

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ  
БЮДЖЕТНОЕ ОБРАЗОВАТЕЛЬНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ ВЫСШЕГО  
ОБРАЗОВАНИЯ "НИЖЕГОРОДСКАЯ ГОСУДАРСТВЕННАЯ  
МЕДИЦИНСКАЯ АКАДЕМИЯ" МИНИСТЕРСТВА ЗДРАВООХРАНЕНИЯ  
РОССИЙСКОЙ ФЕДЕРАЦИИ

На правах рукописи

Абросимов Денис Алексеевич

**Секреторная активность эндокринных кардиомиоцитов  
и морфология миокарда у крыс после острой гипоксии и  
при коррекции мексидолом**

03.03.04 - клеточная биология, цитология, гистология

Диссертация на соискание ученой степени кандидата

биологических наук

Научный руководитель: доктор  
биологических наук,  
профессор И.Л. Ермолин

Нижний Новгород - 2016

## **Используемые сокращения**

АД - Артериальное давление

ВП - Восстановительный период

ВСР - Вариабельность сердечного ритма

КМЦ - Кардиомиоциты

МНП - Мозговой натрийуретический пептид

ПНП - Предсердный натрийуретический пептид

СПР - Саркоплазматический ретикулум

ЯК - Янтарная кислота

CV - Коэффициент вариации

HF - High Frequency

LF - Low Frequency

RR - Кардиоинтервал

SDNN - Стандартное отклонение временного ряда нормальных  
кардиоинтервалов NN

TP - Total Power

ULF - Ultra Low Frequency

VLF - Very Low Frequency

Введение	5
Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Морфофункциональные изменения миокарда в условиях гипоксии и в восстановительном периоде	12
1.1.1. Компенсаторно-приспособительные реакции миокарда при остановке кровообращения	13
1.1.2. Структурно-функциональные изменения миокарда в раннем восстановительном периоде	15
1.1.3. Структурно-функциональные изменения миокарда в отдаленном восстановительном периоде	17
1.2. Общая характеристика натрийуретических пептидов	19
1.3. Мозговой натрийуретический пептид (МНП)	21
1.4. Мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат)	24
1.5. Анализ variability сердечного ритма как показателя функционального состояния организма	29
1.5.1. Оценка variability сердечного ритма при структурно-функциональных нарушениях	31
Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	33
2.1. Моделирование острой гипоксии у крыс	34
2.2. Электронно-микроскопический анализ миокарда правого предсердия	36
2.3. Иммуногистохимический метод определения мозгового натрийуретического пептида	37
2.4. Иммуноцитохимический метод определения мозгового натрийуретического пептида	39
2.5. Структура миокарда левого желудочка на светооптическом уровне	42
2.6. Функциональные характеристики сердца крыс	43
2.7. Статистическая обработка результатов эксперимента	45
Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ	46
3.1. Структура интактного миокарда	46
3.2. Структурно-функциональные изменения миокарда и секреторная активность эндокринных кардиомиоцитов после острой гипоксии в раннем восстановительном периоде	53

3.3. Структурно-функциональные изменения миокарда и секреторная активность эндокринных кардиомиоцитов после острой гипоксии в отдаленном восстановительном периоде	62
3.4. Структурно-функциональные изменения миокарда и секреторная активность эндокринных кардиомиоцитов после острой гипоксии в восстановительном периоде с применением мексидола	67
<b>Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ</b>	<b>75</b>
4.1. Секреторная активность эндокринных кардиомиоцитов в раннем и отдаленном восстановительном периоде после острой гипоксии	75
4.2. Секреторная активность эндокринных кардиомиоцитов в раннем и отдаленном восстановительном периоде после острой гипоксии с применением мексидола	85
Выводы	91
Приложение	93
Список литературы	97

## **ВВЕДЕНИЕ**

### **Актуальность проблемы**

Эндокринная система сердца представлена секреторными кардиомиоцитами, наибольшая часть которых локализована в правом предсердии. Клетки представляют собой сократительные предсердные миоциты, содержащие большое количество секреторных гранул, в которых на сегодняшний день насчитывают около ста соединений, преимущественно белковой природы [Steiner et al., 1990]. Начиная с 1981 года, De Bold et al. были выявлены натрийуретические и диуретические свойства экстрактов предсердий, и впоследствии выделены несколько натрийуретических пептидов, реализующих эти эффекты в организме при помощи специфических рецепторов, расположенных на мембране клеток-мишеней. Затем были открыты такие свойства сердечных гормонов, как ингибирование клеточной пролиферации [Richards, 2007], участие в иммунных и воспалительных реакциях, влияние на процессы опухолевого роста, регуляция активации стволовых клеток и роста сосудов [Abdelalim, Tooyama, 2011, Yang, et al., 2015] и др.

В клинической практике широкое распространение, в качестве маркеров сердечно-сосудистых заболеваний, получили предсердный (ПНП) и мозговой (МНП) натрийуретические пептиды. ПНП и МНП применяют при диагностике инфаркта миокарда, ишемии миокарда, аритмии, острой декомпенсированной сердечной недостаточности, атеросклероза [Voulteenahe et al., 2005, Tang, 2007, Xin et al., 2013, Levine et al., 2014]. МНП считается более значимым маркером, поскольку он точнее отражает нагрузку на миокард [Hall, 2001] и дольше циркулирует в крови, чем ПНП [Buckley et al., 1998]. В связи с чем, изучение мозгового натрийуретического пептида является актуальной проблемой [Ogawa, de Bold, 2014].

Работы, посвященные МНП, содержат противоречивые сведения о сроках и механизмах активации его накопления и выведения [Ramos et al., 2009, Ogawa, de Bold, 2014]. Главным образом оценивается изменение

суммарной плазменной концентрации пептида, вклад в которую вносят различные источники его образования [Tsuruda et al., 2002, Jarai et al., 2009, De Bold A.J., 2011, Ogawa, De Bold, 2014]. Принято считать, что основным депо МНП являются желудочки сердца, однако морфологически оценить содержание в них сердечного гормона не представляется возможным, так как он содержится в диффузном состоянии. В кардиомиоцитах предсердий МНП содержится в секреторных гранулах нескольких типов, количественный анализ которых позволяет оценить изменение продукции пептида [Steiner et al., 1990].

В развитии сердечной патологии основная роль принадлежит левому желудочку [Солейко, Кактурский, 2013], поэтому для оценки структурно-функциональных изменений миокарда вентрикулярный отдел сердца наиболее информативен [Пауков, Гавриш, 2015]. В связи с этим, исследование морфологических изменений миокарда левого желудочка при количественном анализе иммуномеченных гранул с МНП миоцитов правого предсердия в восстановительном периоде после острой гипоксии, является актуальным.

В отечественной клинической практике при ишемической болезни сердца, остром инфаркте миокарда, последствиях черепно-мозговых травм широко применяется антигипоксанта метаболитического типа - "Мексидол" (2-этил-6-метил-3-гидрокси-1,2,4-пиридина сукцинат), обладающий мембранопротекторным эффектом и положительно влияющий на миокард в условиях восстановительного периода [Лукьянова и др., 1990, Чернобаева и др., 1991, Гацура и др., 1996, Андреева, 2009]. Использованию препарата при сердечно-сосудистых заболеваниях посвящено множество работ [Баженова и др., 2006, Булахова, 2006], однако исследований воздействия его на эндокринный аппарат сердца в литературе не встречается. Таким образом, изучение влияния данного антигипоксанта на секреторные кардиомиоциты при структурных перестройках миокарда в восстановительном периоде после острой гипоксии, является актуальной задачей.

По данным литературы известна роль натрийуретических пептидов в регуляции сердечного ритма и электрофизиологических параметров сердца [Moghtadaei, 2015]. В частности, исследуется воздействие МНП на ритмогенез, посредством регуляции кальциевого обмена в саркоплазматическом ретикулуме у крыс с сердечной недостаточностью [Moltzau et al., 2014, Qvigstad et al., 2010]. Синтетические аналоги МНП, такие как несеретид, считаются перспективными в качестве антиаритмогенных агентов при сердечной недостаточности [Potter et al., 2006, Moghtadaei, 2016]. Вместе с этим данные о взаимосвязи сердечного ритма и натрийуретических пептидов противоречивы, поскольку сильно зависят от объекта и модели эксперимента [Moghtadaei, 2016]. Осуществление физиологического контроля в настоящей работе, путем оценки вариабельности сердечного ритма, является необходимым для наиболее точной интерпретации полученных результатов о продукции МНП в эндокринных кардиомиоцитах правого предсердия.

### **Цель исследования**

Изучить секреторную активность эндокринных кардиомиоцитов правого предсердия, продуцирующих мозговой натрийуретический пептид, и структурные изменения миокарда у крыс после острой гипоксии и при введении мексидола.

### **Задачи исследования**

1. Исследовать продукцию мозгового натрийуретического пептида секреторными кардиомиоцитами с помощью количественного анализа иммуномеченных гранул, содержащих пептид, и структурные изменения в миокарде в раннем восстановительном периоде (5 и 60 минут после острой гипоксии).

2. Исследовать продукцию мозгового натрийуретического пептида секреторными кардиомиоцитами с помощью количественного анализа иммуномеченных гранул, содержащих пептид, и структурные изменения в

миокарде в отдаленном восстановительном периоде (60 суток после острой гипоксии).

3. Провести оценку вегетативной регуляции сердечной деятельности с помощью анализа вариабельности сердечного ритма после острой гипоксии в раннем и отдаленном восстановительном периоде.

4. Оценить влияние мексидола на секреторные кардиомиоциты, продуцирующие мозговой натрийуретический пептид, и структуру миокарда в раннем восстановительном периоде (60 минут после острой гипоксии).

5. Изучить влияние мексидола на секреторные кардиомиоциты, продуцирующие мозговой натрийуретический пептид, и структуру миокарда в отдаленном восстановительном периоде (60 суток после острой гипоксии).

### **Научная новизна**

Впервые методом подсчета иммуномеченных гранул А - и В-типов с пептидом исследована секреторная активность кардиомиоцитов, продуцирующих мозговой натрийуретический пептид, в раннем и отдаленном восстановительном периоде после острой гипоксии.

Впервые показано стимулирующее воздействие мексидола на гранулообразующую функцию кардиомиоцитов, продуцирующих мозговой натрийуретический пептид, в отдаленном восстановительном периоде.

Впервые проведена количественная оценка содержания соединительной ткани миокарда в отдаленном восстановительном периоде в группе сравнения и при введении мексидола. Показано уменьшение площади соединительной ткани миокарда при воздействии препарата.

### **Научно-практическая значимость**

Проведенное исследование вносит вклад в понимание функционирования секреторных кардиомиоцитов, вырабатывающих мозговой натрийуретический пептид в условиях постгипоксических осложнений. Полученные данные о стимулирующем действии мексидола на продукцию

мозгового натрийуретического пептида, раскрывают возможный путь воздействия препарата на восстановление функции сердца. Результаты исследования внедрены в учебный процесс кафедр: гистологии с цитологией и эмбриологией, нормальной анатомии Нижегородской государственной медицинской академии в теме: «Сердечно-сосудистая система».

### **Методология и методы диссертационного исследования**

В работе использован комплексный подход для оценки структурно-функционального состояния миокарда в условиях восстановительного периода. Сочетание световой микроскопии с применением различных гистологических методов окраски ткани и трансмиссионной электронной микроскопии позволило всесторонне исследовать структурные изменения в миокарде правого предсердия и левого желудочка в раннем и отдаленном восстановительном периоде после острой гипоксии. Использование иммуноцитохимического определения мозгового натрийуретического пептида (МНП) в секреторных гранулах предсердных кардиомиоцитов дало возможность количественно оценить продукцию МНП в раннем и отдаленном восстановительном периоде. Применение мексидола позволило исследовать влияние антигипоксанта на эндокринный аппарат сердца в условиях восстановительного периода.

Эксперименты выполнены в соответствии с требованиями "Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей" на 82-х аутбредных крысах-самцах, массой 200-250г, распределенных на 3 серии: интактные животные, ранний ВП, отдаленный ВП.

Для изучения морфологических изменений миокарда и продукции мозгового натрийуретического пептида в восстановительном периоде использовали методику клинической смерти и постренимационной болезни у крыс, путем 10-тиминутного пережатия сосудистого пучка сердца [Корпачев и др., 1982]. Анализ ультраструктуры миокарда правого предсердия проводили с

использованием электронного микроскопа Morgagni 268D. Оценку продукции МНП осуществляли методом количественного подсчета иммуномеченных секреторных гранул с пептидом в эндокринных кардиомиоцитах в полях зрения 38x38 мкм. Для специфического определения пептида в гранулах применяли поликлональные антитела к МНП (Rabbit anti-Brain Natriuretic Peptide-32 (Rat) Serum, Peninsula Lab. Inc., Bachem) и вторичные антитела, конъюгированные с коллоидным золотом (Protein-A/Gold, 15 nm, EM Grade, Electron Microscopy Sciences). Для оценки структурно-функционального состояния миокарда в отдаленном постреперфузионном периоде исследовался миокард левого желудочка, окрашенный гематоксилином и эозином и пикрофуксином по Ван Гизону. Морфометрически оценивали площадь соединительной ткани на микрофотографиях, в полях зрения 2560x1920 мкм на микроскопе Eclipse 80i.

Для изучения влияния антигипоксантов на структуру миокарда и продукцию МНП после острой гипоксии использовали мексидол. Препарат вводился экспериментальным животным внутрибрюшинно в течение первого часа восстановительного периода в дозе 25 мг/кг каждые 20 минут (3-хратно).

Влияние регуляторных систем организма на работу сердца интактных и экспериментальных животных оценивали с помощью анализа variability сердечного ритма.

Результаты экспериментов оценивали с помощью критериев Манна-Уитни и Уилкоксона с использованием программных пакетов Microsoft Office Excel 2007 и Statistica 10.0.

### **Положения, выносимые на защиту**

1. После острой гипоксии в отдаленном восстановительном периоде усиливается продукция мозгового натрийуретического пептида при ультраструктурных изменениях в эндокринных кардиомиоцитах.

Деструктивные процессы в миокарде сопровождаются увеличением содержания соединительной ткани.

2. Мексидол, введенный в течение первого часа после острой гипоксии, оказывает пролонгированное стимулирующее действие на секреторные кардиомиоциты, увеличивая продукцию мозгового натрийуретического пептида, способствует сохранности ультраструктуры клеток и уменьшению содержания соединительной ткани в миокарде.

### **Степень достоверности и апробация результатов исследования**

В работе применены современные методы, соответствующие мировому уровню, (гистологические, электронно-микроскопические, иммуноцитохимические), позволяющие эффективно решать поставленные в настоящем исследовании задачи. Достоверность полученных данных подтверждается морфометрическими и адекватными статистическими методами. Использовалась современная аппаратная и программная база.

Результаты настоящего исследования в полном объеме отражены в научных публикациях и представлены на X научной сессии молодых ученых и студентов «Современное решение актуальных научных проблем в медицине» (Нижний Новгород, 2011), IV Международном молодежном медицинском конгрессе «Санкт-Петербургские научные чтения – 2011», XV Юбилейной Всероссийской конференции «Человек и его здоровье» (Санкт-Петербург, 2012), Всероссийской научной студенческой конференции, посвященной году Российской истории и 45-летию Чувашского государственного университета имени И.Н. Ульянова (Чебоксары, 2012), XI Конгрессе Международной ассоциации морфологов (Самара, 2012), Всероссийской XII научной сессии молодых ученых и студентов с международным участием «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Нижний Новгород, 2013), II Всероссийской XIII межрегиональной научной сессии молодых ученых и студентов с международным участием «Современные решения актуальных научных проблем в медицине» (Нижний Новгород, 2015).

По материалам диссертации опубликовано 15 научных работ, из них 5 статей в рецензируемых научных изданиях, входящих в перечень ВАК.

### **Соответствие диссертации паспорту научной специальности**

Диссертация соответствует научной специальности 03.03.04 клеточная биология, цитология, гистология и области исследования согласно пункту 1 и 5.

### **Личный вклад автора**

Автором настоящей работы были осуществлены: поиск литературы по теме диссертационного исследования, планирование основных этапов работы, подбор животных для эксперимента, все этапы эксперимента с реализацией использованных методик исследования. Самостоятельно получен экспериментальный материал, проведены все этапы его подготовки и обработки, получены первичные данные, собраны и проанализированы статистические данные, осуществлен итоговый анализ, трактовка полученных результатов, сформулированы выводы. Результаты работы представлены на научных конференциях, подготовлены публикации.

### **Структура и объем работы**

Диссертация, общим объемом 117 страниц машинописного текста, состоит из введения, обзора литературы, материалов и методов, результатов собственных исследований, обсуждения результатов исследований, выводов, приложения и списка литературы. Работа содержит 27 иллюстраций, 12 гистограмм, 3 графика и 7 таблиц. Список литературы состоит из 181-го источника, из которых 99 отечественных авторов и 82 зарубежных.

## **Глава 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ**

### **1.1. Морфофункциональные изменения миокарда в условиях гипоксии и в восстановительном периоде**

### **1.1.1. Компенсаторно-приспособительные реакции миокарда при остановке кровообращения**

В норме, основным энергетическим субстратом для работы кардиомиоцитов являются жирные кислоты, хотя в миокарде используется также глюкоза, лактат, пируват, кетоновые тела. В результате окислительного фосфорилирования образуются АТФ и креатинфосфат, которые необходимы для проведения возбуждения в миокарде, сокращения миофибрилл и других внутриклеточных процессов. Практически весь кислород идет на образование АТФ. Собственный запас кислорода миокарда обеспечивает 3-7 сердечных сокращений, поэтому при нарушении оксигенации миокарда сердце перестает сокращаться в течение 1-2 минут [Румянцев, 1982, Чернух и др., 1984, Мусил, 1985, Сперелакис, Форбс, 1990].

Во время клинической смерти наблюдается неравномерное кровенаполнение и дистония сосудов сердца, набухание эндотелия, базальной мембраны, периваскулярный отек [Долгих и др., 2005]. Недостаток кислорода, при остановке кровотока в первые секунды, вызывает метаболические нарушения в миокарде [Khaliulin et al., 2004]. Происходит разобщение окисления и фосфорилирования, нарушается система  $\beta$ -окисления жирных кислот, прекращается синтез АТФ, активируется гликолиз, эффективность которого поддерживает структуру клетки, но не обеспечивает сокращений сердечной мышцы [Чеснокова, 2004; Мохова, Хайлова, 2005]. Снижение содержания АТФ и изменение оптимального клеточного рН ведёт к деполяризации мембраны клетки. Вследствие этого идёт накопление  $\text{Ca}^{2+}$  в цитозоле, в дальнейшем приводящее к деструкции мембран и гибели клетки. Нарушения мембран начинаются задолго до проявления признаков необратимости повреждений [Неговский и др., 1987, Лебкова, 1991, Гуревич, 1992, Дьячук, 1992, Фомин, Белоусов, 1992, Постнов, 2001, Чеснокова, 2004]. Доказано также, что в ишемизированной ткани, несмотря на снижение содержания кислорода, происходит активация процесса перекисного окисления липидов (ПОЛ), дополнительно способствующего повреждению

мембранных структур в клетках. В кардиомиоцитах происходят дистрофические изменения, носящие очаговый характер. Сарколемма сохраняет двухконтурное строение, в саркоплазме выявляется умеренное количество рибосом и гранул гликогена, встречающихся под сарколеммой, вокруг митохондрий и между миофиламентами. Наблюдается умеренное набухание митохондрий. В матриксе некоторых митохондрий обнаруживаются фосфаты кальция в виде электронноплотных включений. Миофибриллы имеют различную длину, в участках релаксации миофибрилл I диски разрыхлены и принимают извитую форму [Долгих и др., 2005].

При длительном отсутствии притока крови к миокарду, в ядрах кардиомиоцитов не обнаруживаются ядрышки, конденсация диффузного хроматина ведёт к снижению репликативной активности ядра, перинуклеарное пространство обводняется, вплоть до разрывов нуклеолеммы. Изменения митохондрий выражаются набуханием, нарушением ориентации крист и их последующей деструкцией; просветлением и вакуолизацией матрикса, нарушением целостности внешней мембраны [Мульдьяров, 1979, Саркисов, 1987, Постнов Ю.В., 2001, Пресняков и др., 2002, Stanley, 2004]. Нарушается сократимость миофибрилл: саркомеры пересокращаются и теряют структуру; расширяются межфибриллярные пространства. Наблюдается и внутриклеточный отёк, выражающийся в просветлении саркоплазмы, с коагуляцией её белков и появлением вакуолей. Обводняется саркоплазматический ретикулум (СПР), увеличивается объём и количество лизосом, уменьшается количество гранул гликогена и количество рибосом.

В эндокринных кардиомиоцитах также наблюдается фрагментация цистерн комплекса Гольджи. В условиях длительной остановки кровообращения миокарда, он представлен, в основном, несколькими светлыми вакуолями и пузырьками с электронно-прозрачным содержимым, теряется правильная ориентация его фрагментов, секреторная активность клеток в этих условиях значительно или полностью заторможена [Коростышевская, Максимов, 1989].

Таким образом, при остановке кровообращения основными изменениями в кардиомиоцитах являются повреждение мембранных органелл клеток, вплоть до полного их разрушения, на фоне дефицита энергетических субстратов. Все синтетические процессы в кардиомиоцитах прекращаются.

### **1.1.2. Структурно-функциональные изменения миокарда в раннем восстановительном периоде**

По данным литературы, в раннем восстановительном периоде, изменения в сосудистом русле миокарда выражаются в увеличении сосудистой дистонии. Выявляется расширение сосудов всех калибров при их интенсивном кровенаполнении. Увеличивается периваскулярный отек. Более отчетливым становится набухание эндотелия и сосудистой стенки [Долгих и др., 2005].

К структурным проявлениям постреанимационных изменений кардиомиоцитов относятся изменения вставочных дисков, что, по мнению ряда исследователей, можно отнести к способности сердца заживлять повреждение [Сперелакис, Форбс, 1990]. Эта реакция обусловлена разобщением клеток вследствие увеличения сопротивления нексусов [Полунин, Митрохина, 1985]. Повреждение нексусов, в результате остановки притока крови к миокарду, предотвращает утечку содержимого нормальных клеток через нексус в поврежденную клетку и далее в межклеточный матрикс, что препятствует распространению повреждения среди кардиомиоцитов [Сперелакис, Форбс, 1990].

Реакции адаптации на уровне ультраструктур развиваются почти одновременно с деструкцией органелл клетки [Заржецкий и др., 2003]. Наибольшей морфологической изменчивостью, носящей адаптивный характер, обладают митохондрии. Их умеренное набухание является ответом на недостаточное образование АТФ вследствие разобщения процессов окисления и фосфорилирования. Однако набухание митохондрии способствует увеличению ее функции до тех пор, пока не нарушены

предельно допустимые пространственные взаимоотношения ее структурных элементов [Сперелакис, Форбс, 1990].

Среди изменений ядер кардиомиоцитов отмечается увеличение их площади за счет образования множественных выпячиваний и повышение концентрации хроматина. При этом, иногда наблюдается расширение ядерных пор, и выход через них хроматина в саркоплазму. Также, несколько увеличиваются размеры ядрышек, и возрастает их электронная плотность [Саркисов, 1987].

Среди постреперфузионных адаптаций миокарда выявлена гипертрофия кардиомиоцитов, возникающая за счет гиперплазии миофибрилл [Пресняков и др., 2002]. В результате гиперфункции кардиомиоцитов, направленной на интенсификацию работы сердечной мышцы, в условиях необходимости скорейшего восстановления кровообращения, происходит набухание и расширение канальцев Т-системы. Это может отражать более интенсивное прохождение нервного импульса к сократительным структурам и митохондриям. Расширение канальцев СПР способствует усилению обмена кальция и выведению из клетки продуктов метаболизма, а также разрушенных внутриклеточных структур, освобождая ее тем самым от балластных веществ и уменьшая степень дистрофических изменений клетки. Увеличение количества первичных и вторичных лизосом также направлено на освобождение клетки от разрушенных внутриклеточных структур [Сперелакис, Форбс, 1990].

При гиперфункции клеток, в саркоплазме уменьшается количество гранул гликогена, который обнаруживается преимущественно около митохондрий. Одновременно увеличивается количество липидных включений, причем соотношение гликогена и липидов находится в обратно пропорциональной зависимости. Вероятно, появление жира в условиях уменьшения гликогена, является реакцией, направленной на компенсацию дефицита энергетических субстратов. Однако при недостатке кислорода липиды начинают загружать клетку, т.е. способствуют развитию

внутриклеточной жировой дистрофии [Пауков, Фролов, 1982]. К полутора часам восстановительного периода тяжесть нарушения микроциркуляции напрямую связана с глубиной структурных повреждений в кардиомиоцитах. В эти сроки отмечается большое число клеток в состоянии глыбчатого распада [Долгих и др., 2005].

Таким образом, в раннем восстановительном периоде структурные нарушения в миокарде характеризуются нарушением микроциркуляции и умеренными дистрофическими изменениями в кардиомиоцитах, которые затрагивают преимущественно органеллы синтеза, такие как митохондрии и саркоплазматический ретикулум и носят адаптивный характер.

### **1.1.3. Структурно-функциональные изменения миокарда в отдаленном восстановительном периоде**

По данным литературы, в отдаленные сроки после начала реанимации наблюдается восстановление кровообращения в миокарде. Вместе с этим, через 3 недели восстановительного периода, отмечается слабо выраженный периваскулярный кардиосклероз. В миокарде авторы отмечают восстановление ультраструктуры кардиомиоцитов, увеличение содержания гликогена в саркоплазме, сохранность большинства митохондрий, располагающихся преимущественно в виде многорядных скоплений между миофибриллами. В некоторых митохондриях выявляется гомогенизация крист и встречаются остаточные тельца. Происходит постепенное восстановление канальцев Т-системы, миофибриллы релаксированы лишь в отдельных участках [Долгих и др., 2005]. Более отдаленные сроки восстановительного периода изучались в основном с физиологических и биохимических позиций. По данным таких исследований, отдаленный восстановительный период характеризуется, в основном, утяжелением метаболических нарушений, возникающих во время остановки кровообращения и на ранних этапах его возобновления. Вследствие, сохраняющихся в этот период, затруднений с доставкой кислорода (нарушение микроциркуляции) и нарушений цепи

дыхательных катализаторов, сохраняются условия для продолжения гликолитического пути получения энергии, наряду с использованием окислительного пути. При этом гликолиз, способствуя расходу запасов гликогена, приводит к его истощению, как энергетического субстрата [Кулагин, 1978, Kinney et al., 1970, Drucker, 1971, Yajima, Ui, 1975]. Возрастание потребности в энергии в раннем восстановительном периоде, и истощение запасов гликогена, как энергетического субстрата, приводит к усилению липолиза, который становится еще более выражен в отдаленном восстановительном периоде [Хачатрян, 1980]. Липолиз стимулирует поддержание высоких концентраций в плазме крови катехоламинов, глюкагона и тироксина, которые активируют тканевую липазу [Кулагин, 1978, Carlson, 1970]. Образующиеся, в результате, свободные жирные кислоты, переносятся молекулами альбумина по кровотоку, как высокоэнергетический источник энергии, поглощающийся всеми тканями, кроме нервной. Тем не менее, такое усиление липолиза провоцирует усугубление ацидоза, за счет образования в печени слишком большого количества недоокисленных кетоновых тел и ацетона [Bilenko, 1989; Litvitskiy, 2002]. Образующиеся в ходе этих процессов триглицериды и хиломикроны способны вызывать эмболию концевых сосудистых образований каплями нейтрального жира, что также ухудшает микроциркуляцию и кровоснабжение миокарда. Также, одним из негативных процессов в этот период выступает усиленный глюконеогенез, осуществляющийся за счет повышенного катаболизма белка, и, в первую очередь, за счет резервных белков печени и плазмы крови. Повышенный катаболизм приводит к накоплению гиалуронидазы и образованию полипептидов из тканевого белка, из-за чего происходит увеличение капиллярной проницаемости [Гланц, Герасимова, 1985, Zanello M. et al., 1979, Georgieff et al., 1980]. Кроме потери пластического материала, продолжается накопление кислых продуктов обмена: молочной кислоты, кетоновых тел, ацетона. Снижение pH приводит к дальнейшему повышению уровня катехоламинов крови, что стимулирует расщепление триглицеридов жировой

ткани и белков [Кулагин, 1978]. При снижении рН ниже 7 повреждаются мембраны лизосом, и высвобождающиеся протеолитические ферменты приводят к лизису клеток и гиперферментемии плазмы крови [Кожура и др., 1976, Кулагин, 1978, Taylor, 1969].

Также, важнейшим повреждающим фактором в отдаленном восстановительном периоде, на фоне развития вторичной гипоксии, в сочетании с реоксигенацией и истощением антиоксидантной системы защиты тканей, является усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ) [Suzuki, et al., 2000, Maksimovich, et al., 2005]. Перекиси липидов способны разрыхлять мембраны клеток и блокировать активность многих цитоплазматических ферментов, а также приводить к повреждению структуры митохондрий и, соответственно, нарушению их энергообразующей функции [Владимиров и др., 1976, Габибов, Карагезян, 1981, Lee P.Y. et al., 1982, Litvitskiy, 2002, Dolgikh, et al., 2005, Andreeva, et al., 2009].

Таким образом, исследования миокарда в отдаленном восстановительном периоде носят преимущественно физиологический и биохимический характер. Работы, посвященные изучению структурных изменений ткани сердца в условиях целостного организма, не затрагивают сроки более одного месяца после восстановления кровообращения. Морфологических исследований, посвященных изменению эндокринной функции сердца в отдаленном постреперфузионном периоде, нет. В связи с этим, изучение структуры миокарда, как эндокринного аппарата сердца в отдаленном восстановительном периоде, является актуальным.

## **1.2. Общая характеристика натрийуретических пептидов**

Одним из элементов контроля артериального давления (АД) является ренин–ангиотензин–альдостероновая система, основная задача которой – поддержание системного АД в норме и достаточного кровотока в таких жизненно важных органах, как головной мозг, сердце, почки, печень [Persson, 2003; Callere, Tostes, Savoia et al., 2007]. Антагонистом данной системы

является система натрийуретических пептидов (НП). Натрийуретические пептиды - это сердечные гормоны, регулирующие давление крови и объем жидкости тела. Они вызывают гипотензию благодаря натрийуретическому, диуретическому и вазодилататорному действиям. Кроме того, НП снижают концентрацию ренина и альдостерона в крови и обладают противовоспалительным потенциалом [Мартынова, Накацева, Емельянова и др., 2008; Рахчеева, Бугрова, 2010; Сеа, 2005; Daniels, Maisel, 2007]. Исследованиями последних лет было также продемонстрировано участие НП в липидном обмене и иммунном ответе [De Bold M.L. et al., 2010; Martel et al., 2010; Ogawa et al., 2005, 2008].

Все физиологические эффекты натрийуретических пептидов реализуются при помощи специфических к НП рецепторов, расположенных на клеточной мембране. Различают рецепторы трех типов: А (NPR-A), В (NPR-B) и С (NPR-C). Эти рецепторы отличаются по сродству к разным типам натрийуретических пептидов: так NPR-A активируется физиологическими концентрациями ПНП и МНП, NPR-B обладает наибольшим сродством к CNP [Valli, Gobinet, Bordenave, 1999], а NPR-C связывает все три типа пептидов и служит для удаления гормонов из кровотока [Matsukawa, Grzesik, Takahashi et al, 1999].

NPR-A и NPR-B относятся к классу гуанилатциклазных рецепторов. Они представляют собой трансмембранные белки, состоящие из внеклеточного лигандсвязывающего домена, трансмембранного домена и внутриклеточного домена [Potter, Abbey-Hosch, Dickey, 2006]. NPR-A наиболее широко представлены в эндотелиоцитах сосудов, почках и надпочечниках [Richards, 2007]. Активация рецептора NPR-A приводит к вазодилатации, диурезу, натрийурезу, подавлению синтеза альдостерона, ингибированию клеточной пролиферации [Richards, 2007]. Посредством NPR-A может регулироваться активация стволовых клеток и ангиогенез [Abdelalim, Tooyama, 2011; Yang, et al., 2015]. В свою очередь, рецепторы NPR-B преобладают в мозге, включая гипофиз, и, вероятно, принимают участие в

нейроэндокринной регуляции [Richards, 2007]. Специфическое связывание НП с рецепторами NPR-A и NPR-B приводит к повышению внутриклеточной концентрации циклического гуанозинмонофосфата (цГМФ) и активации цГМФ-зависимых каскадных реакций через которые натрийуретические пептиды реализуют свои эффекты.

### **1.3. Мозговой натрийуретический пептид (МНП)**

МНП впервые был выделен из мозга свиньи в 1988 г. [Song, Kohse, Murad, 1988]. В 1989 г. с помощью радиоиммунного анализа с применением антител, полученных для МНП, было показано, что пептид присутствует в плазме крови человека [Togashi, Hirata, Ando, et al., 1989]. В 1990 г. МНП был выделен из экстракта предсердий человека [Kambayashi, Nakao, Mukoyama, et al., 1990].

На сегодняшний день известно, что мозговой натрийуретический пептид содержится в эндокринных кардиомиоцитах предсердий и желудочков, которые отличаются друг от друга принципом хранения и секреции пептида. В кардиомиоцитах предсердий образуются секреторные гранулы, содержащие как целые молекулы предшественника пептида - проМНП, так и продукты его расщепления. Кардиомиоциты желудочков сердца в норме, напротив, не содержат секреторных гранул и продуктов расщепления проМНП. С другой стороны, имеются данные о том, что, при заболеваниях сердечно-сосудистой системы, в желудочках сердца также образуются секреторные гранулы, и присутствуют продукты расщепления проМНП. Также показано, что фибробласты сердца могут содержать МНП [Tsuruda, Voerrigter, Huntley et al., 2002], а эндотелиоциты сети коронарных артерий экспрессируют ген, несущий информацию о МНП, при коронарном атеросклерозе [Casco, Veinot, Kuroski et al, 2002].

МНП человека синтезируется в виде препрогормона (пре-проМНП), состоящего из 134 аминокислот и, после отщепления 26-ти аминокислотной сигнальной последовательности в гранулярном эндоплазматическом

ретикулуме (ЭПР), преобразуется в проМНП (108 аминокислот). Из этой формы пептида в дальнейшем образуется физиологически неактивная N-концевая часть (NT-проМНП) и биологически активная молекула МНП. Предполагают, что расщепление проМНП происходит в кардиомиоцитах в момент секреции, либо непосредственно перед секрецией, в кровотоке. Тем не менее, до конца этот вопрос не изучен. Было показано, что в плазме человека одновременно присутствуют три формы пептида: МНП, проМНП и NT-проМНП [De Lemos, McGuire, Drazner, 2003]. Считается, что расщепление молекулы проМНП до МНП и NT-проМНП осуществляется эндопротеазой фурином, поскольку при сердечной недостаточности происходит одновременное увеличение экспрессии генов фурина и МНП. [Goetze, 2004]. В ткани сердца была обнаружена и описана также другая эндопротеаза - корин. Корин является сериновой протеазой, способной проводить протеолитическое расщепление проМНП *in vitro* [Wu F. et al, 2012]. Корин содержит трансмембранный домен, поэтому считается, что расщепление молекулы проМНП происходит в момент секреции гормона через клеточную мембрану в кровотоке. Также предполагают, что в процессинге молекулы проМНП принимает участие конвертаза прогормонов-1 [Goetze, 2004].

Время полувыведения молекулы МНП из организма составляет 13-20 минут. Показано, что МНП присутствует в моче, но механизм его выведения почками до конца не ясен. В работе на овцах с сердечной недостаточностью было исследовано влияние ингибитора нейтральной эндопептидазы (НЭП), участвующей в расщеплении МНП, и блокатора рецепторов NPR-C на биологическую активность и удаление пептида из кровотока [Rademaker, Charles, Kosoglou, et al., 1997]. Установлено, что МНП расщепляется под действием протеазы меприна- $\alpha$ . Таким образом, первую стадию деградации МНП в почках осуществляет меприн- $\alpha$ , после этого пептид продолжает проявлять физиологическую активность и может еще взаимодействовать с рецептором NPR-B. Эта укороченная форма МНП является субстратом НЭП, которая производит дальнейшее расщепление МНП. Таким образом, удаление

МНП в почках является двухстадийным процессом и для его осуществления необходимо наличие двух ферментов - меприна- $\alpha$  и НЭП [Карпова и др., 2008].

Одним из основных эффектов МНП в организме считается расширение кровеносных сосудов, приводящее к уменьшению кровяного давления. Это показано в исследованиях на крысах гипертониках и у мышей с повышенной экспрессией гена МНП [Kita, et al., 1991, [Vaderheyden, et al., 2004]. Кроме того, известно, что МНП ингибирует пролиферацию гладкомышечных клеток стенки кровеносных сосудов и оказывает ингибирующее действие на симпатическую систему сердца, что также способствует гипотензии [De Lemos, et al., 2003].

В основном МНП оказывает свои эффекты на уровне почечных клубочков и канальцев. В клубочках пептид способствует расширению приносящей артериолы и одновременному сужению выносящей артериолы, что приводит к увеличению клубочковой фильтрации. В канальцах действие МНП направлено на уменьшение реабсорбции натрия, способствуя его выведению. Также, МНП подавляет синтез ренина, ангиотензина II и, как следствие, альдостерона [Jensen, et al., 1998, Vaderheyden, et al., 2004]. Уровень МНП в плазме крови увеличивается при нарушении функций сердца, почечной недостаточности, заболеваниях печени и у пациентов с различными формами вторичной гипертензии. Интерес к измерению плазменного пула мозгового натрийуретического пептида растет, а роль пептида в диагностике дисфункции сердца постоянно уточняется и дополняется. В целом, МНП рассматривается в качестве высокочувствительного индивидуального фактора риска наступления неблагоприятных, кардиоваскулярных событий [Tsutamoto et al, 1997; Koglin et al, 2001; Palazzuoli, et al., 2011]. В настоящее время МНП вызывает большой интерес у исследователей в связи с его высокой прогностической значимостью в клинической практике как эффективного маркера инфаркта миокарда, острой декомпенсированной сердечной недостаточности, атеросклероза, ишемии, аритмии [Voulteenho et al.,

2005; Tang, 2009; Levine et al., 2014; Xin et al., 2014]. МНП имеет большой потенциал в качестве компонента комплексной терапии заболеваний, сопровождающихся повышением АД [Lee et al., 2009; Hu et al., 2014]. Следует отметить, что данные литературы о реакциях МНП при заболеваниях сердечно-сосудистой системы противоречивы и часто не согласуются в вопросах изменения метаболизма пептида на различных сроках их течения [Ramos et al., 2009; Ogawa, de Bold, 2014]. Кроме того, большинство исследователей уделяют внимание изменению концентрации МНП в плазме крови и не оценивают продукцию пептида в организме различными источниками. Исследований, посвященных образованию МНП в правом предсердии, вносящим значительный вклад в формирование плазменной концентрации пептида, в доступной литературе не встречается.

На основании приведенных литературных данных можно сделать вывод, что мозговой натрийуретический пептид, измеряемый в плазме крови, является ценным маркером и прогностическим агентом в клинической практике и поэтому широко исследуется с биохимических позиций. Вместе с этим, сведения о сроках и механизмах активации накопления и выведения МНП противоречивы [Ramos et al., 2009, Ogawa, de Bold, 2014], что связано с аккумуляцией и выбросом МНП сразу несколькими источниками [Tsuruda et al., 2002, Jarai et al., 2009]. Количественная оценка продукции пептида одним из источников МНП в организме - эндокринными кардиомиоцитами - не проводилась. Морфологических работ, посвященных исследованию взаимосвязи структурных изменений в миокарде с его эндокринной функцией, при сердечно-сосудистых нарушениях, нет. В связи с этим, изучение продукции МНП в кардиомиоцитах правого предсердия в восстановительном периоде является актуальной задачей.

#### **1.4. Мексидол (2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина сукцинат)**

В начале 1980-х гг. в ГУ НИИ Фармакологии РАМН Смирнов Л.Д. и Кузьмин В.И. синтезировали сукцинат 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина

(мексидол). Позднее были выявлены его фармакологические эффекты, проведено изучение механизмов действия, выполнены доклинические исследования, клинические испытания и осуществлено внедрение препарата в медицинскую практику [Воронина, 2009]. Мексидол - препарат, имеющий поликомпонентный спектр фармакологических эффектов и обладающий многофакторным механизмом действия. Наиболее важными сторонами действия мексидола являются его антиоксидантные, мембранотропные эффекты, способность модулировать функционирование рецепторов, мембраносвязанных ферментов и восстанавливать нейромедиаторный баланс [Воронина, 1998, Дюмаев, 1995, Воронина, 2001]. Препарат оказывает противогипоксическое, противоишемическое, кардиопротекторное, нейропротекторное, ноотропное, вегетотропное, анксиолитическое, противосудорожное, антистрессорное действие и другие эффекты.

Мексидол широко применяется для коррекции гипоксических состояний при неотложной медицине [Смирнов А.В., Криворучко, 1998, Лукьянова, 1999, Воронина, 2002, Федин, 2002, Воронина и др., 2002, Журздина, Медведева, 2004]. Препарат, как антигипоксиксанта метаболитического типа действия, способен оказывать свои эффекты на уровне клеток [Биленко, 1989, Смирнов А.В., Криворучко, 1998, Lukacova, et al., 1998, De Wind, et al., 2001, Литвицкий, 2002, Лукьянова, 2004, Зинчук, 2005, Андреева, 2009, Лукьянова, 2011]. Поскольку при гипоксии повреждению в первую очередь подвергаются биологические мембраны, изменяются и главные функции мембран: барьерная, рецепторная, каталитическая [Биленко, 1989]. Для устранения патологических изменений в органах, возникающих при критических состояниях организма, а также для предотвращения развития постреанимационной патологии, возникающей вследствие вторичной гипоксии и реоксигенации, необходимо обеспечить раннюю коррекцию энергетического обмена и восстановление гомеостаза клеточных и субклеточных мембран [Неговский и др., 1987, Лукьянчук, Савченкова, 1998, Андреева, 2009].

Протекторный эффект мексидола при патологических состояниях обусловлен антиоксидантной активностью 3-оксипиридинов [Клебанов и др., 2001, Тиликеева, Воронина, 1987] и антигипоксическим свойством янтарной кислоты (ЯК) [Мутускина, Заржецкий, Трубина, Аврущенко, 1996, Кондрашова, 1997, Андреева, 2009]. Изучение фармакокинетики 2-этил-6-метил-3-гидроксипиридина показало [Жердеев, 1986], что при внутрибрюшинном введении крысам он быстро всасывается из брюшной полости, а максимальная концентрация его в плазме крови, печени и мозге отмечается через 2–3 ч. При этом, более медленное выведение препарата из мембран эндоплазматического ретикулума (ЭПР), по сравнению с выведением из цитозоля (24 ч), свидетельствует, по мнению ряда авторов [Жердеев, 1986], о его мембранотропности [Андреева, 2009].

Изучались противоишемические свойства оксипиридинов [Тиликеева, Воронина, 1987, Вальдман, 1985, Меерсон, 1984]. При исследовании влияния предварительно введенного хлоргидрата 2-этил-6-метил-3-оксипиридина на резистентность изолированного сердца крыс к гипоксии и реоксигенации установлено, что данный препарат предупреждал развитие гипоксической контрактуры миокарда и выход креатинфосфокиназы [Меерсон, 1984]. По мнению авторов [Тиликеева, Воронина, 1987, Смирнов, Дюмаев, 1982, Меерсон, 1984], защитное действие оксипиридинов обусловлено их способностью подавлять процессы перекисного окисления липидов, а также, в силу структурной близости к витаминам группы B6, оказывать влияние на ряд ферментных систем [Смирнов, Дюмаев, 1982, Андреева, 2009].

Таким образом, мембранопротекторное действие производных 3-оксипиридинов обусловлено как прямым модифицирующим действием на физико-химическую характеристику липидного компонента мембран, так и подавлением процессов ПОЛ, что снижает деструктивное влияние свободных радикалов на биологические мембраны клеток [Андреева, 2009].

Другим компонентом мексидола, определяющим эффективность действия данного препарата при различных кислородзависимых патологиях, является янтарная кислота [Чернобаева и др., 1991, Лукьянова, 1990, Андреева, 2009]. На сегодняшний день [Лукьянова, 2004, Лукьянова, 1999, Оковитый, Смирнов, 2001], при решении вопроса о защите организма от гипоксии, основной проблемой является коррекция функции митохондрий и устранение или предупреждение нарушений аэробного энергетического обмена [Андреева, 2009].

Возобновление нормального функционирования дыхательной цепи на ранних стадиях гипоксии должно выражаться в восстановлении электронтранспортной и сопрягающей функции ее NAD-зависимого участка; либо в виде активации альтернативных NADH-оксидазному пути компенсаторных метаболических потоков, обеспечивающих поступление электронов на цитохромный участок и поддерживающих его способность к синтезу энергии в клетке [Лукьянова, 1999, Лукьянова, 2002]. Роль сукцинатаксидазного пути при срочной компенсации дефицита энергии в клетке на ранних стадиях гипоксии широко освещена в литературе [Лукьянова, 2004, Васин, Королева, 2001, Маевский и др., 1997]. При этом процесс окисления сукцината представляется одним из основных механизмов повышения резистентности клетки к гипоксии [Лукьянова, 1999, Маевский, 2000]. Противогипоксическое действие сукцината достоверно продемонстрировано как на экспериментальных животных, так и при клинических исследованиях [Маевский и др., 1997, Заржецкий, Мутускина, 1994, Мутускина и др., 1996, Погорелый, Гаевый, 1997, Кондрашова, 1996]. По мнению авторов [Кондрашова, 1997, Плотникова и др., 1997], усилению такого действия способствует наличие антиоксидантных свойств у янтарной кислоты. Она способна обеспечить ресинтез фосфолипидов и снижать благодаря этому ионную проницаемость мембран и выход калия из митохондрий по градиенту концентрации [Кондрашова, 1996]. Сукцинат принимает активное участие в регуляции кальциевого обмена, обладает

катехоламиниметическими, антиатерогенными, антихолестериногенными свойствами [Кондрашова, 1996, Андреева, 2009].

Таким образом, янтарная кислота и её производные положительно влияют на протекание энергетических процессов в клетке, запускают множество опосредованных, вторичных метаболических путей и играют роль модулятора общего метаболизма организма [Лукьянова, 1999, Маевский, 2000, Заржецкий, Мутускина, 1994]. Тем не менее, экзогенная ЯК обладает низкой проницаемостью через гистогематические барьеры, что снижает её эффективность при гипоксических состояниях [Лукьянова, 1999, Заржецкий, Мутускина, 1994, Кондрашова, 1996]. Проницаемость сукцината значительно усиливается при её внедрении в структуру различных производных 3-оксипиридина [Лукьянова, 1999, Лукьянова и др., 1990]. Мексидол, как и все производные 3-оксипиридина, повышает лабильность биологических мембран, облегчая тем самым транспорт веществ в клетку, способствует активации сукцинатоксидазного пути окисления, а также увеличению мембранного потенциала митохондрий [Лукьянова, 1999, Лукьянова и др., 1990].

Антигипоксические эффекты мексидола были продемонстрированы с использованием различных экспериментальных моделей [Чернобаева и др., 1991, Лукьянова и др., 1990]: острое нарушение мозгового кровообращения у белых мышей [Столярова, 2001], инфаркт миокарда у крыс [Гацура и др., 1996], на моделях изолированного сокращающегося сердца в условиях гипоксии средней тяжести (снижение O<sub>2</sub> в перфузате на 50%) с последующей реоксигенацией [Чернобаева и др., 1991], модели клинической смерти с последующей реперфузией [Андреева и др., 2005]. Отмечается благоприятное влияние ЭС на кровоснабжение ишемизированного участка миокарда в течение 45 мин. после нарушения коронарного кровотока у крыс [Гацура и др., 1996, Андреева, 2009] и его способность корректировать аэробный энергетический обмен в ишемизированном миокарде [Лукьянова и др., 1990]. При гипоксии мозга мексидол, согласно сведениям, имеющимся в литературе

[Воронина, 2002, Федин и др., 2002, Миронов, 2002, Левитина, 2001], оказывал вазопротекторное действие, что выражалось в способности улучшать мозговой кровоток и микроциркуляцию, ингибировать агрегацию тромбоцитов.

Таким образом, экспериментальные данные и клинические результаты позволяют заключить, что применение мексидола при гипоксических состояниях способствует повышению устойчивости организма к дефициту кислорода, сохранению структуры клеток и снижает риск развития постишемических нарушений. Несмотря на это, влияние мексидола на сердце как эндокринный орган [Ogawa, De Bold, 2014] при сердечно-сосудистых заболеваниях не исследовалось. Учитывая широкий спектр протекторных и метаболических эффектов препарата в условиях восстановительного периода, после острой гипоксии, представляет интерес исследование его воздействия на структуру миокарда правого предсердия и продукцию МНП эндокринными кардиомиоцитами в этих условиях.

### **1.5. Анализ вариабельности сердечного ритма как показателя функционального состояния организма**

Анализ вариабельности сердечного ритма (ВСР) является высокоэффективным, неинвазивным методом оценки состояния механизмов, регулирующих физиологические функции в организме человека и животных. ВСР отражает как уровень общей активности регуляторных механизмов, так и степень нейрогуморальной регуляции сердца, а также регуляторный вклад симпатического и парасимпатического отделов вегетативной нервной системы. Активность симпатического и парасимпатического отделов ЦНС меняется во времени для достижения оптимального для организма приспособительного ответа и отражает адаптационную реакцию организма в целом. Адаптационные реакции индивидуальны и реализуются с разной степенью участия различных систем организма, обладающих обратной связью, которая также меняется во времени при изменении функционального статуса этих систем [Баевский, Иванов, 2001].

Метод заключается в распознавании и измерении временных промежутков между RR-интервалами (иногда NN-интервалы – «normal to normal») электрокардиограммы, построении динамических рядов кардиоинтервалов (кардиоинтервалограммы) и последующего анализа полученных числовых рядов различными математическими методами. Анализ ВСР сочетает в себе простоту получения информации и возможность извлечения большого объема данных о нейрогуморальной регуляции физиологических функций и адаптационных реакциях организма [Селье, 1960, Парин, Баевский, 1966, Анохин, 1973, Баевский, Иванов, 2001, Pagani et al, 1986, Malik, Camm, 1993].

**Спектральные методы анализа ВСР** являются одними из наиболее часто используемых методов оценки ВСР [Нидеккер, 1968]. Анализ спектральной плотности мощности колебаний позволяет оценивать распределение мощности в зависимости от частоты колебаний, количественно определять вклад различных частотных составляющих в формирование сердечного ритма и графически представлять соотношения разных его компонентов, отражающих активность определенных звеньев регуляторного механизма.

**К числу геометрических методов**, прежде всего, относится вариационная пульсометрия [Парин и др., 1967, Баевский, 1976]. Данный метод оценивает распределение кардиоинтервалов как случайных величин. Для этого строится кривая распределения кардиоинтервалов (вариационная кривая, или гистограмма) и определяются ее основные характеристики: Мо (Мода), АМо (амплитуда моды), ВАР (вариационный размах) [Баевский, Иванов, 2001].

**Статистические методы анализа ВСР** используются для непосредственной количественной оценки параметров ВСР в исследуемый

промежуток времени. Кардиоинтервалограмма рассматривается как совокупность последовательных временных промежутков – интервалов RR. К наиболее значимым статистическим характеристикам динамического ряда кардиоинтервалов являются: SDNN - Standard Deviation, CV – коэффициент вариации, TP - суммарная мощность спектра и др. [Баевский, Иванов, 2001]

Наряду с перечисленными, существуют и другие методы анализа ВСП, такие как: цифровая фильтрация, корреляционная ритмография, автокорреляционный анализ, методы нелинейной динамики и др. [Баевский, Иванов, 2001]

### **1.5.1. Оценка variability сердечного ритма при структурно-функциональных нарушениях**

Оценка variability сердечного ритма (ВСП) широко применялась в клинике при исследовании сердечно-сосудистых патологий и ряда других заболеваний. Так, например, пониженные показатели ВСП свидетельствуют о риске летального исхода и аритмических осложнений (например, симптоматической устойчивой желудочковой тахикардии) у пациентов, перенесших острый инфаркт миокарда (ИМ) [Lown, Verrier, 1976, Alexopoulos, et al., 1988]. Отличительной особенностью ВСП является отсутствие его зависимости от других факторов постинфарктного риска (пониженная фракция выброса левого желудочка, повышенная эктопическая желудочковая активность и наличие поздних желудочковых потенциалов) [Alexopoulos, et al., 1988]. Отмечается, что ВСП снижается вскоре после острого ИМ и начинает восстанавливаться в течение нескольких недель. Восстановление достигает максимума (но не возвращается к исходному уровню) через 6-12 месяцев после острого ИМ [Cerati, Schwartz, 1991, Myers, et al., 1986]. Оценка ВСП оказывается прогностически значимой как на ранней стадии острого ИМ (через 2-3 дня), так и перед выпиской из лечебного учреждения (через 1-3 недели). ВСП, оцененная позже (через 1 год после острого ИМ), также прогнозирует смертность в дальнейшем [Martin, et al.,

1986]. Результаты экспериментов на животных показали, что скорость восстановления ВСР после острого ИМ также коррелирует с риском осложнений в будущем [Fallen, et al., 1988].

Таким образом, оценка ВСР, как комплексного и независимого показателя регуляции работы сердца после острой гипоксии в разные сроки восстановительного периода, представляет особую ценность для точности интерпретации экспериментальных данных в настоящем исследовании.

## Глава 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперименты проведены в соответствии с правилами лабораторной практики на 82-х аутбредных крысах-самцах Wistar массой 200–250 г. При проведении исследований соблюдались принципы работы с животными, установленные Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и других научных целей (принятой в Страсбурге 18.03.1986 г. и подтвержденной в Страсбурге 15.06.2006 г.).

Таблица 1

**Группы экспериментальных животных, их количество и виды эксперимента.**

Методы Группа	Количество животных в эксперименте, n			
	Электронно-микроскопическое и иммуоцитохимическое исследование	Окраска по ван Гизону	Окраска гематоксилином и эозином	ВСП*
Интактные	5	5	5	12
5 минут ВП	5	0	0	12
60 минут ВП	5	0	5	12
60 суток ВП	5	5	5	12
60 минут ВП + мексидол	5	0	5	0
60 суток ВП + мексидол	5	5	5	0
<b>Общее количество животных в эксперименте - 82 крысы.</b>				
* - группа для измерения вариабельности сердечного ритма (ВСП) - одни и те же 12 крыс на всех сроках эксперимента. ВП - восстановительный период.				

Объектом исследования послужил миокард правого предсердия и левого желудочка крыс в норме и в различные сроки после острой гипоксии, вызванной тотальной остановкой кровообращения. Предметом исследования явились: 1) структурные изменения в миокарде на светооптическом уровне при окраске гематоксилином и эозином и пикрофуксином по ван Гизону, 2) ультраструктурные изменения в миокарде и продукция мозгового

натрийуретического пептида, содержащегося в гранулах секреторных кардиомиоцитов правого предсердия с использованием иммуногистохимического и иммуноцитохимического выявления МНП.

Животные были разделены на 6 групп: 1 - интактные животные, 2 - животные через 5 минут восстановительного периода, 3 - через 60 минут восстановительного периода, 4 - через 60 суток восстановительного периода, 5 - через 60 минут восстановительного периода с введением мексидола в течение первого часа после острой гипоксии в дозе 25 мг/кг каждые 20 минут (3-хкратно), 6 - через 60 суток после восстановительного периода с введением мексидола аналогично предыдущей группе в течение первого часа после острой гипоксии. Сроки восстановительного периода выбраны на основании сведений литературы о различных физиологических нарушениях в организме в данных условиях и возникающих вследствие этих нарушений факторов, способных влиять на продукцию МНП [Неговский и др., 1987, Бугрова и др., 2012, 2015]. За начало восстановительного периода принимали восстановление сердечных сокращений и дыхания крыс после острой гипоксии, моделировавшейся по методу В.Г. Корпачева. Группы экспериментальных животных представлены в таблице. Выбор мексидола в качестве антигипоксанта вызван многочисленными протекторными эффектами препарата в условиях восстановительного периода и его широкому применению в неотложной медицине [Смирнов А.В., Криворучко, 1998, Лукьянова, 1999, Воронина, 2002, Федин, 2002, Воронина и др., 2002, Журздина, Медведева, 2004]. Учитывая отсутствие в литературе данных о функционировании эндокринного аппарата сердца в восстановительном периоде и воздействии на него мексидола, выбранная схема эксперимента позволяет решать поставленные задачи в настоящей работе.

## **2.1. Моделирование острой гипоксии у крыс**

Для изучения морфологических изменений миокарда и продукции мозгового натрийуретического пептида в восстановительном периоде (ВП)

использовали методику клинической смерти и постреанимационной болезни у крыс по В.Г. Корпачеву (патент на изобретение № 958453 ГК СССР по делам изобретений и открытий) [Корпачев и др., 1982]. Наркотизацию животных осуществляли внутрибрюшинным введением барбитурата натрия в дозе 25 мг/кг. Далее проводилась интубация трахеи. Останавливали кровообращение путём полного пережатия сосудистого пучка сердца внутриторакально без вскрытия грудной клетки и без пневмоторакса в течение 10-ти минут. Сердечно-сосудистый пучок пережимали специальным Г-образным крючком, изготовленным из иглы для инъекций, в течение 3-х минут до полной остановки сердца. Крючок вводили на уровне третьего межреберья справа по парастеральной линии. Для этого концом прижимающей части крючка прокалывалась кожа, межреберные мышцы и париетальная плевра. На этом этапе держатель располагался параллельно оси позвоночника, а прижимающая часть – перпендикулярно. Затем держатель поворачивался в положение, перпендикулярное оси позвоночника. Во время этой манипуляции изгиб крючка заходил в плевральную полость. Далее крючок опускался вниз к позвоночнику до легкого упора и производился поворот держателя против часовой стрелки на  $100-110^\circ$ , а прижимающая часть зажима подводилась под сосудистый пучок сердца. На следующем этапе крючок поднимался перпендикулярно вверх, прижимая нижнюю полую и безымянные вены, легочную артерию и аорту к груди. Грудину от смещения вверх удерживали пальцем. Трахея при этом не пережималась, а кровообращение полностью прекращалось, что подтверждалось полной остановкой сердца. Через 3 мин крючок извлекался из грудной клетки в обратной последовательности, сердечные сокращения не восстанавливались, и животное продолжало находиться в состоянии клинической смерти в течение 10 минут, до начала реанимации. Реанимацию проводили с помощью наружного массажа сердца и искусственной вентиляции легких. Перед началом реанимации эндотрахеально вводили 0,1 мл 0,1% раствора адреналина. Выживаемость крыс составляла не менее 60%.

В экспериментальной группе с применением мексидола, препарат вводили животным после реанимации внутривенно каждые 20 минут в течение первого часа восстановительного периода в дозе 25 мг/кг.

Животных выводили из эксперимента по истечении 5-ти минут восстановительного периода (5 минут после восстановления кровообращения), 60-ти минут восстановительного периода и 60-ти суток восстановительного периода.

## **2.2. Электронно-микроскопический анализ миокарда правого предсердия**

Обработка миокарда проводилась по стандартной методике. В качестве фиксаторов использовали последовательно 2,5% раствор глутарового альдегида на фосфатном буфере (pH=7,4) и 1% раствор четырехоксида осмия. Материал обезвоживали в спиртах восходящей концентрации и ацетоне. Обработанную ткань заключали в смесь "эпон-аралдит" [Саркисов, Перов, 1996, Бугрова и др., 2012, 2013, 2015]. Полутонкие и ультратонкие срезы готовили на ультрамикротоме UC7 (Leica), затем окрашивали метиленовым синим и фуксином. Ультратонкие срезы контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца по методу Reynolds и исследовали в трансмиссионном электронном микроскопе Morgagni 268D (FEI). Проводили измерение общей площади агранулярного саркоплазматического ретикулума (СПР) и площади митохондрий в секреторных кардиомиоцитах правого предсердия на электронограммах (поля зрения) с использованием программного пакета AnalySIS Docu 3.2 (Soft Imaging System GmbH), поставлявшегося совместно с электронным микроскопом фирмой FEI. Разрешение электронномикроскопических фотографий, сделанных при постоянном увеличении X22000 в субсарколеммальной области кардиомиоцитов на продольных срезах составляло 1376x1032 пикселей. На электронограммах вручную обводили все митохондрии и СПР по внешней границе, после чего программа выдавала значение площади в  $\mu\text{м}^2$  для каждой митохондрии и

каждого участка СПР, которые затем автоматически суммировались, предоставляя сведения о площади, занятой митохондриями и СПР в данном поле зрения. Количество полей зрения для каждой серии эксперимента составляло не менее 150. Вычисляли среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего.

### **2.3. Иммуногистохимический метод определения мозгового натрийуретического пептида**

Для оценки продукции МНП в эндокринных кардиомиоцитах была применена методика иммуногистохимического определения пептида с последующим анализом ткани под световым микроскопом. Для иммуногистохимического исследования образцы ткани фиксировали в 10% нейтральном формалине в течение 48 часов. Фиксированный материал промывали в проточной водопроводной воде, обезвоживали в этиловом спирте восходящей концентрации и заключали в парафин [Саркисов, Перова, 1996, Петров, Райхлин, 2000]. Гистологические срезы толщиной 5-7 мкм получали на микротоме Leica SM 2000R. Восстановление антигенной активности осуществляли методом теплового демаскирования в цитратном буфере pH 6,0 (Novocastra) [Петров, Райхлин, 2000]. Для визуализации МНП использовали антитела Rabbit anti-Brain Natriuretic Peptide-32 (Rat) Serum, Peninsula Lab. Inc., Bachem. В качестве системы детекции применяли систему «Peroxidase Detection System» (Novocastra) в соответствии с рекомендациями производителя. Негативный контроль ставился путем исключения первичных антител.

Приготовление гистологических препаратов и проведение иммуногистохимической маркировки МНП на парафиновых срезах осуществляли согласно инструкции к антителам:

#### **Первый день.**

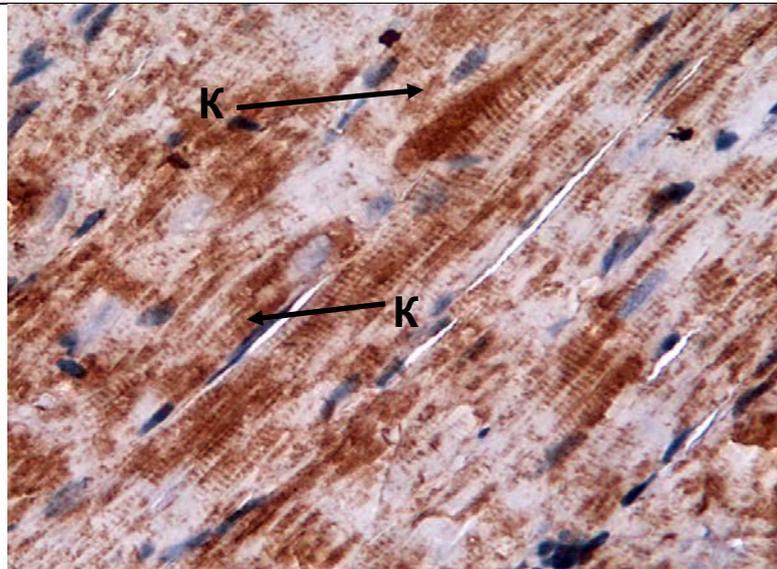
1. Депарафинирование срезов.
2. Демаскировка антигена согласно инструкции.

3. Промывка в TBS буфере (2 раза по 5 минут).
4. Инкубация срезов в течение 5-и минут с протеиновым блоком.
5. Промывка в TBS буфере (2 раза по 5 минут).
6. Инкубация срезов с оптимально разведенными первичными антителами согласно инструкции.
7. Помещение срезов во влажную камеру на 12 часов при температуре 4<sup>0</sup>С.

### **Второй день.**

1. Промывка в TBS буфере (2 раза по 5 минут).
2. Инкубация срезов с оптимально разведенными вторичными антителами согласно инструкции.
3. Промывка в TBS буфере (2 раза по 5 минут).
4. Инкубация срезов с рабочим разведением диаминобензидина (ДАБ) в течение 1-5 минут. Контроль под микроскопом согласно инструкции. Промывка дистиллированной водой в течение 5 минут.
5. Докраска срезов гематоксилином 1 минуту. Промывка в водопроводной воде до получения синей окраски.
6. Обезвоживание и просветление срезов.
7. Заключение срезов в среду Bio Mount.
8. Помещение покровного стекла на срезы.

Иммуногистохимическое маркирование МНП в кардиомиоцитах правого предсердия на парафиновых срезах - неспецифический метод, выявляющий пептид, как в гранулярной, так и в диффузной форме, что затрудняет его количественную оценку (рис. 1).



**Рис. 1.** Иммуногистохимическая реакция на МНП в кардиомиоцитах правого предсердия интактной крысы. Увеличение X400.

К - кардиомиоцит с иммунореактивной меткой к МНП

В связи с этим, в работе использована электронная иммуноцитохимия, позволившая обнаружить в кардиомиоцитах гранулы с МНП и провести количественный анализ этих структур.

#### **2.4. Иммуноцитохимический метод определения мозгового натрийуретического пептида**

Для выявления МНП в гранулах эндокринных кардиомиоцитов правого предсердия проводили иммуноцитохимические реакции на ультратонких срезах материала, заключенного в эпоксидные смолы (Мартынова и др., 2008). Срезы, помещенные на никелевые сеточки, обрабатывали 3%-й перекисью водорода в течение 20 мин для разрыхления смолы и повышения иммунореактивности ткани. Затем срезы инкубировали в растворе поликлональных антител к МНП (Rabbit anti-Brain Natriuretic Peptide-32 (Rat) Serum, Peninsula Lab. Inc., Bachem) с рабочим разведением 1:2000 в течение 1 сут. при 4 °С. В качестве вторых антител использовали белок А, конъюгированный с коллоидным золотом (диаметр частиц 15 нм) (Protein-A/Gold, 15 nm, EM Grade, Electron Microscopy Sciences) с рабочим разведением

1:20. Ультратонкие срезы контрастировали методом, описанным выше, и просматривали в электронном микроскопе Morgagni 268D фирмы FEI.

### **Проведение иммуноцитохимических реакций с антителами к МНП.**

#### **Первый день.**

1. Создание влажной камеры и камеры для  $H_2O_2$ .
2. Помещение сеток со срезами в каплю с  $H_2O_2$  на 20 минут.
3. Промывка сеток в  $H_2O$  и помещение их последовательно в 3 капли PBS (фосфатный буфер с pH 7.4) на 2 минуты в каждую.
4. Помещение сеток в каплю раствора "забивки" (0,05% Tween20, 0,5% Fish gel, PBS) на 10 минут.
5. Помещение сеток в каплю с антителами  $AT_1$  во влажной камере на 24 часа при температуре  $4^{\circ}C$ . Разведение  $AT_1$  проводили согласно инструкции для приготовления стокового раствора, который разводили в "отмывке" (0,05% Tween 20, 0,1% Fish gel, PBS) в соотношении 1:20 (суммарно с учетом всех разведений 1:2000).

#### **Второй день.**

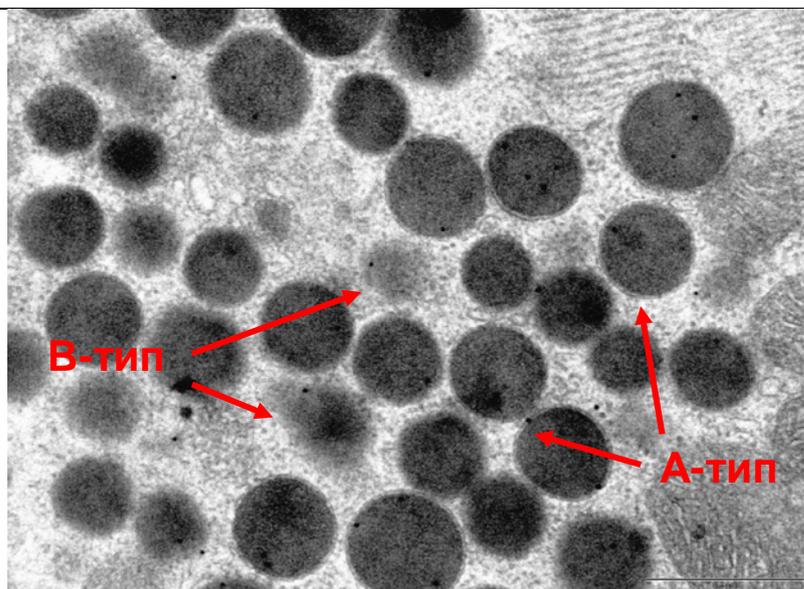
1. Приготовление влажной камеры для реакций с вторичными антителами  $AT_2$  (разведение в отмывке в соотношении 1:20).
2. Извлечение сеток с первичными антителами, приготовленных в первый день.
3. Помещение сеток последовательно в 6 капель раствора "отмывки" (0,05% Tween 20, 0,1% Fish gel, PBS) на 2 минуты в каждую.
4. Помещение сеток в раствор "забивки" на 10 минут.
5. Помещение сеток в каплю с  $AT_2$  на 1 час при комнатной температуре.
6. Помещение сеток последовательно в 6 капель раствора "отмывки" на 2 минуты в каждую.
7. Промывка сеток последовательно в 3-х каплях  $H_2O$  дист., по 20 секунд.

8. Помещение сеток на сухую фильтровальную бумагу в чашке Петри на 24 часа при комнатной температуре.

### **Третий день.**

Контрастирование срезов уранилацетатом и цитратом свинца по методу Reynolds и просмотр под электронным микроскопом.

Применяли метод подсчёта иммуномеченных гранул эндокринных КМЦ визуально на электронномикроскопических препаратах в полях зрения 38x38 мкм (размер ячейки никелевой сеточки, на которую были помещены срезы) при постоянном увеличении X8900. Количество полей зрения для каждой крысы составляло не менее 25-и (5 крыс в каждой серии эксперимента). Используя одну из принятых классификаций, различали два типа секреторных гранул - А-типа («зрелые»), имеющие четко очерченную мембрану и осмиофильное содержимое - хранящие МНП; и В-типа («растворяющиеся») с «размытой» периферией и менее электронноплотным содержимым - высвобождающие пептид (рис. 2) [Коростышевская, Максимов, 1989, Mifune et al, 1991, Твердохлеб 1996]. Выбор правого предсердия для исследования продукции МНП обусловлен наличием в предсердных кардиомиоцитах морфологически оформленных структур, содержащих пептид – секреторных гранул, что позволяет провести количественную оценку его продукции.



**Рис. 2.** Секреторные гранулы, содержащие МНП, в кардиомиоците правого предсердия интактной крысы. Увеличение X44000.

Таким образом, локализация МНП в секреторных гранулах эндокринных кардиомиоцитов правого предсердия с использованием его иммуноцитохимического определения в гранулах А- и В-типов, позволяет произвести точную количественную оценку изменения продукции пептида в эксперименте.

## **2.5. Структура миокарда левого желудочка на светооптическом уровне**

Для оценки структурно-функционального состояния миокарда в отдаленном восстановительном периоде исследовали левый желудочек, как наиболее часто используемый для анализа его морфологической картины в восстановительном периоде [Полякова и др., 1999, Соколова и др., 2002, Бугрова и др., 2013]. Структуру ткани оценивали у животных 3-х групп: 1) интактных, 2) через 60 суток ВП, 3) через 60 суток ВП с применением мексидола. Образцы ткани миокарда фиксировали в 10%-м растворе нейтрального формалина и заливали в парафин [Саркисов, Перова, 1996, Петров, Райхлин, 2000]. Срезы, толщиной 5-7 мкм, готовили на микротоме SM 2000R (Leica, Австрия). Для общей оценки структуры миокарда срезы

окрашивались гематоксилином и эозином. Для исследования доли соединительной ткани в миокарде препараты окрашивались по ван Гизону. Срезы изучали на световом микроскопе Eclipse 80i (Nikon, Япония) с применением программного пакета NIS-Elements BR 4.00.02. Определяли процентное соотношение площади, занимаемой соединительной тканью, зрелыми коллагеновыми волокнами в ее составе и кардиомиоцитами на микрофотографиях (2560x1920 пикселей в масштабе 1 пиксель - 1 микрометр при постоянном увеличении X400) с использованием масштабной сетки (одна ячейка - 70x70 пикселей, или 70x70 мкм). Общая площадь, занимаемая каждым компонентом (коллагеновыми волокнами, матриксом, кардиомиоцитами) определялась суммированием количества ячеек масштабной сетки и последующим расчетом процентного соотношения структур. Количество полей зрения для каждой серии эксперимента составляло не менее 30-и.

## **2.6. Функциональные характеристики сердца крыс**

Для оценки вариабельности сердечного ритма осуществляли снятие ЭКГ с использованием электрокардиографа «Полиспектр 12» (Нейрософт, г. Иваново) и жилета оригинальной конструкции [Дворников, 2002]. Под эфирным наркозом животных освобождали от шерстяного покрова с обеих сторон от грудины на уровне передних конечностей и у основания левой задней конечности. На участки кожи площадью 10x10 мм накладывали электроды. Снятие ЭКГ осуществляли во II-м стандартном отведении. Перед началом записи животное помещали в клетку для адаптации на 20 минут. У экспериментальных животных в раннем и отдаленном восстановительном периоде запись ЭКГ проводили после отключения искусственной вентиляции легких.

Для оценки симпатической, парасимпатической и гуморальной регуляции работы сердца интактных и экспериментальных животных, была проведена оценка вариабельности сердечного ритма (ВСР). Использовались

временные (ритмограмма и статистические показатели) и частотные (спектральный анализ) методы анализа ВСР [Селье, 1960, Парин, Баевский, 1966, Анохин, 1973, Баевский, Иванов, 2001, Pagani et al, 1986, Malik, Camm, 1993].

Кардиоинтервалография RR-интервалов позволяет отражать колебания сердечного ритма от интервала к интервалу. По оси ординат откладываются длительности кардиоинтервалов, а по оси абсцисс – числовые значения динамического ряда кардиоинтервалов. Так строится кардиоинтервалограмма (КИГ), а формирующаяся при этом кривая, которая ее огибает, называется ритмограммой (РГ).

КИГ и РГ были использованы для визуально-логического анализа сердечного ритма сердца, а также в процессах обработки и представления результатов для отображения ВСР.

В качестве статистических показателей при оценке ВСР использовались:

- $RR_{cp}$  – средний кардиоинтервал;
- $SDNN$  – стандартное отклонение временного ряда нормальных кардиоинтервалов  $NN$  ( $\sigma = \sqrt{\sum(M-RR_i)^2 / (N-1)}$ );
- $CV$  – коэффициент вариации – стандартное отклонение, нормированное на  $RR_{cp}$  ( $CV = SDNN / RR_{cp} * 100\%$ ).

В работе был использован спектральный анализ. В силу того, что любая сложная, периодически повторяющаяся кривая может быть представлена как ряд простых синусоидальных кривых, данный метод подходит для анализа повторяющихся RR-интервалов сердечного ритма. Анализ производился на основе алгоритма быстрого преобразования Фурье с использованием всех точек без сглаживания. Спектр разделялся на частотные диапазоны для крыс [Ramaekers, 1999]: LF (0,195 – 0,74 Гц), VLF (менее 0,194 Гц), HF (0,78 – 2,5 Гц). Подсчитывались спектральные показатели ВСР: суммарная мощность спектра (TP) (0 – 2,5 Гц), а также абсолютные мощности всех диапазонов спектра в  $ms^2$ .

Проводилась математическая обработка результатов анализа variability сердечного ритма. Из полученной ЭКГ с помощью программы «Rhythm-service 1.0» строилась КИГ (привязка к R-зубцу с точностью 1 мс) и проводился анализ ВСР. Для обработки использовались визуально выделенные участки КИГ длиной 300RR без артефактов.

Показатели TP, VLF, LF и HF были нормированы с помощью функции натурального логарифма и представлены в виде нормализованных единиц (н.е.).

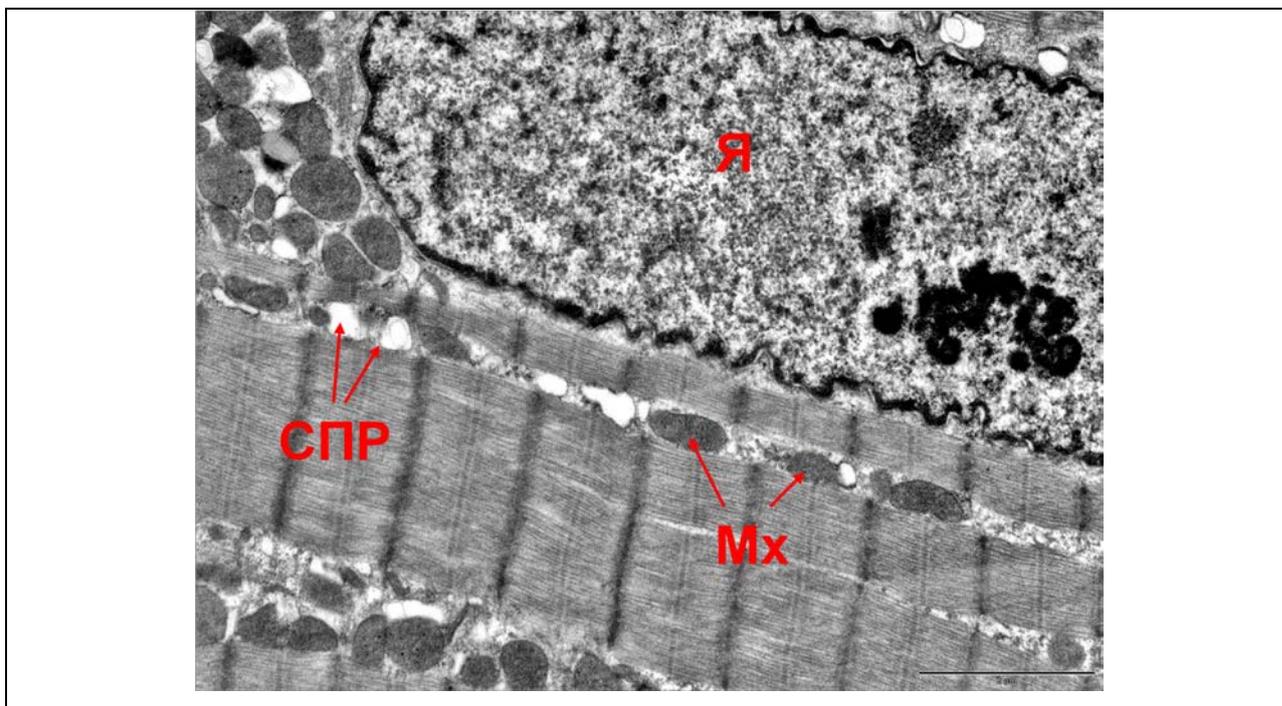
## **2.7. Статистическая обработка результатов эксперимента**

Математическую проверку распределения цифровых рядов на нормальность проводили с помощью критериев Шапиро-Уилка и Колмогорова-Смирнова в программе Statistica 10.0 и Microsoft Office Excel 2007. Данные представляли в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего. Для парных внутригруппового и межгруппового сравнения использовали критерии Манна-Уитни и Уилкоксона. Результаты считали статистически значимыми при  $p < 0,05$ . Для графического отображения различий между сравниваемыми группами использовали стандартную ошибку среднего ( $m$ ).

## Глава 3. РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

### 3.1. Структура интактного миокарда

Ультраструктурный анализ эндокринных кардиомиоцитов правого предсердия выявил следующую картину: ядра клеток овальной формы с преобладанием эухроматина, содержали 1-2 ядрышка. Кариолема большинства ядер ровная, в некоторых случаях образует небольшие складки (рис. 3).

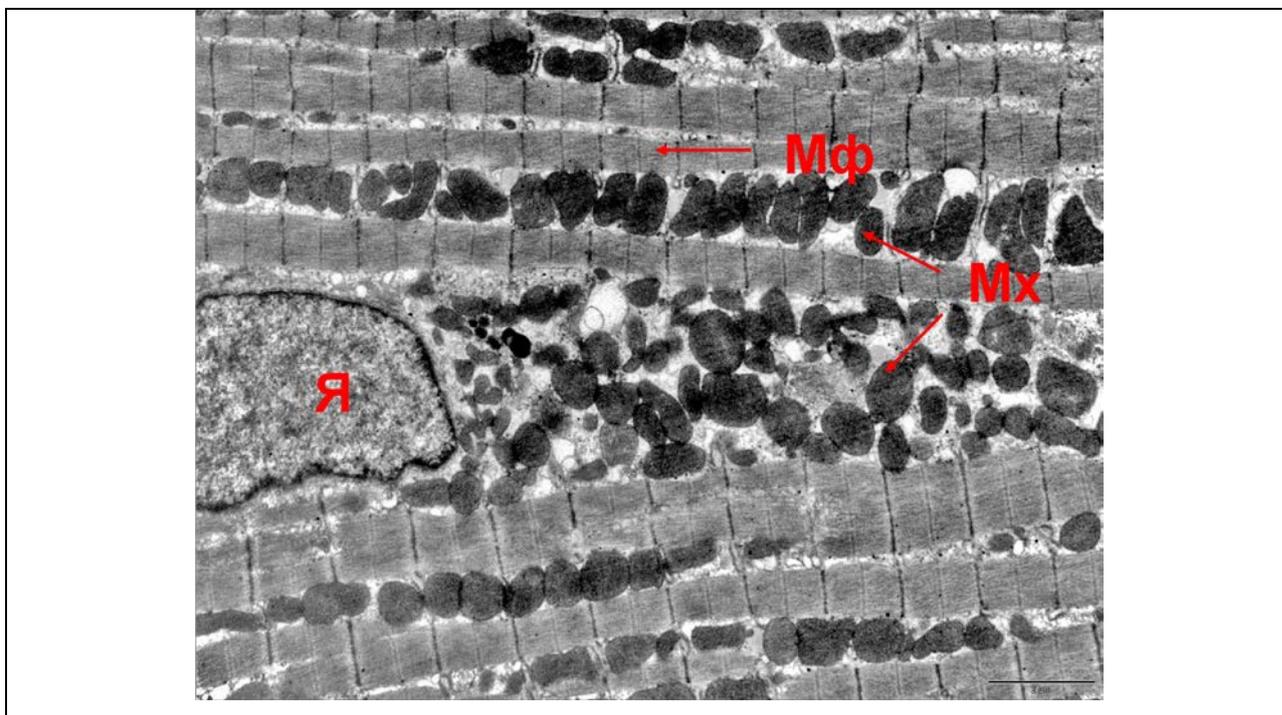


**Рис. 3.** Ядро кардиомиоцита. Увеличение X14000.  
Мх - митохондрии, СПР - саркоплазматический ретикулум, Я - ядро.

Митохондрии располагаются цепочками между миофибриллами, плотно соприкасаясь мембранами друг с другом (рис. 4), имеют структурированный матрикс с плотной упаковкой крист (рис. 5). В ряде случаев обнаруживается незначительное расширение саркоплазматического ретикулума (СПР) (рис. 2). Подсчет общей площади митохондрий, СПР в кардиомиоцитах представлен в таблице 2 и таблице 6 в приложении.

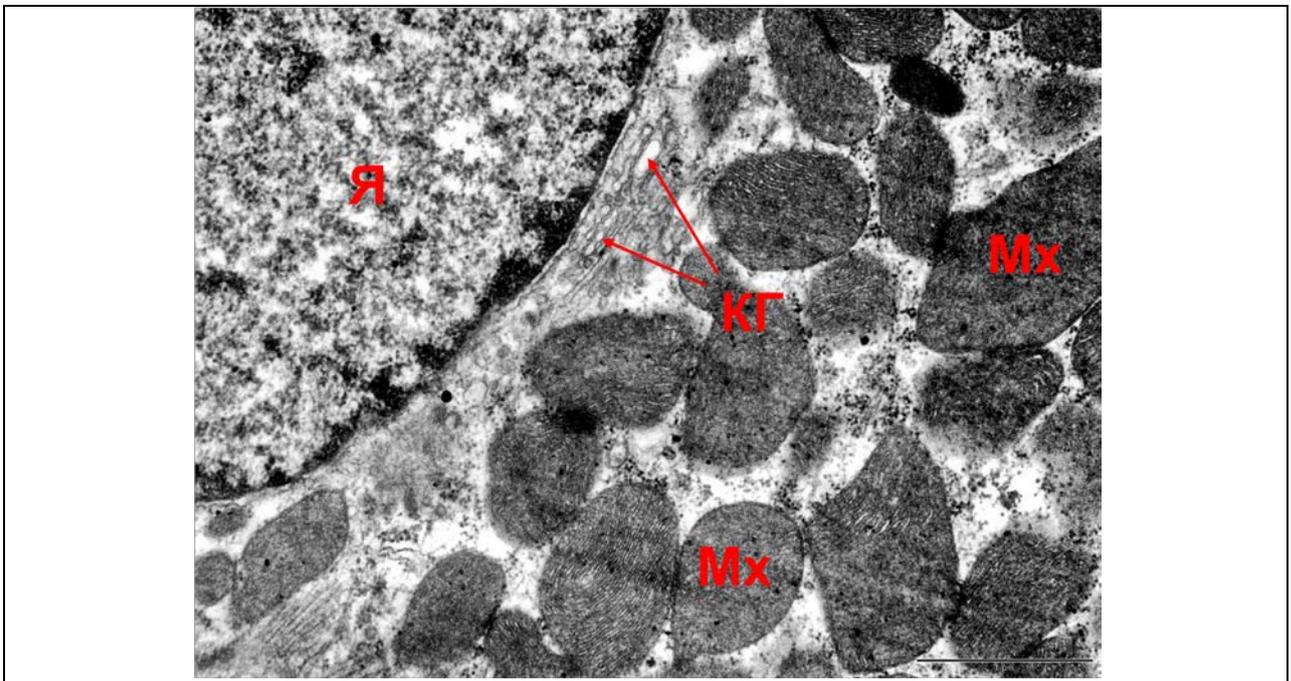
**Количественные показатели площади органелл в эндокринных кардиомиоцитах интактных животных** (данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего - *m*).

Наименование группы	Среднее значение площади, мкм <sup>2</sup>	
	Митохондрии	СПР
Кардиомиоциты интактных животных	10,68±0,75	0,12±0,01



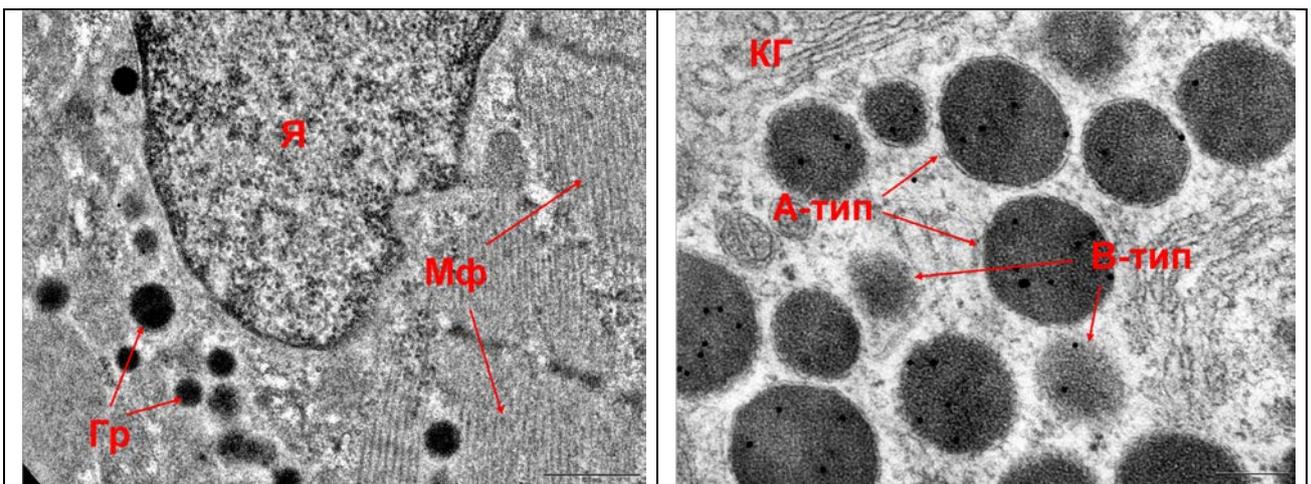
**Рис. 4.** Митохондрии между миофибриллами кардиомиоцита. Увеличение X5600.

Мф - миофибриллы, Мх - митохондрии, Я - ядро.



**Рис. 5.** Митохондрии около ядра кардиомиоцита. Увеличение X18000.  
КГ - комплекс Гольджи, Мх - митохондрии, Я - ядро.

В эндокринных кардиомиоцитах в околоядерной зоне обнаруживаются скопления секреторных гранул А- и В-типов, содержащих мозговой натрийуретический пептид (МНП) (рис. 6А), выявленный с помощью специфических к нему антител.



**А.** Секреторные гранулы с иммунореактивной меткой к МНП около ядра кардиомиоцита. Увеличение X44000.

Гр - секреторные гранулы, Мф - миофибриллы, Я - ядро.

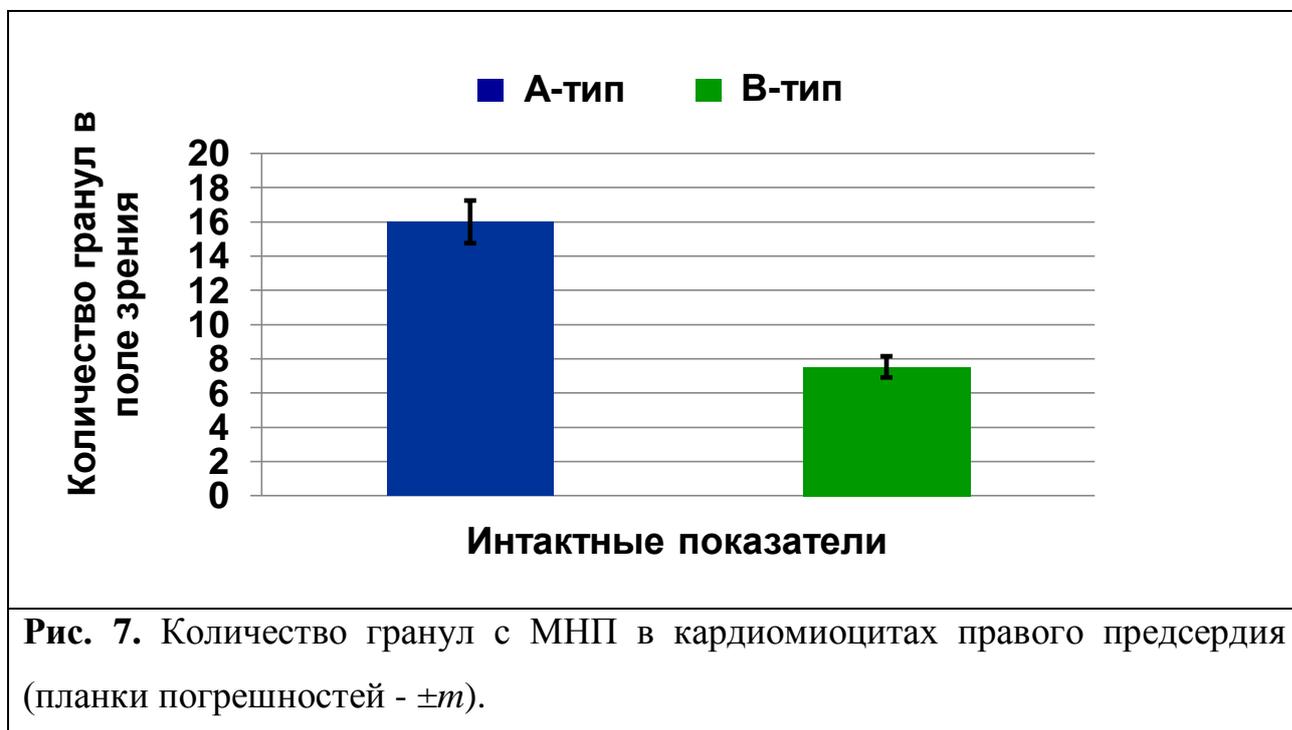
**Б.** Два типа секреторных гранул с иммунореактивной меткой к МНП. Увеличение X85000.

КГ - комплекс Гольджи. А-тип - "зрелые" гранулы, В-тип - "растворяющиеся" гранулы.

**Рис. 6.** Секреторные гранулы в кардиомиоцитах правого предсердия в норме.

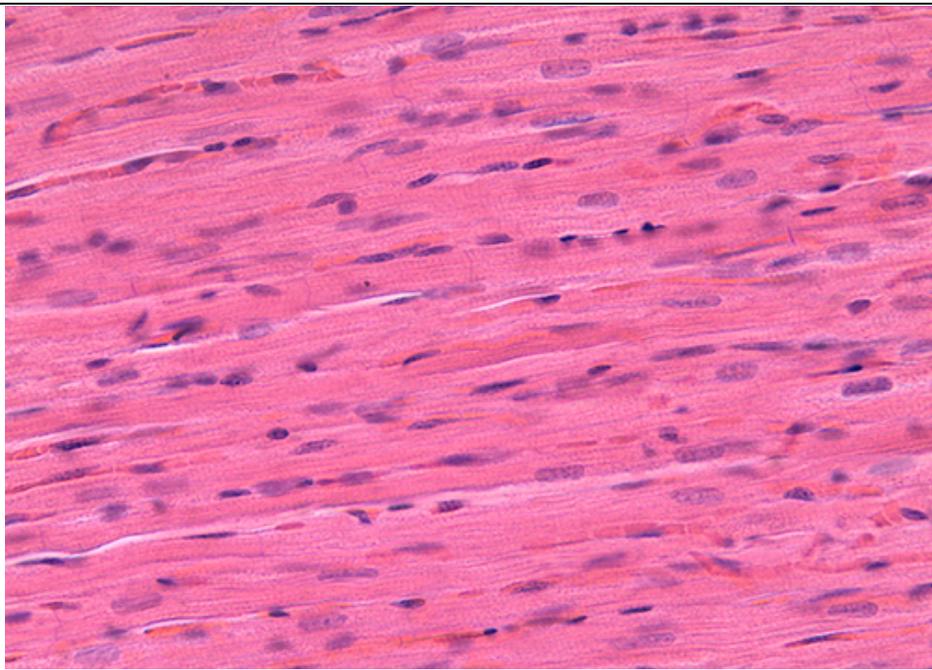
Присутствие пептида в гранулах подтверждается наличием в них иммунореактивных меток к МНП (рис. 6Б).

Среднее количество гранул А-типа в полях зрения (38x38 мкм) составило 16, гранул В-типа - 7 (рис. 7, таблица 5 в приложении).



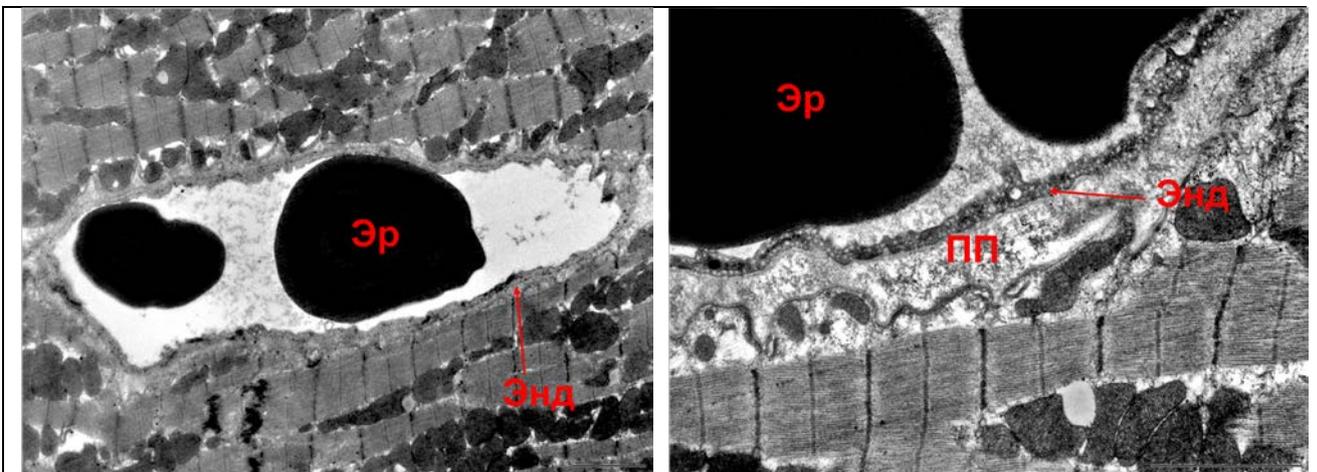
Для оценки структурной организации сердца интактных и экспериментальных животных исследовался миокард левого желудочка, поскольку известно, что ему принадлежит основная роль в развитии сердечной патологии (Пауков, Гавриш, 2015). В связи с этим для общей визуальной оценки структурного состояния миокарда левого желудочка он был окрашен гематоксилином и эозином, а для выявления коллагена в соединительной ткани пикрофуксином по ван Гизону.

В интактном сердце выявлены равномерно окрашенные кардиомиоциты с центрально расположенными ядрами округлой формы. Клетки разделены вставочными дисками (рис. 8). В соединительной ткани выявлены сосуды микроциркуляторного русла и ядра фибробластов.



**Рис. 8.** Миокард левого желудочка intactных животных. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение X400.

По данным электронной микроскопии эндотелиоциты гемокапилляров плотно контактируют друг с другом, в их цитоплазме отмечается небольшое количество пиноцитозных пузырьков (рис. 9Б). Эритроциты в них располагаются свободно (рис. 9А).

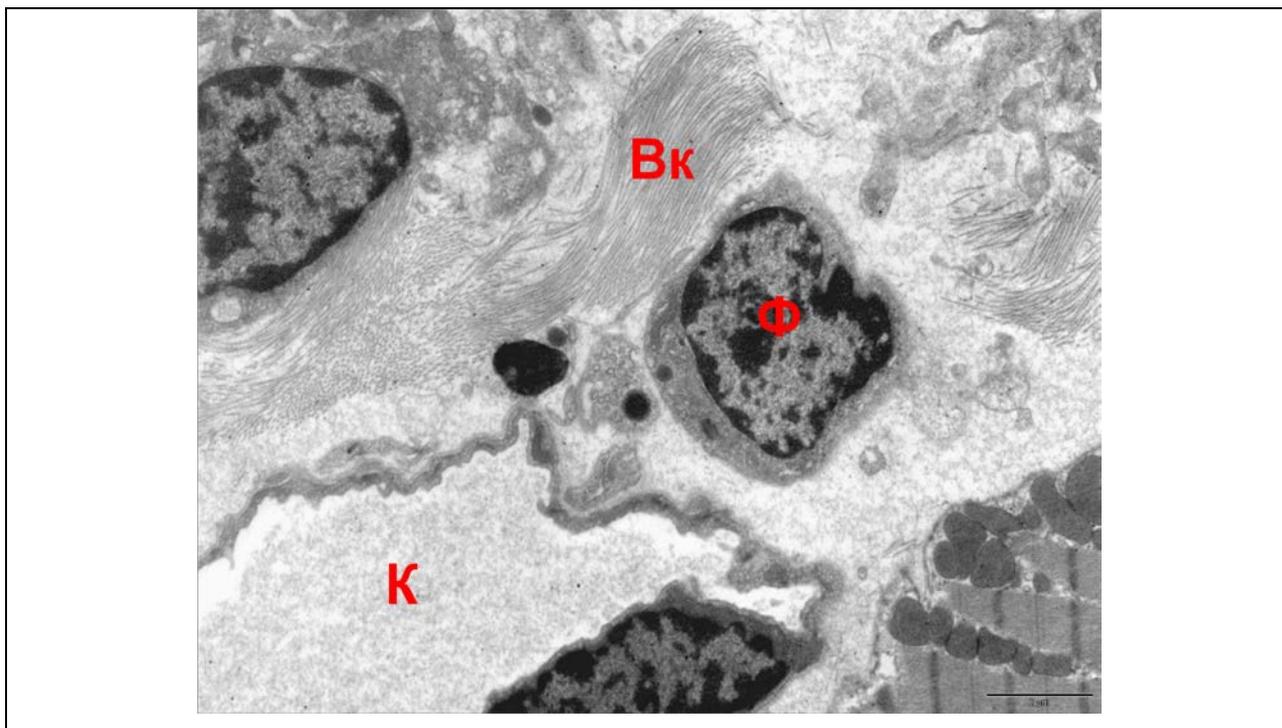


**А.** Увеличение X8900.  
Энд - эндотелий, Эр - эритроцит.

**Б.** Увеличение X18000.  
ПП - перикапиллярное пространство, Энд - эндотелий, Эр - эритроцит.

**Рис. 9.** Микроциркуляторное русло intactного миокарда левого желудочка.

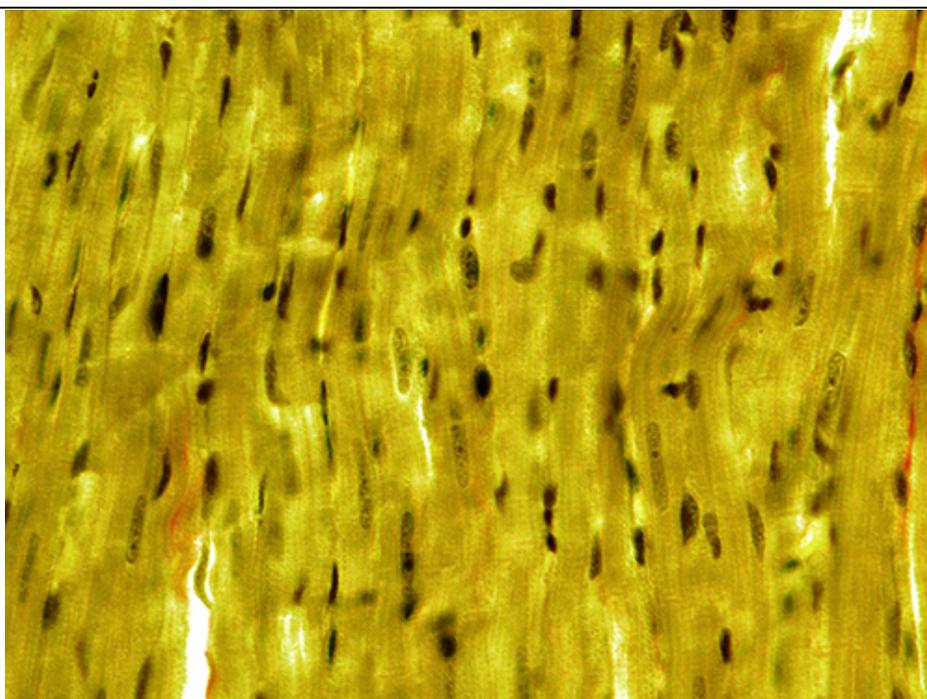
В соединительной ткани миокарда левого желудочка выявляются пучки коллагеновых волокон (рис. 10).



**Рис. 10.** Соединительная ткань в миокарде левого желудочка. Увеличение X8900.

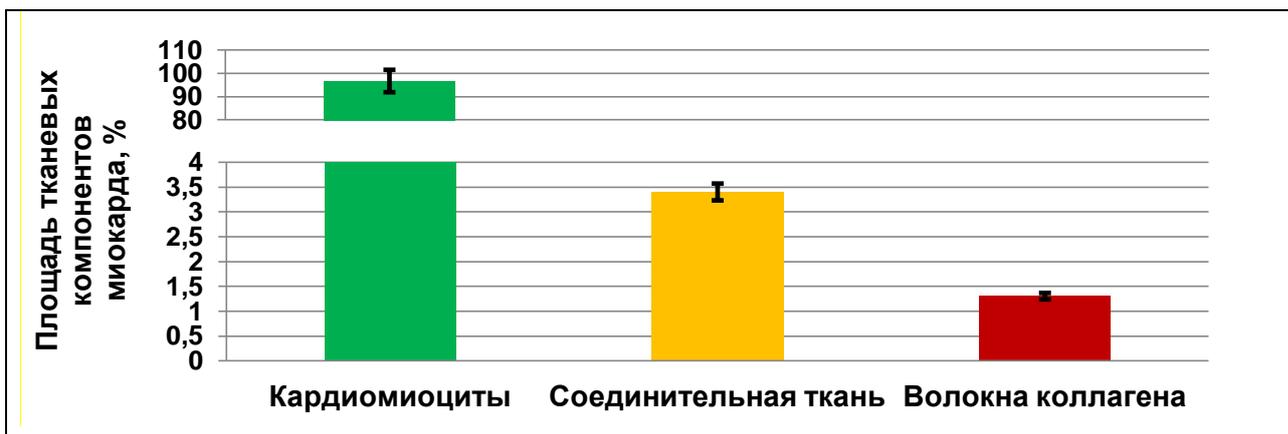
Вк - волокна коллагена, К - капилляр, Ф - фибробласт.

При окраске пикрофуксином по ван Гизону соединительная ткань представлена тонкими прослойками, лежащими между кардиомиоцитами. Выявляется небольшое количество зрелых коллагеновых волокон (рис. 11).



**Рис. 11.** Миокард левого желудочка intactных животных. Окраска пикрофуксином по ван Гизону. Увеличение X400.

Суммарная площадь соединительной ткани в миокарде левого желудочка не превышает 3%, а площадь коллагеновых волокон в ней составляет не более  $\frac{1}{3}$  (рис. 12, таблица 7 в приложении).



**Рис. 12.** Соотношение тканевых компонентов миокарда левого желудочка intactных животных (планки погрешностей -  $\pm m$ ).

Из литературы известно, что одним из путей изменения функционального статуса организма в постреперфузионном периоде является активация симпато-адреналовой, ренин-ангиотензин-альдостероновой и гипофизарно-надпочечниковой систем [Manfrini, et al., 2004], влияющих на

секреторный аппарат сердца. Достоверным критерием оценки активности указанных систем служит изменение variability сердечного ритма (ВСР) [Бугрова и др., 2012]. В настоящей работе использованы временные (ритмограмма и статистические показатели) и частотные (спектральный анализ) методы анализа ВСР. Интактные показатели приведены в таблице 3 в виде  $M \pm m$ .

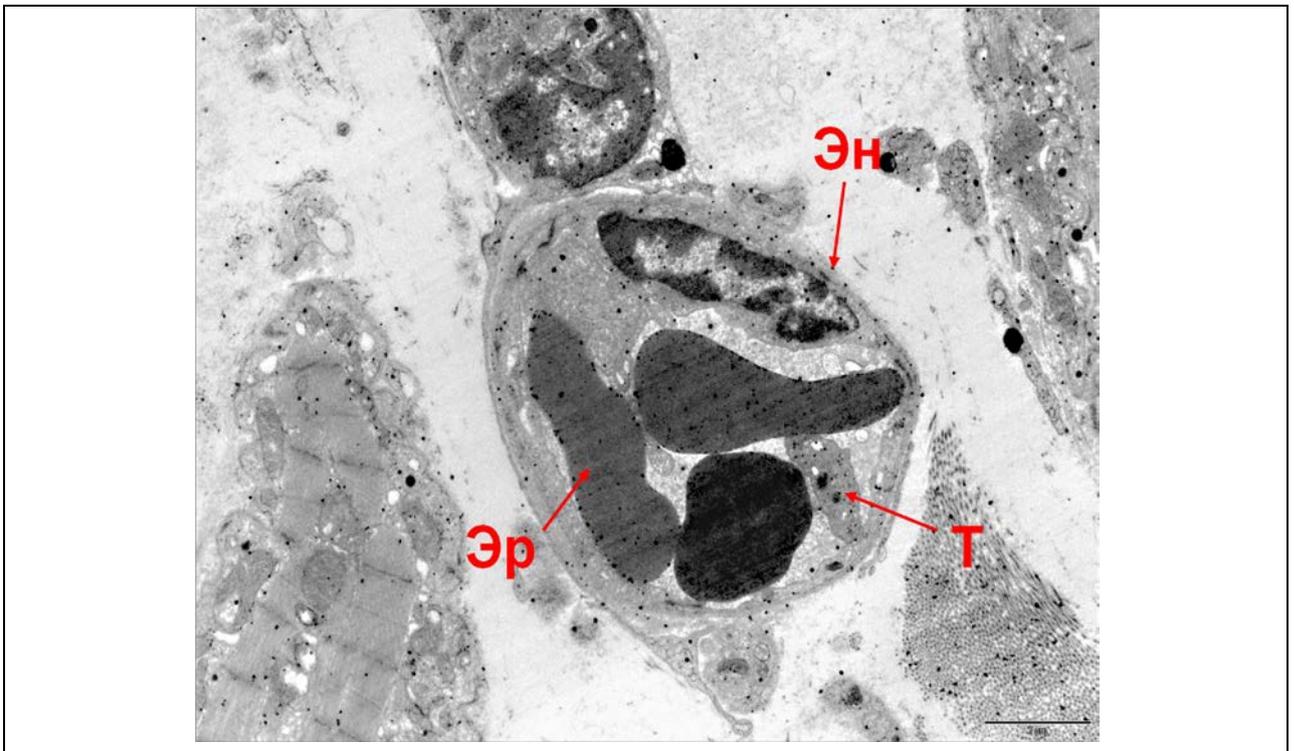
Таблица 3

**Статистические и частотные показатели variability сердечного ритма интактных животных** (данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего -  $m$ ).

Показатели		Интактные животные
Статистические показатели	RR <sub>ср</sub> , мс	157,24±6,46
	CV, %	3,24±0,30
	SDNN, мс	5,16±1,12
Частотные показатели	HF, н.е.	4,32±0,41
	LF, н.е.	3,86±1,04
	VLf, н.е.	5,47±1,18
	TP, н.е.	6,15±1,01

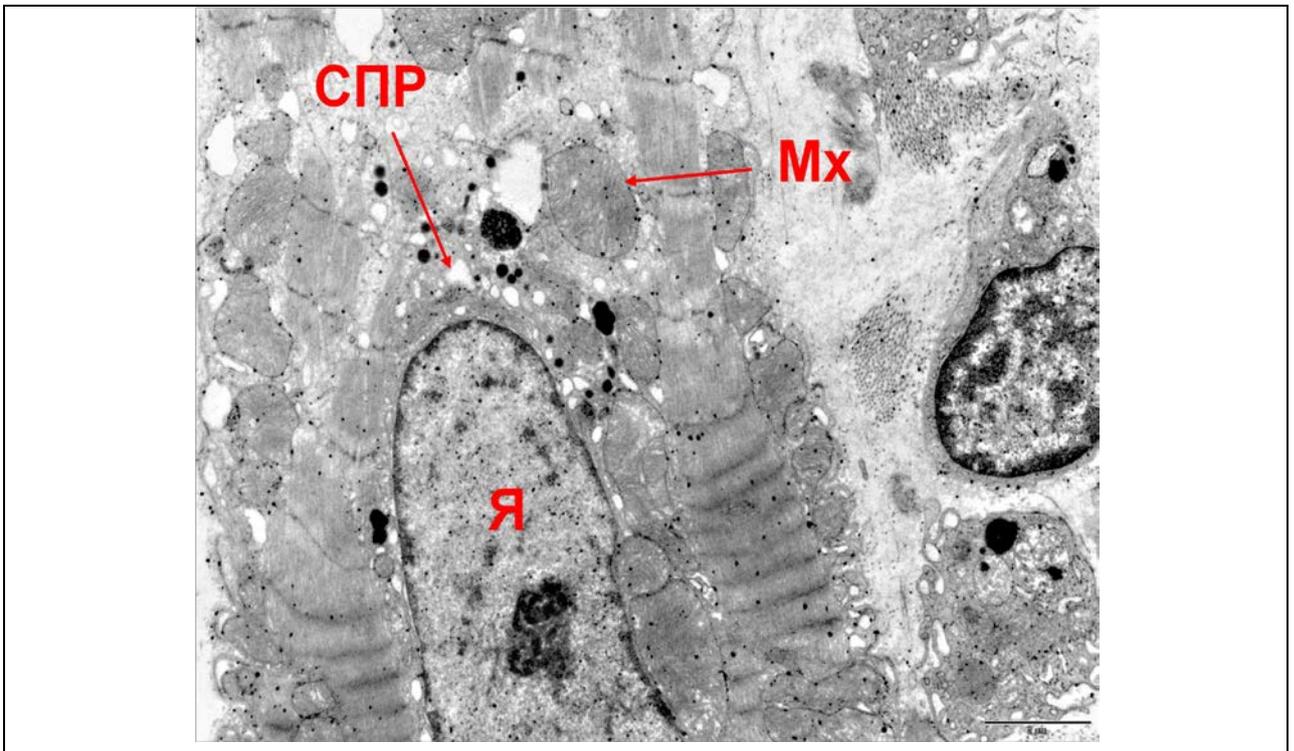
### **3.2. Структурно-функциональные изменения миокарда и секреторная активность эндокринных кардиомиоцитов после острой гипоксии в раннем восстановительном периоде**

**Через 5 минут ВП** в гемокапиллярах миокарда правого предсердия выявляется агрегация эритроцитов и тромбоцитов, перикапиллярное пространство расширено относительно интактных показателей (рис. 13).



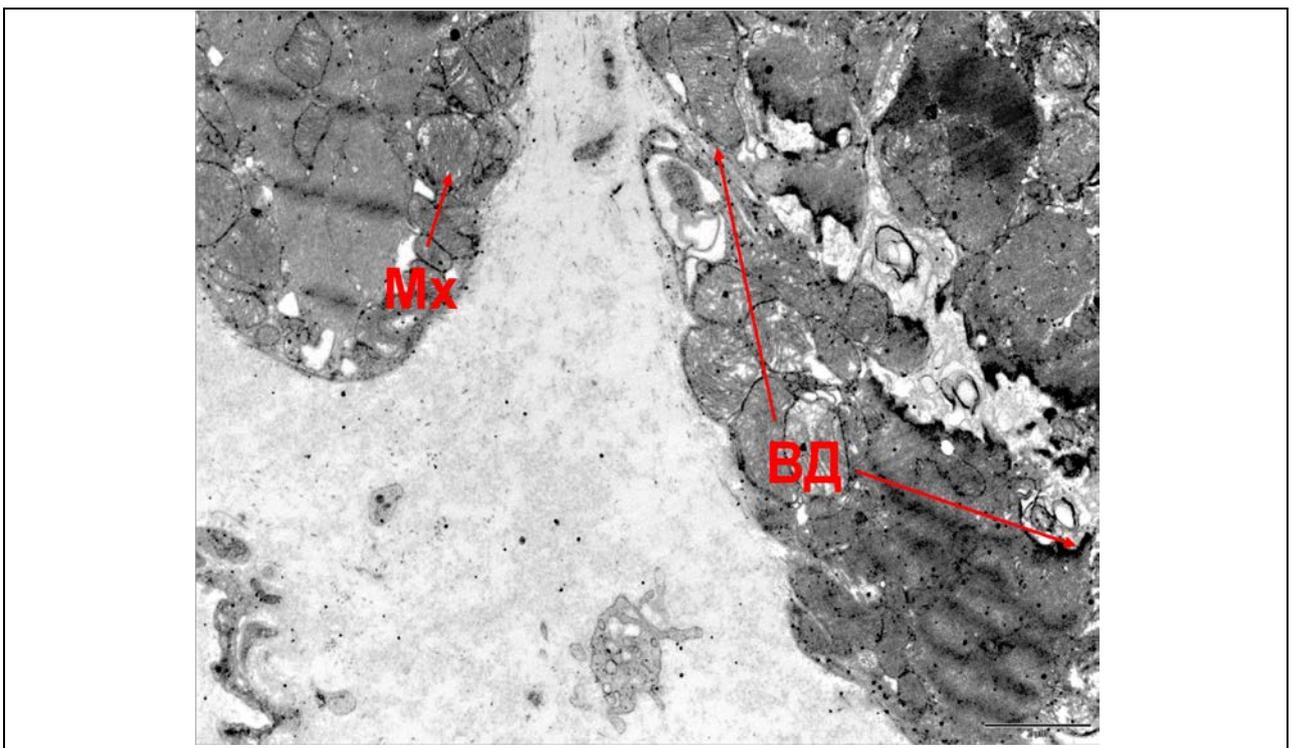
**Рис. 13.** Микроциркуляторное русло миокарда через 5 минут восстановительного периода. Увеличение X8900.  
Т - тромбоцит, Эн – эндотелий, Эр - эритроцит.

Эндокринные кардиомиоциты в основном сохраняют свою ультраструктуру. В отдельных клетках отмечается гиперплазия митохондрий, просветление их матрикса, незначительное расширение саркоплазматического ретикулула (СПР), пересокращение миофибрилл (рис. 14) и единичные расхождения вставочных дисков (рис. 15).



**Рис. 14.** Изменения в кардиомиоцитах через 5 минут восстановительного периода. Увеличение X8900.

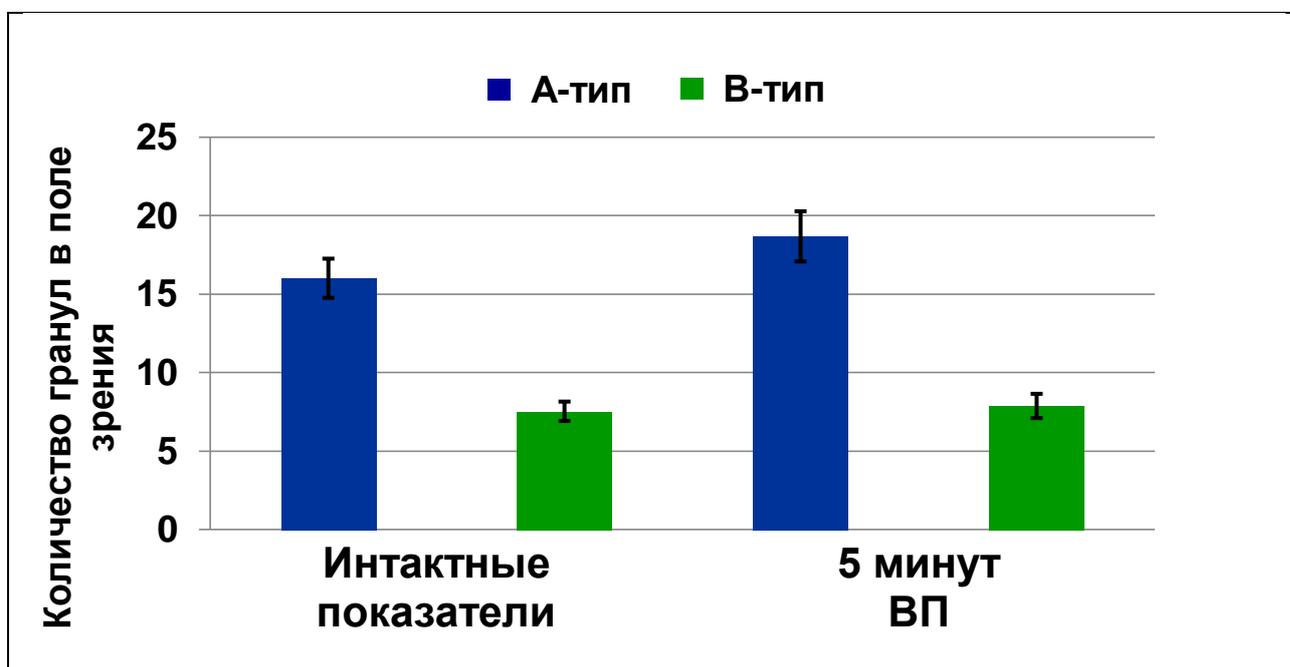
Мх - митохондрии, СПР - саркоплазматический ретикулум, Я - ядро.



**Рис. 15.** Вставочный диск кардиомиоцита через 5 минут восстановительного периода. Увеличение X5600.

ВД - вставочный диск, Мх - митохондрии.

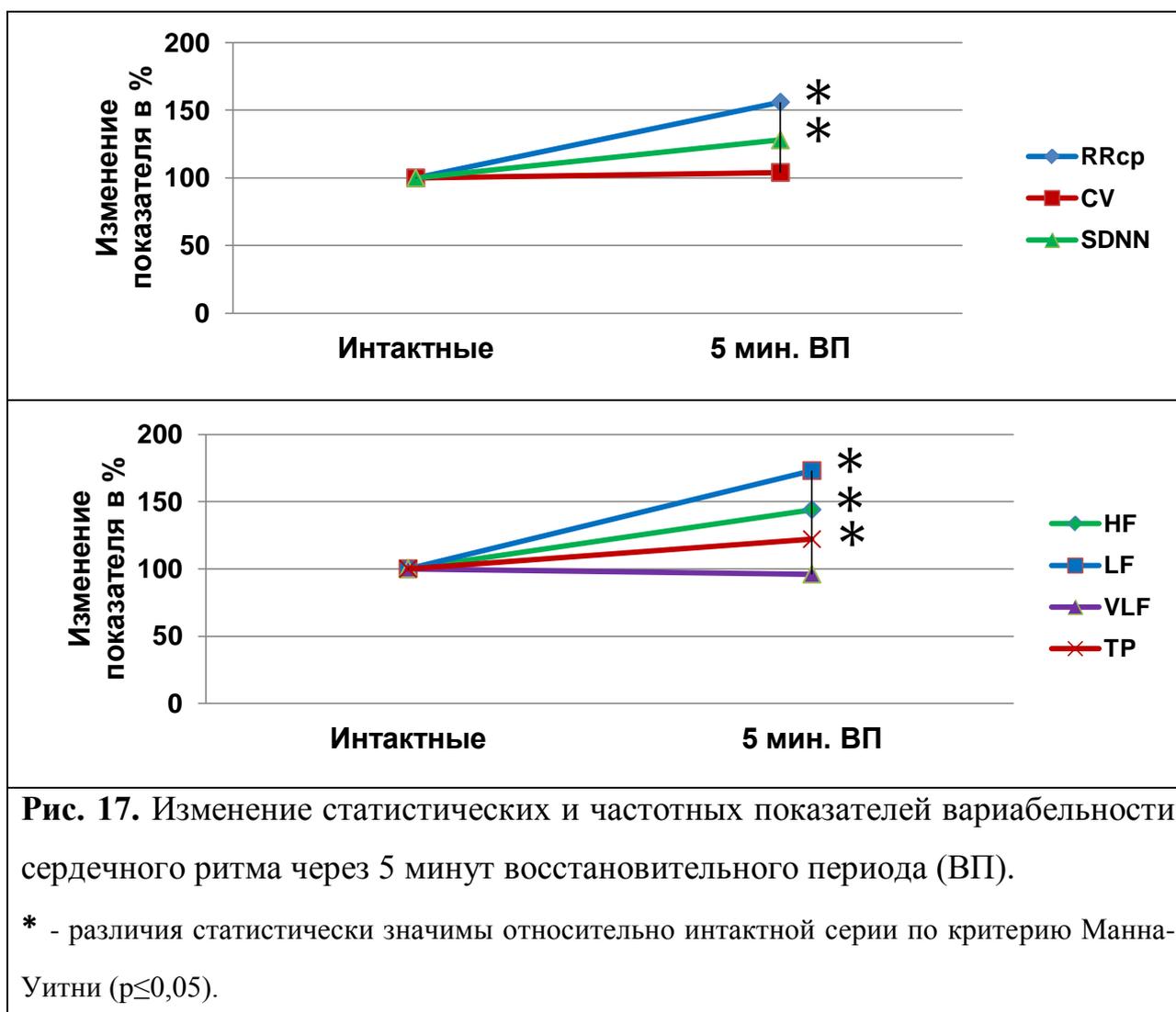
На этом фоне изменения продукции МНП в эндокринных кардиомиоцитах правого предсердия не выявлено, так как количество "зрелых" форм гранул А-типа и "растворяющихся" гранул В-типа, содержащих пептид, не отличается от интактных показателей (рис. 16, таблица 5 в приложении).



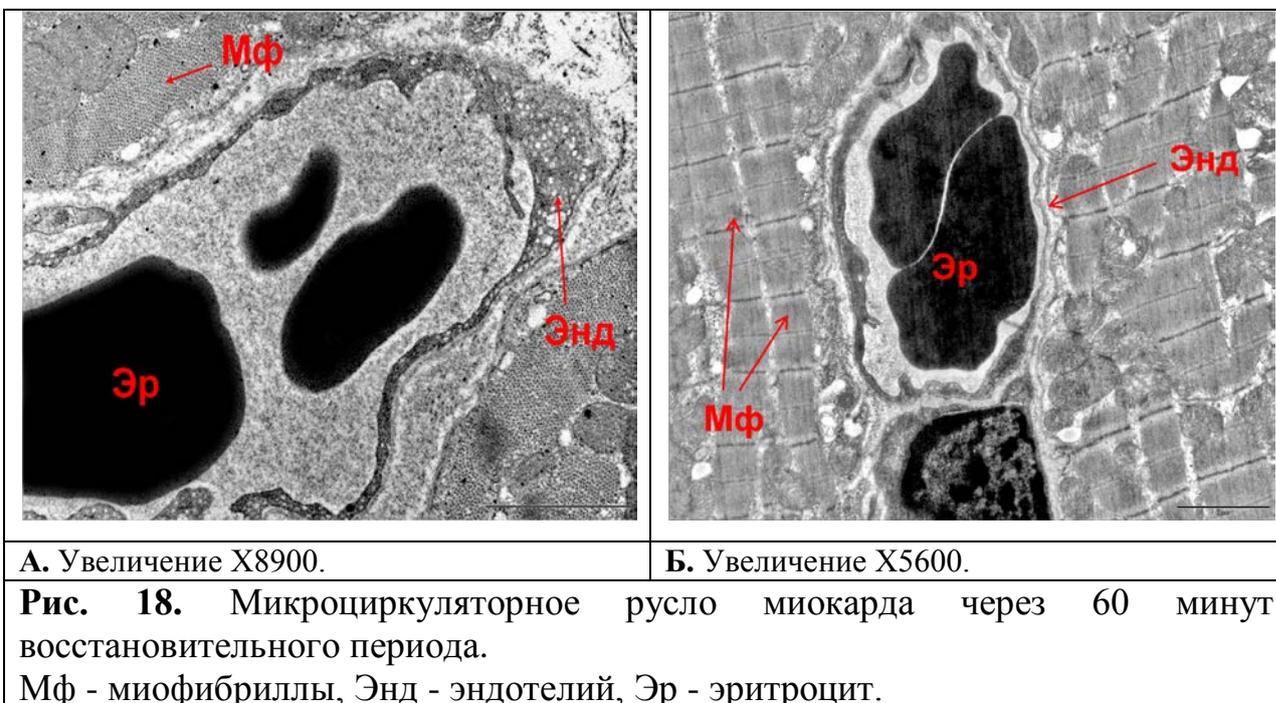
**Рис. 16.** Соотношение количества секреторных гранул, содержащих МНП, интактных животных и животных через 5 минут восстановительного периода (ВП) (планки погрешностей -  $\pm m$ ).

\* - различия статистически значимы относительно интактной серии по критерию Манна-Уитни ( $p \leq 0,05$ ).

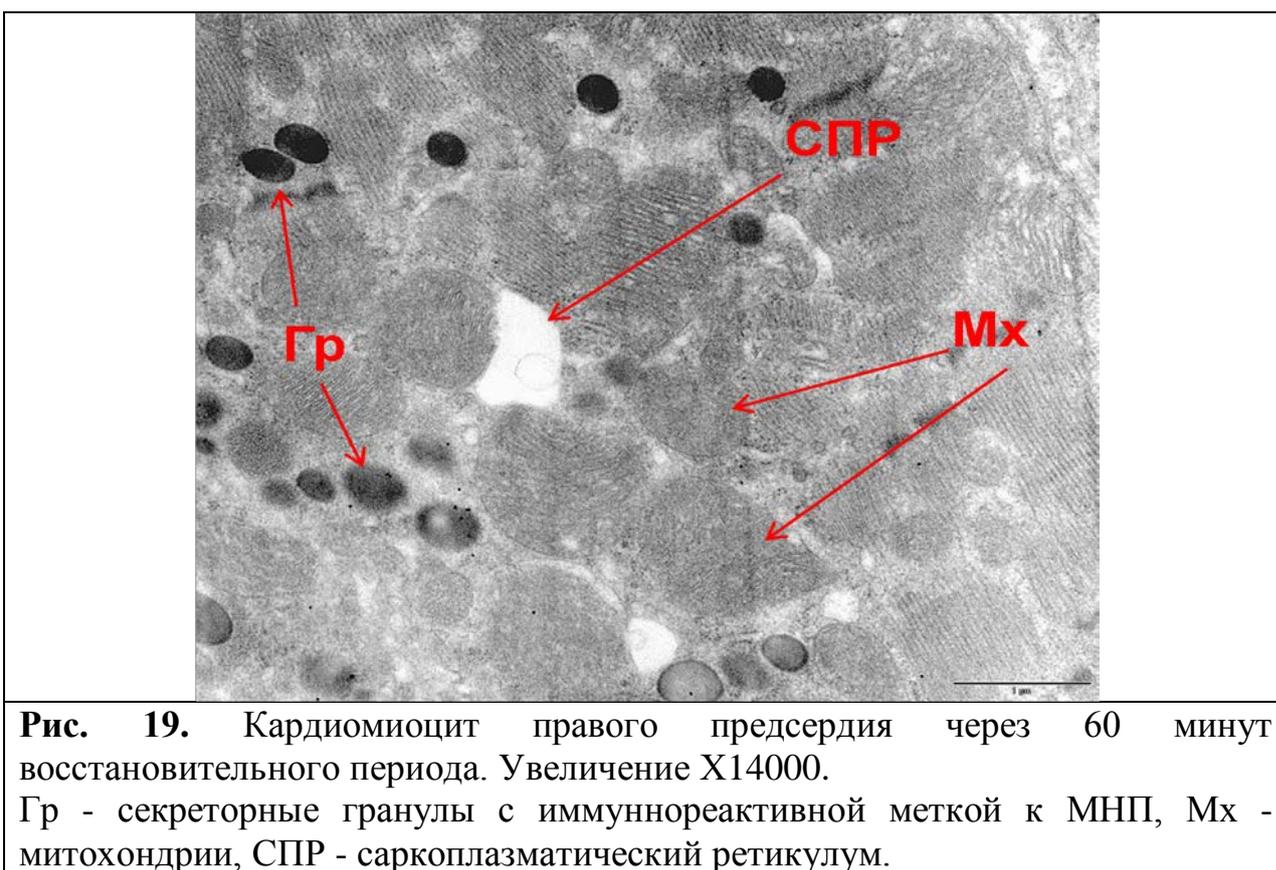
Через 5 минут ВП происходит увеличение статистических (RR-интервала до 156%, стандартного отклонения SDNN до 128%) и частотных (высокочастотной компоненты HF до 144%, низкочастотной компоненты LF до 173% и суммарной мощности спектра TP на 122%) показателей ВСР (рис. 17, таблица 4 в приложении).

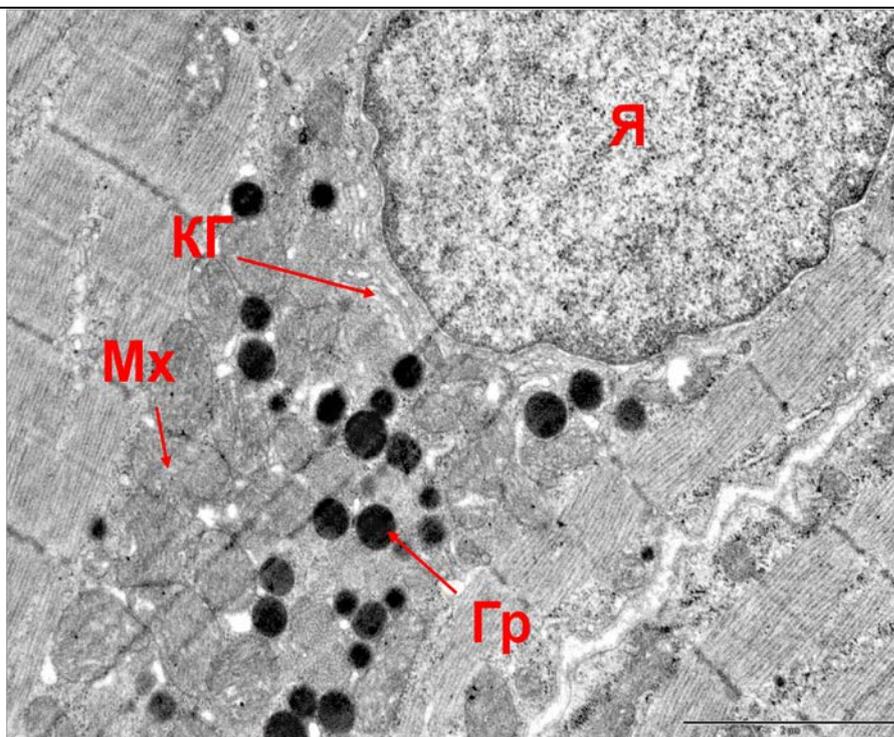


**Через 60 минут ВП** микроциркуляторное русло миокарда правого предсердия характеризуется полиморфным состоянием гемокапилляров. В части сосудов отмечается восстановление кровообращения. В них эритроциты располагаются свободно, перикапиллярное пространство не расширено. В эндотелии отмечается большое число пиноцитозных пузырьков (рис. 18А). В других гемокапиллярах наблюдается гемостаз (рис. 18Б). Встречаются эритроциты неправильной формы и в ряде случаев они обнаруживаются в соединительной ткани.



Реактивные изменения ультраструктуры кардиомиоцитов после острой гипоксии проявляются в расширении СПР (рис. 19), гипертрофии комплекса Гольджи и в просветлении матрикса отдельных митохондрий (рис. 20).

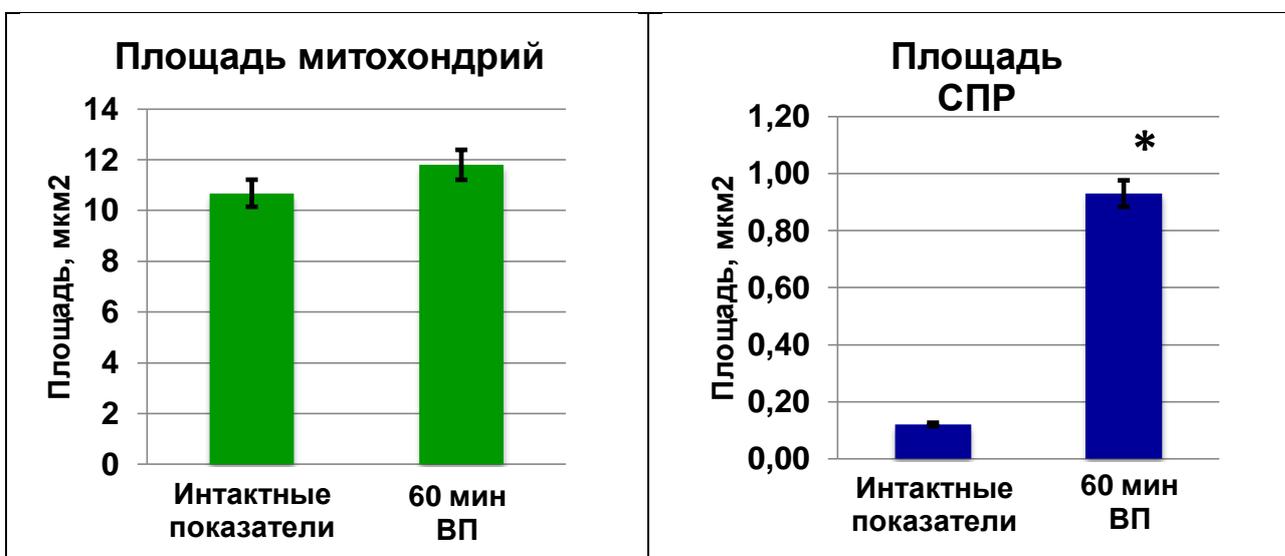




**Рис. 20.** Кардиомиоцит правого предсердия через 60 минут восстановительного периода. Увеличение X11000.

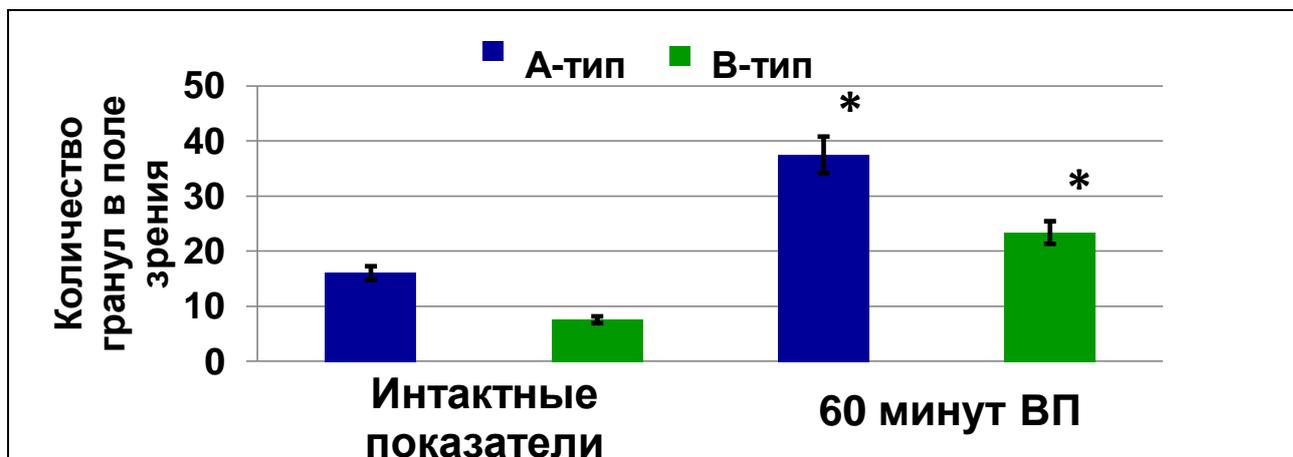
Гр - секреторные гранулы с иммунореактивной меткой к МНП, КГ - комплекс Гольджи, Мх - митохондрии, Я - ядро.

Общая площадь митохондрий не отличается от интактных показателей, а площадь саркоплазматического ретикулума (СПР) увеличивается в 8 раз (рис. 21, таблица 6 в приложении).



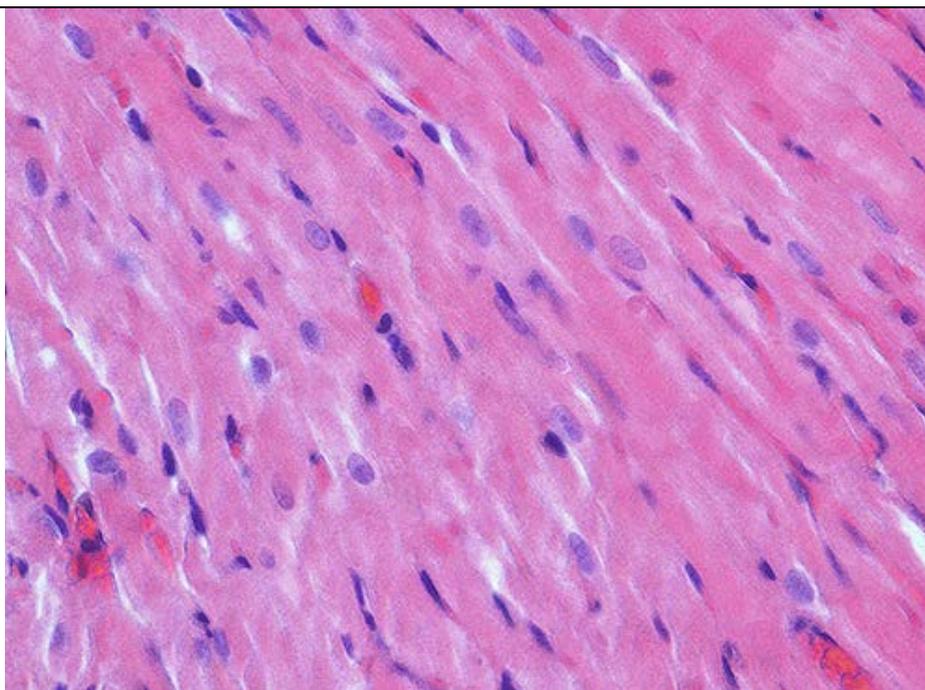
**Рис. 21.** Изменение общей площади митохондрий и СПР кардиомиоцитов правого предсердия в раннем восстановительном периоде (ВП) (планки погрешностей -  $\pm m$ ). \* - различия статистически значимы относительно интактной серии по критерию Манна-Уитни ( $p \leq 0,05$ ).

В кардиомиоцитах наблюдается усиление продукции МНП относительно интактных показателей: количество гранул А-типа увеличивается на 134 %, гранул В-типа на 210% (рис. 22, таблица 5 в приложении).



**Рис. 22.** Соотношение количества секреторных гранул, содержащих МНП, интактных животных и животных через 60 минут восстановительного периода (ВП) (планки погрешностей -  $\pm m$ ).

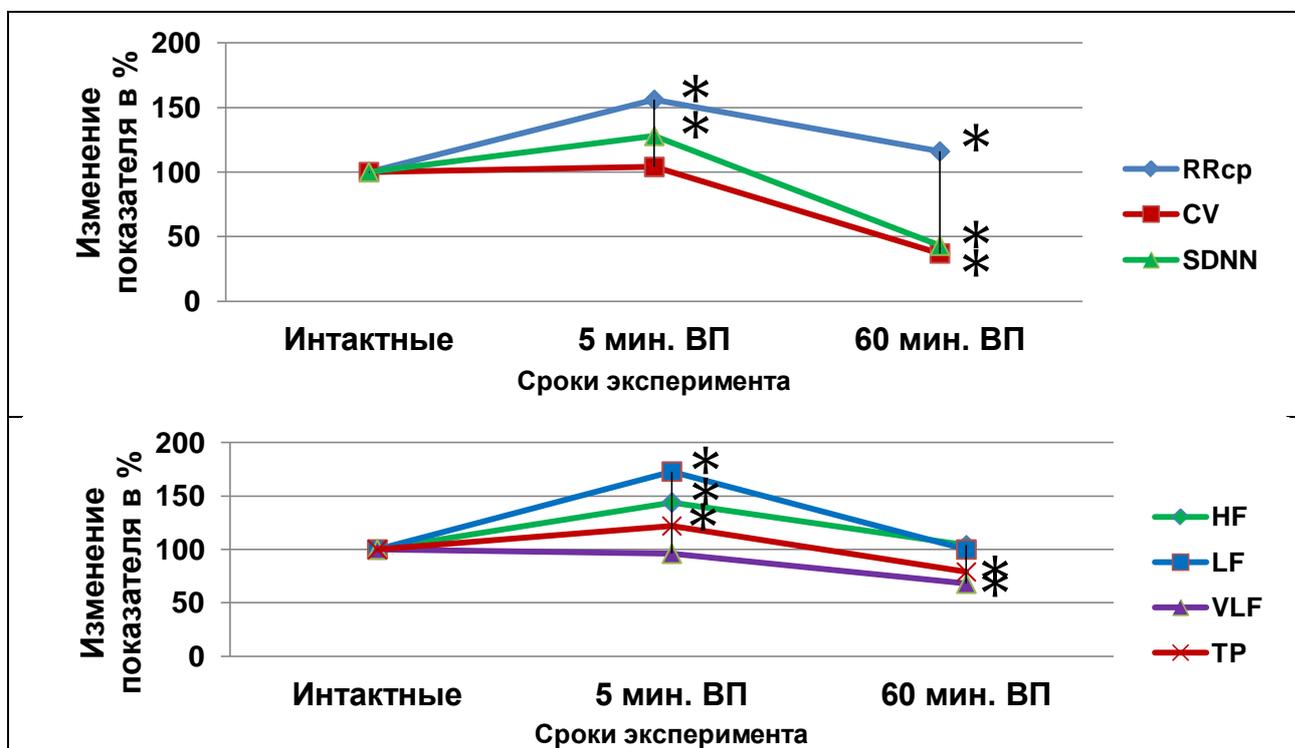
\* - различия статистически значимы относительно интактной серии по критерию Манна-Уитни ( $p \leq 0,05$ ).



**Рис. 23.** Миокард левого желудочка через 60 минут восстановительного периода. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение X400.

При окраске миокарда левого желудочка гематоксилином и эозином выявляется плотное прилегание мышечных волокон. Часть кардиомиоцитов теряет поперечную исчерченность. В ряде сосудов микроциркуляторного русла отмечается гемостаз (рис. 23).

**Анализ variability сердечного ритма через 60 минут ВП** выявил увеличение статистического показателя  $RR_{cp}$  до 116%. Показатель вариации  $CV$  снизился до 37%, значение  $SDNN$  до 43% (рис. 24, таблица 4 в приложении). Среди спектральных характеристик отмечено уменьшение показателя  $VLF$  до 68% и показателя  $TP$  до 79% от исходного уровня (рис. 24, таблица 4 в приложении). Достоверного изменения значений  $HF$  и  $LF$ , по сравнению с интактными показателями, не обнаружено.

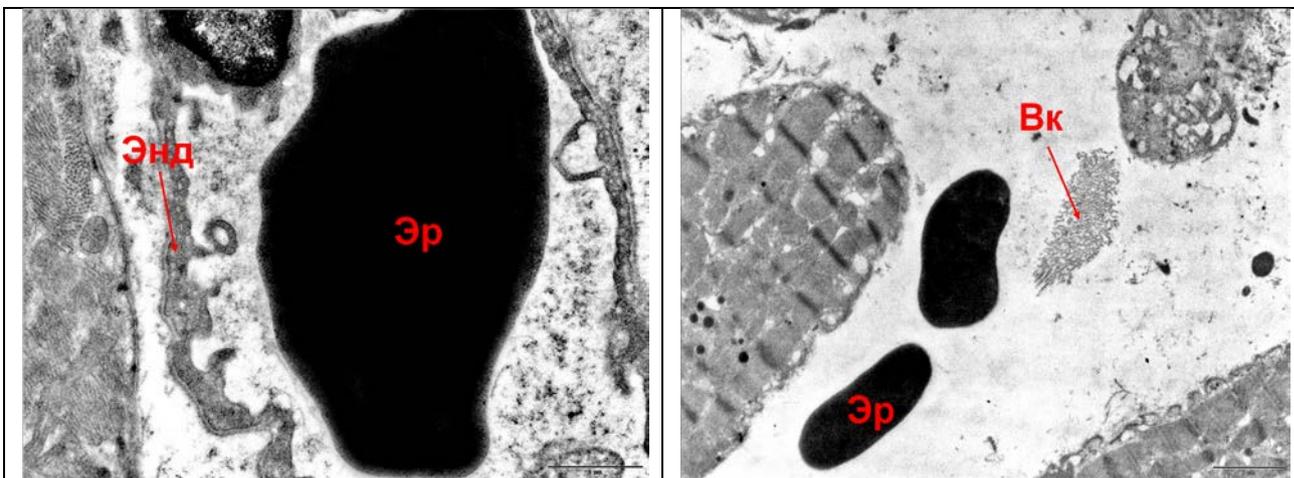


**Рис. 24.** Изменение статистических и частотных показателей variability сердечного ритма через 60 минут восстановительного периода (ВП).

\* - различия статистически значимы относительно интактной серии по критерию Манна-Уитни ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.3. Структурно-функциональные изменения миокарда и секреторная активность эндокринных кардиомиоцитов после острой гипоксии в отдаленном восстановительном периоде

Через 60 суток ВП в гемокапиллярах миокарда правого предсердия эритроциты располагаются свободно (рис. 25А).



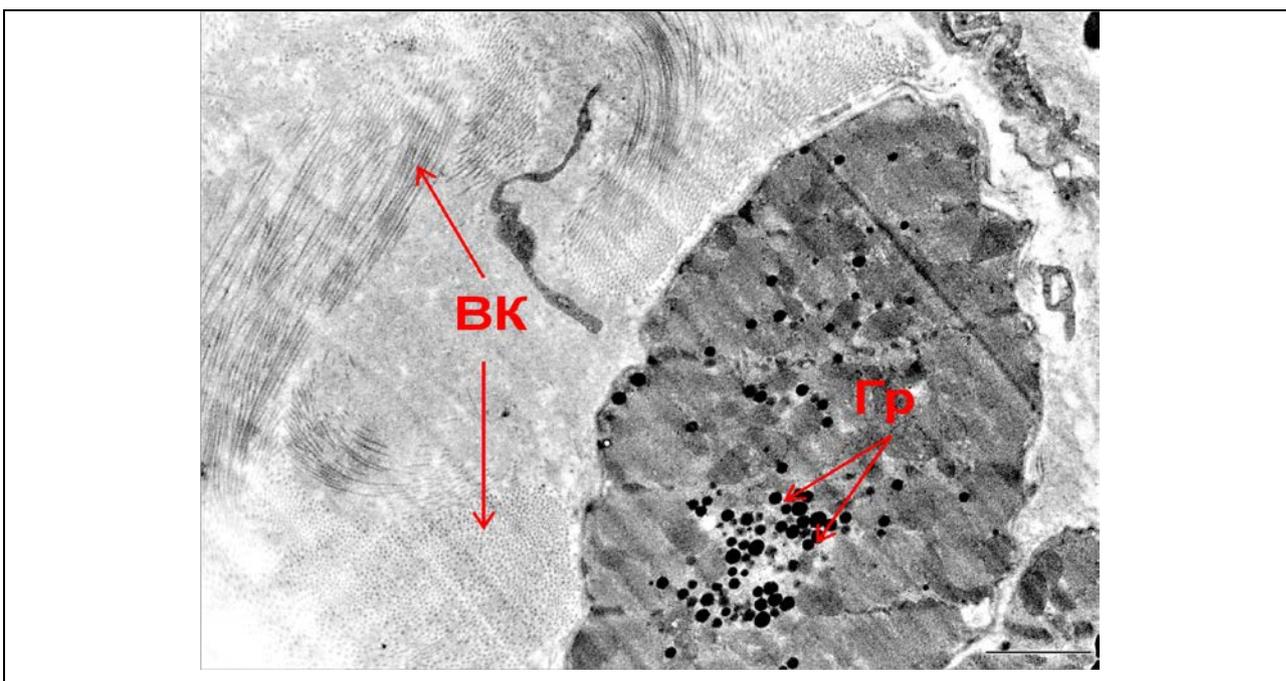
А. Гемокапилляр миокарда. Увеличение X22000.

Энд - эндотелий, Эр - эритроцит.

Б. Эритроциты в соединительной ткани. Увеличение X8900.

Вк - волокна коллагена, Эр - эритроцит.

**Рис. 25.** Микроциркуляторное русло миокарда правого предсердия через 60 суток восстановительного периода.



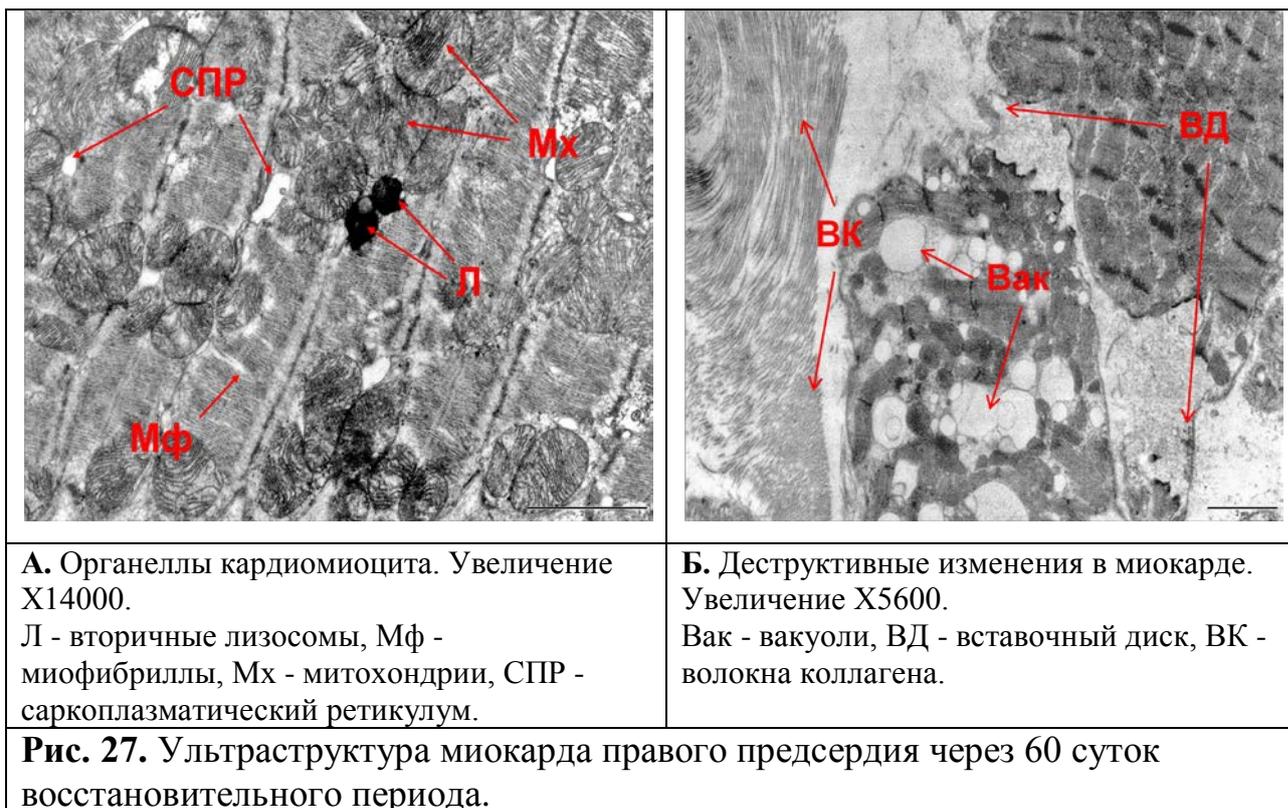
**Рис. 26.** Волокна коллагена в соединительной ткани миокарда правого предсердия через 60 суток восстановительного периода.

ВК - волокна коллагена, Гр - гранулы с иммунореактивной меткой к МНП.

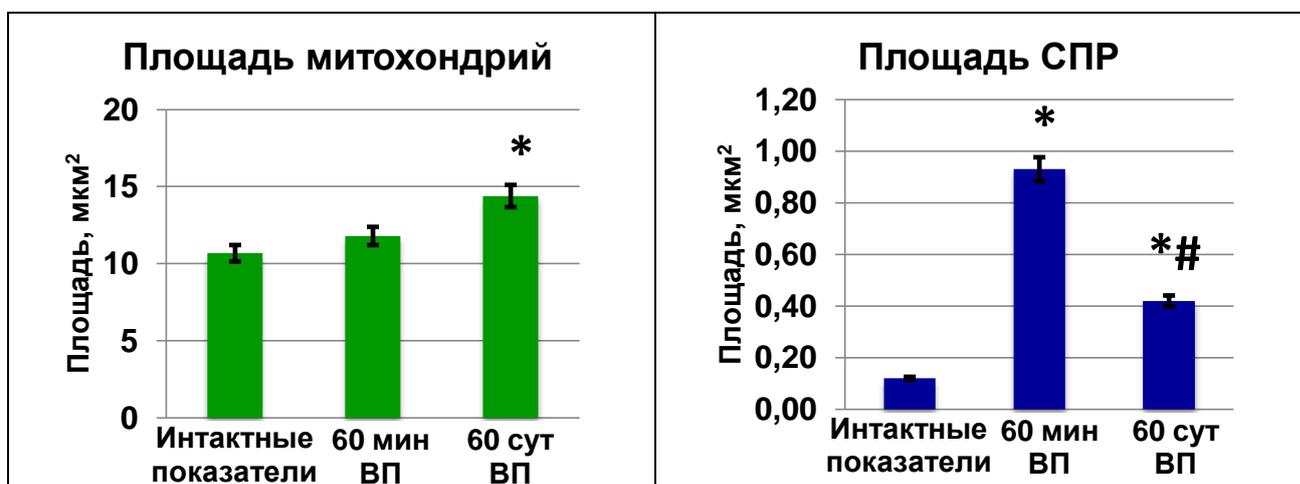
В отдельных гемокапиллярах наблюдается деструкция эндотелия и выход эритроцитов в соединительную ткань (рис. 25Б).

В соединительной ткани обнаружено большое количество волокон коллагена (рис.26).

В миокарде правого предсердия отмечено увеличение числа секреторных кардиомиоцитов с деструктивными изменениями. Выявлена гиперплазия и набухание митохондрий, образование вторичных лизосом (рис. 27А), вакуолей, расхождение вставочных дисков (рис. 27Б).



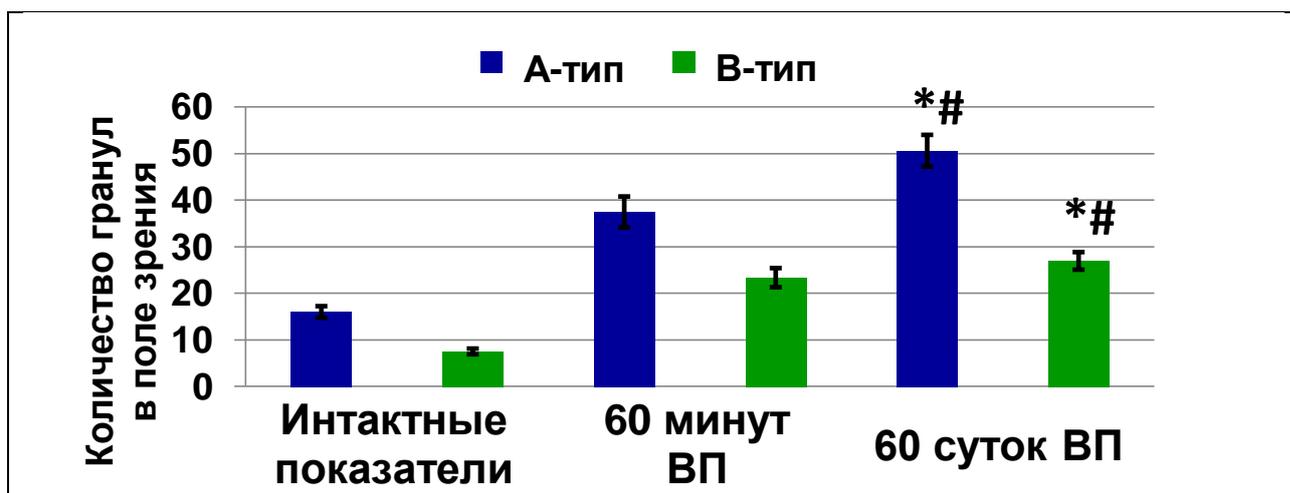
Площадь митохондрий увеличена на 12% относительно интактных показателей и не отличается от 60-ти минут ВП (рис. 28, таблица 6 в приложении). Площадь СПР уменьшена относительно раннего ВП, но превосходит исходные данные в 3 раза (рис. 28, таблица 6 в приложении).



**Рис. 28.** Изменение общей площади митохондрий и СПР кардиомиоцитов правого предсердия в отдаленном восстановительном периоде (ВП) (планки погрешностей -  $\pm m$ ).

\* - различия статистически значимы относительно интактной серии и # - относительно раннего ВП по критерию Манна-Уитни ( $p \leq 0,05$ ).

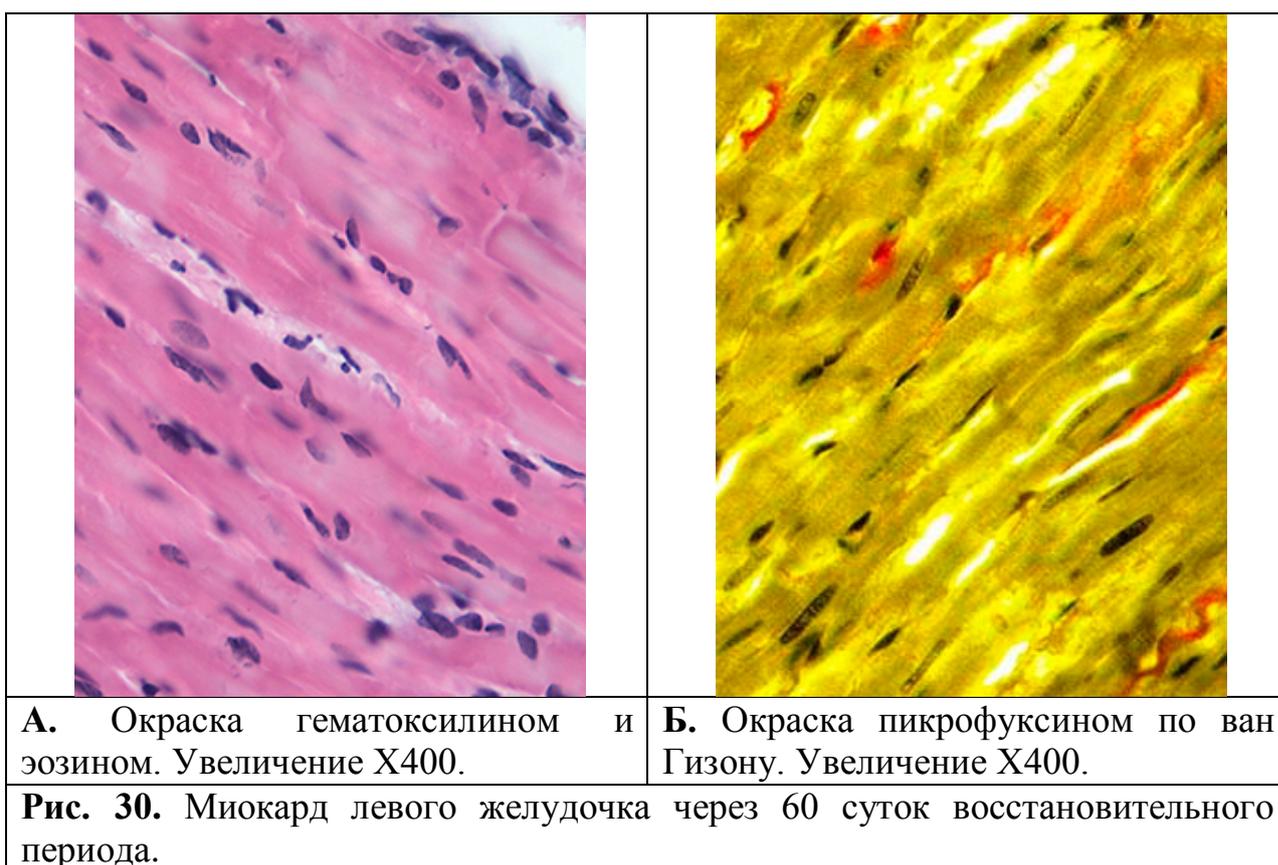
На этом фоне продукция МНП относительно интактных показателей продолжает увеличиваться, что подтверждается возрастанием количества гранул А-типа на 216%, гранул В-типа на 258% (рис. 29, таблица 5 в приложении). Относительно раннего ВП число гранул А-типа возросло на 35%, гранул В-типа на 15% (рис. 29, таблица 5 в приложении).



**Рис. 29.** Соотношение количества секреторных гранул, содержащих МНП, интактных животных и животных в восстановительном периоде (ВП) (планки погрешностей -  $\pm m$ ).

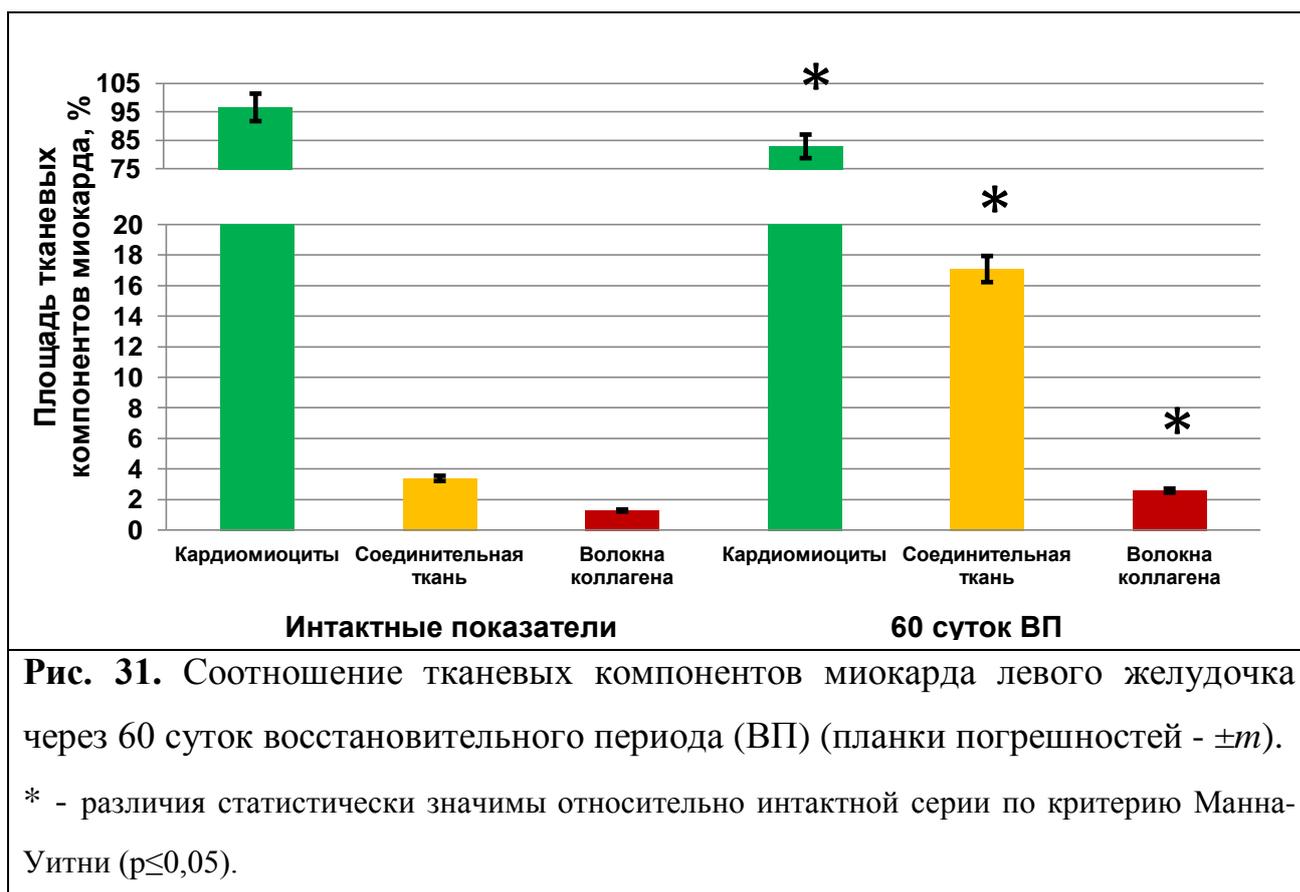
\* - различия статистически значимы относительно интактной серии и # - относительно раннего ВП по критерию Манна-Уитни ( $p \leq 0,05$ ).

При микроскопическом исследовании миокарда левого желудочка, окрашенного гематоксилином и эозином, выявлены деструктивные изменения в ткани относительно интактных показателей и раннего восстановительного периода (60 минут ВП). Отмечена мозаичность окраски части кардиомиоцитов. Центральная часть клеток - светлая, в то время как их края имеют интенсивную окраску, что свидетельствует об изменении их тинкториальных свойств. Выявлено расхождение вставочных дисков (рис. 30А).

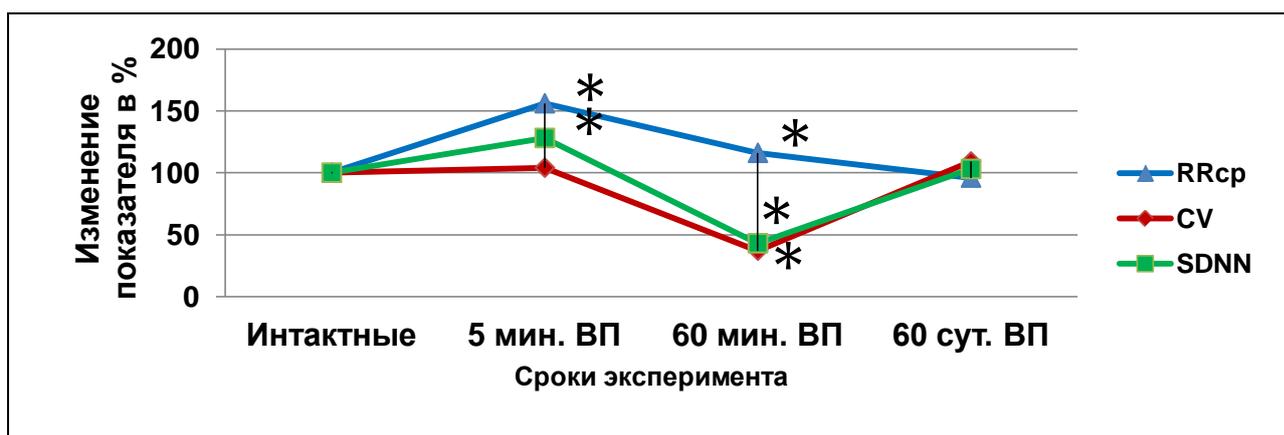


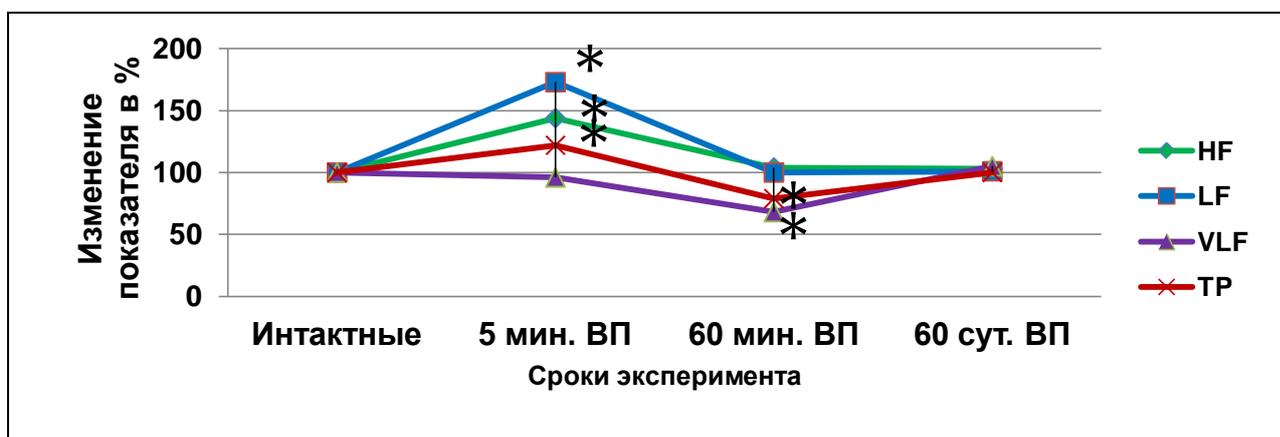
При окраске миокарда пикрофуксином по ван Гизону обнаружено увеличение количества зрелых коллагеновых волокон в соединительной ткани (рис. 30Б). Наибольшее скопление волокон коллагена отмечается в адвентиции сосудов. Суммарная площадь соединительной ткани увеличилась до 17% относительно интактных показателей, площадь, занятая коллагеновыми

волокнами, в её составе возросла более чем в 2 раза, а площадь, занятая кардиомиоцитами, уменьшилась на 14% (рис. 31, таблица 7 в приложении).



Через 60 суток ВП статистические показатели variability сердечного ритма - RR<sub>ср</sub>, SDNN и CV достоверно не отличаются от значений интактной серии (рис. 32, таблица 4 в приложении). Значения спектральных характеристик HF, LF, VLF и суммарная мощность спектра TP также соответствует исходному уровню (рис. 32, таблица 4 в приложении).





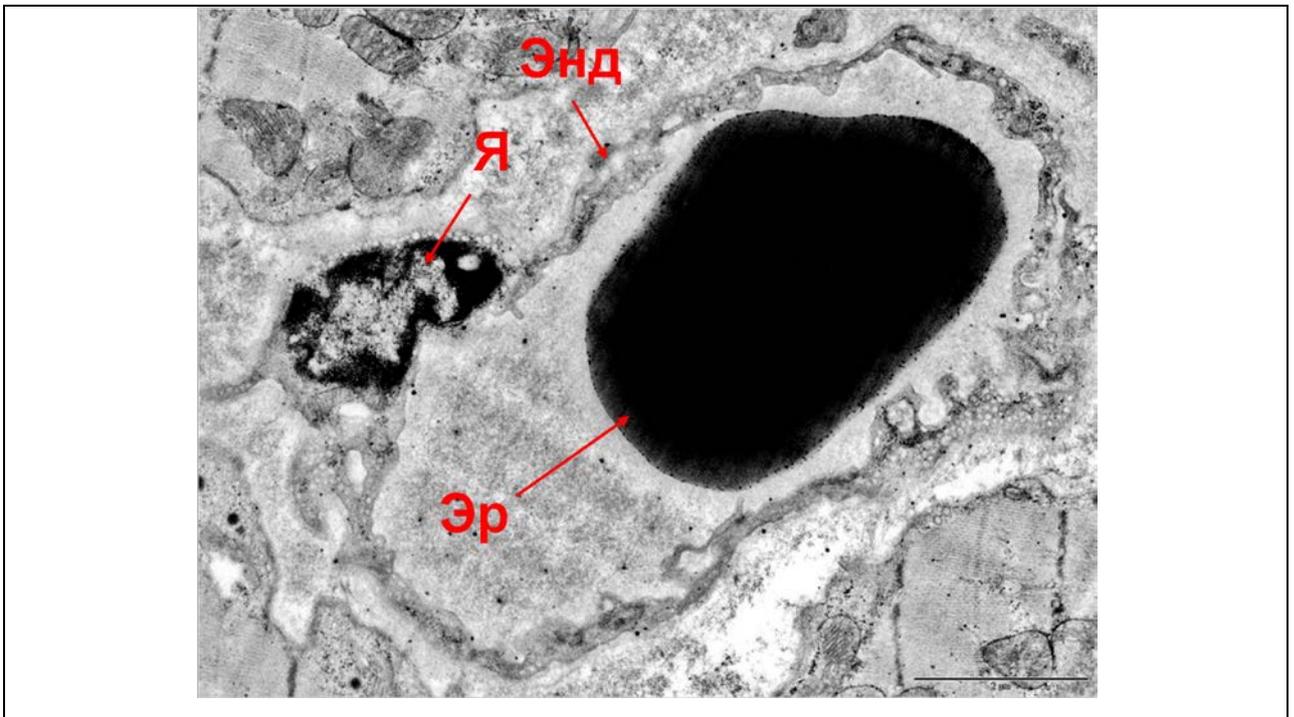
**Рис. 32.** Изменение статистических и частотных показателей variability сердечного ритма через 60 суток восстановительного периода (ВП).

\* - различия статистически значимы относительно интактной серии по критерию Манна-Уитни ( $p \leq 0,05$ ).

### 3.4. Структурно-функциональные изменения миокарда и секреторная активность эндокринных кардиомиоцитов после острой гипоксии в восстановительном периоде с применением мексидола

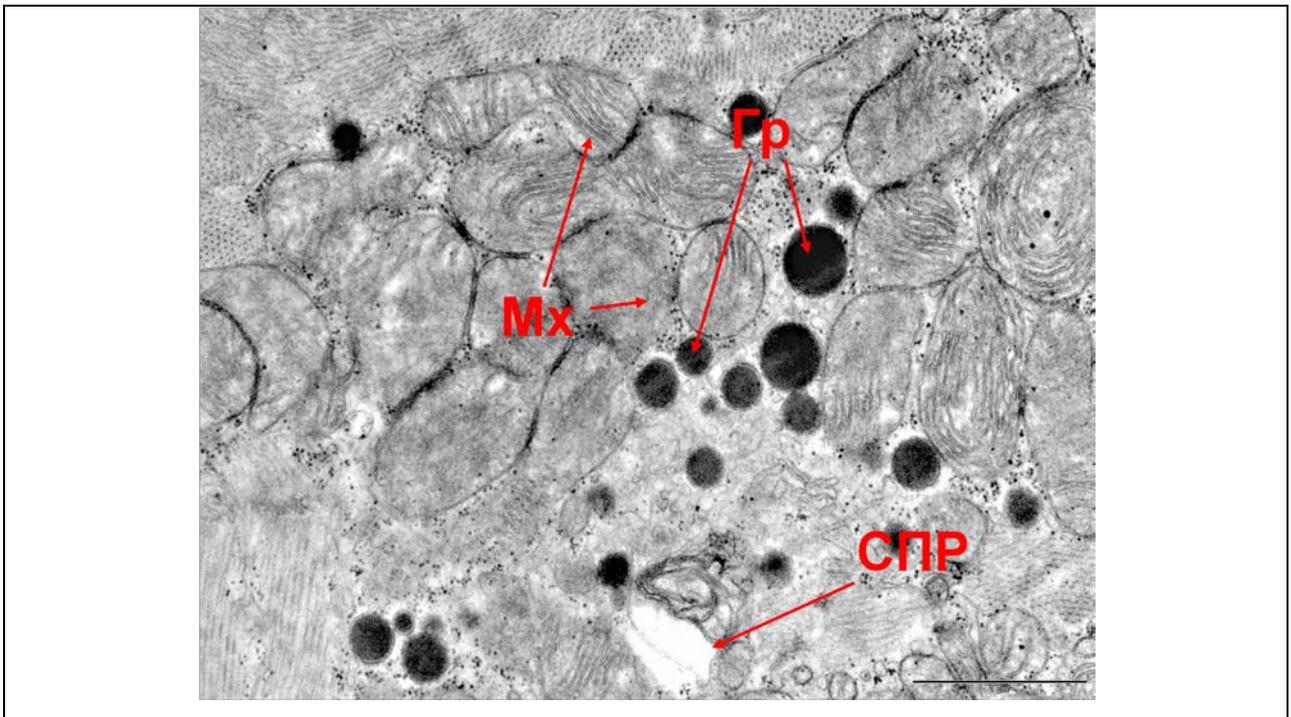
Изучали влияние мексидола на структуру миокарда и продукцию МНП эндокринными кардиомиоцитами правого предсердия. Препарат вводили животным внутривентриально в течение первого часа после острой гипоксии в дозе 25 мг/кг каждые 20 минут (3-хкратно).

**Через 60 минут ВП с применением мексидола** ультраструктурный анализ миокарда правого предсердия выявил отличия в микроциркуляторном русле относительно группы сравнения (60 минут ВП). В эндотелии гемокапилляров отмечается большое число пиноцитозных пузырьков. Эритроциты в их просвете располагаются свободно и не встречаются в соединительной ткани (рис. 33), что указывает на сохранность сосудистой стенки.



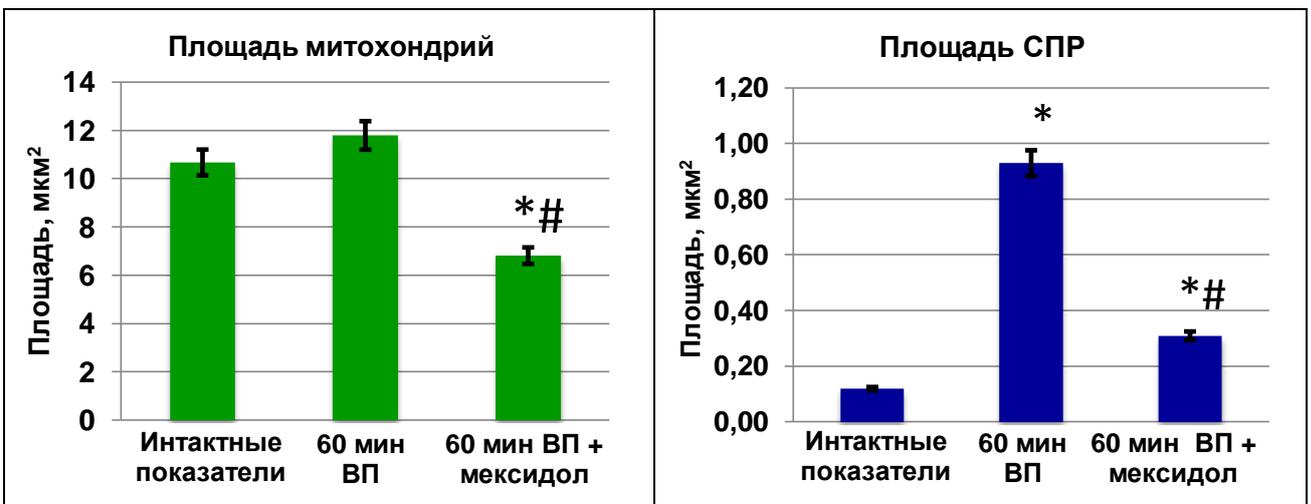
**Рис. 33.** Микроциркуляторное русло миокарда через 60 минут восстановительного периода с применением мексидола. Увеличение X14000. Энд - эндотелий капилляра, Эр - эритроцит, Я - ядро эндотелиоцита.

В эндокринных кардиомиоцитах правого предсердия отмечена бóльшая сохранность мембранных структур относительно группы сравнения (60 минут ВП). Выявлено незначительное просветление матрикса митохондрий, саркоплазматический ретикулум (СПР) менее расширен, чем в контроле (рис. 34).



**Рис. 34.** Ультраструктура кардиомиоцита через 60 минут восстановительного периода с применением мексидола. Увеличение X28000.  
Гр - секреторные гранулы с иммунореактивной меткой к МНП, Мх - митохондрии, СПР - саркоплазматический ретикулум.

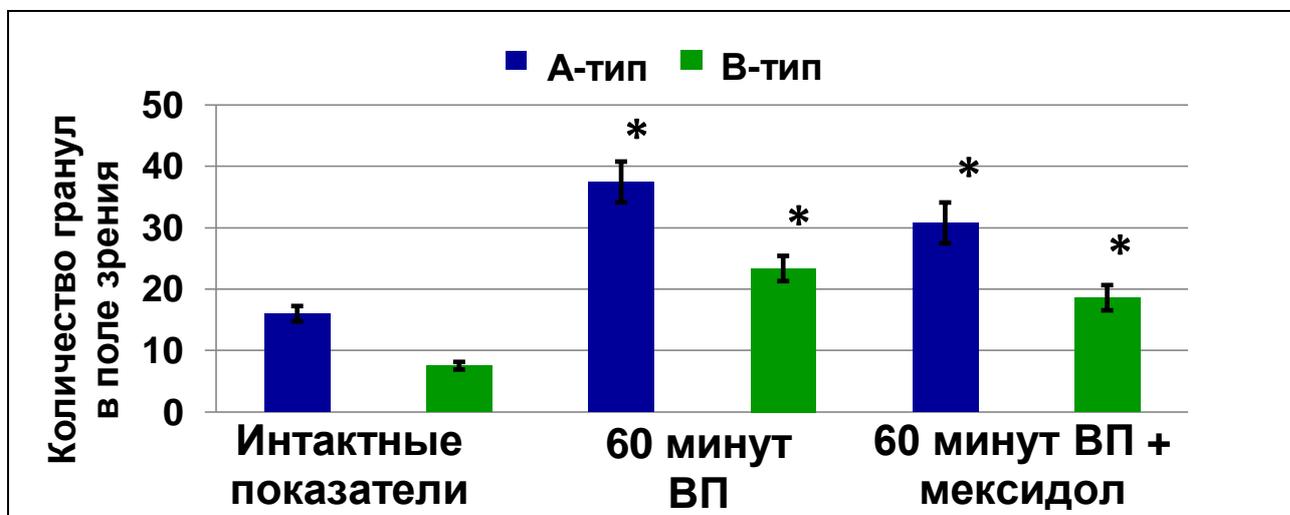
Общая площадь, занятая митохондриями и СПР, уменьшилась относительно группы сравнения (рис. 35, таблица 6 в приложении).



**Рис. 35.** Изменение общей площади митохондрий и СПР кардиомиоцитов правого предсердия в раннем восстановительном периоде (ВР) с применением мексидола (планки погрешностей -  $\pm m$ ).

\* - различия статистически значимы относительно интактной серии и # - относительно группы сравнения (60 минут ВР) по критерию Манна-Уитни ( $p \leq 0,05$ ).

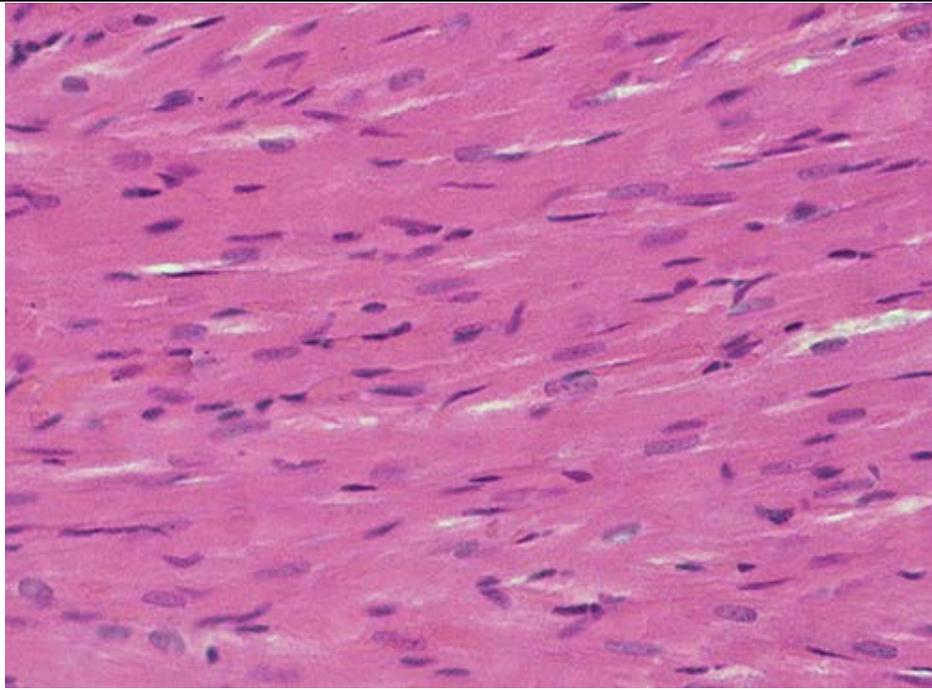
На этом фоне изменения продукции МНП в эндокринных кардиомиоцитах правого предсердия не выявлено, так как количество гранул А- и В-типов с пептидом не отличается от группы сравнения (60 минут ВП) (рис. 36, таблица 5 в приложении).



**Рис. 36.** Соотношение количества секреторных гранул, содержащих МНП, у интактных животных и животных в раннем восстановительном периоде (ВП) с применением мексидола (планки погрешностей -  $\pm m$ ).

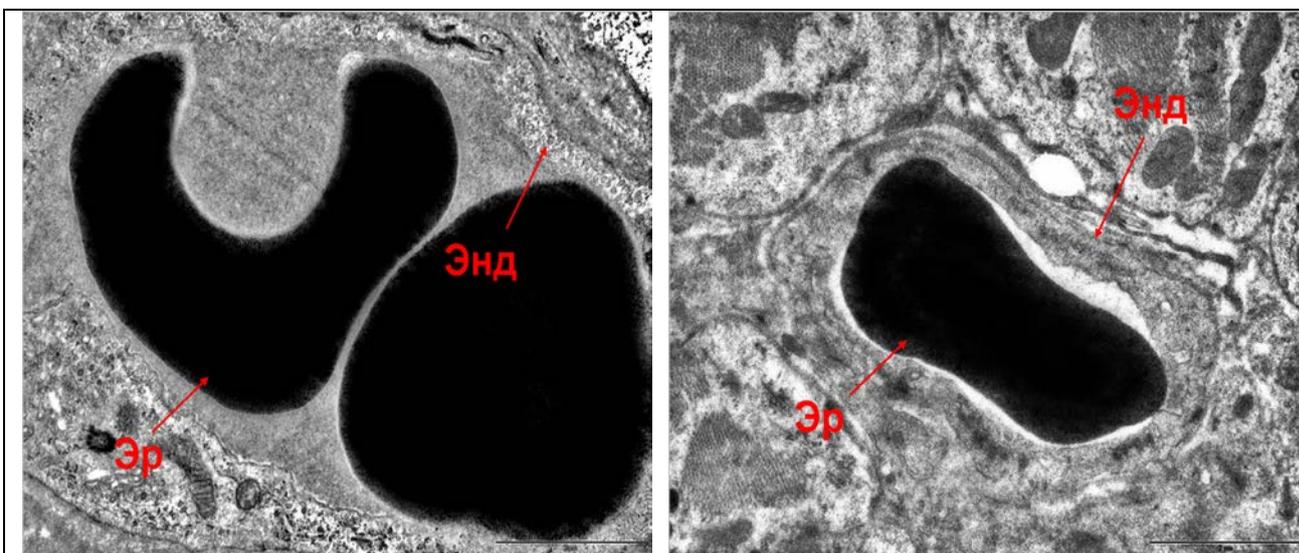
\* - различия статистически значимы относительно интактной серии и (60 минут ВП) по критерию Манна-Уитни ( $p \leq 0,05$ ).

Структурный анализ миокарда левого желудочка, окрашенного гематоксилином и эозином, через 60 минут ВП с применением мексидола, не обнаружил изменений в ткани относительно группы сравнения (60 минут ВП). Саркоплазма кардиомиоцитов окрашена равномерно. Мышечные волокна плотно прилегают друг к другу. В большинстве сосудов микроциркуляторного русла отсутствует гемостаз (рис. 37).



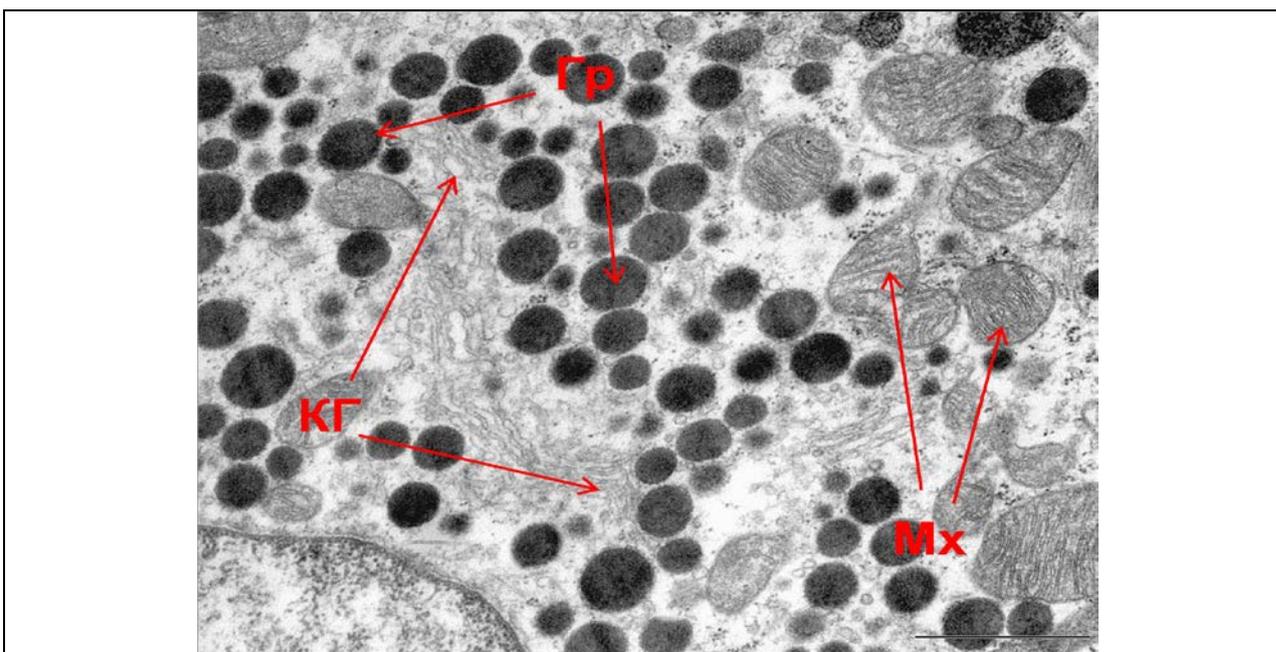
**Рис. 37.** Миокард левого желудочка через 60 минут восстановительного периода с применением мексидола. Окраска гематоксилином и эозином. Увеличение X400.

**Через 60 суток ВП с применением мексидола,** ультраструктурный анализ миокарда правого предсердия выявил отличия в гемокапиллярах по сравнению с группой сравнения (60 суток ВП). В большинстве сосудов эритроциты располагаются свободно, в единичных случаях выявляется их агрегация. В отличие от группы сравнения перикапиллярное пространство не расширено, эритроциты в соединительной ткани не обнаруживаются (рис. 38).



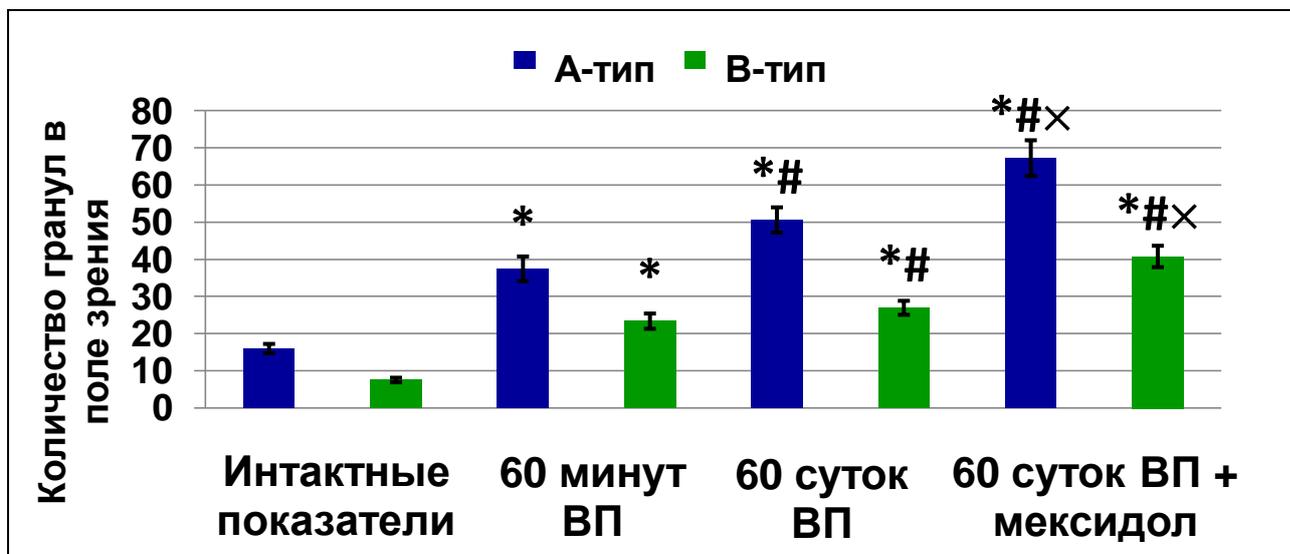
**Рис. 38.** Гемокапилляры миокарда через 60 суток восстановительного периода с применением мексидола. Увеличение X5600.  
Энд - эндотелий, Эр - эритроцит.

В эндокринных кардиомиоцитах правого предсердия отмечается гипертрофия комплекса Гольджи, сохранение ультраструктуры большинства митохондрий. Деструктивные изменения в кардиомиоцитах отсутствуют (рис. 39).



**Рис. 39.** Ультраструктура кардиомиоцитов через 60 суток восстановительного периода с применением мексидола. Увеличение X18000.  
Гр - секреторные гранулы с иммунореактивной меткой к МНП, КГ - комплекс Гольджи, Мх - митохондрии.

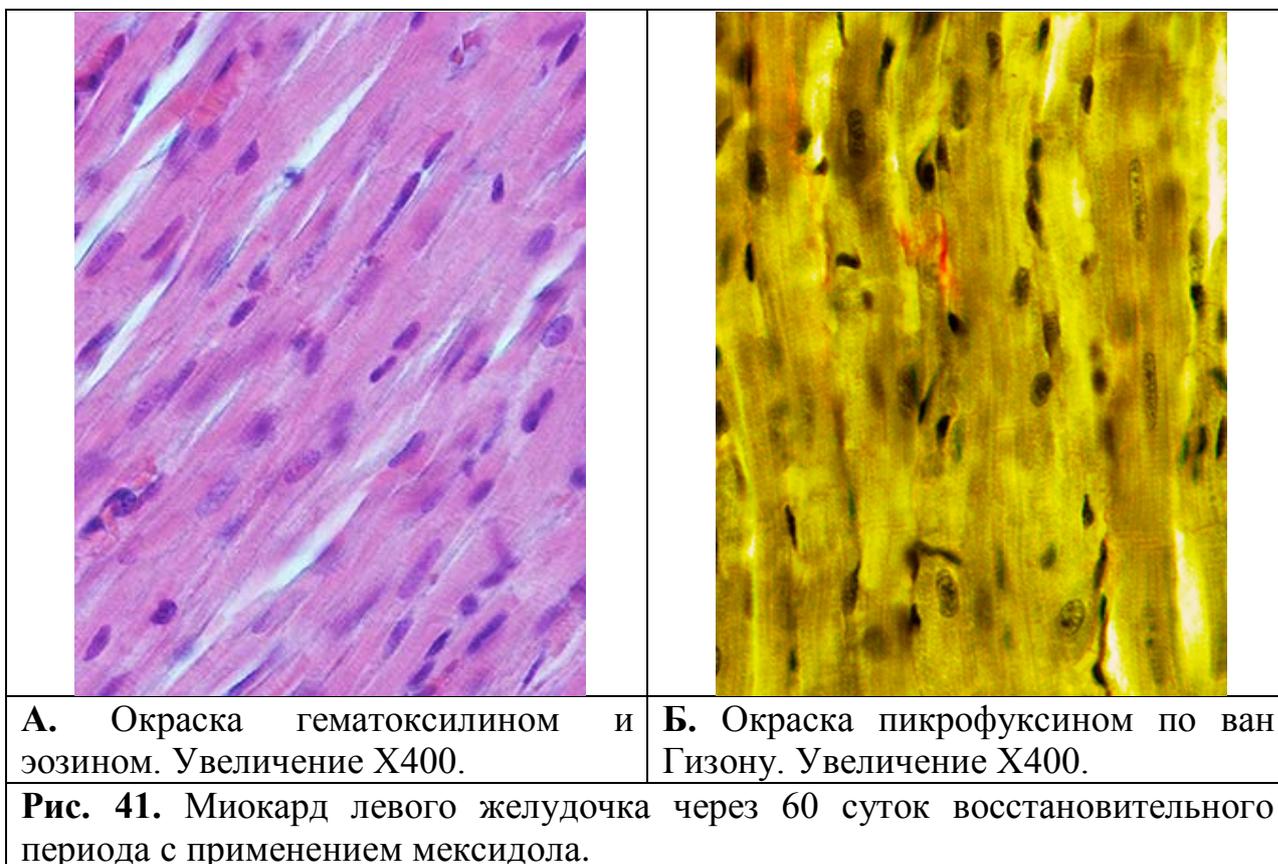
Выявлено увеличение продукции МНП относительно группы сравнения (60 суток ВП). Содержание секреторных гранул А - типа возросло на 33%, гранул В - типа на 51% (рис. 40, таблица 5 в приложении).



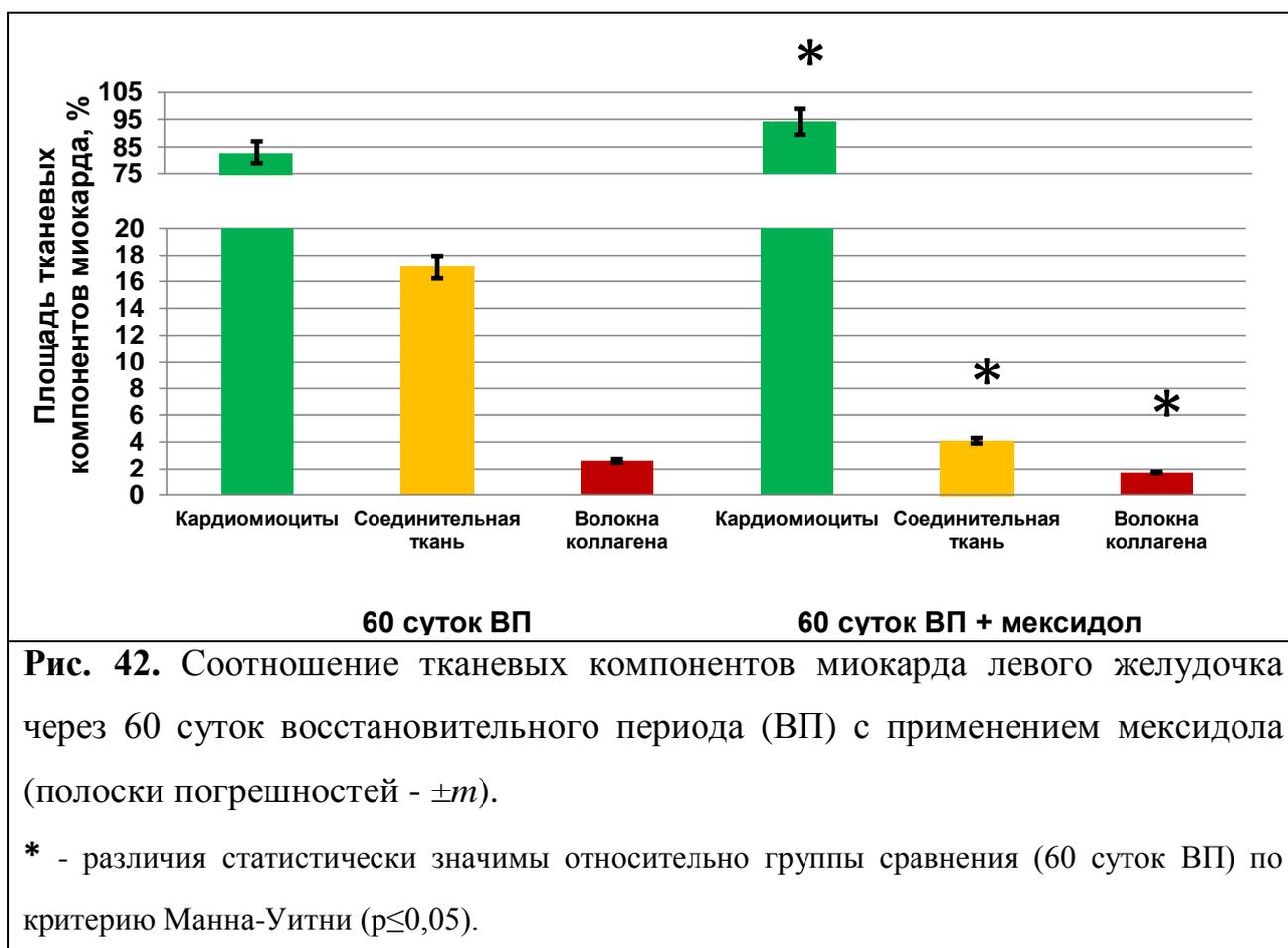
**Рис. 40.** Соотношение количества секреторных гранул, содержащих МНП, у интактных животных и животных в отдаленном восстановительном периоде (ВП) с применением мексидола (планки погрешностей -  $\pm m$ ).

\* - различия статистически значимы относительно интактной серии, # - относительно раннего ВП (60 минут ВП), x - относительно группы сравнения (60 суток ВП) по критерию Манна-Уитни ( $p \leq 0,05$ ).

Микроскопическое исследование миокарда левого желудочка, окрашенного гематоксилином и эозином, показало значительные отличия в структуре ткани относительно группы сравнения. Окраска кардиомиоцитов равномерная, без просветления саркоплазмы. Клеток с гипертрофией не выявлено. Визуально ткань миокарда соответствует интактной серии. В гемокапиллярах отсутствует агрегация форменных элементов крови. Сосудистая стенка сохраняет свою целостность. Эритроциты в ткани не обнаруживаются (рис. 41 А).



Окраска пикрофуксином по ван Гизону выявила тонкие прослойки рыхлой волокнистой соединительной ткани в миокарде левого желудочка (рис. 41Б). Суммарная площадь соединительной ткани уменьшилась относительно группы сравнения (60 суток ВП) на 13%, площадь зрелых коллагеновых волокон в её составе достоверно не отличалась от интактных показателей, а площадь, занятая кардиомиоцитами увеличилась на 13% по сравнению с группой без введения мексидола (рис. 42, таблица 7 в приложении).



## Глава 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ ИССЛЕДОВАНИЯ

### 4.1. Секреторная активность эндокринных кардиомиоцитов в раннем и отдаленном восстановительном периоде после острой гипоксии

Через 5 минут восстановительного периода (ВП), в нашем исследовании выявлена агрегация эритроцитов и тромбоцитов в гемокапиллярах миокарда правого предсердия и расширение перикапиллярного пространства. В большинстве эндокринных кардиомиоцитов отмечается сохранность ультраструктуры. В некоторых клетках выявляются адаптивные реакции, такие как гиперплазия митохондрий, просветление их матрикса, расширение саркоплазматического ретикулума (СПР) и единичные расхождения вставочных дисков. Согласно данным литературы, морфологические изменения в миокарде в условиях раннего постреперфузионного периода носят компенсаторный характер и являются обратимыми [Неговский и др., 1987, Лебкова, 1991, Гуревич, 1992,

Дьячук, 1992, Фомин, Белоусов, 1992, Постнов, 2001, Чеснокова, 2004]. Причиной таких изменений выступает дефицит кислорода и энергетических субстратов, что снижает интенсивность окислительных процессов и приводит к дефициту АТФ [Румянцев, 1982, Чернух и др., 1984, Мусил, 1985, Сперелакис, Форбс, 1990]. Из данных литературы известно, что митохондрии обладают наибольшей морфологической изменчивостью. Их умеренное набухание является ответом на недостаточное образование АТФ, вследствие разобщения процессов окисления и фосфорилирования в условиях раннего ВП [Сперелакис, Форбс, 1990]. Выявленное нами расширение саркоплазматического ретикулума, по-видимому, свидетельствует о защитных процессах в кардиомиоцитах, поскольку известно, что расширение канальцев СПР способствует усилению обмена кальция и выведению из клетки продуктов метаболизма, а также разрушенных внутриклеточных структур, освобождая ее от балластных веществ и уменьшая степень дистрофических изменений клетки [Сперелакис, Форбс, 1990]. Выявленное через 5 минут ВП расхождение вставочных дисков, по мнению исследователей, можно отнести к способности сердца заживлять повреждение [Сперелакис, Форбс, 1990]. Эта реакция обусловлена, разобщением клеток вследствие увеличения сопротивления нексусов [Полунин, Митрохина, 1985] и предотвращает утечку содержимого нормальных клеток через нексус в поврежденную клетку и, далее в межклеточный матрикс, что препятствует распространению повреждения среди кардиомиоцитов [Сперелакис, Форбс, 1990]. Можно заключить, что энергетический кризис в раннем ВП возникает вследствие нарушения кровообращения в миокарде и носит обратимый характер.

Анализ миокарда левого желудочка на светооптическом уровне не выявил выраженных отличий в структуре клеток относительно интактных показателей. В микроциркуляторном русле отмечался гемостаз, что соответствует морфологической картине, выявленной при оценке правого предсердия.

Таким образом, **через 5 минут** после восстановления кровообращения в миокарде преобладали компенсаторно-приспособительные реакции.

На этом фоне в эндокринных кардиомиоцитах правого предсердия не выявлено изменений секреторной активности, поскольку продукция мозгового натрийуретического пептида (МНП) не отличалась от интактных показателей. Данные литературы о продукции МНП противоречивы. С одной стороны, большинство исследований указывает на увеличение накопления и выведения МНП в отдаленные сроки после стимуляции его продукции различными факторами и отмечается необходимость сохранения такого воздействия длительное время. Так, Ramos с соавторами показали, что мРНК, несущая информацию о пептиде, экспрессируется только через 15 минут после начала реперфузии [Ramos et al., 2009]. С другой стороны, есть данные, указывающие на быструю реакцию МНП при воздействии факторов, способных стимулировать его продукцию [Ogawa, de Bold, 2014]. При этом одним из основных стимулов, приводящих к увеличению накопления и выведения пептида, считается повышение артериального давления (АД) [Голухова, Алиева, 2007, De Bold A.J., 2011]. Нами установлено, что через 5 минут ВП происходит увеличение показателей вариабельности сердечного ритма (ВСР): низкочастотной компоненты LF, высокочастотной HF и общей мощности спектра TP. По данным литературы изменение показателей ВСР служит достоверным критерием оценки активности симпато-адреналовой, ренин-ангиотензин-альдостероновой и гипоталамико-надпочечниковой систем [Manfrini, et al., 2004], которые являются одним из путей увеличения функционального статуса организма в восстановительном периоде. Известно, что активация данных систем приводит к явлению гипердинамии сердечно-сосудистой системы [Неговский и др., 1987], которая способствует прогрессированию повреждения кардиомиоцитов, но, в то же время, оказывается полезной для организма в целом, так как приводит гемодинамику в соответствие с его потребностями в начале ВП [Бугрова и др., 2012]. В

работах с использованием экспериментальной модели, аналогичной настоящему исследованию, показано, что через 5 минут ВП происходит кратковременное повышение АД [Мухина, Куликов, 2007]. По-видимому, активация центрального пути регуляции сердечного ритма также приводила к кратковременному повышению артериального давления и в нашем исследовании. Однако резкое увеличение АД в эти сроки не оказывало влияния на эндокринную активность секреторных кардиомиоцитов правого предсердия.

Таким образом, **через 5 минут ВП** после острой гипоксии в миокарде не происходит выраженных морфологических изменений, способных оказывать влияние на секреторный аппарат сердца и изменять продукцию МНП. Резкое повышение артериального давления через 5 минут ВП происходит в результате активации симпатической нервной системы, но также не приводит к изменению продукции МНП в кардиомиоцитах правого предсердия. Это согласуется с данными литературы о необходимости длительного воздействия стимулов на продукцию МНП и более поздние сроки активации этого процесса.

Анализ ультраструктуры миокарда правого предсердия **через 60 минут ВП** после острой гипоксии выявил улучшение кровообращения и транспортных процессов в ткани. Это подтверждалось увеличением количества гемокapилляров со свободным расположением эритроцитов и отсутствием тромбоцитов в их просвете, большим числом пиноцитозных пузырьков в эндотелии. При этом сохранявшийся в части гемокapилляров гемостаз свидетельствовал о том, что полного восстановления кровообращения в микроциркуляторном русле не происходило. Морфологические изменения в эндокринных кардиомиоцитах сохраняли адаптивный характер и выражались в просветлении матрикса митохондрий, гипертрофии комплекса Гольджи и расширении саркоплазматического ретикулума (СПР). Морфометрическая оценка общей площади митохондрий не выявила отличий от интактных показателей, а площадь СПР увеличилась в

8 раз, что может свидетельствовать о значительном усилении процессов внутриклеточной репарации, транспорта, а также увеличении интенсивности кальциевого обмена [Сперелакис, Форбс, 1990]. Гипертрофия комплекса Гольджи, по-видимому, указывает на усиление синтетических процессов в кардиомиоцитах.

Светооптический анализ миокарда левого желудочка не выявил отличий в структуре ткани относительно 5 минут ВП. Вероятно, это связано с тем, что основные процессы адаптации миокарда в условиях раннего ВП происходят на уровне ультраструктур и для возникновения выраженных изменений в ткани требуются более длительные сроки восстановительного периода.

Оценка продукции мозгового натрийуретического пептида **через 60 минут ВП** выявила увеличение числа гранул А- и В-типов с иммунореактивной меткой к пептиду, что свидетельствует об увеличении синтетической активности секреторного аппарата сердца. Анализ данных литературы показал, что на сегодняшний день отсутствуют сведения о влиянии морфологических изменений в миокарде на накопление и выведение МНП, хотя известно, что кардиомиоциты являются основным источником пептида в организме [Ogawa, de Bold, 2014]. Установлено, что в постреперфузионном периоде на продукцию натрийуретических пептидов в организме могут оказывать влияние ряд факторов, активирующихся в результате остановки кровообращения. Одним из таких факторов является HIF-1 $\alpha$  (hypoxia inducible factor), который запускает промотор в последовательности, кодирующей МНП, и стимулирует транскрипцию его мРНК [Ramos et al., 2009]. Кроме того, в исследованиях De Bold [De Bold, 2011], показано, что в условиях дефицита кислорода при остановке кровообращения, происходит захват ионов Ca<sup>2+</sup> в саркоплазматический ретикулум посредством активации K<sup>+</sup>-зависимых кальциевых каналов, расположенных на его мембране. При этом автор отмечает, что данный процесс способствует увеличению продукции другого натрийуретического

пептида - предсердного (ПНП), который демонстрирует сходные с МНП эффекты и использует одни и те же клеточные рецепторы для их реализации. В предыдущих работах с использованием этой же экспериментальной модели нами показано, что оба пептида совместно накапливаются и хранятся в секреторных гранулах предсердных кардиомиоцитов [Рахчеева, Бугрова, 2010, Ogawa, de Bold, 2014]. Также было выявлено значительное увеличение числа секреторных гранул, содержащих ПНП на 60 минут ВП [Бугрова и др., 2012]. В представленной работе продемонстрирована такая же реакция МНП в аналогичные сроки эксперимента [Абросимов и др., 2015]. Проведенный в данном исследовании морфологический анализ эндокринных кардиомиоцитов правого предсердия выявил многократное увеличение площади саркоплазматического ретикула по сравнению с интактными показателями. Учитывая особое значение СПР во внутриклеточном транспорте  $Ca^{2+}$ , [Сперелакис, Форбс, 1990] и стимулирующем действии обратного захвата ионов  $Ca^{2+}$  в саркоплазматический ретикулум на продукцию натрийуретических пептидов [De Bold, 2011], можно предположить, что в нашем эксперименте расширение СПР сопровождалось притоком в него ионов  $Ca^{2+}$ , что наряду с активацией таких факторов как HIF-1 $\alpha$ , могло выступать одним из стимулов увеличения эндокринной активности секреторных кардиомиоцитов **через 60 минут ВП после острой гипоксии**. Таким образом, активация продукции МНП секреторных гранул кардиомиоцитов правого предсердия происходит через 60 минут ВП и говорит в пользу данных литературы о более медленном ответе МНП на различные факторы и необходимости длительного их воздействия [Ogawa, de Bold, 2014].

Проведенный анализ вариабельности сердечного ритма показал снижение статистических и частотных показателей сердечного ритма (RRcp, SDNN, CV, TP, VLF) относительно 5 минут ВП, что свидетельствует о децентрализации вегетативной регуляции работы сердечно-сосудистой системы и переходе на интракардиальный путь контроля функций сердца [Бугрова М.Л. и др., 2012]. Из литературы известно, что в эти сроки

артериальное давление понижается [Мухина, Куликов, 2007]. Учитывая уменьшение показателей ВСП через 60 минут ВП можно предположить, что в нашей работе АД также снижалось и поэтому не могло влиять на секреторную активность эндокринных кардиомиоцитов.

Таким образом, увеличение продукции МНП в эндокринных кардиомиоцитах правого предсердия **через 60 минут ВП** свидетельствует об отсроченной активации накопления и выведения пептида после стрессорного воздействия на организм. В раннем восстановительном периоде влияние факторов, связанных с центральным путем регуляции сердечного ритма на продукцию МНП отсутствует, а одними из стимулов этого процесса может выступать повышение концентрации ионов  $Ca^{2+}$  в саркоплазматическом ретикулуме и активация  $HIF-1\alpha$ .

Нами показано, что **через 60 суток** после возобновления кровообращения наблюдается восстановление микроциркуляции в миокарде правого предсердия, что подтверждается преимущественно свободным расположением форменных элементов крови в просвете гемокапилляров. Вместе с этим, в соединительной ткани вокруг гемокапилляров обнаруживалось большое количество волокон коллагена. Можно предположить, что увеличение площади соединительной ткани, несмотря на восстановление микроциркуляции через 60 суток ВП, снижало эффективность транспорта веществ и кислорода к кардиомиоцитам. Дефицит трофического обеспечения в миокарде правого предсердия проявлялся в увеличении числа эндокринных кардиомиоцитов с глубокими структурными нарушениями: образование большого числа вакуолей в клетках, вторичных лизосом, и набухание митохондрий, расширение саркоплазматического ретикулума (СПР). В отличие от показателей раннего восстановительного периода (5 минут ВП) выявляется большее число расхождений вставочных дисков, что, как отмечалось ранее, препятствовало выходу содержимого интактных клеток в поврежденные, способствуя сохранности ткани миокарда [Сперелакис,

Форбс, 1990]. Образование большого числа лизосом, свидетельствует об интенсивных процессах утилизации поврежденных компонентов кардиомиоцитов, а образование множества вакуолей связано с повреждением мембран лизосом и высвобождением протеолитических ферментов, приводящих к лизису компонентов клеток [Кожура и др., 1976, Кулагин, 1978, Taylor, 1969]. По данным авторов этот процесс связан со снижением pH в результате накопления кислых продуктов обмена: молочной кислоты, кетоновых тел и ацетона. Как отмечается в литературе, одним из повреждающих факторов в отдаленном ВП является усиление перекисного окисления липидов (ПОЛ) [Suzuki, et al., 2000, Maksimovich, et al., 2005]. Установлено, что этот процесс в частности приводит к повреждению структуры митохондрий и нарушению их энергообразующей функции [Владимиров и др., 1976, Габитов, Карагезян, 1981, Lee P.Y. et al., 1982, Litvitskiy, 2002, Dolgikh, et al., 2005, Andreeva, et al., 2009]. Известно, что набухание митохондрий способствует увеличению их функции, но только до тех пор, пока не нарушены предельно допустимые пространственные взаимоотношения ее структурных элементов [Сперелакис, Форбс, 1990]. Набухание и увеличение числа митохондрий в нашем исследовании явилось следствием приспособительных реакций кардиомиоцитов в условиях дефицита кислорода. Данный процесс был обусловлен нарушением транспорта из сосудов микроциркуляторного русла к клеткам в результате увеличения площади соединительной ткани в миокарде. Аналогичные деструктивные процессы выявлялись в левом желудочке. Структурный анализ миокарда при окраске по ван Гизону установил увеличение суммарной площади соединительной ткани до 17% относительно интактных показателей, площадь, занятая коллагеновыми волокнами в её составе возросла более чем в 2 раза. Площадь, занятая кардиомиоцитами при этом уменьшилась на 14%.

Таким образом, после кратковременной 10-минутной остановки кровообращения, на 60-е сутки ВП, в миокарде правого предсердия и левого желудочка наблюдаются структурные нарушения. Деструктивные изменения

проявляются в увеличении площади соединительной ткани миокарда и повреждении внутриклеточных структур эндокринных кардиомиоцитов. Полученные данные свидетельствуют о том, что кратковременное нарушение кровоснабжения сердца является существенным повреждающим фактором, эффект от которого проявляется в отдаленные сроки восстановительного периода.

В настоящей работе показано, что **через 60 суток ВП** эндокринная активность секреторных кардиомиоцитов продолжает увеличиваться, о чем свидетельствует возрастание числа секреторных гранул А- и В-типов, содержащих МНП. Как было отмечено ранее, полученные результаты согласуются с данными литературы о медленной реакции МНП в ответ на воздействие факторов, способных стимулировать его продукцию. Как и через 60 минут ВП, продукцию МНП в отдаленные сроки после острой гипоксии мог стимулировать HIF-1 $\alpha$ . Кроме того, в нашем исследовании показано достоверное соответствие всех показателей variability сердечного ритма интактному уровню, что свидетельствует о восстановлении центрального звена вегетативной регуляции работы сердечно-сосудистой системы. Из литературы известно, что через 60 суток ВП уровень артериального давления сохраняется повышенным относительно интактных показателей [Мухина, Куликов, 2007]. Вероятно, в отдаленном ВП активность симпато-адреналовой и ренин-ангиотензин-альдостероновой систем вызывала устойчивую гипертензию, которая могла выступать одним из факторов, стимулировавших продукцию МНП в эндокринных кардиомиоцитах правого предсердия в нашей работе.

В настоящем исследовании достоверно показано, что через 60 суток ВП площадь, занимаемая митохондриями, расположенными в субсарколеммальной области эндокринных кардиомиоцитов правого предсердия, увеличилась на 12% относительно интактных показателей. По данным литературы, в ответ на гипоксию миокарда, вызванную остановкой кровообращения, как адаптивная реакция на нехватку АТФ в кардиомиоцитах,

происходит захват  $\text{Ca}^{2+}$  в матрикс митохондрий посредством кальциевого унипортера (mitochondrial calcium uniporter), расположенного на их наружной мембране. Известно, что избыточный приток ионов кальция в митохондриальный матрикс приводит к гибели клетки [Pan et al., 2013]. Sun и соавторы установили, что в условиях ишемии/реперфузии МНП, путем блокировки кальциевого унипортера, препятствует входу больших доз  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии, что предохраняет клетку от гибели [Sun et al., 2010]. В исследовании Thireau и соавторов показано, что после инфаркта миокарда МНП препятствует обратному захвату ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондриальный матрикс [Thireau et al., 2012]. Увеличение площади, как отмечено ранее, происходило за счет гиперплазии митохондрий, набухания матрикса и вероятно сопровождалось притоком в него  $\text{Ca}^{2+}$ . Можно предположить, что увеличение продукции МНП в эндокринных кардиомиоцитах являлось адаптивной реакцией на вхождение избыточных доз  $\text{Ca}^{2+}$  в митохондрии для предотвращения их гибели и стабилизации синтетических процессов в клетках. Кроме того, через 60 суток ВП саркоплазматический ретикулум оставался расширенным и, несмотря на то, что его площадь была меньше, чем в раннем ВП (через 60 минут ВП), она превышала интактные показатели в 3 раза. Возможно, в данные сроки эксперимента, как и в раннем ВП, приток ионов  $\text{Ca}^{2+}$  в саркоплазматический ретикулум мог дополнительно стимулировать продукцию МНП.

Ещё одним стимулом секреторной активности эндокринных кардиомиоцитов в нашем исследовании могло являться увеличение площади соединительной ткани в миокарде правого предсердия и левого желудочка, поскольку доказано, что продукция МНП усиливается в ответ на этот процесс [Huntley, 2010].

Таким образом, через 60 суток ВП увеличение продукции мозгового натрийуретического пептида происходило на фоне увеличения общей площади митохондрий и саркоплазматического ретикулума в кардиомиоцитах правого предсердия относительно интактных показателей, увеличения

площади интерстициальной соединительной ткани и уменьшения площади, занятой кардиомиоцитами в миокарде левого желудочка вследствие их гибели.

#### **4.2. Секреторная активность эндокринных кардиомиоцитов в раннем и отдаленном восстановительном периоде после острой гипоксии с применением мексидола**

Препарат вводился экспериментальным животным в течение первого часа реперфузии дробно, каждые 20 минут. Было установлено, что через 60 минут ВП с применением мексидола происходит восстановление микроциркуляции и транспортных процессов в миокарде правого предсердия относительно контроля. Это подтверждалось свободным расположением эритроцитов в гемокапиллярах и большим количеством пиноцитозных пузырьков в эндотелии. При этом гемостаз в сосудах полностью отсутствовал, и эритроциты не обнаруживались в интерстициальной соединительной ткани, что указывает на сохранность гемокапилляров. Многочисленные исследования показывают высокую эффективность мексидола при восстановлении кровообращения в миокарде в восстановительном периоде [Лукьянова и др., 1990, Чернобаева и др., 1991, Гацура и др., 1996, Столярова, 2001, Андреева и др., 2005, Андреева, 2009]. В данной работе улучшение микроциркуляции в миокарде правого предсердия происходит уже через 60 минут ВП после острой гипоксии, что дополняет данные литературы о сроках воздействия препарата на сердечно-сосудистую систему в восстановительном периоде.

В эндокринных кардиомиоцитах правого предсердия отмечена бóльшая сохранность мембранных структур относительно группы сравнения (60 минут ВП). Выявлено незначительное просветление матрикса митохондрий, саркоплазматический ретикулум (СПР) был менее расширен. Общая площадь, занятая митохондриями и СПР уменьшилась относительно группы сравнения показателей. По данным литературы, мексидол за счет наличия в своем составе янтарной кислоты (сукцината) запускает

опосредованные вторичные метаболические пути в клетке и играет роль модулятора общего метаболизма организма [Лукьянова, 1999, Маевский, 2000, Заржецкий, Мутускина, 1994]. Антигипоксанта обладает прямым модифицирующим действием на физико-химическую характеристику липидного компонента мембран, способствует коррекции функций митохондрий и устраняет нарушения аэробного энергетического обмена [Лукьянова, 1999, Лукьянова и др., 1990, Андреева, 2009]. Известно, что сукцинат принимает активное участие в регуляции кальциевого обмена и медленнее всего выводится из мембран эндоплазматического ретикулума [Жердеев, 1986, Андреева, 2009]. Вероятно, уменьшение общей площади митохондрий и СПР, а также сохранность ультраструктуры эндокринных кардиомиоцитов в целом, было связано со способностью антигипоксанта стабилизировать клеточные мембраны, компенсировать дефицит энергетических субстратов в клетках и регулировать ионный транспорт.

Морфологическая оценка миокарда левого желудочка не выявила значимых отличий в структуре ткани от группы сравнения. По-видимому, эффекты мексидола через 60 минут после восстановления кровообращения проявляются только на ультраструктурном уровне.

В настоящем исследовании показано, что через 60 минут ВП с применением мексидола наблюдалось увеличение числа зрелых и растворяющихся форм гранул, содержащих МНП относительно интактных показателей. Вместе с этим, полученные данные достоверно не отличались от показателей через 60 минут ВП без препарата, что указывает на отсутствие влияния мексидола на секреторную активность эндокринных кардиомиоцитов в раннем восстановительном периоде. Можно предположить, что в эти сроки продукция МНП стимулировалась теми же факторами, которые приводили к увеличению числа гранул с пептидом через 60 минут ВП. Интересно отметить, что ранее, на этой же экспериментальной модели, нами исследовалось влияние антигипоксанта на продукцию предсердного натрийуретического пептида (ПНП) в кардиомиоцитах правого предсердия [Бугрова и др., 2014]. Было

установлено, что через 60 минут ВП происходило увеличение продукции ПНП в экспериментальной серии с введением препарата относительно группы сравнения без мексидола. По-видимому, антигипоксанта выступал фактором, дополнительно стимулировавшим образование секреторных гранул, содержащих ПНП. Возможно, такое различное влияние препарата на продукцию ПНП и МНП может свидетельствовать о неодинаковых механизмах запуска образования секреторных гранул предсердных кардиомиоцитов, содержащих пептиды. В литературе нет исследований, посвященных сравнению механизмов запуска продукции МНП и ПНП и неодинаковому воздействию антигипоксантов на их продукцию. Полученные в ходе нашей работы результаты свидетельствуют о необходимости проведения таких исследований в дальнейшем.

Таким образом, введение мексидола в течение первого часа реперфузии, способствовало сохранности ультраструктуры эндокринных кардиомиоцитов правого предсердия и улучшению в нем микроциркуляции по сравнению с группой сравнения. Антигипоксанта не повлиял на продукцию МНП в раннем восстановительном периоде (через 60 минут ВП), так как количество секреторных гранул, содержащих пептид, численно соответствовало группе сравнения (60 минут ВП).

В настоящем исследовании, в группе **через 60 суток ВП с применением мексидола**, в миокарде правого предсердия наблюдалось улучшение кровообращения по сравнению с группой сравнения (60 суток ВП). Эритроциты в большинстве сосудов располагались свободно, их агрегация в просвете гемокапилляров отмечалась в единичных случаях. Перикапиллярное пространство не было расширено, эритроциты в соединительной ткани не обнаруживались. В эндокринных кардиомиоцитах правого предсердия не было выявлено деструктивных изменений, которые наблюдались в группе сравнения. Отмечена сохранность мембранных структур кардиомиоцитов, что связано с кардиопротекторным и цитопротекторным действием мексидола

[Лукьянова и др., 1990, Чернобаева и др., 1991, Заржецкий, Мутускина, 1994, Гацура и др., 1996, Маевский, 2000, Столярова, 2001, Андреева и др., 2005, Андреева, 2009]. Сохранность ультраструктуры кардиомиоцитов правого предсердия и нормализация в нем кровообращения, по сравнению с группой сравнения в нашем исследовании, свидетельствует о положительном воздействии антигипоксанта на миокард в отдаленные сроки ВП. Кроме этого, в эндокринных кардиомиоцитах отмечалась гипертрофия комплекса Гольджи, что может указывать на усиление в них синтетических процессов.

При анализе миокарда левого желудочка, как и в миокарде правого предсердия, не выявлено деструктивных изменений в ткани. Морфологическая картина визуально соответствовала интактным показателям. Можно предположить, что цитопротекторное действие мексидола в условиях раннего восстановительного периода (60 минут ВП) способствовало сохранности кардиомиоцитов в отдаленные сроки после острой гипоксии.

Морфометрический анализ миокарда левого желудочка группы **через 60 суток ВП с мексидолом** выявил уменьшение площади рыхлой волокнистой соединительной ткани относительно группы сравнения (60 суток ВП) на 13%, площадь коллагеновых волокон в её составе достоверно не отличалась от интактных показателей, а площадь, занятая кардиомиоцитами увеличилась на 13% относительно 60 суток ВП, что вероятно связано с их гипертрофией. В литературе нет данных о воздействии препарата на продукцию компонентов соединительной ткани в миокарде в восстановительном периоде. Можно предположить, что сохранность большего количества кардиомиоцитов относительно группы сравнения способствовало уменьшению площади коллагеновых волокон и других соединительнотканых компонентов в опытной серии.

В группе с **применением мексидола, через 60 суток ВП**, выявлено увеличение секреторной активности эндокринных кардиомиоцитов по сравнению со всеми экспериментальными группами, что подтверждалось увеличением числа гранул А- и В-типов, содержащих МНП. Из литературы

известно, что препарат способен напрямую влиять на синтетический аппарат клетки за счет наличия в своем составе янтарной кислоты (ЯК). Как отмечалось ранее, этот компонент корректирует функции митохондрий, предупреждает и устраняет нарушение аэробного энергетического обмена за счет активации альтернативного NADH-оксидазного сукцинатоксидазного окислительного пути [Маевский и др., 2005]. ЯК, в составе препарата, способна обеспечивать протекание АТФ-азных реакций, способствовать окислению накапливающихся продуктов гликолиза,  $\beta$ -окислению и кетогенезу и, поступая в цитоплазму клеток, выступать в качестве экзогенного источника энергии [Маевский и др., 2005, Андреева, 2009, Замотаева и др., 2013]. Вероятно, в нашем исследовании мексидол оказывал прямое пролонгированное действие на синтетический аппарат кардиомиоцитов, стимулируя в них продукцию МНП через 60 суток ВП. С другой стороны, по данным ряда исследований, мозговой натрийуретический пептид играет важную роль в процессах ремоделирования миокарда у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями [Watson, Phelan, et al, 2012]. Показано подавление пептидом синтеза коллагена, усиление действия металлопротеиназ и снижение пролиферативной активности фибробластов сердца [Huntley, Ichiki, et al, 2010]. Можно предположить, что в нашем исследовании антигипоксикант, способствуя восстановлению микроциркуляции в миокарде и сохранности ультраструктуры кардиомиоцитов правого предсердия на 60-е сутки ВП, стимулировал продукцию МНП, который, в свою очередь, дополняя кардиопротекторное действие препарата, приводил к уменьшению количества соединительнотканых компонентов в миокарде и способствовал сохранению большего числа кардиомиоцитов относительно группы сравнения (60 суток ВП).

Таким образом, показано, что острая гипоксия миокарда приводит к структурным нарушениям кардиомиоцитов и развитию кардиосклероза в отдаленные сроки восстановительного периода. В ответ на это, в эндокринных кардиомиоцитах происходит увеличение накопления и выведения МНП. В

группе с применением мексидола, через 60 суток ВП, ультраструктура предсердных миоцитов восстанавливается, но не возвращается к интактному уровню. В связи с этим в миокарде правого предсердия продукция МНП продолжает увеличиваться. При этом повышенное гранулообразование не сопровождается необратимыми структурными изменениями в миокарде и развитием кардиосклероза, который является главной причиной нарушения электрической активности сердца [Moghtadaei, 2016]. По данным Huntley и соавторов [Huntley, Ichiki, et al., 2010], МНП подавляет синтез коллагена и снижает пролиферативную активность фибробластов сердца, что препятствует увеличению в нем соединительной ткани. Уменьшение соединительнотканного компонента миокарда и восстановление показателей variability сердечного ритма в группе с мексидолом до уровня близкого к интактному в нашей работе, указывает на сохранение препаратом ультраструктуры эндокринных кардиомиоцитов, интенсивно продуцирующих МНП, который мог оказывать антисклеротический и антиаритмогенный эффекты. Полученные результаты дают основание для дальнейшего исследования взаимодействия натрийуретических пептидов, вырабатываемых в эндокринных кардиомиоцитах, с кардиологическими лекарственными средствами.

## ВЫВОДЫ

1. После острой гипоксии через 5 минут восстановительного периода большинство секреторных кардиомиоцитов правого предсердия сохраняют свою ультраструктуру при нарушении микроциркуляции. Продукция мозгового натрийуретического пептида в миоцитах правого предсердия не изменяется: количество секреторных гранул А- и В-типов не отличается от интактного контроля. Процессы происходят при увеличении показателей variability сердечного ритма: RR-интервала на 56%, SDNN - 28%, HF - 44%, LF - 73% и TP на 22% от исходных значений.

2. Через 60 минут восстановительного периода после острой гипоксии происходит усиление синтетической активности секреторных кардиомиоцитов, проявляющееся в возрастании числа гранул, содержащих мозговой натрийуретический пептид (А-типа на 134%, В-типа на 210%), и увеличении площади саркоплазматического ретикулума по сравнению с интактными показателями. Процессы наблюдаются на фоне восстановления микроциркуляции в миокарде. Происходит снижение показателей variability сердечного ритма: CV на 63%, SDNN - 57%, VLF - 32% и TP на 21% от исходного уровня.

3. После острой гипоксии через 60 суток восстановительного периода в секреторных кардиомиоцитах увеличивается гранулообразование: количество гранул с мозговым натрийуретическим пептидом А-типа возрастает на 216%, В-типа - на 258% по сравнению с показателями интактного контроля. В миокарде увеличивается площадь соединительной ткани, доля зрелых коллагеновых волокон в её составе. Показатели variability сердечного ритма значимо не отличаются от интактных.

4. Мексидол, введенный в течение первого часа восстановительного периода после острой гипоксии, не влияет на продукцию мозгового натрийуретического пептида секреторными кардиомиоцитами, при сохранности их ультраструктуры и улучшении микроциркуляции в правом

предсердии в раннем восстановительном периоде, относительно группы сравнения (60 минут восстановительного периода).

5. Мексидол, введённый в течение первого часа после острой гипоксии, сохраняет ультраструктуру эндокринных кардиомиоцитов в раннем восстановительном периоде и через 60 суток способствует увеличению продукции мозгового натрийуретического пептида. Количество гранул А-типа возрастает на 33%, В-типа - на 51% относительно группы сравнения (60 суток восстановительного периода).

# *Приложение*

Таблица 4

Изменение показателей variability сердечного ритма в раннем и отдаленном постреперфузионном периоде (данные представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего - *m*).

Показатели	Интактные животные	ВП		
		5 мин. ВП	60 мин. ВП	60 сут. ВП
RR <sub>ср</sub> , мс	157,24±6,46	<b>245,07±7,59*</b>	<b>182,30±8,25*</b>	151,4±9,68
CV, %	3,24±0,30	3,13±0,20	<b>1,19±0,10*</b>	3,54±0,75
SDNN, мс	5,16±1,12	<b>6,62±0,11*</b>	<b>2,20±0,31*</b>	5,29±1,08
HF, н.е.	4,32±0,41	<b>6,22±0,33*</b>	4,50±0,67	4,46±0,55
LF, н.е.	3,86±1,04	<b>6,68±1,07*</b>	3,87±0,84	3,9±1,11
VLF, н.е.	5,47±1,18	5,25±0,57	<b>3,74±0,74*</b>	5,76±1,07
TP, н.е.	6,15±1,01	<b>7,49±0,14*</b>	<b>4,83±0,21*</b>	6,17±1,07

\* - значения статистически отличаются от интактных показателей по критерию Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

Изменение количества секреторных гранул кардиомиоцитов правого предсердия, содержащих МНП в раннем и отдаленном постреперфузионном периоде.

	А-тип		В-тип
	М		
<u>1.</u> Интактные показатели	М	16,00	7,53
	<i>m</i>	1,247219	0,618281
<u>2.</u> 5 мин. ВП	М	18,67 P1=0,187502	7,87 P1=0,754919
	<i>m</i>	1,599603	0,773777
<u>3.</u> 60 мин. ВП	М	<b>37,47*</b> P1=0,000002	<b>23,37*</b> P1=0,000000
	<i>m</i>	3,320689	2,055261
		P2=0,000190	P2=0,000002
<u>4.</u> 60 сут. ВП	М	<b>50,61*</b> P1=0,000000	<b>26,96*</b> P1=0,000000
	<i>m</i>	3,405698	1,887358
		P2=0,000001	P2=0,000000
		P3=0,011709	P3=0,304423
<u>5.</u> 60 мин. ВП + этилметилгидроксипиридина сукцинат	М	<b>30,80<sup>#</sup></b> P1=0,000001	<b>18,60<sup>#</sup></b> P1=0,000000
	<i>m</i>	2,223556	1,296537
		P2=0,000020	P2=0,000000
		P3=0,320190	P3=0,124392
<u>6.</u> 60 сут. ВП + этилметилгидроксипиридина сукцинат	М	<b>67,26<sup>#</sup></b> P1=0,000000	<b>40,79<sup>#</sup></b> P1=0,000000
	<i>m</i>	4,808522	2,881255
		P2=0,000000	P2=0,000000
		P3=0,000000	P3=0,000002
		P4=0,011100	P4=0,000001
		P5=0,000000	P5=0,000000

P1, P2, P3 и т.д. - значения критерия достоверности Манна-Уитни относительно групп 1, 2, 3 и т.д.

\* - различия статистически значимы относительно интактных показателей и # - группы сравнения по критерию Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

Таблица 6

Площадь клеточных элементов кардиомиоцитов правого предсердия в раннем и отдаленном восстановительном периоде (ВП).

Экспериментальные группы	Среднее значение площади, $\mu\text{м}^2 \pm m$			
	Миофибриллы	Митохондрии	СПР	Саркоплазма
Интактные показатели	18,08±0,76	10,68±0,75	0,12±0,01	3,53
60 минут ВП	15,74±0,39	11,80±0,42	<b>0,93*-0,13</b>	3,94
60 минут ВП + мексидол	16,11±1,27	<b>8,79*#±0,67</b>	<b>0,34*#±0,04</b>	7,16
60 суток ВП	15,03±0,74	<b>14,39*×±0,64</b>	<b>0,42*×±0,1</b>	2,56

\* - различия статистически значимы относительно интактных показателей, # - группы сравнения и × - раннего ВП по критерию Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

Таблица 7

Площадь соединительной ткани миокарда левого желудочка и зрелых коллагеновых волокон в ее составе в раннем и отдаленном восстановительном периоде (ВП).

Экспериментальные группы	Среднее значение площади, отн. ед./стандартное отклонение/стандартная ошибка среднего					
	Соединительная ткань			Коллаген		
	mean	SD	m	mean	SD	m
Интактные показатели	33,79	16,53	3,69	12,74	6,60	1,47
60 суток ВП	<b>171,81*</b>	61,06	12,73	<b>26,31*</b>	10,56	2,20
60 суток ВП + мексидол	<b>18,02<sup>#</sup></b>	12,32	2,47	<b>16,58<sup>#</sup></b>	9,02	1,81

\* - различия статистически значимы относительно интактных показателей и # - группы сравнения по критерию Манна-Уитни ( $p < 0,05$ ).

## Список литературы

1. Абросимов Д.А. Влияние мексидола на накопление и выведение мозгового натрийуретического пептида в условиях отдаленного постреанимационного периода в миокарде крыс / Д.А. Абросимов // Медиаль. – 2015. – № 1(15). – С. 160.
2. Абросимов Д.А. Изменение содержания мозгового натрийуретического пептида в кардиомиоцитах крыс в условиях раннего постреперфузионного периода под воздействием мексидола / Д.А. Абросимов, М.Л. Бугрова // Морфология. – 2015. – Т. 147, № 3. – С. 61.
3. Абросимов Д.А. Количественный анализ мозгового натрийуретического пептида кардиомиоцитов крыс в раннем постреперфузионном периоде / Д.А. Абросимов, Е.И. Яковлева, М.Л. Бугрова // Цитология. – 2015. – Т. 57, № 4. – С. 305-308.
4. Андреева Н.Н. Экспериментальные и клинические аспекты применения мексидола при гипоксии / Н.Н. Андреева // Медицинский альманах. – 2009. – Т. 4, № 9. – С. 193-197.
5. Андреева Н.Н. Коррекция мексидолом постреперфузионных изменений липидного обмена мозга / Н.Н. Андреева, И.В. Мухина // Экспер. и клин. фармакол. – 2005. – Т. 68, № 3. – С. 37-41.
6. Анохин, П.К. Принципиальные вопросы общей теории функциональных систем. Принципы системной организации функций / П.К. Анохин – М.: Наука, 1973. – С. 5-61.
7. Баевский, Р.М. Кибернетический анализ процессов управления сердечным ритмом. Актуальные проблемы физиологии и патологии кровообращения / Р.М. Баевский – М.: Медицина, 1976. – С. 161 -175.
8. Баевский Р. М. Анализ вариабельности сердечного ритма при использовании различных электрокардиографических систем: методические рекомендации / Р. М. Баевский, Г. Г. Иванов // Вестник аритмологии. – 2001. – № 24. – С. 65-86.

9. Баженова Л.Н. Влияние препарата «Мексидол» на эндотелиальную дисфункцию у больных с хронической сердечной недостаточностью / Л.Н. Баженова, Н.Н. Володина, Н.П. Фролова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Приложение 1. – С. 96-100.
10. Биленко, М.В. Ишемические и реперфузионные повреждения органов / М.В. Биленко – М. : Медицина, 1989. – 368 с.
11. Бугрова М.Л. Исследование предсердного натрийуретического пептида кардиомиоцитов в условиях отдаленного постреперфузионного периода в эксперименте / М.Л. Бугрова, Д.А. Абросимов, Е.И. Яковлева, О.С. Баскина, И.Л. Ермолин // Современные технологии в медицине. – 2013. – Т. 5, № 4. – С. 39-44.
12. Бугрова М.Л. Влияние Мексидола на мозговой натрийуретический пептид кардиомиоцитов в постреперфузионном периоде в эксперименте / М.Л. Бугрова, Д.А. Абросимов, Е.И. Яковлева // Современные технологии в медицине. – 2015. – Т. 7, №3. – С. 40-46.
13. Бугрова М.Л. Взаимосвязь интенсивности синтеза, накопления и секреции предсердного натрийуретического пептида кардиомиоцитов с уровнем регуляции ритма у крыс в условиях раннего постреперфузионного периода / М.Л. Бугрова, Е.И. Яковлева, Д.А. Абросимов // СТМ. – 2012. – № 3. – С. 26-30.
14. Бугрова М.Л. Образование и выброс предсердного натрийуретического пептида в кардиомиоцитах под воздействием мексидола в раннем постреперфузионном периоде в эксперименте / М.Л. Бугрова, Е.И. Яковлева, И.Л. Ермолин // Морфологические ведомости. – 2014. – № 2. – С. 19-25.
15. Булахова Е.Ю. Использование препарата «Мексидол» для оптимизации лечения артериальной гипертензии у больных молодого возраста / Е.Ю. Булахова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Приложение 1. – С. 101-103.

16. Вальдман А.В. Влияние производных 3-оксипиридинов на центральную нервную систему / А.В. Вальдман, Т.А. Воронина, Л.Д. Смирнов // Бюлл. экспер. биологии и мед. – 1985. – № 1. С. – 60-62.
17. Вариабельность сердечного ритма. Теоретические аспекты и практическое применение (тезисы международного симпозиума, Ижевск. 12-14 сен. 1996 г.). – Ижевск, 1996. – С. 225.
18. Васин М.В. Активизация сукцинатоксидазной системы клеток при патофизиологических состояниях организма / М.В. Васин, Л.В. Королева // В кн.: Митохондрии в патологии; Пушкино: Изд-во ин-та теорет и экспер. биофизики РАН, 2001. – С. 25-27.
19. Владимиров Ю.А. Хемилюминесценция сыворотки крови в присутствии солей двухвалентного железа / Ю.А. Владимиров, Р.Р. Фархутдинов, М.. Молоденков // Вопр. мед. химии. – 1976. – Т. 22, №. 2. – С. 216-223.
20. Воронина Т.А. Антиоксидант мексидол. Основные нейропсихотропные эффекты и механизм действия / Т.А. Воронина // Психофармакология и биологическая наркология. – 2001. – № 1. – С. 2-11.
21. Воронина Т.А. Мексидол: основные нейропсихотропные эффекты и механизм действия / Т.А. Воронина // Фарматека. – 2009. – Т. 180, № 6. – С.1-4.
22. Воронина Т.А. Перспективы применения антиоксидантов при гипоксии мозга / Т.А. Воронина // III Росс. конф. Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция. - 2002. - С. 7-9.
23. Воронина Т.А. Ноотропные препараты, достижения и новые проблемы / Т.А. Воронина, С.Б. Середепин // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1998. – № 4. – С 3-9.
24. Воронина Т.А. Действие семакса и мексидола на моделях ишемии / Т.А. Воронина, Вик. В. Яснецов // Экспер. и клин. Фарм. – 2009. – Т. 72, № 1. – С. 68-70.

25. Габибов М.М. Изучение процессов окисления липидов в различных тканях крыс при гипероксии и в постгипероксическом периоде / М.М. Габибов, К.Г. Карагезян // Бюл. exper. биол. – 1981. – № 6. – С. 682-684.
26. Гацура В.В., Пичугин В.В., Сернов Л.Н. Противоишемический кардиопротекторный эффект мексидола. Кардиология. 1996. Т. 36 № 11. С. 59-62.
27. Гланц, Р.М. Теоретические основы парентерального питания / Р.М. Гланц, Л.И. Герасимова ; под. ред. Р.М. Гланца // в кн.: Парентеральное питание при тяжелых травмах. – М. : Медицина, 1985. – С. 5-13.
28. Голухова Е.З. Клиническое значение определения натрийуретических пептидов у больных с хронической сердечной недостаточностью / Е.З. Голухова, А.М. Алиева // Кардиология и сердечно-сосудистая хирургия. – 2007. – № 1. – С. 45-51.
29. Гуревич В.С. Фармакологическая коррекция ПОЛ в миокарде крыс при гипоксии и реоксигенации / В.С. Гуревич // Гипоксия и окислительные процессы. Н. Новгород, 1992. – С. 26-30.
30. Дворников А.В. Вариабельность сердечного ритма при различных функциональных состояниях вегетативной регуляции у крыс : автореф. дис. ... канд. биол. наук. / Дворников Алексей Викторович. – Нижний Новгород, 2002. – 25 с.
31. Долгих В.Т. Структурные основы постреанимационной сердечной недостаточности / В.Т. Долгих, Кочетов А.М., Долгих С.В. // Общая реаниматология. 2005. – №1. – С. 20-25.
32. Дьячук Г.И. К вопросу о фармакологической коррекции гипоксии веществами кумариновой природы / Г.И. Дьячук // Гипоксия и окислительные процессы. – Н. Новгород. – 1992. – С. 35-39.
33. Дюмаев, К.М. Антиоксиданты в профилактике и терапии патологий ЦНС / К.М. Дюмаев, Т.А. Воронина, Л.Д. Смирнов. – М.: Медицина, 1995. – 271 с.

34. Ескунов П.Н. Возрастные особенности постреперфузионного восстановления структуры миокарда / П.Н. Ескунов, В.В. Семченко // Морфология. – 2002. – Т. 122, №34. – С. 45-49.
35. Жердеев В.П. Фармакинетика водорастворимого антиоксиданта из класса 3-оксипиридинов / В.П. Жердеев, А.К. Сариев, А.А. Дворянинов, Т.А. Воронина, Л.Д. Смирнов // Бюлл. exper. биол. и мед. – 1986. – № 3. – С. 325-327.
36. Журздина Я.В. Применение мексидола при хронической ишемии сердца и мозга / Я.В. Журздина, Л.А. Медведева // III Росс. конгресс по патофизиологии: дизрегуляторная патология органов и систем (экспериментальная и клиническая патофизиология). – 2004. – С. 9-12.
37. Замотаева М.Н. Экспериментальное обоснование применения мексидола и 3-оксипиридина фумарата при хроническом повреждении миокарда / М.Н. Замотаева, И.Н. Чаиркин, В.И. Инчина, И.А. Дроздов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2013. – Т. 2. – С. 176-178.
38. Заржецкий Ю.В. Механизмы приспособлений к нагрузочным реакциям у крыс, перенесших системную остановку кровообращения / Ю.В. Заржецкий, М.Ш. Аврущенко, Н.К. Хитров, В.В. Мороз // Бюл. эксперим. биологии. 2003. – Т. 134, № 3. – С. 261-269.
39. Заржецкий Ю.В. Влияние сукцината натрия на функциональные, биохимические и морфологические показатели восстановления ЦНС у крыс после 10 мин остановки кровообращения / Ю.В. Заржецкий, Е.А. Мутускина // Анестезиол. и реаниматол. – 1994. – № 5. – С. 44-48.
40. Зинчук В.В. Степень окислительного стресса головного мозга крыс при ишемии/реперфузии в условиях коррекции L-аргинин-NO системы / Н.Е. Максимович, Д.А. Маслаков // Российский физиологический журнал. – 2005. – № 4. – С.385-393.
41. Карпова Н.С. Исследование свойств и процессинга предшественника натрийуретического пептида В (proBNP) человека / Н.С. Карпова, А.Г. Катруха, А.Г. Семенов. – М.: Медицина, 2008.

42. Клебанов Г.И. Антиоксидантные свойства производных 3-оксипиридина: мексидола, эмоксипина и проксипина / Г.И. Клебанов, О.Б. Любицкий, О.В. Васильева, Ю.В. Климов // Вопр. мед химии. – 2001. – № 47. – С. 288-300.
43. Кожура В.Л. Постгипоксические изменения в коре головного мозга у собак в отдаленном восстановительном периоде после четырех часов гипотензии от массивной кровопотери / В.Л. Кожура, Л.В. Молчанова, С.И. Пылова // Бюл. exper. биол. – 1976.– №8. – С. 933-936.
44. Кондрашова М.Н. Антиоксидантное действие прооксидантов (Vcl-2, супероксид воздуха, янтарная кислота) / М.Н. Кондрашова // Всеросс. конф.: Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция. Материалы всероссийской конференции. – М., 1997. – С. 60.
45. Кондрашова, М.Н. Терапевтическое действие янтарной кислоты / М.Н. Кондрашовой; под ред. М.Н. Кондрашовой. – Пушкино: Наука, 1996. – 236 с.
46. Коростышевская И.М. Ультраструктурные особенности гормонопродуцирующих кардиомиоцитов в некоторых экспериментальных и клинических условиях / И.М. Коростышевская, В.Ф.Максимов // Архив анатомии, гистологии и эмбриологии. – 1989. – Т. ХСVI, № 2. – С. 42-49.
47. Коростышевская И.М. Возможности ультраструктурной оценки секреторной активности предсердных кардиомиоцитов / И.М. Коростышевская, В.Ф. Максимов, С.А. Курганов // Цитология. – 2013. – Т. 55, № 8. – С. 739-747.
48. Корпачев В.Г. Моделирование клинической смерти и постренимационной болезни у крыс / В.Г. Корпачев, С.П. Лысенков, Л.З. Тель // Патология, физиология и экспериментальная терапия. – 1982. – №3. – С. 78-80.
49. Кулагин, В.К. Патологическая физиология травмы и шока / В.К. Кулагин. – Л.: Медицина, 1978. – 296 с.

50. Лебкова, Н.П. Морфологические закономерности изменения сосудисто-тканевых отношений в миокарде крыс при гипоксии // Сосудисто-тканевые отношения при гипоксии : сборник научных трудов / под общ. ред. В. П. Смирнова. Н.Новгород, 1991. – С. 33-38.
51. Левитина Е.В. Влияние мексидола на клинико-биохимические проявления перинатальной гипоксии у новорожденных детей / Е.В. Левитина Экспер. и клин. фармакол. – 2001. – Т 64, № 5. – С. 34-36.
52. Литвицкий, П.Ф. Патофизиология : учеб. для студентов мед. вузов: в 2 т. / П.Ф. Литвицкий // Москва : ГЭОТАР-МЕД, 2002. – 808 с.
53. Лукьянчук ВД. Антигипоксанты: состояние и перспективы / В.Д. Лукьянчук, Л.В. Савченкова // Экспериментальная и клиническая фармакология. – 1998. – № 4. – С. 72-79.
54. Лукьянова Л.Д. Новые подходы к созданию антигипоксантов метаболического действия / Л.Д. Лукьянова // Вестник Росс. Акад. Мед. наук. – 1999. – № 3. – С. 18-25.
55. Лукьянова Л.Д. Роль биоэнергетических нарушений в патогенезе гипоксии / Л.Д. Лукьянова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2004. – № 2. – С.2-11.
56. Лукьянова Л.Д. Влияние гипоксического перекондиционирования на свободнорадикальные процессы в тканях крыс с различной толерантностью к гипоксии / Л.Д. Лукьянова, Ю.И. Кирова // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – № 3. – С. 263-268.
57. Лукьянова Л.Д. Особенности антигипоксического действия мексидола, связанные с его специфическим влиянием на энергетический обмен / Л.Д. Лукьянова, В.Е. Романова, Г.Н. Чернобаева, Н.В. Лукиных // Химико-фармацевтический ж. – 1990. – Т. 24, № 8. – С. 9-11.
58. Маевский Е.И. Анаэробное образование сукцината и облегчение его окисления – возможные механизмы адаптации клетки к кислородному голоданию / Е.И. Маевский // Биофизика. – 2000. – Т. 45, № 3. – С. 500-513.

59. Маевский Е.И. Функциональная роль анаэробного образования сукцината в клетках на уровне целого организма / Е.И. Маевский, Е.В. Гришина, А.С. Розенфельд, А.М. Зякун // Всеросс. конф. Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция. – 1997. – С. 2-4.
60. Маевский Е.И. О сигнальной и субстратной роли янтарной кислоты при гипоксии / Е.И.Маевский, Е.В. Гришина, А.С. Розенфельд, А.М. Зякун, М.Н. Кондрашова // IV Росс. конф.: Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция. – 2005. – С. 12-14.
61. Мартынова М. Г. Иммунолокализация предсердного натрийуретического пептида в тучных клетках перикарда крысы и человека / М. Г. Мартынова, Е. В. Накацаева, М. И. Емельянова и др. // Цитология. – 2008. – №3. – С. 237-242.
62. Меерсон, Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца / Ф.З. Меерсон. – М.: Медицина, 1984. – с. 272.
63. Миронов Н.В. Антиоксидантная терапия препаратом мексидол в лечении острой стадии ишемического инсульта (методические рекомендации), Н.В. Миронов // М.: МЦ УДП РФ. – 2002. – С. 8.
64. Мохова Е.Н., Хайлова Л.С. Участие анионных переносчиков внутренней мембраны митохондрий в разобщающем действии жирных кислот / Е.Н. Мохова, Л.С. Хайлова // Биохимия. – 2005. – Т. 70, № 2. – С. 197-202.
65. Мульдьяров, П.Я. Субмикроскопическая патоморфология ревмокардита / П.Я. Мульдьяров. – М.: Медицина, 1979. – 216 с.
66. Мусил Я. Основы биохимии патологических процессов / Я Мусил, – М.: Медицина, 1985. – 430 с.
67. Мутускина Е.А. Влияние янтарной кислоты на постреанимационную патологию ЦНС и организма в целом / Е.А. Мутускина, Ю.В. Заржецкий, И.Е. Трубина, М.Ш. Аврущенко // Анестезиология и реаниматология. – 1996. – № 5. – С. 61-63.
68. Мухина И.В. Особенности структурно-функциональной перестройки магистральных артериальных сосудов в отдаленном постреанимационном

- периоде / И.В. Мухина, Р.С. Куликов, Е.И. Яковлева, Н.Н. Андреева, Н.Н. Проданец, Л.Б. Снопина, М.Л. Бугрова // *Общая реаниматология*. – 2007. – Т. 2. – С. 8-13.
69. Неговский В.А. Постреанимационная болезнь / В.А. Неговский, А.М. Гурвич, Е.С. Золотокрылина. – М.: Медицина, 1987. – 480 с.
70. Нидеккер И.Г. Выявление скрытых периодичностей методом спектрального анализа / И.Г. Нидеккер: дис. ... канд. физ-мат. наук. – М.: ВЦ АН СССР, 1968. – 131 с.
71. Оковитый С.В. Антигипоксантаы / С.В. Оковитый А.В. Смирнов // *Эксперим. и клин. фармакология*. – 2001. – Т. 64, № 3. – С. 76-80.
72. Парин, В.В. Введение в медицинскую кибернетику / В.В. Парин, Р.М. Баевский. – М.: Медицина, 1966. –220 с.
73. Парин, В.В. Космическая кардиология / В.В. Парин, Р.М. Баевский, Ю.Н. Волков, О.Г. Газенко. – Л.: Медицина, 1967. –206 с.
74. Пауков, В.С. Элементы теории патологии сердца / В.С. Пауков, В.А. Фролов, – М.: Медицина, 1982. - 270 с.
75. Плотникова Т.М. Церебропротекторные эффекты янтарнокислого аммония в условиях хронической ишемии мозга / Т.М. Плотникова, В.Х. Ваизов, А.С. Саратовиков // *Всеросс. конф.: Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция*. – 1997. – С. 2-4.
76. Погорелый В.Е. Эффективность препаратов метаболического действия при циркуляторной гипоксии мозга / В.Е. Погорелый, М.Д. Гаевый // *Всеросс. конф. Гипоксия: механизмы, адаптация, коррекция*. – 1997. – С. 2-4.
77. Полунин Н.И. Влияние гипоксии на авторитмическую активность пейсмекерных клеток синоатриального узла / Н.И. Полунин, Н.М. Митрохина // *Вопросы регуляции дыхания и кровообращения: сб. науч. тр. Куйбышев*. – 1985. – С. 76-79.
78. Полякова И.А. Ультраструктура хондриома кардиомиоцитов крыс при клинической смерти и в постреанимационном периоде / И.А. Полякова,

- М.В. Шорникова, И.В. Саморукова, Ю.С. Ченцов // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1999. – № 1. – С. 95-100.
79. Постнов Ю.В. О роли кальциевой перегрузки митохондрий и энергетического дефицита в патогенезе артериальной гипертензии / Ю.В. Постнов // Арх. патологии. – 2001. – Т. 63, № 3. – С. 3-10.
80. Пресняков С.В. Анализ ультраструктуры кардиомиоцитов крыс при условиях истощающих нагрузок / С.В. Пресняков, Мохаммед Шаиф Фарех Фуад, С.П. Саликова // Морфология. – 2002. – Т. 121, № 2-3. – С. 128.
81. Рахчеева М.В. Изменение соотношения гранул А- и В- типов, содержащих предсердный и мозговой натрийуретические пептиды, в предсердных миоцитах крыс в условиях вазоренальной гипертензии / М.В. Рахчеева, М.Л. Бугрова // Цитология. – 2010. – № 8. – С. 629-633.
82. Румянцев, В.П. Кардиомиоциты в процессах репродукции, дифференцировки и регенерации / Румянцев В.П. – Л.: Наука, 1982. – 288 с.
83. Саркисов, Д.С. Структурные основы адаптации и компенсации нарушенных функций / Д.С. Саркисов ; под ред. Д.С. Саркисова. – М.: Медицина, 1987. – 448 с.
84. Саркисов, Д.С. Микроскопическая техника / Д.С. Саркисов, Д.С. Перов // под ред. Д.С. Саркисова, Д.С. Перова. М.: Медицина, 1996. – 548 с.
85. Селье, Г. Очерки об адаптационном синдроме. Пер. с англ. / Селье Г. – М.: Медгиз, 1960. – 275 с.
86. Смирнов Л.Д.  $\beta$ -оксипроизводные шестичленных азотистых гетероциклов. Синтез, ингибирующая активность и биологические свойства / Л.Д. Смирнов, К.М. Дюмаев // Химико-фармацев. Журнал. – 1982. – Т 16, № 4. – С. 28-44.
87. Смирнов А.В. Антигипоксанты в неотложной медицине / А.В. Смирнов, Б.И. Криворучко // Анестезиология и реаниматология. – 1998. – № 2. – С. 50-55.

88. Соколова Р.И. Гибернация и станнинг как проявление ишемической дисфункции миокарда / Р.И. Соколова, В.С. Жданов // Архив патологии. – 2002. – № 1. – С. 50-54.
89. Солейко Е.В. Осложненное течение хронической постинфарктной аневризмы сердца (клинико-морфологические параллели) / Е.В. Солейко, Л.В. Кактурский // Eruditio Juvenium. 2013. – №3. – С. 7-12.
90. Сперелакис, Н. Ультраструктура миокарда млекопитающих. Физиология и патофизиология сердца / Н. Сперелакис, М.С. Форбс. – М.: Медицина, 1990 – Т. 1. – 624 с.
91. Столярова В.В. Исследование кардиопротекторного действия препаратов с антиоксидантной активностью при острой ишемии головного мозга / В.В. Столярова // Эксперим. и клин. фармакология. – 2001. – Т. 64, № 6. – С. 31-33.
92. Тиликеева У.М. Характеристика противогипоксических свойств антиоксидантов из класса 3-оксипиридина / У.М. Тиликеева, Т.А. Воронина // Фармакология и токсикология. – 1987. – № 1. – С. 74-77.
93. Федин, А.И. Применение антиоксиданта «Мексидол» у больных с острым нарушением мозгового кровообращения: методические рекомендации / А.И. Федин, С.А. Румянцева, О.П. Миронова, В.Н. Евсеев. – М.: РГМУ, 2002. – С. 16.
94. Фомин И.В. Эффективность антиоксидантной терапии у больных ИБС / И.В. Фомин, С.С. Белоусов // Гипоксия и окислительные процессы. Н. Новгород. – 1992. – С. 188-198.
95. Хачатрян, С.А. Некоторые патохимические аспекты умирания и оживления организма. В кн.: Современные проблемы реаниматологии / Хачатрян С.А.; под ред. П.Д. Горизонтова и А.М. Гурвича. – М.: Медицина, 1980. – С. 27-35.
96. Чернобаева, Г.Н. Антигипоксические эффекты и механизмы действия некоторых производных 3-оксипиридинов. В кн.: Итоги науки и техники. Серия Фармакология. Химиотерапевтические средства / Г.Н. Чернобаева,

- В.Е. Романова, А.М. Дудченко, Э.Л. Германова ; под ред. Л.Д. Лукьяновой. – М.: ВИНТИ, 1991. – Т. 27. – С. 26-39.
97. Чернух, А.М. Микроциркуляция / А.М. Чернух, П.Н. Александров, О.В. Алексеев. – М.: Медицина, 1984. – 455 с.
98. Чеснокова, Н.П. Типовые патологические процессы / Н.П. Чеснокова; Монография. – Издательство Саратовского медицинского университета, 2004. – 400 с. – С. 132-136.
99. Чечулин, Ю.С. Повреждённое сердце / Ю.С. Чечулин. – М.: Медицина, 1975. – 279 с.
100. Abdelalim E.M. NPR-A regulates self-renewal and pluripotency of embryonic stem cells / E.M. Abdelalim, I. Tooyama // Cell Death Dis. – 2011. – Vol. 2 – e-pub: doi:10.1038.
101. Alexopoulos D. The 24 hour heart rate behavior in long-term survivors of cardiac transplantation / D. Alexopoulos, S. Yusuf, J.A. Johnston et al. // Am. J. Cardiol. – 1988. – Vol. 61. – P 880-884.
102. Andreeva N.N. The effect of ozonated physiological solution on the postreperfused lipid composition and the level of carbohydrate metabolism substrates / N.N. Andreeva, T.I. Solov'eva, M.V. Balandina, I.V. Mukhina // Biomed. Khim. – 2009. – Vol. 55, № 6. – P. 750-758.
103. Bilenko M.V. Regeneration ability of ischemic liver and the effect of liver resection and extracts stimulating proliferation / M.V. Bilenko, L.A. Seregina, N.G. Komarov, O.Iu. Abakumova // Vopr. Med. Khim. – 1989. – Vol. 35. № 2. – P. 93-97.
104. Callere G. Expert Rev. / G. Callere, R. Tostes, C. Savoia et al. // Cardiovasc. Ther. – 2007. – Vol. 5. – P. 531-532.
105. Carlson L.A. Serum-lipid reducing principles-possibilities for treatment. 1. General views on the treatment of hyperlipidemias / L.A. Carlson // Lakartidningen. – 1970. – Vol. 67: Suppl IV. – P. 33.

106. Casco V.H. Natriuretic peptide system gene expression in human coronary arteries / V.H. Casco, J.P. Veinot, M.L. Kuroski de Bold, R.G. Masters, Stevenson M.M., de Bold A.J. // *J. Histochem. Cytochem.* – 2002. – Vol. 50. – P. 799-809.
107. Cea L.B. Natriuretic peptide family: new aspects / L.B. Cea // *Curr. ed. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents.* – 2005. – Vol. 3. – P. 87-98.
108. Cerati D. Single cardiac vagal fiber activity, acute myocardial ischemia, and risk for sudden death / D. Cerati, P.J. Schwartz // *Circ. Res.* 1991. – Vol 69. – P. 1389-1401.
109. Cowie M.R. BNP and congestive heart failure / M.R. Cowie, G.F. Mendez // *Prog. Cardiovasc. Dis.* – 2002. – Vol. 44. – P. 293-320.
110. Daniels L.B. Natriuretic peptides / L.B. Daniels, A.S. Maisel // *J. Am. Coll. Cardiol.* – 2007. – Vol. 50. – P. 2357–2368.
111. De Bold A.J. Thirty years of research on atrial natriuretic factor: historical background and emerging concepts / A.J. De Bold // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* – 2011. – Vol. 89, №. 8. – P. 527-31.
112. De Bold M.L. Cardiac hormones ANF and BNP modulate proliferation in the unidirectional mixed lymphocyte reaction / M.L. De Bold, A. Etchepare, A. Martinuk, and A.J. de Bold // *J. Heart Lung Transplant.* 2010. – Vol.2, № 3. – P. 323-326.
113. De Lemos J.A. B-type natriuretic peptide in cardiovascular disease / J.A. De Lemos, D.K. McGuire, M.H. Drazner // *Lancet.* – 2003 [Published online]: <http://image.thelancet.com/extras/02art2325web.pdf>.
114. De Wind L.J. Ischemic: reperfused isolated working mouse heart: membrane damage and type II A phospholipase A / L.J. De Wind, J. Willems, T.H. Roemen et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ Physiol.* – 2001. – Vol. 280, № 6. – P. 2572-2580.
115. Dolgikh V.T. Obshchaya reanimatologiya / V.T. Dolgikh, A.M. Kochetkov, S.V. Dolgikh // *General Resuscitation.* – 2005. – Vol. 1, № 2. – P. 20-25.

116. Doust J. The role of BNP testing in heart failure / J. Doust, R. Lehman, P. Glasziou // *Am. Fam. Physician.* – 2006. – Vol. 74, № 11. – P. 1893-1898.
117. Drucker W.R. Shock and metabolism / W.R. Drucker // *Surg. Gynecol. Obstet.* – 1971. – Vol. 132, № 2. – P. 234-239.
118. Fallen E.L. Spectral analysis of heart rate variability following human heart transplantation: evidence for functional reinnervation / E.L. Fallen, M.V. Kamath, D.N. Ghista, D. Fitchett // *J. Auton. Nerv. Syst.* – 1988. – Vol. 23. – P. 199-206.
119. Georgieff M. Differences in postoperative metabolism after pre- and postoperative beginning of total parenteral nutrition / M. Georgieff, R. Kattermann, K. Geiger, L.W. Storz, U. Bethke, H. Lutz // *Z. Ernährungswiss.* – 1980. – Vol. 19, № 2. – P. 122-139.
120. Goetze J.P. Biochemistry of pro-B-type natriuretic peptide-derived peptides: the endocrine heart revisited / J.P. Goetze // *Clin. Chem.* – 2004. – Vol. 50. – P. 1503-1510.
121. Hu G. Anti-inflammatory Effect of B-Type Natriuretic Peptide Postconditioning During Myocardial Ischemia-Reperfusion: Involvement of PI3K/Akt Signaling Pathway / G. Hu, X. Huang, K. Zhang, H. Jiang, X. Hu // *Inflammation.* 2014 [Published online]: doi: 10.1007/s10753-014-9895-0.
122. Huntley B. B-Type Natriuretic Peptide and Extracellular Matrix Protein Interactions in Human Cardiac Fibroblasts / B. Huntley, T. Ichiki, J. Sangaralingham, H. Chen, J. Burnett // *J. Cell. Physiol.* 2010 [Published online]: doi: 10.1002/jcp.22253.
123. Jarai R. Human cardiac fibroblasts express B-type natriuretic peptide: fluvastatin ameliorates its up-regulation by interleukin-1alpha, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta / R. Jarai, C. Kaun, T.W. Weiss, W.S. Speidl, K. Rychli, G. Maurer, K. Huber, J. Wojta // *J. Cell. Mol. Med.* – 2009. – Vol. 13, № 11-12. – P. 4415-4421.

124. Jensen K.T. Effect of BNP on renal hemodynamics, tubular function and vasoactive hormones in humans / K.T. Jensen, J. Carstens, E.B. Pedersen // *Am. J. Physiol.* – 1998. – Vol. 274. – P. 63-72.
125. Kambayashi Y. Isolation and sequence determination of human brain natriuretic peptide in human atrium / Y. Kambayashi, K. Nakao, M. Mukoyama, Y. Saito, Y. Ogawa, S. Shiono, et al. // *FEBS. Lett.* – 1990. – Vol. 259. – P. 341-345.
126. Khaliulin I. Apomorphine prevents myocardial ischemia/reperfusion-induced oxidative stress in the rat heart / I. Khaliulin, A. Schneider, E. Houminer, J.B. Borman, H. Schwalb // *Free Radic. Bio.l Med.* – 2004. – Vol. 37, № 7. – P. 969-976.
127. Kinney J.M. Carbohydrate and nitrogen metabolism after injury / J.M. Kinney, C.Z. Long, J.H. Duke // In: *Symp. Energy metabolism in trauma.* London. – 1970. – P. 103-113.
128. Kita T. Effect of brain natriuretic peptide-45, a circulating form of brain natriuretic peptide, in spontaneously hypertensive rats / T. Kita, O. Kida, N. Yokota, T. Eto, N. Minamino, K. Kangawa, et al. // *Eur. J. Pharmacol.* – 1991. – Vol. 202. – P. 73-79.
129. Koglin J. Role of brain natriuretic peptide in risk stratification of patients with congestive heart fealure / J. Koglin, S. Pehlivanli, M. Schwaiblmair et al. // *J. Amer. Coll. Cardiol.* – 2001. – Vol. 38.– P. 1934-1941.
130. Kuhn M. Endothelial actions of atrial and B-type natriuretic peptides / M Kuhn. // *Br. J. Pharmacol.* 2012 Jan 5, [Published online] doi: 10.1111/j.1476-5381.2012.01827.x.
131. Kuhn M. The natriuretic peptide/guanylyl cyclase – a system functions as a stress-responsive regulator of angiogenesis in mice / M. Kuhn, K. Völker, K. Schwarz, J. Carbajo-Lozoya, U. Flögel, C. Jacoby et al. // *J. Clin. Invest.* 2009. – Vol. 119. – P. 2019-2030.
132. Lee C.Y. Pharmacodynamics of a novel designer natriuretic peptide, CD-NP, in a first-in-human clinical trial in healthy subjects / C.Y. Lee, H.H. Chen, O.

- Lisy, S. Swan, C. Cannon, H.D. Lieu, J.C. Jr. Burnett // *J. Clin. Pharmacol.* – 2009. – Vol. 49, № 6. – P. 668-673.
133. Lee P.Y. Evidence for carbon tetrachloride-induced lipid peroxidation in mouse liver / P.Y. Lee, P.B. McCay, K.R. Hornbrook // *Biochem. Pharmacol.* – 1982. – Vol. 31, № 3. – P. 405-409.
134. Levine Y.C. B-type natriuretic peptide is a major predictor of ventricular tachyarrhythmias / Y.C. Levine, M.A. Rosenberg, M. Mittleman, M. Samuel, N. Methachittiphan, M. Link, M.E. Josephson, A.E. Buxton // *Heart Rhythm.* - 2014. – Vol. 11, № 7. – P. 1109-1116.
135. Litvitskiy P.F. Pathogenic and adaptive changes of the heart in regional myocardial ischemia and postischemic myocardial reperfusion / P.F. Litvitskiy // *Patol. Fiziol. Eksp. Ter.* – 2002. – Vol. 2. – P. 2-12.
136. Lown B. Neural activity and ventricular fibrillation / B. Lown, R.L. Verrier / *N. Engl. J. Med.* – 1976. – Vol. 294. – P. 1165-1170.
137. Lukáčová N. Lipid peroxidation and phospholipid composition in rat brain regions after ischemia and in early perfusion periods / N. Lukáčová, M. Gottlieb, J. Marsala // *Arch. Ital. Biol.* – 1998. – Vol. 136, № 3. – P. 167-180.
138. Maksimovich N.E. The degree of cerebral oxidative stress in rats during ischemia-reperfusion combined with a modulation of L-arginine-NO system / N.E. Maksimovich, V.V. Zinchuk, D.A. Maslakov // *Ros.s Fiziol. Zh. Im. IM. Sechenova.* – 2005. – Vol. 91, № 4. – P. 385-393.
139. Malik M. Components of heart rate variability. What they really mean and what we really measure / M. Malik, A.J. Camm // *Am. J. Cardiol.* 1993.– V. 72. – P. 821-822.
140. Manfrini O. Changes in autonomic nervous system activity: spontaneous versus balloon-induced myocardial ischaemia / O. Manfrini, G. Morgagni, C. Pizzi, F. Fontana, R. Bugiardini // *Eur. Heart. J.* – 2004. – Vol. 25, № 17. P. 1502-1508.

141. Martel G. Central role of guanylyl cyclase in natriuretic peptide signaling in hypertension and metabolic syndrome / G. Martel, P. Hamet and J. Tremblay // *Mol. Cell. Biochem.* – 2010. Vol. 334, № 1–2. – P. 53-65.
142. Martin G.J. Heart rate variability and sudden death secondary to coronary artery disease during ambulatory ECG monitoring / G.J. Martin, N.M. Magid, G. Myers et al. // *Am. J. Cardiol.* – 1986. – Vol. 60. – P. 86-89.
143. Matsukawa N. The natriuretic peptide clearance receptor locally modulates the physiological effects of the natriuretic peptide system / N. Matsukawa, W.J. Grzesik, N. Takahashi, K.N. Pandey, S. Pang, M. Yamauchi, O. Smithies // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 1999. – Vol. 96. – P. 7403-7408.
144. Moghtadaei M. Electrophysiological effects of natriuretic peptides in the heart are mediated by multiple receptor subtypes / M. Moghtadaei, I. Polina, R.A. Rose // *Progress in Biophysics and Molecular Biology.* – 2016. – Vol. 120, Issues 1-3. – P. 37-49.
145. Moltzau L.R. Different compartmentation of responses to brain natriuretic peptide and C-type natriuretic peptide in failing rat ventricle / L.R. Moltzau, J.M. Aronsen, S. Meier, J. Skogestad, O. Orstavik, G.B. Lothe, I. Sjaastad, T. Skomedal, J.B. Osnes, F.O. Levy, E. Qvigstad // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* – 2006. – Vol. 350. – P. 681-690.
146. Myers G.A. Power spectral analysis of heart rate variability in sudden cardiac death: comparison to other methods / G.A. Myers, G.J. Martin, N.M. Magid et al. // *IEEE Trans. Biomed. Eng.* – 1986. – Vol. 33. – P. 1149-1156.
147. Ogawa T. The Heart as an Endocrine Organ / T. Ogawa, A.J. De Bold // *Endocrine connections.* – 2014. – [Published online]: doi: 10.1530/EC-14-0012.
148. Ogawa T. Neuroendocrine profiling of humans receiving cardiac allografts / T. Ogawa, J.P. Veinot, R.A. Davies, H. Haddad, S.J. Smith, R.G. Masters et al. // *J. Heart. Lung. Transplant.* – 2005. – Vol. 24, № 8. – P. 1046-1054.
149. Ogawa T. Angiotensin II receptor antagonism reverts the selective cardiac BNP upregulation and secretion observed in myocarditis / T. Ogawa, J.P.

- Veinot, M.L. Kuroski de Bold, T. Georgalis and de A.J. Bold // *Am. J. Physiol.* – 2008. – Vol. 294. – P. H5296-H2603.
150. Pagani M. Power spectral analysis of heart rate and arterial pressure variability as a marker of supatho-vagal interaction in man and conscious dog / M. Pagani, F. Lombardi, S. Guzzetti et. al. // *Circ. Res.* – 1986. – Vol. 59. – P. 178-193.
151. Palazzuoli A. Anemia correction by erythropoietin reduces BNP levels, hospitalization rate, and NYHA class in patients with cardio-renal anemia syndrome / A. Palazzuoli, I. Quatrini, A. Calabrò, G. Antonelli, M. Caputo, M.S. Campagna, B. Franci and R. Nuti // *Clin. Exp. Med.* – 2011. – Vol. 11, № 1. – P. 43-48.
152. Pan X. The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter (MCU) / X. Pan, J. Liu, T. Nguyen, C. Liu, J. Sun, Y. Teng, M.M. Fergusson, I.I. Rovira, M. Allen, D.A. Springer, A.M. Aponte, M. Gucek, R.S. Balaban, E. Murphy, T. Finkel // *Nat. Cell. Biol.* – 2013. – Vol. 15, № 12. P. 1464-1472.
153. Pankow K. Successive action of meprin A and neprilysin catabolizes B-type natriuretic peptide / K. Pankow, Y. Wang, F. Gembardt, E. Krause, X. Sun, G. Krause, H. Schultheiss, W. Siems, T. Walther // *Circ. Res.* – 2007. – Vol. 101. – P. 875-882.
154. Persson P.B. The kidney and hypertension / P.B. Persson // *Am. J. Physiol. Integrat. Comp. Physiol.* – 2003. – Vol. 284. – P. 1176–1178.
155. Potter L.R. Natriuretic Peptides, Their Receptors, and Cyclic Guanosine Monophosphate – Dependent Signaling Functions / L.R. Potter, S. Abbey-Hosch, D.M. Dickey // *Endocrine Reviews.* – 2006. – Vol. 27. – P. 47–72.
156. Qvigstad E. Natriuretic peptides increase beta1-adrenoceptor signalling in failing hearts through phosphodiesterase 3 inhibition / E. Qvigstad, L.R. Moltzau, J.M. Aronsen, C.H. Nguyen, K. Hougen, I. Sjaastad, F.O. Levy, T. Skomedal, J.B. Osnes // *Cardiovasc Res.* – 2010. – Vol. 85. – P. 763-772.

157. Rademaker M.T. Clearance receptors and endopeptidase: equal role in natriuretic peptide metabolism in heart failure / M.T. Rademaker, C.J. Charles, T. Kosoglou, A.A. Protter, E.A. Espiner, M.G. Nicholls, A.M. Richards // *Am. J. Physiol.* – 1997. – Vol. 273. – P. H2372-H2379.
158. Ramaekers, D. Effects of melanocortins and N-terminal proopiomelanocortin on cardiovascular function and autonomic dynamics / D. Ramaekers. – Leuven University Press, 1999. – 131 p.
159. Ramos L.W. Ischemia/reperfusion is an independent trigger for increasing myocardial content of mRNA B-type natriuretic peptide / L.W. Ramos, N. Murad, E. Goto, E.L. Antônio, J.A.Jr. Silva, P.F. Tucci, A.C. Carvalho // *Heart Vessels.* – 2009. – Vol. 24, № 6. – P. 454-459.
160. Richards A.M. Natriuretic peptides: Update on peptide release, bioactivity, and clinical use / A.M. Richards // *Hypertension.* – 2007. – Vol. 12. – P. 331-343.
161. Schumer W. Metabolism of shock / W. Schumer, J.C. Kukral *Surgery.* – 1968. – Vol. 63, № 4. – P. 630-636.
162. Sommerkamp H. Shock, acidosis and lipolysis / H. Sommerkamp // *Bruns. Beit. Klin. Chir.* – 1969. – Vol. 217, № 8. – P. 673-677.
163. Song D.L. Brain natriuretic factor. Augmentation of cellular cyclic GMP, activation of particulate guanylate cyclase and receptor binding / D.L. Song, K.P. Kohse, F. Murad // *FEBS. Lett.* – 1988. – Vol. 232, № 1. – P. 125-129.
164. Stanley W.C. Myocardial energy metabolism during ischemia and the mechanisms of metabolic therapies / W.C. Stanley // *J. Cardiovasc. Pharmacol. Ther.* – 2004. – Vol. 9, № 1. – P. 31-45.
165. Sun Y. B-type natriuretic peptide protects cardiomyocytes at reperfusion via mitochondrial calcium uniporter / Y. Sun, T. Deng, N. Lu, M. Yan, X. Zheng // *Biomed. Pharmacother.* – 2010. – Vol. 64, № 3. – P. 170-176.
166. Suzuki M. The involvement of the intracellular superoxide production system in hepatic ischemia-reperfusion injury. In vivo and in vitro experiments using transgenic mice manifesting excessive CuZn-SOD activity / M. Suzuki, H.

- Takeuchi, T. Kakita, M. Unno, Y. Katayose, S. Matsuno // *Free Radic. Bio. Med.* – 2000. – Vol. 29, № 8. – P. 756-763.
167. Taylor W. Steroid metabolism in the cat. Biliary and urinary excretion of metabolites of [4-14C] cortisone / W. Taylor // *Biochem. J.* – 1969. – Vol. 113, № 2. – P. 259-261.
168. Tang W.H. B-Type Natriuretic Peptide: A Critical Review / W.H. Tang // *Heart Failure*, 2009 [Published online]: doi: 10.1111/j.1527-5299.2007.05622.x
169. Thireau J. Functional evidence for an active role of B-type natriuretic peptide in cardiac remodelling and pro-arrhythmogenicity / J. Thireau, S. Karam, J. Fauconnier, S. Roberge, C. Cassan, O. Cazorla, F. Aimond, A. Lacampagne, D. Babuty, S. Richard // *Cardiovascular Research.* – 2012. – Vol. 95, № 1. P. 59-68.
170. Togashi K. Brain natriuretic peptide-like immunoreactivity is present in human plasma / K. Togashi, Y. Hirata, K. Ando, Y. Takei, M. Kawakami, F. Marumo // *FEBS. Lett.* – 1989. – Vol. 250. – P. 235-237.
171. Tsuruda T. Brain natriuretic peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases / T. Tsuruda, G. Boerrigter B.K. Huntley, J.A. Noser, A. Cataliotti, L.C. Costello-Boerrigter et al. // *Circ. Res.* – 2002. – Vol. 91. – P. 1127-1131.
172. Tsutamoto T. Attenuation of compensation of endogenous cardiac natriuretic peptide system in chronic heart failure / T. Tsutamoto, A. Wada, K. Maeda et al. // *Circulation.* 1997. – Vol. 96. – P. 509-516.
173. Vaderheyden M. Brain and other natriuretic peptides: molecular aspects / M. Vaderheyden, J. Bartunek, M. Goethals // *Eur. J. Heart Fail.* – 2004. – Vol. 6. – P. 261-268.
174. Valli N. Review of 10 years of the clinical use of brain natriuretic peptide in cardiology / N. Valli, A. Gobinet, L. Bordenave // *J. Lab. Clin. Med.* – 1999. – Vol. 134. – P. 437-444.
175. Voulteenaho O. BNP as marker in heart disease / O. Voulteenaho, M. Ala-Kopsala, H. Ruskoaho // *Adv. Clin. Chem.* – 2005. – Vol. 40. – P. 1-36.

176. Watson C. Mechanical stretch up-regulates the B-type natriuretic peptide system in human cardiac fibroblasts: a possible defense against transforming growth factor- $\beta$  mediated fibrosis / C. Watson, D. Xu M. Phelan, P. Collier, R. Neary, A. Smolenski, M. Ledwidge, K. McDonald, J. Baugh // *Fibrogenesis and tissue repair*. – 2012. – Vol. 5. – P. 1-10.
177. Wu Z.J. Recent advances in natriuretic peptide family genes and cardiovascular diseases / Z.J. Wu, W. Jin, F.R. Zhang, Y. Liu // *Yi Chuan*. – 2012. – Vol. 34, № 2. – P. 127-33.
178. Xin W. Does B-type natriuretic peptide-guided therapy improve outcomes in patients with chronic heart failure? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials / W. Xin, Z. Lin, S. Mi 2014. – *Heart Fail. Rev.*, 2014 [Published online]: doi: 10.1007/s10741-014-9437-8.
179. Yajima M. Carbohydrate metabolism and its response to catecholamines as modified in alkalotic rat / M. Yajima, M. Ui // *Am. J. Physiol.* – 1975. – Vol. 228, № 4. – P. 1046-1052.
180. Zanello M. Alterations in the enzyme profile in intensive care patients undergoing total parenteral nutrition / M. Zanello, E. Castelli, J. Berger, C. Cetrullo // *Resuscitation*. – 1979. – Vol. 7, № 3-4. – P. 185-198.
181. Zhang J. NPR-A: A Therapeutic Target in Inflammation and Cancer / J. Zhang, M. Li, Y. Yang, Y. Yan, J. Li, J. Qu, J. Wang // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr.* – 2015. – Vol. 25. – Issue 1. P. 41 – 46.