

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. ЛОМОНОСОВА

На правах рукописи



Куренкова Анастасия Дмитриевна

ВЛИЯНИЕ ПРОЛИЛ-ГЛИЦИЛ-ПРОЛИНА (PGR) И ЕГО
АЦЕТИЛИРОВАННОЙ ФОРМЫ (N-AcPGR) НА РАЗВИТИЕ
ИШЕМИЧЕСКОГО ПОВРЕЖДЕНИЯ МИОКАРДА У КРЫС

Специальность: 03.03.01 — физиология

АВТОРЕФЕРАТ

диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва - 2018

Работа выполнена на кафедре физиологии и общей патологии факультета фундаментальной медицины и кафедре физиологии человека и животных биологического факультета Федерального государственного бюджетного образовательного учреждения высшего образования «Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова»

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

Официальные оппоненты: *Цорин Иосиф Борисович* — доктор биологических наук, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова», лаборатория фармакологического скрининга, ведущий научный сотрудник
Соколов Олег Юрьевич — доктор биологических наук, федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Научный центр психического здоровья», лаборатория патофизиологии, ведущий научный сотрудник
Шрам Станислав Иванович — кандидат химических наук, федеральное государственное бюджетное учреждение «Институт молекулярной генетики Российской академии наук», сектор нейрофармакологии, заведующий сектором

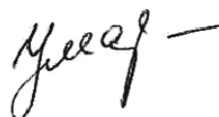
Защита диссертации состоится «17» декабря 2018 г., в 17 ч. 00 мин. на заседании диссертационного совета МГУ.03.06 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: 119234, Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 12, биологический факультет МГУ, аудитория М-1. Факс: (495)939-43-09.

E-mail: bellaum@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова (Фундаментальная библиотека, Ломоносовский проспект, д. 27) и на сайте ИАС «ИСТИНА»: <https://istina.msu.ru/dissertations/153711509/>

Автореферат разослан «16» ноября 2018 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета,
доктор биологических наук

 Умарова Б.А.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

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 (Haddox 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) даёт 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 глипролинового 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 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-АсPGP 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 объемом выборок и актуальными методами статистического анализа. Обзор литературы и обсуждение подготовлены с использованием современной тематической литературы.

Апробация результатов. Основные результаты исследования были представлены на следующих конференциях: XI, XII, XIII Международный

Междисциплинарный конгресс «Нейронаука для медицины и психологии»; XXI, XXII, XXIII Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2014, 2015, 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»; 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 сокращений и список цитируемой литературы (содержит 135 источников). Работа иллюстрирована 47 рисунками и содержит 5 таблиц.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проводили на самцах белых беспородных крыс весом 350-450 г. 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. По массе и параметру общей вариабельности ритма животные были разделены на следующие экспериментальные группы (таблица 1).

Модель необратимой ишемии (Голубева и др., 2006). Крыс наркотизировали хлоралгидратом (400 мг/кг). Ишемию получали, перевязывая левую ветвь коронарной артерии на уровне ушка левого предсердия. Место операции обрабатывали антибиотиком 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 и др., 2015). Электрокардиограмму регистрировали в I отведении у животных в состоянии спокойного бодрствования до и после функционального теста — холодовой пробы (ХП). Для выполнения ХП животное помещали на 3 минуты в стеклянный куб с

прозрачными стенками на пакет со снегом (+4°C). 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. Из записей удаляли экстрасистолы и шумы, оставляя только комплексы QRS нормальных кардиоциклов синусового происхождения (NN). По 5-минутным фрагментам покоя до холодной пробы и первым 5 минутам после пробы рассчитывали параметры ВРС (таблица 2).

Таблица 1. 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 (НИ)	28	22	30	19
Необратимая ишемия (НИ) + PGP	27	23	29	20
Необратимая ишемия (НИ) + N-АсPGP	30	20	30	19

Таблица 2. Основные параметры variability ритма сердца и их характеристика.

Параметр ВРС	Расчёт	Характеристика
SDNN, мс	Стандартное отклонение NN-интервалов	Общая variability ритма сердца
PNN3, %	Процент NN-интервалов синусового происхождения, отличающихся от предыдущих более чем на 3 мс	Отражает влияние парасимпатического отдела ВНС
SDANN, мс	Стандартное отклонение средних значений NN-интервалов, вычисленным по 1 минутным сегментам записи	Отражает влияние симпатического отдела ВНС на сердечный ритм

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, присоединенный к датчику давления (ISOTEC) 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 фармакологических нагрузочных тестов. 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 TAM-A (Hugo Sachs Elektronik, Германия), аналого-цифрового преобразователя E-140 (L-CARD) и программного обеспечения PowerGraph (Россия).

Рассчитывали следующие параметры гемодинамики: ЧСС — частота сердечных сокращений, АДср — среднее артериальное давление, ЛЖКСД — левожелудочковое конечное систолическое давление, ЛЖКДД - левожелудочковое конечное диастолическое давление.

Для оценки функциональных возможностей сердечно-сосудистой системы использовали фармакологические нагрузочные тесты ацетилхолином, добутамином и фенилэфрином. Вещества вводили 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. 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.

Получение гистологических срезов и их окрашивание. Наркотизированным животным через катетер в сонной артерии в сердце вводили 4% раствор формалина в PBS до осветления ткани и остановки сердечбиений. Полученные препараты держали в 10% растворе формалина в PBS сутки, а затем промывали водой в течение 7 часов. Препараты, зафиксированные в парафине, нарезали на микротоме Microm HM 3559 (Thermo Fisher Scientific, США) на срезы толщиной 5 мкм. Срезы анализировали на микроскопе Imager A1 Axio (Zeiss, Германия). На срезах, окрашенных гематоксилином и эозином оценивали состояние ткани миокарда в трёх зонах: в передней и задней стенке и в межжелудочковой перегородке. Для возможности корректного применения статистических методов обработки результатов использовали балльную шкалу (Ахметшина, Бердалин и др., 2015). На срезах, окрашенных 0,1% толуидиновым синим (Puebla-Osorio et al., 2017), определяли количество тучных клеток в 5 полях зрения при увеличении x40 (не менее чем в четырёх кольцевых срезах одного сердца). Оценивали степень дегрануляции всех тучных клеток в различных зонах (не менее восьми клеток на зону в разных кольцевых срезах) по баллам: 0 – недегранулированные клетки; 1 – слабо дегранулированные клетки; 2 – сильно дегранулированные клетки; 3 – очень сильно дегранулированные клетки, вплоть до потери очертаний.

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 выбриту область внутрикожно с образованием бугорка вводили индукторы воспалительного ответа или эквивалентный объём физиологического раствора 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, в модификации). Животных под эфирным наркозом декапитировали и обескровливали. Делали надрез брюшной полости и вводили 10 мл Hepes-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 Hepes-NaCl (pH=7,4).

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

Центрифугировали 10 мин при 1200 об/мин (18° С). Отбирали тучные клетки и трижды промывали от фиколла сбалансированным раствором. После каждого промывания клетки концентрировали, центрифугируя 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.

Метод определения гистамина тучных клеток (Shore, 1971). Метод основан на реакции конденсации гистамина с ортофталевым альдегидом, в результате которой образуется флуоресцирующий комплекс.

Клетки активировали аналогом АКТГ Синактеном (20 мкМ) в течение 10 мин при 37 °С. Реакцию останавливали, доводя объём проб до 400 мкл охлаждённым сбалансированным буфером для тучных клеток, и помещали на холод 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. Флуоресценцию измеряли на модульном многофункциональном планшетном анализаторе EnVision при 460 нм, возбуждая при 335 нм.

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. 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), съёмку проводили с частотой 1 фото в 5 сек, в течение 1 мин перед активацией и 5 мин после. Обработку результатов проводили в программе ImageJ.

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.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

Было показано, что PGP способен снижать секрецию гистамина тучными клетками, препятствовать повышению концентрации внутриклеточного кальция (Бондаренко и др., 2016) и повышению проницаемости сосудов при экспериментальном перитоните у крыс (Умарова и др., 2006). Относительно N-AsPGP таких данных не было. Поэтому в первой части работы провели сравнительный анализ действия обеих форм пептида на секреторную активность тучных клеток, изменение уровня внутриклеточного кальция в тучных клетках, а также на увеличение проницаемости сосудов кожи крыс, обусловленное активацией тучных клеток.

Процент снижения секреции гистамина рассчитывали относительно количества секретированного гистамина при действии только Синактена, принимая этот уровень за 0. Установлено, что PGP в концентрации от $3 \cdot 10^{-9}$ до $6 \cdot 10^{-5}$ М в равной степени способен снижать секрецию гистамина тучными клетками, однако при дальнейшем

уменьшении концентрации выраженный эффект не наблюдался. N-АсPGR способен снижать секрецию гистамина вплоть до концентрации $3 \cdot 10^{-10}$ М, что на порядок ниже, чем у PGR. Более того при концентрациях от $3 \cdot 10^{-9}$ М до $3 \cdot 10^{-7}$ М влияние N-АсPGR на снижение секреции гистамина более выражено (рисунок 1, А).

Одним из важнейших признаков активации тучных клеток и их дегрануляции является увеличение концентрации внутриклеточного кальция. Сравнили влияние PGR и N-АсPGR на кальциевый ответ тучных клеток при их активации аналогом АКТГ Синактенном (рисунок 1, Б).

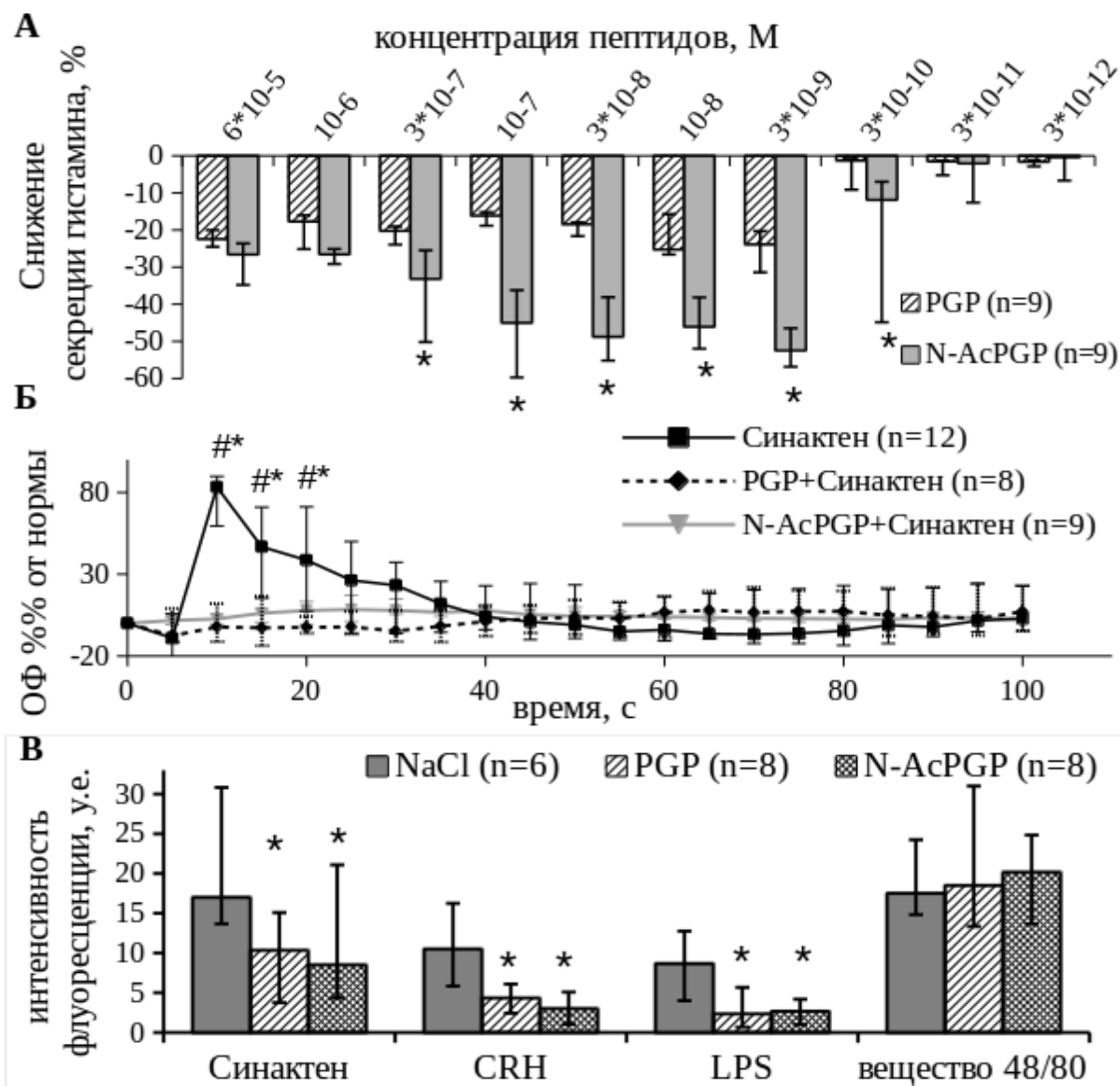


Рисунок 1. Влияние PGR и N-АсPGR на снижение секреции гистамина тучными клетками (А), уровень внутриклеточного кальция (Б) и проницаемость сосудов кожи (В). А) * $p < 0,05$ по сравнению с PGR; (PGR от $3 \cdot 10^{-9}$ М до $6 \cdot 10^{-5}$; N-АсPGR от $3 \cdot 10^{-9}$ М до $3 \cdot 10^{-10}$ М – значимое снижение по сравнению с действием Синактена) Б) * $p < 0,05$ по сравнению с PGR, # $p < 0,05$ по сравнению с N-АсPGR; В) * $p < 0,05$ по сравнению с NaCl.

Добавление активатора в первые секунды вызывало возрастание внутриклеточной концентрации кальция на 83% и уменьшение до базового уровня в течение минуты. Предобработка тучных клеток PGR и N-АсPGR препятствовала скачкообразному увеличению Ca^{++} в цитоплазме. На неактивированные тучные клетки пептиды не оказывали такого эффекта. Результаты свидетельствуют, что способность

N-АсPGR, подобно PGR, препятствовать увеличению концентрации внутриклеточного кальция и снижать количество секретируемого гистамина в условиях *in vitro* может быть обусловлена их стабилизирующим действием на тучные клетки.

Для оценки изменения проницаемости сосудов измеряли экстравазацию красителя Evans Blue при активации локального воспалительного процесса различными триггерами: Синакеном, кортиколиберином CRH, LPS и веществом 48/80. На рисунке 1 (В) видно, что все используемые триггеры вызывают увеличение проницаемости сосудов. Введение PGR, а также N-АсPGR, значительно уменьшало экстравазацию Evans Blue при активации Синакеном, CRH и LPS, но не веществом 48/80. Используемые триггеры отличаются по механизму действия на тучные клетки. Синактен, LPS и CRH, являясь селективными активаторами, активируют тучные клетки, взаимодействуя со своими рецепторами на клеточной мембране (Iman-Florjanc et al., 1984; Theoharides et al., 1998, 2007; Maruo et al., 1992). Вещество 48/80 (продукт конденсации N-метил-параметоксифенилэтиламина и формальдегида) относится к неселективному активатору и действует непосредственно на G-белки, что приводит к массивному выбросу гистамина (Rothschild, 1970).

Таким образом, эффекты пептидов зависят от механизма действия активатора: в нашем исследовании пептид снижал проницаемость сосудов только в случае действия триггера через рецептор.

2. Исследование влияния синтетических аналогов PGR на секрецию гистамина тучными клетками и проницаемость сосудов кожи.

Для выявления ключевого сочетания аминокислот, необходимого для реализации эффектов пептида, исследовали влияния ряда синтетических аналогов PGR на секрецию гистамина тучными клетками и проницаемость сосудов кожи. Модификации пептидов условно были разделены на группы: 1. Присоединение аминокислот с С- (Семакс) и N-конца (PGPL); 2. Замена одного из пролинов или глицина (RGP, PGA и PLP); 3. Дипептиды, образующиеся при деградации PGR (PG и GP).

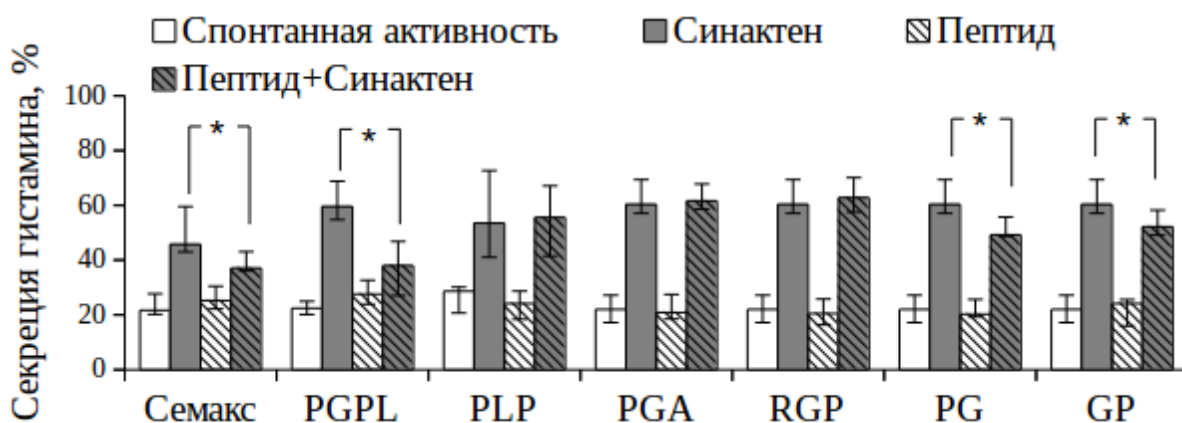


Рисунок 2. Влияние синтетических аналогов PGR на секрецию гистамина тучными клетками. * $p < 0,05$, $n=9$ для каждого пептида

Предобработка тучных клеток пептидами первой группы (Семакс и PGPL), а также дипептидами приводила к значимому снижению секреции гистамина при последующей активации Синакеном. Пептиды второй группы (PLP, PGA, RGP) не оказывали влияния на этот параметр (рисунок 2). Пептиды сами по себе не оказывали влияния на секрецию гистамина.

Аналогичные результаты были получены при исследовании влияния пептидов

на увеличение проницаемости сосудов кожи крыс при внутрикожном введении активаторов тучных клеток — Синактена, LPS, вещества 48/80 (рисунок 3).

На рисунке 3 видно, что пептиды Семакс, PGPL, PG и GP значительно снижали экставазацию 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 экставазацию красителя.

Таким образом, результаты нашей работы показали, что минимальной активной группировкой глипролинов является сочетание аминокислот PG или GP. Замена одного из пролинов у PGP приводит к потере способности пептида влиять на секреторную активность тучных клеток. Результаты экспериментов с использованием различных по механизму триггеров для индукции воспаления, не противоречит предположению о возможности аллостерической модуляции пептидами мембранных рецепторов (V'unova et al., 2008).

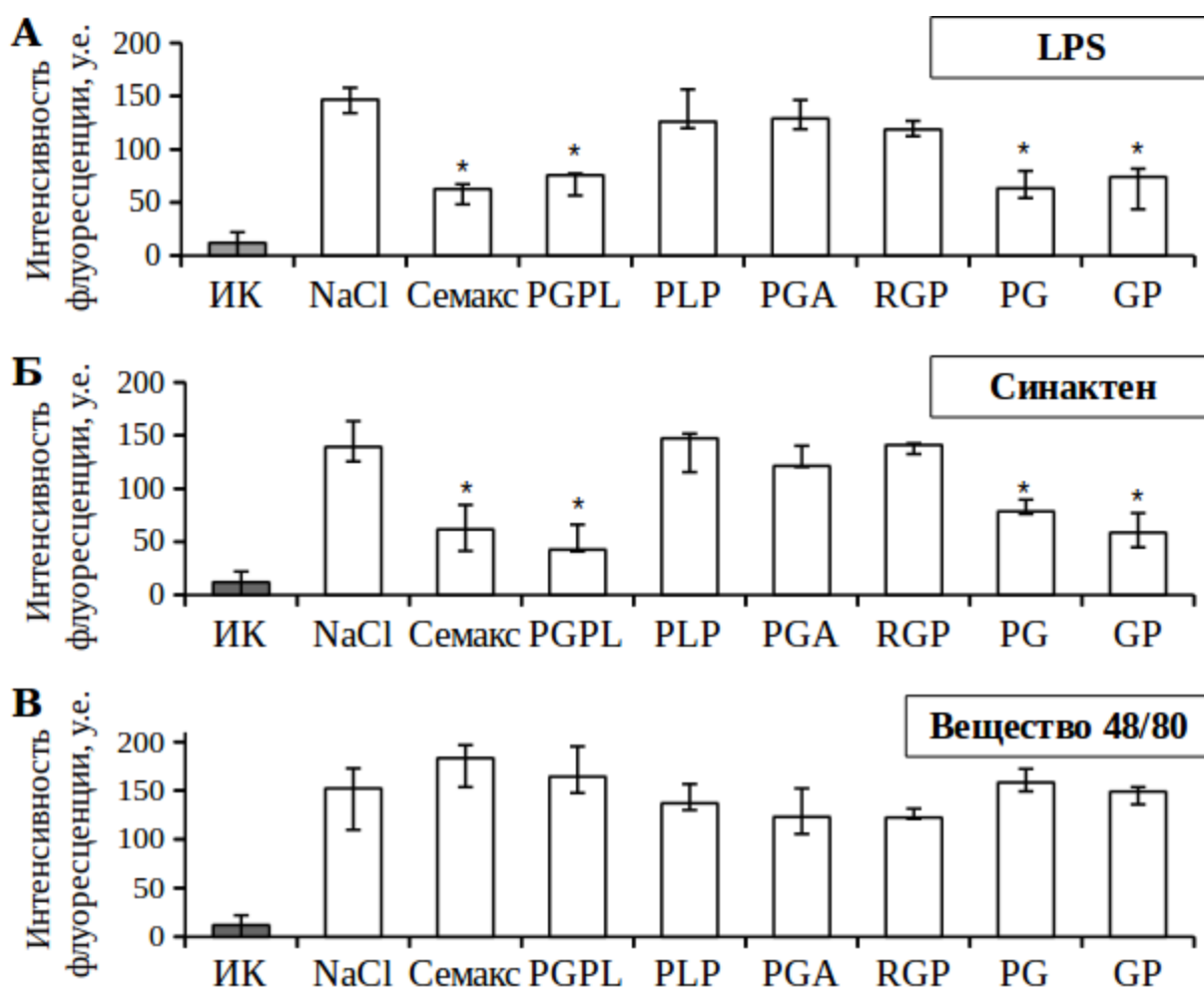


Рисунок 3. Влияние модифицированных форм PGP на увеличение проницаемости сосудов кожи крыс, вызванное введением LPS (А), Синактена (Б) и вещества 48/80 (В). * $p < 0,05$ по сравнению с контролем (NaCl). N=7 для каждого пептида. ИК — интактный контроль.

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

Известно, что некоторые патологические процессы могут по-разному развиваться у организмов с различной организацией вегетативной нервной системы (ВНС). Влияние ВНС на работу сердечно-сосудистой системы можно изучать с помощью оценки ВРС. В клинике используется измерение уровня ВРС для прогноза исхода

инфаркта миокарда, однако данных о влиянии исходного вегетативного статуса на развитие этого процесса нет. В связи с этим, в этой части работы изучали различия в вегетативной регуляции сердца и гемодинамических показателях у крыс с разным уровнем ВРС.

При помощи кластерного анализа по параметру SDNN крысы были разделены на подгруппы животных с исходно низкой (НВ) и высокой ВРС (ВВ). Параметры рNN3 и SDANN, характеризующие, соответственно, вклад парасимпатического и симпатического отдела ВНС также были выше в группе ВВ крыс (рисунок 4).

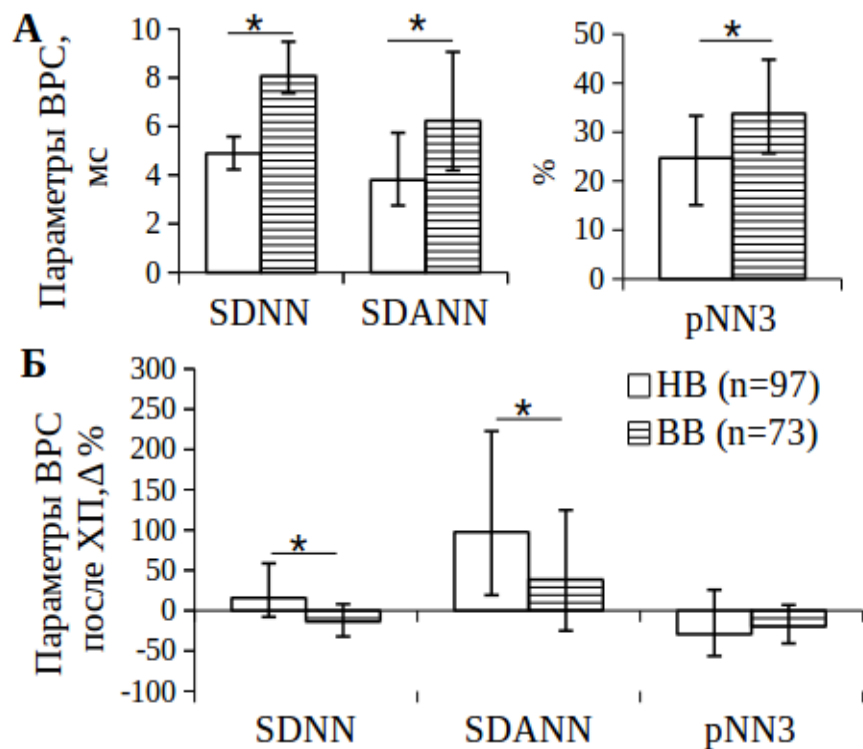


Рисунок 4. Параметры ВРС у крыс с исходно низкой (НВ) и высокой (ВВ) вариабельностью ритма сердца в покое до операции (А) и их реакция на холодовую пробу (Б). *p<0,05

Реакция параметров на мягкое стрессорное воздействие – холодовую пробу (ХП) – также отличалась в двух группах. Так, у крыс с исходно низкой вариабельностью ритма (НВ) наблюдали увеличение показателя общей вариабельности ритма SDNN на 15%, в то время как у ВВ значимого изменения параметра не отмечали. Параметр SDANN, отражающий преимущественно вклад симпатического отдела ВНС, увеличивался на 97% и 38% в подгруппах НВ и ВВ животных. Увеличение этого параметра в группе НВ было значимо большим, чем в группе ВВ. Параметр рNN3, отражающий влияние парасимпатического отдела ВНС в равной степени уменьшался на 29% и 19% у НВ и ВВ крыс, соответственно.

В покое у наркотизированных НВ животных по сравнению с ВВ крысами были значимо выше на 8% ЧСС, на 7% и 15% скорости сокращения и расслабления миокарда соответственно. При этом диастолическое давление в левом желудочке у НВ крыс было в два раза меньше.

В связи с показанными различиями в вегетативной регуляции сердца и гемодинамических параметрах, а также различному ответу на ХП, мы предположили, что динамика развития ишемического повреждения также может различаться у НВ и ВВ крыс.

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

После инфаркта миокарда у НВ животных сохранялся уровень общей

вариабельности ритма сердца, в то время как у ВВ он снижался на 40 и 29% в острый период через 1 и 3 суток, соответственно (рисунок 5, А). Уменьшение общей ВРС по всей видимости связано со снижением вклада симпатического отдела, отражаемого параметром SDANN (рисунок 5, Б). При этом у НВ животных через 1, 3 и 28 суток происходило увеличение параметра рNN3, характеризующего вклад парасимпатического отдела ВНС, на 30, 43 и 43% соответственно (рисунок 5, В).

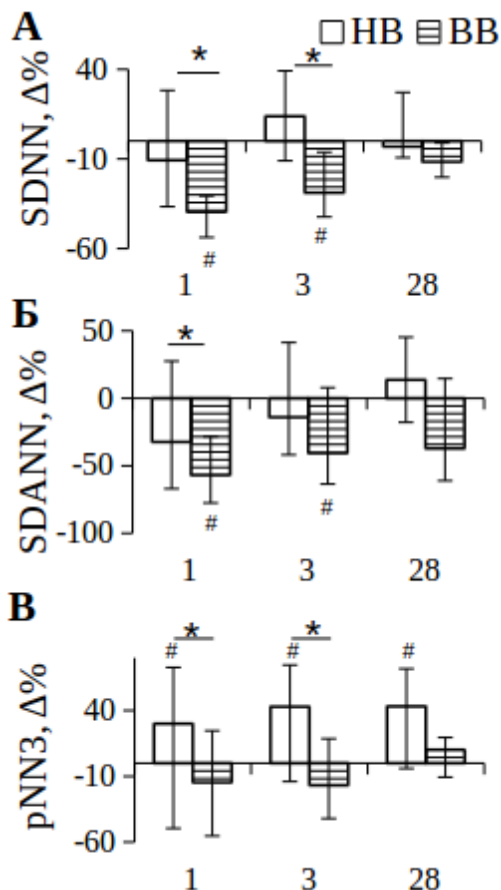


Рисунок 5. Изменение параметров ВРС у низко-(НВ) и высоковариабельных (ВВ) животных после инфаркта миокарда. * $p < 0,05$, # $p < 0,05$ по сравнению с доинфарктным уровнем.

По оси абсцисс — сутки после операции.

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

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

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

После моделирования необратимой ишемии у наркотизированных крыс с исходно низкой ВРС через 3-е суток наблюдали уменьшение ЧСС на 21%, АД_{ср} 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. При этом, несмотря на уменьшение значений показателей через 3 суток после инфаркта в группе НВ крыс, различий между группами в абсолютных значениях практически не наблюдали, что, возможно, связано с изначально высокими значениями параметров у НВ животных.

Площадь некроза, оцененная через 3 суток после операции при помощи окраски 2,3,5-трифенилтетразолиумхлоридом, не отличалась у НВ и ВВ животных и составила около 25% от площади левого желудочка. Однако масса рубца, нормированная на массу левого желудочка, была значимо выше в подгруппе ВВ крыс по сравнению с НВ животными (31 и 23% соответственно). Выживаемость в подгруппе НВ животных составила 70%, а в подгруппе ВВ — 53% ($p=0,067$).

В настоящее время в клинической практике не используется разделение пациентов по уровню активности их вегетативной нервной системы и для всех применяется единая стратегия терапии. Мы показали наличие взаимосвязи между

исходным уровнем ВРС и различиями в вегетативной регуляции сердца после ишемии, а также в исходе инфаркта миокарда у крыс. В связи с этим в дальнейшей работе анализировали эффекты PGP и N-АсPGP в модели необратимой ишемии в двух подгруппах отдельно.

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

Развитие инфаркта миокарда сопровождается активацией воспаления, осложняющего течение заболевания. В первой части работы было установлено, что PGP и N-АсPGP могут обладать противовоспалительным действием за счёт снижения секреции гистамина тучными клетками. В связи с этим мы предположили, что введение пептидов в острый срок развития ишемического повреждения может снизить уровень воспалительной реакции и улучшить состояние сердца, что отразится и на регуляции работы сердца вегетативной нервной системой, и на гемодинамических показателях.

Исследование влияния пептидов PGP и N-АсPGP на параметры ВРС после инфаркта миокарда

Параметры ВРС рассчитывали через 1, 3 и 28 суток после инфаркта миокарда. У НВ крыс динамика изменения параметров не отличалась в контрольной группе (НИ) и в группах НИ+PGP и НИ+N-АсPGP: по сравнению с доинфарктным уровнем параметры SDNN и SDANN не изменялись, а параметр рNN3 увеличивался через 1 сутки и оставался повышенным к 28 суткам. У НВ крыс в группе НИ+PGP по сравнению с контрольной группой НИ через 28 суток увеличивался на 50% параметр общей вариабельности ритма SDNN (рисунок 6, А), по всей видимости, за счёт увеличения в 2 раза показателя быстрых колебаний ритма рNN3 (рисунок 6, В), отражающего преимущественно вклад парасимпатического отдела ВНС.

У высоковариабельных животных (ВВ) динамика изменения параметров в экспериментальных группах также не отличалась: по сравнению с доинфарктным уровнем снижались параметры SDNN на 39 и 29% и SDANN на 57 и 41% в острый период (1 и 3 суток), но SDANN оставался сниженным на 37% вплоть до 28 суток (рисунок 6, Г, Д, Е). В группе НИ+N-АсPGP по сравнению с контрольной группой НИ через 28 суток параметр общей вариабельности ритма SDNN был значимо меньше 3,7 раза (рисунок 6, Г).

Исследование влияния PGP и N-АсPGP на гемодинамические показатели после инфаркта миокарда.

У низковариабельных крыс через 3 суток после ИМ в группе НИ уменьшались ЧСС на 21%, АДср на 6%, ЛЖКСД на 13%, индексы сократимости и расслабления миокарда на 14 и 23% соответственно. Это может свидетельствовать о снижении сократительной активности сердца. Через 28 суток АДср и ЛЖКСД возвращались к уровню интактного контроля. В группах НИ+PGP и НИ+N-АсPGP через 28 суток увеличивалась ЧСС на 26 и 18% соответственно. Введение N-АсPGP приводило к уменьшению на 8 и 21% скорости сокращения и расслабления миокарда через 28 суток (рисунок 7).

У крыс с исходно высокой вариабельностью ритма сердца в группе НИ по сравнению с интактным контролем через 3 суток снижалось ЛЖКДД и оставалось сниженным через 28 суток. Через 28 суток в группе НИ+N-АсPGP увеличилось АДср на 12%, ЛЖКСД на 13% и скорости сокращения и расслабления миокарда на 8 и 3% соответственно (рисунок 7).

Для оценки функциональных возможностей сердца применяли фармакологические нагрузочные тесты ацетилхолином, добутамином и

фенилэфрином. Установлено, что уменьшение постнагрузки ацетилхолином и прямая стимуляция сердечной мышцы добутамином не выявляют различий между группами НИ, НИ+PGR и НИ+N-АсPGR.

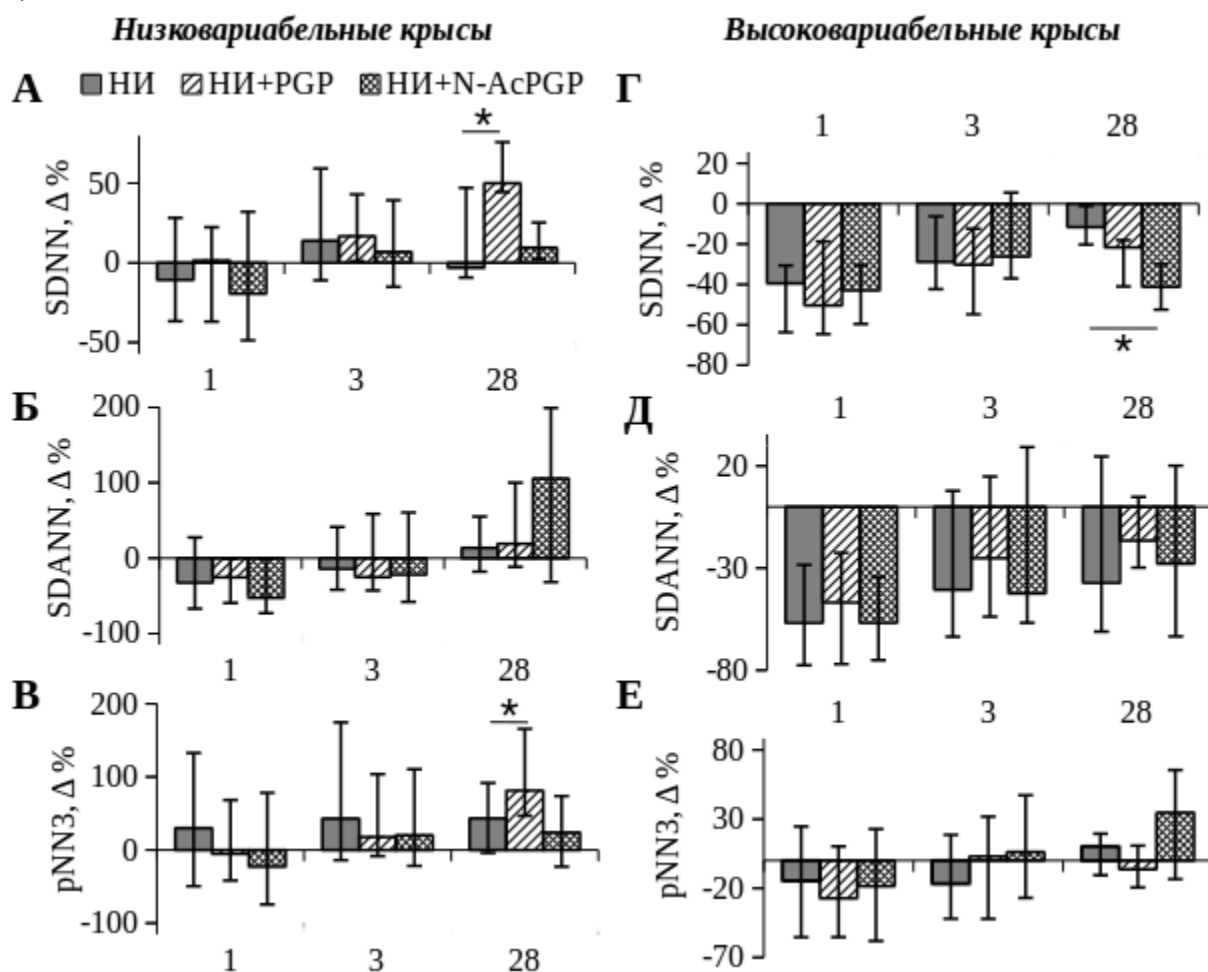


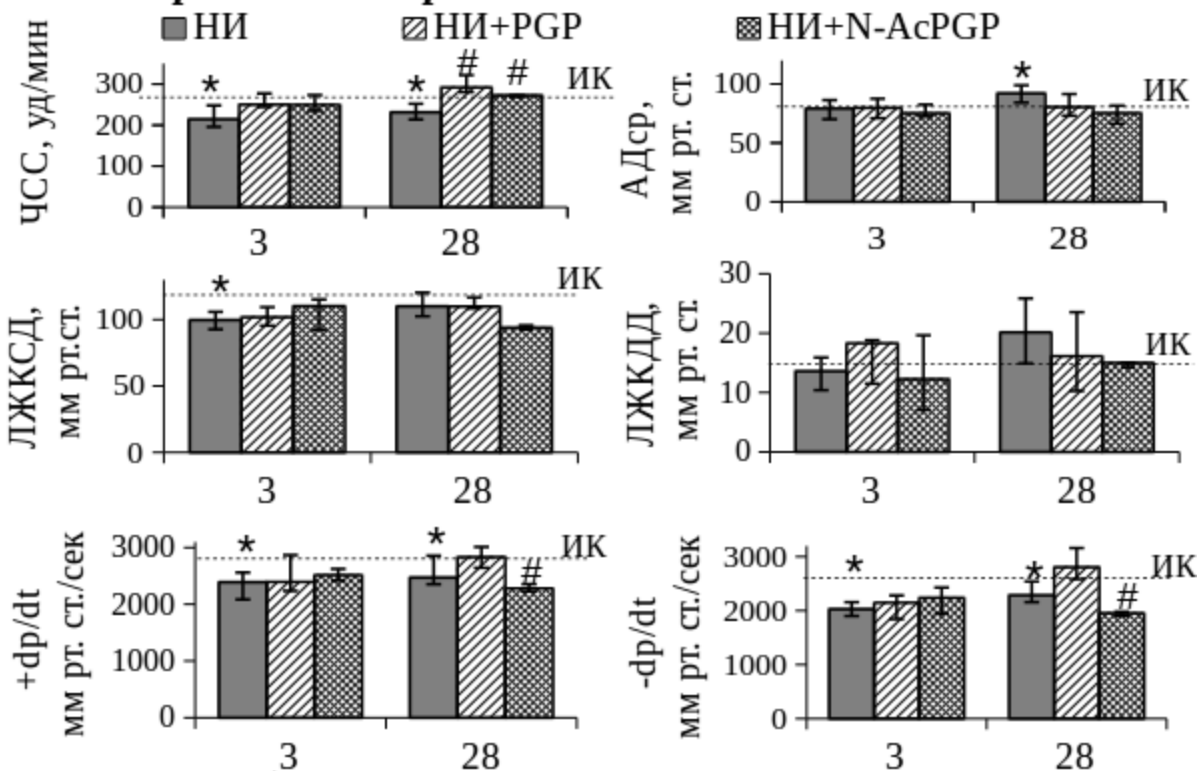
Рисунок 6. Влияние пептидов PGR и N-АсPGR на параметры ВРС после инфаркта миокарда у низко- (А-В) и высоковариабельных (Г-Е) животных.

* $p < 0,05$ По оси абсцисс — сутки после операции.

Через 3 суток после ишемии у *НВ животных* инфузия фенилэфрина приводила к росту АДср, ЧСС и параметров работы сердца в той же степени, что и в интактном контроле. Через 28 суток в группе НИ увеличение АДср было меньшим в 2,4 раза по сравнению с ИК. Реакции ЛЖКСД и индексов сократимости и расслабления миокарда также были меньшими в 1,5; 3 и 2,2 раза по сравнению с ИК. В группе НИ+N-АсPGR на эти же сутки инфузия фенилэфрина приводила к большему в 1,4 раза увеличению АДср по сравнению с группой НИ, а также были увеличены реакции индексов сократимости и расслабления миокарда в 2 и 1,7 раз соответственно. Через 28 суток введение PGR не изменило реакцию АДср на инфузию фенилэфрина по сравнению с группой НИ, но увеличило ответы индексов сократимости и расслабления миокарда на 73 и 72% соответственно. Через 3 и 28 суток после ишемии у *ВВ животных* в группе НИ инфузия фенилэфрина приводила к меньшему на 35 и 45 % росту 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 суток изменение АДср в ответ на инфузию фенилэфрина оказалось в 3 раза меньшим, чем в группе НИ. Это привело к

уменьшению реакции ЛЖКСД, но не к изменению сократительной активности сердца.

Низковариабельные крысы



Высоковариабельные крысы

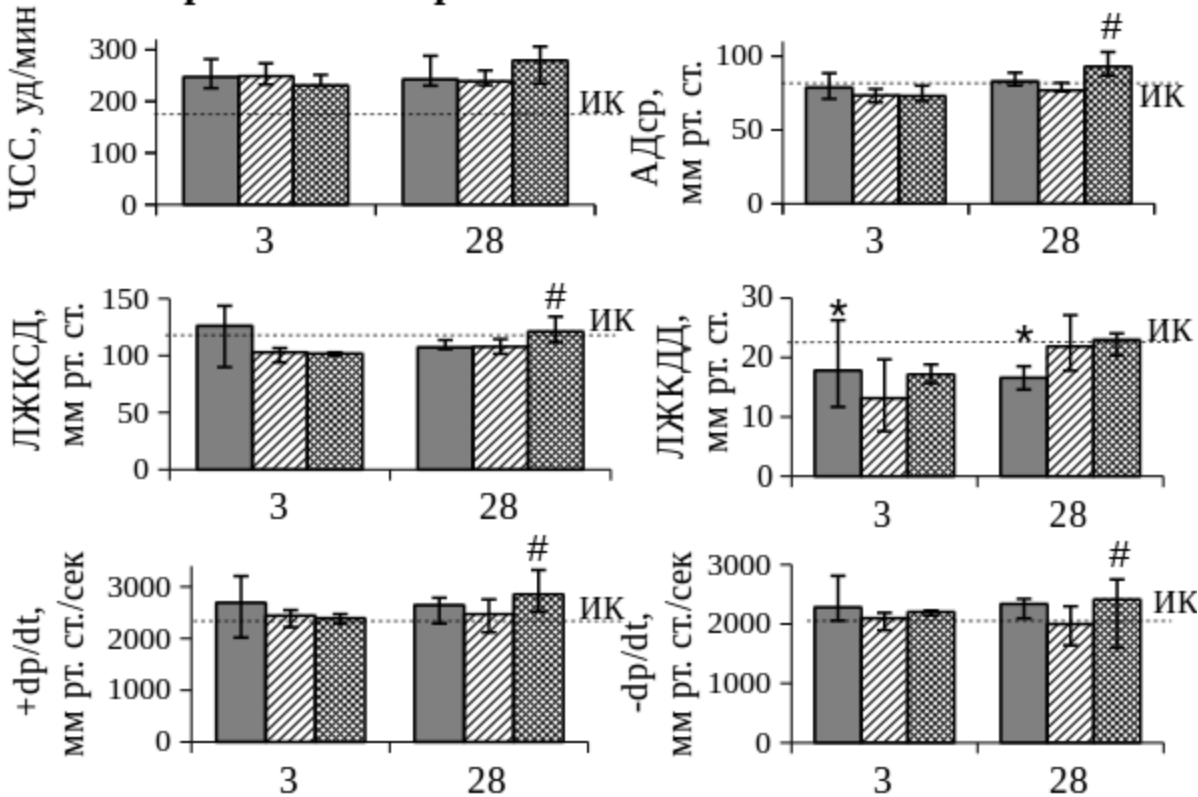


Рисунок 7. Влияние PGR и N-AcPGR на гемодинамические показатели у крыс с исходно низкой и высокой ВРС.

* $p < 0,05$ по сравнению с ИК (только для группы НИ), # $p < 0,05$ по сравнению с группой НИ. По оси абсцисс — сутки после операции.

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 был практически одинаковым, что свидетельствует о том, что снижение сократительной активности сердца связано со снижением $\alpha 1$ -опосредованного увеличения постнагрузки, вероятно, вследствие уменьшения количества или десенситизации $\alpha 1$ -адренорецепторов. При этом оба пептида увеличивали реакции индексов сократимости и расслабления миокарда за счёт увеличения $\alpha 1$ -опосредованного роста АДср. В связи с этим можно предположить, что эффекты пептидов в некоторой степени опосредованы их влиянием на сосудистое русло, как за счёт влияния на вегетативную регуляцию, так и за счёт возможного прямого действия на сосуды (Бакаева, 2003).

Исследование влияния пептидов PGP и N-AcPGP на морфологические изменения ткани сердца в острый и хронический период развития ишемического повреждения

Для значений параметров, характеризующих общее состояние миокарда, значимых различий в контроле и во влиянии пептидов между НВ и ВВ животными выявлено не было, в связи с чем группы были объединены. Через 7 часов после операции в передней стенке снижалась поперечная исчерченность кардиомиоцитов и наблюдали инфильтрацию ткани немиоцитарными клетками. Важным является также то, что гистологическая картина позволяет на таком раннем сроке выявить ишемизированный регион. Через 1 и 3 суток поперечная исчерченность кардиомиоцитов оставалась на том же уровне и уменьшалась через 28 суток. Состояние миокарда в межжелудочковой перегородке и задней стенке значимо не отличалось от состояния ткани в интактном контроле, однако через 1 и 3 суток в задней стенке значимо увеличивалось количество немиоцитарных клеток и через 28 суток уже не отличалось от интактного контроля. Пептиды не повлияли на состояние кардиомиоцитов, однако PGP снизил инфильтрацию ткани немиоцитарными клетками по сравнению с группой НИ через 3 суток после операции в передней и задней стенке.

При исследовании гистологического материала было выявлено, что в первые часы после моделирования необратимой ишемии количество тучных клеток во всех отделах сердца увеличивается, возможно, за счёт миграции их предшественников (Frangogiannis et al., 2002).

У животных с исходно низкой и высокой вариабельностью ритма сердца в интактном контроле не наблюдали различий в количестве и степени дегрануляции тучных клеток. Уже через 7 часов, а также через 1, 3 и 28 суток у ВВ животных в передней стенке было значимо больше тучных клеток в 1,75, 1,2, 1,8 и 5,4 раза соответственно, хотя распределение по степени дегрануляции не отличалось в двух группах. Это, а также тот факт, что у ВВ животных рубец через 28 суток больше, чем у НВ подтверждается данными литературы о том, что большее количество тучных клеток коррелирует с большим количеством коллагена и апоптозом кардиомиоцитов (Zhang et al., 2006). Через 28 суток в подгруппе НВ животных введение N-AcPGP приводило к уменьшению в 3 раза количества тучных клеток в передней стенке, в то время как у ВВ крыс после инъекций как PGP, так и N-AcPGP количество тучных клеток в передней стенке увеличилось в 2 раза (рисунок 8, А). В целом, на всех сроках PGP и N-AcPGP действовали однонаправленно и в равной степени снижали степень дегрануляции тучных клеток (рисунок 8, Б).

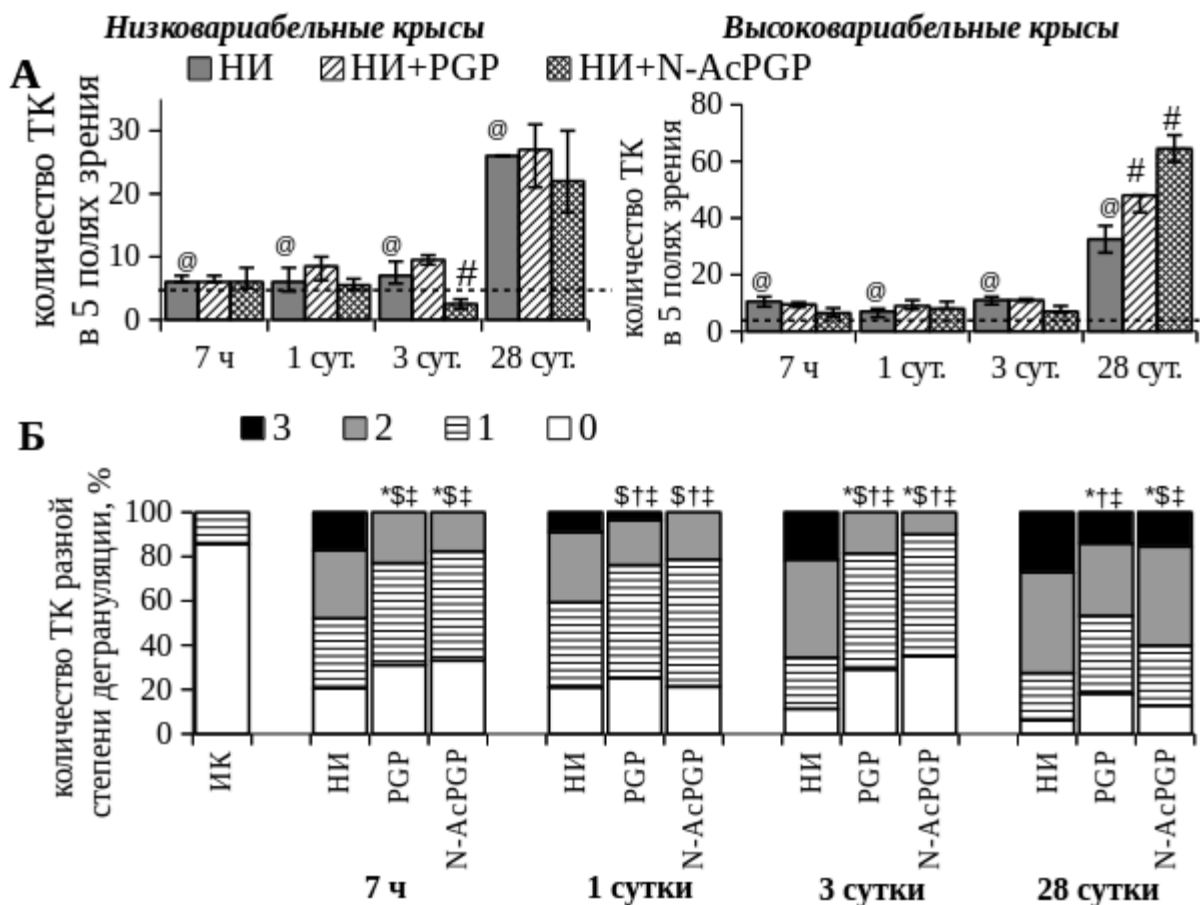


Рисунок 8. Влияние PGR и N-АсPGR на количество тучных клеток в передней стенке миокарда (А, Б) и на степень их дегрануляции (В). @ $p < 0,05$ по сравнению с ИК (только для группы НИ), # $p < 0,05$ по сравнению с группой НИ;

* $p < 0,05$ 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.

Исследование влияния пептидов PGR и N-АсPGR на размеры поражения миокарда и выживаемость животных

Площадь некроза миокарда оценивали через 3 суток, 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 введение N-АсPGR приводило к увеличению размера поражения на 18% и массы сформировавшегося рубца, относительно массы живой ткани левого желудочка, на 17%. PGR не повлиял на размер некроза и массу рубца (рисунок 9).

PGR и N-АсPGR не повлияли на выживаемость ВВ крыс (рисунок 9, Е), однако у НВ крыс в группе НИ+N-АсPGR наблюдали тенденцию ($p = 0,072$) к увеличению смертности к 28 суткам с 29,7 до 53,5 % (рисунок 9, В).

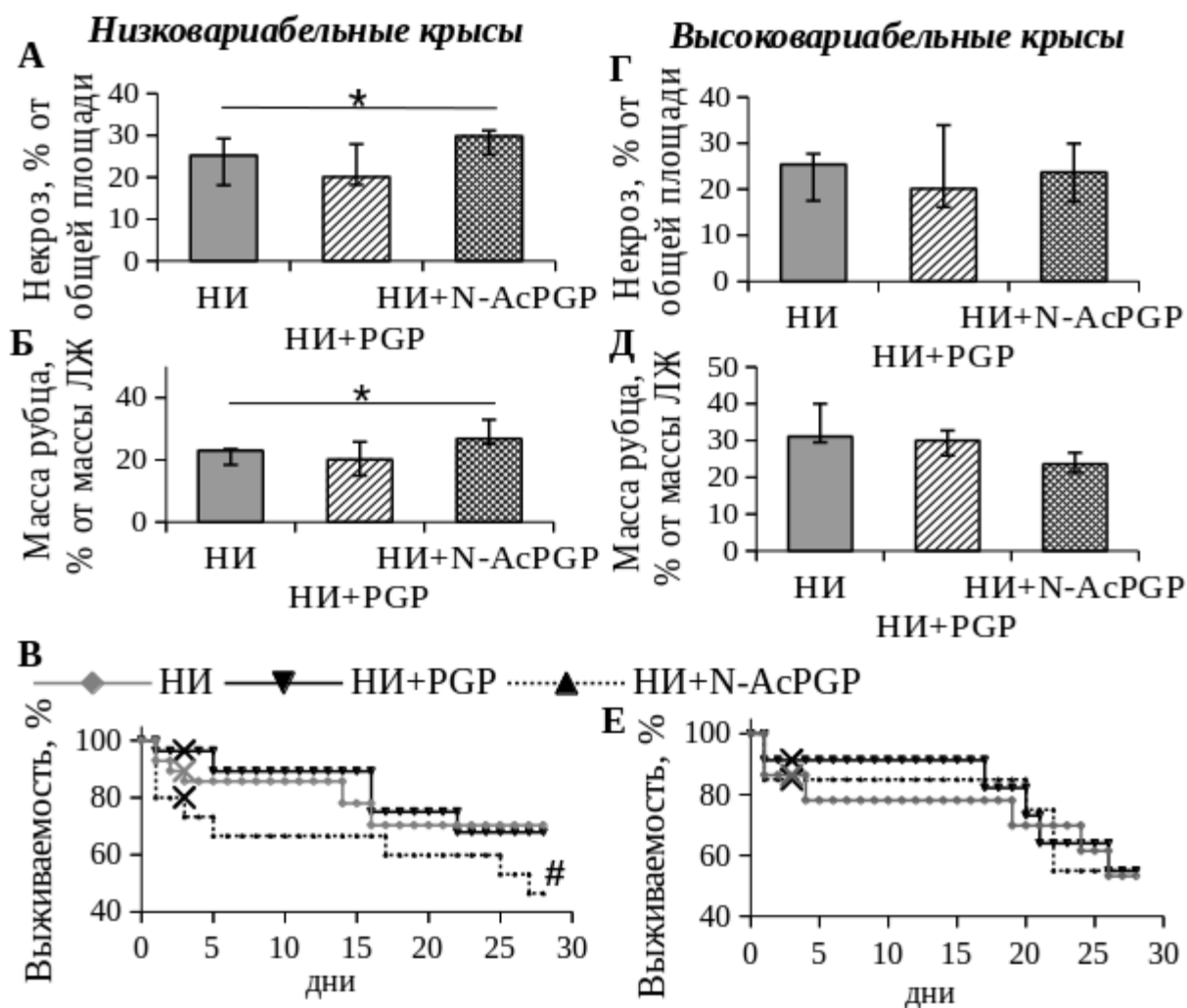


Рисунок 9. Влияние PGR и N-АсPGR на размеры некроза через 3 суток (А, Г), относительную массу рубца через 28 суток (Б, Д) и выживаемость животных (В, Е) после операции. * $p < 0,05$, # $p < 0,1$ по сравнению с группой НИ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе было исследовано влияние PGR и его ацелированной формы (N-АсPGR) на развитие ишемического повреждения миокарда у крыс. Мы показали, что ацелирование с N-конца не отменяет способность PGR снижать количество секретируемого тучными клетками гистамина. Так, N-АсPGR, как и PGR, 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 PGR 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 PGR 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-АсPGP 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-АсPGP 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-АсPGP 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.

ВЫВОДЫ

1. PGP и его ацетилированная форма N-АсPGP уменьшали количество секретируемого гистамина и предотвращали увеличение концентрации внутриклеточного Ca^{++} при активации тучных клеток Синактеном. 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-АсPGP индексы сокращения и расслабления миокарда в покое у наркотизированных животных снижались и увеличивались размер некроза и относительная масса рубца. У крыс с исходно высоким уровнем ВРС через 28 суток на фоне введения N-АсPGP 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-АсPGP 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-АсPGP привело только к уменьшению реакций АДср и ЛЖКСД на инфузию фенилэфрина.

6. На фоне введения PGP и N-АсPGP 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-АсPGP был противоположным.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, WoS, RSCI и в изданиях, рекомендованных для защиты в диссертационном совете МГУ.03.06. по специальности физиология 03.03.01

1. Бондаренко Н.С., **Куренкова А.Д.**, Никишин Д.А., Умарова Б.А. Влияние пролил-глицил-пролина (PGP) и его ацетиловой формы (N-AcPGP) на уровень кальция в цитоплазме перитонеальных тучных клеток крыс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. — 2016. — Т. 161, № 4. — С. 475–478.
2. **Куренкова А.Д.**, Умарова Б.А., Гаврилова С.А. Влияние пролил-глицил-пролина (pgr) и его ацетиловой формы (n-acpgr) на проницаемость сосудов кожи крыс // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. — 2016. — Т. 102, № 9. — С. 95–103.
3. Гаврилова С.А., Марков М.А., Бердалин А.Б., **Куренкова А.Д.**, Кошелев В.Б. Изменение симпатической иннервации сердца крысы при экспериментальном инфаркте миокарда; влияние пептида Семакс // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины — 2017. — Т. 163, №5. — С. 570–574.
4. **Kurenkova A.D.**, Andreeva L.A., Umarova B.A., Gavrilova S.A., Myasoedov N.F. The connection between structure modification and anti-inflammatory effects of prolyl-glycyl-proline (PGP) // International Journal of Peptide Research and Therapeutics. — 2018. — Т. 24, №3. — С. 347-353.

Тезисы докладов международных и всероссийских конференций

1. **Куренкова А.Д.**, Умарова Б.А., Андреева Л.А., Гаврилова С.А., Гусева А.А. Ацетилование не отменяет протекторные эффекты регуляторного пептида пролил-глицил-пролина (PGP) (Стендовый). II Научная конференция «Физиологическая активность регуляторных пептидов» посвященная 90-летию со дня рождения академика РАМН Игоря Петровича Ашмарина, Москва, Россия, 18 сентября 2015.
2. **Куренкова А.Д.**, Умарова Б.А., Гаврилова С.А. Влияние пролил-глицил-пролина (PGP) и его ацетиловой формы (N-AcPGP) на состояние миокарда при ишемическом и реперфузионном повреждении (Стендовый). VI Всероссийская с международным участием Школа-конференция по физиологии кровообращения, МГУ, Россия, 2-5 февраля 2016.
3. **Куренкова А.Д.** Влияние синтетических аналогов продуктов деградации внеклеточного матрикса на секрецию гистамина тучными клетками *in vitro* (Устный). Международная научная конференция студентов, аспирантов и молодых ученых «Ломоносов-2016», МГУ им. М.В. Ломоносова, Россия, 11-15 апреля 2016.
4. **Куренкова А.Д.**, Бондаренко Н.С. Участие тучных клеток в пептидной регуляции проницаемости сосудов при воспалении (Стендовый) XIX международная медико-биологическая научная конференция молодых исследователей «Фундаментальная наука и клиническая медицина. Человек и его здоровье», Санкт-Петербург, Россия, 23 апреля 2016.
5. **Куренкова А.Д.**, Умарова Б.А., Гаврилова С.А., Андреева Л.А. Провоспалительное действие ацетиловой формы пролил-глицил-пролина (PGP) (Заочный). Нейронаука для медицины и психологии: 12 Международный междисциплинарный конгресс. Судак, Крым, Россия. 1—14 июня 2016 г.
6. Зайцев И.Л., **Куренкова А.Д.**, Волкова Ю.Л. Влияние пептида Семакс (фрагмент АКТГ4-7-PGP) на вегетативную регуляцию сердца при ишемическом и реперфузионном повреждении - Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии – 2017, Санкт-Петербург, Россия.
7. Умарова Б.А., **Куренкова А.Д.**, Гаврилова С.А. Тучные клетки сердца в воспалительной реакции при ишемическом повреждении миокарда - XIII международный междисциплинарный конгресс нейронаука для медицины и психологии, 2017, Крым, г. Судак, Россия.
8. **Куренкова А.Д.**, Волкова Ю.Л., Зайцев И.Л., Умарова Б.А., Гаврилова С.А. Влияние пептида семакс на динамику вегетативного сопровождения работы сердца при ишемическом и реперфузионном повреждении - XIII Международный междисциплинарный

конгресс «Нейронаука для медицины и психологии», 2017, Крым, Судак, Россия.

9. **Куренкова А.Д.**, Иванов Е.В., Волкова Ю.Л., Умарова Б.А., Гаврилова С.А. Взаимосвязь морфологических характеристик тучных клеток и лейкоцитарных клеток на ранних сроках ишемического и реперфузионного повреждения миокарда - XXIII съезд Физиологического общества им. И. П. Павлова, 2017, г. Воронеж, Россия.

10. **Куренкова А.Д.**, Мельник П.С., Бун М.Г., Зайцев И.Л., Мосолова Е.С., Гаврилова С.А., Умарова Б.А. Влияние пролил-глицил-пролина (PGR) и его ацетилированной формы на вегетативную регуляцию сердца при ишемическом повреждении миокарда - II молодёжная школа-конференция «Молекулярные механизмы регуляции физиологических функций» – 2017, Звенигород, Россия, 2017.

11. Бун М.Г., **Куренкова А.Д.** Взаимосвязь между параметрами variability ритма сердца здоровых крыс и тяжестью развития инфаркта миокарда у этих животных. XXIV Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии – 2018», Санкт-Петербург, Россия, 2018.

12. Мельник П.С., **Куренкова А.Д.** Влияние пептида PGR и его ацетилированной формы на параметры гемодинамики у крыс с инфарктом миокарда. XXIV Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии – 2018», Санкт-Петербург, Россия, 2018.

13. Мосолова Е.С., **Куренкова А.Д.** Влияние пептидов PGR и N-AcPGR на variability ритма сердца крыс в острый и хронический период развития инфаркта миокарда. XXIV Всероссийская конференция молодых учёных с международным участием «Актуальные проблемы патофизиологии и биохимии – 2018», Санкт-Петербург, Россия, 2018.

14. Умарова Б.А., Гаврилова С.А., **Куренкова А.Д.**, Волкова Ю.Л. Регуляция секреции тучных клеток при сердечнососудистых заболеваниях. Нейронаука для медицины и психологии: 14 Международный междисциплинарный конгресс. Судак, Крым, Россия. 2018.

15. **Куренкова А.Д.**, Мельник П.С., Бун М.Г., Мосолова Е.С., Умарова Б.А., Гаврилова С.А. Влияние пептидов PGR и N-AcPGR на вегетативную регуляцию сердца и гемодинамические параметры при инфаркте миокарда у крыс. Нейронаука для медицины и психологии: 14 Международный междисциплинарный конгресс. Судак, Крым, Россия. 2018.

Список сокращений

АДср — среднее артериальное давление,
АКТГ – адренокортикотропный гормон
ВВ — высоковариабельные животные,
ВНС — вегетативная нервная система,
ВРС — variability ритма сердца,
ИК — интактный контроль,
ЛЖКДД - левожелудочковое конечное диастолическое давление,
ЛЖКСД — левожелудочковое конечное систолическое давление,
НВ — низковариабельные животные,
НИ — необратимая ишемия,
ТК — тучные клетки,
ЧСС — частота сердечных сокращений,
CRH – кортиколиберин,
LPS – липополисахариды