

2. **Крыжановский Г.Н.** Современная патофизиология как экспериментальная, фундаментальная и интегративная медико-биологическая наука // Вест. Рос. АМН. 1997. № 5. С. 60-62.
3. **Bormann I.** In Bolk: Hand der vergleichenden Anatomie der Wirbeltier 3, 1937.
4. **Laguesse E.** Structure du pancreas introhepatique chez les poissons // C. R. Acad., 1891. С. 112, 440.
5. **Lazarow A., Cooperstein J.** Studies on the isolated islet tissue of fish // Biol. Bull. 1951. Vol 100. No 3. P. 191-198.

Modelling of pancreas pathology in fish

**G.I. Pronina, N.Yu. Koryagina, A.O. Revyakin, G.D. Kapanadze,
O.I. Stepanova, O.V. Baranova, Yu.B. Lvov**

The peritoneum injection of alloxan in doses 50 to 300 mg/kg thresh to juvenile carp causes pancreas pathology. The content of glucose in blood increases in fish of experimental group, the structure of the islets of Langergans is broken.

Key words: pathology modeling, carp, pancreas, the islets of Langergans, alloxan ($C_4H_2N_2O_4$).

Защитные эффекты фармакологического прекондиционирования морфином на модели острого инфаркта миокарда у крыс CD

Э.Р. Шайхутдинова^{1,2}, О.Н. Хохлова², Г.А. Слащева², А.Н. Мурашев²

¹ – Пуцинский Государственный естественно-научный институт, Пуцино

² – Лаборатория биологических испытаний Филиала Института биоорганической химии им. акад. М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Пуцино

Контактная информация: Шайхутдинова Эльвира Рауильевна, shai78@rambler.ru

Изучена эффективность фармакологического preconditionирования морфином на модели острого инфаркта миокарда у крыс CD в сравнении с ишемическим preconditionированием, а также влияние этих защитных механизмов на размер инфаркта в зависимости от длительности тестовой ишемии.

Ключевые слова: острый инфаркт миокарда, морфин, ишемическое и фармакологическое preconditionирование, крысы CD.

В 1986 г. С.Е. Митру с соавт. обнаружили кардиопротективный феномен, названный ишемическим preconditionированием (ИПК). Суть его заключается в том, что после серии кратковременных периодов ишемии сердце приобретает повышенную устойчивость к повреждающему действию длительного нарушения коронарного кровотока, что проявляется в уменьшении объема зоны некроза. В последующие годы было выяснено, что инициирование адаптационных механизмов ИПК возможно с помощью правильно подобранных фармакологических подходов, имитирующих защитные эффекты preconditionирования миокарда без использования ишемических стимулов. Так, морфин может мимикрировать защитный эффект ИПК [9]. В 1996 г. было показано, что и ИПК, и фармакологическое preconditionирование морфином повышает устойчивость сердца к повреждающему действию длительного нарушения коронарного кровотока [3, 7, 8].

Также большой теоретический и практический интерес представляет исследование противоишемической эффективности preconditionирования в зависимости от длительности тестовой ишемии [6]. Для этого были выполнены эксперименты, в которых инфаркт-лимитирующий эффект ишемического и фармакологического preconditionирования морфином изучался при продолжительностях последующей ишемии 25 и 40 мин.

В связи с этим, целью настоящей работы явилось изучение защитных эффектов фармакологического preconditionирования морфином на модели острого инфаркта миокарда у крыс CD в сравнении с ишемическим preconditionированием, а также эффективности этих механизмов в зависимости от длительности тестовой ишемии.

Материалы и методы

В экспериментах были использованы животные SPF-статуса, полученные из Питомника лабораторных животных ФИБХ РАН, г. Пушкино. Животные содержались в стандартных условиях (температура $21 \pm 3^\circ\text{C}$, влажность 30-70%, 12-час период освещения, корм и вода — *ad libitum*). Все манипуляции с животными осуществлялись в соответствии с требованиями Институтской Комиссии ФИБХ РАН по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных.

На аутобредных самцах крыс Sprague-Dawley (300-350 г) под уретановым наркозом (1,5 г/кг, внутривенно) моделировали острый инфаркт миокарда окклюзией левой коронарной артерии (ЛКА) с последующей реперфузией, при искусственной вентиляции легких с частотой дыхания 60-65 в мин и дыхательным объемом 10 мл на 1 кг массы тела (Rodent Ventilator UGO BASILE 7025). Среднее артериальное давление (СрАД) и частоту сердечных сокращений (ЧСС) в течение эксперимента измеряли электроманометром через катетер, введенный в бедренную артерию. Регистрация и обработка сигнала производилась с помощью программного обеспечения «NemoDynamics» версия 1.1. (ИБК РАН, Россия). Введения веществ осуществляли через катетер, имплантированный в бедренную вену.

Для оценки защитных свойств морфина в сравнении с ишемическим preconditionированием животных подвергали 25-мин окклюзии ЛКА с последующей 2-час реперфузией. За 30 мин до окклюзии крысы получали три 5-мин инфузии морфина (20 мкг/кг/мин), разделенные 5-мин периодами (группа ФПК-«фармакологическое preconditionирование»), или три 5-мин коронароокклюзии, разделенные меж-

ду собой 5-мин эпизодами реперфузии (группа ИПК — «ишемическое прекондиционирование»). Контролем служили животные, у которых моделировали окклюзию-реперфузию без дополнительных вмешательств.

При исследовании эффективности фармакологического и ишемического прекондиционирования в зависимости от длительности тестовой ишемии использовали те же схемы экспериментов, но окклюзия ЛКА длилась 40 мин. Каждая экспериментальная группа включала 8 животных.

Определение размеров анатомической зоны риска и зоны инфаркта производили с помощью методики «двойного окрашивания» 2% метиленовым синим и 1% трифенилтетразолием хлоридом (ТТХ). После окончания реперфузии вокруг коронарной артерии вновь затягивали лигатуру и внутривенно вводили раствор метиленового синего до визуализации границы между кровоснабжаемыми и ишемизированными отделами. Далее сердце быстро удаляли, отмывали в физиологическом растворе и разрезали в поперечном направлении на пять срезов одинаковой толщины. Полученные срезы инкубировали в течение 15 мин в растворе

ТТХ при температуре 37°C и pH 7,4, затем фиксировали 5 мин в 10% формалине. После этого изображения базальных поверхностей срезов фотографировали цифровой камерой SONY DXC-107AP, соединенной с фотографическим устройством микроскопа OLYMPUS SZ40. Компьютерную обработку изображений осуществляли с использованием программы *Image TOOL*. Общую площадь инфаркта вычисляли по пяти срезам и представляли в процентном отношении от площади зоны риска. Затем таким же способом как и в случае зоны инфаркта вычисляли площадь анатомической зоны риска от общей площади левого желудочка для данного сердца.

Статистическую обработку данных проводили с использованием пакета программ *Statistica 7 for Windows*. Данные представляли в виде «среднее $\pm$ стандартное отклонение», изменения исследуемых показателей считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Показатели системной гемодинамики, а именно СрАД и ЧСС животных во время проведения эксперимента представлены в табл. 1.

Таблица 1
Показатели системной гемодинамики в экспериментальных группах

Группы	СрАД, мм.рт.ст.			ЧСС, уд/мин		
	исходно	конец окклюзии	конец реперфузии	исходно	конец окклюзии	конец реперфузии
25 мин окклюзии ЛКА						
Контроль	84,3 $\pm$ 4,2	64,5 $\pm$ 5,8*	48,0 $\pm$ 3,5*	291,8 $\pm$ 11,5	364,9 $\pm$ 19,0*	401,5 $\pm$ 14,2*
ФПК	83,8 $\pm$ 2,5	56,5 $\pm$ 3,9*	56,3 $\pm$ 6,8*	319,9 $\pm$ 17,4	338,6 $\pm$ 28,4	373,4 $\pm$ 15,9*
ИПК	79,0 $\pm$ 2,5	60,0 $\pm$ 2,4*	52,8 $\pm$ 6,8*	291,1 $\pm$ 16,8	317,6 $\pm$ 13,0	318,6 $\pm$ 23,1*

40 мин окклюзии ЛКА						
Контроль	77,3±3,5	58,6±3,6*	53,3±3,2*	296,1±11,2	415,3±28,9*	441,5±25,6*
ФПК	83,5±2,1	69,6±3,4*	70,3±3,5*, #	326,1±17,1	379,3±23,0	358,6±12,5#
ИПК	75,9±5,3	59,3±4,1*	60,1±4,4*, #	270,7±6,3	357,9±14,2*	368±10,0*, #

Примечание: исходно — после имплантации артериального катетера; конец окклюзии — 25-я или 40-я мин после окклюзии ЛКА; конец реперфузии — в конце эксперимента;

* — $P<0,05$ относительно исходных данных, # — $P<0,05$ — относительно контрольной группы.

Исходно эти параметры достоверно не различались во всех группах. При 25-мин окклюзии ЛКА во всех трех группах к концу окклюзии наблюдалась гипотензия, а рефлекторная тахикардия на снижение АД была обнаружена только в контрольной группе. К концу реперфузионного периода в контроле сохранялась гипотензия и тахикардия по сравнению с исходными значениями. В группе «фармакологическое прекондиционирование» (ФПК) к концу эксперимента АД оставалось сниженным и возрастала частота сердечбиений, в группе «ишемическое прекондиционирование» (ИПК) также наблюдалось гипотензия, ЧСС же оставалась на исходном уровне и статистически значимо отличалась от величин контрольной группы на 120-й мин реперфузии. При 40-мин окклюзии ЛКА среднее АД в группах снижалось к концу окклюзии и оставалось сниженным до конца эксперимента, у контрольных животных величи-

при этом возникала как в контроле, так и в группе «ИПК» на протяжении всего окклюзионно-реперфузионного периода, причем на 120-й мин реперфузии частота сердцебиений у контрольных животных была достоверно выше, чем в двух других группах. При фармакологическом прекондиционировании морфином повышение ЧСС было менее выражено во время эксперимента. То есть ишемическое и морфиновое прекондиционирование уменьшило частоту развития тахикардий в реперфузионный период и предотвратило снижение артериального давления по сравнению с контролем при 40-мин окклюзии ЛКА (табл. 1).

Определение анатомической зоны риска не выявило отличий в группах, ее размер составил с $33,0\pm1,7$ до $39,3\pm3,2\%$ от общей площади левого желудочка, что свидетельствует об одинаковом объеме миокарда, подвергшегося ишемии (табл. 2).

Таблица 2

Размер анатомической зоны риска, выраженный в процентах от общей поверхности левого желудочка

Группы	25 мин окклюзии ЛКА	40 мин окклюзии ЛКА
Контроль	35,0±2,6%	39,3±3,2%
ФПК	33,1±2,1%	36,6±1,9%
ИПК	36,3±2,8%	35,5±1,6%

на этого показателя в конце реперфузии была достоверно ниже, чем в группах с прекондиционированием. Тахикардия

В то же время, размер зоны инфаркта был различным в зависимости от условий эксперимента (рис., табл. 3). Так,

при 25-мин окклюзии ЛКА применение морфина в группе «ФПК» приводило к статистически достоверному снижению размера инфаркта до $33,3 \pm 2,7\%$ (относительно контроля $42,9 \pm 2,7\%$). Ишемическое preconditionирование также оказывало инфаркт-лимитирующее действие и уменьшало зону инфаркта еще более эффективно ($14,1 \pm 4,1\%$, $P < 0,05$).

Исследование защитного действия preconditionирования при более длительной 40-мин ишемии ЛКА выявило достоверное увеличение зоны инфаркта в сравнении с 25-мин окклюзией во всех экспериментальных группах. В контрольной группе размер инфаркта

составил $55,2 \pm 2,5\%$ ($P < 0,05$ относительно 25-мин окклюзии ЛКА). В группе «ИПК» зона инфаркта достоверно увеличивалась вдвое, с $14,1 \pm 4,1\%$ до $30,6 \pm 3,3\%$, защитный эффект preconditionирования при этом сохранялся. Морфин также оказывал кардиопротективное действие, размер инфаркта составлял $45,1 \pm 1,8\%$ ($P < 0,05$ относительно контроля).

Сравнивая эффекты фармакологического и ишемического preconditionирования при 25- и 40-мин окклюзии, можно заметить достоверную разницу в размерах инфаркта миокарда между этими группами. Эти результаты подтверждают, что опыты, выполненные

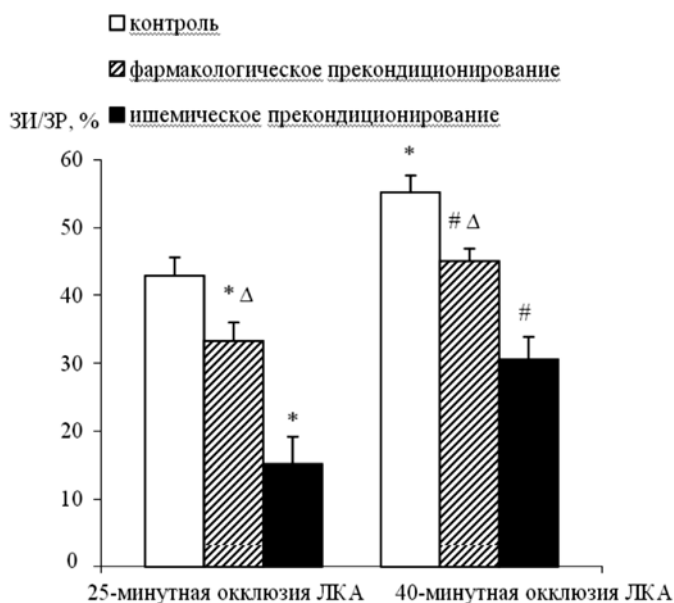


Рис. Защитные эффекты фармакологического и ишемического preconditionирования при разной продолжительности окклюзии левой коронарной артерии (ЛКА). Зона инфаркта (ЗИ) выражена в процентах от зоны риска (ЗР).

* — $P < 0,05$ относительно контроля при 25-минутной окклюзии ЛКА;

— $P < 0,05$ относительно контроля при 40-минутной окклюзии ЛКА;

Δ — $P < 0,05$ относительно группы «ишемическое preconditionирование».

Данные для построения рисунка

Группы	Контроль		ИПК		ФПК	
	Mean	SEM	Mean	SEM	Mean	SEM
25-мин окклюзия ЛКА	42,9	2,7	14,1	4,1	33,3	2,7
40-мин окклюзия ЛКА	55,2	2,5	30,6	3,3	45,1	1,8

с применением фармакологических агентов, нельзя считать воспроизведением классического феномена прерывистой ишемии, поскольку ишемическими стимулами мы воспроизводим именно ишемию клеток, а фармакологическими препаратами — лишь их гипоксию [2]. Возможно, при фармакологических подходах запускаются определенные пути защиты, действующие на эффекторы, которые активизируют внутриклеточные сигнальные процессы и приводят к изменениям в метаболизме, облегчающим выживание миоцитов в условиях длительной ишемии. Например, известно, что основные механизмы защиты миокарда с помощью морфина связаны с активацией АТФ-зависимых K⁺-каналов [4]. При ишемическом же preconditionировании реализуются все возможные арсеналы, обеспечивающие толерантность сердца к ишемии — от изменения эффективности и скорости метаболических реакций, использующих АТФ, до образования целого ряда эндогенных триггеров, взаимодействующих с рецепторами кардиомиоцитов и далее активирующих разные пути проведения внутриклеточного сигнала, в которых участвуют медиаторы и вторичные посредники ишемического preconditionирования (ε-изоформа протеинкиназы C и АТФ-зависимые K⁺-каналы), или прямо влияющих на

активность ферментов [1]. Тем не менее, в литературе имеются сообщения о более эффективном кардиопротективном действии морфина. Так, в экспериментах Schultz с соавт. [7] было показано, что морфиновое preconditionирование почти полностью воспроизводит эффект ишемического. Трудно сказать, в чем причина различий между результатами наших исследований и подобными данными. Возможно, это связано с использованием крыс разных линий, применением разных средств для наркоза [5].

Выводы

Таким образом, в результате наших исследований было показано, что фармакологическое preconditionирование морфином оказывает инфаркт-лимитирующее действие как при 25-мин, так и при более длительной 40-мин окклюзии ЛКА, но защитный эффект морфина в схеме, идентичной ишемическому preconditionированию, оказывается слабее.

Список литературы

1. Писаренко О.И. // Кардиология. 2005. № 9. С. 62-72.
2. Сидоренко Г.И., Гуринов А.В. // Кардиология. 1997. № 10. С. 4-15.
3. Ela C., Barg J., Vogel Z., et al. // J. Mol. Cell. Cardiol. 1997. V. 29. P. 711-720.
4. Fryer R.M., Hsu A.K., Nagase H., et

- al.* // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2000. v. 294(2), P. 451-457.
5. *Jugdutt B.I., Joljart M.J., Khan M.I.* // Circulation. 1996. V. 94. P. 94-101.
6. *Riess M.L., Stowe D.F., Warltier D.C.* // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. 2003. V. 286. P. 1603-1607.
7. *Schultz J.E., Hsu A.K., Gross G.J.* // Circ. Res. 1996. V. 78. P. 1100-1104.
8. *Schultz J.J., Hsu A.K., Gross G.J.* // J. Mol. Cell. Cardiol. 1997. V. 29. P. 2187-2195.
9. *Wang T.L., Chang H., Hung C.R., et al.* // Cardiovasc. Res. 1998. V. 40. P. 557-563.

Protective effect of pharmacological preconditioning by morphine on acute myocardial infarction in CD rats

E.R. Shaykhutdinova, O.N. Khokhlova, G.A. Slashcheva, A.N. Murashev

The peritoneum injection of alloxan in doses 50 to 300 mg/kg thresh to juvenile carp causes pancreas patEfficiency pharmacological preconditioning with morphine on model of an acute myocardial infarction at CD rats in comparison with ischemic preconditioning and also influence of these protective mechanisms on the infarct size depending on duration of a test ischemia is studied.

Key words: morphine, ischemic and pharmacological preconditioning, CD rats.