

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА
ФАКУЛЬТЕТ ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ,
БИОЛОГИЧЕСКИЙ ФАКУЛЬТЕТ

На правах рукописи

Куренкова Анастасия Дмитриевна

**Влияние пролил-глицил-пролина (PGR) и его ацетилированной формы (N-AsPGR) на
развитие ишемического повреждения миокарда у крыс**

Специальность — 03.03.01 — Физиология

ДИССЕРТАЦИЯ

на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научные руководители:
доктор биологических наук, доцент/с.н.с.
Умарова Белла Анверовна
кандидат биологических наук, доцент
Гаврилова Светлана Анатольевна

Москва - 2018

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ.....	10
1.1. Глипролины и их роль в воспалении.....	10
1.2. Тучные клетки и их роль в воспалении.....	14
1.3. Воспалительный ответ при инфаркте миокарда и роль тучных клеток в регуляции процесса.....	20
1.4. Изменение variability ритма сердца и вегетативной регуляции сердца при инфаркте миокарда.....	24
1.5. Изменение гемодинамических параметров и показателей работы сердца после инфаркта миокарда.....	30
2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ.....	32
3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	42
3.1. Сравнительный анализ действия PGP и N-AsPGP на секреторную активность перитонеальных тучных клеток крыс и проницаемость сосудов, обусловленную активацией тучных клеток.....	42
3.2. Исследование влияния синтетических аналогов PGP на секрецию гистамина тучными клетками и проницаемость сосудов кожи.....	45
3.3. Влияние PGP и N-AsPGP на динамику морфологических изменений в сердце после моделирования инфаркта миокарда.....	48
3.4. Сравнительный анализ параметров ВРС и гемодинамики в норме у крыс с исходно высоким и низким уровнем variability ритма сердца.....	52
3.5. Сравнение изменения вегетативной регуляции сердца и гемодинамических показателей у крыс с исходно высоким и низким уровнем variability ритма сердца после моделирования необратимой ишемии.....	56
3.5.1. В состоянии спокойного бодрствования.....	56
3.5.2. Изменения гемодинамических параметров у наркотизированных НВ и ВВ крыс на 3 и 28 сутки после инфаркта миокарда.....	57
3.5.3. Анализ размера некроза, рубца, веса и выживаемости животных с исходно низким и высоким уровнем ВРС после инфаркта миокарда.....	61
3.6. Исследование влияние PGP и N-AsPGP на динамику развития инфаркта миокарда у крыс с исходно высоким и низким уровнем variability ритма после моделирования необратимой ишемии.....	63
3.6.1. Влияние пептидов PGP и N-AsPGP на параметры ВРС после инфаркта миокарда. .	63

3.6.2. Влияние PGR и N-AsPGR на гемодинамические параметры после инфаркта миокарда в покое и при использовании фармакологических тестов.....	68
3.6.3. Влияние PGR и N-AsPGR на массу и выживаемость животных, а также размеры поражения сердца после инфаркта миокарда.....	79
3.7. Влияние пептидов на морфофункциональный статус тучных клеток сердца после инфаркта миокарда.....	83
3.7.1. Динамика изменения морфофункционального статуса тучных клеток при необратимой ишемии.....	83
3.7.2. Влияние PGR и N-AsPGR на состояние популяции тучных клеток на различных сроках инфаркта миокарда.....	86
4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	95
5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ.....	102
6. ВЫВОДЫ.....	103
7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ.....	104
8. ЛИТЕРАТУРА.....	106

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность проблемы и степень её разработанности

Трипептид семейства глипролинов пролил-глицил-пролин (PGP) обладает широким спектром противовоспалительных эффектов, обеспечивающих протекторное и терапевтическое действие при различных патологиях с воспалительным компонентом. Ранее показано, что PGP способствует заживлению язв желудка (Самонина и др., 2008), влияет на тонус кровеносных сосудов (Бакаева и др., 2003), увеличивает выживаемость животных при анафилактической реакции у мышей (Копылова и др., 2011), оказывает противовоспалительное действие при отёке лапы (Куренкова и др., 2016). В определенной степени протекторные эффекты реализуются через стабилизирующее влияние на тучные клетки, препятствуя усилению секреторной активности тучных клеток в условиях *in vivo* (Умарова и др., 2009, 2011) и предотвращая характерные для активации изменения морфологических параметров клеток (Bondarenko et al., 2013).

Важным является также то, что PGP может образовываться эндогенно из белков внеклеточного матрикса под действием металлопротеиназ и пролилэндопептидазы, выделяемых нейтрофилами. В очаге воспаления PGP может деградировать до метаболитов P и GP или же подвергаться ацетилированию с N-конца с образованием более стабильной формы N-АсPGP (Wells et al., 2014). Существуют данные, свидетельствующие о выраженном провоспалительном действии PGP и N-АсPGP в лёгких, поскольку они являются хемоаттрактантами нейтрофилов, причём N-АсPGP в 30 раз более активен, чем PGP (Haddock et al., 1999). В целом, N-АсPGP за счёт большей стабильности может сохранять и усиливать провоспалительные эффекты PGP. В связи с этим актуальным является изучение влияния этих пептидов на течение воспалительного процесса при заболеваниях, сопряженных с деградацией внеклеточного матрикса (Hahn et al., 2015). Одним из таких патологических процессов является ишемическое повреждение миокарда

В настоящее время ишемическая болезнь сердца и инфаркт миокарда являются ведущими причинами смерти в мире. Избыточная активация симпатического отдела вегетативной нервной системы (ВНС) во время инфаркта провоцирует дополнительное повреждение миокарда, а снижение вариабельности сердечного ритма (ВРС) дает плохой прогноз на жизнь пациента (Buccelletti et al., 2009). Инициатором воспалительной реакции в сердце являются тучные клетки, расположенные вблизи нервных окончаний (Keith et al., 1995), что свидетельствует о регуляции их секреторной активности со стороны ВНС (Morrey et al., 2010). Исследователи выделяют людей с изначально разным соотношением симпатических и парасимпатических влияний на миокард - симпатотоников, нормотоников и ваготоников,

причём адаптационные возможности сердечнососудистой системы у таких людей отличаются (Чуян и др., 2009). Сведений о том, как влияет исходный баланс парасимпатического и симпатического отделов ВНС на морфофункциональный статус тучных клеток при инфаркте миокарда в литературе нет.

Активация тучных клеток приводит к высвобождению медиаторов, регулирующих процесс воспаления на всех этапах его развития. Так, высвобождение гистамина и серотонина приводит к увеличению проницаемости сосудов и обеспечивает хемотаксис нейтрофилов и других клеток крови (Metcalf et al., 1997; Metz et al., 2007; Puxeddu et al., 2003). Как нейтрофилы, так и тучные клетки способны секретировать протеазы, приводящие к деградации внеклеточного матрикса и генерации пептидов гликолиинового ряда. У мышей с дефицитом тучных клеток после инфаркта сократительная способность миокарда выше по сравнению с мышами дикого типа, а также меньше зона некроза (Bot et al., 2008). Сходным эффектом обладали и стабилизаторы мембран тучных клеток кетотифен и кромолин (Levick et al., 2011), что может свидетельствовать о негативной регуляции тучными клетками воспалительного процесса при инфаркте миокарда.

Однако тучные клетки секретируют факторы роста, стимулирующие ангиогенез, а также пролиферацию клеток эндотелия и фибробластов, что необходимо для образования рубца после инфаркта (Frangogiannis et al., 2002). Гистамин тучных клеток участвует в репарации ткани за счёт привлечения макрофагов в очаг воспаления (Deng et al., 2015). Учитывая обширное регуляторное влияние тучных клеток, можно заключить, что их роль зависит от стадии воспаления и изучена не полностью.

Тучные клетки с одной стороны являются инициаторами воспалительного ответа, а с другой стороны могут участвовать в регуляции заживления. Поэтому перспективными в отношении коррекции воспалительной реакции могут оказаться препараты, регулирующие секреторную активность тучных клеток, не имеющие выраженных побочных эффектов. К ним можно отнести эндогенные пептиды, такие как PGP и, возможно, его более стабильная ацетилированная форма. Влияние этих пептидов на ишемическое повреждение миокарда ранее не исследовалось.

Цель работы изучить влияние пептидов пролил-глицил-пролина (PGP) и его ацетилированной формы (N-АсPGP) на развитие ишемического повреждения миокарда у крыс.

Задачи исследования

1. Провести сравнительный анализ действия PGP и N-АсPGP на секреторную активность тучных клеток крыс и увеличение проницаемости сосудов, обусловленное активацией тучных клеток.

- определить зависимость степени высвобождения гистамина перитонеальными тучными клетками от концентрации PGP и N-АсPGP;

- определить способность пептидов влиять на концентрацию внутриклеточного кальция при активации тучных клеток;

- определить способность пептидов влиять на сосудистую проницаемость, вызванную активацией тучных клеток разными триггерами.

2. Выявить структурно-функциональную зависимость физиологической активности синтетических аналогов PGP: изучить их влияние на секреторную активность тучных клеток и на проницаемость сосудов.

3. Изучить изменение вегетативной регуляции сердца и гемодинамических параметров у крыс после моделирования необратимой ишемии у крыс с исходно высоким и низким уровнем ВРС:

- определить параметры ВРС и гемодинамики в острый и хронический период развития ишемического повреждения;

- оценить общее состояние животных, размеры некроза и рубца.

4. Исследовать влияние PGP и N-АсPGP на динамику развития инфаркта миокарда у крыс после моделирования необратимой ишемии у крыс с исходно высоким и низким уровнем ВРС:

- определить параметры ВРС и гемодинамики в острый и хронический период развития ишемического повреждения;

- изучить влияние PGP и N-АсPGP на морфологические изменения ткани сердца в острый и хронический период развития ишемического повреждения

- оценить общее состояние животных, размеры некроза и рубца.

5. Исследовать влияние PGP и N-АсPGP на морфофункциональный статус тучных клеток после моделирования необратимой ишемии у крыс с исходно высоким и низким уровнем ВРС.

Научная новизна

В работе впервые было показано, что минимальными структурными единицами синтетических глипролинов, необходимой для реализации эффектов пептидов на тучные клетки, являются дипептиды PG и GP. Установлено, что ацетилирование не отменяет эффектов PGP на тучные клетки. На модели необратимой ишемии впервые было показано, что динамика развития инфаркта миокарда у крыс, его исход и эффекты пептидов зависят от исходной

вариабельности сердечного ритма. Показано провоспалительное действие N-АсPGP в модели необратимой ишемии, заключающееся в увеличении размера некроза и массы рубца после инфаркта миокарда.

Теоретическая и практическая значимость

Теоретическое значение результатов работы состоит в том, что изучен опосредованный стабилизацией тучных клеток механизм участия эндогенных пептидов глипролинового ряда в регуляции воспаления и установлена взаимосвязь физиологической активности со структурой пептидов. Изучение процессов регуляции воспалительной реакции в сердце имеет несомненное практическое значение для разработки новых стратегий терапии инфаркта миокарда, основанных на коррекции секреторной активности тучных клеток. Наличие у PGP и N-АсPGP протекторных свойств позволяет считать их перспективными для разработки новых подходов в терапии. Однако проявление провоспалительных эффектов N-АсPGP в модели необратимой ишемии делает приоритетной задачу подробного изучения механизмов действия пептидов.

Методология и методы исследования

В представленной работе применялись физиологические, гистологические и биохимические методы. Была оценена вариабельность ритма сердца и гемодинамические показатели у крыс. Для оценки морфологии миокарда использовались стандартные гистологические методы подготовки препаратов, получения срезов и их окрашивания. Для измерения количества секретируемого тучными клетками гистамина, концентрации внутриклеточного кальция и экстравазации красителя Evans Blue использовали флуориметрию.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Ацетилирование пролил – глицил – пролина не приводит к изменению его способности влиять на секрецию гистамина тучными клетками. Эффект пептидов связан с ингибированием кальциевого ответа на стимуляцию.
2. Минимальной структурной единицей, снижающей секреторную активность тучных клеток, и, как следствие, препятствующей увеличению проницаемости сосудов при активации тучных клеток являются дипептиды PG и GP.
3. Развитие инфаркта миокарда у крыс с исходно высокой и низкой вариабельностью ритма сердца имеет свои особенности, которые могут влиять на характер действия пептидов PGP и N-АсPGP на ишемическое поражение сердца.

4. Эффекты пептидов PGP и N-AsPGP на динамику изменения числа тучных клеток при моделировании необратимой ишемии у крыс зависят от исходного баланса влияний на ритм сердца парасимпатического и симпатического отделов вегетативной нервной системы, в то время как действие пептидов на дегрануляцию тучных клеток сердца не определяется исходной вариабельностью ритма сердца.

Степень достоверности данных

Достоверность полученных данных подтверждается использованием современных общепринятых экспериментальных методик, достаточным объёмом выборок и актуальными методами статистического анализа. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием современной тематической литературы.

Апробация результатов

Основные результаты исследования были представлены в виде тезисов (8), устных (6) и стендовых сообщений (6) на следующих конференциях:

XI, XII, XIII Международный Междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии»;

XXII, XXIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2014», «Ломоносов-2015», «Ломоносов-2016»;

Актуальные проблемы патофизиологии: XXI Всероссийская конференция молодых ученых с международным участием;

VII Российский симпозиум «Белки и пептиды»;

II Научная конференция «Физиологическая активность регуляторных пептидов», посвященная 90-летию со дня рождения академика РАМН Игоря Петровича Ашмарина;

VI Всероссийская с международным участием школа-конференция по физиологии кровообращения;

XIX международная медико-биологическая научная конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье»;

XXIII и XXIV Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии»;

XXIII съезд Физиологического общества им. И. П. Павлова;

II молодежная школа-конференция «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций».

Диссертационная работа апробирована 11 октября 2018 года на заседании кафедры

физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины и 22 октября 2018 года на заседании кафедры физиологии человека и животных биологического факультета МГУ имени М.В. Ломоносова

Публикации

По материалам диссертации опубликованы 19 печатных работ: 4 статьи в периодических изданиях, индексируемых аналитическими базами Scopus, Web of Science, RSCI и рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.06 по специальности 03.03.01 – физиология, и 15 тезисов в сборниках докладов международных и всероссийских научных конференций.

Личный вклад автора

Автор принимала непосредственное участие в планировании экспериментов, хирургических операциях, проведении биохимических и гистологических исследований; анализе, статистической обработке и обобщении результатов; подготовке статей и тезисов; представлении результатов работы на всероссийских и международных конференциях.

Структура и объём диссертации

Диссертация изложена на 117 страницах и включает введение, обзор литературы, описание методов исследования, результаты, обсуждение, заключение, выводы, список цитируемой литературы (содержит 135 источников) и список сокращений. Работа иллюстрирована 47 рисунками и содержит 5 таблиц.

1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Глипролины и их роль в воспалении

Короткие пептидные фрагменты глипролины или матрикины, содержащие аминокислоты пролин и глицин, впервые были получены путём протеолитического расщепления эластина аорты человека и связок быка (Senior et al., 1980). Позднее было показано, что последовательность пролил-глицил-пролин (PGP) содержится и в других белках внеклеточного матрикса, например, коллагене, фибронектине, ламинине и протеогликанах (Pfister, Haddox, Sommers, 1998). При воспалении в генерации пептидов участвуют такие ферменты как матриксные металлопротеиназы 8 и 9 (Gaggar et al., 2008) и пролилэндопетидаза, выделяемые нейтрофилами (O'Reilly et al., 2009).

Широко известны провоспалительные свойства глипролинов, преимущественно обуславливающиеся способностью привлекать нейтрофилы и в меньшей степени макрофаги в очаг воспаления (Senior, Griffin, Mecham, 1980). Введение PGP в глаз вызывало увеличение палочкоядерных нейтрофилов в роговице, что было схоже с гистологической картиной щелочного повреждения (Pfister, Haddox, Sommers, 1998). Однако гораздо большую активность в отношении нейтрофилов может проявлять ацетилированная форма N-АсPGP (Haddox et al., 1999). N-АсPGP также образуется в очаге воспаления из PGP химическим ацетилированием, например, при действии акролеина и в отличие от PGP не подвергается быстрой деградации с помощью лейкотриен А4 гидролазы (LTA4H) (Barnes, 2010), усиливая воспалительную реакцию (Wells et al., 2014) (рисунок 1). PGP обнаруживаются в бронхоальвелярном лаваже у крыс после аэрозольной экспозиции LPS через 12 часов в концентрации 231 нг/мл (Weathington et al., 2006), а также в мокроте здоровых пациентов в концентрации 22 пг/мл и у больных хронической обструктивной болезнью лёгких (ХОБЛ) в концентрации 58 пг/мл. Лечение ХОБЛ с помощью азитромицина уменьшало количество PGP в мокроте, что позволяет рассматривать пептид в качестве потенциального биомаркера (O'Reilly et al., 2013). N-АсPGP в свою очередь практически отсутствует у здоровых пациентов, но при ХОБЛ его концентрация возрастает до 163 пг/мл (O'Reilly et al., 2009). Интересно то, что мокрота больных ХОБЛ сама по себе способна расщеплять коллаген I типа с образованием PGP и в меньшей степени N-АсPGP (O'Reilly et al., 2009).

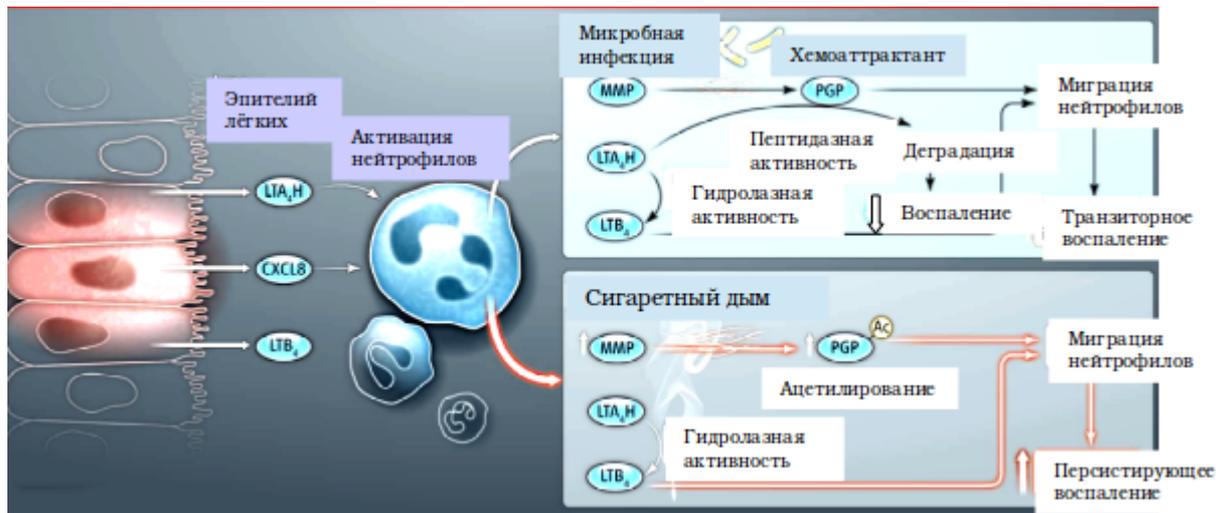


Рисунок 1. Образование PGP и N-АсPGP и их роль в лёгких при воспалении (Barnes, 2010, с изменениями).

Несмотря на это, было показано, что PGP обладает и противовоспалительным действием. Пептид в концентрации 3,7 мкмоль/кг, введённый за 15 минут до индукции воспаления уменьшал размеры отёка, вызванного подкожным введением гистамина и каолина (Бондаренко и др., 2010). На модели анафилактической реакции у мышей, вызванной введением вещества 48/80, предварительное введение PGP увеличивало количество выживших животных и ослабляло выраженность симптомов анафилактического шока (Korylova et al., 2011). PGP, а также его метаболиты PG и GP уменьшали базальную секрецию кислоты желудком, но оказались неэффективны в отношении стимулированной карбахолом и гистамином (Фалалеева и др., 2010а). При этом на различных моделях язвообразования PGP, PG и GP уменьшали поражение слизистой оболочки желудка (Самонина и др., 2008; Фалалеева и др., 2010b). Также PGP и его метаболиты практически полностью устраняли нарушение сократительной активности лимфатических сосудов при экспериментальном остром перитоните (Умарова и др., 2003; 2009). PGP увеличивал устойчивость крыс в условиях острой гипобарической гипоксии и устранял постгипоксические нарушения поведения (Эдеева и др., 2008). В отношении стрессогенных нарушений поведения PGP оказывался также эффективен (Бадмаева и др., 2005). Было показано, что эффекты PGP на поведение могут быть опосредованы связыванием пептида с D2 и D3 дофаминовыми рецепторами (Meshavkin et al., 2011). В нормальном состоянии введение PGP и другого глипролина семакса (фрагмент АКТГ₄₋₇-PGP) улучшали работу мозга за счёт стимуляции пролиферации нейроглии и эндотелия, увеличения капиллярной сети и стимуляции пролиферации клеток предшественниц в субвентрикулярной зоне. Но нейропротекторный эффект на модели неполной глобальной ишемии сохранялся только у семакса (Stavchansky et al., 2011). Хотя для обоих пептидов была

показана способность задерживать развитие нарушений кальциевой регуляции и уменьшать потенциал митохондрий в условиях глутаматной нейротоксичности (Storozhevych et al., 2007).

Протекторные свойства PGP связывают с его способностью стабилизировать тучные клетки — основные модуляторы воспалительного ответа. Предварительная обработка изолированных тучных клеток пептидом приводила к снижению секреции ими провоспалительных медиаторов гистамина и β -гексоаминидазы (Умарова и др., 2011). Также была показана способность PGP снижать проницаемость сосудов в различных моделях, а также уровень цитоплазматического кальция при активации тучных клеток веществами различной природы (Бондаренко и др., 2017). В реализации защитных свойств PGP могут участвовать и другие, не связанные со стабилизацией тучных клеток механизмы, поскольку блокада тучных клеток кетотифеном на модели анафилактического шока не устраняла полностью протекторное действие PGP (Korylova et al., 2011).

Защитные свойства N-AsPGP изучены не так детально. При подкожном введении N-AsPGP в дозах от 7,5 и до 17,5 мг/кг увеличивал выживаемость животных в экспериментальных моделях перитонита и сепсиса. Вероятно, этот эффект связан с изменением цитокинового профиля, а именно увеличением продукции лейкоцитами $IFN\gamma$ и $IL-12$ и уменьшением секреции $TNF\alpha$, $IL1\beta$ и $IL-6$. Также N-AsPGP оказывал антиапоптотическое действие на иммунные клетки. Поскольку эти результаты противоречат данным о провоспалительном действии N-AsPGP при ХОБЛ, авторами было высказано предположение, что такие различия в действии N-AsPGP могут объясняться зависимостью эффекта пептида от выбора модели, состояния животных, способа и частоты введения пептида (Kim et al., 2011). Для обоих пептидов была показана способность изменять цитокиновый профиль в моделях этанолового стрессорного и ацетатного язвообразования (Сангаджиева и др., 2013). Пептиды уменьшали секрецию провоспалительных цитокинов ($INF\gamma$ и $TNF\alpha$) лимфоцитами и увеличивали секрецию MCP-1 и противовоспалительного $IL-17\alpha$ клетками лимфоузла.

Известно, что пептиды PGP и N-AsPGP имеют структурную гомологию с хемокинами CXCL1, CXCL2, CXCL3 у грызунов и CXCL8 (IL-8) у человека (Weathington et al., 2006). Блокада CXCL8 (IL-8) с помощью антител уменьшала воспалительный ответ в лёгких за счёт уменьшения миграции нейтрофилов (Sekido et al., 1993). Интересно то, что именно группировка GP в структуре этого интерлейкина важна для активации клеток (Clark-Lewis et al., 1994). Блокада рецептора CXCR2, а также использование в эксперименте мышей, нокаутных по гену рецептора, показала, что при отсутствии рецептора PGP и N-AsPGP не вызывали хемотаксис нейтрофилов (Weathington et al., 2006). Однако, существуют данные, что N-AsPGP действует не прямо через рецептор, поскольку не вытесняет радиолиганд (^{125}I)CXCL8 и не способен вызывать активацию G-белка и рекрутмент β -аррестина в клетках, экспрессирующих CXCR1 и

2 (Kruijff de et al., 2010). С другой стороны, также было показано, что N-АсPGR может активировать нейтрофилы напрямую зависимо от G i/o белка, и это вызывает секрецию нейтрофилами CXCL8, который в свою очередь может отвечать за хемотаксис (Overbeek et al., 2011). Такое противоречие авторы связывают с различиями в клеточных культурах, на которых проводили эксперименты. Помимо этого, N-АсPGR может активировать тирозинкиназы факторов роста, тем самым приводя к активации рецепторов, сопряженных с G-белком (Delcourt, Vockaert et al., 2007). Интересно и то, что индуцированный N-АсPGR хемотаксис опосредуется через фосфолипазный путь и связан с увеличением внутриклеточного кальция (Stillie et al., 2009), в то время как хемотаксис, вызываемый CXCL8, может проходить как через активацию PLC, так и независимо от IP3 с помощью активации каналов, регулируемых высвобождением кальция из депо (SOC), то есть возможно N-АсPGR и CXCL8 индуцируют хемотаксис через различные сигнальные пути (Overbeek et al., 2011).

Дополнительно в ряде работ было высказано предположение, что пептид может связываться и с другими мембранными белками. В поддержку этой гипотезы говорит тот факт, что PGR способен специфически связываться с нейронами базальных ядер в переднем мозге у крыс и снижать взаимодействие агонистов рецепторов каннабиоидов, никотиновых и NMDA со своими рецепторами (V'upova et al., 2008). Также было показано, что N-АсPGR усиливает адгезию нейтрофилов к эндотелию за счёт изменения конформации интегрина Mac-1 (CD11b/CD18) (Overbeek et al., 2013).

Таким образом, механизмы действия пептидов изучены достаточно слабо, очевидно, что пептиды могут иметь широкий спектр мишеней и проявлять как про-, так и противовоспалительные свойства, зависящие от дозы, выбранной модели воспаления и многих других факторов. PGR и его ацетилированная форма являются важными эндогенными регуляторами от которых зависит течение и исход заболевания и необходимо изучать влияния этих пептидов на воспалительный процесс, при котором происходит деградация внеклеточного матрикса, например, при реперфузионном повреждении миокарда, повреждении почек или при инфаркте миокарда (Hahn et al., 2015).

1.2. Тучные клетки и их роль в воспалении

Тучные клетки (рисунок 2) — это тканевые клетки миелоидного ряда, содержащие в цитоплазме большое количество базофильных гранул. Они находятся в соединительной ткани различных органов, начиная от кожи и заканчивая мелкими кровеносными и лимфатическими сосудами.

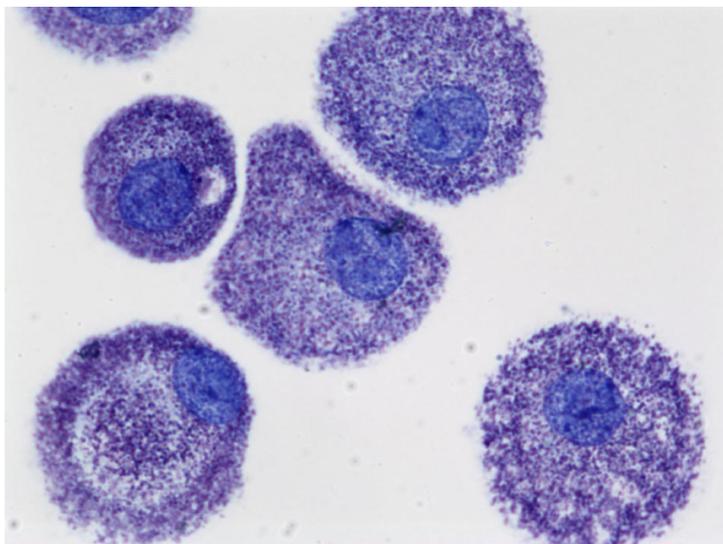


Рисунок 2. Тучные клетки, окраска толуидиновым синим, увеличение 400x (Metcalfе, 2008).

Тучные клетки являются аналогами базофилов крови и имеют схожую линию дифференцировки. Известно, что тучные клетки и базофилы имеют общий предшественник в красном костном мозге, но до сих пор не известно, происходит ли он из общего миелоидного предшественника или является частью эозинофильно-базофильного пути (Jamur, Oliver, 2011). Из костного мозга предшественники тучных клеток попадают в селезёнку, где могут депонироваться некоторое время. Депо предшественников тучных клеток находятся в костном мозге, селезёнке, крови, лимфатических узлах и мукозальном слое кишечника (Crappер, Schrader, 1983). Основные факторы, определяющие дифференцировку тучных клеток - фактор стволовых клеток (SCF) и IL-3; в качестве кофакторов выступают IL-4, IL-9, IL-10 (а в слизистых оболочках IL-33) и фактор роста нервов (NGF) (Furitsu et al., 1989; Nakahata et al., 1986). Из селезёнки клетки снова поступают в кровоток, а затем, под действием определённых стимулов, мигрируют в ткани. В ткани завершается созревание и определяется конечный фенотип тучной клетки под действием микроокружения, что обеспечивает такую их важную особенность, как возможность различного ответа на стимулы в зависимости от ткани (Frossi et al., 2004).

На основе фенотипического и биохимического различия можно выделить субпопуляции

тучных клеток. У грызунов выделяют мукозальные тучные клетки (МТК) в стенке кишечника и соединительно-тканые тучные клетки (СТТК) (Metcalfе et al., 1997). МТК меньше по размеру, содержат меньше гистамина и серотонина, чем СТТК, и отвечают иначе на различные стимулы.

Таблица 1. Характеристика тучных клеток грызунов (Metcalfе et al., 1997).

Характеристика	СТТК	МТК
Размер	10-20 мкм	5-10 мкм
Фиксация формальдегидом	Устойчивые	Чувствительные
Окрашивание	Сафранин	Альциановый синий
Развитие в зависимости от Т-клеток	Нет	Да
Содержащаяся протеаза	Химаза (RMCP I)	Химаза (RMCP II)
Молекулярная масса протеогликанов	Гепарин 750-1000 кДа	Хондроитин сульфат 100-150 кДа
5-гидрокситриптамин	1-2 пг/клетка	<0.5 пг/клетка
Гистамин	10-20 пг/клетка	1 пг/клетка
Простагландин D2	+	+
Лейкотриен C4	-	++
Активируются связыванием с FcεRI	Да	Да
Соединением 48/80	Да	Нет
Субстанцией P	Да	Нет
Ингибирование хромогликатом натрия	Да	Нет

RMCP (rat mast cell protease) — протеаза тучных клеток крыс

Но не все тучные клетки могут быть классифицированы таким образом. Например, субэпидермальные клетки крыс имеют признаки СТТК и МТК (Gurish, Austen, 2001).

Как у мышей и крыс, у человека можно выделить субпопуляции тучных клеток, различающиеся по содержанию нейтральных протеаз. Некоторые тучные клетки содержат триптазу, химазу и катепсин G. Эти клетки называются ТК_{тх} по содержанию триптазы и химазы. Также есть ТК_т, содержащие только триптазу, и ТК_х, содержащие только химазу. Последние локализуются в основном в слизистых желудочно-кишечного тракта (Crivellato et al., 2004). На основе локализации в тканях и некоторых биохимических признаков ТК_т человека имеют сходство с МТК крыс, а ТК_{тх} с СТТК.

В действительности деление на субпопуляции весьма условно, существуют клетки с

признаками обеих групп, а также есть данные о том, что тучные клетки могут менять свой фенотип и переходить из одной субпопуляции в другую. Но, тем не менее, классификация тучных клеток важна, в связи с их различной физиологической ролью. Например, при воспалении желудочно-кишечного тракта, МТК не активируются, а ответ опосредуется клетками, имеющими сходство и с МТК, и с СТТК (Theoharides, Cochrane, 2004).

Тучные клетки сердца в большом количестве локализованы в районе ушек предсердий и по характеристике мембранных антигенов похожи на тучные клетки в лёгких и матке. Причина такой локализации остаётся неизученной, считается, что эти тучные клетки выполняют эндокринную функцию в предсердиях. Так, химаза тучных клеток способна расщеплять предшественник предсердного натрийуретического пептида до активной формы, а также регулировать работу ангиотензинпревращающего фермента и образование эндотелина. Помимо этого, тучные клетки регулируют систему свёртывания крови и работу эндотелия. Увеличение числа тучных клеток в миокарде является важным признаком развития заболеваний сердца, таких как фиброз после трансплантации, тромбоз, дисфункция миокарда и других. При анализе гистологического материала было выявлено, что в сердце человека представлены две субпопуляции тучных клеток: TK_{tx} (90%) в эпикарде миокарда и эндокарде и TK_r . Как и практически все тучные клетки, тучные клетки сердца высвобождают гистамин при связывании IgE со своим рецептором. Интересно то, что SCF может вызывать дозозависимую секрецию гистамина тучными клетками сердца и усиливать ответ клеток на IgE, как это было показано для тучных клеток лёгких и матки (Sperg et al., 1994).

Медиаторы тучных клеток (Adkinson, Busse, 2009) можно разделить на две группы: преформированные медиаторы, которые синтезируются и запасаются в течение жизни клетки, и синтезированные *de novo* вследствие активации. Эффекты разных медиаторов проявляются в разное время, например, эффекты гистамина заметны в первые минуты после активации, а белковые медиаторы синтезированные *de novo* секретируются через несколько часов и отвечают за «позднюю фазу» воспаления. К преформированным медиаторам тучных клеток относятся гистамин, серотонин, нейтральные протеазы (химаза, триптаза, карбоксипептидаза G), кислые гидролазы (β -гексозаминидаза, β -глюкоронидаза, β -D-галактозидаза, арилсульфатаза), протеогликаны (гепарин, хондроитин 4,6, гиалуроновая кислота), различные пептиды (эндотелин, эндорфины, CRH, субстанция P, соматостатин, кинины и другие), а также некоторые цитокины (TNF α , IL-8, MCP-1, MCP-3, MCP-4). К медиаторам, синтезированным *de novo*, относятся в первую очередь метаболиты арахидоновой кислоты (простагландины, лейкотриены, тромбоксаны, липоксины), различные цитокины ((IL) — 1,2,3,4,5,6,9,10,13,16, INF- γ , MIF, TNF- α), а также факторы роста и пролиферации других клеток CSF, GM-CSF, b-FGF, NGF, VEGF.

Связывание рецептора на поверхности тучной клетки с лигандом вызывает её активацию и секрецию биологически активных веществ, участвующих в запуске иммунных ответов, таких как воспаление, аллергические реакции, а также реакций на стрессорные воздействия или присутствие в организме паразита. Способы активации тучных клеток принято делить на иммунную и неиммунную активацию. Иммунная активация связана с взаимодействием антигена с присоединённой молекулой иммуноглобулина IgE, с соответствующим рецептором на поверхности тучной клетки FcεRI (а так же FcεRII и FcεRIII). Неиммунная активация осуществляется различными веществами, в том числе аденозином, легкими цепями антител, различными белковыми сигнальными соединениями и другими молекулами. Вещества могут действовать как через их специфический рецептор, так и с помощью иных механизмов (Adkinson, Busse, 2009).

Неиммунная активация тучных клеток чрезвычайно важна для регуляции многих процессов, в том числе и для поддержания гомеостаза. Показана роль тучных клеток в ответе организма на стрессорные стимулы. При стрессе активируется гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая система, что приводит к стимуляции секреции АКТГ, CRH и глюкокортикоидов. При введении АКТГ крысам, уровень активации тучных клеток совпадает с таковым при стрессе, а введение блокаторов снимает этот эффект. CRH способен активировать тучные клетки кожи (Theoharides et al., 1995) при этом тучные клетки секретируют VEGF и происходит увеличение проницаемости сосудов (Cao et al., 2006). Более того, степень дегрануляции тучных клеток брыжейки и подкожной клетчатки увеличивается при иммобилизационном, водоиммерсионном стрессе, а также при введении холецистокинина-4 (Умарова и др., 2003). Также было показано, что стресс усиливает многие патологические процессы, такие как кожное и коронарное воспаление, астма, артрит, цистит и воспаления желудочно-кишечного тракта, именно за счёт взаимодействия CRH с тучными клетками (Theoharides, Cochrane, 2004).

Иммунная активация тучных клеток приводит к слиянию гранул с медиаторами с мембраной клетки, за счёт чего в межклеточное пространство попадает множество медиаторов. Но также секреция медиаторов возможна путем так называемой дифференциальной (селективной) секреции, необходимой для выброса определённых медиаторов в ответ на различные стимулы без секреции гистамина и развития анафилактического шока. Например, активация тучных клеток CRH приводит к секреции VEGF, но не секреции гистамина или триптазы (Cao et al., 2006).

Благодаря медиаторам, содержащимся в гранулах, а также распространению тучных клеток по всему организму и способности отвечать на множество стимулов, тучные клетки занимают особое положение среди клеток, принимающих участие в воспалительном и

иммунном ответе. Была показана роль тучных клеток не только в развитии анафилактических и анафилактоидных реакций, но и в патогенезе аутоиммунных заболеваний (например, ревматоидного артрита и рассеянного склероза) (Brown, Hatfield, 2012), нарушении работы репродуктивной системы (Menzies et al., 2011), защите от патогенных организмов (Malaviya, Abraham, 2001) и развитии раковых опухолей (Pittoni, Colombo, 2012) (рисунок 3).

Тучные клетки принимают участие практически на всех стадиях воспалительного ответа. Помимо выделения провоспалительных медиаторов, большинство которых способно увеличивать проницаемость сосудов, тучные клетки секретируют различные цитокины, обеспечивающие привлечение клеток в очаг воспаления и их взаимодействие (рисунок 3). Тучные клетки секретируют хемоаттрактанты для нейтрофилов, эозинофилов (Abraham, St John, 2010) и даже для макрофагов и Т-клеток, необходимых для модуляции хронического воспаления (Metz et al., 2007).

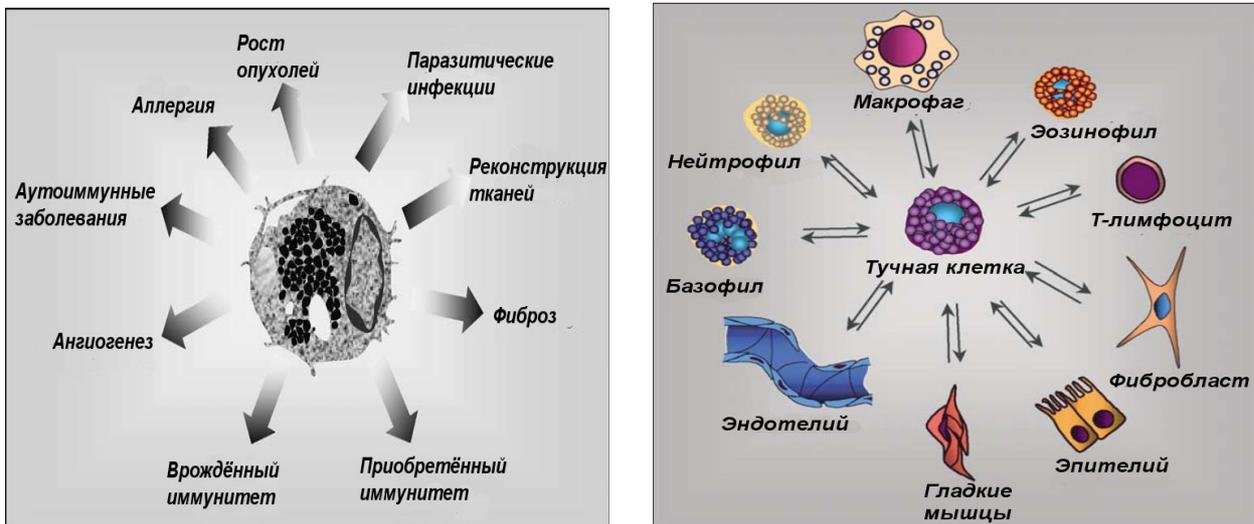


Рисунок 3. Связь тучных клеток с различными физиологическими процессами (Puxeddu et al., 2003).

Тучные клетки могут выступать в роли как провоспалительных, так и противовоспалительных агентов. С одной стороны, выделяющиеся из тучных клеток медиаторы вызывают вазодилатацию и увеличение проницаемости сосудов, способствуя развитию воспаления. С другой - воспалительные медиаторы увеличивают проницаемость гематоэнцефалического барьера (Abbott, 2000) и способны действовать на гипоталамус, стимулируя гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковую ось и синтез надпочечниками кортизола, тормозящего воспалительный процесс (Gurish, Austen, 2001). Множество заболеваний, таких как астма, артрит, рассеянный склероз, мигрени связаны с воспалением. Известно, что стресс отягощает течение таких патологий и это обычно сопровождается чрезмерной активацией

тучных клеток (Theoharides, Kalogeromitros, 2006). Кроме этого, стрессорные воздействия способны сами по себе вызвать увеличение секреторной активности тучных клеток *in vivo* (Смирнова и др., 2003; Умарова и др., 2003).

Известно, что атеросклероз является ведущей причиной развития инфаркта миокарда. При формировании бляшки тучные клетки скапливаются в зоне риска и оказывают влияние на деятельность макрофагов, обмен ЛПОНП и состояние эндотелия (Bot et al., 2008). При этом тучные клетки секретируют гистамин, PGD_2 и LTC_4 , вызывающие вазоспазм, уменьшение просвета сосуда и как следствие ишемию (Laine et al., 1999).

1.3. Воспалительный ответ при инфаркте миокарда и роль тучных клеток в регуляции процесса

Инфаркт миокарда тесно сопряжен с развитием воспалительной реакции в сердце, возникающей вследствие ишемии. Нарушение кровотока и доставки кислорода в первую очередь ведёт к прогрессирующим метаболическим нарушениям кардиомиоцитов и потере ими сократительной активности вследствие недостатка энергии. Через 20-40 минут наступает необратимая стадия ишемического повреждения, при которой начинается апоптотическая гибель кардиомиоцитов (Reimer et al., 1983). Гибнущие клетки выделяют широкий спектр так называемых молекулярных фрагментов, ассоциированных с повреждениями (DAMPs), которые активируют миграцию иммунных клеток в очаг и воспалительный ответ (Timmers et al., 2012). Противовоспалительная терапия с помощью кортикостероидов на модели необратимой ишемии и ишемии с последующей реперфузией оказалась успешной на собаках и уменьшала размер рубца (Libby et al., 1973), однако при проведении клинических испытаний привела к катастрофическим последствиям (Roberts et al., 1976), поскольку хоть и снижала повреждение в острые сроки, но задерживала репарацию ткани (Kloner et al., 1978).

При формировании зоны некроза в ишемизированном сердце нейтрофилы скапливаются на границе зоны некроза и изредка мигрируют внутрь на 2-4 сутки (Vinten-Johansen, 2004). При восстановлении кровотока нейтрофилы распределяются в первые 6 часов во внутрисосудистом пространстве, а затем мигрируют в строму. Нейтрофилы скапливаются в зоне ишемии и за счёт синтеза АФК, различных протеаз и цитокинов способствуют усилению повреждения миокарда вследствие активации системы комплемента, активации экспрессии Р-селектина, увеличению числа различных хемокинов и увеличения способности ICAM-1 связываться с рецепторами нейтрофилов (Frangogiannis et al., 1998). Аналог простаглицина илопрост, обладающий способностью ингибировать активацию нейтрофилов, уменьшал размеры зоны инфаркта после 90 минут окклюзии и 6 часов реперфузии за счёт снижения аккумуляции нейтрофилов и уменьшения продукции ими супероксид аниона (Simpson et al., 1987). Схожие эффекты были выявлены в экспериментах с применением аденозина (Vinten-Johansen, 2004).

Поскольку основным хемоаттрактантом для нейтрофилов является IL-8, было высказано предположение, что уменьшение его количества с помощью трансфузии эндотелиальных клеток, содержащих рецептор IL-8RA/RB (CXCR1/CXCR2) может оказать терапевтический эффект при инфаркте миокарда. Было показано, что при трансфузии таких клеток мышам уменьшались размер некроза, фракция коллагена, улучшалась насосная функция сердца и уменьшалась экспрессия провоспалительных цитокинов и молекул адгезии в ткани сердца. Авторы отмечают, что эндотелиальные клетки, экспрессирующие рецепторы IL-8 также могут

связывать образующиеся в очаге воспаления PGP и N-АсPGP, препятствуя, таким образом, хемотаксису нейтрофилов под действием этих пептидов (Zhao et al., 2013).

Стоит отметить также, что адгезия нейтрофилов на стенке коронарных сосудов способствует развитию дисфункции эндотелия и уменьшает просвет сосуда. В капиллярах возможно развитие «no-reflow» феномена, заключающегося в уменьшении кровотока в субэндокарде за счёт скапливающихся там нейтрофилов и повреждении ими стенки сосудов (Engler et al., 1983). Если в перфузионной жидкости не будет нейтрофилов, то феномен «no-reflow» не развивается, и отек уменьшается (Jordan et al., 1999).

После инфаркта миокарда тучные клетки скапливаются в субэпикарде (но не субэндокарде) повреждённой зоны и это коррелирует с фракцией коллагена, а также с выраженностью апоптоза кардиомиоцитов (Engels et al., 1995; Levick et al., 2011; Zhang et al., 2006). Считается, что увеличение количества тучных клеток связано не с пролиферацией клеток в миокарде, а преимущественно с миграцией их предшественников в ишемизированный миокард. Факторы, ответственные за миграцию тучных клеток в настоящий момент остаются неизученными, однако чётко выявлена роль SCF в этом процессе. Более того, фактор стволовых клеток также способствует созреванию тучных клеток и уменьшает их апоптоз (Frangogiannis et al., 2002).

Преформированные медиаторы тучных клеток при ишемии незамедлительно инициируют цитокиновый каскад (Frangogiannis et al., 2002), что позволяет считать тучные клетки ключевым регулятором воспалительного процесса на самых ранних этапах развития ишемического повреждения. Гистамин, основным источником которого являются тучные клетки, увеличивает проницаемость сосудов и способствует миграции клеток в очаг воспаления, но в то же время участвует в репарации ткани и заживлении: в эксперименте у животных с отсутствующей гистидиндекарбоксилазой увеличивалась площадь повреждения миокарда вследствие увеличения апоптоза кардиомиоцитов и уменьшения инфильтрации моноцитами-макрофагами (Deng et al., 2015). Такие медиаторы тучных клеток как химаза и триптаза способствуют ремоделированию миокарда и моделируют активность других физиологических регуляторов. Например, химаза может превращать ангиотензин I в ангиотензин II, минуя ангиотензин-превращающий фермент, а триптаза активирует MMPs, приводящие к разрушению внеклеточного матрикса (Bot et al., 2008). Интересно то, что уровень активации ренин-ангиотензин-альдостероновой системы положительно коррелирует с негативным прогнозом исхода инфаркта миокарда, поскольку ангиотензин II и альдостерон увеличивают высвобождение норадреналина из нервных окончаний и уменьшают его обратный захват, что в целом приводит к увеличению повреждающего действия на сердце (Sumners, Raizada, 1986; Weber, Purdy, 1982). Протеазы тучных клеток могут оказывать и противовоспалительное

действие, заключающееся в их способности деградировать С3а, IL-6, TNF α . Интересно также то, что тучные клетки способны регулировать сократительную активность живого миокарда, способствуя её большей сохранности, эти пути реализуются за счет активации PKA и последующего фосфорилирования сократительных белков (Ngkelo et al., 2016).

Локализация тучных клеток возле нервных окончаний (Keith et al., 1995) предполагает, что они также могут подвергаться влиянию со стороны нервной системы. Действительно, на модели ишемии-реперфузии было показано, что субстанция P, высвобождающаяся из нервных окончаний может активировать тучные клетки, вызывая секрецию ими ренина, который в свою очередь является первым звеном в активации ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, приводящей к увеличению системного артериального давления. Примечательно то, что ацетальдегид, токсичный агент, вырабатываемый при нарушении функционирования дыхательной цепи митохондрий, может активировать нервные волокна симпатического отдела вегетативной нервной системы, стимулируя секрецию ими норадреналина, что приводит к активации тучных клеток, приводя к увеличению секреции ренина (Morrey et al., 2010).

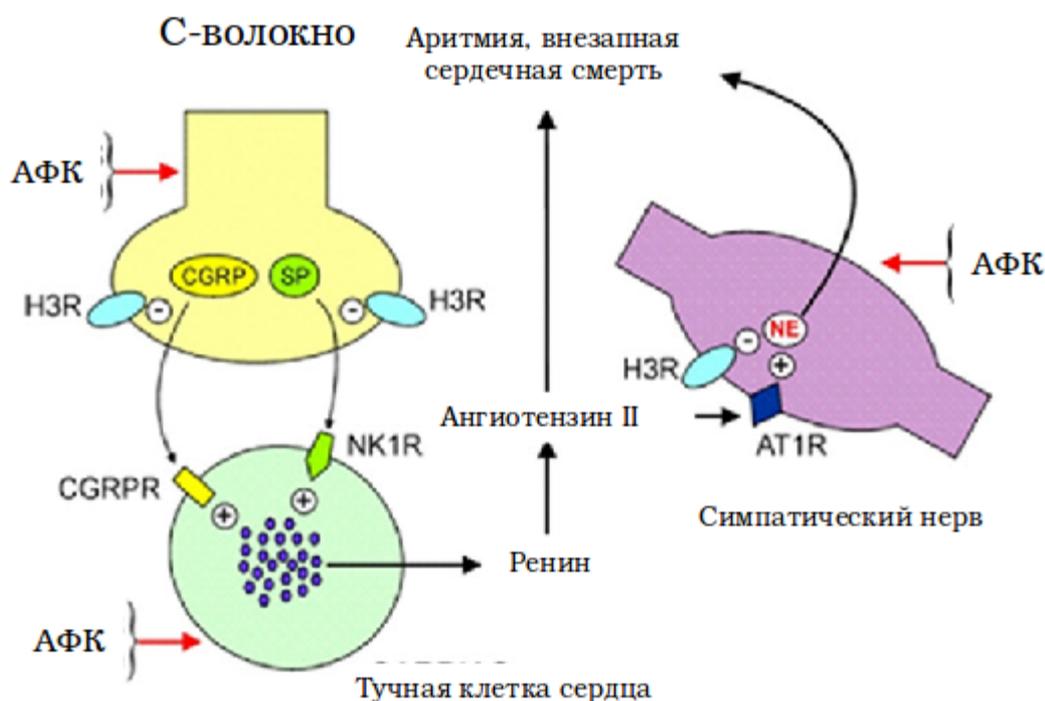


Рисунок 4. Взаимодействие тучных клеток, сенсорных волокон и симпатических нервов при инфаркте миокарда (Morrey et al., 2010, с изменениями)

В целом, у мышей с дефицитом тучных клеток после моделирования инфаркта миокард оставался жизнеспособнее, по сравнению с мышами дикого типа, а также уменьшалась зона некроза (Bot et al., 2008). Сходным эффектом обладали и стабилизаторы мембран тучных клеток, такие как кетотифен и кромолин (Levick et al., 2011), что свидетельствует о негативной регуляции тучными клетками воспалительного процесса при инфаркте миокарда. Однако, на более поздних этапах воспалительной реакции медиаторы тучных клеток стимулируют ангиогенез, а также пролиферацию клеток эндотелия и фибробластов, за счёт секреции VEGF и FGF, что стимулирует образование рубца после инфаркта (Frangogiannis, Smith, Entman, 2002).

1.4. Изменение variability ритма сердца и вегетативной регуляции сердца при инфаркте миокарда

Вариабельность ритма сердца (BPC) отражает изменения в длинах RR интервалов, связанных со взаимодействием двух отделов вегетативной нервной системы (ВНС): симпатического и парасимпатического при регуляции ритма сердца. Изменения в длительности интервалов между двумя кардиоциклами могут возникать вследствие адаптации сердца к изменяющимся условиям среды, а также могут свидетельствовать об эмоциональном стрессе и различных заболеваниях. Существует деление людей на подгруппы с преобладанием влияния одного из отделов вегетативной нервной системы (ВНС): симпатотоники ($SDNN=25,81\pm 2,31$) с преобладанием центрального контура регуляции, ваготоники ($SDNN=71,2\pm 2,38$) с преобладанием автономного контура регуляции и нормотоники ($SDNN=46,78\pm 1,51$), причём как было показано, наибольшие адаптационные возможности сердечно-сосудистой системы характерны для ваготоников (Чуян и др., 2009).

Поскольку регуляция ритма сердца представляет собой сложную многоуровневую систему, существуют подходы, описывающие её как взаимодействие нескольких контуров регуляции, оказывающих различное воздействие согласно потребностям организма. Самой простой является двухконтурная модель регуляции, описывающая взаимодействие центрального и автономного контура регуляции. К структурам автономного контура относятся SA-узел, блуждающий нерв и его ядра, и он соотносится с парасимпатическими влияниями на сердечный ритм. Центральный контур, соотносящийся с симпатическими влияниями, имеет несколько уровней: к первому относятся структуры центральной нервной системы, регулирующие взаимодействие организма с окружающей средой, включая кору больших полушарий; ко второму, в основном, гипоталамо-гипофизарная система и структуры, участвующие в поддержании гормонально-вегетативного гомеостаза; к третьему относятся структуры, обеспечивающие внутрисистемный гомеостаз, например, вазомоторные центры в продолговатом мозге. Связь между двумя контурами обеспечивается нервными и гуморальными путями, а также различными рефлекторными механизмами, например, барорефлексом или хеморефлексом (Баевский и др., 2001).

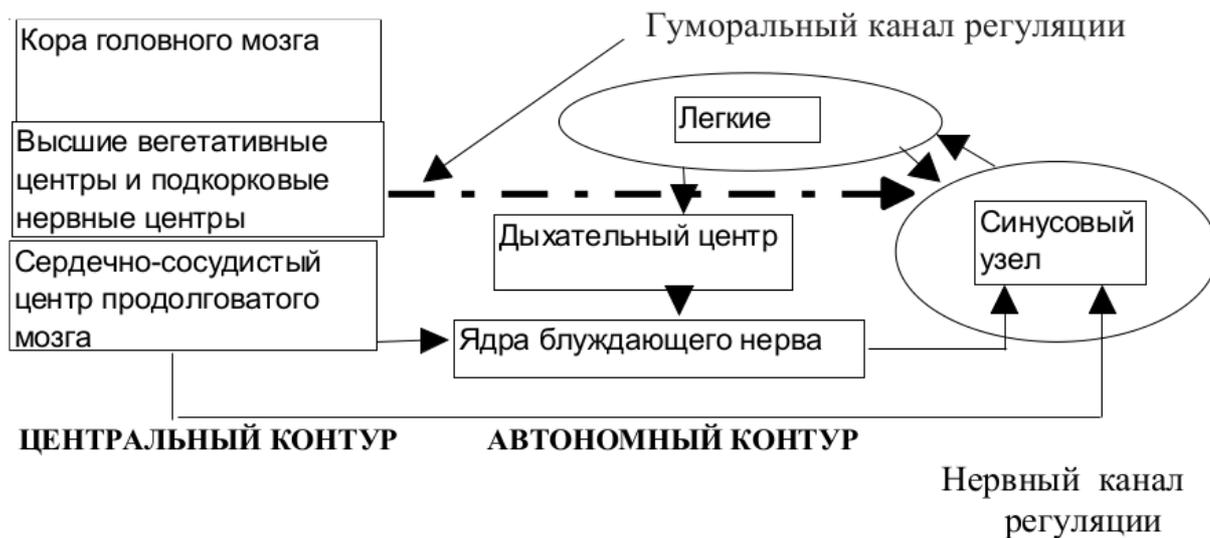


Рисунок 5. Схема двухконтурной модели регуляции ритма сердца (Баевский и др., 2001).

Стимуляция симпатического отдела ВНС, возникающая в ответ на стресс, физические нагрузки или заболевания сердца, приводит к увеличению ЧСС за счёт стимуляции пейсмекерных клеток SA-узла и связана с низкочастотным диапазоном колебаний ритма (0,04-0,15 Гц). Парасимпатическая активность в основном обусловлена функционированием внутренних органов, дыхательными движениями, и, напротив, снижает частоту генерации потенциала пейсмекерными клетками и связана с высокочастотным диапазоном колебаний ритма (0,15-0,4 Гц). Это различие позволяет отделить симпатические и парасимпатические влияния (Acharya et al., 2006). Хотя в медленноволновых компонентах также присутствуют и парасимпатические влияния, реализующиеся за счёт дыхательных волн. При этом парасимпатический отдел ВНС оказывает влияние в большей степени на узел автоматии, в то время как симпатический отдел действует в большей степени на миокард желудочков (Михайлов, 2000).

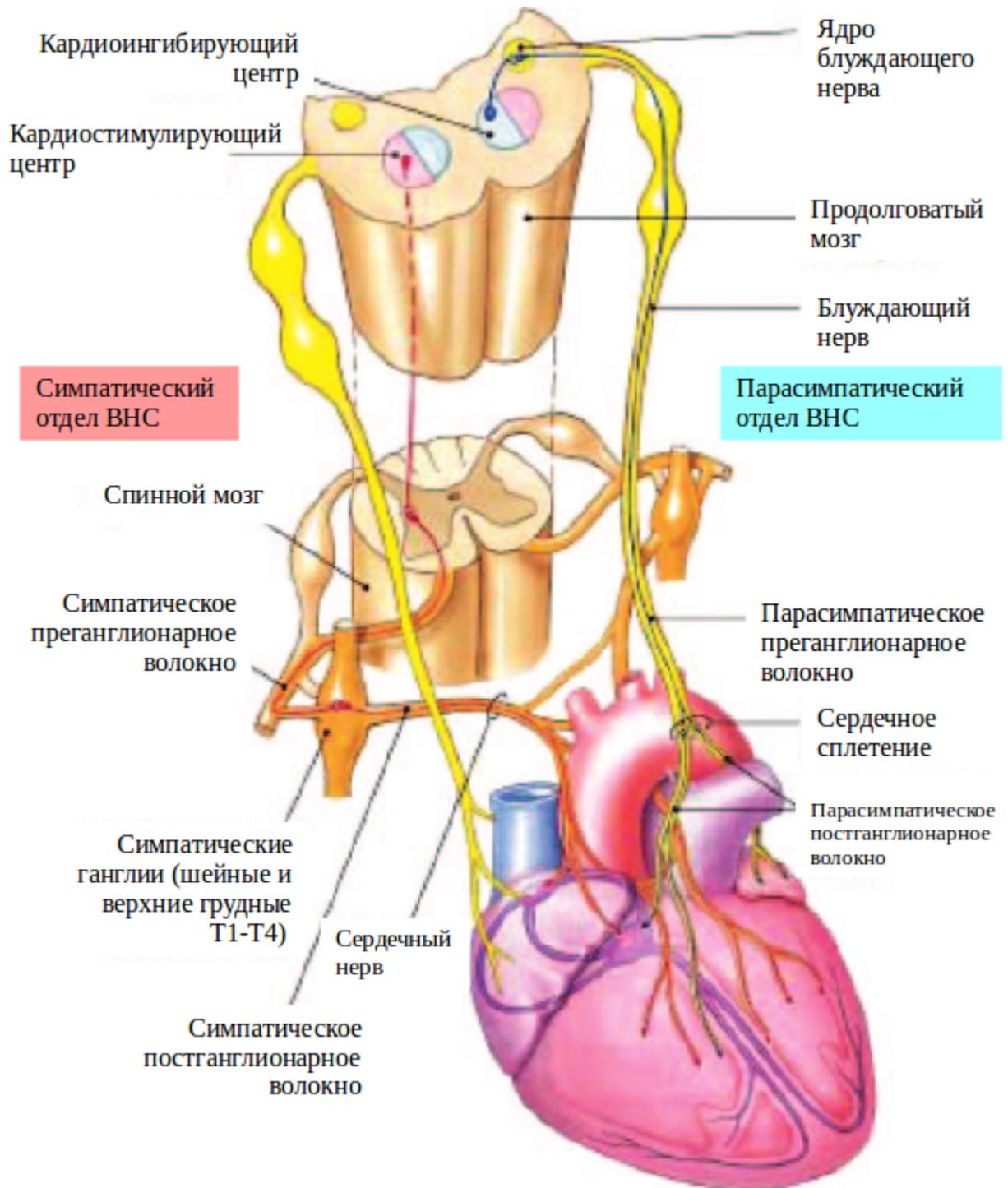


Рисунок 6. Иннервация сердца со стороны ВНС (Olshansky et al., 2008).

Известно, что после инфаркта миокарда происходит увеличение влияния симпатического отдела ВНС на сердце и уменьшение влияние парасимпатического отдела (Rothschild et al., 1988). Такая реакция вегетативной нервной системы направлена на компенсаторное увеличение сердечного выброса и поддержания артериального давления на исходном уровне, однако впоследствии может приводить к ухудшению насосной функции сердца (Triposkiadis et al., 2009). Более того, активация симпатического отдела уменьшает порог возникновения фибрилляций, в то время как парасимпатический отдел увеличивает этот порог и защищает от

возникновения аритмии и фибрилляции (Schwartz et al., 1992). Продолжительную гиперактивацию симпатического отдела связывают с неблагоприятным исходом инфаркта миокарда (Graham et al., 2002).

Увеличение активности симпатического отдела ВНС приводит к истощению внутриклеточных запасов норадреналина в нейронах и увеличение его концентрации в крови (Pepper, Lee, 1999), который в свою очередь оказывает повреждающее действие на кардиомиоциты. В последующем происходит сенситизация ткани за счёт увеличения количества β_1 и β_2 -адренорецепторов, при этом в самой зоне ишемии наблюдается отсутствие влияния симпатического отдела вегетативной нервной системы (Li et al., 2004) вследствие гибели нервных окончаний при увеличении плотности и чувствительности адренорецепторов. Однако, показана способность нервов прорасти в ишемизированный регион уже через 1 неделю и важнейшим фактором, регулирующим этот процесс, является фактор роста нервов NGF. Таким образом, на фоне увеличенной чувствительности ткани к катехоламинам нервная стимуляция миокарда приводит к возникновению аритмогенных зон (Li, Li, 2015), в связи с чем в терапии инфаркта миокарда используют β_1 -адреноблокаторы.

Существует понятие о воспалительном рефлекс, который реализуется за счёт афферентных и эфферентных путей, идущих в составе блуждающего нерва и приводит к уменьшению продукции цитокинов (Tracey et al., 2002). Выделяющиеся в очаге воспаления цитокины активируют афферентные нервные волокна, сигнал поступает в продолговатый мозг, отсюда афферентные пути идут в гипоталамо-гипофизарную систему, высвобождающую адренотропный гормон (который стимулирует продукцию глюкокортикоидов, подавляющих воспалительный ответ); в передний мозг, координирующий автономные функции и поведенческие реакции; и на эфферентные пути X пары черепно-мозговых нервов (Bernik et al., 2002). Ацетилхолин в экспериментах на культурах клеток способен подавлять продукцию TNF α , IL-1 β , IL-6, IL-18 (Borovikova et al., 2000). В опытах на макрофагах активация рецептора ацетилхолина α_7 nAChR стимулирует JAK/STAT путь и ингибирует транскрипционный фактор NF- κ B, что уменьшает синтез и секрецию цитокинов (Jonge de et al., 2005). Рецептор α_7 nAChR обнаружен на тучных клетках, и его активация уменьшает дегрануляцию тучных клеток, вызванную IgE (Shi et al., 2017). Селезёнка является важным источником TNF α в плазме крови и стимуляция блуждающего нерва уменьшает продукцию этого цитокина (Huston et al., 2006). При моделировании ишемии в сердце спленэктомия уменьшала воспалительный ответ и ускоряла ремоделирование миокарда (Ismahil et al., 2014). Таким образом, совокупность данных позволяет предполагать, что воспалительный рефлекс может быть важной частью регуляции течения ишемического повреждения, как через прямое влияние ацетилхолина на сердце, так и опосредовано через различные системы органов (рисунок 7).

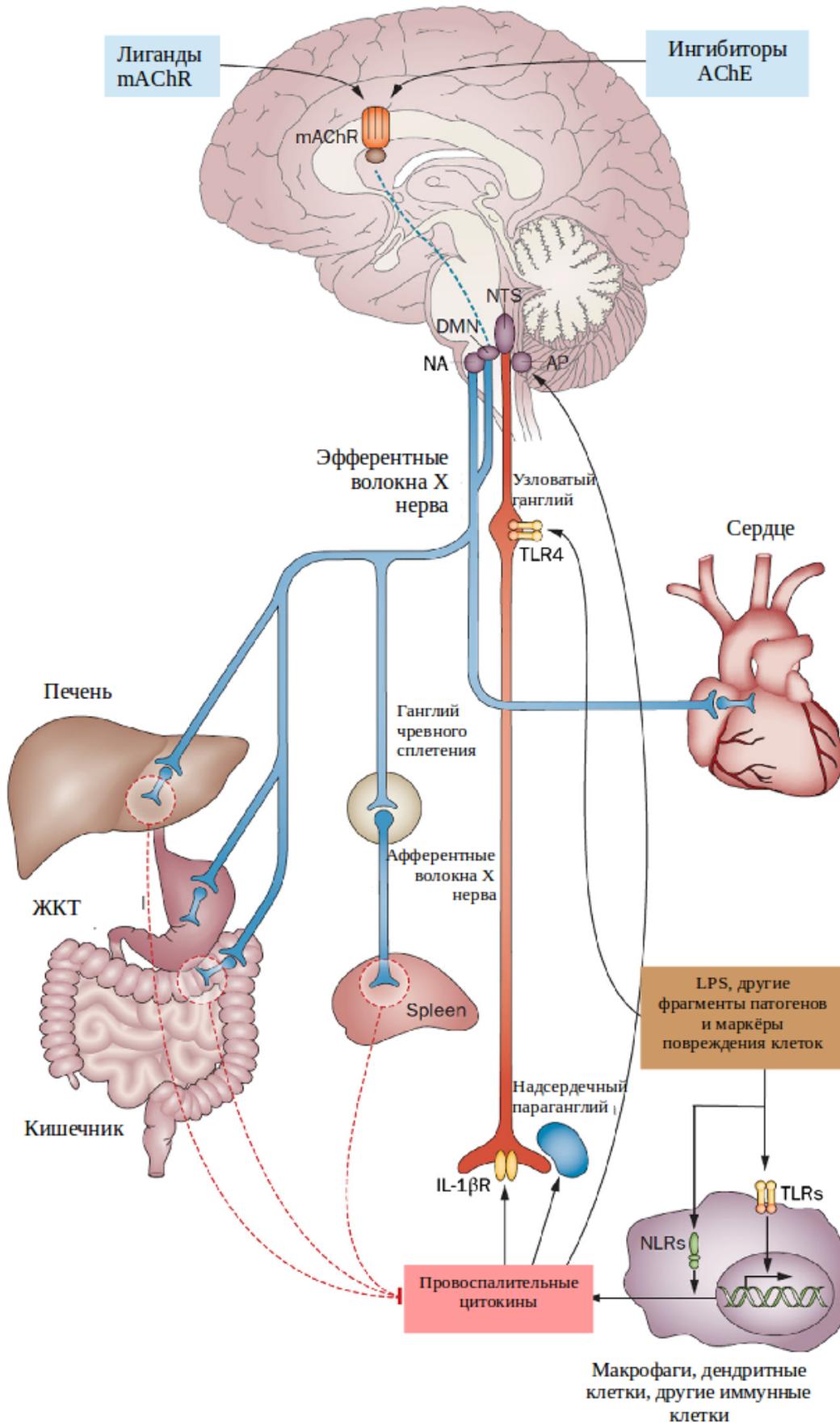


Рисунок 7. Компоненты предполагаемого воспалительного рефлекса при инфаркте миокарда (Olshansky, 2016).

Клинические испытания, в которых исследовалось влияние стимуляции блуждающего нерва на развитие инфаркта миокарда, не показали значимого улучшения течения заболевания, такой результат связывают с неоднородностью выборки по времени, прошедшему от сердечного приступа. Полагают, что у людей в начале развития инфаркта миокарда, когда есть потенциал для влияния на процессы ремоделирования, преимущества стимуляции вагуса будут более заметны (Zannad et al., 2015).

В настоящий момент в клинике используются методы оценки ВРС для прогноза исхода инфаркта миокарда. Оценку параметров ВРС также используют для прогнозирования осложнений во время реабилитации пациента, а также для установления длительности реабилитации (Carreggiani et al., 2004). В одном из первых исследований было показано, что у пациентов после инфаркта миокарда при показателе $SDNN < 50$ мс вероятность летального исхода увеличивается в 5 раз по сравнению с пациентами с $SDNN > 100$ мс (Kleiger et al., 1987). В дальнейшем по результатам мета анализа установлено, что при $SDNN < 70$ мс, вероятность смерти у пациентов с инфарктом миокарда повышается в 4 раза (Buccelletti et al., 2009). Множество исследований подтверждает, что снижение, как спектральных (Bigger et al., 1993), так и временных параметров ВРС (Zuanetti et al., 1993) тесно связано с увеличением смерти пациентов. Такая корреляция показана между смертностью и параметрами $SDNN$, $SDANN$, длительности RR интервалов (Vaishnav et al., 1993) и в некоторых работах для $pNN50$ и $RMSSD$ (Zuanetti et al., 1993).

1.5. Изменение гемодинамических параметров и показателей работы сердца после инфаркта миокарда

К основным оцениваемым в клинике гемодинамическим параметрам относят систолическое и диастолическое артериальное давление (АД), пульсовое давление, определяемое как разность между систолическим и диастолическим АД и частоту сердечных сокращений (ЧСС). Для более детальной оценки работоспособности сердца используют также систолическое и диастолическое давления и объёмы желудочков сердца, сердечный выброс и индексы сократимости и расслабления миокарда, представляющие собой максимальную скорость повышения и понижения давления в желудочках соответственно. Показатели работы сердца могут определяться как инвазивно с помощью внутрисердечных датчиков, так и неинвазивно с помощью эхокардиографии и доплерографии. В клинике также используются показатели преднагрузки (непрямые - венозное давление, давление в левом предсердии и прямой - конечный диастолический объём в левом желудочке) и постнагрузки (непрямой - общее периферическое сопротивление сосудов). Изменение этих параметров может свидетельствовать как о сердечной недостаточности, кардиомиопатии, инфаркте миокарда, а также о системных заболеваниях. Преднагрузкой принято считать объём крови (или степень напряжения мышцы) в желудочках в конце диастолы. По закону Франка-Старлинга, чем больше преднагрузка, тем больше развиваемая сила сокращения (до определённых пределов) и, соответственно, выше ударный объём и АД. Постнагрузка для левого желудочка определяется величиной давления в аорте (или как общее сопротивление сосудов). При увеличении постнагрузки конечное систолическое давление в левом желудочке увеличивается, а сердечный выброс может уменьшаться (Vincent, 2008).

Во время систолы желудочков давление в них нарастает, что приводит к открытию клапана аорты и выбрасыванию крови. Максимальное давление в систоле называют конечным систолическим давлением. Затем наступает диастола, состоящая из фаз изометрического расслабления, быстрого и медленного наполнения, в конце которых закрываются створчатые клапаны. Давление в желудочке в этот момент называют конечным диастолическим давлением. ЛЖКДД может снижаться с возрастом, а также при сердечной недостаточности и гипертрофии миокарда или повышаться из-за жёсткости мышечной стенки или при увеличении преднагрузки (Borlaug, Kass, 2009). После инфаркта миокарда у пациентов наблюдается снижение среднего артериального давления и систолического давления в левом желудочке (ЛЖКСД) и повышение диастолического (ЛЖКДД). Увеличение конечного диастолического давления является важным прогностическим показателем смерти пациента (Briennesse et al., 2018), для увеличения прогностической значимости этот параметр требует использования дополнительных

гемодинамических показателей.

Индекс сократимости миокарда $+dp/dt$ используется для мониторинга состояния пациента после инфаркта миокарда. Однако, увеличение преднагрузки и ЧСС приводит к увеличению индекса сократимости, поэтому он не всегда точно отражает сократительную способность миокарда (Nagayama et al., 2007). В случае возникновения диссинхронизации, отсутствия скоординированного сокращения кардиомиоцитов, сильно занижается параметр $+dp/dt$ (Spragg, Kass, 2006). На аналогичный параметр, $-dp/dt$ – индекс расслабления, отражающий максимальную скорость расслабления миокарда, действуют такие же ограничения.

У свиней после моделирования инфаркта миокарда наблюдается уменьшение сердечного выброса, ЛЖКСД и артериального давления через 6 недель, индексов сократимости и расслабления миокарда $+dp/dt$ и $-dp/dt$ уже через 1 неделю и увеличение ЛЖКДД также через 1 неделю (Angeli et al., 2009). У собак артериальное давление падает уже через 85 минут окклюзии коронарной артерии (Litt et al., 1989). У крыс наблюдается увеличение конечного систолического и диастолического диаметра левого желудочка, но уменьшение фракции выброса через 2 недели после инфаркта (Zhao et al., 2013). В других исследованиях показано уменьшение АД, ЛЖКСД, скорости сокращения миокарда и увеличение ЛЖКДД в моделях необратимой ишемии и ишемии-реперфузии через 3 суток после операции (Голубева и др., 2006).

Интересно, что в клинике были попытки использования адреномиметиков (добутамина и милринона) для улучшения насосной функции сердца после инфаркта миокарда, однако при улучшенных гемодинамических параметрах, наблюдалось увеличение смертности среди пациентов (Packer et al., 1991). Использование в эксперименте пептидного препарата Семакс (аналога АКТГ(4-7) – PGP) уменьшало ЧСС и диастолическое давление после инфаркта, что является важным признаком уменьшения нагрузки на миокард (Голубева и др., 2006).

2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты и реагенты

- Гистамин - Sigma, США
- Синактен Депо - Novartis, Швейцария
- Краситель толуидиновый синий - Serva, Германия
- 2,3,5 – трифенилтетразолиум хлорид (ТТХ) – Sigma, США
- Evans Blue – Sigma, США
- Fluo 3 AM — Invitrogen, США
- Вещество 48/80 - Sigma, США
- FiColl 400 – Pharmacia, Швейцария
- N,N - диметил формамид — Pharmacia, Швейцария
- Гепарин — Синтез, Россия
- Золетил — Vibrac, Бразилия
- Рометар — Bioveta, Чехия
- Ацетилхолин- Sigma, США
- Добутамин — Hexal Pharmaceuticals, Индия
- Фенилэфрин — Biomedicals, США
- Хлоралгидрат — Химмед, Россия

Растворы

- Буфер Hepes-NaCl, pH=7,4 (145 mM NaCl, 10 mM HEPES)
- Сбалансированный буфер для тучных клеток (pH=7,4). Содержит: буфер Hepes-NaCl (pH=7,4), 5 mM KCl, 1 mM CaCl₂, 1 mM MgCl₂, 5 mM глюкозы и 0,1% бычьего сывороточного альбумина (BSA).
 - Фиколл-400 25% и 35% в буфере Hepes-NaCl с 5 mM глюкозой и 0,03% BSA
 - Фосфатно-солевой буфер (PBS) pH=7,4 (137 mM NaCl, 2,7 mM KCl, 10 mM Na₂HPO₄, 1,76 mM KH₂PO₄)
 - Ортофталевый альдегид 0,1% в этиловом спирте
 - NaOH 1N
 - HCl 3N

- Толуидиновый синий 0,1% (1% NaCl, 7% этиловый спирт, pH=2,3)
- Гематоксилин Эрлиха — Гистолайн, Россия
- Эозин 0,2% — Гистолайн, Россия
- Используемые в работе пептиды PGP, N-АсPGP, Семакс (MQFHPPG), Селанк (TKPLPPG), PGPL, PLP, FPG, GPG, PGA, PGP, PG и GP были синтезированы в Институте молекулярной генетики РАН

В экспериментах с животными соблюдали Правила лабораторной практики, определенные Приказом Министерства здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. N 708н г. Москва «Об утверждении Правил лабораторной практики» и следовали рекомендациям, изложенным в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств».

Эксперименты проводили на 437 самцах белых беспородных крыс массой 350-450 г. Животных содержали в стандартных условиях с регулируемым освещением 12 ч день, 12 ч ночь, со свободным доступом к воде и пище (стандартный корм для грызунов). По массе и параметру общей вариабельности ритма животные были разделены на следующие экспериментальные группы:

Таблица 2. Экспериментальные группы животных в модели ишемического повреждения миокарда (НВ — низковариабельные, ВВ - высоковариабельные)

Экспериментальная группа	Количество крыс			
	Оценка ВРС, гемодинамических параметров и площади поражения		Получение гистологических срезов	
	НВ	ВВ	НВ	ВВ
Интактный контроль	12	8	4	4
Необратимая ишемия + дистиллированная вода	28	22	30	19
Необратимая ишемия + PGP	27	23	29	20
Необратимая ишемия + N-АсPGP	30	20	30	19

Модель необратимой ишемии (Голубева и др., 2006)

Крыс наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг). Грудную клетку вскрывали в районе верхушечного толчка. Ишемию получали, перевязывая левую ветвь коронарной артерии на

уровне ушка левого предсердия. Место операции обрабатывали антибиотиком и йодом и зашивали. Животные находились под наблюдением в течение всего времени пребывания под наркозом. В случае остановки сердца или дыхания проводили экстренную реанимацию.

Оценка вариабельности ритма сердца у крыс (Морозова, Лукошкова, Гаврилова, 2015)

В течение месяца перед началом эксперимента всех животных приучали к рукам. В связи с наличием циркадных ритмов, влияющих на работу сердца, регистрацию проводили строго в промежуток времени с 7 до 14 часов. Электрокардиограмму регистрировали у животных в состоянии спокойного бодрствования до и после холодной пробы. За сутки до регистрации у животных без наркоза выбривали шерсть на коже спины. В день регистрации кожу обезжировали и накладывали накожные электроды (Skintact F-301, Leonhard Lang GmbH, Austria). Затем животное помещали в стеклянный куб с непрозрачными стенками на 1 час для адаптации. Через час регистрировали ЭКГ в течение 20 минут (спокойное бодрствование) с частотой оцифровки 2 кГц. Затем животное помещали на 3 минуты в стеклянный куб с прозрачными стенками на пакет со снегом (+4°C) — холодная проба (ХП). После этого возвращали животное в куб для регистрации ЭКГ и проводили запись еще в течение 10 минут. Записи ЭКГ обрабатывали с помощью оригинальной программы для оценки параметров ВРС (разработчик д.б.н. Е.В. Лукошкова, Россия). Из записей удаляли экстрасистолы и шумы, оставляя только кардиоциклы синусового происхождения (NN). По 5-минутным фрагментам записей ЭКГ периода покоя до холодной пробы и первым 5 минутам после пробы рассчитывали статистические и спектральные параметры ВРС, представленные в таблице.

Таблица 3. Основные параметры вариабельности ритма сердца и их характеристика (Михайлов, 2000)

Параметр ВРС	Расчёт	Характеристика
SDNN, мс	Стандартное отклонение NN-интервалов	Общая вариабельность ритма сердца, отражает влияние на синусовый ритм парасимпатического и симпатического отдела ВНС. Изменение параметра связано с изменением влияния на сердце одного из отделов.

PNN3, %	Процент NN-интервалов синусового происхождения, отличающихся от предыдущего более чем на 3 мс	Отражает кратковременную смену частоты ритма, зависящую от напряжения парасимпатического отдела ВНС и синусовую аритмию, связанную с дыханием
SDANN, мс	Стандартное отклонение средних значений NN-интервалов, вычисленным по 1 минутным сегментам записи	Отражает влияние симпатического отдела ВНС на сердечный ритм
TP	Общая мощность спектра	Отражает суммарные влияния ВНС на сердце. В отличие от параметра SDNN активация симпатического отдела приводит к уменьшению TP.
LF	Низкочастотные колебания ритма при частоте 0,2-0,8 Гц (Морозова и др., 2015)	Преимущественно отражает влияние симпатического отдела, в основном связанное с реализацией барорефлекса
HF	Высокочастотные колебания ритма при частоте 0,8-2,5 Гц (Морозова и др., 2015)	Отражает вагусный контроль сердечного ритма и связан с дыхательными движениями

Регистрация гемодинамических показателей и параметров работы сердца (Гаврилова и др., 2008)

Животным, наркотизированным смесью Золетил (27,78 мг/кг) + Рометар (2,78мг/кг), производили трахеотомию. В бедренную артерию имплантировали катетер, соединенный с датчиком давления ISOTEC (Harvard Apparatus, США) и производили регистрацию артериального давления. В артериальный катетер с помощью инфузора ВЭДА-2 (Россия) подавали смесь гепарина (50 ЕД/мл) и Золетила (0,061 мг/кг*мин) в физиологическом растворе. В бедренную вену имплантировали венозный катетер для инфузии веществ для выполнения фармакологических нагрузок. В левый желудочек сердца через правую сонную артерию вводили миниатюрный датчик регистрации давления SPR-407 (Millar, США). Запись, оцифровку и обработку сигнала осуществляли с помощью многоканальной системы для регистрации давления ТАМ-А (Hugo Sachs Elektronik, Германия), аналого-цифрового преобразователя E-140 (L-CARD, Россия). В программе PowerGraph (Россия) рассчитывали частоту сердечных сокращений (ЧСС), среднее артериальное давление (АДср), конечное

систолическое и диастолическое давление в левом желудочке (ЛЖКСД и ЛЖКДД), максимальные скорости увеличения (+dp/dt) и уменьшения (-dp/dt) давления в левом желудочке.

Для оценки функциональных возможностей сердечно-сосудистой системы использовали фармакологические нагрузочные тесты ацетилхолином, добутамином и фенилэфрином. Ацетилхолин, агонист холинорецепторов, вызывает дилатацию сосудов и снижение постнагрузки на сердце, а также обладает кардиоингибиторным эффектом. Добутамин, агонист β_1 -адренорецепторов, располагающихся в основном в сердце, прямо стимулирует работу сердечной мышцы. Фенилэфрин, агонист α_1 -адренорецепторов, располагающихся преимущественно в сосудах, вызывает вазоконстрикцию и увеличение постнагрузки. Вещества инфузоровали с помощью инфузора PHD2000 (Harvard Apparatus, США) через катетер, имплантированный в бедренную вену, в накопительном режиме в течение 3-х минут каждую из пяти доз вводимого препарата, суммарно - 15 минут. Дозу вводимого препарата увеличивали, изменяя скорость введения. Общий объем вводимой жидкости за время инфузии составлял 300 мкл. Вещества вводили в следующей последовательности: ацетилхолин, добутамин и фенилэфрин. Временной интервал между введениями препаратов составлял 20 минут, достаточный для возвращения параметров гемодинамики к доинфузионному уровню. Использовали следующие дозы препаратов: ацетилхолин – 1; 3; 6; 9; 12 мкг/кг*мин, добутамин – 1; 2; 3; 4,5; 6 мкг/кг*мин, фенилэфрин – 3; 6; 9; 12; 15 мкг/кг*мин.

В тексте диссертации результат оценки реакций гемодинамических параметров на нагрузочный тест ацетилхолином и фенилэфрином показан на инфузию дозы, находящийся на плато кривой доза-эффект (6 мкг/кг*мин и 9 мкг/кг*мин, соответственно). Для добутамину выбрали реакцию гемодинамических параметров на инфузию дозы 2 мкг/кг*мин, при которой увеличение артериального давления составляло не более 15% от исходного уровня, и минимально влияло на увеличение постнагрузки на работу сердца.

Оценка площади ишемического поражения сердечной мышцы

Для оценки площади поражения через 72 часа после ишемии животных наркотизировали, вскрывали грудную клетку, вырезали сердце и промывали его в воде. Удаляли предсердия по фиброзному кольцу, и стенку правого желудочка. Левый желудочек помещали на -20°C на несколько суток. Замороженные сердца нарезали на 8-9 колец толщиной 1-1,5 мм и инкубировали в 1% растворе 2,3,5-трифенилтетразолия хлорида в PBS в течение 15 минут при 37°C . Срезы помещали в 10% раствор формалина в PBS, выкладывали между предметными стёклами и сканировали с двух сторон с разрешением 600 dpi. Площадь некроза считали с помощью программного обеспечения для планиметрического определения площади поражения, разработанного на ФФМ МГУ, на каждом срезе с обеих сторон и выражали в процентах от

общей площади срезов.

Для определения размера рубца через 28 суток после инфаркта миокарда у наркотизированных животных вырезали сердце и промывали его в воде. Предсердия удаляли по фиброзному кольцу, отделяли правый желудочек, межжелудочковую перегородку, рубец (белёная ткань) и живую ткань левого желудочка. Все части взвешивали и считали относительную массу рубца. В работе представлена масса рубца, нормированная на массу живого левого желудочка, включая перегородку.

Получение гистологических срезов и их окрашивание

Наркотизированным хлоралгидратом крысам через катетер в сонной артерии в сердце вводили 4% раствор формалина в PBS до осветления ткани и остановки сердцебиений. После этого сердце удаляли и нарезали на три части: верхушка, середина и основание. Полученные препараты держали в 10% растворе формалина в PBS сутки, а затем промывали водой в течение 7 часов. Последовательно на приборе Лаборант (Россия) осуществляли проводку препаратов в следующих растворах: 50% этиловый спирт (6 часов), 70% этиловый спирт (6 часов), 96% этиловый спирт (дважды по 6 часов), 100% этиловый спирт (6 часов), спирт:хлороформ 1:1 (6 часов), хлороформ (6 часов), хлороформ:парафин 1:1 (6 часов), парафин (5 часов).

Препараты, зафиксированные в парафине, нарезали на микротоме Microm HM 3559 (Thermo Fisher Scientific, США) на срезы толщиной 5 мкм, фиксировали на стёклах и высушивали в течение 1 суток в термостате при температуре 95°C. Перед окраской срезы гидратировали, проводя последовательно через следующие растворы: толуол (дважды по 3 минут), этанол 100% (дважды по 3 минуты), этанол 96 % (3 минуты), этанол 75 % (3 минуты), этанол 50 % (3 минуты), дистиллированная вода (3 минуты).

Для оценки степени повреждения миокарда срезы окрашивали сначала гематоксилином в течение 10 минут, промывали, а затем эозином в течение 3 минут.

Для подсчёта тучных клеток и оценки их состояния срезы окрашивали 0,1% раствором толуидинового синего по модифицированному протоколу (Puebla-Osorio et al., 2017).

После окраски дегидратировали срезы, проводя через растворы спиртов в обратной последовательности. Срезы заливали смолой и накрывали покровными стёклами. Срезы смотрели на микроскопе Imager A1 Axio (Zeiss, Германия).

Состояние ткани миокарда оценивали в трёх зонах: передней стенке, межжелудочковой перегородке и задней стенке.

Для возможности корректного применения статистических методов обработки результатов использовали балльную шкалу (Ахметшина, Бердалин, Гаврилова, 2015).

Для характеристики состояния сердечной мышцы оценивали баллами:

а) Поперечная исчерченность кардиомиоцитов (КМЦ): 0 – отсутствует; 1 - наблюдаются единичные волокна продольной направленности с поперечной исчерченностью; 2 – встречаются, но не везде, пучки продольных волокон с поперечной исчерченностью; 3 - поперечная исчерченность видна везде или почти везде.

б) Степень повреждения КМЦ: 0 – отсутствуют погибшие клетки с нечеткими контурами, разволокненной цитоплазмой и с конденсированным ядром; 1 - наблюдаются единичные поврежденные клетки, некроза нет; 2 - сливающиеся участки разволокненных клеток с нечеткими контурами, часто видны конденсированные ядра, некроза нет; 3 - поврежденные участки занимают большую площадь (больше поля зрения), на больших участках у клеток ядер нет вообще, выраженной зоны некроза нет; 4 - существенную часть среза занимает зона некроза; все или почти все клетки вне зоны некроза имеют неровные, нечеткие контуры, разволокненную цитоплазму, конденсированные ядра; 5 - единичные клетки с ядрами; основную часть среза занимает зона некроза.

Для характеристики инфильтрации ткани клетками крови оценивали баллами:

в) Количество немиоцитарных клеток (НМК) на срезе: 0 - немиоцитарных клеток нет; 1 - небольшое количество НМК между кардиомиоцитами; 2 - относительно небольшое количество НМК, встречаются единичные инфильтраты; 3 - крупные инфильтраты (в том числе по краю зоны некроза) или большое число мелких; 4 - очень большое количество НМК, инфильтраты занимают большую часть среза.

г) Выраженность кровоизлияний: 0 - кровоизлияний нет; 1 - наблюдаются мелкие единичные кровоизлияния; 2 - большие кровоизлияния (до поля зрения); 3 - многочисленные обширные кровоизлияния, занимающие большую часть инфарктной зоны.

На срезах, окрашенных толуидиновым синим, определяли количество тучных клеток в 5 полях зрения при увеличении $\times 400$ в трёх зонах: передней стенке, межжелудочковой перегородке и задней стенке, не менее чем в четырёх кольцевых срезах сердца. Перед операцией у всех животных была зарегистрирована ЭКГ и по ней рассчитан параметр общей variability ритма (SDNN), по которому крысы были разделены на группы с исходно низкой (НВ) и высокой (ВВ) ВРС. В дальнейшем анализ проводили в двух группах. Оценивали степень дегрануляции тучных клеток в различных зонах, не менее восьми клеток на зону в разных кольцевых срезах, по баллам:

- 0 – не дегранулированные клетки (рисунок 8, а);
- 1 – слабо дегранулированные клетки (рисунок 8, б);
- 2 – сильно дегранулированные клетки (рисунок 8, в);
- 3 – очень сильно дегранулированные клетки, вплоть до потери очертаний (рисунок 8, г).

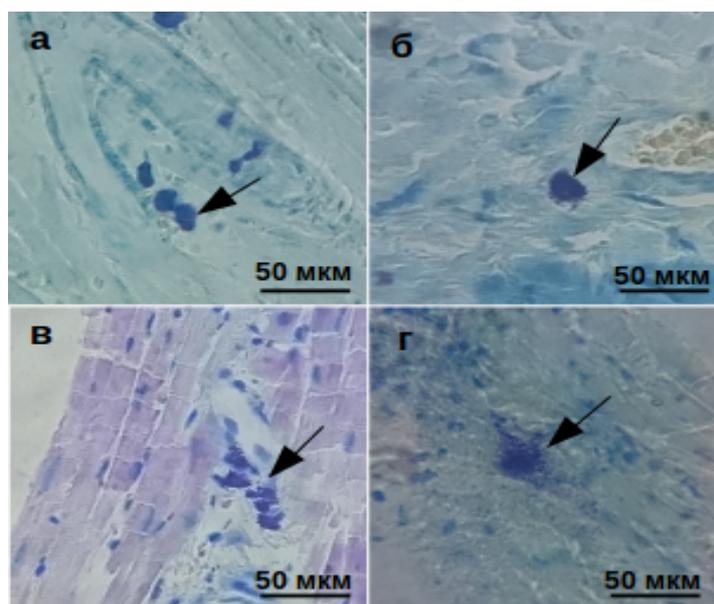


Рисунок 8. Репрезентативные микрофотографии тучных клеток разной степени дегрануляции. а - не дегранулированные клетки, б, в – слабо и сильно дегранулированные клетки, г – очень сильно дегранулированные клетки.

Метод определения проницаемости сосудов (Theoharides et al., 1998)

Крыс наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг) и выстригали шерсть под лопаткой. 0,6 мл 1% раствора Evans Blue вводили в подъязычную вену. Через 15 минут в выбритую область внутрикожно с образованием бугорка вводили индукторы воспалительного ответа или физиологический раствор в качестве контроля. Через полчаса после введения красителя вырезали кожу, очищали от прилежащих тканей и фотографировали с внутренней стороны. Затем по трафарету вырезали фрагменты с каждым активатором и инкубировали в N, N диметилформамиде в течение 24 часов при 55°C для экстракции Evans blue из кожи. Флуоресценцию измеряли на модульном многофункциональном планшетном анализаторе EnVision (PerkinElmer, США) при 680 нм, возбуждая при 620 нм.

Метод выделения перитонеальных тучных клеток крыс (Thon, Uvnäs, 1967)

Животных под эфирным наркозом декапитировали и обескровливали. Делали надрез брюшной полости и вводили 10 мл Нерес-NaCl (pH=7,4). Массировали брюшную стенку в течение 1 мин. Перитонеальную жидкость собирали и центрифугировали 5 мин при 800 об/мин (4°C). Супернатант удаляли, осадок суспендировали в 2 мл Нерес-NaCl (pH=7,4).

Тучные клетки очищали, нанося на градиент фикола (35% и 25%). Центрифугировали

10 мин при 1200 об/мин (18° С). Во время центрифугирования тучные клетки проходят в слой фиколла, другие клеточные элементы концентрируются на границе фиколла. Эти клеточные элементы удаляли, а тучные клетки отмывали от фиколла. Для этого их трижды промывали сбалансированным раствором. После каждого промывания клетки концентрировали центрифугированием в течение 10 мин последовательно при 1000, 800 и 600 об/мин. Осадок перитонеальных тучных клеток разводили в 2 мл сбалансированного раствора. Подсчёт клеток проводили в камере Горяева. Клетки предварительно окрашивали толуидиновым синим (рН=7,0) в следующем соотношении: к 100 мкл суспензии клеток добавляли 5 мкл красителя (0,1%). В камере Горяева 5 раз выбирали по пять больших квадратов по диагонали и считали в них клетки. Количество тучных клеток определяли по формуле:

$$N = a \cdot 50 \cdot 1000 = n \cdot 10^6 \text{ тк/мл,}$$

где N – общее количество тучных клеток в 1 мл, а – среднее количество тучных клеток в 5 больших квадратах.

Метод определения гистамина тучных клеток (Shore, 1971)

Метод основан на реакции конденсации гистамина с ортофтальевым альдегидом, в результате которой образуется флуоресцирующий комплекс.

Клетки активировали аналогом АКТГ Синакеном (20 мкМ) в течение 10 мин при 37 °С. Реакцию останавливали, доводя объём проб до 400 мкл охлаждённым сбалансированным буфером, и помещали на +4 °С на 5 мин. Затем пробы центрифугировали 10 мин при 1600 об/мин. Отбирали по 0,1 мл супернатанта и определяли содержание гистамина.

Осадки растворяли в 100 мкл сбалансированного буфера. Содержащиеся в них тучные клетки разрушали кипячением на водяной бане в течение 5 мин. Затем вновь центрифугировали 10 мин при 1600 об/мин и отбирали по 100 мкл супернатанта для анализа остаточного гистамина.

Для определения содержания гистамина к 100 мкл пробы добавляли 20 мкл 1N NaOH, а затем 10 мкл 0,1% раствора ортофталевого альдегида. Образовавшийся флуорофор стабилизировали подкислением раствора. Для этого через 4 мин добавляли 10 мкл 3N HCl. После добавления каждого реактива смесь тщательно перемешивали. Флуоресценцию измеряли на модульном многофункциональном планшетном анализаторе EnVision (PerkinElmer, США) при 460 нм, возбуждая при 335 нм.

Высвобождение гистамина определяли по формуле:

количество секретируемого гистамина (%) = $A/(A+B) \cdot 100\%$, где А – содержание гистамина в супернатанте, В – содержание гистамина в осадке.

Количество гистамина в пробе определяли по калибровочной кривой

Определение уровня кальция в цитоплазме тучных клеток

Очищенные перитонеальные тучные клетки (1 мл) инкубировали с флуоресцентным красителем Fluo-3 AM (5 мкМ) в течение 45-60 мин при комнатной температуре. Затем клетки осаждали центрифугированием при 800 об/мин в течение 5 мин, к осадку добавляли сбалансированный буфер и инкубировали в течение 30 мин.

90 мкл суспензии тучных клеток помещали в специальные стеклянные камеры. Клетки просматривали на флуоресцентном микроскопе Keyence (возбуждение 488 нм, детекция 500-550 нм, объектив X40), съемку проводили с частотой 1 фото в 5 сек, в течение 1 мин перед активацией и 5 мин после. Обработку результатов проводили в программе ImageJ. Измеряли интенсивность флуоресценции каждой клетки во времени, считали CTCF (corrected total cell fluorescence) по формуле

$$\text{CTCF} = \text{Integrated density} - (\text{area of cell} / \text{mean fluorescence of background})$$

Затем для каждой клетки считали среднюю флуоресценцию в норме (до действия активатором) и считали проценты изменения степени флуоресценции по сравнению с нормой.

Статистическую обработку результатов проводили в программе STATISTICA 8. Использовали непараметрический критерий Манна-Уитни для сравнения двух независимых выборок и критерий Краскела-Уоллиса для сравнения нескольких независимых выборок. Для сравнения связанных выборок использовали критерий Вилкоксона. Для оценки выживаемости использовали лог-тест. При проверке статистических гипотез использовали 5% уровень значимости ($p < 0,05$). Данные представлены как медиана и 1 и 3 квартили. Изменение параметров относительно контроля считали по формуле $(O-K) * 100/K$, где O - значение параметра в опытной группе, K – в контрольной.

3. РЕЗУЛЬТАТЫ

3.1. Сравнительный анализ действия PGP и N-АсPGP на секреторную активность перитонеальных тучных клеток крыс и проницаемость сосудов, обусловленную активацией тучных клеток

Ранее было показано, что PGP способен уменьшать секрецию гистамина тучными клетками, и такое его действие связано с уменьшением концентрации внутриклеточного кальция (Бондаренко и др., 2016). В связи с этим в первой части работы провели сравнительный анализ действия исследуемых пептидов на секреторную активность тучных клеток, а также на увеличение проницаемости сосудов кожи крыс, обусловленное активацией тучных клеток.

Известно, что пептиды могут действовать по-разному в зависимости от их концентрации. Поскольку способность PGP и N-АсPGP снижать секреторную активность тучных клеток была показана ранее, в этой части работы мы определяли влияние концентрации исследуемых пептидов на снижение секреции гистамина. Использовали 10 концентраций PGP и N-АсPGP от $3 \cdot 10^{-12}$ до $6 \cdot 10^{-5}$ М. Пептиды инкубировали с тучными клетками ($\sim 1,8 \cdot 10^6$ кл/проба) в течение 10 минут, а затем добавляли аналог АКТГ Синактен (20 мкМ). Процент снижения секреции гистамина рассчитывали по сравнению с количеством секретированного гистамина при действии только Синактена, принимая уровень последнего за 0. Полученные результаты представлены на рисунке 9.

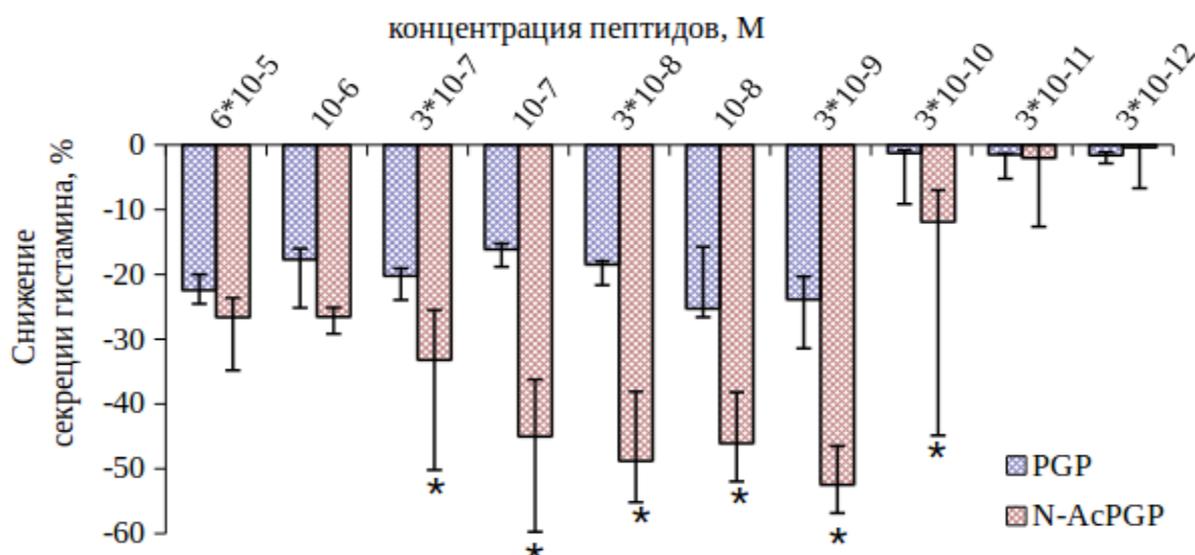


Рисунок 9. Зависимость процента снижения секреции гистамина тучными клетками при их активации Синактеном (20 мкМ) от концентрации PGP и N-АсPGP.

$n=9$, * $p < 0,05$ по сравнению с PGP (критерий Манна Уитни); (PGP от $3 \cdot 10^{-9}$ М до $6 \cdot 10^{-5}$; N-АсPGP от $3 \cdot 10^{-9}$ М $3 \cdot 10^{-10}$ М – значимое снижение по сравнению с действием Синактена)

На графике видно, что концентрации PGP от $3 \cdot 10^{-9}$ М до $6 \cdot 10^{-5}$ в равной степени способны снижать секрецию гистамина тучными клетками, но при дальнейшем уменьшении концентрации выраженный эффект уже не наблюдается.

N-АсPGP способен снижать секрецию гистамина вплоть до концентрации $3 \cdot 10^{-10}$ М, что на порядок ниже, чем у PGP. Более того при концентрациях от $3 \cdot 10^{-9}$ до $3 \cdot 10^{-7}$ М влияние N-АсPGP на снижение секреции гистамина более выражено.

Таким образом, полученные данные свидетельствуют о том, что ацетилирование PGP не лишает его способности препятствовать высвобождению гистамина тучными клетками.

Одним из важнейших признаков активации тучных клеток и как следствие их дегрануляции является увеличение концентрации внутриклеточного кальция. Сравнивали влияния PGP и N-АсPGP на кальциевый ответ тучных клеток при их активации аналогом АКТГ Синактеном.

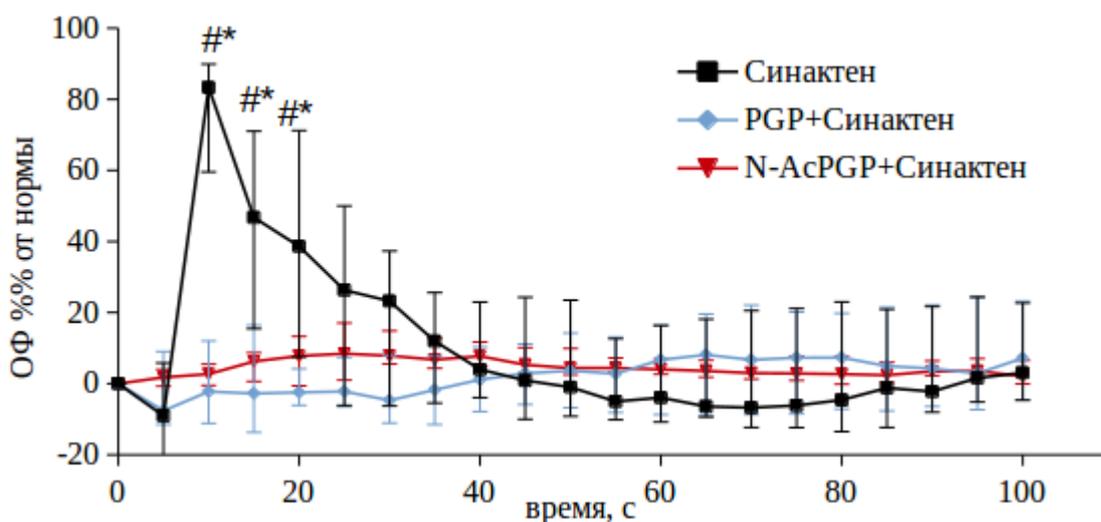


Рисунок 10. Относительная флуоресценция тучных клеток при активации Синактеном (20 мкМ);

n (Синактен) = 12, n (PGP+Синактен) = 8, n (N-АсPGP+Синактен) = 9;

* - $p < 0,05$ PGP+Синактен по сравнению с Синактеном (критерий Манна-Уитни),

- $p < 0,05$ N-АсPGP+Синактен по сравнению с Синактеном (критерий Манна-Уитни).

PGP и N-АсPGP сами по себе не влияли на концентрацию кальция в цитоплазме тучных клеток. Введение активатора в первые секунды вызывало возрастание внутриклеточной концентрации кальция на 83%, которая в течение минуты уменьшалась до базового уровня. Предобработка тучных клеток исследуемыми пептидами препятствовала скачкообразному увеличению Ca^{++} в цитоплазме при активации клеток Синактеном (рисунок 10).

Таким образом, снижение секреции гистамина может быть обусловлено способностью PGP и N-АсPGP препятствовать увеличению внутриклеточной концентрации кальция при активации клеток Синактеном.

Для оценки изменения проницаемости сосудов измеряли экстравазацию красителя Evans Blue при активации локального воспалительного процесса различными триггерами: Синактеном, кортиколиберином CRH, LPS и веществом 48/80 (рисунок 11).

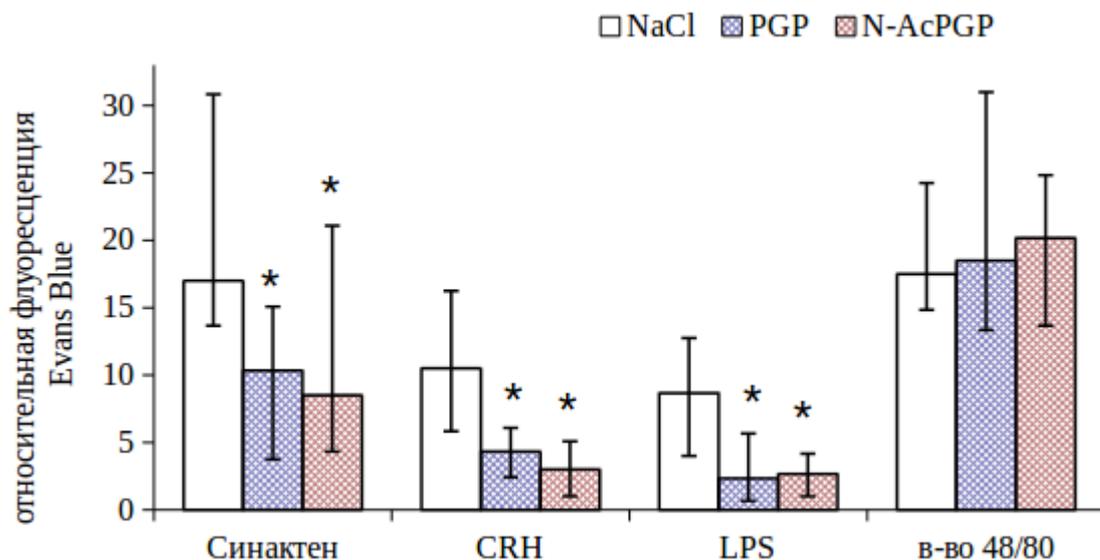


Рисунок 11. Относительная флуоресценция Evans Blue, экстрагированного из ткани, при действии различных триггеров. $n(\text{NaCl})=6$, $n(\text{PGP})=8$, $n(\text{N-АсPGP})=8$; * $-p<0,05$ по сравнению с контролем (NaCl) (критерий Манна-Уитни).

На рисунке 11 видно, что все используемые триггеры вызывают увеличение проницаемости сосудов. Введение PGP, а также N-АсPGP, значительно уменьшало экстравазацию Evans Blue при активации Синактеном, CRH и LPS, но не веществом 48/80.

Таким образом, N-АсPGP сохраняет противовоспалительные свойства PGP, заключающиеся в способности снижать секреторную активность тучных клеток, уменьшая количество секретируемого ими гистамина, а также уменьшать вызванную активацией тучных клеток проницаемость сосудов кожи крыс.

3.2. Исследование влияния синтетических аналогов PGP на секрецию гистамина тучными клетками и проницаемость сосудов кожи

Во второй части работы для установления ключевого сочетания аминокислот, необходимого для реализации эффектов пептида, исследовали влияние ряда синтетических аналогов PGP на секрецию гистамина тучными клетками и проницаемость сосудов кожи. Модификации пептида условно были разделены на группы:

1. Добавление аминокислот с С или N-конца (Семакс, Селанк и PGPL, соответственно);
2. Замена одного из пролинов или глицина (RGP, PGA и PLP);
3. Дипептиды, образующиеся при деградации PGP (PG и GP) и их модифицированные формы с присоединением аминокислоты к пролину (GPG и FPG).

Исследуемые пептиды, а также аминокислоты пролин и глицин добавляли к суспензии тучных клеток в концентрации $3 \cdot 10^{-8}$ М, а затем активировали клетки Синактеном (20 мкМ) и измеряли количество секретируемого гистамина (рисунок 12). В контрольные пробы добавляли равный объём сбалансированного буфера.

На рисунке 12 видно, что добавление к суспензии тучных клеток Синактена вызывает увеличение секреции гистамина по сравнению с их спонтанной активностью. Пептиды сами по себе не оказывали влияния на секрецию гистамина. Предобработка тучных клеток пептидами Семакс, Селанк, PGPL FPG, GPG, PG и GP приводила к значимому снижению секреции гистамина при последующей активации Синактеном. Пептиды PLP, PGA, RGP и аминокислоты пролин и глицин не оказывали влияния на этот параметр.

Аналогичные результаты были получены при исследовании влияния пептидов на увеличение проницаемости сосудов кожи крыс при внутрикожном введении активаторов тучных клеток — Синактена, LPS и вещества 48/80 (рисунок 13). Исследуемые пептиды (3,7 мкмоль/кг) вводили внутривенно за 10 минут до инъекции триггеров. Контрольным животным вводили физиологический раствор. После экстракции Evans Blue из ткани измеряли флуоресценцию красителя и вычитали из каждого значения флуоресценции при введении триггера контрольное (NaCl) значение, чтобы нивелировать вклад растворителя в увеличение экстравазации.

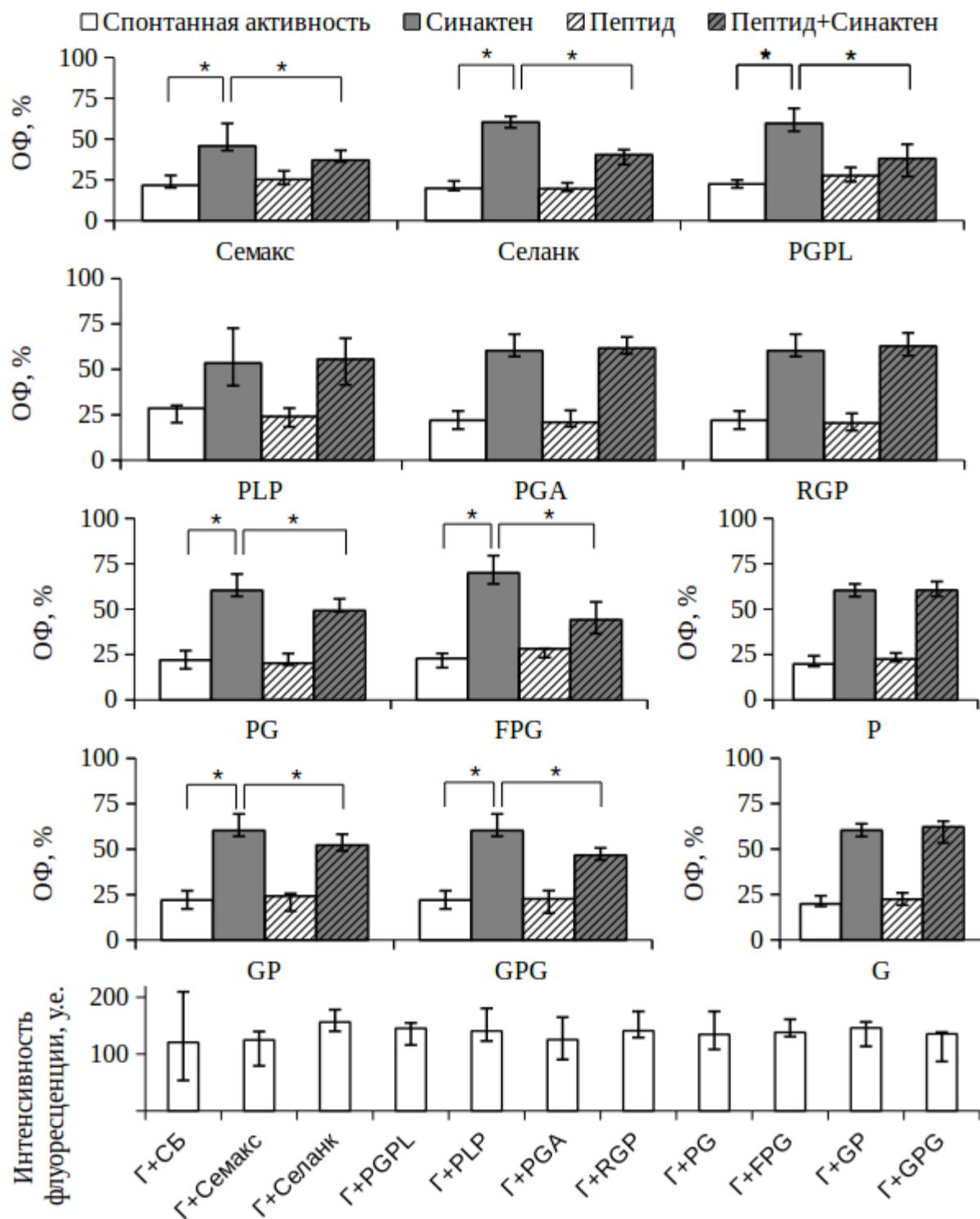


Рисунок 12. Секретия гистамина тучными клетками при активации Синактеном (20 мкМ) и предобработке исследуемыми пептидами ($3 \cdot 10^{-8}$ М).

ОФ — относительная флуоресценция, Г — гистамин; n для каждого пептида = 9; *p < 0,05 (критерий Манна-Уитни).

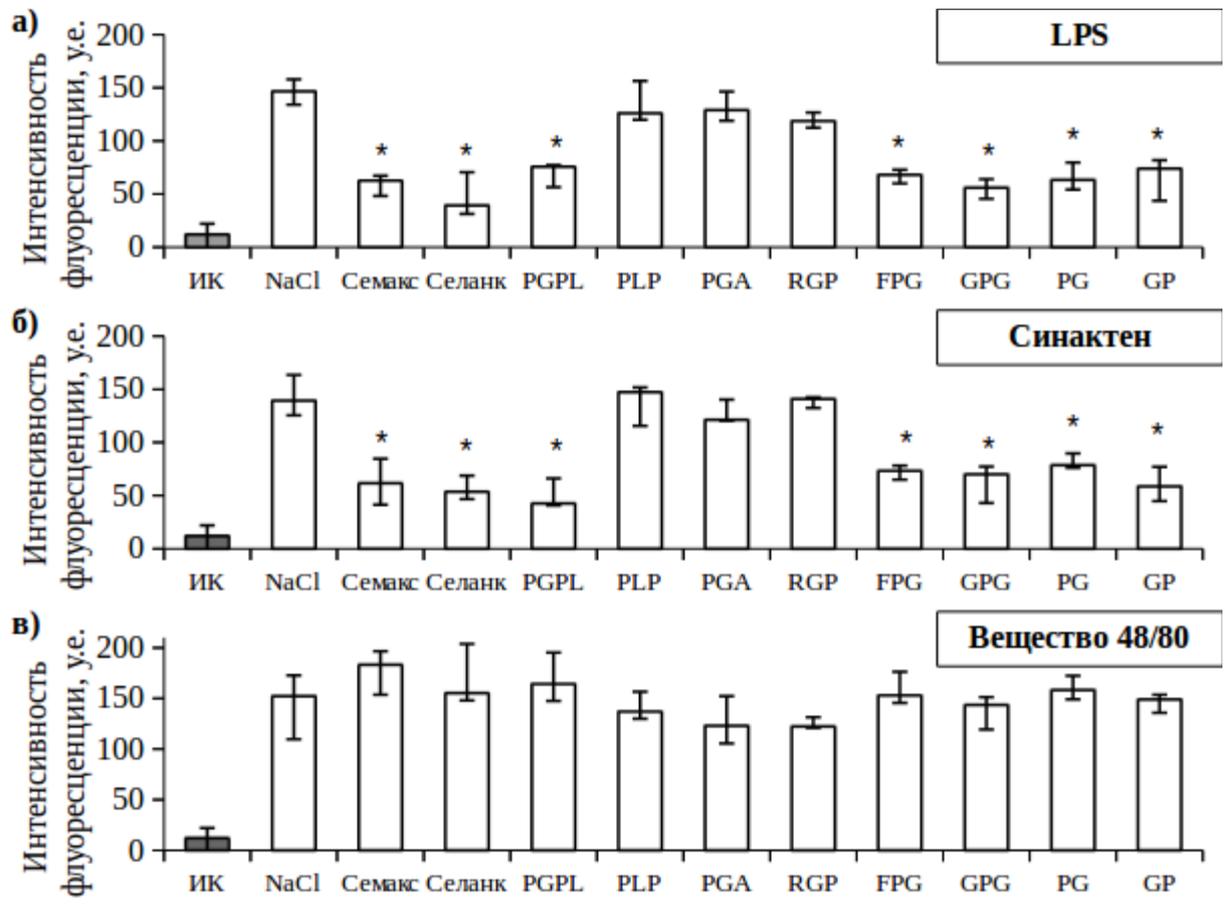


Рисунок 13. Относительная флуоресценция экстрагированного Evans Blue при введении исследуемых пептидов (3,7 мкмоль/кг).

n=7 для каждого пептида. *p<0,05 по сравнению с NaCl.

На рисунке 13 видно, что пептиды Семакс, Селанк, PGPL, FPG, GPG, PG и GP значительно снижали экстравазацию Evans Blue по сравнению с контрольной (NaCl) группой при индукции увеличения сосудистой проницаемости Синактеном и LPS. Пептиды PLP, PGA и RGP не влияли на проницаемость сосудов. При введении вещества 48/80 ни один из исследуемых пептидов не повлиял на экстравазацию красителя.

Таким образом, результаты нашей работы показали, что пептиды Семакс, Селанк, PGPL, FPG, GPG, PG и GP снижали секрецию гистамина тучными клетками и увеличение проницаемости сосудов при введении Синактена и LPS, но не вещества 48/80. В то же время пептиды PLP, PGA и RGP не влияли на эти параметры. Составляющие RGP аминокислоты пролин и глицин также не снижали секрецию гистамина тучными клетками.

3.3. Влияние PGP и N-АсPGP на динамику морфологических изменений в сердце после моделирования инфаркта миокарда

Моделирование необратимой ишемии сопровождается развитием воспалительной реакции, приводящей к повреждению ткани сердца и инфильтрации миокарда различными клетками, регулирующими воспалительный процесс. Для характеристики развития воспалительной реакции использовали балльную полуколичественную оценку. Поскольку после окклюзии левой коронарной артерии сердце неоднородно по уровню кровоснабжения изучали три зоны миокарда: переднюю стенку левого желудочка – область ишемии и два региона непосредственно ишемией не задетых - межжелудочковую перегородку и прилегающую к области ишемии заднюю стенку левого желудочка.

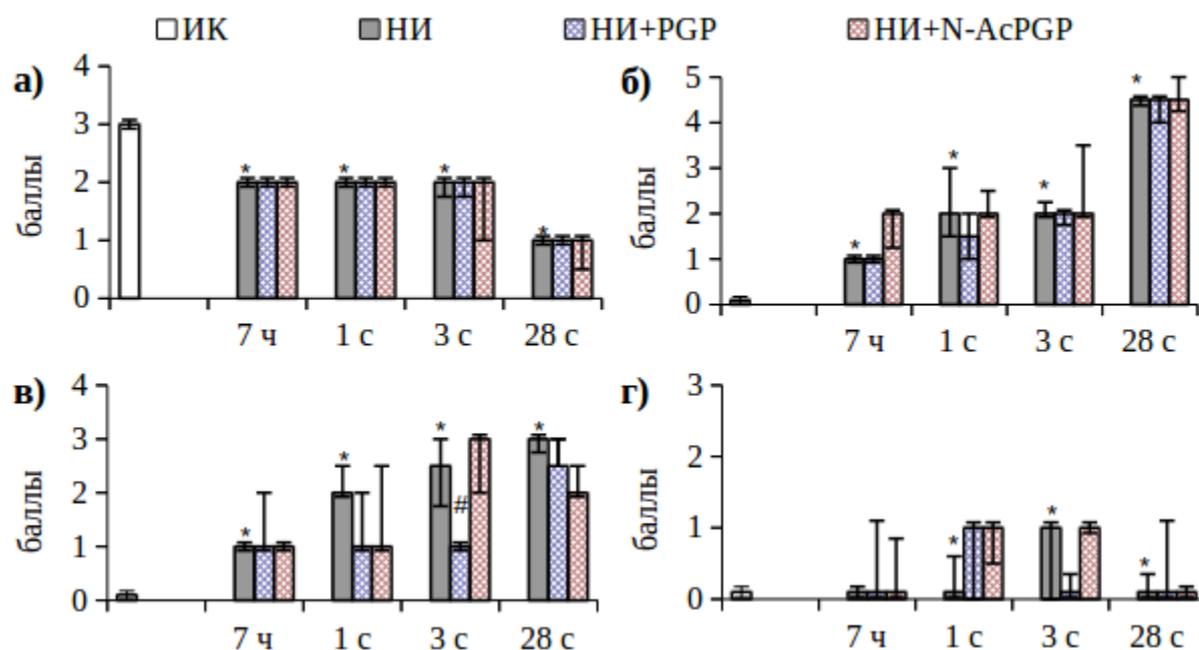


Рисунок 14. Общее состояние миокарда в передней стенке сердца в различные сроки развития ишемического повреждения: а) поперечная исчерченность кардиомиоцитов, б) степень повреждения кардиомиоцитов, в) наличие немиоцитарных клеток, г) выраженность кровоизлияний.

n(ИК)=7;

7 часов: n(НИ)=8, n(НИ+PGP) =9, n(НИ+N-АсPGP)=8;

1 сутки: n(НИ)=10, n(НИ+PGP) =8, n(НИ+N-АсPGP)=8;

3 сутки: n(НИ)=8, n(НИ+PGP) =8, n(НИ+N-АсPGP)=8;

28 сутки: n(НИ)=8, n(НИ+PGP) =9, n(НИ+N-АсPGP)=8;

*p <0,05 по сравнению с ИК (интактный контроль), #p <0,05 по сравнению с группой НИ

Через 7 часов после операции в передней стенке левого желудочка сердца крысы снижалась поперечная исчерченность кардиомиоцитов и увеличивалась степень их повреждения. В ткани присутствовали немиоцитарные клетки, наиболее крупные инфильтраты обнаруживали в области эпикарда (рисунок 15, Е). Выраженных кровоизлияний не наблюдали (рисунок 14). Важным является также то, что гистологическая картина позволяет на таком раннем сроке выявить ишемизированный регион.

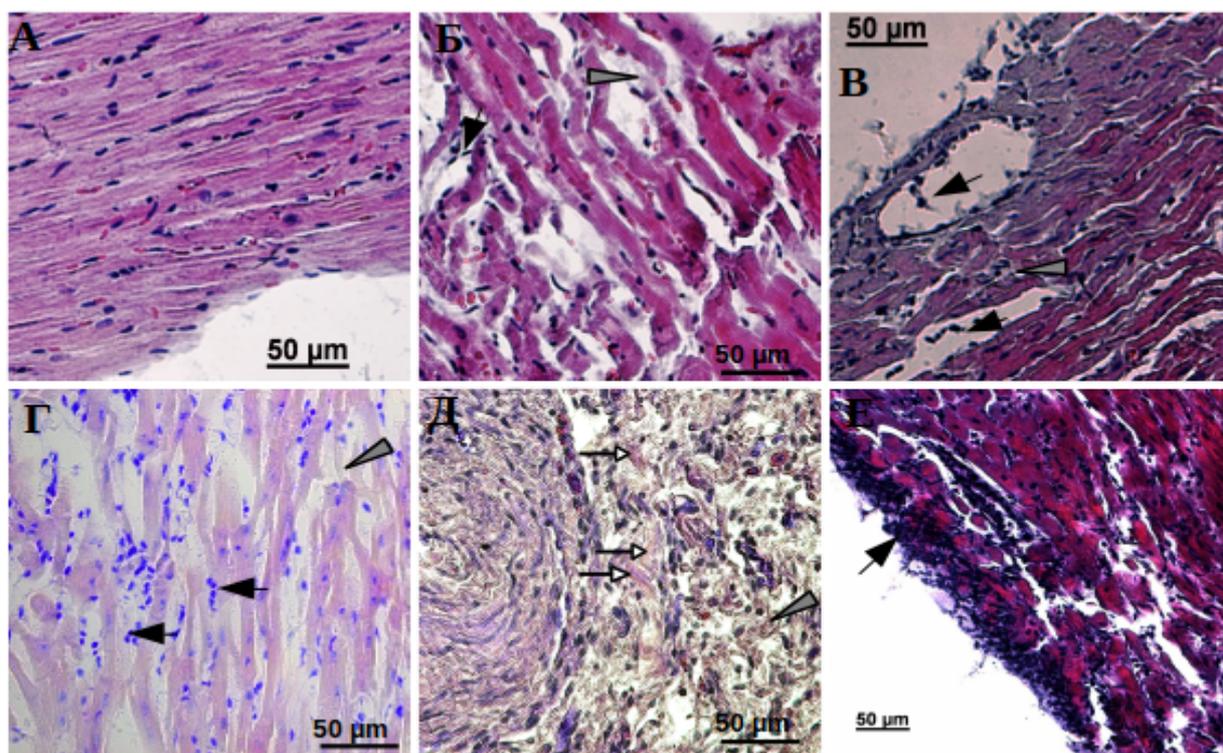


Рисунок 15. Гистологическая картина миокарда у интактных крыс (А), через 7 часов (Б), 1 сутки (В), 3 суток (Г) и 28 суток (Д) после необратимой ишемии. Е - инфильтрация немиоцитарными клетками в области эпикарда через 7 часов после необратимой ишемии. Черными стрелками обозначены немиоцитарные клетки, белыми — живые кардиомиоциты, серыми — гибнущие кардиомиоциты.

Через сутки и трое суток поперечная исчерченность живых кардиомиоцитов, обнаруживаемых в передней стенке, оставалась на том же уровне, что и через 7 часов. Также через 3 суток в срезах обнаруживали участки некроза с единичными кардиомиоцитами, имеющими слабо выраженную поперечную исчерченность (рисунок 15, Г). Инфильтрация ткани немиоцитарными клетками на этот срок была более выражена, а также в миокарде обнаруживали единичные кровоизлияния.

Через 28 суток в передней стенке левого желудочка был выражен участок сформировавшейся соединительной ткани - рубец. Кардиомиоциты в околорубцовой зоне имели

слабо выраженную поперечную исчерченность. Также наблюдали сильную инфильтрацию немиоцитарными клетками, что свидетельствует о незавершенном воспалении или интенсивно идущих процессах репарации ткани, поскольку в обоих процессах задействованы немиоцитарные клетки разных типов.

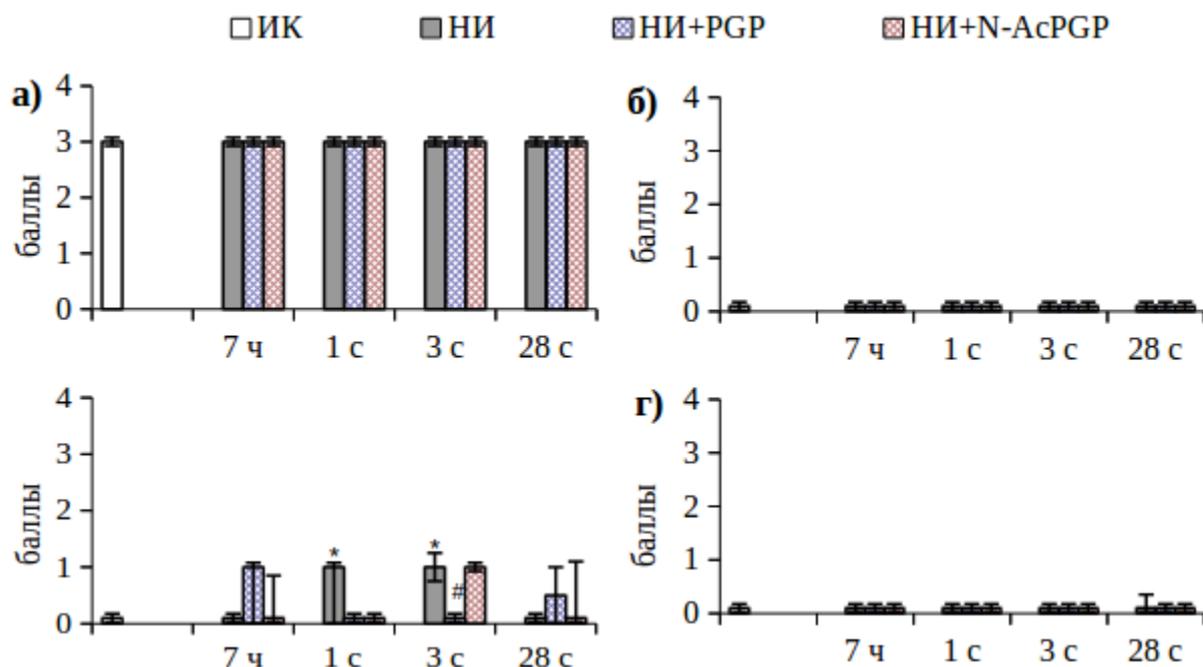


Рисунок 16. Общее состояние миокарда в задней стенке сердца в различные сроки развития ишемического повреждения. а) поперечная исчерченность кардиомиоцитов, б) степень повреждения кардиомиоцитов, в) наличие немиоцитарных клеток, г) выраженность кровоизлияний.

n(ИК)=7;

7 часов: n(НИ)=8, n(НИ+PGP)=9, n(НИ+N-AcPGP)=8;

1 сутки: n(НИ)=10, n(НИ+PGP)=8, n(НИ+N-AcPGP)=8;

3 сутки: n(НИ)=8, n(НИ+PGP)=8, n(НИ+N-AcPGP)=8;

28 сутки: n(НИ)=8, n(НИ+PGP)=9, n(НИ+N-AcPGP)=8;

* $p < 0,05$ по сравнению с ИК (интактный контроль), # $p < 0,05$ по сравнению с группой НИ

Состояние миокарда в межжелудочковой перегородке значимо не отличалось от состояния ткани в интактном контроле.

В задней стенке не наблюдали признаков гибели кардиомиоцитов — поперечная исчерченность и степень их повреждения не отличались от таковых в группе интактного контроля. Однако через сутки и трое суток значимо увеличивалась инфильтрация миокарда немиоцитарными клетками (рисунок 16), что свидетельствует о том, что воспалительная

реакция при необратимой ишемии также затрагивает и неишемизированный регион. Пептиды значительно не повлияли на морфологические изменения кардиомиоцитов и выраженность кровоизлияний, однако в группе НИ+PGP через 3 суток после операции инфильтрация ткани сердца воспалительными клетками была значительно меньше в передней и задней стенке сердца (рисунок 14 и 16).

3.4. Сравнительный анализ параметров ВРС и гемодинамики в норме у крыс с исходно высоким и низким уровнем variability ритма сердца

Развитие инфаркта миокарда связано с активацией стресс реакции организма на боль и недостаточность кровоснабжения мозга и органов, с увеличением активности симпатического отдела вегетативной нервной системы и снижением - парасимпатического. Влияние ВНС на работу сердца можно неинвазивно изучать с помощью оценки ВРС. В клинике для оценки состояния больного используется суточное мониторирование ВРС – холтеровский монитор. Снижение общей ВРС дает плохой прогноз на жизнь пациента. Данных о том, как влияет исходный баланс двух отделов вегетативной нервной системы (у организма преобладают влияния симпатического или парасимпатического отдела нервной системы) на развитие инфаркта миокарда в литературе не обнаружено. По нашим предварительным данным развитие ИМ у крыс с низкой и высокой variability ритма сердца имеет особенности. В связи с этим, в этой части работы изучали различия в вегетативной регуляции сердца и гемодинамических показателях у крыс с исходно низким и высоким уровнем ВРС.

Все эксперименты по оценке выполнены на бодрствующих животных. До моделирования необратимой ишемии у всех крыс регистрировали ЭКГ и рассчитывали параметры variability ритма сердца. По параметру общей variability ритма SDNN с помощью кластерного анализа методом К-средних крысы были разделены на субпопуляции с исходно низкой (НВ) (SDNN=2,16-6,6) и высокой (ВВ) (SDNN=6,69-13,12) ВРС. В покое у НВ животных остальные статистические и спектральные характеристики variability сердечного ритма также отличались и были значимо ниже, чем у ВВ (рисунок 17).

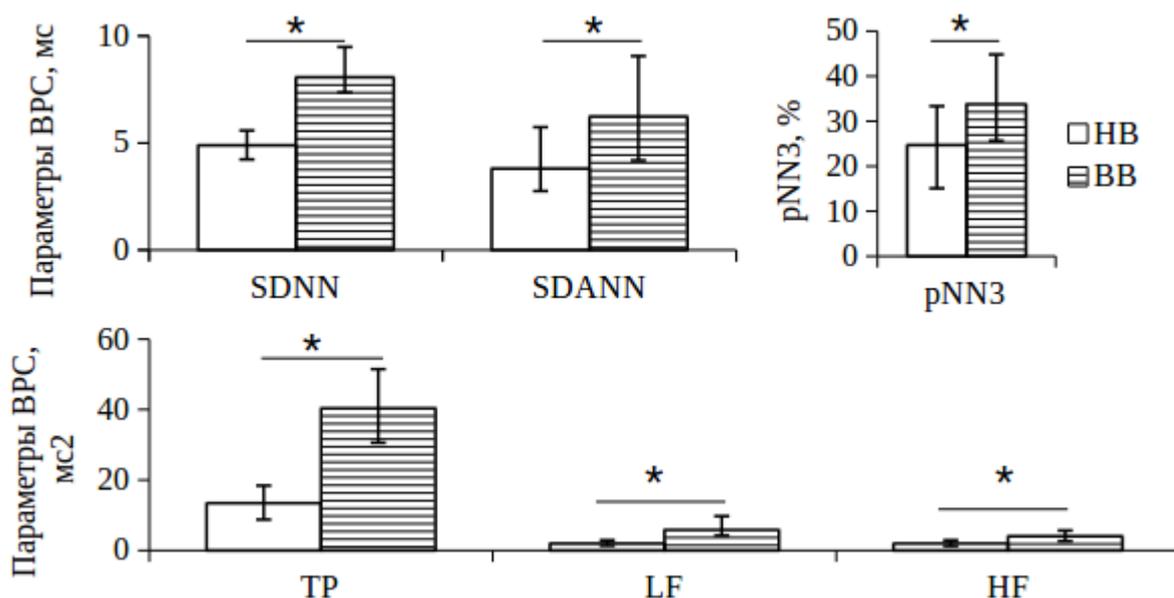


Рисунок 17. Временные и спектральные характеристики ВРС в покое у НВ и ВВ крыс; n(НВ)=97, n(ВВ)=73; *p<0,05 (критерий Манна-Уитни)

В ответ на холодовую пробу реакции параметров ВРС в подгруппах НВ и ВВ животных отличались (рисунок 18). Так, у крыс с исходно низкой ВРС наблюдали значимое увеличение на 15% общей вариабельности SDNN, показателей медленных колебаний ритма SDANN в 2 раза, а также увеличение общей мощности спектра TP на 19% и низкочастотного компонента LF на 30%. При этом показатели рNN3 и HF значимо уменьшались на 29 и 12% соответственно. У ВВ животных значимо достоверно снижались параметры SDNN на 13%, рNN3 на 19%, HF на 9% и TP на 21 % и увеличивались параметры SDANN на 38 %, то есть в меньшей степени по сравнению с группой НВ крыс (рисунок 18).

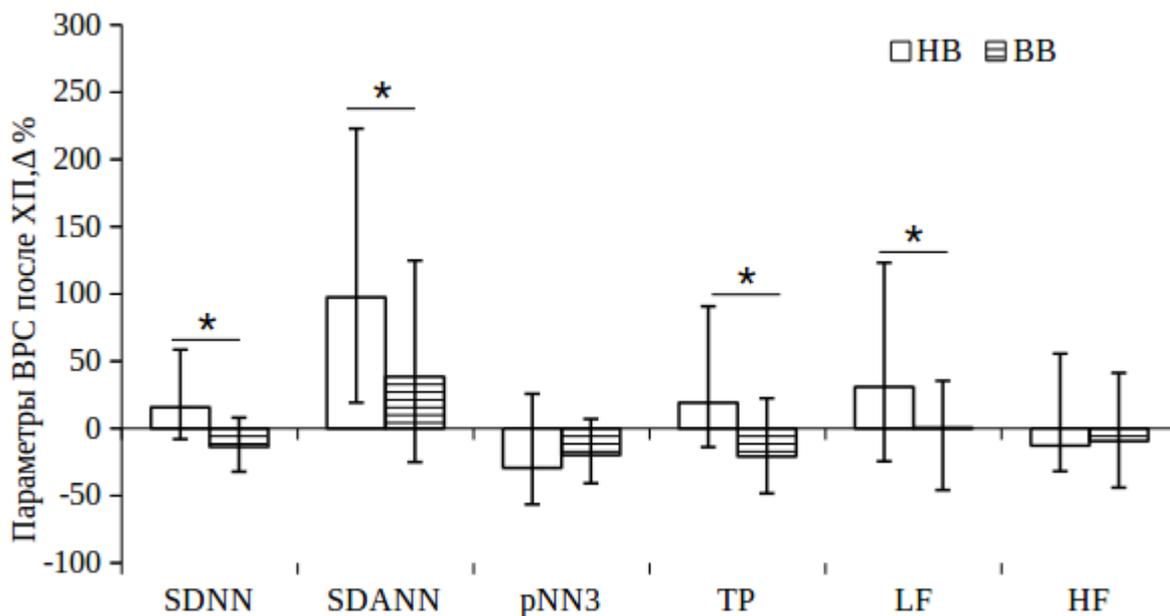


Рисунок 18. Изменение временных и спектральных параметров ВРС в ответ на холодную пробу у крыс с исходно высокой (ВВ) и низкой (НВ) вариабельностью сердечного ритма. n(НВ)=97, n(ВВ)=73; *p <0,05 (критерий Манна-Уитни)

Таким образом, крысы с исходно высоким и низким уровнем ВРС, рассчитываемому по параметру SDNN, отличаются также по остальным исследуемым параметрам: у ВВ животных они значимо выше. Более того, отличалась реакция показателей ВРС на холодную пробу у крыс с разным исходным уровнем: параметры общей вариабельности реагировали на ХП разнонаправлено, а показатели медленных колебаний ритма отвечали на функциональный тест у НВ животных значимо сильнее.

В связи с этим, мы предположили, что такие различия в вегетативной регуляции сердца могут отразиться на гемодинамических параметрах и показателях работы сердца, как в покое, так и при использовании фармакологических нагрузочных тестов. Все эксперименты по изучению гемодинамических характеристик выполнены на наркотизированных золетилом и рометаром крысах. В покое у наркотизированных НВ животных по сравнению с ВВ выше ЧСС

и индексы сократимости и расслабления миокарда и меньше ЛЖКДД (таблица 4).

Таблица 4. Абсолютные значения гемодинамических параметров у низковариабельных (НВ) и высоковариабельных (ВВ) животных в покое и в ответ на фармакологические нагрузочные тесты в группе интактного контроля

n(НВ)=12, n(ВВ)=8; * - p<0,05 по сравнению с покоем (критерий Вилкоксона), # - p<0,05 при сравнении покоя у НВ и ВВ животных (критерий Манна-Уитни)

	НВ				ВВ			
	покой	ACh	Dbt	Phe	покой	ACh	Dbt	Phe
ЧСС уд/мин (бодрству ющие)	368,4 (333,3; 397,2)				399,5 (391,3; 419,2)			
ЧСС уд/мин (наркоти зирован ные)	269,7 (263,9; 295,9)#	273,0 (250,1; 293,7)	310,9 (296,6; 332,4)*	297,8 (276,3; 321,0)	250,0 (205,3; 261,6)#	250,9 (221,2; 274,8)	293,8 (257,7; 318,9)	284,9 (255,5; 309,4)
АДср, мм. рт. ст.	84,2 (79,0; 96,0)	78,7 (77,3; 88,6)*	87,1 (78,6; 103,7)	169,8 (154,1; 174,7)*	81,6 (73,4; 88,4)	72,5 (69,4; 77,4)*	88,7 (81,2; 95,4)	179,7 (174,5; 182,2)*
ЛЖКСД, мм.рт. ст.	114,4 (108,1; 119,3)	108,5 (104,9; 118,8)	119,8 (120,7; 150,3)*	213,6 (198,9; 232,7)*	122,2 (104,5; 124,5)	118,0 (103,4; 121,9)	137,0 (128,2; 152,4)*	226,1 (209,8; 244,8)*
ЛЖКДД мм.рт.ст.	15,0 (11,1; 28,1)#	15,0 (11,7; 27,8)	14,3 (12,3; 25,7)	21,2 (12,4; 29,3)*	30,0 (16,2; 33,8)#	29,7 (17,2; 35,2)	24,2 (17,5; 34,1)	26,3 (20,1; 32,9)
+dp/dt мм.рт.ст./ сек.	2773,9 (2671,3; 3011,4)#	2706,2 (2630,0; 2918,0)*	3328,7 (2989,3; 3572,0)*	4511,6 (4297,4; 4754,1)*	2679,2 (2461,9; 2838,9)#	2622,3 (2470,9; 2794,2)*	3235,3 (3047,4; 3588,4)*	4511,7 (4135,7; 5042,7)*
-dp/dt мм.рт.ст./ сек.	2641,2 (2512,7; 2748,2)#	2436,2 (2312,7; 2508,7)*	3068,9 (2962,8; 3272,1)*	4725,8 (4293,2; 5138,6)*	2240,6 (2118; 2574,9)#	2210,8 (2088,2; 2485,6)*	3078,0 (2827,1; 3420,7)*	4763,1 (4438,2; 5052,3)*

Фармакологический нагрузочный тест ацетилхолином у НВ и ВВ животных приводил к уменьшению артериального давления на 7 и 11 %, индекса сократимости на 1,2 и 2,1 % и индекса расслабления миокарда на 2,4 и 1,3 %, соответственно. Прямая стимуляция работы

сердца НВ и ВВ животных добутамином приводила к увеличению индекса сократимости на 20 и 21%, индекса расслабления миокарда на 16 и 37 %, а также ЧСС у наркотизированных животных на 25 и 18%, соответственно. Различий в реакции параметров гемодинамики на инфузию ацетилхолина и добутамина в подгруппах НВ и ВВ животных не наблюдали. Увеличение АДср фенилэфрином приводило к увеличению ЛЖКСД и индексов сократимости и расслабления миокарда. При этом рост ЧСС у наркотизированных крыс и ЛЖКДД в ответ на фенилэфрин отмечен только у НВ животных (таблица 4).

Таким образом, ВВ и НВ животные отличаются по гемодинамическим параметрам в покое и их реакции на увеличение постнагрузки фенилэфрином, а также по показателям ВРС и их ответу на стрессорное воздействие. В связи с этим в работе исследовали динамику изменения вегетативной регуляции работы сердца и гемодинамических инфаркта миокарда у НВ и параметров после ВВ животных отдельно.

3.5. Сравнение изменения вегетативной регуляции сердца и гемодинамических показателей у крыс с исходно высоким и низким уровнем вариабельности ритма сердца после моделирования необратимой ишемии

3.5.1. В состоянии спокойного бодрствования

После инфаркта миокарда у НВ животных сохранялся уровень общей вариабельности ритма сердца, оцененный по параметру SDNN, в то время как у ВВ он снижался на 40 и 29% в острый период, через сутки и 3-е суток соответственно (рисунок 19).

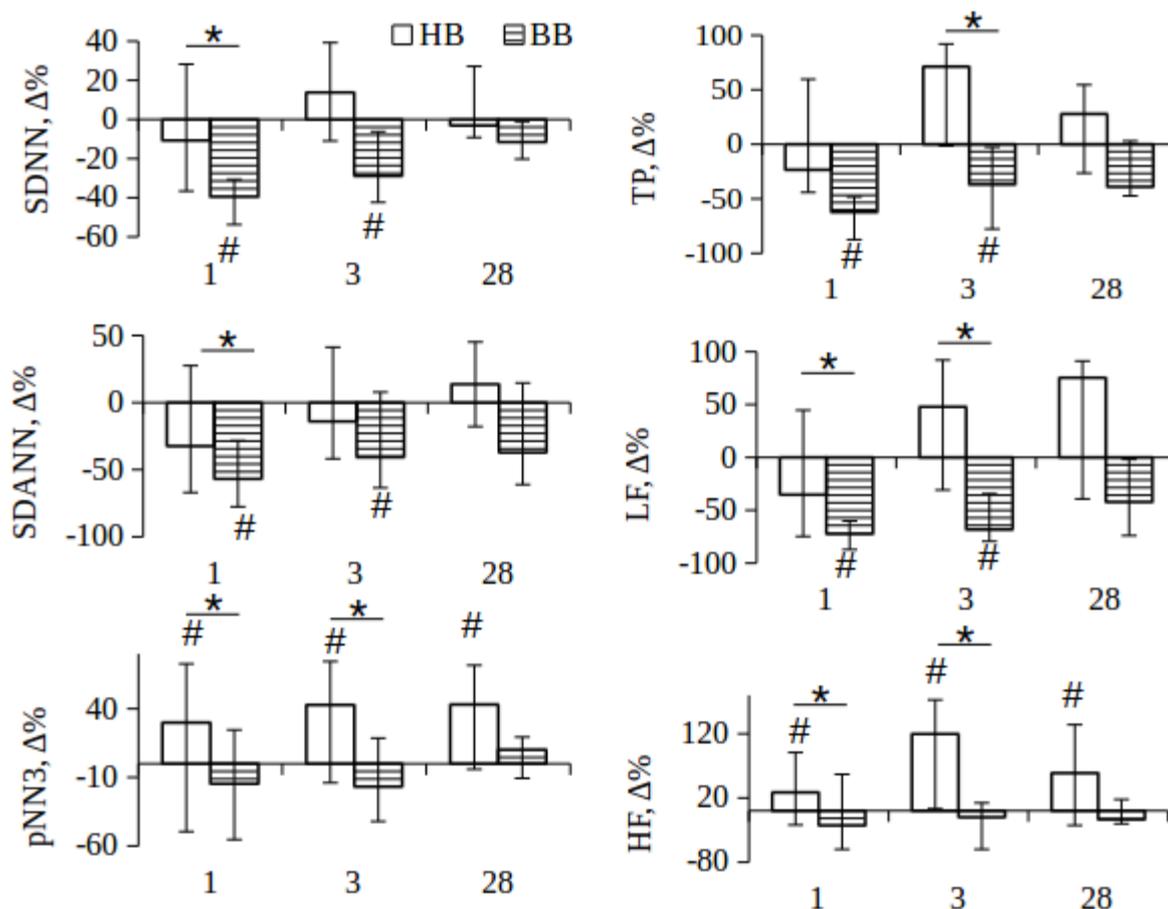


Рисунок 19. Изменение параметров ВРС у низко- (НВ) и высоковариабельных (ВВ) животных после инфаркта миокарда.

* - $p < 0,05$, # - $p < 0,05$ по сравнению с доинфарктным уровнем;

1 сутки: $n(\text{НВ})=26$, $n(\text{ВВ})=19$;

3 сутки: $n(\text{НВ})=24$, $n(\text{ВВ})=19$;

28 сутки: $n(\text{НВ})=6$, $n(\text{ВВ})=5$

Показатель общей мощности спектра TP у ВВ животных аналогично снижался на 62 и 37 % через сутки и трое суток соответственно. Уменьшение общей вариабельности в группе ВВ

связано со снижением вклада симпатического отдела вегетативной нервной системы в ВРС, отражаемого статистическим параметром SDANN и спектральным показателем LF. Все параметры ВРС у ВВ животных возвращались к доинфактным значениям через 28 суток после моделирования ишемии. При этом, у НВ животных через сутки, трое и 28 суток происходило увеличение на 30, 43 и 43% параметра рNN3 и спектрального показателя HF на 29, 120 и 59 % соответственно - оба характеризуют вклад парасимпатического отдела ВНС (рисунок 19) в ВРС.

Таким образом, у крыс с исходно низким уровнем ВРС по сравнению с ВВ животными через сутки и 3-е суток значимо выше параметр общей ВРС SDNN, а также выше показатели быстрых (рNN3, HF) и медленных (LF и SDARR) колебаний ритма, что может свидетельствовать о том, что у НВ животных лучше сохранялась вегетативная регуляция сердца после ИМ (рисунок 19). Более того, у ВВ крыс увеличение показателей, интерпретируемых как регуляция со стороны симпатического отдела ВНС, происходила значительно раньше, чем показателей отражающий вклад парасимпатического отдела.

3.5.2. Изменения гемодинамических параметров у наркотизированных НВ и ВВ крыс на 3 и 28 суток после инфаркта миокарда

После моделирования необратимой ишемии у наркотизированных крыс с исходно низкой ВРС через 3-е суток наблюдали уменьшение ЧСС на 21 %, АДср на 6 %, ЛЖКСД на 13 % и индексов сократимости и расслабления миокарда на 14 и 23 % соответственно, что может свидетельствовать о снижении сократительной функции сердца и развитии сердечной недостаточности. Через 28 суток сниженными оставались только ЧСС на 14 % и индексы сокращения и расслабления миокарда на 11 и 14 %.

У ВВ животных уменьшалось только ЛЖКДД на 41 и 45 % через 3-е и 28 суток после операции соответственно.

После моделирования инфаркта миокарда, как в группе НВ, так и в группе ВВ крыс, ответы гемодинамических показателей на фармакологические нагрузочные тесты ацетилхолином и добутамином по сравнению с группой интактного контроля не изменялись.

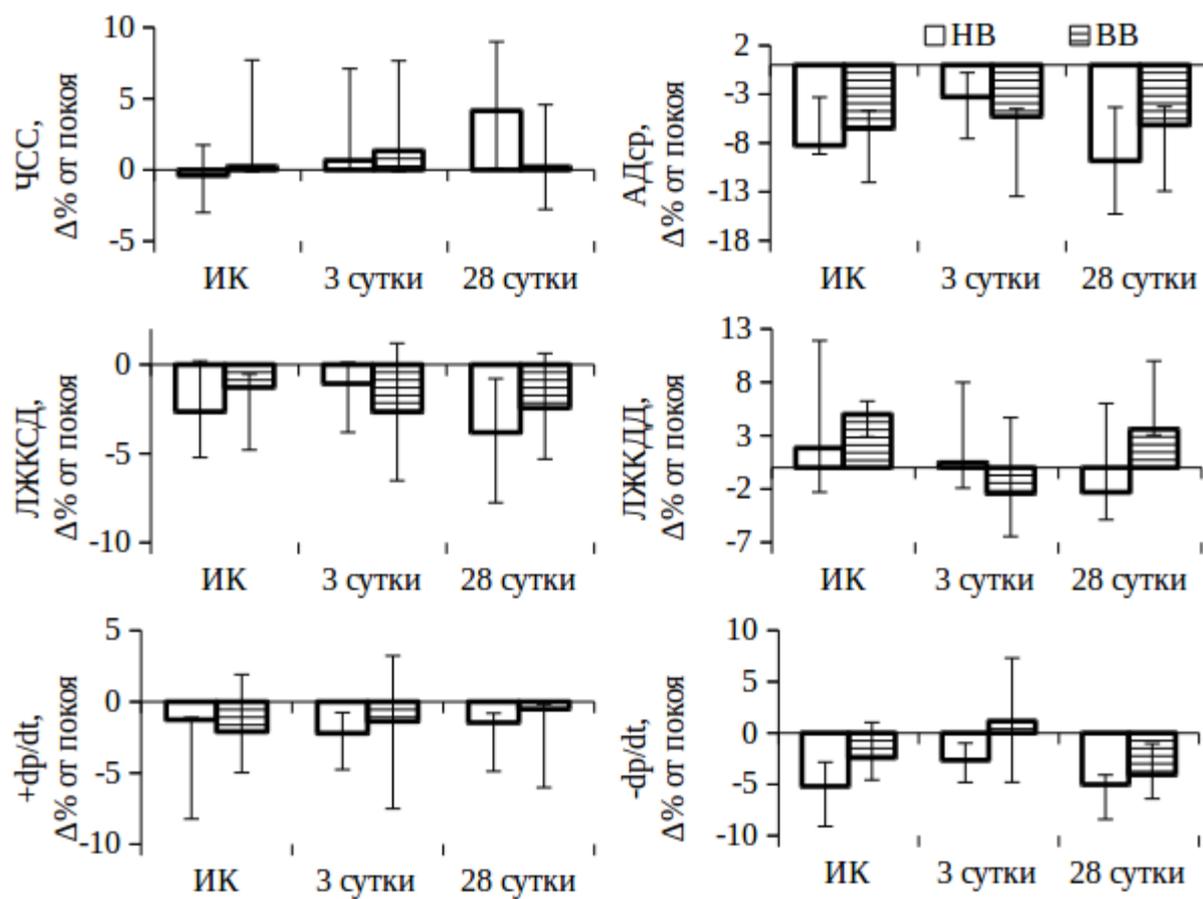


Рисунок 20. Реакция гемодинамических показателей на инфузию ацетилхолина в группе НИ у низко- (NB) и высоковариабельных (BB) крыс.

1 сутки: n(NB)=26, n(BB)=19;

3 сутки: n(NB)=11, n(BB)=8;

28 сутки: n(NB)=6, n(BB)=5;

* - $p < 0,05$; # - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим ИК

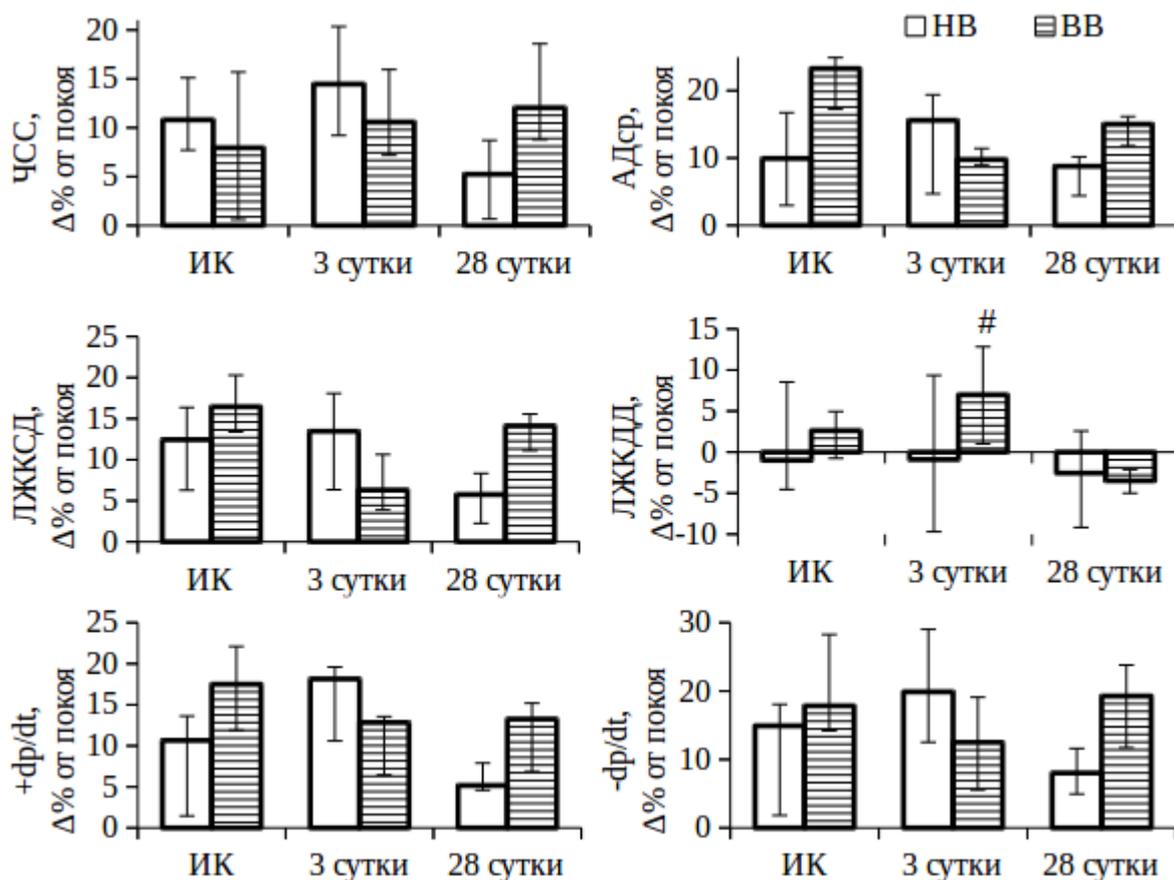


Рисунок 21. Реакция гемодинамических показателей на инфузию добутина в группе НИ у низко- (HV) и высоковариабельных (VV) крыс.

1 сутки: n(HV)=26, n(VV)=19;

3 сутки: n(HV)=11, n(VV)=8;

28 суток: n(HV)=6, n(VV)=5;

* - $p < 0,05$; # - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим ИК

У HV и VV животных через 3-е суток после моделирования необратимой ишемии инфузия агониста $\alpha 1$ -адренорецепторов фенилэфрина приводила к росту АДср, ЧСС и параметров работы сердца в той же степени, что и в интактном контроле. Через 3 суток субпопуляции HV крыс по сравнению в VV животными ответы АДср увеличивалось в большей степени, что приводило к большему росту ЛЖКСД и скоростей сокращения миокарда, но различия нивелировались к 28 суткам после моделирования инфаркта (рисунок 22). Через 28 суток после операции у обеих групп наблюдали меньшее увеличение АДср, ЛЖКСД и индексов сократимости и расслабления миокарда по сравнению с интактным контролем (рисунок 22).

Уменьшение ответа ЛЖКСД и индексов сократимости и расслабления миокарда у VV животных через 3 суток по сравнению с HV крысами и в обеих подгруппах через 28 суток может быть связано как с уменьшением постнагрузки, так и с уменьшением сократительной

способности сердца. Для оценки сократительной активности миокарда в ответ на увеличение постнагрузки вычисляли отношение изменения $+dp/dt$ к изменению АДср. У ВВ и НВ крыс и интактном контроле и после моделирования ишемии на всех сроках эксперимента этот индекс не отличался, что свидетельствует о том, что меньшее увеличение ЛЖКСД и индексов сокращения и расслабления миокарда вероятнее всего связано со снижением $\alpha 1$ -опосредованного увеличения постнагрузки.

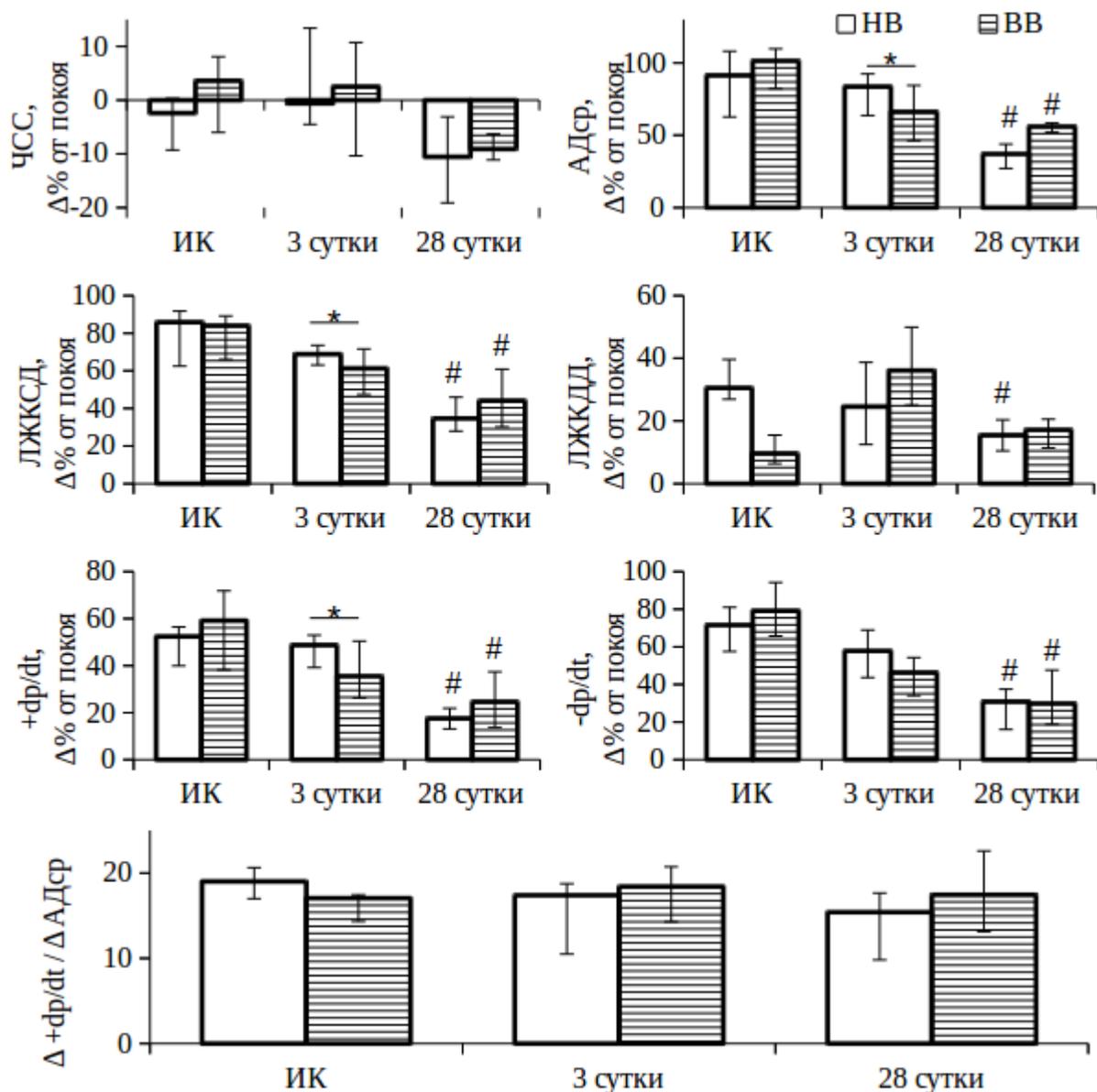


Рисунок 22. Реакция гемодинамических показателей на инфузию фенилэфрина в группе НИ у низко- (НВ) и высоковариабельных (ВВ) крыс.

1 сутки: $n(\text{НВ})=26$, $n(\text{ВВ})=19$;

3 сутки: $n(\text{НВ})=11$, $n(\text{ВВ})=8$;

28 сутки: $n(\text{НВ})=6$, $n(\text{ВВ})=5$;

* - $p < 0,05$; # - $p < 0,05$ по сравнению с соответствующим ИК

3.5.3. Анализ размера некроза, рубца, веса и выживаемости животных с исходно низким и высоким уровнем ВРС после инфаркта миокарда

Через 3 суток после моделирования необратимой ишемии размер некроза у низко и высоковариабельных крыс не различался и составил около 25% от общей площади кольцевых срезов сердца. Различий между группами НВ и ВВ животных обнаружено не было (рисунок 23, а). Через 28 суток у ВВ животных была значимо больше относительная масса сформировавшегося рубца (рисунок 23, б). Выживаемость в субпопуляции НВ животных к 28 суткам составила 70%, а среди ВВ крыс — 53%, то есть у ВВ животных к 28 суткам наблюдали тенденцию ($p=0,067$) к большей смертности (рисунок 23, г). Динамика массы между ВВ и НВ крысами в течение 28 суток значимо не отличалась (рисунок 23, в).

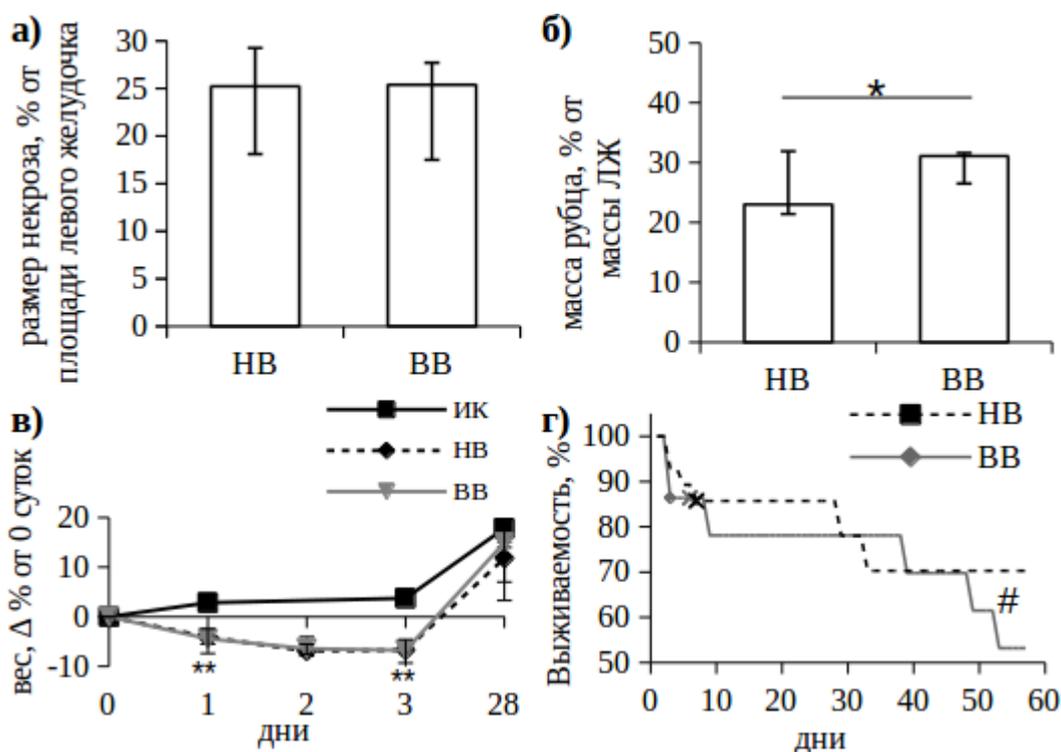


Рисунок 23. Размер некроза (а) через 3 суток и масса рубца (б) через 28 суток после операции у высоковариабельных (ВВ) и низковариабельных (НВ) животных. Динамика массы крыс (в) и их выживаемость (г) за 28 суток эксперимента.

* - $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни), # - $p < 0,1$ (лог-ранк тест)

Таким образом, в популяции крыс можно выделить животных с исходно низким и высоким уровнем ВРС. У таких животных отличаются все параметры, характеризующие ВРС и

их реакции на мягкий стрессорный стимул — холодовую пробу. Обнаружено, что у этих животных отличаются изменения в вегетативной регуляции и в работе сердца, которыми сопровождается развитие инфаркта миокарда. Поэтому влияние пептидов пролил-глицил-пролина и его ацетилированной формы на развитие инфаркта миокарда оценено отдельно у НВ и ВВ животных.

3.6. Исследование влияние PGP и N-AsPGP на динамику развития инфаркта миокарда у крыс с исходно высоким и низким уровнем вариабельности ритма после моделирования необратимой ишемии

Ранее в настоящей работе было показано, что PGP и N-AsPGP могут обладать противовоспалительным действием за счёт снижения секреции гистамина тучными клетками. Развитие инфаркта миокарда сопровождается активацией воспаления, осложняющего течение заболевания. Мы предположили, что введение пептидов в острый срок развития ишемического повреждения может снизить уровень воспалительной реакции и улучшить состояние сердца, что отразится и на сопровождении работы сердца вегетативной нервной системой, и на гемодинамических показателях.

3.6.1. Влияние пептидов PGP и N-AsPGP на параметры ВРС после инфаркта миокарда

У низковариабельных крыс после необратимой ишемии в группе НИ+PGP по сравнению с контрольной группой НИ (изменения в контрольной группе на рисунке 19 раздела 3.5.1) через 28 суток увеличивалась общая ВРС: на 50% параметр - SDNN и в 6,6 раз общая мощность спектра TP. Также наблюдали увеличение в 2 раза показателей быстрых колебаний ритма, определяемых статистическим параметром pNN3 и спектральным показателем HF, отражающими преимущественно вклад парасимпатического отдела ВНС (рисунок 24).

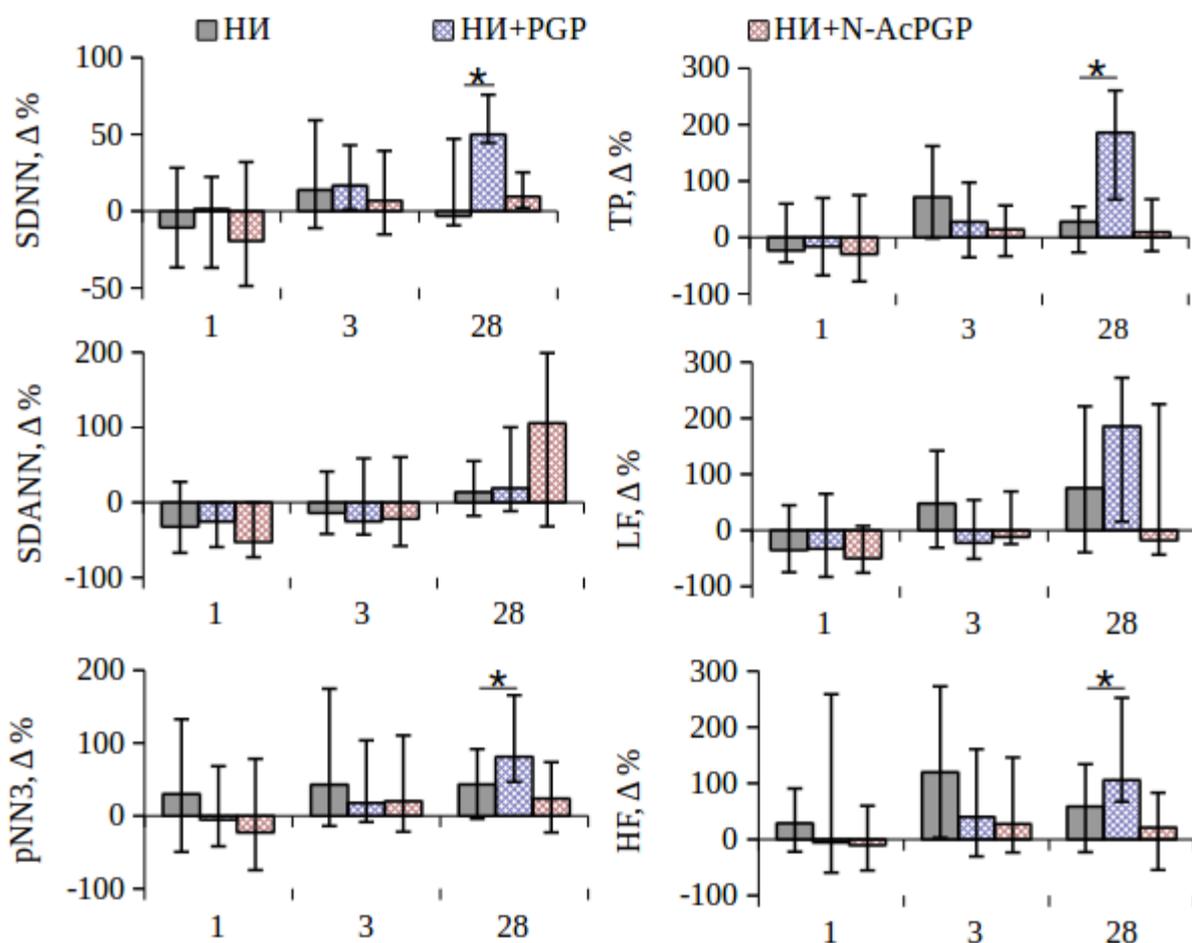


Рисунок 24. Влияние PGR и N-АсPGR на параметры ВРС у НВ крыс через 1, 3 и 28 суток после операции (по оси абсцисс).

1 сутки $n(\text{НИ})=26$, $n(\text{НИ+PGR})=26$, $n(\text{НИ+N-АсPGR})=24$;

3 сутки $n(\text{НИ})=24$, $n(\text{НИ+PGR})=26$, $n(\text{НИ+N-АсPGR})=22$;

28 суток $n(\text{НИ})=6$, $n(\text{НИ+PGR})=5$, $n(\text{НИ+N-АсPGR})=5$;

* - $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

У высоковариабельных животных (ВВ) после необратимой ишемии в группе НИ+N-АсPGR по сравнению с контрольной группой НИ (изменения в контрольной группе на рисунке 19 раздела 3.5.1) через 28 суток параметр общей variability ритма SDNN был значимо меньше в 3,7 раза (рисунок 19 раздела 3.5.1). При этом не наблюдалось значимого уменьшения показателя общей мощности спектра TP, что может быть связано с большим разбросом данных при спектральном анализе.

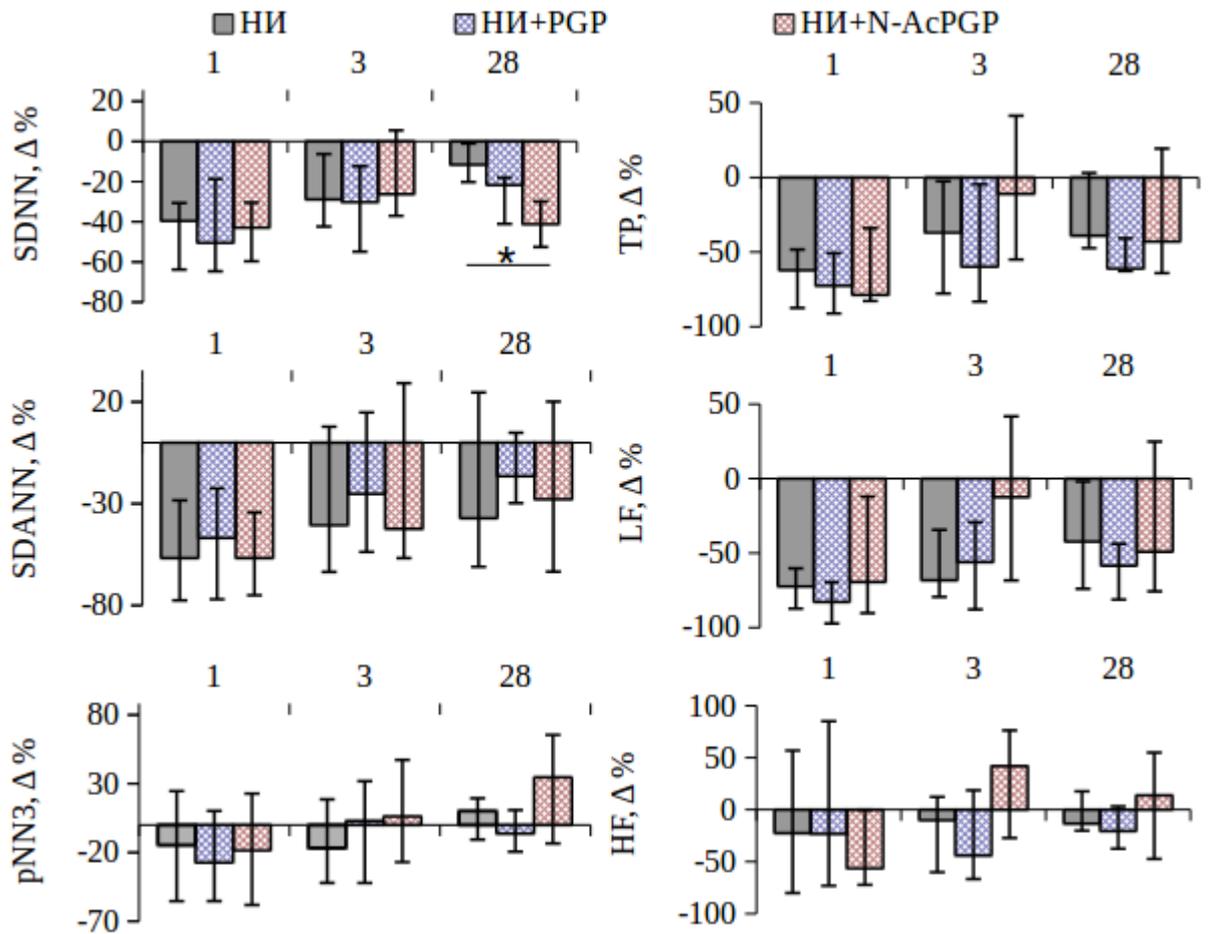


Рисунок 25. Влияние PGP и N-АсPGP на параметры ВРС у высоковариабельных (ВВ) крыс через 1, 3 и 28 суток после операции (по оси абсцисс).

1 сутки $n(\text{HI})=19$, $n(\text{HI+PGP})=21$, $n(\text{HI+N-АсPGP})=17$;

3 сутки $n(\text{HI})=19$, $n(\text{HI+PGP})=21$, $n(\text{HI+N-АсPGP})=17$;

28 суток $n(\text{HI})=5$, $n(\text{HI+PGP})=5$, $n(\text{HI+N-АсPGP})=4$;

* - $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

Таким образом, пептиды оказали разнонаправленное действие, зависящее от исходного уровня активности ВНС: у низковариабельных животных PGP увеличил общую вариабельность ритма через 28 суток после инфаркта миокарда за счёт увеличения вклада показателей, преимущественно отражающих активность парасимпатического отдела ВНС, в то время как N-АсPGP в группе высоковариабельных крыс снизил общую вариабельность ритма.

Анализ результатов функциональной нагрузки на ВРС инфарктных крыс показал, что у крыс с исходно низкой ВРС через сутки, трое и 28 суток после ИМ снижалась в 2, 2,5 и 3 раза реакция параметра общей ВРС SDNN в ответ на предъявление холодового стимула. При этом

уменьшение реакции общей ВРС не поддержано соответствующим изменением общей мощности спектра, что может быть связано с меньшей выраженностью реакции спектральных показателей на холодное воздействие и большим разбросом данных. Пептиды не повлияли на реакцию параметров ВРС на ХП в этой группе животных (рисунок 26).

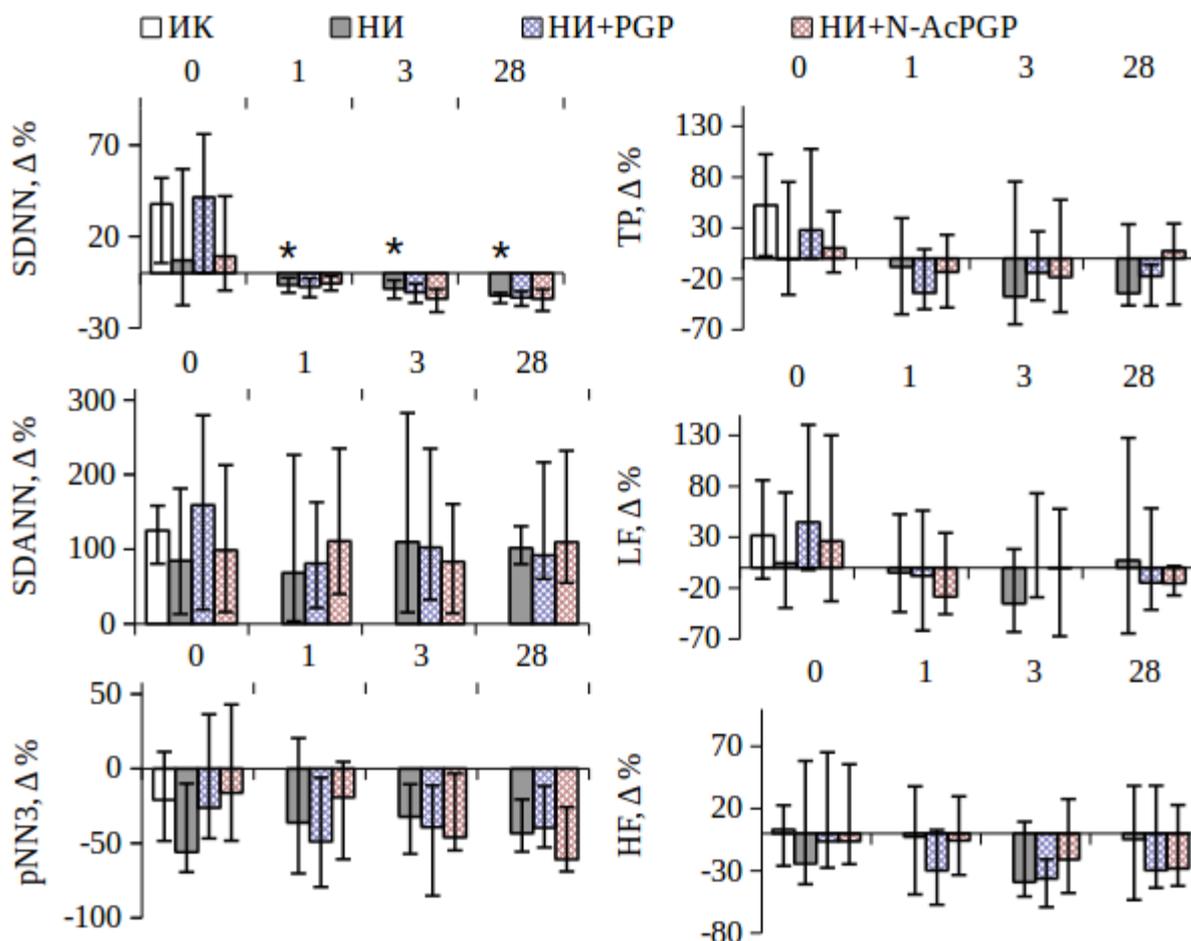


Рисунок 26. Влияние PGP и N-AcPGP на реакции параметров ВРС на ХП у НВ крыс через 1, 3 и 28 суток после операции (по оси абсцисс).

n(ИК)=12;

1 сутки n(НИ)=26, n(НИ+PGP)=26, n(НИ+N-AcPGP)=24;

3 сутки n(НИ)=24, n(НИ+PGP)=26, n(НИ+N-AcPGP)=22;

28 сутки n(НИ)=6, n(НИ+PGP)=5, n(НИ+N-AcPGP)=5;

* $p < 0,05$ для группы НИ по сравнению с уровнем до операции (0 сутки) (критерий Вилкоксона)

У высоковариабельных животных реакция параметра общей ВРС оставалась на доинфарктном уровне через сутки и 3-е суток после операции, однако снижалась в 3,5 раза через 28 суток, по всей видимости, за счёт снижения реакции временного параметра pNN3 и

спектрального показателя HF (рисунок 27), преимущественно отражающих активность парасимпатического отдела ВНС. Отсутствие изменения реакции спектрального показателя TP может быть связано с тем, что, несмотря на высокую степень корреляции с SDNN, данный параметр имеет иную природу и изменение активности одного из отделов ВНС может приводить к различным изменениям в этих показателях. Через 3 суток реакция на ХП временного и спектрального параметров SDANN и LF увеличивалась в 2 и 3 раза соответственно, (рисунок 27).

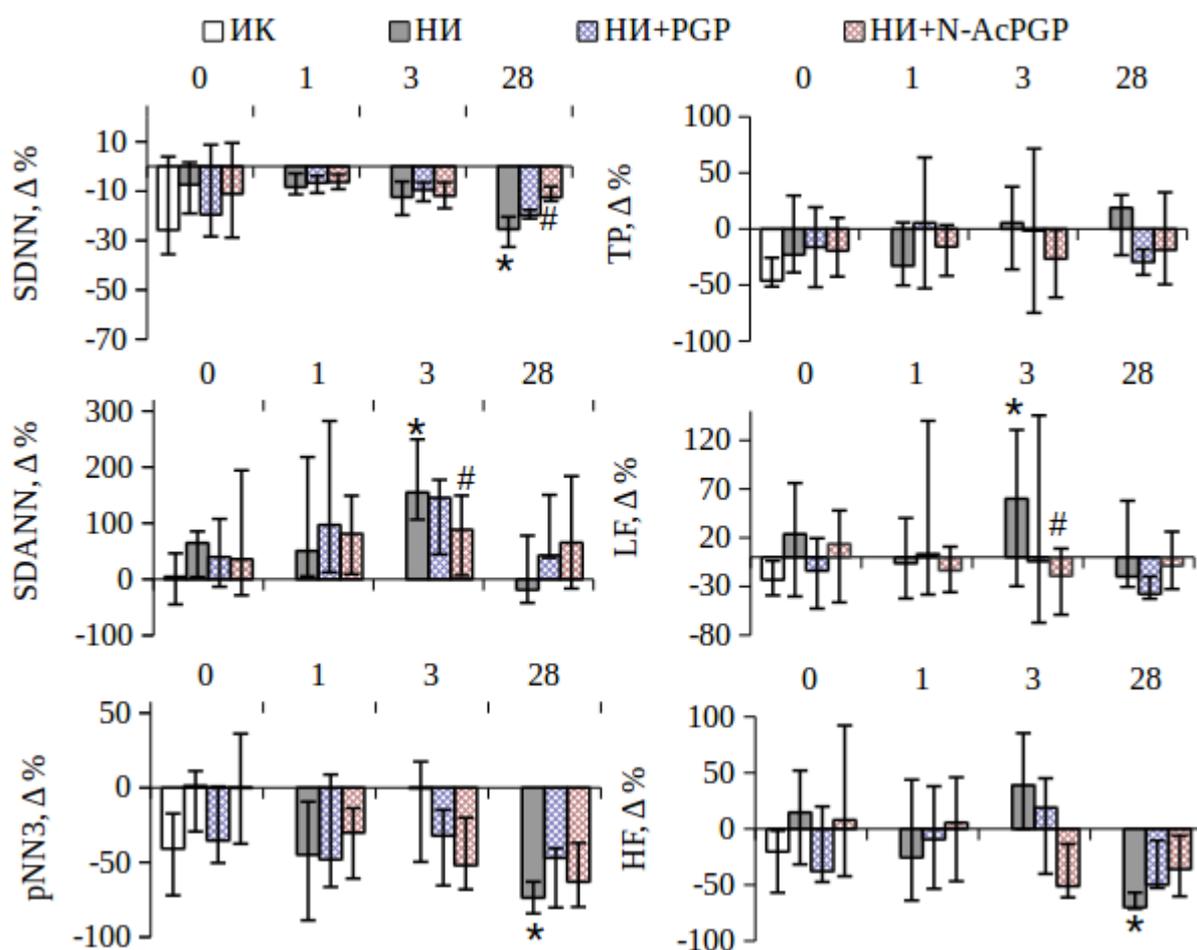


Рисунок 27. Влияние PGP и N-АсPGP на реакции параметров ВРС на ХП у ВВ крыс через 1, 3 и 28 суток после операции (по оси абсцисс).

$n(\text{ИК})=8$;

1 сутки $n(\text{НИ})=19$, $n(\text{НИ+PGP})=21$, $n(\text{НИ+N-АсPGP})=17$;

3 сутки $n(\text{НИ})=19$, $n(\text{НИ+PGP})=21$, $n(\text{НИ+N-АсPGP})=17$;

28 сутки $n(\text{НИ})=5$, $n(\text{НИ+PGP})=5$, $n(\text{НИ+N-АсPGP})=4$;

* - $p < 0,05$ для группы НИ по сравнению с с уровнем до операции (0 сутки) (критерий Вилкоксона);

- $p < 0,05$ по сравнению с группой НИ (критерий Манна-Уитни)

В группе НИ+N-АсPGP реакция SDANN и LF снижалась по сравнению с группой НИ и не отличалась от доинфарктных значений. Также в группе НИ+N-АсPGP через 28 суток в 2 раза увеличивалась реакция на ХП параметра общей ВРС SDNN и не отличалась от доинфарктного уровня (рисунок 27).

Таким образом, у крыс с исходно низким уровнем ВРС PGP увеличил общую ВРС в хронический период за счёт увеличения вклада парасимпатического отдела ВНС. ХП не выявила дополнительных влияний пептидов на ВРС в этой подгруппе животных. У высоковариабельных животных N-АсPGP снизил общую вариабельность ритма в через 28 суток и повлиял на ответы параметров на ХП, нивелируя изменения в реакции этих параметров, возникающие вследствие развития ишемического повреждения, приближая их реакции к уровню до инфаркта.

3.6.2. Влияние PGP и N-АсPGP на гемодинамические параметры после инфаркта миокарда в покое и при использовании фармакологических тестов

В остром эксперименте на наркотизированных НВ животных в состоянии покоя через 3 суток после ИМ в группе НИ уменьшались ЧСС, АДср, ЛЖКСД и скорости сокращения и расслабления миокарда, но АД и ЛЖКСД возвращались к уровню интактного контроля через 28 суток после моделирования инфаркта. PGP и N-АсPGP через 28 суток увеличивали ЧСС на 26 и 18% соответственно. N-АсPGP уменьшил на 8 и 21% скорости сокращения и расслабления миокарда через 28 суток (рисунок 28).

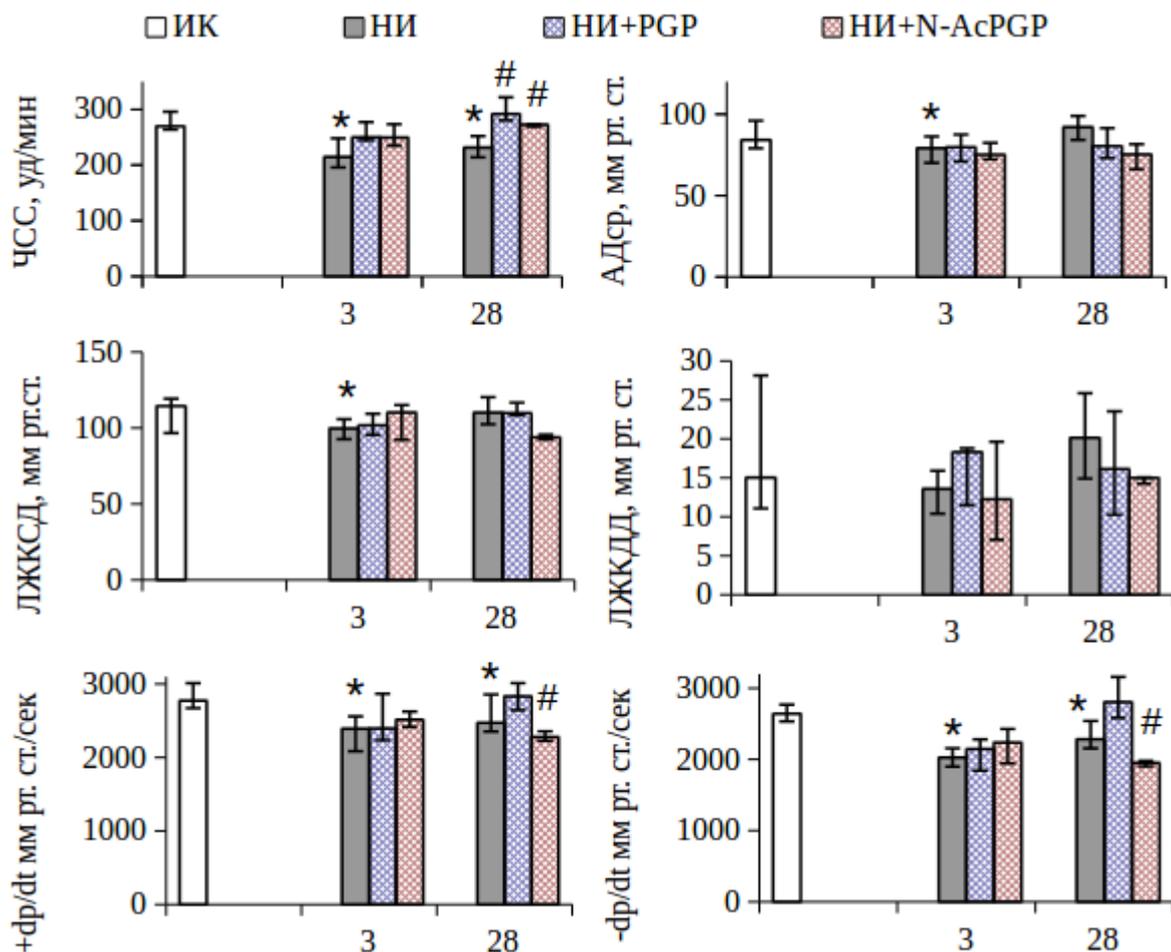


Рисунок 28. Влияние PGR и N-АсPGR на гемодинамические показатели у крыс с исходно низкой ВРС. По оси абсцисс — сутки после операции.

n(ИК)=12;

3 сутки n(НИ)=11, n(НИ+PGR)=13, n(НИ+N-АсPGR)=9;

28 сутки n(НИ)=6, n(НИ+PGR)=5, n(НИ+N-АсPGR)=5;

* - $p < 0,05$ по сравнению с ИК (только для группы НИ),

- $p < 0,05$ по сравнению с группой НИ на соответствующие сутки.

У крыс с исходно высокой вариабельностью ритма сердца в группе НИ по сравнению с интактным контролем через 3 суток снижалось ЛЖКСД и оставалось сниженным через 28 суток. В хронический период N-АсPGR увеличил АДср на 12%, ЛЖКСД на 13% и скорости сокращения и расслабления миокарда на 8 и 3% соответственно (рисунок 29).

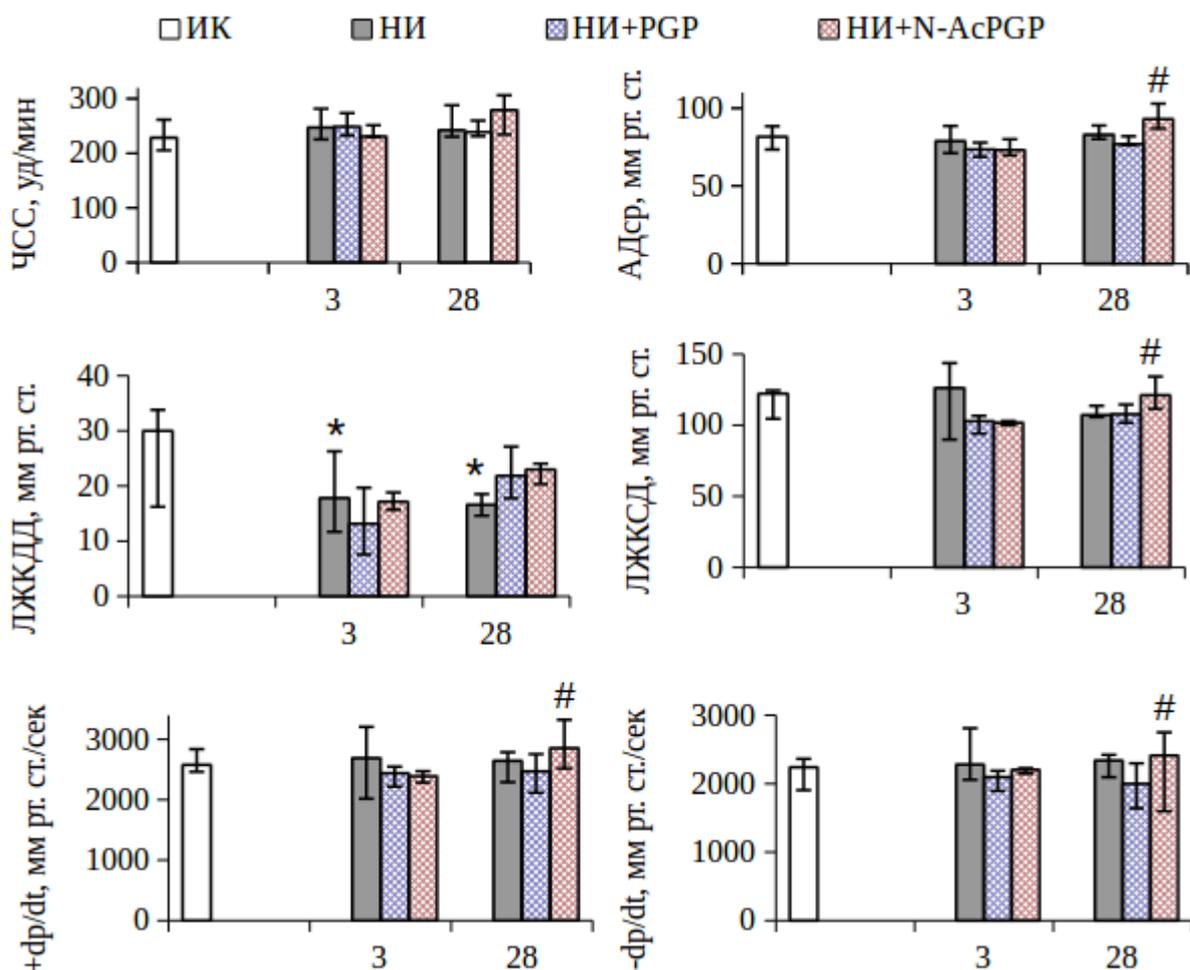


Рисунок 29. Влияние PGR и N-AcPGR на гемодинамические показатели у крыс с исходно высокой ВРС. По оси абсцисс — сутки после операции.

n(ИК)=8;

3 сутки n(НИ)=8, n(НИ+PGR)=12, n(НИ+N-AcPGR)=7;

28 сутки n(НИ)=5, n(НИ+PGR)=5, n(НИ+N-AcPGR)=4;

* - $p < 0,05$ по сравнению с ИК (только для группы НИ),

- $p < 0,05$ по сравнению с группой НИ на соответствующие сутки.

Фармакологическая нагрузка ацетилхолином приводила к снижению артериального давления и параметров работоспособности сердца в одинаковой степени во всех экспериментальных группах через 3 суток после моделирования инфаркта, пептиды не изменяли направленность эффектов (рисунок 30, 31). У НВ крыс через 28 суток после операции в группе НИ+PGR при сравнимом падении артериального давления с контрольной и инфарктной группами индексы сократимости и расслабления сердца снижались значимо больше, чем у инфарктного контроля (рисунок 30).

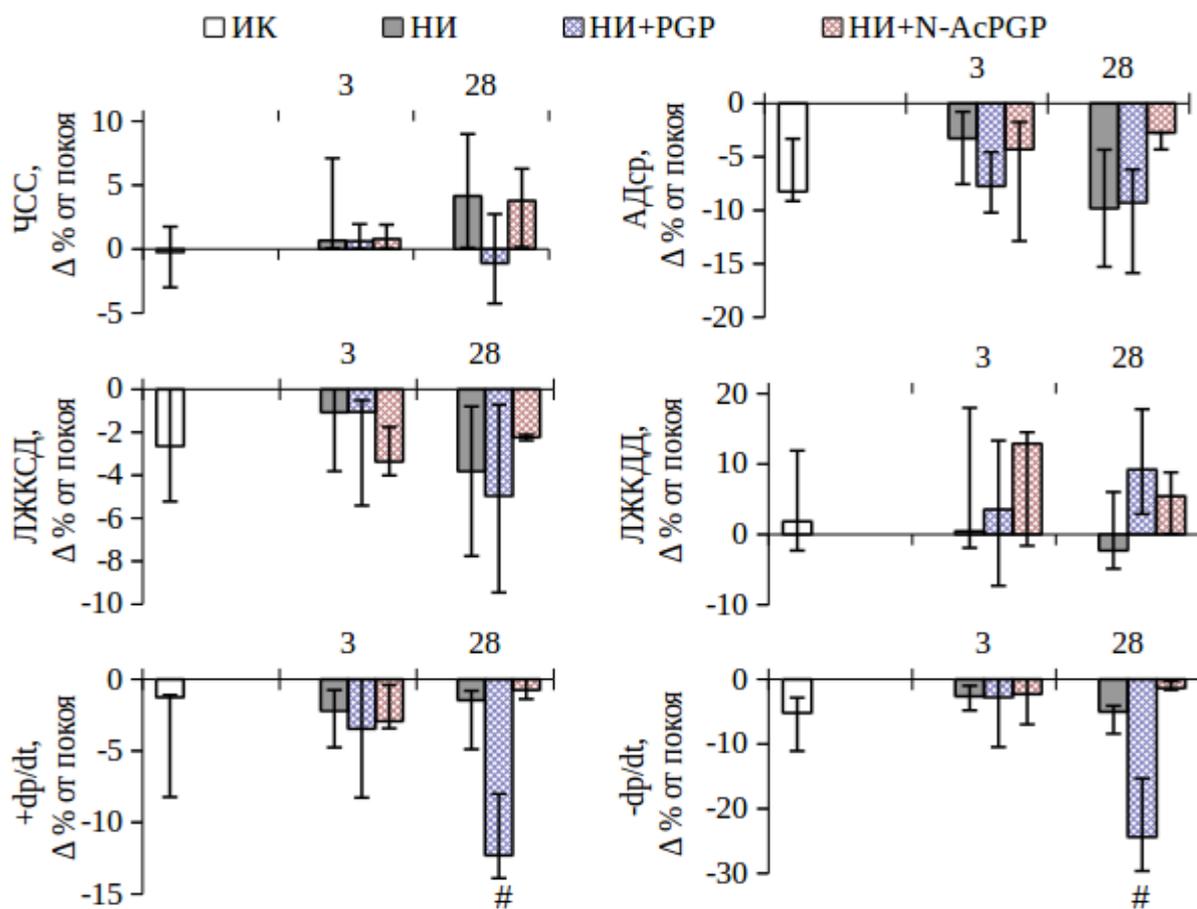


Рисунок 30. Влияние PGR и N-AcPGR на реакции гемодинамических показателей на инфузию ацетилхолина в подгруппе НИ крыс после моделирования необратимой ишемии. По оси абсцисс — сутки после операции.

n(ИК)=12;

3 сутки n(НИ)=11, n(НИ+PGR)=13, n(НИ+N-AcPGR)=9;

28 сутки n(НИ)=6, n(НИ+PGR)=5, n(НИ+N-AcPGR)=5;

- $p < 0,05$ по сравнению с группой НИ (критерий Манна-Уитни).

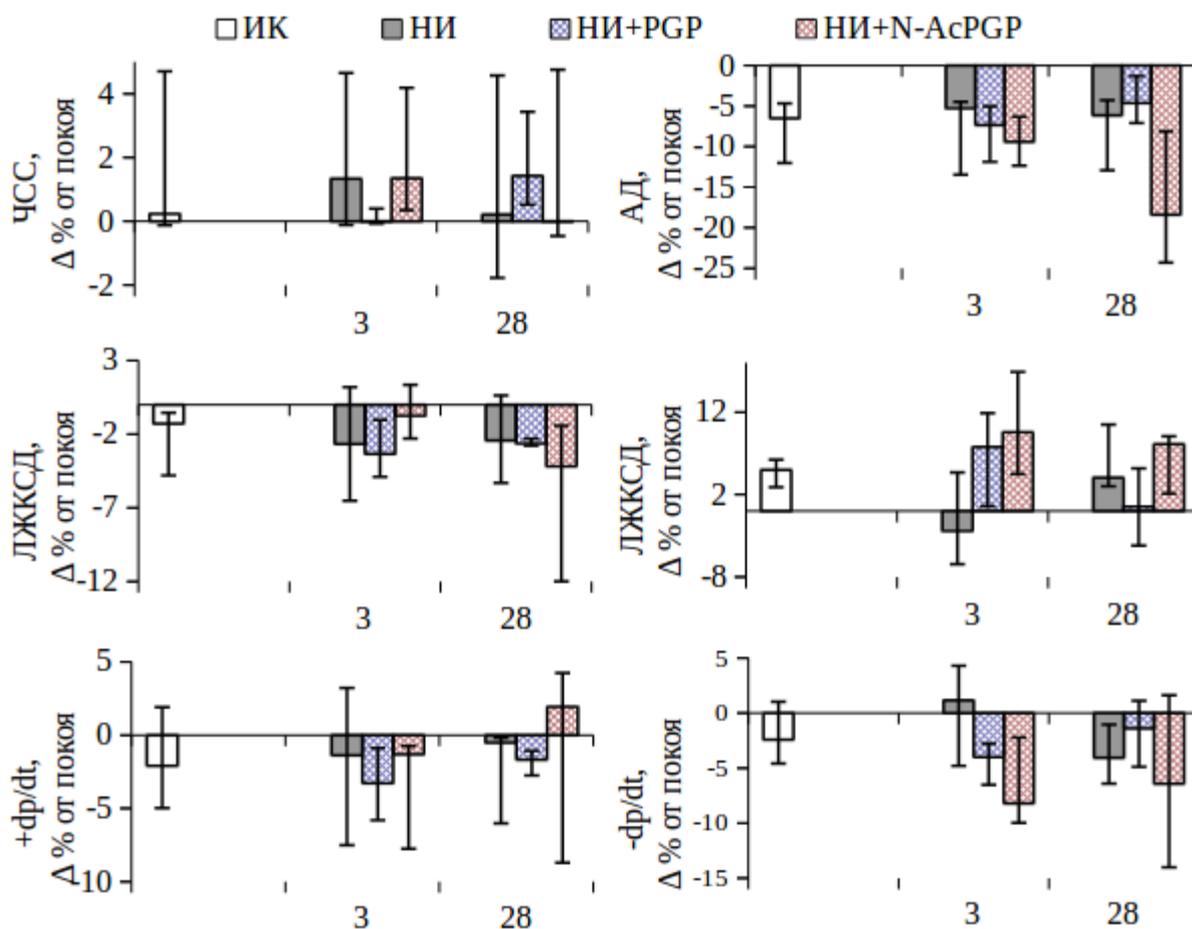


Рисунок 31. Влияние PGR и N-АсPGR на реакции гемодинамических показателей на инфузию ацетилхолина в подгруппе ВВ крыс после моделирования необратимой ишемии. По оси абсцисс — сутки после операции.

$n(\text{ИК})=8$;

3 сутки $n(\text{НИ})=8$, $n(\text{НИ+PGR})=12$, $n(\text{НИ+N-АсPGR})=7$;

28 сутки $n(\text{НИ})=5$, $n(\text{НИ+PGR})=5$, $n(\text{НИ+N-АсPGR})=4$;

Прямая стимуляция сердца добутамином приводила к увеличению ЧСС и индексов сократимости и расслабления миокарда, а также росту АД и ЛЖКСД. Пептиды не повлияли на реакцию гемодинамических показателей на стимуляцию β_1 -адренорецепторов после ИМ в группе животных с исходно низкой ВРС (рисунок 32).

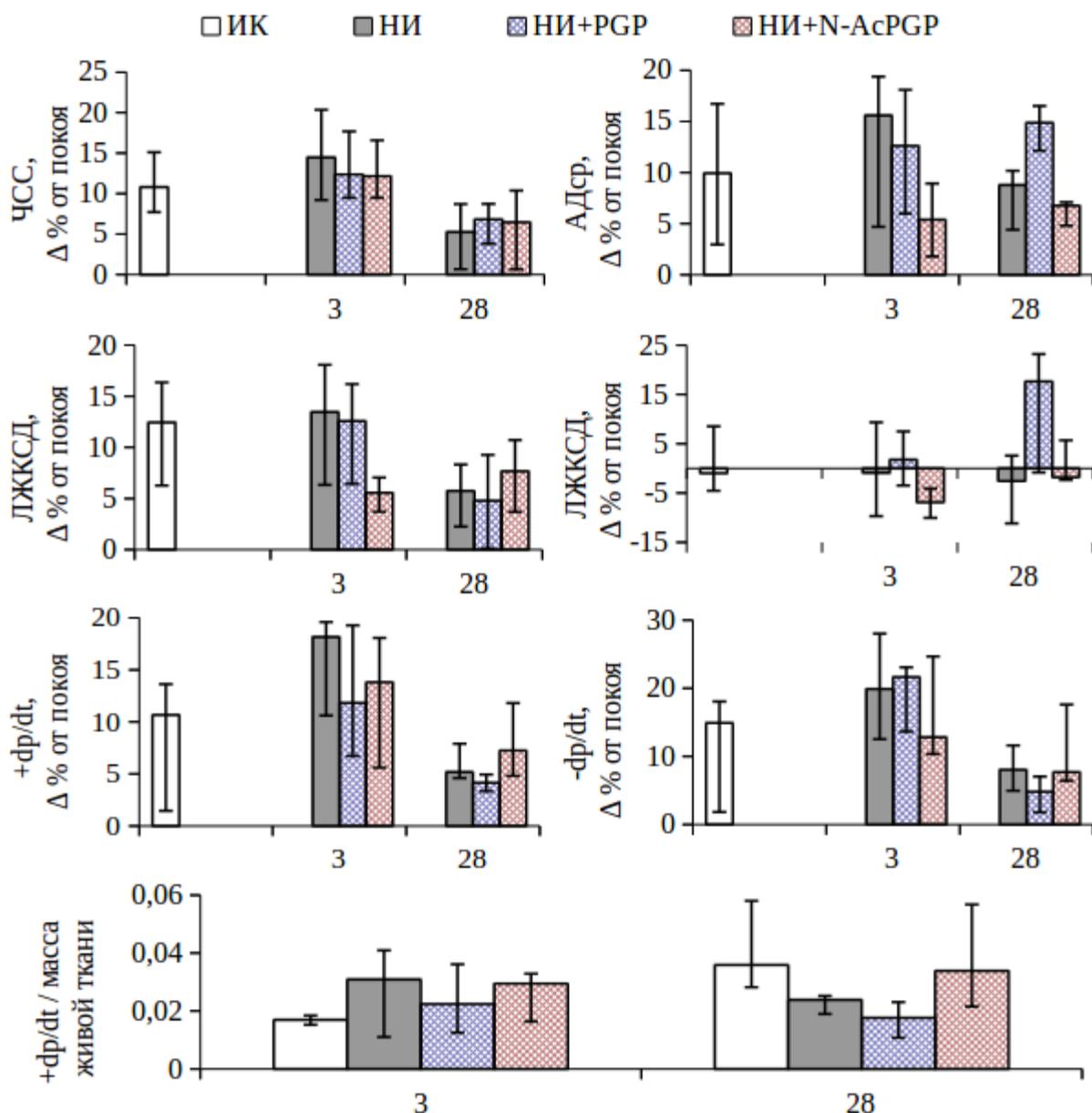


Рисунок 32. Влияние PGR и N-AcPGR на реакции гемодинамических показателей на инфузию добутамина в подгруппе НИ крыс после моделирования необратимой ишемии. По оси абсцисс — сутки после операции.

n(ИК)=12;

3 сутки n(НИ)=11, n(НИ+PGR)=13, n(НИ+N-AcPGR)=9;

28 сутки n(НИ)=6, n(НИ+PGR)=5, n(НИ+N-AcPGR)=5.

У ВВ животных на фоне прямой стимуляции сократительной активности миокарда добутамином N-AcPGR через 3 суток увеличил в 2 раза реакцию АДср и ЛЖКСД (рисунок 33).

Для оценки работоспособности живой ткани миокарда рассчитывали величину отношения +dp/dt в ответ на добутамин и площади или массы живой ткани на 3 и 28 сутки соответственно. Во всех группах, в том числе в ИК, данный показатель был примерно

одинаковым, что свидетельствует о том, что во всех группах живой миокард сокращается с одинаковой силой (рисунок 32, 33).

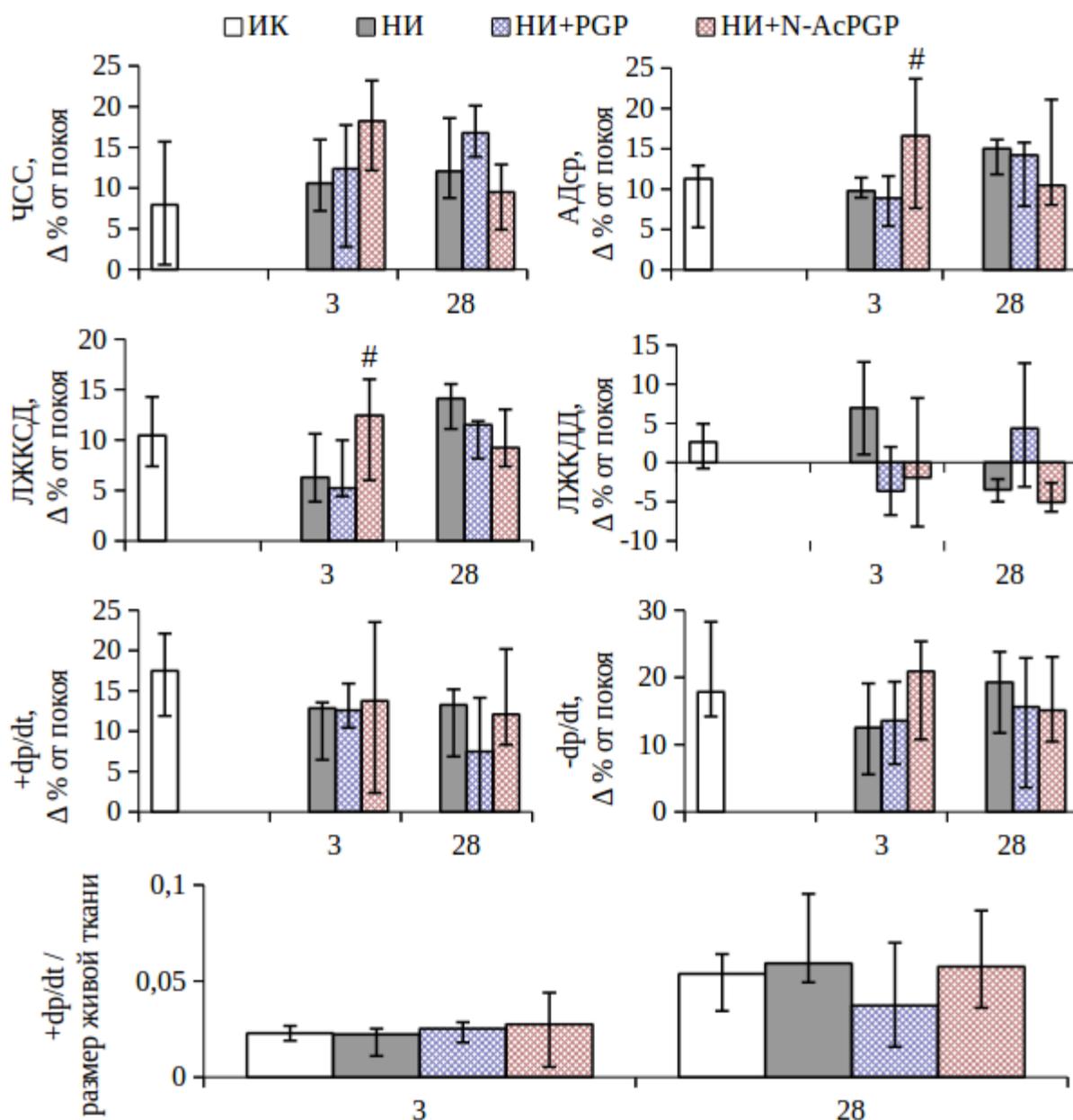


Рисунок 33. Влияние PGP и N-AcPGP на реакции гемодинамических показателей на инфузию добутамина в подгруппе ВВ крыс после моделирования необратимой ишемии. По оси абсцисс — сутки после операции.

n(ИК)=8;

3 сутки n(НИ)=8, n(НИ+PGP)=12, n(НИ+N-AcPGP)=7;

28 сутки n(НИ)=5, n(НИ+PGP)=5, n(НИ+N-AcPGP)=4;

#p<0,05 по сравнению с группой НИ (критерий Манна-Уитни)

Увеличение АД агонистом α 1-адренорецепторов фенилэфрином как у НВ (рисунок 34), так и у ВВ (рисунок 35) крыс вызвало дозозависимое увеличение сократительной активности

сердца. Уже на второй дозе (6 мкг/кг*мин) ответ гемодинамических показателей достигал максимума и далее не увеличивался. Как у НВ, так и у ВВ животных PGP и N-АсPGP в равной степени влияли на изменение гемодинамических показателей в ответ на увеличение постнагрузки фенлэфрином в дозах от 6 до 15 мкг/кг*мин.

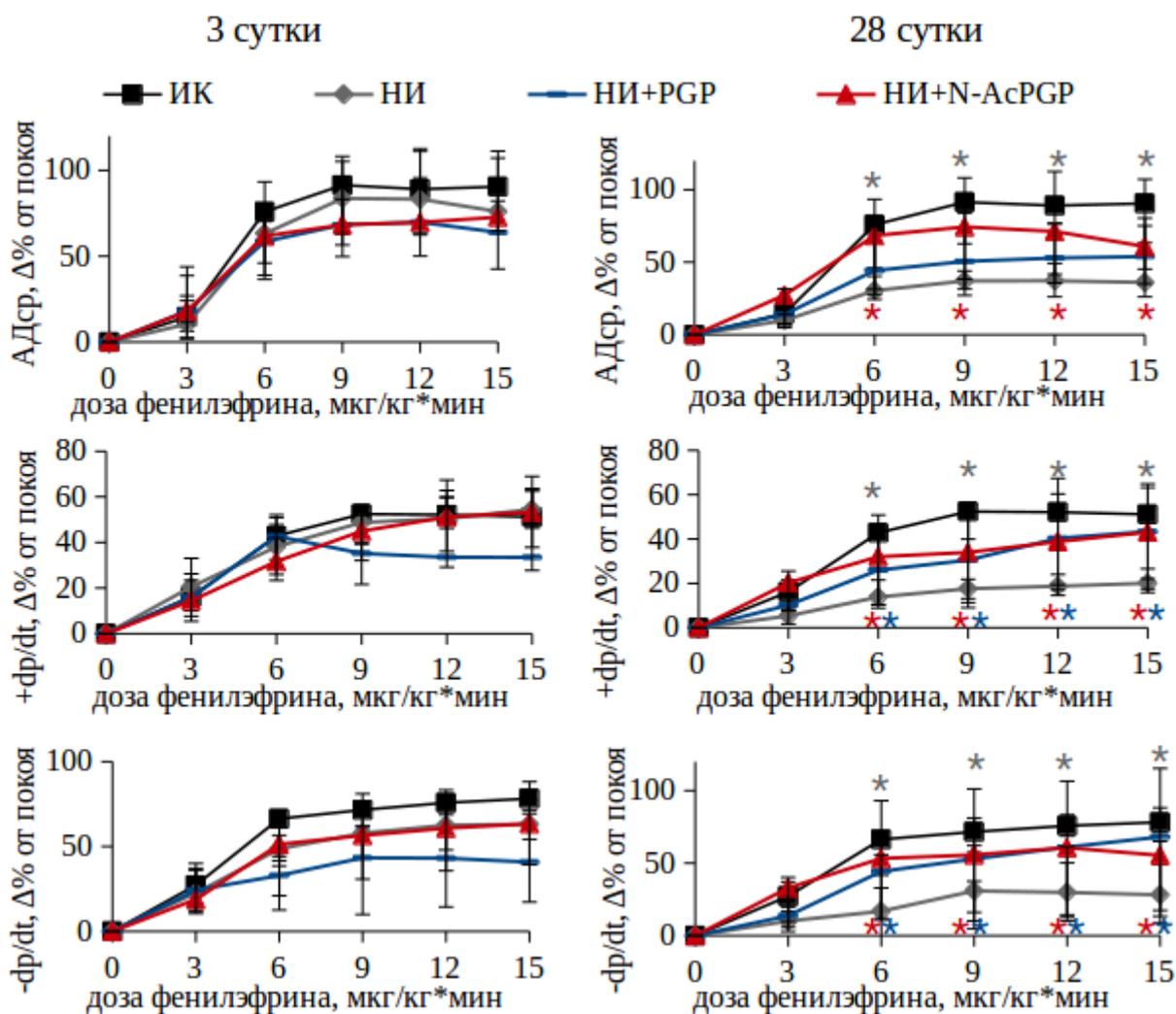


Рисунок 34. Изменение величин АД_{сп} и индексов сокращения и расслабления миокарда в ответ на инфузию возрастающих доз фенлэфрина у низковариабельных животных через 3 и 28 суток после ишемии.

* - $p < 0,05$

серые * - сравнение группы НИ с группой ИК,

синие * - сравнение группы НИ+PGP с группой НИ,

красные * - сравнение группы НИ+N-АсPGP с группой НИ.

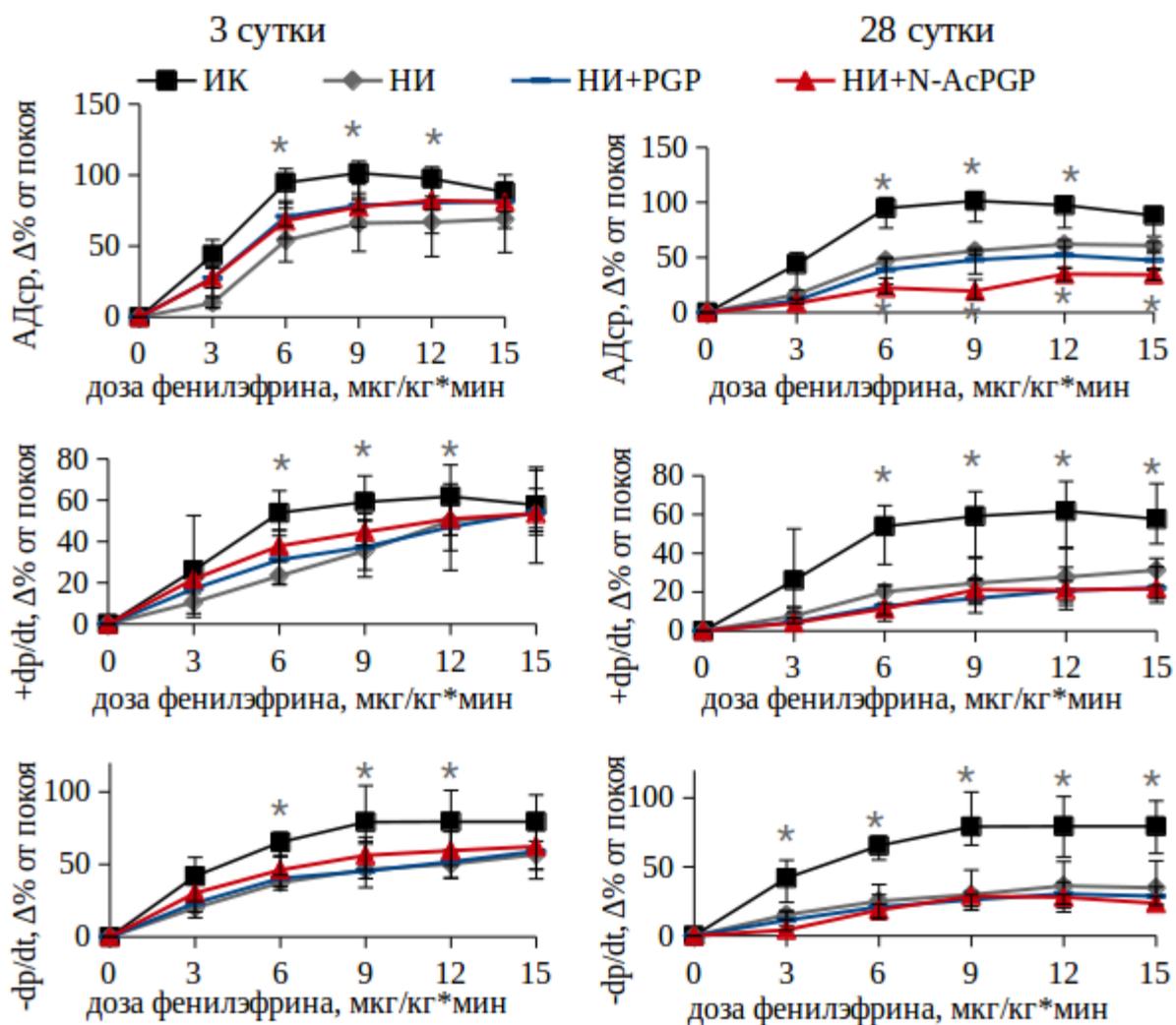


Рисунок 35. Изменение величин АДср и индексов сокращения и расслабления миокарда в ответ на инфузию возрастающих доз фенилэфрина у высоковариабельных животных через 3 и 28 суток после ишемии. * - $p < 0,05$ (серые * - сравнение с группой НИ).

При инфузии фенилэфрина в дозе 9 $\mu\text{g}/\text{kg}\cdot\text{min}$ через 28 суток в подгруппе *НВ животных* в группе НИ увеличение АДср было меньшим в 2,4 раза по сравнению с ИК. В связи уменьшением постнагрузки реакции ЛЖКСД и индексов сократимости и расслабления миокарда были меньшими в 1,5, 3 и 2,2 раза по сравнению с ИК. В группе НИ+N-AcPGR на эти же сутки инфузия фенилэфрина приводила к большему в 1,4 раза увеличению АДср по сравнению с группой НИ, что вызывало увеличение скоростей сокращения и расслабления миокарда в 2 и 1,7 раз соответственно (рисунок 36).

Через 28 суток PGR не изменил реакцию АДср на инфузию фенилэфрина по сравнению с группой НИ. Тем не менее, при сниженных относительно интактных животных значениях реакции АДср, PGR увеличил ответы индексов сократимости и расслабления миокарда на 73 и 72 % соответственно (рисунок 36), что может свидетельствовать о чрезмерной реакции этих

параметров в ответ на увеличение постнагрузки.

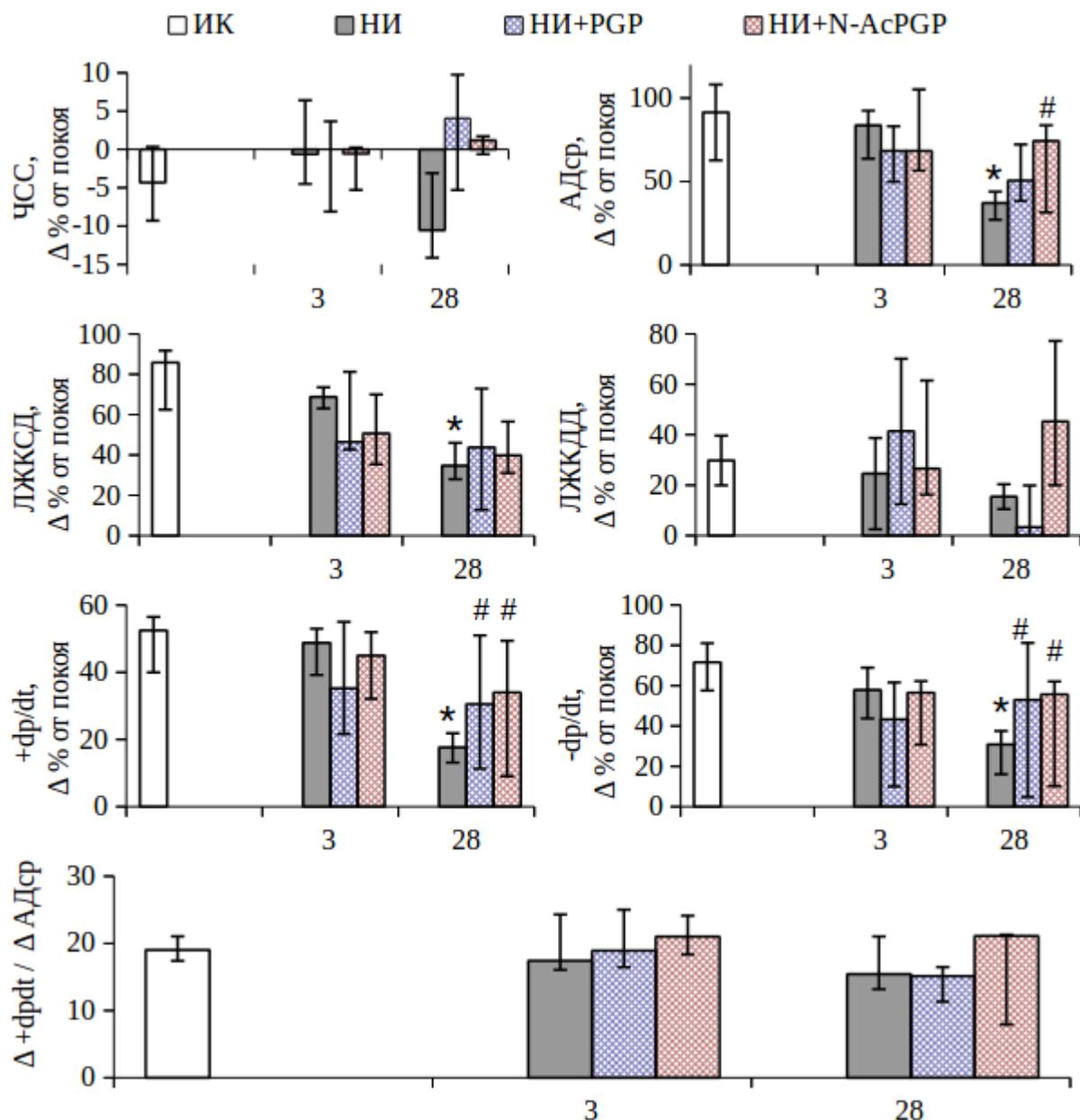


Рисунок 36. Влияние PGP и N-АсPGP на реакции гемодинамических показателей на инфузию фенилэфрина в подгруппе НИ крыс после моделирования необратимой ишемии. По оси абсцисс — сутки после операции. n(ИК)=12;

3 сутки n(НИ)=11, n(НИ+PGP)=13, n(НИ+N-АсPGP)=9;

28 сутки n(НИ)=6, n(НИ+PGP)=5, n(НИ+N-АсPGP)=5;

* - $p < 0,05$ по сравнению с группой ИК (критерий Манна-Уитни); # - $p < 0,05$ по сравнению с группой НИ (критерий Манна-Уитни)

Через 3 и 28 суток после ишемии у *ВВ животных* в группе НИ инфузия фенилэфрина приводила к меньшему на 35 и 45 % увеличению АДср по сравнению с ИК. Реакция индексов сократимости и расслабления миокарда в ответ на увеличение постнагрузки также была

снижена по сравнению с ИК на 40 и 38 % через 3 суток и на 58 и 62 % через 28 суток. Реакция ЛЖКСД уменьшалась на 48 % только через 28 суток. В группе НИ+N-АсPGR через 28 сутки изменение АДср в ответ на инфузию фенилэфрина оказалось в 3 раза меньшим, чем в группе НИ, что привело к уменьшению ЛЖКСД, но не к изменению сократительной активности сердца (рисунок 37).

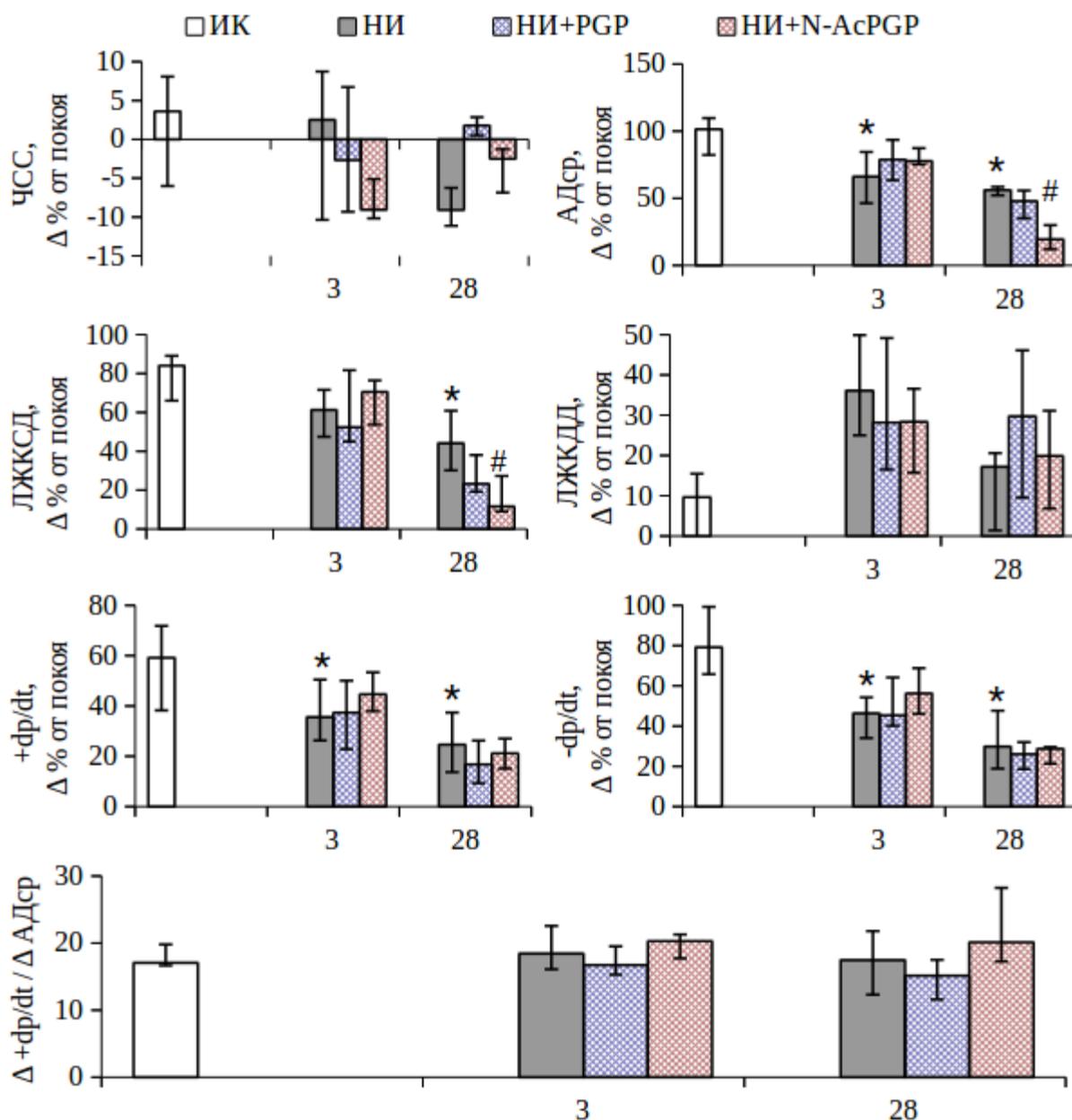


Рисунок 37. Влияние PGR и N-АсPGR на реакции гемодинамических показателей на инфузию фенилэфрина в подгруппе ВВ крыс после моделирования необратимой ишемии. По оси абсцисс — сутки после операции. n(ИК)=8; 3 сутки n(НИ)=8, n(НИ+PGR)=12, n(НИ+N-АсPGR)=7; 28 сутки n(НИ)=5, n(НИ+PGR)=5, n(НИ+N-АсPGR)=4; * - p < 0,05 по сравнению с группой ИК (критерий Манна-Уитни); # - p < 0,05 по сравнению с группой НИ (критерий Манна-Уитни)

Для оценки изменения сократительной активности миокарда в ответ на увеличение постнагрузки вычисляли отношение изменения $+dp/dt$ к изменению АДср. Во всех экспериментальных группах этот показатель не отличался (рисунок 36, 37), что свидетельствует о том, что снижение сократительной активности сердца связано со снижением α 1-опосредованного увеличения постнагрузки, вероятно вследствие уменьшения количества или десенситизации α 1-адренорецепторов. Увеличение индексов сокращения и расслабления миокарда у НВ животных в группах PGP и N-AsPGP также свидетельствует о наличии сократительных резервов в сердце.

Таким образом, у крыс с исходно низкой вариабельностью сердца N-AsPGP уменьшил сократительную способность сердца через 28 суток после ишемии, в то время как у высоковариабельных животных на этот же срок он увеличил гемодинамические показатели. Уменьшение постнагрузки и работоспособности сердца ацетилхолином и прямая стимуляция его работы добутамином не выявили влияния пептидов на реакции гемодинамических показателей. При этом у НВ животных оба пептида увеличили сниженную в хронический период сократительную активность сердца в ответ на инфузию фенилэфрина, по всей видимости за счёт влияния на α 1-опосредованное увеличение АДср.

3.6.3. Влияние PGP и N-AsPGP на массу и выживаемость животных, а также размеры поражения сердца после инфаркта миокарда

Массу животных оценивали через 1, 2, 3 и 28 сутки. Инфаркт миокарда вызывал снижение массы крыс в острые сроки, однако к 28 суткам различия между группами нивелировались. Пептиды не влияли на падение массы крыс после операции (рисунок 38, а и б). У ВВ крыс PGP и N-AsPGP не повлияли на выживаемость крыс (рисунок 38, г), однако у НВ крыс в группе N-AsPGP имелась тенденция ($p=0,072$) к увеличению смертности к 28 суткам с 29,7 до 53,5 %.

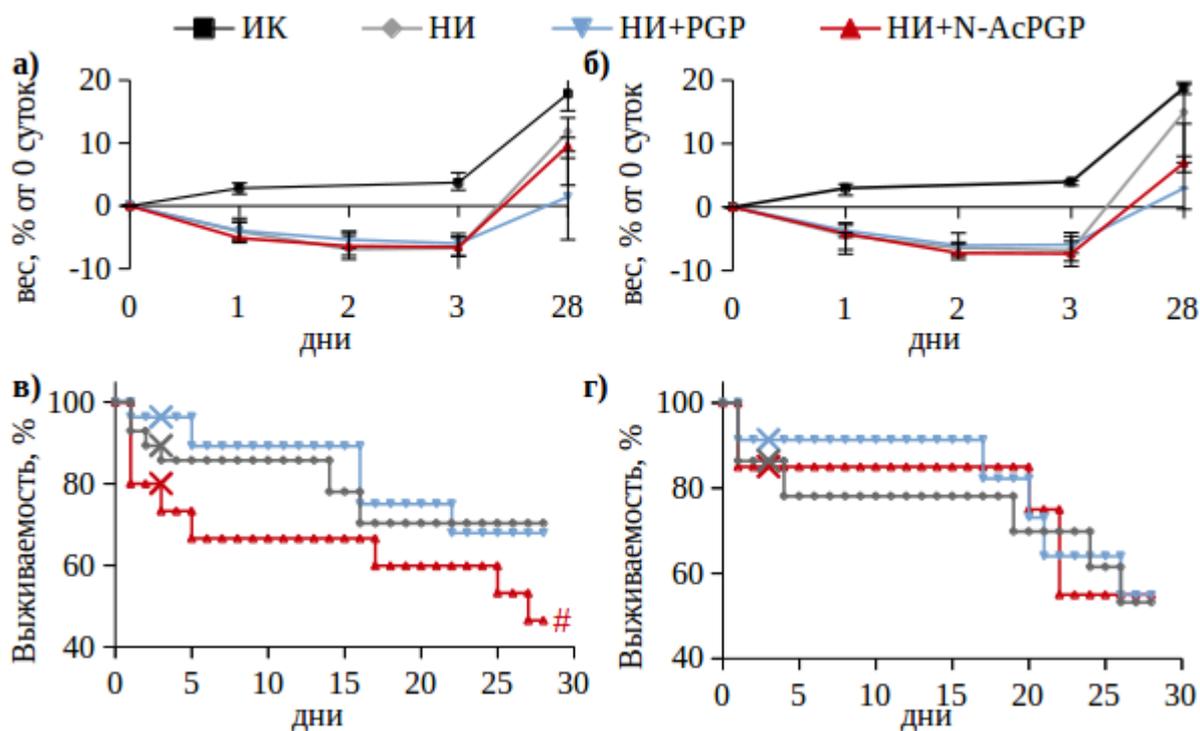


Рисунок 38. Динамика массы и выживаемость у НВ (а, в) и ВВ (б, г) крыс после инфаркта миокарда.

$p < 0,1$ (лог-ранк тест).

Площадь поражения миокарда оценивали через 3 суток после операции, а массу рубца через 28 суток после операции. И у НВ и у ВВ животных в группе НИ площадь поражения левого желудочка через 3 суток в среднем составила 25%. Относительная масса рубца у НВ крыс составила 23 %, у ВВ — 31 %. Только в группе НВ животных N-АсPGP увеличивал размер поражения на 18 % и массу сформировавшегося рубца, относительно массы живой ткани левого желудочка, на 17 %. PGP не повлиял на размер некроза и массу рубца (рисунок 39).

В работе также оценивали структуру сформировавшегося к 28 суткам рубца. У крыс с исходно низкой вариабельностью в группе NI+N-AcPGP в 85% случаев наблюдали истончение стенки левого желудочка, что значимо ($p = 0,011$, критерий Хи-квадрат) отличалось от контрольной группы НИ (тонкая стенка наблюдалась в 22% случаев). Различий между низковариабельными и высоковариабельными крысами, а также влияния PGP на этот параметр выявлено не было.

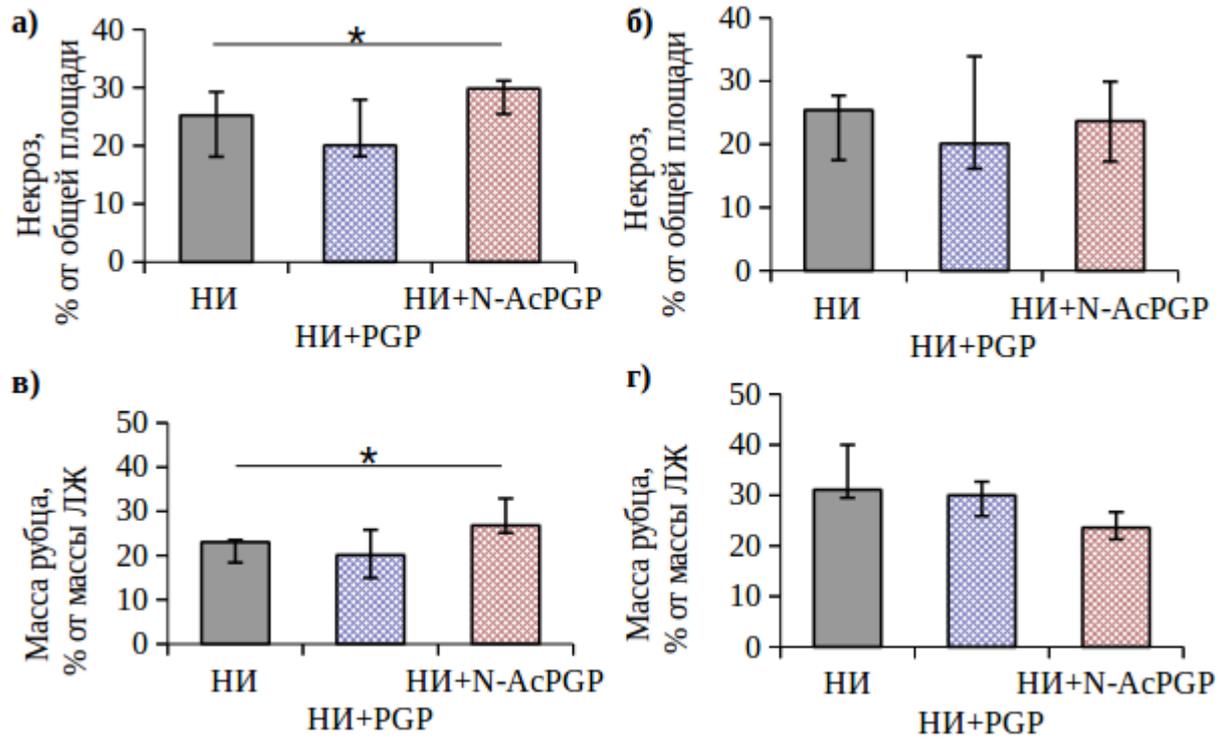


Рисунок 39. Размер некроза и относительная масса рубца у НВ (а, в) и ВВ (б, г) крыс.

* - $p < 0,05$ (критерий Манна-Уитни)

Нормирование массы сердца и его отделов на массу животного показало, что у НВ животных имеется тенденция ($p=0,091$) к увеличению массы сердца на 15 % через 28 суток после ишемии. При этом масса живой ткани левого желудочка, нормированная на массу крысы, не отличалась от таковой у интактных животных, что может свидетельствовать о гипертрофии миокарда (таблица 5).

Относительная масса сердца у высоковариабельных крыс группы НИ не отличалась от массы в интактном контроле, при этом наблюдали значимое уменьшение массы живой ткани левого желудочка в 2 раза (таблица 5).

Таблица 5. Относительная масса сердца и его отделов у низко- и высоковариабельных животных в группе интактного контроля (ИК) и экспериментальных группах НИ, НИ+PGR, НИ+N-АсPGR. МП — межжелудочковая перегородка, ЛЖ — левый желудочек (только живая ткань), ПЖ — правый желудочек. * - $p < 0,05$ по сравнению с группой ИК, # - $p < 0,1$ по сравнению с группой ИК

	НВ				ВВ			
	ИК	НИ	НИ+PGR	НИ+N- АсPGR	ИК	НИ	НИ+PGR	НИ+N- АсPGR
масса сердца (мг)/масса крысы (г)	2,1 (2,1; 2,3)	2,4 (2,3; 2,5) #	2,4 (2,2; 2,6)	2,5 (2,3; 2,7)	2,2 (2,1;2,2)	2,3 (2,2;2,4)	2,2 (2,2;2,3)	2,2 (1,8;2,5)
МП (мг)/масса крысы(г)	0,8 (0,7;0,8)	0,7 (0,5; 0,8)	0,7 (0,7;0,8)	0,7 (0,7;0,8)	0,7 (0,7;0,8)	0,7 (0,6;0,7)	0,8 (0,7;0,8)	0,6 (0,5;0,8)
ЛЖ (мг)/масса крысы(г)	0,9 (0,9;1,0)	0,8 (0,6;0,9)	0,7 (0,6;0,7)	0,6 (0,6;0,7)	1,0 (0,9;1,0)	0,5 (0,3;0,6) *	0,4 (0,4;0,5)	0,5 (0,5;0,7)
ПЖ (мг)/масса крысы(г)	0,4 (0,4;0,6)	0,5 (0,4;0,5)	0,6 (0,5;0,7)	0,6 (0,6;0,7)	0,5 (0,5;0,6)	0,5 (0,5;0,6)	0,6 (0,5;0,7)	0,5 (0,4;0,6)

Таким образом, у крыс с исходно низкой вариабельностью N-АсPGR увеличивал размер некроза через 3 суток после ишемии и массу рубца через 28 суток, не оказывая влияния на наблюдаемую у НВ крыс гипертрофию миокарда.

3.7. Влияние пептидов на морфофункциональный статус тучных клеток сердца после инфаркта миокарда

Ранее мы показали, что пептиды практически не влияли на общую морфологию миокарда, но в тоже время у НВ животных N-AsPGP оказал выраженное провоспалительное действие, увеличивая размеры некроза и рубца, что способствовало развитию сердечной недостаточности. Для выявления влияния пептидов на развитие воспалительного процесса мы оценили их эффекты на морфофункциональный статус тучных клеток, поскольку тучные клетки одними из первых реагируют на воспалительный стимул и регулируют процесс воспаления на всех сроках, начиная от инициации, заканчивая репаративными процессами.

3.7.1. Динамика изменения морфофункционального статуса тучных клеток при необратимой ишемии

В литературе практически отсутствуют данные о морфологическом статусе тучных клеток на ранних сроках развития ишемического повреждения. В связи с этим в этой части работы мы оценили количество тучных клеток и степень их дегрануляции на гистологических препаратах, окрашенных толуидиновым синим через небольшие промежутки времени после операции: 2, 3, 3,5, 4, 6, 7, 8, 12, 24 и 72 часа. Полученные результаты представлены на рисунке 40.

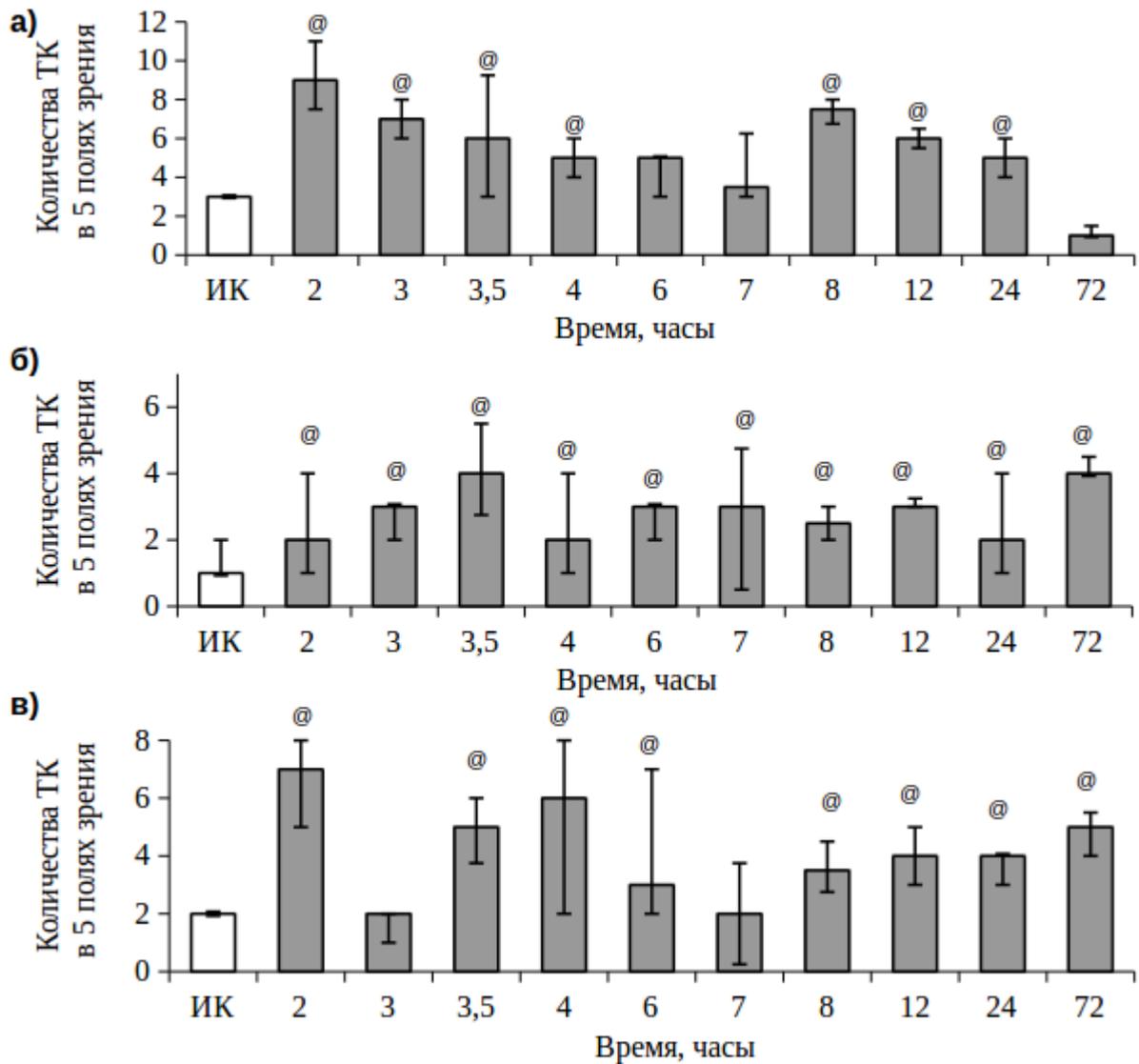


Рисунок 40. Количество тучных клеток в 5 полях зрения в а) передней стенке, б) межжелудочковой перегородке и в) задней стенке сердца. ИК — интактный контроль. N для каждого срока = 5; @ $p < 0,05$ по сравнению с ИК;

Через 2 часа после окклюзии коронарной артерии количество тучных клеток во всех зонах сердца увеличивалось и оставалось таковым на протяжении 6 часов. Через 6-7 часов и 7 часов в передней стенке и задней стенке левого желудочка количество тучных клеток уменьшалось. Через 3-е суток в передней стенке количество тучных клеток не отличалось от интактного контроля. Стоит отметить, что тучные клетки располагались в основном в околососудистых регионах и в области эпикарда (рисунок 44). Вместе с тем, во всех зонах наблюдали значимое увеличение степени дегрануляции тучных клеток: появлялись очень сильно, сильно и слабо дегранулированные клетки, причём наиболее выражено реагирующими регионами оказывались передняя и задняя стенка левого желудочка. Интересно также то, что через 6-7 часов после операции в передней и задней стенке левого желудочка наблюдали пик

увеличения степени дегрануляции тучных клеток, в то время как в межжелудочковой перегородке в эти же сроки отсутствовали очень сильно дегранулированные клетки и далее увеличивалось количество недегранулированных клеток (рисунок 41). Можно предположить, что в эти сроки происходит наиболее заметная гибель клеток или их миграция, поэтому в дальнейшей работе мы исследовали влияние пептидов на морфологическое состояние миокарда и тучных клеток на раннем сроке - через 7 часов, а также через сутки, трое и 28 суток после операции.

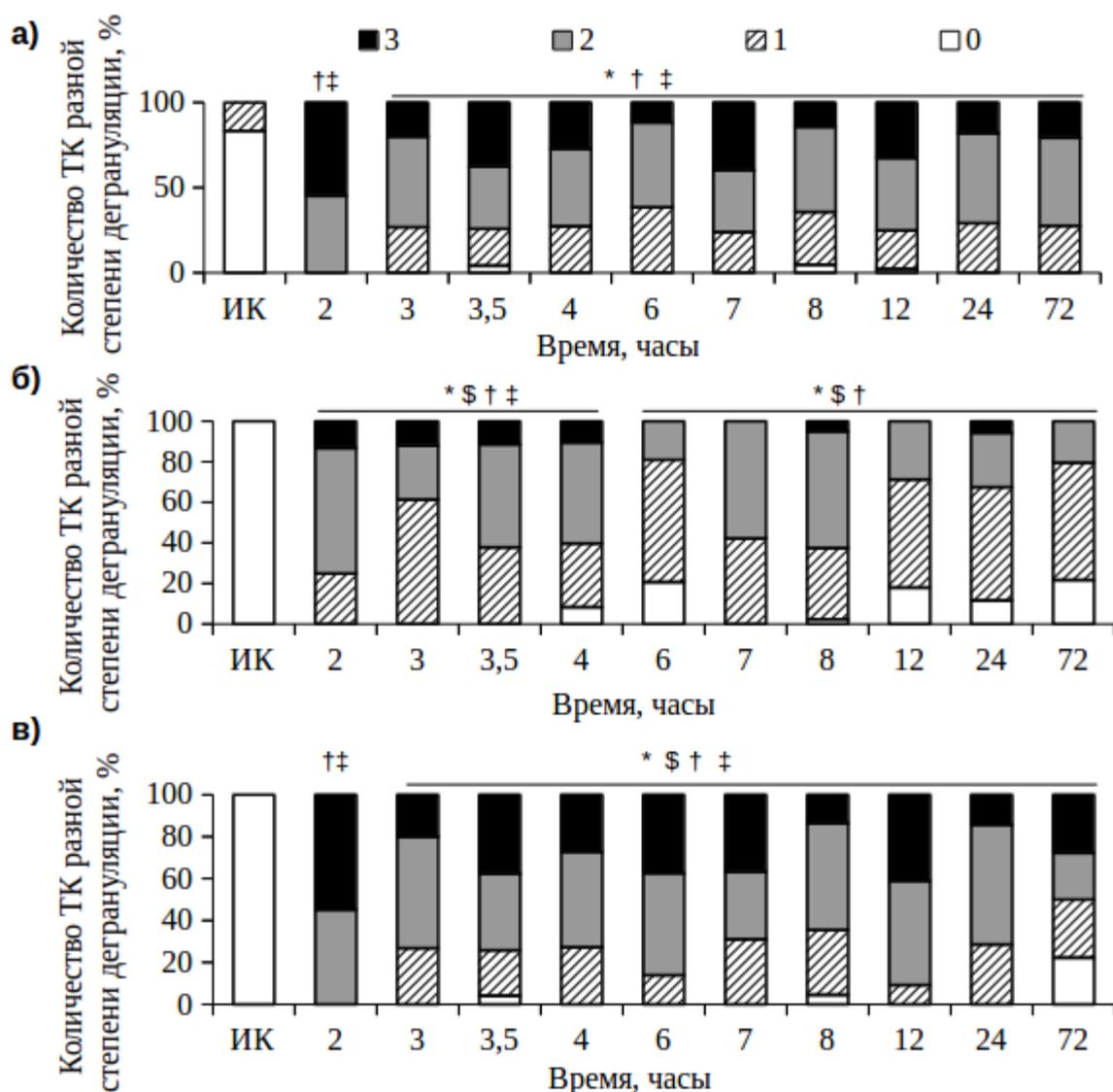


Рисунок 41. Распределение тучных клеток по степени дегрануляции в а) передней стенке, б) межжелудочковой перегородке и в) задней стенке сердца. ИК — интактный контроль. N для каждого срока = 5; * $p < 0,05$ для дегранулированных клеток (0) по сравнению с ИК; \$ $p < 0,05$ для слабо дегранулированных клеток (1) по сравнению с ИК; † $p < 0,052$ для сильно дегранулированных клеток (2) по сравнению с ИК; ‡ $p < 0,05$ для очень сильно дегранулированные клетки (3) по сравнению с ИК;

3.7.2. Влияние PGP и N-AsPGP на состояние популяции тучных клеток на различных сроках инфаркта миокарда

Поскольку тучные клетки способны реагировать на различные стимулы со стороны нервной системы, мы изучали эффекты PGP и N-AsPGP на морфофункциональный статус тучных клеток отдельно у животных с различной исходной активностью ВНС. У интактных крыс с исходно низкой и высокой вариабельностью ритма сердца не наблюдали различий в количестве и степени дегрануляции тучных клеток. При этом, несмотря на отсутствие различий в общей морфологии миокарда после инфаркта миокарда у НВ и ВВ животных, количество тучных клеток уже через 7 часов, а также через 1, 3 и 28 суток у ВВ животных в передней стенке было значимо больше в 1,75, 1,2, 1,8 и 5,4 раза соответственно, хотя распределение по степени дегрануляции не отличалось в двух группах. Это может свидетельствовать о том, что тучные клетки отражают активность различных регуляторных путей, в том числе и влияния вегетативной нервной системы. Стоит также отметить, что через 3 суток в зоне некроза в передней стенке практически не находили тучных клеток, в то время как через 28 суток в зоне сформированного рубца насчитывали до 20 клеток в одном поле зрения (увеличение $\times 400$), что позволяет подтвердить активную роль тучных клеток в процессах репарации.

У НВ животных в передней стенке (ишемизированном регионе) увеличивалось количество тучных клеток через 3-е и 28 суток после ишемии в 1,75 и 6,5 раз (рисунок 42, а). При этом увеличивалась также степень их дегрануляции: через 7 часов появлялись сильно и очень сильно дегранулированные клетки и уменьшалось количество недегранулированных клеток. Такое распределение в передней стенке сохранялось вплоть до 28 суток (рисунок 43, а). PGP и N-AsPGP через 7 часов, 1 сутки и 28 суток снижали количество очень сильно дегранулированных клеток тучных клеток за счёт увеличения процента слабо дегранулированных клеток. Через 3 суток оба пептида снизили количество очень сильно и сильно дегранулированных тучных клеток и увеличили количество недеграулированных и слабодегранулированных клеток (рисунок 43, а).

В межжелудочковой перегородке количество тучных клеток увеличивалось через 7 часов в 3 раза и оставалось таковым вплоть до 28 суток (рисунок 42, б), через 7 часов появлялись сильно дегранулированные клетки, через 1 сутки — очень сильно дегранулированные клетки. К 28 суткам степень дегрануляции в целом уменьшалась. PGP и N-AsPGP через 7 часов уменьшили количество сильно дегранулированных тучных клеток и увеличили количество недегранулированных клеток. Через сутки оба пептида снизили процент очень сильно дегранулированных клеток, а через 3-е — процент сильно дегранулированных тучных клеток

(рисунок 43, б).

В задней стенке количество тучных клеток увеличивалось через сутки в 1,5 раза и 3-е суток в 1,7 раз, но уменьшалось до значений интактного контроля через 28 суток (рисунок 42, в). Уже через 7 часов появлялись слабо, сильно и очень сильно дегранулированные клетки. Такое распределение сохранялось до третьих суток, а через 28 суток наблюдали только недегранулированные и слабо дегранулированные клетки. PGP и N-AsPGP через 7 часов, 1 и 3 суток снижали количество очень сильно дегранулированных клеток и увеличивали процент недегранулированных тучных клеток (рисунок 43, в).

В группе НИ+N-AsPGP через 3 суток уменьшалось в 2,5 и 3 раза количество тучных клеток в межжелудочковой перегородке и передней стенке с одновременным увеличением в 1,8 раз в задней стенке. Через 28 суток PGP и N-AsPGP увеличивали количество тучных клеток в перегородке в 4 и 3,3 раза и задней стенке в 3 раза (рисунок 42, б, в). При этом через 28 суток в межжелудочковой перегородке и в задней стенке в группе НИ+PGP и НИ+N-AsPGP появлялись сильно дегранулированные клетки, которые отсутствовали в группе НИ (рисунок 43, б, в). Это может быть связано с общим увеличением числа тучных клеток в этих экспериментальных группах.

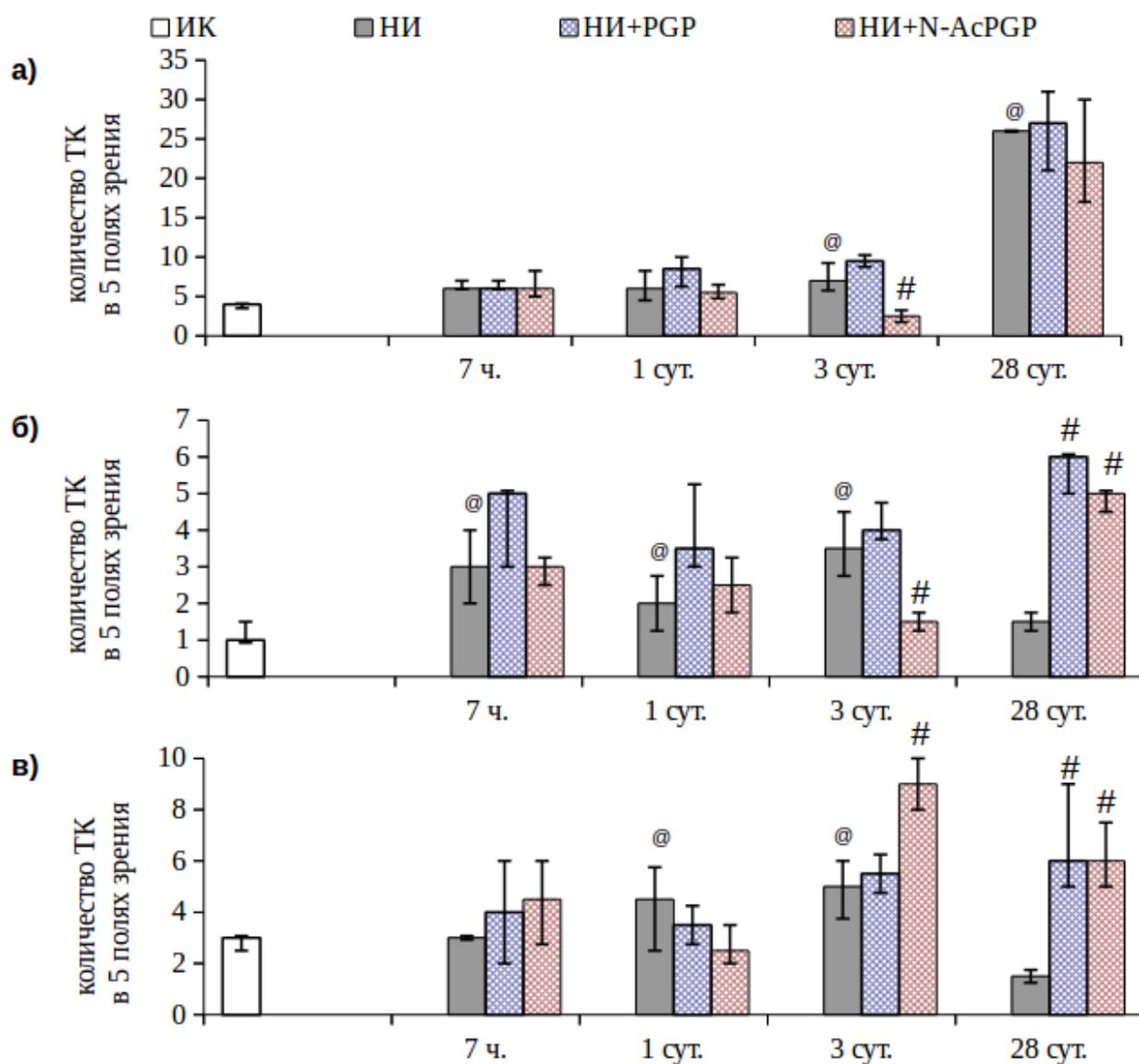


Рисунок 42. Количество тучных клеток в 5 полях зрения у НВ животных в: а) передней стенке, б) межжелудочковой перегородке и в) задней стенке сердца. ИК — интактный контроль.

$n(\text{ИК})=3$;

7 часов: $n(\text{НИ})=4$, $n(\text{НИ+PGP})=5$, $n(\text{НИ+N-AcPGP})=4$;

1 сутки: $n(\text{НИ})=6$, $n(\text{НИ+PGP})=4$, $n(\text{НИ+N-AcPGP})=4$;

3 сутки: $n(\text{НИ})=4$, $n(\text{НИ+PGP})=4$, $n(\text{НИ+N-AcPGP})=4$;

28 сутки: $n(\text{НИ})=3$, $n(\text{НИ+PGP})=5$, $n(\text{НИ+N-AcPGP})=4$;

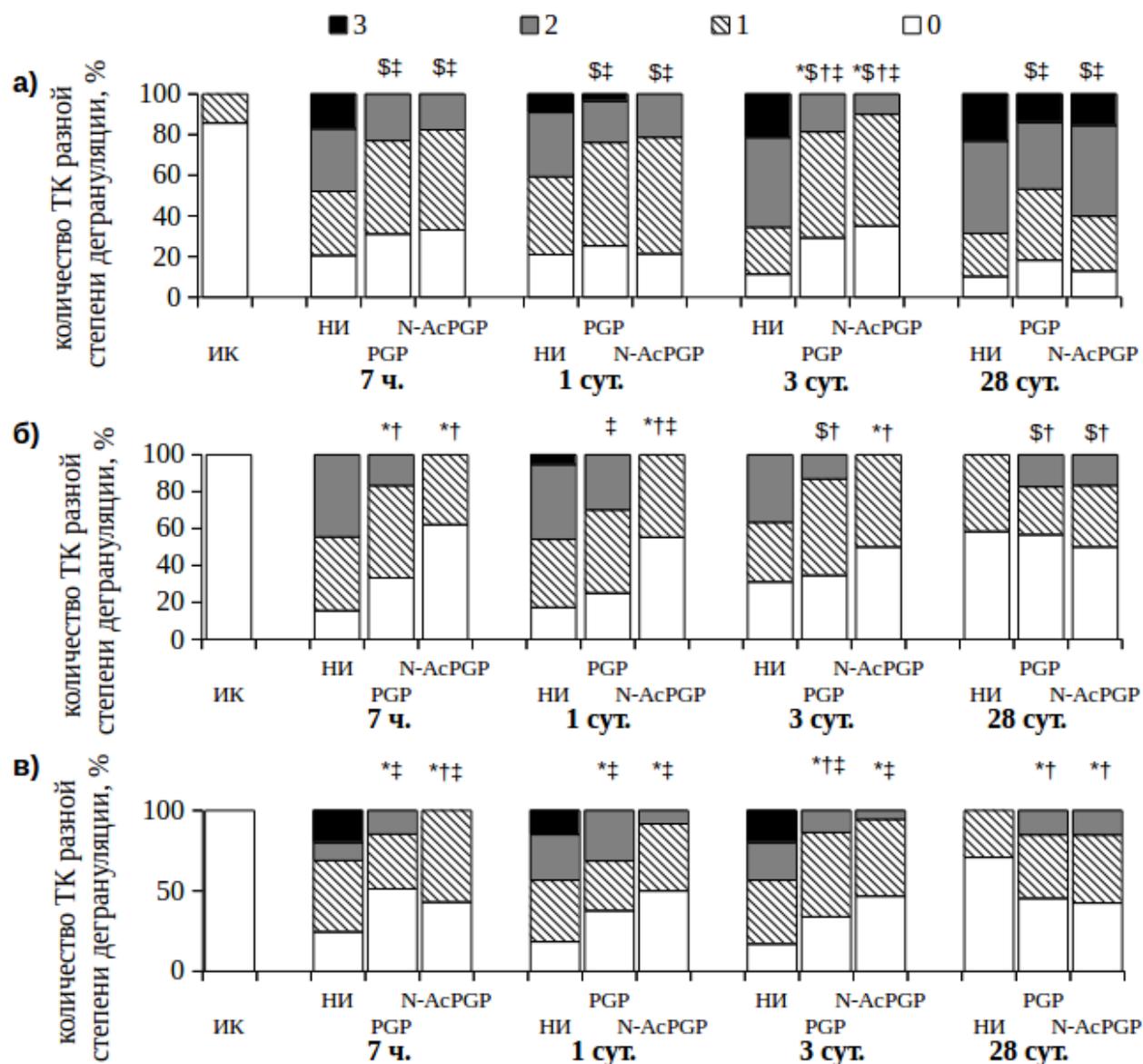


Рисунок 43. Распределение тучных клеток по степени дегрануляции у НВ животных в а) передней стенке, б) межжелудочковой перегородке и в) задней стенке сердца. ИК — интактный контроль.

$n(\text{ИК})=3$; 7 часов: $n(\text{НИ})=4$, $n(\text{НИ+PGP})=5$, $n(\text{НИ+N-AcPGP})=4$; 1 сутки: $n(\text{НИ})=6$, $n(\text{НИ+PGP})=4$, $n(\text{НИ+N-AcPGP})=4$; 3 сутки: $n(\text{НИ})=4$, $n(\text{НИ+PGP})=4$, $n(\text{НИ+N-AcPGP})=4$; 28 сутки: $n(\text{НИ})=3$, $n(\text{НИ+PGP})=5$, $n(\text{НИ+N-AcPGP})=4$;

@ $p<0,05$ по сравнению с ИК; # $p<0,05$ по сравнению с группой НИ; * $p<0,05$ для недегранулированных клеток (0) по сравнению с НИ; \$ $p<0,05$ для слабо дегранулированных клеток (1) по сравнению с НИ; † $p<0,052$ для сильно дегранулированных клеток (2) по сравнению с НИ; ‡ $p<0,05$ для очень сильно дегранулированных клеток (3) по сравнению с НИ;

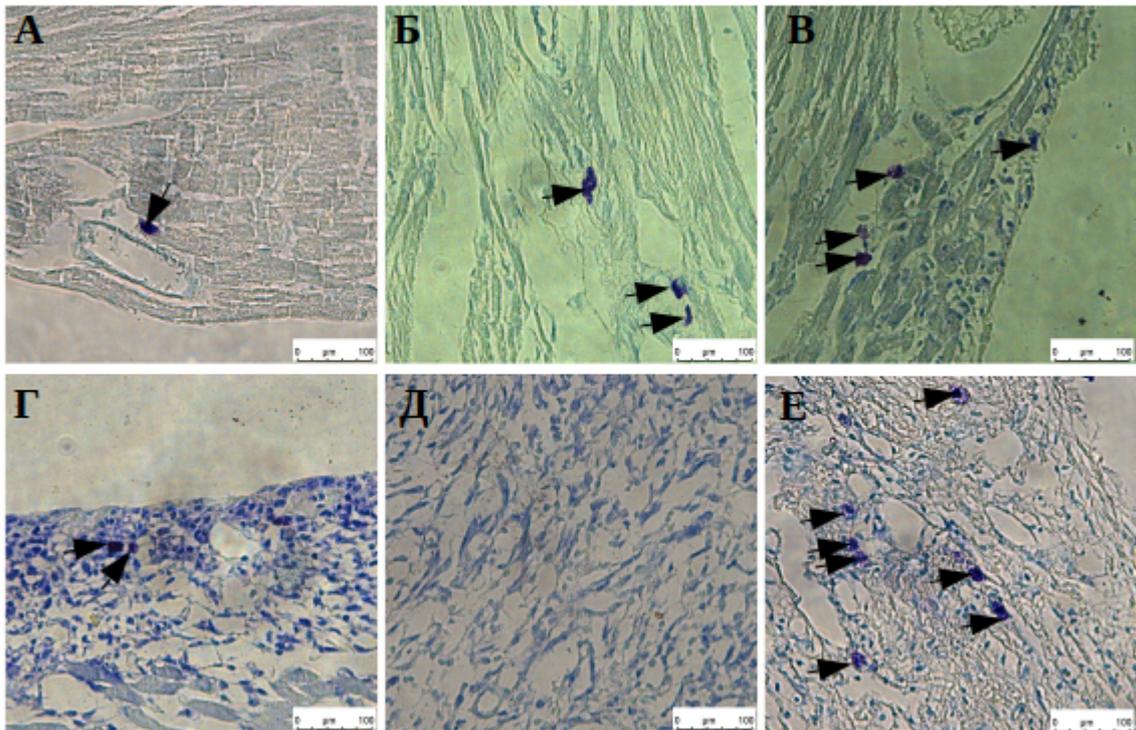


Рисунок 44. Репрезентативные микрофотографии тучных клеток сердца (стрелки) в интактном контроле (А), через 7 часов (Б), 1 суток (В), 3 суток (Г) и 28 суток (Е) после ишемии. Д — отсутствие тучных клеток в зоне некроза через 3 суток

У высоковариабельных животных количество тучных клеток в передней стенке (ишемизированном регионе) увеличивалось на всех сроках после операции в 3,5, 2,3, 3,7 и 10,8 раз (рисунок 45, а). Степень дегрануляции клеток резко увеличивалась: через 7 часов выделяли сильно и очень сильно дегранулированные клетки. Такое распределение сохранялось вплоть до 28 суток. PGP и N-АсPGP на всех сроках снизили количество очень сильно дегранулированных тучных клеток и увеличили процент недегранулированных клеток. Также через одни и 3-е суток наблюдали уменьшение количества сильно дегранулированных тучных клеток (рисунок 46, а).

В межжелудочковой перегородке количество тучных клеток увеличивалось через 7 часов, 1 и 3 суток в 3,5, 5,5 и 2,5 раз и возвращалось к нормальным значениям через 28 суток (рисунок 45, б). Степень дегрануляции клеток возрастала через 7 часов, выделяли слабо и сильно дегранулированные клетки, а через 1 сутки также очень сильно дегранулированные клетки, которых не наблюдали в группах НИ+PGP и НИ+N-АсPGP. Также оба пептида через 7 часов уменьшили количество сильно дегранулированных тучных клеток и увеличили количество недегранулированных клеток. Через 3 суток только N-АсPGP снизил количество сильно дегранулированных тучных клеток, а через 28 суток оба пептида увеличили процент слабо дегранулированных клеток (рисунок 46, б).

В задней стенке количество тучных клеток увеличивалось через 7 часов, 1 и 3 суток в 2,75, 2,5 и 2,5 раз, соответственно, и возвращалось к нормальным значениям через 28 суток (рисунок 45, в). При этом через 7 часов, 1 сутки и 3 суток наблюдали очень сильно дегранулированные тучные клетки, а клетки слабой и сильной степени дегрануляции — на всех сроках. PGP и N-AsPGP уменьшили процент очень сильно дегранулированных клеток через 7 часов, 1 сутки и 3 суток с увеличением числа недегранулированных клеток. Через 28 суток после ишемии PGP уменьшил количество недегранулированных клеток и увеличил процент слабо дегранулированных (рисунок 46, в).

PGP увеличил количество тучных клеток через 28 суток в передней стенке в 1,5 раза, в перегородке в 3 раза и в задней стенке в 2,4 раза, а N-AsPGP только в передней и задней стенке в 2 раза (рисунок 46).

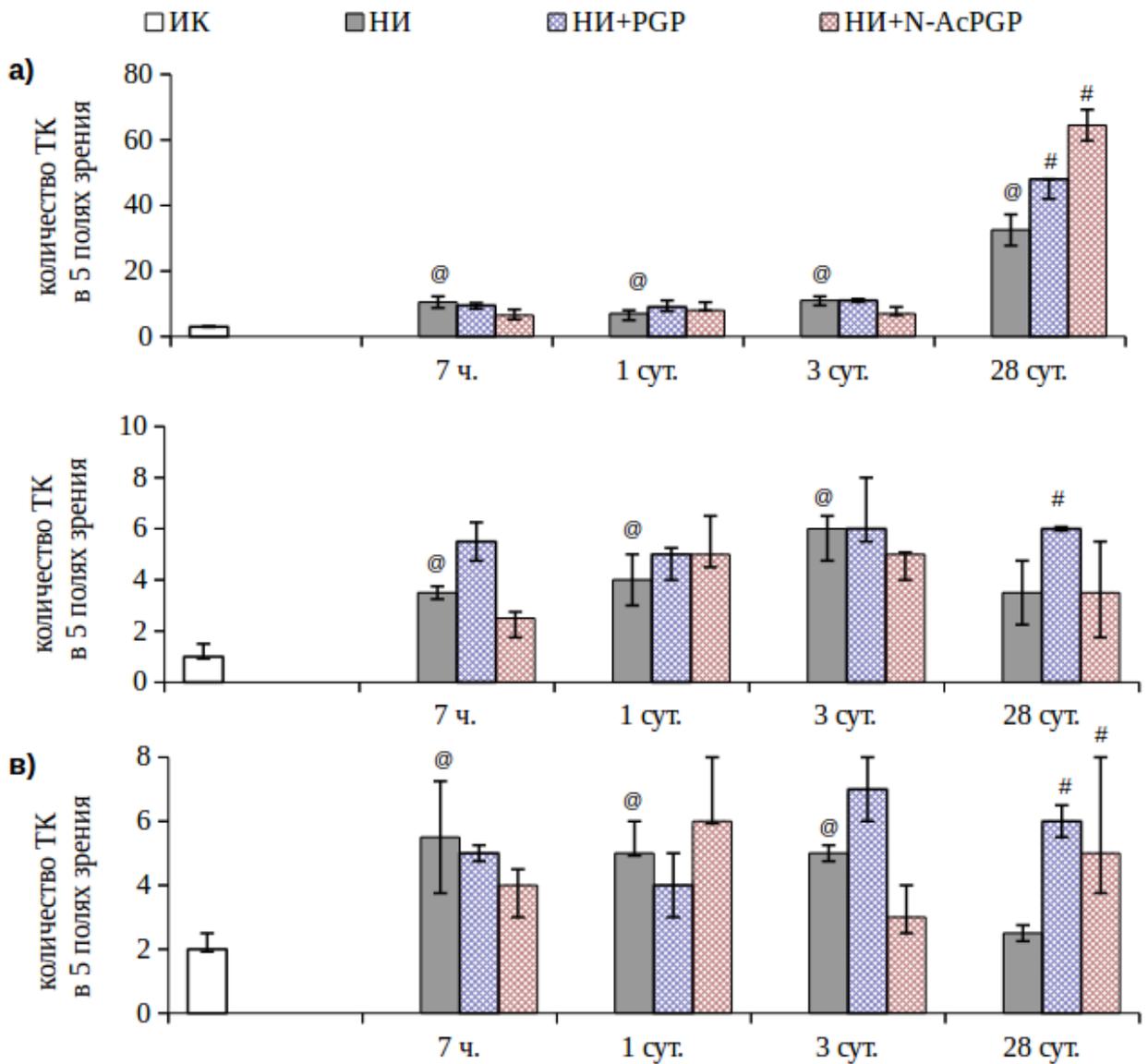


Рисунок 45. Количество тучных клеток в 5 полях зрения в а) передней стенке, б) межжелудочковой перегородке и в) задней стенке сердца. ИК — интактный контроль.

$n(\text{ИК})=4$;

7 часов: $n(\text{НИ})=4$, $n(\text{НИ+PGR})=4$, $n(\text{НИ+N-AcPGR})=4$;

1 сутки: $n(\text{НИ})=4$, $n(\text{НИ+PGR})=4$, $n(\text{НИ+N-AcPGR})=4$;

3 сутки: $n(\text{НИ})=4$, $n(\text{НИ+PGR})=4$, $n(\text{НИ+N-AcPGR})=4$;

28 сутки: $n(\text{НИ})=5$, $n(\text{НИ+PGR})=4$, $n(\text{НИ+N-AcPGR})=4$;

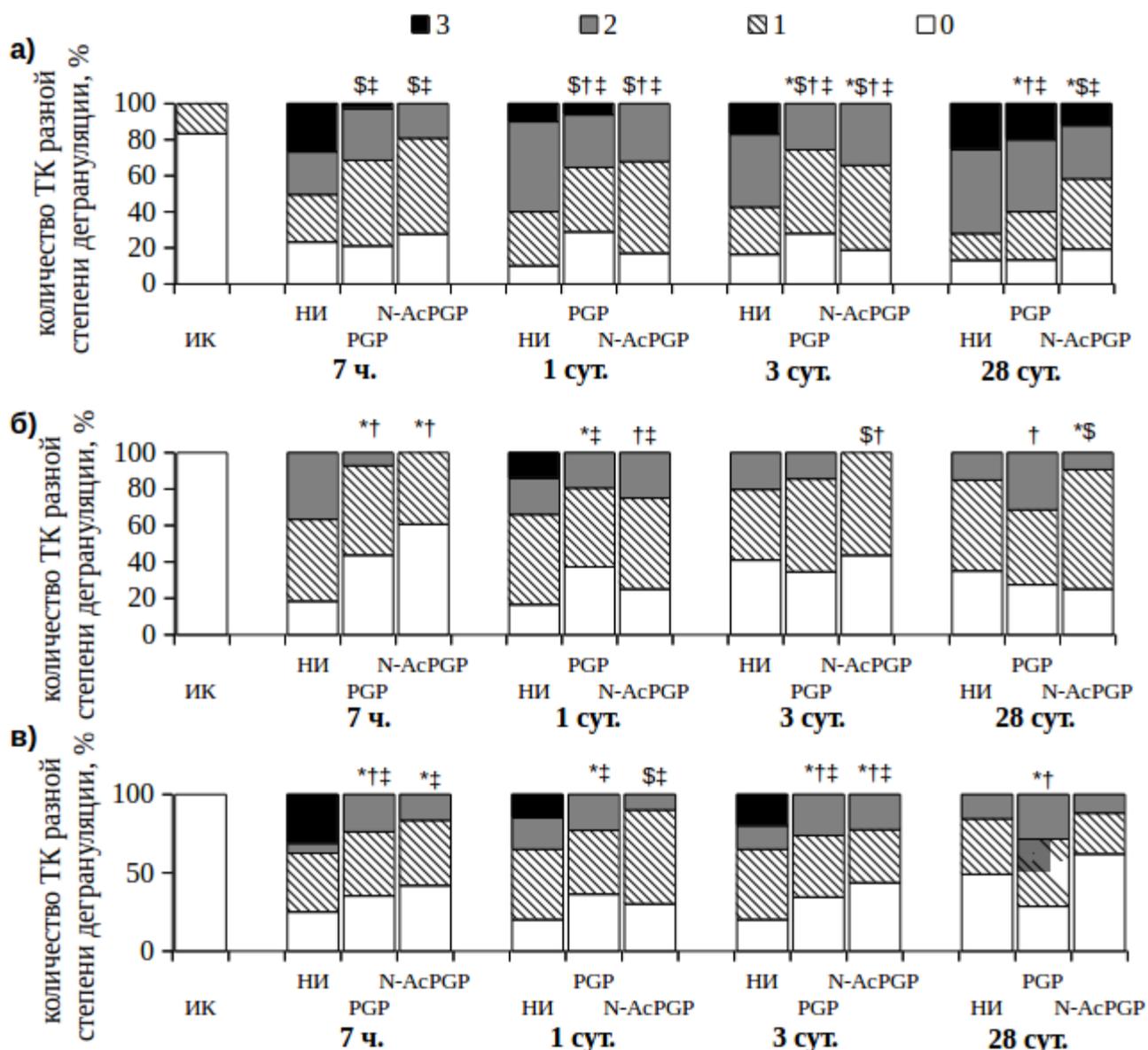


Рисунок 46. Распределение тучных клеток по степени дегрануляции у ВВ животных в а) передней стенке, б) межжелудочковой перегородке и в) задней стенке сердца. ИК — интактный контроль.

$n(\text{ИК})=4$; 7 часов: $n(\text{НИ})=4$, $n(\text{НИ+PGP})=4$, $n(\text{НИ+N-AcPGP})=4$; 1 сутки: $n(\text{НИ})=4$, $n(\text{НИ+PGP})=4$, $n(\text{НИ+N-AcPGP})=4$; 3 сутки: $n(\text{НИ})=4$, $n(\text{НИ+PGP})=4$, $n(\text{НИ+N-AcPGP})=4$; 28 сутки: $n(\text{НИ})=5$, $n(\text{НИ+PGP})=4$, $n(\text{НИ+N-AcPGP})=4$;

$p < 0,05$ по сравнению с группой НИ; * $p < 0,05$ для недегранулированных клеток (0) по сравнению с НИ; \$ $p < 0,05$ для слабо дегранулированных клеток (1) по сравнению с НИ; † $p < 0,052$ для сильно дегранулированных клеток (2) по сравнению с НИ; ‡ $p < 0,05$ для очень сильно дегранулированных клеток (3) по сравнению с НИ;

Таким образом, PGP и N-AsPGP однонаправлено влияли на степень дегрануляции тучных клеток, приводя к её уменьшению на всех сроках эксперимента. Однако пептиды оказали различное влияние на количество тучных клеток, причём это влияние определялось исходным состоянием вегетативной нервной системы.

4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Ранее было показано, что пептид PGP способен оказывать противовоспалительное действие в определённой степени опосредованное способностью стабилизировать тучные клетки (Умарова, 2008). В настоящей работе мы показали, что ацетилирование с N-конца не отменяет противовоспалительных эффектов пептида. Так, N-АсPGP снижал секреторную активность тучных клеток в экспериментах *in vitro* и уменьшал степень дегрануляции тучных клеток сердца в экспериментах *in vivo*. N-АсPGP также препятствовал увеличению проницаемости сосудов кожи крыс, вызванному введением провоспалительных триггеров: CRH, LPS, Синактена. Выбранные нами триггеры отличаются по механизму действия на тучные клетки. Синактен связывается с рецепторами АКТГ на мембране, что приводит к секреции тучными клетками гистамина (Iman-Florjanc, Ertavec, 1984). LPS также имеет рецепторы на мембране тучных клеток и приводит к селективной секреции IL-6 (Theoharides et al., 2007), увеличивающего проницаемость сосудов (Maguo et al., 1992). CRH, являясь селективным активатором, связываясь со своим рецептором, увеличивает проницаемость сосудов за счёт секреции тучными клетками фактора роста эндотелия сосудов VEGF без высвобождения гистамина (Theoharides et al., 1998). Таким образом, можно предположить, что действие обоих пептидов в данном случае связано с влиянием на тучные клетки. Интересно то, что PGP и N-АсPGP оказались не способны влиять на увеличение проницаемости сосудов, вызванного введением вещества 48/80. Вещество 48/80 (продукт конденсации N-метил-парапетоксибензилэтиламина и формальдегида) относится к неселективным активаторам и действует напрямую на G-белки, что приводит к массивному выбросу гистамина (Rothschild, 1970). Таким образом, действие пептидов зависит от механизма действия активатора: в нашем исследовании пептид оказывал противовоспалительный эффект только в случае действия триггера через рецептор. В связи с этим можно предположить, что механизм действия пептидов может быть связан с модуляцией рецепторов к различным лигандам, что косвенно подтверждено данными о способности PGP конкурентно связываться с различными рецепторами в мозге крыс (Вьюнова, 2008).

Использованные в данной работе синтетические аналоги PGP позволили выявить ключевую группировку, необходимую для реализации эффектов пептида. При присоединении аминокислот к C- или N-концу (PGPL и Семакс, Селанк соответственно) эффект PGP сохранялся. В тоже время замена глицина, как в пептиде PLP приводила к потере способности PGP снижать секрецию гистамина тучными клетками и проницаемость сосудов кожи. Более того, формы PGA и RGP, у которых был заменён один из пролинов с C- и N-конца соответственно, также не влияли на исследуемые параметры. Дипептиды PG и GP и их формы с

присоединенной аминокислотой к пролину (FPG и GPG соответственно) оказались также активны в отношении влияния на секрецию гистамина тучными клетками и уменьшения сосудистой проницаемости. Таким образом, результаты нашей работы показали, что минимальной активной группировкой глипролинов является сочетание аминокислот PG или GP, в тоже время замена одного из пролинов у RGP приводит к потере способности пептида влиять на секреторную активность тучных клеток.

В настоящей работе была выявлена взаимосвязь между исходным состоянием вегетативной нервной системы у крыс, оцененной методом расчёта ВРС, и динамикой развития инфаркта миокарда. Более того, эффекты исследуемых пептидов RGP и N-AsRGP также зависели от уровня ВРС до моделирования инфаркта миокарда, что позволяет предположить, что на фоне разницы в течение воспалительной реакции в двух группах животных пептиды могут оказывать различное действие. В настоящее время в клинике не используется разделение людей по уровню исходной активности их вегетативной нервной системы, и для всех применяется единая стратегия терапии, хотя для ряда исследований в спортивной медицине принято выделять людей с преобладанием центрального или автономного контура регуляции (Баевский и др., 2001). Поскольку деление крыс на подгруппы НВ и ВВ производилось по параметру SDNN, крыс с исходно низкой вариабельностью ритма сердца можно соотнести с людьми с преобладающим центральным контуром регуляции, в то время как ВВ животные соотносятся с теми, у кого преобладает автономный контур.

Было показано, что крысы с исходно высокими значениями параметра ВРС SDNN отличаются от крыс с низкими значениями в норме не только по остальным исследуемым статистическим и спектральным параметрам, но и по их реакции на мягкое стрессорное воздействие — холодовую пробу, а также по гемодинамическим параметрам и их реакции на введение фармакологических нагрузок. Используемый в работе метод оценки общего состояния миокарда после ишемии не позволил выявить различий в течении воспалительной реакции у крыс с исходно низкой и высокой вариабельностью ритма сердца, однако оценка морфофункционального статуса тучных клеток и физиологические методы оценки вегетативной регуляции и гемодинамических параметров показали разницу в динамике развития ишемического повреждения.

Роль тучных клеток в событиях, происходящих после инфаркта миокарда, в литературе описана недостаточно полно. С одной стороны, тучные клетки могут оказывать на миокард повреждающее действие, высвобождая ферменты, расщепляющие белки матрикса, а также провоспалительные цитокины и хемокины, приводящие к привлечению и накоплению воспалительных лейкоцитов в зоне ишемии. Использование в этом случае блокаторов тучных клеток может оказывать терапевтический эффект при инфаркте миокарда (Bot, Berkel, Biessen,

2008). С другой стороны, тучные клетки, как богатый источник ростовых факторов (VEGF, bFGF) могут участвовать в заживлении и формировании коллатералей после ишемии (Hughes et al., 2004). Также существуют данные о том, что гистамин, источником которого являются преимущественно незрелые миелоидные клетки, может снижать гибель кардиомиоцитов и за счёт привлечения макрофагов ускорять процесс заживления (Deng et al., 2015). То есть про- и противовоспалительные эффекты медиаторов тучных клеток зависят от времени, прошедшего с момента инициации воспаления, а также от миграции и созревания самих клеток.

При исследовании гистологического материала выявлено, что в первые часы после моделирования необратимой ишемии количество тучных клеток во всех отделах сердца увеличивается, причём клетки скапливаются в основном в области эпикарда и в околососудистых регионах, что не противоречит данным литературы (Engels et al., 1995). Увеличение числа клеток происходит, по всей видимости, за счёт миграции их предшественников (Frangogiannis et al., 2002). Интересно то, что через 6-7 часов количество тучных клеток резко снижается, что может быть связано как с массовой гибелью клеток (об этом также может свидетельствовать уменьшение количества сильно дегранулированных клеток в передней стенке и межжелудочковой перегородке), так и прекращение миграции. Известно, что на это же время приходится пик миграции нейтрофилов и поскольку тучные клетки регулируют клеточный ответ при воспалении, уменьшение их числа может сдерживать хемотаксис нейтрофилов. Интересно то, что на всех сроках количество тучных клеток отличалось в подгруппах крыс с исходно низкой и высокой ВРС: у ВВ крыс количество тучных клеток во всех отделах сердца выше, чем у НВ. Это, а также тот факт, что у ВВ животных рубец на 28 сутки больше, чем у НВ подтверждается данными литературы о том, что количество тучных клеток коррелирует с фракцией коллагена и апоптозом кардиомиоцитов (Zhang et al., 2006).

После инфаркта миокарда НВ животные демонстрируют лучшую сохранность вегетативной регуляции, в то время как у ВВ животных наблюдали снижение общей variability ритма сердца. Тот факт, что в данной группе животных выживаемость была выше, а также меньше размер рубца через 28 суток, соотносится с клиническими наблюдениями, что уменьшение общей variability ритма после инфаркта миокарда является предиктором неблагоприятного исхода заболевания (Buccelletti et al., 2009). В ответ на холодовую пробу у ВВ животных реакция параметров общей ВРС сохранялась в острые сроки, но уменьшалась к 28 суткам, в то время как чувствительность параметров, отражающих вклад различных отделов ВНС увеличивалась, приводя к «дисбалансу» в вегетативной регуляции.

Гемодинамические параметры и параметры работы сердца уменьшались сразу после инфаркта у НВ крыс, что свидетельствует о снижении сократительной активности сердца и

развитии сердечной недостаточности. Тем не менее АДср и ЛЖКСД в этой группе животных восстанавливались через 28 суток после ишемии, что может быть связано с гипертрофией миокарда. У ВВ животных гемодинамические показатели оставались на прежнем уровне в течение всего срока эксперимента, что, вероятно, увеличивало нагрузку на сердце и могло привести к большему повреждению сердечной мышцы через 28 суток, а также к увеличению смертности в этой группе. Само отсутствие значимого уменьшения этих параметров в группе может быть связано с изначально более низкими значениями показателей, характерными для ВВ животным, что позволяет предположить, что крысы с исходно высокой ВРС в норме имеют некоторые резервы сократительной активности.

Полученные нами данные о динамике изменения гемодинамических показателей не полностью соответствуют ранее полученным результатам на аналогичной модели (Гаврилова и др., 2006). Так, мы не наблюдали увеличения диастолического давления ни в одной из групп, а также развития явных признаков сократительной дисфункции в группе ВВ животных. Последнее может быть связано с тем, что ранее разделения животных по их исходному уровню ВРС для изучения гемодинамических показателей не проводилось, а поскольку таких животных в целом меньше, реакции, описанные ранее относились скорее к НВ крысам. Также поскольку регистрация гемодинамических параметров проводилась на наркотизированных животных, могут проявляться различия в абсолютных значениях параметров и их реакции на фармакологические нагрузки. В качестве наркоза в работе Гавриловой С.А. использовался тиопентал натрия (75 мг/кг), в настоящей работе использовали смесь препаратов Золетил (действующие вещества тилетамина гидрохлорид и золазепам гидрохлорид) и Рометар (ксилазина гидрохлорид). В инструкции к препарату тиопентал натрия указано, что он обладает выраженным миорелаксantным действием, стимулирует активность блуждающего нерва, снижает АД и ЧСС, а также оказывает кардиоингибиторное действие. Смесь тилетамина и золазепам обладает меньшим миорелаксantным действием и при длительном введении увеличивает АД и ЧСС у крыс (Wilson et al., 1993). Как было показано на лошадях (Wagner et al., 1991) и собаках (Hsu et al., 1985) при длительном введении ксилазин вызывает уменьшение АД и ЧСС. В настоящей работе доза наркоза подбиралась экспериментально таким образом, чтобы на протяжении всего эксперимента среднее артериальное давление не изменялось, однако нельзя исключать влияние разнонаправленного действия препаратов как на сами гемодинамические показатели, так и на их ответы на фармакологические нагрузки.

Для исследования эффектов PGP и N-АсPGP на гистологическом уровне мы также разделили популяцию крыс на НВ и ВВ животных, однако динамика изменения общего состояния миокарда не отличалась в двух группах. Пептиды практически не повлияли на общее состояние миокарда, хотя, возможно, уровень световой микроскопии и применяемая в работе

оценка, недостаточны для выявления этих различий. Через 3 суток в группе НИ+PGR наблюдали уменьшение количества немиоцитарных клеток в передней стенке и межжелудочковой перегородке, что может свидетельствовать о снижении интенсивности воспалительного процесса в этот срок, хотя через 28 суток инфильтрация ткани немиоцитарными клетками не отличалась от таковой в контрольной группе НИ.

Пептиды однонаправлено влияли на количество тучных клеток в срок через 28 суток после необратимой ишемии, приводя к увеличению их количества в межжелудочковой перегородке и задней стенке у НВ крыс и передней и задней стенке у ВВ животных. Стоит отметить большую роль тучных клеток в репаративных процессах, в связи с чем увеличение их количества в ишемизированном регионе у ВВ животных может свидетельствовать о более активных процессах репарации. Однако N-AsPGR уменьшил количество тучных клеток у НВ крыс через 3 суток после инфаркта с одновременным увеличением их числа в других отделах сердца, что позволяет предположить либо изменение миграции клеток, либо большую их гибель в этот срок. В целом этот факт соотносится с данными о том, что именно у НВ животных N-AsPGR оказал выраженное провоспалительное действие, увеличивая размеры некроза через 3 суток после необратимой ишемии. PGR и N-AsPGR стабилизировали тучные клетки на всех сроках и во всех отделах сердца, уменьшая в основном количество сильно и очень сильно дегранулированных клеток, что может свидетельствовать о их влиянии на процессы ремоделирования миокарда через тучные клетки.

Пептиды PGR и N-AsPGR по-разному влияли на параметры ВРС после инфаркта миокарда у крыс с исходно низким и высоким уровнем ВРС. В подгруппе НВ животных к 28 суткам PGR способствовал лучшей сохранности вегетативной регуляции работы сердца и преобладанию парасимпатического отдела вегетативной нервной системы, что потенциально может улучшать функционирование сердечно-сосудистой системы, что подтверждается увеличением ЧСС через 28 суток в группе НИ+PGR до доинфарктных значений. Более того, вагусная активность может снижать выраженность воспалительной реакции в сердце (Трасеу, 2002). Характерно также то, что эффекты пептидов, примененных в острый срок развития инфаркта, на ВРС наблюдали в основном через 28 суток, что позволяет предположить, что пептиды имеют пролонгированное действие на вегетативную регуляцию.

PGR и N-AsPGR также оказали различное действие на гемодинамические параметры. В субпопуляции НВ животных через 28 суток увеличивалась ЧСС под влиянием обоих пептидов, но уменьшались скорости сокращения и расслабления миокарда в группе НИ+N-AsPGR, что свидетельствует о снижении сократительной способности сердца и развитии сердечной недостаточности и подтверждается большим размером рубца в этой группе. Интересно также то, что практически у всех животных этой группы наблюдали тонкую

рубцовую ткань, что позволяет предположить, что пептид также влияет на процессы образования соединительной ткани в ишемизированном регионе.

Уменьшение постнагрузки и снижение сократительной активности сердца ацетилхолином, а также прямая стимуляция его работы добутамином не выявила существенного влияния пептидов на гемодинамические показатели. Однако инфузия агониста α 1-адренорецепторов фенилэфрина у НВ крыс приводила к меньшему приросту АДср в группе НИ и меньшему увеличению индексов сократимости и расслабления миокарда вследствие уменьшения постнагрузки. Это может быть связано с уменьшением количества или десенситизации α 1-адренорецепторов в сосудах, это предположение следует проверить в будущих экспериментах. При этом оба пептида увеличивали реакции индексов сократимости и расслабления миокарда за счёт увеличения α 1-опосредованного роста АДср. В связи с этим можно предположить, что эффекты пептидов в некоторой степени опосредованы влиянием на сосудистое русло, возможно, как за счёт изменения вегетативной регуляции, так и за счёт прямого действия на сосуды и адренорецепторы (Бакаева и др., 2003).



Рисунок 47. Основные эффекты PGP и N-AcPGP на развитие ишемического повреждения миокарда у крыс с исходно различной ВРС.

В целом, можно заключить, что воспалительный процесс у крыс с исходно различным

балансом влияний симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы при инфаркте миокарда развивается по-разному, и как следствие влияет на ремоделирование миокарда, его работоспособность, на состояние сосудистого русла и на исход заболевания. Пептиды также оказывали различное действие на развитие ишемического повреждения у крыс с исходно различной активностью ВНС (рисунок 47). PGP не проявлял выраженного кардиопротекторного действия, хотя и увеличивал общую ВРС у НВ животных и активность парасимпатического отдела ВНС через 28 суток после инфаркта миокарда. N-AcPGP также у НВ крыс оказывал провоспалительное действие и его введение приводило к увеличению размера некроза через 3 суток, увеличению массы рубца и развитию сердечной недостаточности через 28 суток. При этом оба пептида в равной степени снижали степень дегрануляции тучных клеток на всех сроках.

5. ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе было исследовано влияние PGP и его ацетилированной формы (N-AsPGP) на развитие ишемического повреждения миокарда у крыс. Мы показали, что ацетилирование с N-конца не отменяет способность PGP снижать количество секретируемого тучными клетками гистамина. Так, N-AsPGP, как и PGP, уменьшал высвобождение гистамина изолированными перитонеальными тучными клетками в экспериментах *in vitro* и степень дегрануляции тучных клеток сердца в экспериментах *in vivo*. Оба пептида в равной степени препятствовали увеличению проницаемости сосудов кожи крыс, вызванному введением провоспалительных триггеров: CRH, LPS, Синактена. Влияние пептидов зависит от механизма действия активатора: в нашем исследовании пептиды оказывали противовоспалительный эффект только в случае рецептор-опосредованной активации тучных клеток соответствующим триггером.

Использованные в данной работе синтетические аналоги PGP позволили выявить ключевую группировку, необходимую для реализации эффектов пептида. Результаты нашей работы показали, что минимальной активной группировкой глипролинов является сочетание аминокислот PG или GP. Замена одного из пролинов у трипептида PGP приводит к потере его способности влиять на секреторную активность тучных клеток.

В настоящей работе была выявлена взаимосвязь между исходным состоянием вегетативной нервной системы у крыс, оцененной методом расчёта ВРС, и динамикой развития инфаркта миокарда. Более того, исходный уровень ВРС определял эффекты исследуемых пептидов PGP и N-AsPGP на вегетативную регуляцию сердца, гемодинамические показатели и общее состояние миокарда после моделирования ишемии. На модели необратимой ишемии показано, что PGP не обладает выраженным кардиопротекторным действием, а введение его ацетилированной формы N-AsPGP у крыс с исходно низким уровнем ВРС приводит к увеличению размеров рубца и снижению сократительной способности сердца.

Эти данные, а также способность PGP и N-AsPGP образовываться в очаге воспаления позволяют полагать, что пептиды могут участвовать в контроле воспалительной реакции, сопровождающей ишемическое повреждение сердца. Возможно, действие пептидов в этом случае обуславливается не только влиянием на тучные клетки и локальный воспалительный ответ, но является комплексным и затрагивает другие звенья регуляции, в том числе центральную нервную систему.

6. ВЫВОДЫ

1. PGP и его ацетилированная форма N-AsPGP уменьшали количество секретируемого гистамина и предотвращали увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{2+} при активации тучных клеток Синактенон. Оба пептида препятствовали повышению сосудистой проницаемости, вызванной введением активаторов тучных клеток LPS, CRH и Синактена.

2. Минимальными группировками аминокислот, необходимыми для реализации действия глипролинов на тучные клетки, являются PG и GP, однако присоединение к глицину аланина (PGA) или аргинина (RGP), а также замена глицина в пептиде PGP на лейцин (PLP) ведёт к потере влияния на секреторную активность тучных клеток.

3. После инфаркта у крыс с исходно низкой ВРС сохранялся уровень общей ВРС и увеличивались параметры, интерпретируемые как вклад парасимпатического отдела ВНС, в то время как у крыс с исходно высокой ВРС животных общая ВРС снижалась. Через 3 и 28 суток после инфаркта уменьшение индексов сокращения и расслабления миокарда наблюдали только у животных с исходно низкой ВРС. У крыс с исходно высокой ВРС через 28 суток относительная масса рубца была выше, чем у крыс с низкой ВРС.

4. У животных с исходно низкой ВРС через 28 суток на фоне введения PGP увеличилась общая ВРС за счёт увеличения вклада параметров, интерпретируемых как влияние парасимпатического отдела ВНС. При введении N-AsPGP индексы сокращения и расслабления миокарда в покое у наркотизированных животных снижались и увеличились размер некроза и относительная масса рубца. У крыс с исходно высоким уровнем ВРС через 28 суток на фоне введения N-AsPGP уменьшилась общая ВРС, увеличились АДср, ЛЖКСД и скорости сокращения и расслабления миокарда в покое у наркотизированных животных.

5. У животных с исходно низкой ВРС на фоне введения PGP и N-AsPGP через 28 суток увеличились сниженные вследствие ишемии ответы индексов сокращения и расслабления миокарда на инфузию фенилэфрина за счёт увеличения ответа АДср. У крыс с исходно высокой ВРС введение N-AsPGP привело только к уменьшению реакций АДср и ЛЖКСД на инфузию фенилэфрина.

6. На фоне введения PGP и N-AsPGP степень дегрануляции тучных клеток снижалась во всех отделах на всех сроках независимо от исходной ВРС. Через 28 суток число тучных клеток в области рубца увеличивалось только у крыс с исходно высокой ВРС. У животных с исходно низкой ВРС эффект при введении N-AsPGP был противоположным.

7. СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

- АДср — среднее артериальное давление
АКТГ — адренокортикотропный гормон
АФК — активные формы кислорода
ВВ — высоковариабельные
ВНС — вегетативная нервная система
ВРС — вариабельность ритма сердца
ИК — интактный контроль
ИМ — инфаркт миокарда
ЛЖКДД — левожелудочковое конечное диастолическое давление
ЛЖКСД — левожелудочковое конечное систолическое давление
ЛПОНП — липопротеины очень низкой плотности
МТК — мукозальные тучные клетки
НВ — низковариабельные
НИ — необратимая ишемия
НМК — немиоцитарные клетки
СП — спонтанная активность
СТТК — тучные клетки соединительной ткани
ТК_т — тучные клетки, содержащие триптазу
ТК_{тх} — тучные клетки, содержащие триптазу, химазу, катепсин G и карбоксипептидазы
ТК_х — тучные клетки, содержащие химазу
ТТХ — 2,3,5-трифенилтетразолия хлорид
ХОБЛ — хроническая обструктивная болезнь лёгких
ЧСС — частота сердечных сокращений
N-AcPGR — ацетил-пролил-глицил-пролин
BSA — бычий сывороточный альбумин
CGRP — пептид, родственник геноу кальцитонина
CRH — кортиколиберин
CXCR2 — клеточный рецептор хемокинов
FcεR — рецептор (ε) IgE
FGF — фактор роста фибробластов
GM-CSF — колониестимулирующий фактор гранулоцитов-моноцитов
INFγ — интерферон-гамма
IgE — иммуноглобулин E

IL — интерлейкин

LT — лейкотриен

LTB₄H — гидролаза лейкотриена B₄

MCP — моноцитарный хемоаттрактантный белок

MIF — воспалительный фактор макрофагов

MMP — металлопротеиназа

NGF — фактор роста нервов

NMDA — ионотропный рецептор глутамата, связывающий N-метил-D-аспарат

PAF — фактор активации тромбоцитов

PBS — фосфатно-солевой буфер

PE — пролилэндопептидаза

PG — простагландин

PGP — пролил-глицил-пролин

RMCP — протеаза тучных клеток крыс

SCF — фактор стволовых клеток

TGF — трансформирующий фактор роста

TLR — toll-like рецептор

TNF α — фактор некроза опухолей α

VEGF — фактор роста эндотелия сосудов

VIP — вазоактивный интестинальный пептид

8. ЛИТЕРАТУРА

1. 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.
2. Бадмаева С.Е. Копылова Г.Н. Самонина Г.Е. Умарова Б.А. Абушинова Н.Н. Протекторные (профилактические) эффекты интерназального введения глипролинов (Pro-Gly-Pro, Gly-Pro, Pro-Gly) в отношении стрессогенных нарушений поведения крыс // Вестник московского университета. 2005. Т. 4. № 16. С. 3–7.
3. Баевский Р.М., Иванов Г.Г., Чирейкин Л.В., Гаврилушкин А.П., Довгалецкий П.Я., Кукушкин Ю.А., Мироов Т.Ф., Прилуцкий Д.А., Семенов Ю.Н., Фёдоров В.Ф., Флейшман А.Н., Медведев М.М. Анализ variability сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем // Вестник аритмологии. 2001. Т. 24. С. 65–87.
4. Бондаренко Н.С., Шнейдерман А.Н., Гусева А.А., Умарова Б.А. Пептид пролил - глицил - пролин (PGP) препятствует повышению проницаемости кровеносных сосудов при воспалении // Acta Naturae (русскоязычная версия). 2017. Т. 9. № 1(32). С. 55–59.
5. Гаврилова С.А., Голубева А.В., Липина Т.В., Фоминых Е.С., Вареник Е.Н., Шорникова М.В., Ченцов Ю.С., Кошелев В.Б. Кардиопротекторный эффект пептидного препарата семакс в условиях экспериментального ишемического и реперфузионного повреждения миокарда // Регионарное кровообращение и микроциркуляция. 2008. Т. 7. № 3. С. 71–79.
6. Голубева А.В., Гаврилова С.А., Липина Т.В., Шорникова М.В., Постников А.Б., Андреева Л.А., Ченцов Ю.С., Кошелев В.Б. Защитное действие пептида семакс в острую стадию инфаркта миокарда крыс // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. 2006. Т. 92. № 6. С. 732–745.
7. Копылова Г.Н., Смирнова Е.А., Санжиева Л.Ц., Умарова Б.А., Лелекова Т.В., Самонина Г.Е. Участие тучных клеток в стрессогенных нарушениях микроциркуляции брыжейки крыс // Вестник московского университета. 2006. Т. 2. № 16. С. 6–9.
8. Копылова Г.Н., Бондаренко Н.С., Умарова Б.А., Самонина Г.Е. Защитное действие пролил-глицил-пролина (PGP) при анафилактической реакции у мышей, вызванной веществом 48/80 // Вестник Московского университета. 2011. Т. 66. № 4. С. 126–128.
9. 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. 1111–1119.

10. Михайлов В.М. Вариабельность ритма сердца. Опыт практического применения. Иваново: Ивановская государственная медицинская академия, 2000. 200 с.
11. Морозова М.П., Лукошкова Е.В., Гаврилова С.А. Особенности оценки вариабельности ритма сердца у крыс // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. 2015. № 3. С. 291–307.
12. Самонина Г.Е., Копылова Г.Н., Умарова Б.А. Трипептид Pro-Gly-Pro и гомеостаз слизистой оболочки желудка // Нейрохимия. 2008. Т. 25. № 1–2. С. 128–131.
13. Сангаджиева А.Д., Бакаева З.В., Самонина Г.Е., Гусева А.А., Шаповал И.М., Осипова В.А., Мезенцева М.В., Андреева Л.А. Изменение цитокинового профиля крыс при протекторных противоязвенных эффектах глипролинов. Влияние глипролинов (PGR И N-ACETYL-PGR) на экспрессию генов цитокинов при этаноловом повреждении желудка // Вестник Московского университета. Серия 16 Биология. 2013. № 2. С. 7–11.
14. Смирнова Е.А., Умарова Б.А., Копылова Г.Н., Гончарова Е.Л. Влияние холецистокинина-4 на секреторную активность тучных клеток крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2003. Т. 135. № 1. С. 17–20.
15. Умарова Б.А., Копылова Г.Н., Смирнова Е.А., Гусева А.А., Жуйкова С.Е. Секреторная активность тучных клеток при стрессе - влияние пептидов пролил-глицил-пролина и семакса // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2003. Т. 136. № 10. С. 371–373.
16. Умарова Б.А., Лелекова Т.В., Копылова Г.Н., Самонина Г.Е., Бакаева З.В., Гончарова Е.Л., Бондаренко Н.С. Стабилизация тучных клеток уменьшает нарушения функций лимфатических сосудов при воспалении // Цитокины и воспаление. 2009. Т. 8. № 3. С. 44–47.
17. Умарова Б.А., Бондаренко Н.С., Копылова Г.Н., Самонина Г.Е. Влияние пептида PGR на секрецию бета-гексозаминидазы и гистамина перитонеальными тучными клетками крыс *in vitro* // Биологические мембраны. 2011. Т. 28. № 4. С. 262–266.
18. Фалалеева Т.М., Самонина Г.Е., Береговая Т.В., Кучеренко М.И., Андреева Л.А. Влияние глипролинов на структурно-функциональное состояние слизистой оболочки желудка и массу тела крыс в условиях длительного введения глутамата натрия // Физика живого. 2010а. Т. 18. № 1.
19. Фалалеева Т.М. Самонина Г.Е., Береговая Т.В., Дзюбенко Н.В., Андреева Л.А. Влияние пролин-содержащих пептидов pro-gly-pro и его метаболитов gly-pro и pro-gly на желудочную секрецию кислоты у крыс // мир медицины и биологии. 2010б. Т. 6. № 2. С. 189–193.
20. Чуян Е.Н., Бирюкова Е.А., Раваева М.Ю., Никифоров И.Р. Особенности системы

- вегетативного управления сердцем у испытуемых с различным типом вегетативной регуляции // Ученые записки Таврического национального университета им. В.И. Вернадского. Серия «Биология, Химия». 2009. Т. 22. № 61. С. 113–133.
21. Эдеева С.Е., Багликова К.Е., Копылова Г.Н., Самонина Г.Е., Умарова Б.А., Бакаева З.В., Платонова Р.Д. Влияние пептида Pro-Gly-Pro на устойчивость крыс к острой гипобарической гипоксии и постгипоксические нарушения поведения // Вестник московского университета. 2008. Т. 4. № 16. С. 8–12.
22. Abbott N.J. Inflammatory mediators and modulation of blood-brain barrier permeability. // Cell. Mol. Neurobiol. 2000. Т. 20. № 2. С. 131–47.
23. Abraham S.N., St John A.L. Mast cell-orchestrated immunity to pathogens. // Nat. Rev. Immunol. 2010. Т. 10. № 6. С. 440–52.
24. Acharya U.R., Joseph K.R., Kannathal N., Lim C.M., Suri J.S. Heart rate variability: A review // Med. Biol. Eng. Comput. 2006.
25. Adkinson N.F., Busse W.W. Middleton's Allergy: Principles and practice. : Elsevier Inc., 2009. Вып. 7. 186-202 с.
26. Angeli F.S., Shapiro M., Amabile N., Orcino G., Smith C.S., Tacy T., Boyle A.J., Chatterjee K., Glantz S.A., Grossman W., Yeghiazarians Y. Left ventricular remodeling after myocardial infarction: characterization of a swine model on beta-blocker therapy. // Comp. Med. 2009. Т. 59. № 3. С. 272–9.
27. Barnes P.J. Neutrophils find smoke attractive. // Science. 2010. Т. 330. № 6000. С. 40–1.
28. Bernik T.R., Friedman S.G., Ochani M., DiRaimo R., Ulloa L., Yang H., Sudan S., Czura C.J., Ivanova S.M., Tracey K.J. Pharmacological stimulation of the cholinergic antiinflammatory pathway. // J. Exp. Med. 2002. Т. 195. № 6. С. 781–8.
29. Bigger T., Steinman R.C., Program I. Predict Mortalit After Myocardial Infarction // Circulation. 1993. Т. 88. № 3. С. 927–934.
30. Bondarenko N.S., Yusipovich A. I., Kovalenko S. S., Kopylova G. N., Umarova B. A., Graevskaya E. E., Maksimov G. V. Application of laser interference microscopy (LIM) for investigation of the protective effect of prolyl-glycyl-proline (Pro-Gly-Pro) on mast cells // Biochem. Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol. 2013. Т. 7. № 3. С. 222–227.
31. Borlaug B.A., Kass D.A. Invasive Hemodynamic Assessment in Heart Failure // Heart Fail. Clin. 2009.
32. Borovikova L. V., Ivanova S., Zhang M., Yang H., Botchkina G.I., Watkins L.R., Wang H., Abumrad N., Eaton J.W., Tracey K.J. Vagus nerve stimulation attenuates the systemic inflammatory response to endotoxin. // Nature. 2000. Т. 405. № 6785. С. 458–62.
33. Bot I., Berkel T.J.C. Van, Biessen E.A.L. Mast Cells: Pivotal Players in Cardiovascular

- Diseases // *Curr. Cardiol. Rev.* 2008. T. 4. C. 170–178.
34. Brienesse S.C., Davies A.J., Khan A., Boyle A.J. Prognostic Value of LVEDP in Acute Myocardial Infarction: a Systematic Review and Meta-Analysis // *J. Cardiovasc. Transl. Res.* 2018. T. 11. № 1. C. 33–35.
 35. Brown M. a, Hatfield J.K. Mast Cells are Important Modifiers of Autoimmune Disease: With so Much Evidence, Why is There Still Controversy? // *Front. Immunol.* 2012. T. 3. № June. C. 147.
 36. Buccelletti F., Gilardi E., Scaini E., Galiuto L., Persiani R., Biondi A., Basile F., Gentiloni Silveri N., Buccelletti F. Heart rate variability and myocardial infarction: systematic literature review and metanalysis. , 2009.
 37. Cao J., Cetrulo C.L., Theoharides T.C. Corticotropin-releasing hormone induces vascular endothelial growth factor release from human mast cells via the cAMP/protein kinase A/p38 mitogen-activated protein kinase pathway. // *Mol. Pharmacol.* 2006. T. 69. № 3. C. 998–1006.
 38. Cao J., Papadopoulou N., Kempuraj D., Boucher W.S., Sugimoto K., Cetrulo C.L., Theoharides T.C. Nerve sprouting and sudden cardiac death. // *Circ. Res.* 2000. T. 86. № 7. C. 816–21.
 39. Carpeggiani C., Landi P., Michelassi C., Raciti M., Macerata A., Emdin M. Early assessment of heart rate variability is predictive of in-hospital death and major complications after acute myocardial infarction // 2004. T. 96. C. 361–368.
 40. Clark-Lewis I., Dewald B., Loetscher M., Moser B., Baggiolini M. Structural requirements for interleukin-8 function identified by design of analogs and CXC chemokine hybrids. // *J. Biol. Chem.* 1994. T. 269. № 23. C. 16075–81.
 41. Crivellato E., Beltrami, C.A., Mallardi F., Ribatti D. The mast cell: an active participant or an innocent bystander? // *Histol. Histopathol.* 2004. T. 19. № 1. C. 259–70.
 42. Delcourt N., Bockaert J., Marin P. GPCR-jacking: from a new route in RTK signalling to a new concept in GPCR activation // *Trends Pharmacol. Sci.* 2007. T. 28. № 12. C. 602–607.
 43. Deng L., Hong T., Lin J., Ding S., Huang Z., Chen J., Jia J., Zou Y., Wang T.C., Yang X. Histamine deficiency exacerbates myocardial injury in acute myocardial infarction through impaired macrophage infiltration and increased cardiomyocyte apoptosis // *Sci. Rep.* 2015.
 44. Engels W., Reiters P. H. C. M., Daemen, M. J. a P., Smits J. F. M., Van der Vusse G. J. Transmural changes in mast cell density in rat heart after infarct induction in vivo // *J. Pathol.* 1995. T. 177. C. 423–429.
 45. Engler R.L., Schmid-Schönbein G.W., Pavelec R.S. Leukocyte capillary plugging in myocardial ischemia and reperfusion in the dog. // *Am. J. Pathol.* 1983. T. 111. № 1. C. 98–111.
 46. Frangogiannis N., Smith C., Entman M. The inflammatory response in myocardial infarction. // *Cardiovasc. Res.* 2002. T. 53. C. 31–47.

47. Frangogiannis N. G., Lindsey M. L., Michael L. H., Youker K. A., Bressler R. B., Mendoza L. H., Entman M. L. Resident Cardiac Mast Cells Degranulate and Release Preformed TNF- α , Initiating the Cytokine Cascade in Experimental Canine Myocardial Ischemia/Reperfusion // *Circulation*. 1998. T. 98. № 7. C. 699–710.
48. Frossi B., Carli M. De, Pucillo C. The mast cell: an antenna of the microenvironment that directs the immune response. // *J. Leukoc. Biol.* 2004. T. 75. C. 579–585.
49. Furitsu T., Saito H., Dvorak A. M., Schwartz L. B., Irani A. M., Burdick J. F., Ishizaka T. Development of human mast cells in vitro. // *Proc. Natl. Acad. Sci. U. S. A.* 1989. T. 86. № 24. C. 10039–43.
50. Gaggar A., Jackson P. L., Noerager B. D., O'Reilly P. J., McQuaid D. B., Rowe S. M., Blalock J. E. A novel proteolytic cascade generates an extracellular matrix-derived chemoattractant in chronic neutrophilic inflammation. // *J. Immunol.* 2008. T. 180. № 8. C. 5662–9.
51. Graham L.N., Smith P.A., Stoker J.B., Mackintosh A.F., Mary D.A. Time course of sympathetic neural hyperactivity after uncomplicated acute myocardial infarction. // *Circulation*. 2002. T. 106. № 7. C. 793–7.
52. Gurish M.F., Austen K.F. The diverse roles of mast cells. // *J. Exp. Med.* 2001. T. 194. № 1. C. F1-5.
53. Haddox J. L., Pfister R. R., Muccio D. D., Villain M., Sommers C. I., Chaddha M., DeLucas L. J. Inhibitory effect of a complementary peptide on ulceration in the alkali-injured rabbit cornea. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2001. T. 42. № 12. C. 2769–75.
54. Hahn C.S., Scott D.W., Xu X., Roda M.A., Payne G.A., Wells J.M., Viera L., Winstead C.J., Bratcher P., Sparidans R.W., Redegeld F.A., Jackson P.L., Folkerts G., Blalock J.E., Patel R.P., Gaggar A. The matrikine N- -PGP couples extracellular matrix fragmentation to endothelial permeability // *Sci. Adv.* 2015.
55. Hsu W.H., Lu Z.X., Hembrough F.B. Effect of xylazine on heart rate and arterial blood pressure in conscious dogs, as influenced by atropine, 4-aminopyridine, doxapram and yohimbine // *J. Am. Vet. Med. Assoc.* 1985. T.186. № 2. C.153-156.
56. Hughes G.C., Biswas S.S., Yin B., Coleman R.E., DeGrado T.R., Landolfo C.K., Lowe J.E., Annex B.H., Landolfo K.P. Therapeutic angiogenesis in chronically ischemic porcine myocardium: comparative effects of bFGF and VEGF // *Ann. Thorac. Surg.* 2004. T. 77. № 3. C. 812–818.
57. Huston J.M., Ochani M., Rosas-Ballina M., Liao H., Ochani K., Pavlov V.A., Gallowitsch-Puerta M., Ashok M., Czura C.J., Foxwell B. Splenectomy inactivates the cholinergic antiinflammatory pathway during lethal endotoxemia and polymicrobial sepsis. // *J. Exp. Med.* 2006. T. 203. № 7. C. 1623–8.

58. Irman-Florjanc T., Erjavec F. The effect of adrenocorticotropin on histamine and 5-hydroxytryptamine secretion from rat mast cells. // *Agents Actions*. 1984. T. 14. № 3–4. C. 454–7.
59. Ismahil M.A., Hamid T., Bansal S.S., Patel B., Kingery J.R., Prabhu S.D. Remodeling of the Mononuclear Phagocyte Network Underlies Chronic Inflammation and Disease Progression in Heart Failure: Critical Importance of the Cardiosplenic Axis // *Circ. Res*. 2014. T. 114. № 2. C. 266–282.
60. Jamur M.C., Oliver C. Origin, maturation and recruitment of mast cell precursors // *Front. Biosci*. 2011. C. 1;3:1390-406.
61. de Jonge W.J., van der Zanden E.P., The F.O., Bijlsma M.F., van Westerloo D.J., Bennink R.J., Berthoud H.-R., Uematsu S., Akira S., van den Wijngaard R.M. Stimulation of the vagus nerve attenuates macrophage activation by activating the Jak2-STAT3 signaling pathway // *Nat. Immunol*. 2005. T. 6. № 8. C. 844–851.
62. Jordan J.E., Zhao Z.Q., Vinten-Johansen J. The role of neutrophils in myocardial ischemia-reperfusion injury. // *Cardiovasc. Res*. 1999. T. 43. № 4. C. 860–878.
63. Keith I.M., Jin J., Saban R. Nerve-mast cell interaction in normal guinea pig urinary bladder. // *J. Comp. Neurol*. 1995. T. 363. № 1. C. 28–36.
64. Kim S. D., Lee H. Y., Shim J. W., Kim H. J., Yoo Y. H., Park J. S., Bae, Y.-S. Activation of CXCR2 by extracellular matrix degradation product acetylated Pro-Gly-Pro has therapeutic effects against sepsis. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med*. 2011. T. 184. № 2. C. 243–51.
65. Kleiger R.E., Miller J.P., Bigger J.T., Moss A.J. Decreased heart rate variability and its association with increased mortality after acute myocardial infarction. // *Am. J. Cardiol*. 1987. T. 59. № 4. C. 256–62.
66. Kloner R.A., Fishbein M.C., Lew H., Maroko P.R., Brauwald E. Mummification of the infarcted myocardium by high dose corticosteroids. // *Circulation*. 1978. T. 57. № 1. C. 56–63.
67. Kruijf P., Lim H. D., Overbeek S. A., Zaman G. J. R., Kraneveld A. D., Folkerts G., Smit, M. J. The collagen-breakdown product N-acetyl-Proline-Glycine-Proline (N- α -PGP) does not interact directly with human CXCR1 and CXCR2 // *Eur. J. Pharmacol*. 2010. T. 643. № 1. C. 29–33.
68. Laine P., Kaartinen M., Penttilä A., Panula P., Paavonen T., Kovanen P. T. Association between myocardial infarction and the mast cells in the adventitia of the infarct-related coronary artery. // *Circulation*. 1999. T. 99. C. 361–369.
69. Levick S. P., Melndez G. C., Plante E., McLarty J. L., Brower G. L., Janicki J. S. Cardiac mast cells: The centrepiece in adverse myocardial remodelling // *Cardiovasc. Res*. 2011. T. 89. № 1. C. 12–19.

70. Li C.-Y., Li Y.-G. Cardiac Sympathetic Nerve Sprouting and Susceptibility to Ventricular Arrhythmias after Myocardial Infarction // *Cardiol. Res. Pract.* 2015. T. 2015. C. 1–8.
71. Li W., Knowlton D., Van Winkle D.M., Habecker B.A. Infarction alters both the distribution and noradrenergic properties of cardiac sympathetic neurons // *Am. J. Physiol. Circ. Physiol.* 2004. T. 286. № 6. C. H2229–H2236.
72. Libby P., Maroko P.R., Covell J.W., Malloch C.I., Ross J., Braunwald E. Effect of practolol on the extent of myocardial ischaemic injury after experimental coronary occlusion and its effects of ventricular function in the normal and ischaemic heart. // *Cardiovasc. Res.* 1973. T. 7. № 2. C. 167–73.
73. Litt M. R., Jeremy R. W., Weisman H. F., Winkelstein J. A., Becker L. C. Neutrophil Depletion Limited to Reperfusion Reduces Myocardial Infarct Size After 90 Minutes of Ischemia // *Circulation.* 1989. T. 80. № 6. C. 1816–1827.
74. Malaviya R., Abraham S.N. Mast cell modulation of immune responses to bacteria. // *Immunol. Rev.* 2001. T. 179. C. 16–24.
75. Maruo N., Morita I., Shirao M., Murota S. IL-6 increases endothelial permeability in vitro. // *Endocrinology.* 1992. T. 131. № 2. C. 710–714.
76. Menzies F.M., Shepherd M.C., Nibbs R.J., Nelson S.M. The role of mast cells and their mediators in reproduction, pregnancy and labour. // *Hum. Reprod. Update.* 2011. T. 17. № 3. C. 383–96.
77. Meshavkin V.K., Batishcheva E.Y., Kost N.V, Sokolov O.Y., Trufanova A.V, & Samonina, G. E. Effects of Pro-Gly-Pro tripeptide on the dopamine system. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2011. T. 151. № 4. C. 429–31.
78. Metcalfe D., Mekori A., Diseases I., Aviv, T., Introduction I., Apoptosis C., Baram D. Mast Cells // *Physiol. Rev.* 1997. T. 77. № 4. C. 1033–1079.
79. Metcalfe D.D. Mast cells and mastocytosis. // *Blood.* 2008. T. 112. № 4. C. 946–56.
80. Metz M., Grimbaldston M. A., Nakae S., Piliponsky A. M., Tsai M., Galli S. J. Mast cells in the promotion and limitation of chronic inflammation // 2007. T. 217. C. 304–328.
81. Morrey C., Brazin J., Seyedi N., Corti F., Silver R.B., Levi R. Interaction between Sensory C-fibers and Cardiac Mast Cells in Ischemia/Reperfusion: Activation of a Local Renin-Angiotensin System Culminating in Severe Arrhythmic Dysfunction // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2010.
82. Nagayama T., Takimoto E., Sadayappan S., Mudd J.O., Seidman J.G., Robbins J., Kass D.A. Control of In Vivo Contraction/Relaxation Kinetics by Myosin Binding Protein C: Protein Kinase A Phosphorylation-Dependent and -Independent Regulation // *Circulation.* 2007. T. 116. № 21. C. 2399–2408.

83. Nakahata T., Kobayashi T., Ishiguro A., Tsuji K., Naganuma K., Ando O., Akabane T. Extensive proliferation of mature connective-tissue type mast cells in vitro. // *Nature*. 1986. T. 324. № 6092. C. 65–7.
84. Ngkelo A., Richart A., Kirk J.A., Bonnin P., Vilar J., Lemitre M., Marck P., Branchereau M., Le Gall S., Renault N. Mast cells regulate myofilament calcium sensitization and heart function after myocardial infarction // *J. Exp. Med.* 2016. T. 213. № 7. C. 1353–1374.
85. O'Reilly P. J., Jackson P. L., Wells J. M., Dransfield M. T., Scanlon P. D., Blalock J. E. N-alpha-PGP and PGP, potential biomarkers and therapeutic targets for COPD. // *Respir. Res.* 2009. T. 10. C. 38.
86. O'Reilly P.J., Jackson P.L., Wells J.M., Dransfield M.T., Scanlon P.D., Blalock J.E. Sputum PGP is reduced by azithromycin treatment in patients with COPD and correlates with exacerbations. // *BMJ Open*. 2013. T. 3. № 12. C. e004140.
87. Olshansky B., Sabbah H.N., Hauptman P.J., Colucci W.S. Parasympathetic nervous system and heart failure pathophysiology and potential implications for therapy // *Circulation*. 2008.
88. Olshansky B. Vagus nerve modulation of inflammation: Cardiovascular implications // *Trends Cardiovasc. Med.* 2016.
89. Overbeek S.A., Kleinjan M., Henricks P. A. J., Kamp V.M., Ricciardolo F.L., Georgiou N. A., Folkerts G. Chemo-attractant N-acetyl proline-glycine-proline induces CD11b/CD18-dependent neutrophil adhesion. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. T. 1830. № 1. C. 2188–93.
90. Overbeek S. A., Henricks P. A. J., Srienc A. I., Koelink P. J., De Kruijf P., Lim H. D., Folkerts G. N-acetylated Proline-Glycine-Proline induced G-protein dependent chemotaxis of neutrophils is independent of CXCL8 release // *Eur. J. Pharmacol.* 2011. T. 668. № 3. C. 428–434.
91. Packer M., Carver J.R., Rodeheffer R.J., Ivanhoe R.J., DiBianco R., Zeldis S.M., Hendrix G.H., Bommer W.J., Elkayam U., Kukin M.L. Effect of Oral Milrinone on Mortality in Severe Chronic Heart Failure // *N. Engl. J. Med.* 1991. T. 325. № 21. C. 1468–1475.
92. Pepper G.S., Lee R.W. Sympathetic activation in heart failure and its treatment with beta-blockade. // *Arch. Intern. Med.* 1999. T. 159. № 3. C. 225–34.
93. Pfister R.R., Haddox J.L., Sommers C.I. Injection of chemoattractants into normal cornea: a model of inflammation after alkali injury. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 1998. T. 39. № 9. C. 1744–50.
94. Pittoni P., Colombo M.P. The dark side of mast cell-targeted therapy in prostate cancer. // *Cancer Res.* 2012. T. 72. № 4. C. 831–5.
95. Puebla-Osorio N., Sarchio S.N.E., Ullrich S.E., Byrne S.N. Detection of Infiltrating Mast Cells Using a Modified Toluidine Blue Staining // *Methods in molecular biology* (Clifton, N.J.). ,

2017. C. 213–222.
96. Puxeddu I., Ribatti D., Crivellato E., Levi-Schaffer F. Mast cells in allergy and beyond // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2003. T. 35. № 12. C. 1601–1607.
 97. Reimer K.A., Jennings R.B., Tatum A.H. Pathobiology of acute myocardial ischemia: metabolic, functional and ultrastructural studies. // *Am. J. Cardiol.* 1983. T. 52. № 2. C. 72A–81A.
 98. Roberts R., DeMello V., Sobel B.E. Deleterious effects of methylprednisolone in patients with myocardial infarction. // *Circulation.* 1976. T. 53. № 3 Suppl. C. I204-6.
 99. Rothschild A.M. Mechanisms of histamine release by compound 48-80. // *Br. J. Pharmacol.* 1970. T. 38. № 1. C. 253–62.
 100. Rothschild M., Rothschild A., Pfeifer M. Temporary decrease in cardiac parasympathetic tone after acute myocardial infarction. // *Am. J. Cardiol.* 1988. T. 62. № 9. C. 637–9.
 101. Schwartz P.J., Rovere M.T. La, Vanoli E. Autonomic nervous system and sudden cardiac death. Experimental basis and clinical observations for post-myocardial infarction risk stratification. // *Circulation.* 1992. T. 85. № 1 Suppl. C. I77-91.
 102. Sekido N., Mukaida N., Harada A., Nakanishi I., Watanabe Y., Matsushima K. Prevention of lung reperfusion injury in rabbits by a monoclonal antibody against interleukin-8 // *Nature.* 1993. T. 365. № 6447. C. 654–657.
 103. Senior R.M., Griffin G.L., Mecham R.P. Chemotactic activity of elastin-derived peptides // *J. Clin. Invest.* 1980. T. 66. C. 859–862.
 104. Shi L., Xu H., Wu Y., Li X., Zou L., Gao J., Chen H. Alpha7-nicotinic acetylcholine receptors involve the imidacloprid-induced inhibition of IgE-mediated rat and human mast cell activation // *RSC Adv.* 2017.
 105. Shore P.A. The chemical determination of histamine. // *Methods Biochem. Anal.* 1971. C. Suppl:89-97.
 106. Simpson P.J., Mickelson J., Fantone J.C., Gallagher K.P., Lucchesi B.R. Iloprost inhibits neutrophil function in vitro and in vivo and limits experimental infarct size in canine heart. // *Circ. Res.* 1987. T. 60. C. 666–673.
 107. Sperr W.R., Bankl H.C., Mundigler G., Klappacher G., Agis H., Simon P., Laufer P., Imhof M., Radaszciewicz T., Glogar D. The Human Cardiac Mast Cell: Localization, Isolation, Phenotype, and Functional Characterization // *Blood.* 1994. T. 84. № 1. C. 3876–3884.
 108. Spragg D.D., Kass D.A. Pathobiology of Left Ventricular Dyssynchrony and Resynchronization // *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2006. T. 49. № 1. C. 26–41.
 109. Stavchansky V.V, Yuzhakov V.V, Botsina A.Y., Skvortsova V.I., Bondurko L.N.,

- Tsyganova M.G., Dergunova L.V. The effect of Semax and its C-end peptide PGP on the morphology and proliferative activity of rat brain cells during experimental ischemia: a pilot study. // *J. Mol. Neurosci.* 2011. T. 45. № 2. C. 177–85.
110. Stillie R., Farooq S.M., Gordon J.R., Stadnyk A.W. The functional significance behind expressing two IL-8 receptor types on PMN // *J. Leukoc. Biol.* 2009. T. 86. № 3. C. 529–543.
111. Storozhevykh T.P., Tukhatova G.R., Senilova Y.E., Pinelis V.G., Andreeva L. A., Myasoyedov N. F. Effects of semax and its Pro-Gly-Pro fragment on calcium homeostasis of neurons and their survival under conditions of glutamate toxicity. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007. T. 143. № 5. C. 601–4.
112. Summers C., Raizada M.K. Angiotensin II stimulates norepinephrine uptake in hypothalamus-brain stem neuronal cultures // *Am. J. Physiol. Physiol.* 1986. T. 250. № 2. C. C236–C244.
113. Theoharides T.C., Spanos C., Pang X., Alferes L., Ligris K., Letourneau R., Chrousos G.P. Stress-induced intracranial mast cell degranulation: a corticotropin-releasing hormone-mediated effect. // *Endocrinology.* 1995. T. 136. № 12. C. 5745–50.
114. Theoharides T.C., Singh L.K., Boucher W., Pang X., Letourneau R., Webster E., Chrousos G. Corticotropin-releasing hormone induces skin mast cell degranulation and increased vascular permeability, a possible explanation for its proinflammatory effects. // *Endocrinology.* 1998. T. 139. № 1. C. 403–13.
115. Theoharides T.C., Kempuraj D., Tagen M., Conti P., Kalogeromitros D. Differential release of mast cell mediators and the pathogenesis of inflammation. // *Immunol. Rev.* 2007. T. 217. C. 65–78.
116. Theoharides T.C., Cochrane D.E. Critical role of mast cells in inflammatory diseases and the effect of acute stress // *J. Neuroimmunol.* 2004. T. 146. C. 1–12.
117. Theoharides T.C., Kalogeromitros D. The critical role of mast cells in allergy and inflammation // *Annals of the New York Academy of Sciences.* , 2006a. C. 78–99.
118. Theoharides T.C., Kalogeromitros D. The critical role of mast cells in allergy and inflammation. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2006b. T. 1088. C. 78–99.
119. Thon I.L., Uvnäs B. Degranulation and histamine release, two consecutive steps in the response of rat mast cells to compound 48-80. // *Acta Physiol. Scand.* 1967. T. 71. № 4. C. 303–15.
120. Timmers L. и др. The innate immune response in reperfused myocardium // *Cardiovasc. Res.* 2012. T. 94. № 2. C. 276–283.
121. Tracey K.J. The inflammatory reflex // *Nature.* 2002. T. 420. № 6917. C. 853–859.
122. Timmers L., Pasterkamp G., de Hoog V.C., Arslan F., Appelman Y., de Kleijn D.P. V.

- The Sympathetic Nervous System in Heart Failure: Physiology, Pathophysiology, and Clinical Implications // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009. T. 54. № 19. C. 1747–1762.
123. V'unova T.V., Andreeva L.A., Shevchenko K.V., Shevchenko V.P., Bobrov M.Y., Bezuglov V.V., Myasoedov N.F. Binding of tripeptide Pro-Gly-Pro labeled at the C-terminal proline residue to plasma membranes of the rat forebrain // *Dokl. Biol. Sci.* 2008. T. 419. № 1. C. 95–96.
 124. Vaishnav S., Stevenson R., Marchant B., Lagi K., Ranjadayalan K., Timmis A.D. Relation Between Heart Rate Variability Early After Acute Myocardial Infarction and Long-Term Mortality // 1993. C. 653–657.
 125. Vincent J.L. Understanding cardiac output // *Crit. Care.* 2008.
 126. Vinten-Johansen J. Involvement of neutrophils in the pathogenesis of lethal myocardial reperfusion injury // *Cardiovasc. Res.* 2004. T. 61. C. 481–497.
 127. Wagner A.E., Muir W.W. 3rd, Hinchcliff K.W. Cardiovascular effects of xylazine and detomidine in horses // *Am. J. Vet. Res.* 1991. T. 52. № 5. C. 651–657
 128. Weathington N.M., van Houwelingen A.H., Noerager B.D., Jackson P.L., Kraneveld A.D., Galin F. S., Blalock J. E. A novel peptide CXCR ligand derived from extracellular matrix degradation during airway inflammation. // *Nat. Med.* 2006. T. 12. № 3. C. 317–23.
 129. Weber M.A., Purdy R.E. Catecholamine-mediated constrictor effects of aldosterone on vascular smooth muscle. // *Life Sci.* 1982. T. 30. № 23. C. 2009–17.
 130. Wells J.M., O'Reilly P.J., Szul T., Sullivan D.I., Handley G., Garrett C., McNicholas C.M., Roda M.A., Miller B.E., Tal-Singer R. An aberrant leukotriene A4 hydrolase-proline-glycine-proline pathway in the pathogenesis of chronic obstructive pulmonary disease // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2014. T. 190. № 1.
 131. Wilson R.P., Zagon I.S., Larach D.R., Lang C.M. Cardiovascular and respiratory effects of tiletamine-zolazepam // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1993. T. 44. № 1. C. 1–8.
 132. Zannad F., De Ferrari G.M., Tuinenburg A.E., Wright D., Brugada J., Butter C., Klein H., Stolen C., Meyer S., Stein K.M. Chronic vagal stimulation for the treatment of low ejection fraction heart failure: results of the NEural Cardiac TherApy foR Heart Failure (NECTAR-HF) randomized controlled trial. // *Eur. Heart J.* 2015. T. 36. № 7. C. 425–33.
 133. Zhang Q.-Y., Ge J.-B., Chen J.-Z., Zhu J.-H., Zhang L.-H., Lau C.-P., Tse H.-F. Mast cell contributes to cardiomyocyte apoptosis after coronary microembolization. // *J. Histochem. Cytochem.* 2006. T. 54. C. 515–523.
 134. Zhao X., Zhang W., Xing D., Li P., Fu J., Gong K., Chen Y.-F. Endothelial cells overexpressing IL-8 receptor reduce cardiac remodeling and dysfunction following myocardial infarction. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2013. T. 305. C. H590–8.

135. Zuanetti G., Latini R., Maggioni A.P., Santoro L., Franzosi M.G. Influence of diabetes on mortality in acute myocardial infarction: data from the GISSI-2 study. // J. Am. Coll. Cardiol. 1993. T. 22. № 7. C. 1788–94.