

ВЛИЯНИЕ СЕМАКСА НА АПОПТОТИЧЕСКУЮ ГИБЕЛЬ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫС ПРИ НЕОБРАТИМОЙ ИШЕМИИ И ИШЕМИИ-РЕПЕРФУЗИИ

А.Б.Бердалин¹, С.А. Гаврилова¹, А.В. Голубева¹, С.В. Буравков², В.Б. Кошелев¹

¹Кафедра физиологии и общей патологии; ²Кафедра экологической и экстремальной медицины ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова, 119192, Москва

Исследовались 5 групп белых беспородных крыс: интактный контроль; необратимая ишемия с препаратом и без; животные с реперфузией после 2,5 часов ишемии с введением Семакса (внутрибрюшинно в дозе 150 мкг/кг через 15 мин и через 2ч 15 мин после перевязки коронарной артерии) и без него. Через 72 часа после вмешательства забирался материал для световой микроскопии (окраска гематоксилином-эозином и TUNEL-анализ) из инфарктной зоны и условно интактного миокарда. При необратимой ишемии и ишемии-реперфузии в области передней стенки формируется зона некроза, в зонах условно интактного миокарда также развиваются существенные морфологические изменения. Эти признаки сопровождаются значимым увеличением апоптотического индекса. Семакс не оказал влияния на морфологию миокарда, однако статистически значимо уменьшал апоптотическую гибель кардиомиоцитов.

Ключевые слова: Семакс, апоптоз, миокард, апоптотический индекс, ишемия.

При развитии инфаркта миокарда реперфузионная терапия снижает острую смертность больных и повышает качество жизни [12]. Однако проблема повреждения и последующего ремоделирования миокарда все еще не решена. Главные события в кардиомиоцитах в зоне ишемии связаны с нарушением метаболизма клеток [11]. На уровне организма реализуется общая стресс-реакция [7]. Реперфузия приводит к свободнорадикальному повреждению и гиперактивации воспаления [4,11]. Это способствует расширению области поражения за счет некроза и апоптоза.

Пептидный препарат Семакс, фрагмент АКТГ, успешно применяют при терапии ишемических поражений мозга [2]. Результаты нашего более раннего исследования показали, что Семакс оказывает благоприятное влияние на ремоделирование миокарда: сдерживает гипертрофию, нормализует баланс между энергообеспечивающим и сократительным аппаратами кардиомиоцитов в зоне риска; улучшает рабочие характеристики миокарда у крыс при необратимой перевязке левой коронарной артерии и в модели с реперфузией, не влияя при этом на размер некроза [1]. Работ посвященных исследованию влияния Семакса на функциональное состояние миокарда после инфаркта немного и они подтверждают наши результаты, однако относительно механизмов этого действия авторы убедительных предположений не высказывают [9]. Мы предположили, что Семакс улучшает состояние миокарда непосредственно не затронутого ишемией. Учитывая, что работы посвященные влиянию Семакса на морфологию отсутствуют, целью настоящей работы стала оценка влияния Семакса на морфологические изменения и уровень апоптоза в острую стадию развития инфаркта миокарда у крыс в условиях ишемии и ишемии-реперфузии в областях непосредственно не затронутых ишемией.

Материалы и методы

Эксперимент проводили на самцах белых беспородных крыс массой 300-400 грамм. Работу выполняли с соблюдением "Правил проведения работ с использованием экспериментальных животных".

Под хлоралгидратным наркозом (400 мг/кг) по модифицированному методу Селье, без использования аппарата искусственного дыхания, необратимо переязывали левую коронарную артерию на уровне ушка левого предсердия или лигировали артерию на 2ч. 30 мин. с последующей реперфузией. Объем зоны риска в нашей модели составлял 30% от объема левого желудочка. В основном в литературе описывались модели реперфузии после 30-60 минут ишемии. В нашей модели длительность ишемии перед реперфузией была пролонгирована до 2,5 часов, что обеспечивает развернутую картину реперфузионного

синдрома, кроме того, такие сроки восстановления кровотока приближены ко времени начала терапии инфаркта в клинике. Семакс вводили внутривенно в дозе 150 мкг/кг через 15 мин и через 2ч. 15 мин. после лигирования левой коронарной артерии. Через 72 часа после операции животным проводили эвтаназию и взятие гистологического материала.

Всего в эксперименте участвовало 5 групп животных: интактный контроль (К); необратимая ишемия с препаратом (ИС) и без (И); животные с реперфузией после 2,5 часов ишемии с препаратом (ИРС) и без него (ИР). Пробы миокарда отбирали из 3 участков желудочка: из ишемизированного региона (передней стенки левого желудочка, ПС) и областей, непосредственно не задетых ишемией: верхней части боковой стенки левого желудочка и межжелудочковой перегородки (БС, МП).

Фиксацию, проводку и окраску материала гематоксилином-эозином выполняли по стандартным гистологическим методикам. Для проведения морфологического анализа мы провели ранжирование основных качественных признаков, изменение которых показывает степень повреждения или сохранности ткани миокарда, по их выраженности (таблица 1).

Для подсчета площади поперечного сечения кардиомиоцитов использовали серии микрофотографий поперечно-ориентированных кардиомиоцитов. Для этого в подсчет включали клетки с отношением поперечных осей не более 1,5:1.

Определение уровня апоптоза проводили методом TUNEL-анализа набором ApopTag (CHEMICON) по рекомендованной производителем методике для парафиновых срезов. Результаты представлены в виде апоптотического индекса (АИ) – количество клеток с TUNEL-позитивными ядрами отнесено к общему количеству ядер кардиомиоцитов (около 1000) на серии микрофотографий.

Статистическую обработку данных проводили в программе Statistica 6.0. Данные представлены в виде среднего \pm стандартное отклонение. Для оценки значимости межгрупповых различий использовали непараметрический критерий Манна-Уитни. Статистически значимыми различия признавались при $p \leq 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Данные анализа основных морфологических признаков с использованием разработанной нами шкалы представлены в таблице 1.

Таблица 1

Результат полуколичественной оценки основных параметров морфологии кардиомиоцитов миокарда левого желудочка крыс разных групп

Признак	Интактный контроль			Необратимая ишемия			Ишемия-реперфузия		
	ПС	БС	МП	ПС	БС	МП	ПС	БС	МП
Поперечная исчерченность	++ +	+++	+++	-	+	++	-	+	+
Степень повреждения клеток	-	-	-	+++++	++	++	++++	+++	+++
Кровоизлияния	-	-	-	++	-	-	+++	-	-
Немиоцитарные клетки	+	+	+	+++	++	++	+++++	+++	+++
Контрактуры	-	-	-	+	+	+	+++	++	+++

Количество «+» - выраженность признака; «-» - отсутствие признака.

Необратимая перевязка левой коронарной артерии приводит к формированию области некроза. В области полной ишемии на срезах обнаруживали обширную зону гибели кардиомиоцитов; наблюдали небольшие кровоизлияния, инфильтрацию ткани нейтрофилами и макрофагами по периферии зоны некроза (рисунок 1Б, таблица 1). Это соответствует классической картине развития инфаркта миокарда [3]. В области боковой стенки и межжелудочковой перегородки левого желудочка на продольно срезанных кардиомиоцитах нередко наблюдали контрактуры, зачастую отсутствовала поперечная исчерченность, ядра клеток были конденсированы, количество немиоцитарных клеток было увеличено (рисунок 1В, таблица 1).

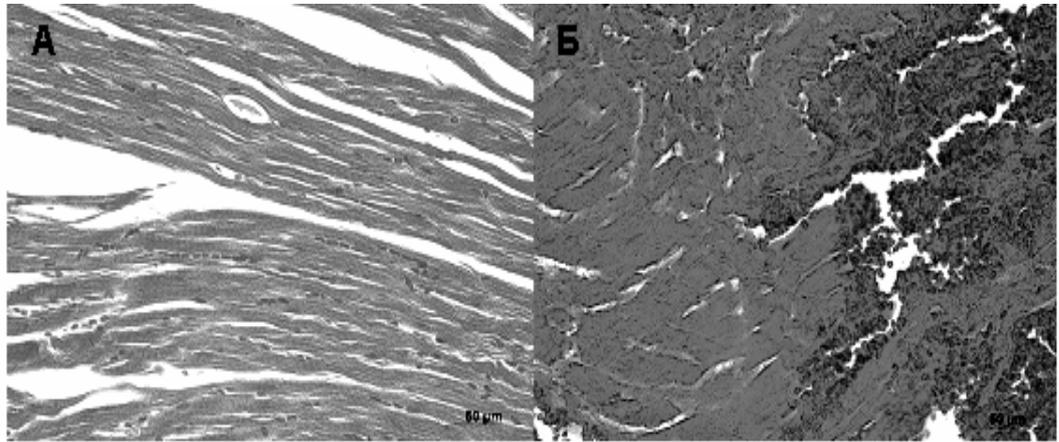


Рис. 1. Миокард крыс при экспериментальном инфаркте миокарда и действии семакса. Гематоксилин-эозин; x400.

А – межжелудочковая перегородка, группа интактного контроля;

Б – инфарктная зона передней стенки левого желудочка, группа необратимой ишемии;

Изменения в неишемизированном миокарде при инфаркте отмечаются многими авторами, их связывают с функциональной перегрузкой миокарда, гиперактивацией симпатической нервной системы [5,10].

При ишемии-реперфузии в зоне некроза частично восстанавливается кровообращение, что, с одной стороны, ведет к гибели несколько меньшего числа клеток, а с другой стороны к развитию массивного кровоизлияния в некротическую ткань, мощной воспалительной реакции – инфильтрации ткани немиоцитарными клетками, многочисленным контрактурам кардиомиоцитов (рисунок 1Г, таблица 1). Серьезно был поврежден условно интактный миокард: повсеместно наблюдались контрактуры и отсутствие поперечной исчерченности кардиомиоцитов, инфильтрация клетками воспаления (рисунок 1Д, таблица 1). Выраженность кровоизлияний, контрактур и инфильтрация немиоцитарными клетками в значительной степени отражает активность воспалительной реакции в миокарде. Поскольку Семакс не оказывал влияния на размер зоны некроза в наших ранних экспериментах, мы предполагали, что существенных изменений патоморфологической картины при введении препарата не будет. Эксперимент это подтвердил: введение Семакса не приводило к существенным изменениям микроскопической картины по сравнению с аналогичными группами без препарата, что может говорить о недостаточной выраженности действия семакса для регистрации его на светооптическом уровне, а также свидетельствует о слабом влиянии препарата на собственно ишемическое повреждение кардиомиоцитов и выраженность воспалительной реакции.

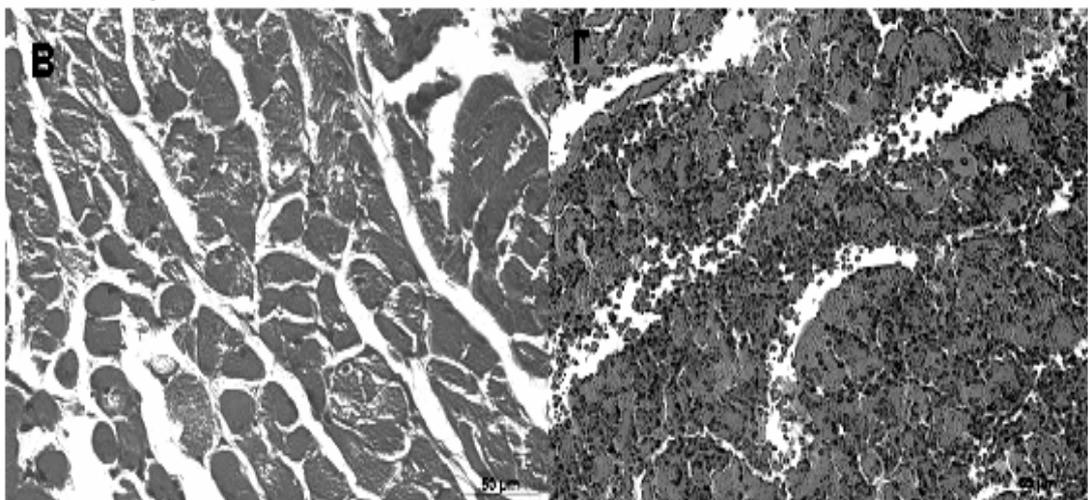


Рис. 1. Миокард крыс при экспериментальном инфаркте миокарда и действии семакса. Гематоксилин-эозин; x400.

В - боковая стенка левого желудочка, группа необратимой ишемии;

Г - зона инфаркта миокарда передней стенки левого желудочка, группа ишемии-реперфузии;

Средние значения площади кардиомиоцитов в интактном контроле и при инфаркте по всем трем участкам миокарда с препаратом и без него составили $90 \pm 30 \text{ мкм}^2$. Вероятно, в это время явления отека уже исчезли или оказались незначительны.

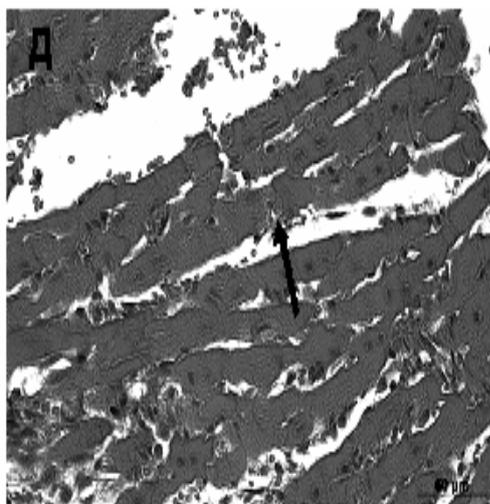


Рис. 1. Миокард крыс при экспериментальном инфаркте миокарда и действии семакса. Гематоксилин-эозин; x400.

Д - боковая стенка левого желудочка, группа ишемии-реперфузии, контрактуры кардиомиоцитов (указано стрелкой).

К 3 суткам зона некроза уже сформирована и гибель кардиомиоцитов апоптозом, как в зоне риска, так и в условно интактном миокарде, что связано с сохраняющейся воспалительной реакцией, в частности повышенной продукцией активных форм кислорода и провоспалительных факторов, а также с длительно действующими факторами вследствие изменившегося функционального состояния сердца (гиперактивация симпатической нервной системы, сократительный стресс) [6,10].

У крыс группы интактного контроля во всех областях миокарда по результатам TUNEL-анализа уровень апоптоза составлял 0,15-0,20% (рисунок 2А, таблица 2), что аналогично литературным данным [8].

Таблица 2

Апоптотический индекс (% апоптотических ядер на 100 ядер кардиомиоцитов) кардиомиоцитов миокарда левого желудочка крыс разных групп

Группа \ Стенка	К	И	ИС	ИР	ИРС
ПС	0,18±0,08	6,31±6,18*	0,97±0,64 [#]	7,12±7,47**	1,64±0,79 ^{##}
БС	0,20±0,10	2,13±1,01*	0,87±0,50	1,24±0,37**	0,66±0,52 ^{##}
МП	0,15±0,06	1,26±0,32*	0,36±0,26 [#]	2,40±2,41**	0,43±0,18 ^{##}

* - статистически значимые различия между группами интактного контроля (К) и необратимой ишемии (И), # - между группами необратимой ишемии (И) и ишемии с семаксом (ИС), ** - статистически значимые различия между группами интактного контроля (К) и ишемии-реперфузии (ИР), ## - между группами ишемии-реперфузии (ИР) и ишемии-реперфузии с семаксом (ИРС) ($p \leq 0,05$).

Необратимая ишемия и ишемия-реперфузия привели к увеличению апоптотического индекса в зоне развития инфаркта в 37 и 42 раза соответственно. В условно интактном миокарде (боковой стенке и межжелудочковой перегородке) количество TUNEL-позитивных клеток также было выше по сравнению с контролем в 13 и 7 раз при необратимой ишемии и в 7 и 14 раз при ишемии-реперфузии соответственно (рисунок 2Б, таблица 2).

Семакс, примененный в острую стадию развития инфаркта миокарда, снижает уровень апоптоза в 6,2 и 4 раза для ПС, БС и МП соответственно в условиях необратимой ишемии и в 6,2 и 8 раз в условиях ишемии-реперфузии.

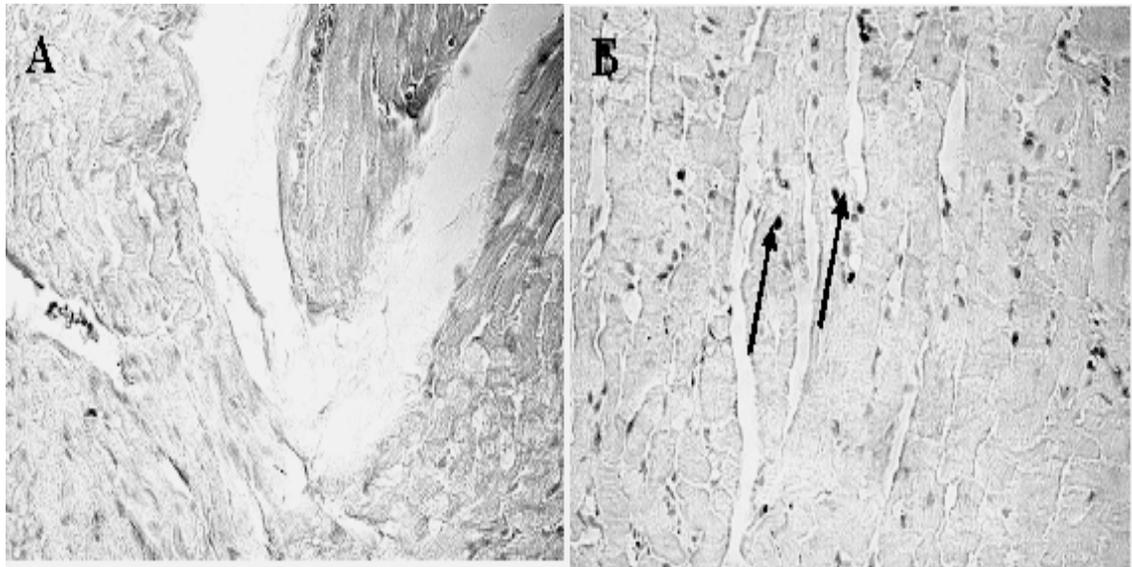


Рис. 2. Результаты TUNEL-анализа. x400. А – Миокард крысы из группы интактного контроля. Б – Боковая стенка левого желудочка при ишемии-реперфузии, видны TUNEL-позитивные клетки (указано стрелками). TUNEL-анализ.

Под воздействием Семакса наблюдается снижение апоптотического индекса в обеих моделях инфаркта миокарда и во всех его зонах, однако видимого влияния на светомикроскопическую картину препарат не оказал. Если бы такое существенное снижение апоптотического индекса было бы связано с уменьшением активности воспалительной реакции, то эффект препарата был бы заметен и при морфологическом анализе. Однако этого не наблюдалось, следовательно можно предполагать влияние препарата на некий длительно действующий фактор (например, на активность симпатической нервной системы), реализующееся в отставленные сроки после инфаркта уменьшением гипертрофии и улучшением рабочих характеристик миокарда.

Выводы

Таким образом, при необратимой ишемии и ишемии-реперфузии в области передней стенки формируется зона некроза, в зонах условно интактного миокарда, особенно при ишемии-реперфузии, также развиваются существенные морфологические изменения: контрактуры кардиомиоцитов, инфильтрация ткани немиоцитарными клеточными элементами. Эти признаки сопровождаются значимым увеличением апоптотического индекса. Семакс не оказал влияния на выраженность ишемического повреждения и интенсивность воспалительной реакции, тем не менее, уменьшал апоптотическую гибель клеток на 3 сутки инфаркта миокарда, влияя, таким образом, на некий длительно действующий фактор.

ЛИТЕРАТУРА

1. Гаврилова С.А. Кардиопротективный эффект пептидного препарата семакс в условиях экспериментального ишемического и реперфузионного повреждения миокарда / Гаврилова С.А, Голубева А.В.// Регионарное кровообращение и микроциркуляция. – 1998. - т. 7. - № 3 (27). – С. 71-79.
2. Гусев Е.И. Ишемия головного мозга. / Гусев Е.И.. - М., 2001.
3. Калитеевская В.Ф. Морфологические изменения при инфаркте миокарда / Калитеевская В.Ф.// Архив патологии. – 1957. - № 5. - С. – 20.
4. Ambrosio G. Myocardial reperfusion injury / Ambrosio G, Tritto I.// Eur. Heart J. Suppl. - 2002. - Vol. 4. Suppl.B. - PP. 28-30.
5. Burniston J.G. Beta2-Adrenergic receptor stimulation in vivo induces apoptosis in the rat heart and soleus muscle / Burniston J.G, Tan L.B.// J. Appl. Physiol. – 2005. - Vol. 98(4). - PP. 1379-86
6. Eefting F. Role of apoptosis in reperfusion injury / Eefting F., Rensing B.// Cardiovascular Research. - 2004. - Vol. 61. - PP. 414– 426.

7. Goldspink D.F. Catecholamine-induced apoptosis and necrosis in cardiac and skeletal myocytes of the rat in vivo: the same or separate pathways? / Goldspink D.F, Burniston J.G.// Exp. Physiol. – 2004. - Vol. 89. - PP. 407-416.
8. Mercanoglu G. The effects of nebivolol on apoptosis in a rat infarct model / Mercanoglu G., Safran N.// Circ. J. - 2008. - Vol. 72. - PP. 660-670.
9. Orlov A.V. Effect of Semax and Semax-Heparin mixture on isolated heart activity after total ischemia in rats. / Orlov A.V, Khomutov A.E.// Bull. of Exp. Biol. and Med. – 1999. - №11. – pp. 1084-1086.
10. Redel A Impact of ischemia and reperfusion times on myocardial infarct size in mice in vivo. / Redel A, Jazbutyte V.// Exp. Biol. Med. (Maywood). – 2008. - Vol. 233(1). - PP. 84-93.
11. Skyschally A. Pathophysiology of Myocardial Infarction. Protection by Ischemic Pre- and Postconditioning. / Skyschally A, Schulz R.// Herz. – 2008. - N. 2. - PP. 88-100.
12. The GUSTO Investigators. An international randomized trial comparing four thrombolytic strategies for acute myocardial infarction // N. Engl. J. Med. – 1993. - Vol. 329. - PP. 673-82.

SEMAX INFLUENCE ON RAT CARDIOMYOCYTE APOPTOTIC CELL DEATH IN IRREVERSIBLE ISCHEMIA AND ISCHEMIA-REPERFUSION

Berdalin A.B, Gavrilova S.A, Golebeva A.V, Buravkov S.V, Koshelev V.B.

5 groups of male rats were investigated: control group; irreversible ischemia with drug and without; the animals with reperfusion after 2.5 hours of ischemia with drug and without it. Samples for light microscopy (haematoxylin-eosin and TUNEL-analysis) of the risk area (anterior wall of left ventricle) and conditionally intact myocardium (lateral wall and interventricular septum) were taken 72 hours after intervention. Semax were injected intraperitoneally at a dose of 150 mg / kg after 15 minutes and after 2 hours 15 minutes after ligation of coronary artery. The necrosis was formed in the anterior wall area both under irreversible ischemia and ischemia-reperfusion. Substantial morphological changes also developed in areas of relatively intact myocardium. These signs are accompanied by a significant increase of apoptotic index. Semax had no effects on the morphology of myocardium, but significantly reduced apoptosis of cardiomyocytes.

Key words: Semax, apoptosis, myocardium, apoptotic index ischemia.

Бердалин Александр Берикович; аспирант кафедры физиологии и общей патологии ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова; 119192, г. Москва, Ломоносовский проспект, д.31, корп.5; alex_berdalin@mail.ru; 8-(495)-932-88-13
 Гаврилова Светлана Анатольевна; к.б.н., доцент кафедры физиологии и общей патологии ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова; 119192, г. Москва, Ломоносовский проспект, д.31, корп.5; sgavrilova@mail.ru; 8-(495)-932-88-13
 Голубева Анна Валерьевна; к.б.н., ассистент кафедры физиологии и общей патологии ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова; 119192, г. Москва, Ломоносовский проспект, д.31, корп.5; avgolubeva@gmail.com; 8-(495)-932-88-13
 Буравков Сергей Валентинович; д.м.н., ведущий научный сотрудник научно-исследовательской лаборатории компьютерных технологий в медицине ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова; 119192, г. Москва, Ломоносовский проспект, д.31, корп.5; buravkov@fbm.msu.ru; тел. (факс): 8-(495)-932-99-12
 Кошелев Владимир Борисович; д.б.н., проф., зав. кафедрой физиологии и общей патологии ФФМ МГУ имени М.В. Ломоносова; 119192, г. Москва, Ломоносовский проспект, д.31, корп.5; koshelevv@fbm.msu.ru; 8-(495)-932-99-82