

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

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Нижний Новгород – 2016

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном образовательном учреждении высшего образования «Нижегородская государственная медицинская академия» Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Научный руководитель - **Ермолин Игорь Леонидович**
д.б.н, профессор, заведующий кафедрой гистологии с цитологией и эмбриологией ФГБОУ ВО «Нижегородская государственная медицинская академия» Минздрава РФ

Официальные оппоненты: **Буравков Сергей Валентинович**
д.м.н., руководитель научно-исследовательской лаборатории компьютерных технологий в медицине ФГБОУ ВО «Московский государственный университет имени М.В.Ломоносова»

Серов Роман Андреевич
д.м.н., профессор заведующий патологоанатомическим отделением ФГБУ «Научный центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н Бакулева» МЗ РФ

Ведущая организация - ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки РФ

Защита диссертации состоится «___» _____ 2017 г. в ___ часов на заседании диссертационного совета Д 001.004.01 при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека» (117418 г. Москва, ул. Цюрупы д.3).

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт морфологии человека» и на официальном сайте morfolhum@mail.ru

Автореферат разослан «___» _____ 2017 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета
доктор медицинских наук

Михайлова Лилия Петровна

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 [Voulteenaho 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-гидроксипиридина 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.

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. Самостоя-

тельно 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.

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

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
Общее количество животных в эксперименте - 82 крысы.				
* - группа для измерения variability 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-хратно), 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.

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 парастернальной 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 произ-

водился поворот держателя против часовой стрелки на 100-110°, 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 животные продолжали 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 эндо-трахеально 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 внутрибрюшинно 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.

Электронно-микроскопический анализ миокарда правого предсердия

Обработка миокарда проводилась по стандартной методике. В качестве фиксаторов использовали последовательно 2,5% раствор глutarового альдегида на фосфатном буфере (рН=7,4) и 1% раствор четырехоксида осмия. Материал обезживали 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 мкм² для каждой митохондрии и каждого участка СПР, которые затем автоматически суммировались, предоставляя сведения о площади, занятой митохондриями и СПР в данном поле зрения. Ко-

личество полей зрения для каждой серии эксперимента составляло не менее 150. Вычисляли среднее арифметическое и стандартную ошибку среднего.

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

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.

Для оценки накопления и выведения МНП применяли метод подсчета иммуномеченых гранул секреторных КМЦ в полях зрения (38x38 мкм²). Используя одну из принятых классификаций [Mifune et al., 1991], различали два типа секреторных гранул - А-типа («зрелые»), имеющие четко очерченную

мембрану и осмиофильное содержимое - хранящие МНП (накопление пептида), и В-типа («растворяющиеся») с «размытой» периферией и менее электронно-плотным содержимым - высвобождающие МНП (высвобождение пептида) (рис. 1) (Рахчеева, Бугрова, 2010, Бугрова и др., 2012).

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. Следует отметить, что совместно с МНП в гранулах содержится другой натрийуретический пептид - предсердный (ПНП), а также еще около ста соединений (Steiner et al., 1990). В связи с этим, локализация МНП в секреторных гранулах кардиомиоцитов правого предсердия с использованием его иммуноцитохимического определения в гранулах А- и В-типов, позволяет произвести точную количественную оценку изменения продукции данного пептида в эксперименте.

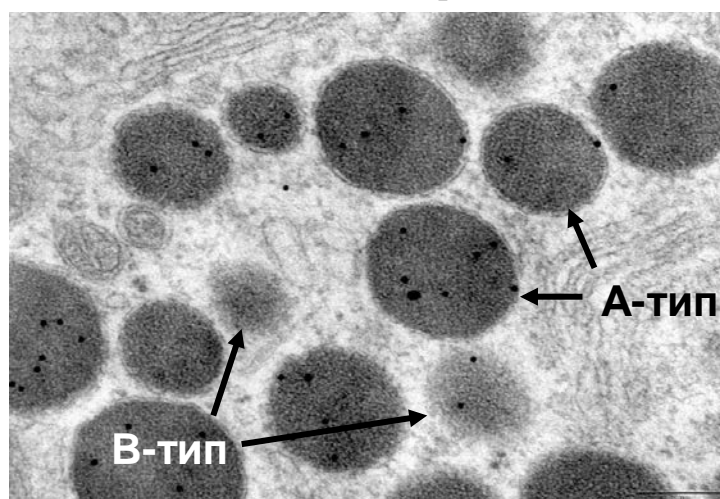


Рис. 1. Секреторные гранулы, содержащие МНП, в интактном кардиомиоците правого предсердия крысы. Увеличение X85000.

Структура миокарда левого желудочка на светоптическом 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 тка-

нью, зрелыми коллагеновыми волокнами в ее составе и кардиомиоцитами на микрофотографиях (2560x1920 пикселей в масштабе 1 пиксель - 1 микромметр 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.

Функциональные характеристики сердца крыс

Для оценки variability 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 variability сердечного ритма с использованием временных (ритмограмма и статистические показатели) и частотных (спектральный анализ) методы [Селье, 1960, Парин, Баевский, 1966, Анохин, 1973, Баевский, Иванов, 2001, Pagani et al., 1986, Malik, Camm, 1993].

В качестве статистических показателей при оценке variability сердечного ритма использовались:

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

Для оценки частотных показателей variability сердечного ритма, спектр разделялся на частотные диапазоны для крыс [Ramaekers D., 1999]: LF (0,195 – 0,74 Гц), VLF (менее 0,194 Гц), HF (0,78 – 2,5 Гц). Подсчитывались спектральные показатели variability сердечного ритма: суммарная мощность спектра (TP) (0 – 2,5 Гц), а также абсолютные мощности всех диапазонов спектра в мс².

Анализ variability сердечного ритма из полученной ЭКГ проводился из полученной ЭКГ, с помощью программы «Rhythm-service 1.0». Для обработки использовались визуально выделенные участки кардиоинтервалогаммы длиной 300RR без артефактов. Полученные данные обработаны с использованием программного пакета MS Excel и программы Statistica 10.0. Пока-

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

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).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

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

На этом фоне изменения продукции МНП в секреторных кардиомиоцитах правого предсердия не выявлено.

Количество "зрелых" форм гранул А-типа и "растворяющихся" гранул В-типа, содержащих пептид, не отличается от интактных показателей (рис. 2).

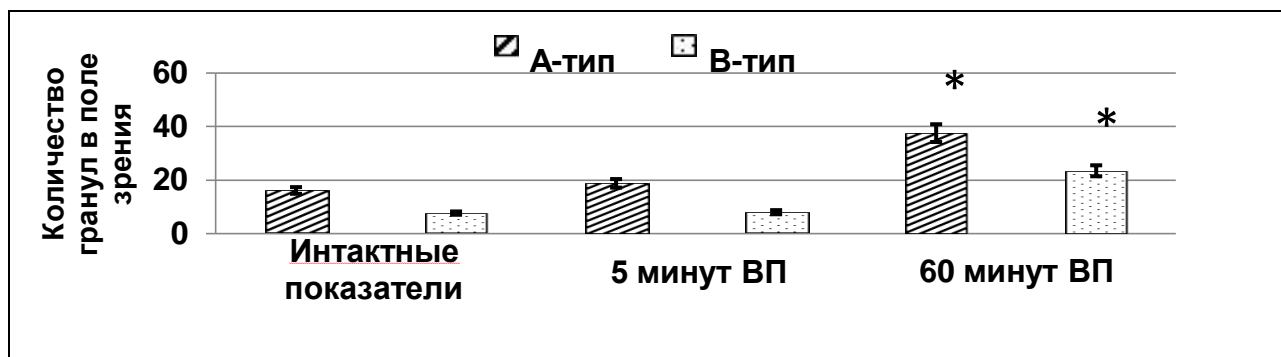
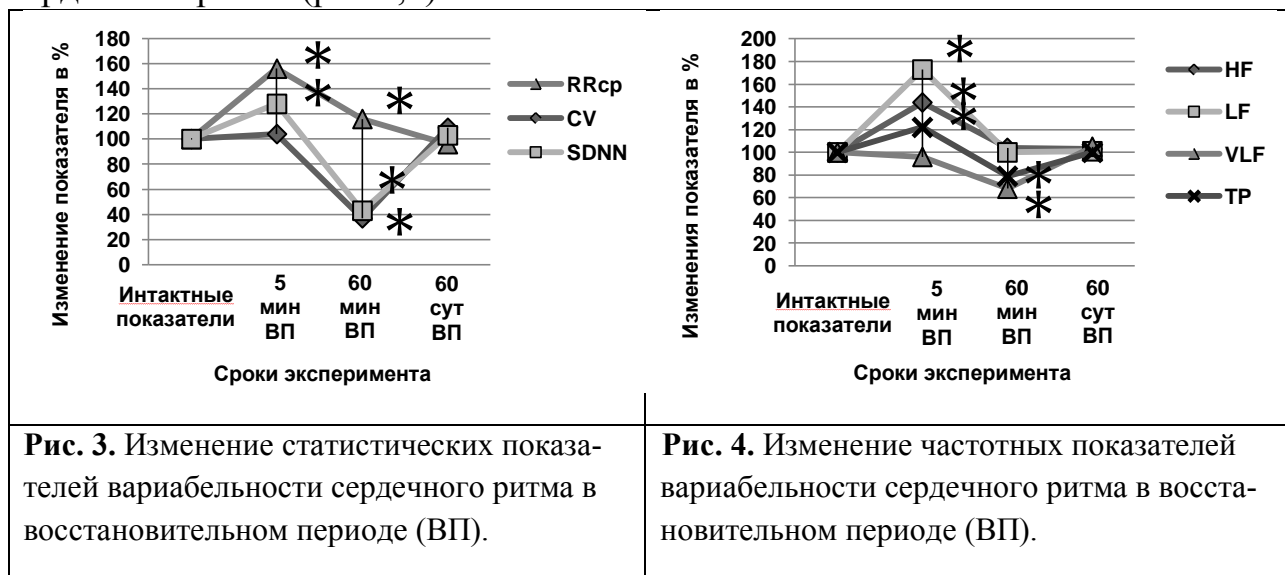


Рис. 2. Соотношение количества секреторных гранул, содержащих МНП, интактных животных и животных через 5 и 60 минут восстановительного периода (ВП) (планки погрешностей - $\pm m$).

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

Морфологический 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.

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 variability сердечного ритма (рис.3,4).



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

Через 5 минут после реанимационных мероприятий морфологические изменения в миокарде носят компенсаторный характер. Выраженных структурных перестроек, способных влиять на секреторный аппарат сердца и продукцию МНП не происходит. Резкое повышение артериального давления (АД) через 5 минут ВП [Мухина, Куликов, 2007] происходит в результате активации симпатической нервной системы, что подтверждается увеличением статистических и частотных показателей variability сердечного ритма в настоящем исследовании. Кратковременное повышение АД 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 [Ramos et al., 2009].

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. В других гемокапиллярах наблюдается гемостаз. Встречаются эритроциты неправильной формы и в ряде случаев они обнаруживаются в соединительной ткани. Реактивные изменения ультраструктуры кардиомиоцитов после острой гипоксии проявля-

ются в расширении СПР, гипертрофии комплекса Гольджи и в просветлении матрикса митохондрий.

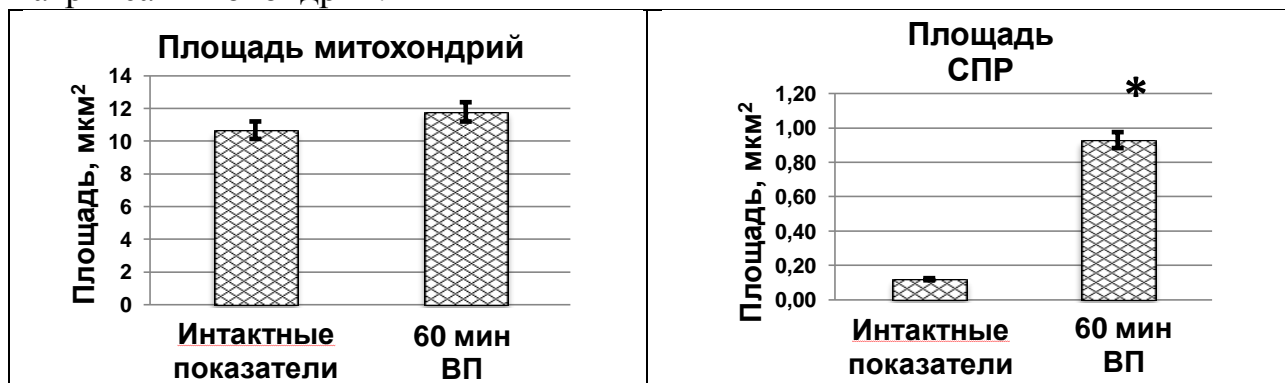


Рис. 5. Изменение общей площади митохондрий и СПР кардиомиоцитов правого предсердия в раннем восстановительном периоде (ВР) (планки погрешностей - $\pm m$).

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

Общая площадь митохондрий не отличается от интактных показателей, а площадь саркоплазматического ретикулула (СПР) увеличивается в 8 раз (рис. 5).

В кардиомиоцитах наблюдается усиление продукции МНП относительно интактных показателей: количество гранул А-типа увеличивается на 134%, гранул В-типа на 210% (рис. 2).

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.

Анализ вариабельности сердечного ритма через 60 минут ВР выявил увеличение статистического показателя RR_{cp} до 116%. Показатель вариации CV снизился до 37%, значение SDNN до 43% (рис. 3). Среди спектральных характеристик отмечено уменьшение показателя VLF до 68% и показателя TP до 79% от исходного уровня (рис. 4). Достоверного изменения значений HF и LF, по сравнению с интактными показателями, не обнаружено (рис. 4).

Увеличение продукции МНП в секреторных кардиомиоцитах правого предсердия **через 60 минут ВР** 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. На основании данных литературы об избыточном захвате ионов Ca^{2+} в саркоплазматический ретикулум в условиях дефицита кислорода [De Bold, 2011] и стимулирующем влиянии этого процесса на продукцию натрийуретических пептидов [Рахчеева, Бугрова, 2010, Бугрова и др., 2012, Ogawa, de Bold, 2014] можно предположить, что выявленное расширение СПР сопровождалось изменением ионного транспорта и приводило к увеличению продукции МНП.

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. В отдельных гемокапиллярах наблюдается деструкция эндотелия и выход эритроцитов в соединительную ткань. В соединительной ткани обнаружено большое количество волокон коллагена. В миокарде правого предсердия отмечено увеличение числа секреторных кардиомиоцитов с деструктивными изменениями. Выявлена гиперплазия и набухание митохондрий, образование вторичных лизосом, вакуолей, расхождение вставочных дисков.

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

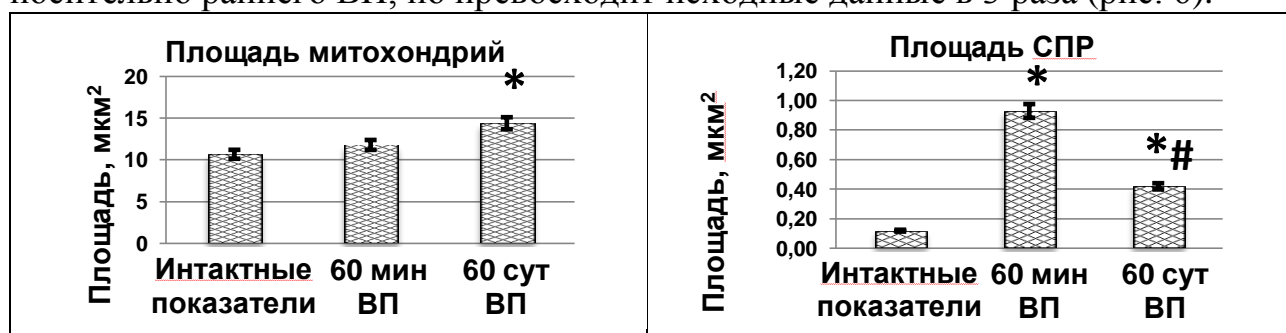


Рис. 6. Изменение общей площади митохондрий и СПР кардиомиоцитов правого предсердия в отдаленном восстановительном периоде (ВП) (планки погрешностей - $\pm m$).

* - 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. 7). Относительно раннего ВП число гранул А-типа возросло на 35%, гранул В-типа на 15% (рис. 7).

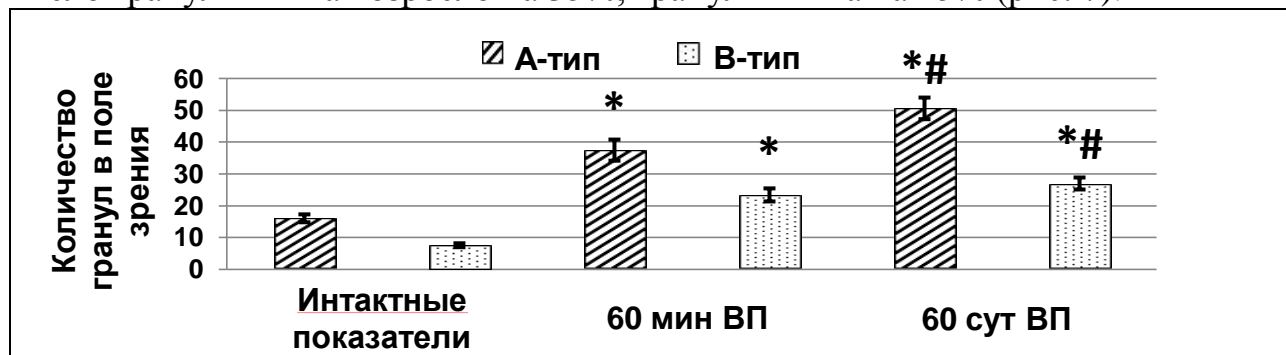


Рис. 7. Соотношение количества секреторных гранул, содержащих МНП, интактных животных и животных в восстановительном периоде (ВП) (планки погрешностей - $\pm m$).

* - 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). Выявлено расхождение вставочных дисков.

При окраске миокарда пикрофуксином по ван Гизону обнаружено увеличение количества зрелых коллагеновых волокон в соединительной ткани. Наибольшее скопление волокон коллагена встречается 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. 8).

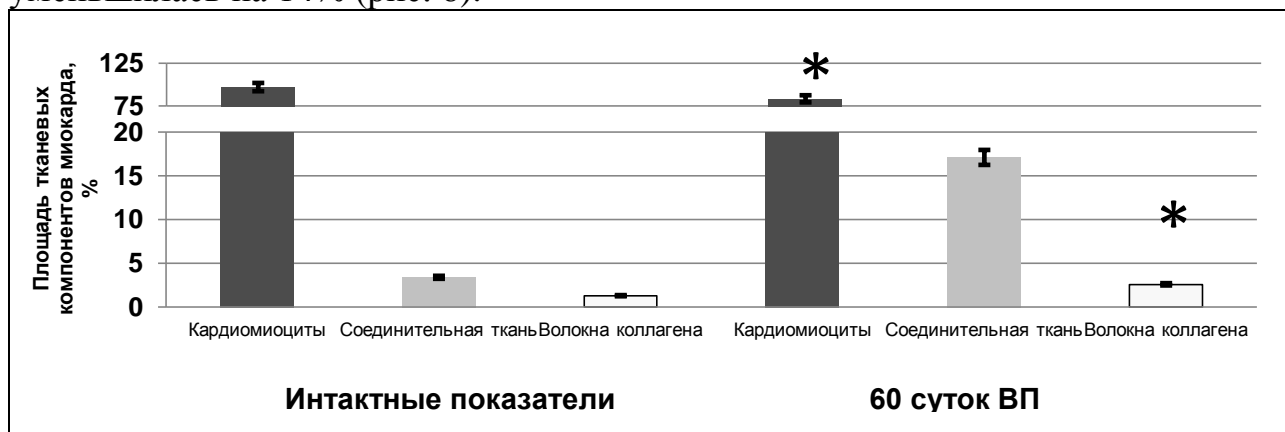


Рис. 8. Соотношение тканевых компонентов миокарда левого желудочка через 60 суток восстановительного периода (ВП) (планки погрешностей - $\pm m$).

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

Через 60 суток ВП статистические показатели variability сердечного ритма - RR_{ср}, SDNN и CV достоверно не отличаются от значений интактной серии. Значения спектральных характеристик HF, LF, VLF и суммарная мощность спектра TP также соответствует исходному уровню (рис. 3,4).

После кратковременной 10-минутной остановки кровообращения, на 60-е сутки ВП, в миокарде правого предсердия и левого желудочка наблюдаются глубокие структурные нарушения: увеличение площади соединительной ткани и повреждение внутриклеточных структур кардиомиоцитов. Полученные данные свидетельствуют о том, что кратковременное нарушение кровоснабжения сердца оказывается существенным повреждающим фактором, эффект от которого проявляется в отдаленные сроки восстановительного периода.

Согласно данным литературы, МНП блокирует избыточный приток ионов Ca^{2+} в митохондриях в условиях реперфузии, предотвращая их деструкцию и гибель клеток [Sun et al., 2010, Thireau et al., 2012, Pan et al., 2013]. Вероятно, обнаруженное увеличение продукции МНП на фоне гиперплазии, набухания митохондрий и расширения СПР - следствие цитопротекторного действия пептида в отдаленные сроки восстановительного периода.

Одним из основных факторов, стимулирующих эндокринную активность кардиомиоцитов через 60 суток ВП, явилось увеличение содержания со-

единительной ткани в миокарде, поскольку известно, что этот процесс повышает продукцию МНП в миокарде [Huntley, 2010].

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 секреторными кардиомиоцитами правого предсердия. Препарат вводили животным внутривенно в течение первого часа после острой гипоксии в дозе 25 мг/кг каждые 20 минут (3-хратно).

Через 60 минут ВП с применением мексидола, в эндотелии гемокпилляров отмечается большое число пиноцитозных пузырьков. Эритроциты в их просвете располагаются свободно и не встречаются в соединительной ткани, что указывает на сохранность сосудистой стенки. В секреторных кардиомиоцитах правого предсердия отмечена бóльшая сохранность мембранных структур относительно группы сравнения (60 минут ВП).

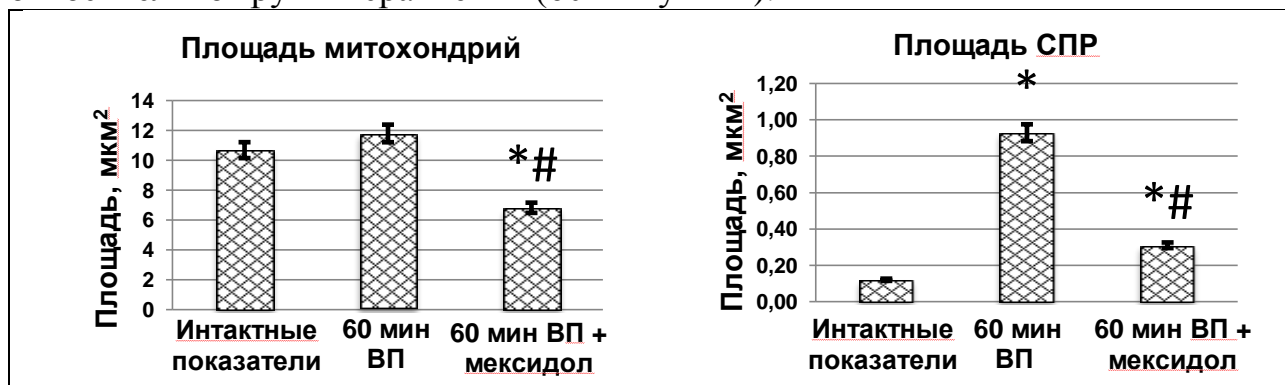


Рис. 9. Изменение общей площади митохондрий и СПР кардиомиоцитов правого предсердия в раннем восстановительном периоде (ВП) с применением мексидола (планки погрешностей - $\pm m$).

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

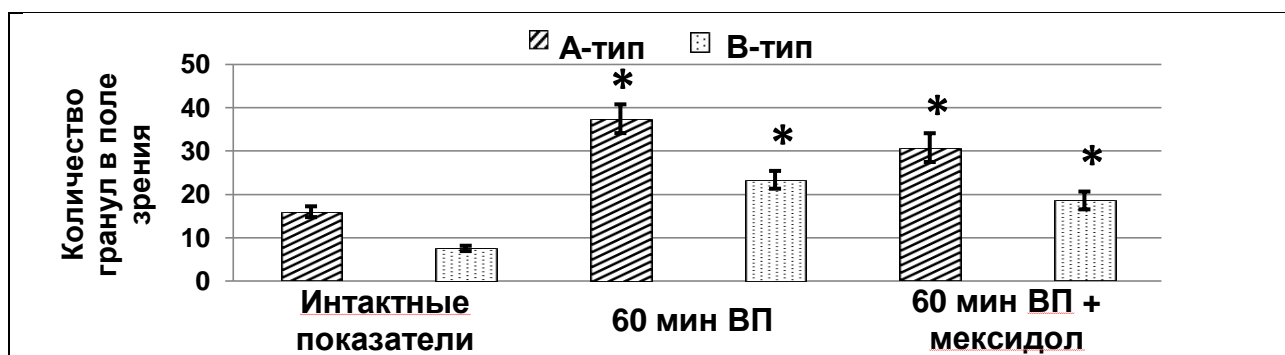


Рис. 10. Соотношение количества секреторных гранул, содержащих МНП, у интактных животных и животных в раннем восстановительном периоде (ВП) с применением мексидола (планки погрешностей - $\pm m$).

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

Выявлено незначительное просветление матрикса митохондрий, СПР менее расширен, чем в группе сравнения. Общая площадь, занятая митохондриями и СПР, уменьшилась относительно группы сравнения (рис. 9).

На этом фоне изменения продукции МНП в секреторных кардиомиоцитах правого предсердия не выявлено, так как количество гранул А- и В-типов с пептидом не отличается от группы сравнения (60 минут ВП) (рис. 10).

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

Мексидол, введенный в течение первого часа после острой гипоксии, способствует сохранению ультраструктуры секреторных кардиомиоцитов правого предсердия и улучшению в нем микроциркуляции по сравнению с группой без воздействия препарата. Мексидол не влияет на продукцию МНП в раннем восстановительном периоде, так как количество секреторных гранул, содержащих пептид, численно соответствует группе сравнения. Ранее на аналогичной экспериментальной модели, нами было установлено стимулирующее воздействие мексидола на продукцию другого натрийуретического пептида, имеющего высокое сходство с МНП [Рахчеева, Бугрова, 2010, Ogawa, de Bold, 2014] - предсердного (ПНП), широко применяющегося в клинической практике в качестве диагностического и прогностического маркера [Бугрова и др., 2014]. Различное влияние препарата на продукцию МНП и ПНП может быть следствием неодинаковых механизмов запуска образования секреторных гранул предсердных кардиомиоцитов, содержащих пептиды. В литературе нет исследований, посвященных сравнению механизмов активации продукции МНП и ПНП и воздействию антигипоксантов на этот процесс. Полученные в ходе нашей работы результаты свидетельствуют о необходимости проведения таких исследований в дальнейшем.

Через 60 суток ВП с применением мексидола 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. В секреторных кардиомиоцитах правого предсердия отмечается гипертрофия комплекса Гольджи, сохранение ультраструктуры большинства митохондрий. Деструктивные изменения в кардиомиоцитах отсутствуют.

Выявлено увеличение продукции МНП относительно группы сравнения (60 суток ВП). Содержание секреторных гранул А - типа возросло на 33%, гранул В - типа на 51% (рис. 11).

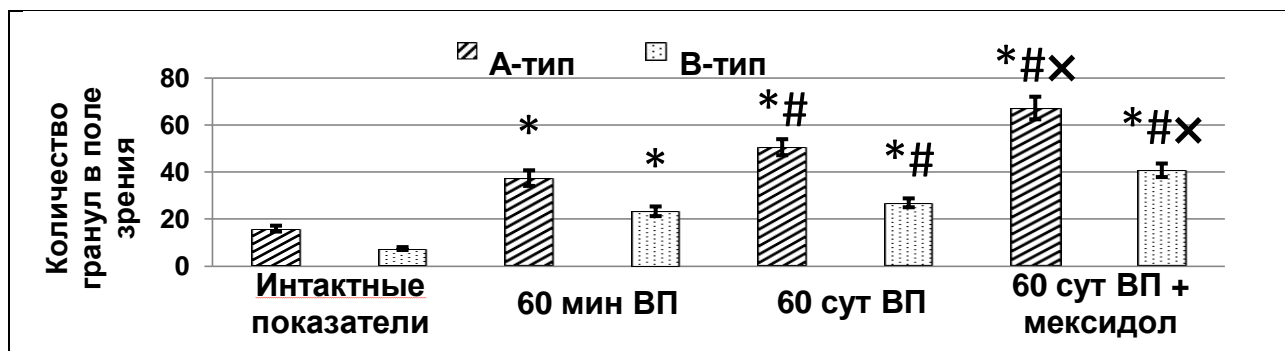


Рис. 11. Соотношение количества секреторных гранул, содержащих МНП, у интактных животных и животных в отдаленном восстановительном периоде (ВП) с применением мексидола (планки погрешностей - $\pm m$).

* - 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. Окраска пикрофуксином по ван Гизону выявила тонкие прослойки рыхлой волокнистой соединительной ткани в миокарде левого желудочка.

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. 12), что вероятно связано с их гипертрофией.

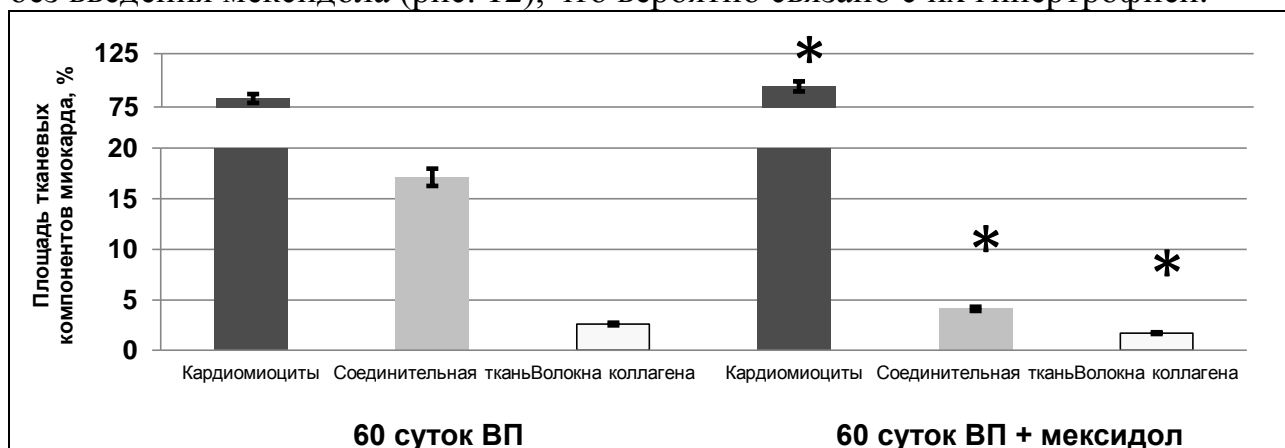


Рис. 12. Соотношение тканевых компонентов миокарда левого желудочка через 60 суток восстановительного периода (ВП) с применением мексидола (полоски погрешностей - $\pm m$).

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

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 ретикулула 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 мио-

карде увеличивается площадь соединительной ткани, доля зрелых коллагеновых волокон в её составе. Показатели вариабельности сердечного ритма значительно 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, введенный 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).

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Бугрова М.Л. Взаимосвязь интенсивности синтеза, накопления и секреции предсердного натрийуретического пептида кардиомиоцитов с уровнем регуляции сердечного ритма у крыс в условиях раннего постреперфузионного периода / М.Л. Бугрова, Е.И. Яковлева, Д.А. Абросимов // *Современные технологии в медицине.* – 2012. – Т. 1, № 3. – С. 26-30.
2. 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.
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. 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.
5. Галкина М.В. Предсердный и мозговой натрийуретические пептиды секреторных кардиомиоцитов в условиях солевой нагрузки в эксперименте / М.В. Галкина, Л.Б. Снопина, Н.Н. Проданец, Р.Д. Лапшин, И.И. Белоусова, Д.А. Абросимов, М.Л. Бугрова. // *Современные технологии в медицине.* – 2016. – Т. 8, №3. – С. 49-55.
6. Бугрова М.Л. Соотношение гранул, содержащих ANP, в секреторных кардиомиоцитах правого предсердия крыс в раннем постреперфузионном пе-

- риоде / М.Л. Бугрова, Д.А. Абросимов, Е.А. Румянцев // Сборник материалов X – ой научной сессии молодых ученых и студентов "Современное решение актуальных научных проблем в медицине". – Медицинский альманах (спецвыпуск). – 2011. – С. 119-120.
7. Бугрова М.Л. Влияние мексидола на количество и соотношение типов гранул, содержащих ANP, в предсердных миоцитах изолированного сердца / М.Л. Бугрова, Д.А. Абросимов, Е.Е. Харьковская // Материалы IV Международного молодежного медицинского конгресса "Санкт-Петербургские научные чтения, 2011". – 2011. – С. 252.
 8. Бугрова М.Л. Предсердный натрийуретический пептид при функциональной изоляции сердца и в условиях изолированной перфузии / М.Л. Бугрова, Д.А. Абросимов // Сборник материалов XV Юбилейной Всероссийской конференции "Человек и его здоровье". – 2012. – С. 42.
 9. Бугрова М.Л. Морфометрический анализ содержания ANP в секреторных гранулах миоцитов правого предсердия крыс в отдаленном постреперфузионном периоде / М.Л. Бугрова, Д.А. Абросимов // Материалы докладов XI конгресса "Международной ассоциации морфологов", Морфология. – 2012. – Т. 141, № 3. – С. 29.
 10. Бугрова М.Л. Интенсивность процессов синтеза и секреции ANP в гранулах предсердных миоцитов крыс под воздействием факторов ишемии/реперфузии / М.Л. Бугрова, Д.А. Абросимов // Материалы докладов и сообщений, представленных на III конференцию общества клеточной биологии, Цитология. – 2012. – Т. 54, №9. – С. 669-670.
 11. Бугрова М.Л. Изменение содержания ANP и BNP в гранулах предсердных миоцитов крыс в раннем восстановительном периоде / М.Л. Бугрова, Д.А. Абросимов // Сборник материалов II Всероссийской научно-практической конференции с международным участием "Морфология в теории и практике". – 2012. – С. 135.
 12. Абросимов Д.А. Взаимосвязь изменения количества гранул, содержащих ANP, в предсердных миоцитах со структурными перестройками в миокарде крыс в отдаленном постреперфузионном периоде / Д.А. Абросимов, О.С. Баскина, М.Л. Бугрова // Медиаль. – 2013. – № 1(6). – С. 63.
 13. Абросимов Д.А. Влияние мексидола на накопление и выведение мозгового натрийуретического пептида в условиях отдаленного восстановительного периода в миокарде крыс / Д.А. Абросимов // Медиаль. – 2015. – №1(15). – С. 160.
 14. 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.
 15. Бугрова М.Л. Влияние мексидола на процессы образования и выведения предсердного натрийуретического пептида в ишемизированном изолированном сердце крысы / М.Л. Бугрова Д.А. Абросимов // Морфология. – 2015. – Т. 147, № 3. – С. 64.

Принятые сокращения

АД - артериальное давление	HF - High Frequency
ВП – восстановительный период	LF - Low Frequency
КМЦ - кардиомиоциты	RR - кардиоинтервал
МНП - мозговой натрийуретический пептид	SDNN - стандартное отклонение временного ряда нормальных кардиоинтервалов NN
ПНП - предсердный натрийуретический пептид	TP - Total Power
СПР - саркоплазматический ретикулум	ULF - Ultra Low Frequency
CV - коэффициент вариации	VLF - Very Low Frequency