

*Лискова Ю. В., Саликова С. П., Стадников А. А.*

## **КАРДИОПРОТЕКТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ МЕЛАТОНИНА: СОСТОЯНИЕ ВОПРОСА И РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННОГО ИССЛЕДОВАНИЯ**

*Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (заведующий – проф. А. А. Стадников)  
Оренбургской государственной медицинской академии, Оренбург, e-mail: liskovaj@bk.ru*

Мелатонин изучается с момента его открытия А. Лернером с соавт. в 1958 году как гормон шишковидной железы. В 2003 году была продемонстрирована причастность мелатонина к регуляции деятельности сердечно-сосудистой системы, артериального давления, сократимости миокарда [1]. Первоначально считалось, что гормон синтезируется исключительно в эпифизе, однако есть указания на наличие экстрапинеального мелатонина, который образуется в различных органах, а также синтезируется и в сердце [2]. Мелатонин, как оказалось, – эффективный акцептор свободных радикалов. Он действует синергически с другими антиоксидантами, стимулируя синтез супероксиддисмутазы, глутатионпероксидазы и каталазы [3]. Мелатонин реализует свои эффекты через рецептор-зависимые и рецептор-независимые механизмы. Рецепторы мелатонина принадлежат к суперсемейству трансмембранных доменов, которые передают сигнал внутриклеточно через G-протеины. Кардиомиоциты (КМЦ) и эндотелий сосудов являются «мишенью» для мелатонина и экспрессирует оба вида рецепторов (MT1 и MT2) [4]. Расширение кровеносных сосудов опосредуется через MT2-рецепторы, в то время как MT1-зависимая активация приводит к вазоконстрикции [5]. Мелатонин обладает мощным антиадренергическим эффектом. Показано, что мелатонин значительно снижает уровень как изопротеренол, так и форсколин-индуцированной циклической АМФ, что также способствует его кардиопротективному действию [6]. Снижение уровня мелатонина было выявлено при артериальной гипертензии, ишемической болезни сердца, инфаркте миокарда и сердечной недостаточности [7, 8]. Несмотря на идентификацию рецепторов мелатонина, его сигнальные пути в сердце все еще плохо изучены. В настоящее время имеются немногочисленные данные о регуляторных механизмах экзогенного мелатонина на процессы клеточной пролиферации, апоптоз КМЦ, структурный гомеостаз миокарда при сердечной недостаточности.

Целью работы явилось изучение влияния мелатонина на экспрессию мембранных мелатониновых MT2-рецепторов (MTR2), апоптоз КМЦ (экспрессия Caspase-3) и ремоделирование миокарда левого желудочка крыс в условиях экспериментальной сердечной недостаточности (ЭСН).

**Материал и методы.** Исследование проведено на 40 крысах-самцах линии Wistar массой 180–230 г. Контролем служили 10 интактных крыс. У 30 животных основной группы моделировали ЭСН путем подкожного введения 0,1 мл 1 % раствора мезатона в течение 14 сут с последующим плаванием до глубокого утомления. На 14-е сут ЭСН 10 животных декапитировали под эфирным рауш-наркозом. 20 опытных животных с ЭСН были разделены на 2 группы: 10 крысам вводили

в течение 14 дней подкожно мелатонин (Sigma-Aldrich, USA) в дозе 1 мг/кг чистого вещества, разведенного в смеси: 0,2 мл 0,9 % хлорида натрия в 98 % этаноле (9:1 объем/объем), 10 животным подкожно вводили 0,2 мл 0,9 % хлорида натрия ежедневно. На 28-е сут опыта животные были выведены из эксперимента. Содержание крыс в виварии и проведение экспериментов соответствовали «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных приказами МЗ СССР № 1045 от 6.04.73 г., № 1179 от 10.10.83 г. Миокард ЛЖ крыс был подвергнут стандартной однотипной обработке и изучен с помощью световой микроскопии, иммуноцитохимических реакций (оценка экспрессии кроличьих поликлональных антител Anti-MTNR1B (AB1), «Sigma-Aldrich», USA и экспрессии моноклональных антител к Caspase-3, «BIOCARE MEDICAL», USA), методов морфометрии. Оценку локализации и интенсивности иммунной реакции MT2-рецепторов проводили полуколичественным методом +/-+++ в случайно выбранных 20 полях зрения (100 %): (–) нет иммунопозитивных кардиомиоцитов (ИКМЦ); (+) легкая, один ИКМЦ; (++) умеренная, более 5 ИКМЦ; (+++) высокая иммунореактивность, почти все кардиомиоциты иммунопозитивны. Для идентификации клеток с признаками апоптоза определяли индекс апоптоза (ИА) как число окрашенных телец, деленное на 1000 клеток в 20 случайно выбранных полях зрения. Морфометрию осуществляли в соответствии со сложившимися принципами системного количественного анализа [9]. Исследование структурно-функциональной реорганизации мышечной и стромальной частей миокарда осуществляли в условных полях зрения микроскопа ОРТКА В-350 (Италия), микрофотографии получали с использованием цифровой фотокамеры ScoreTek DCM 500 (Италия) и программы ScorePhoto с указанной окулярной вставкой при исследовании 20 полей зрения гистологических срезов (об. 40, ок. 20). Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Statistica 6.0».

**Результаты исследования и их обсуждение.** Установлено, что при ЭСН происходят определенные структурно-функциональные изменения как КМЦ, так и внеклеточного матрикса миокарда, что согласуется с результатами наших предыдущих исследований [10]. Так, в миокарде ЛЖ крыс на 14 сут моделирования ЭСН отмечалась выраженная оксифильная мозаичность КМЦ. Встречались как интенсивно воспринимающие эозин клетки, которые чаще характеризовались контрактурным типом повреждения, так и слабоокрашенные КМЦ с разреженной саркоплазмой. В таких зонах отмечались существенные нарушения в соединительной ткани и сосудах микроциркуляторного русла (МЦР). Наблюдался выраженный полиморфизм ядер сердечных миоцитов. Встречались зоны плазматического пропитывания межмышечной соединительной ткани, участки клеточных инфильтратов.

Через 14 сут ежедневного введения животным с ЭСН 0,2 мл 0,9 % раствора хлорида натрия в миокарде ЛЖ усиливалась мозаичность окрашивания КМЦ кислыми красителями по сравнению с предыдущим сроком. Возрастало количество как атрофически измененных КМЦ, так и число гипертрофированных миоцитов. В некоторых участках миокард выглядел значительно разволокненным, усилились нарушения гемодинамики по сравнению с предыдущей группой животных. Интрамуральные артерии находились в основном в состоянии спазма или вторичного пареза, наблюдались выраженное венозное и капиллярное полно-

кровие, геморрагические и плазморрагические очаги. Отмечалась диффузная инфильтрация стромы мононуклеарными клетками. Данные морфометрии показали, что сохранялось увеличение  $d$  КМЦ и их ядер, ОП КМЦ достоверно снижалась по сравнению с контролем, отмечалось достоверное возрастание ОП соединительной ткани в сравнении с предыдущей группой (табл. 1).

В миокарде крыс с введением мелатонина преобладали КМЦ с неизменными морфологическими свойствами. КМЦ в большинстве случаев равномерно окрашивались гематоксилином и эозином, имели вытянутую форму, соединялись друг с другом с помощью вставочных дисков. Значительно реже, чем в предыдущих группах, отмечались участки с неоднородным окрашиванием мышечных сегментов, гипертрофированные КМЦ. Встречались участки с умеренными гемодинамическими расстройствами: полнокровные и расширенные капилляры, интрамуральные артерии в состоянии спазма. Строма органа содержала немногочисленные фибробласты, расположенные между мышечными волокнами, периваскулярно и перикапиллярно встречались группы тучных клеток. Оценка данных морфометрии миокарда в этой группе показала недостоверное увеличение  $d$  КМЦ и их ядер, ОП КМЦ уменьшалась недостоверно, отмечалось недостоверное увеличение ОП соединительной ткани по сравнению с группой контроля (табл. 1).

Таблица 1

### МОРФОМЕТРИЧЕСКИЕ ПОКАЗАТЕЛИ МИОКАРДА ЛЖ КРЫС В ГРУППАХ ( $M \pm M$ )

Показатель	Экспериментальные группы			
	Самцы Контроль $n = 10$	Самцы 14 сут ЭСН $n = 10$	Самцы 14 сут ЭСН+14 сут NaCl $n = 10$	Самцы 14 сут ЭСН+14 сут мелатонин $n = 10$
$d$ КМЦ, мкм	$8,24 \pm 0,37$	$8,93 \pm 1,12^{*,**}$	$8,75 \pm 1,18^{*,**}$	$8,36 \pm 1,15$
$d$ ядра КМЦ, мкм	$2,6 \pm 0,54$	$2,9 \pm 1,2^{*,**}$	$2,76 \pm 0,65$	$2,72 \pm 0,87$
ОП КМЦ, об. %	$85,1 \pm 2,7$	$78,4 \pm 5,2$	$72,23 \pm 4,8^{*,**}$	$81,4 \pm 3,73$
ОП Стромы, об. %	$15,6 \pm 2,6$	$43,51 \pm 3,8^{*,**}$	$47,81 \pm 2,0^{*,**}$	$23,1 \pm 2,12$

*Примечание:*  $n$  – количество животных в группе; ОП КМЦ – объемная плотность КМЦ; ОП стромы – объемная плотность сосудов и соединительной ткани; ЭСН – экспериментальная сердечная недостаточность.

\*  $p < 0,05$  при сравнении с контролем.

\*\*  $p < 0,05$  при сравнении с группой ЭСН+мелатонин.

При иммуноцитохимическом исследовании миокарда ЛЖ у крыс всех групп были обнаружены КМЦ с различной степенью активности МТ2 -рецепторов (по критериям оценки экспрессии МТР2). В миокарде контрольной группы крыс преобладали участки с умеренной экспрессией МТ2 рецепторов (табл. 2). На 14 сут ЭСН в миокарде ЛЖ крыс встречались участки как с высокой степенью экспрессии, так и со значимым уменьшением плотности МТР2 (рис. 1). Избирательное

усиление экспрессии МТ2-рецепторов наблюдалось у животных в зонах с более выраженной реорганизацией миокарда при ЭСН. Необходимо отметить, что у самцов с ЭСН и введением хлорида натрия, имеющих более выраженные морфологические изменения миокарда, встречались чаще участки с умеренной, чем с высокой степенью экспрессии МТ2-рецепторов по сравнению с группой крыс на 14 сут ЭСН. Данный факт можно объяснить истощением защитных компенсаторных механизмов в миокарде при ЭСН, что, вероятно, влияет на чувствительность и функцию МТ2-рецепторов мелатонина. Также, возможно, это связано со снижением ауто- и паракринных резервов синтеза эндогенного мелатонина в миокарде при длительном воздействии неблагоприятных факторов. Умеренная степень экспрессии МТ2-рецепторов в миокарде животных с ЭСН и введением мелатонина, сопровождающаяся минимальными структурно-функциональными изменениями КМЦ, доказывает важную роль мелатонина в защите сердца при повреждении. На сегодняшний день известно, что мелатонин полезен сердцу своими антиоксидантными и сосудорасширяющими эффектами [11]. По мнению исследователей, МТ2-рецептор-опосредованная вазодилатация является эндотелийзависимой и реализуется путем повышения синтеза оксида азота, стимуляцией ацетилхолина и/или ингибированием эффектов норадреналина [3]. Нарушения секреторной активности периферических звеньев синтеза мелатонина, а также изменение чувствительности МТ2-рецепторов в миокарде в условиях ЭСН может играть важную патогенетическую роль в прогрессировании сердечной недостаточности.

Таблица 2

**ЭКСПРЕССИЯ МТ2-РЕЦЕПТОРОВ  
В МИОКАРДЕ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА КРЫС**

Группы животных	МТР2
Интактные самцы (контроль)	+ / + + (40/60 %)
Самцы 14 сут ЭСН	+ / + + / + + + (20/30/50 %)
Самцы 14 сут ЭСН + 14 сут NaCl 0,9 %	+ / + + / + + + (20/60/20 %)
Самцы 14 сут ЭСН + 14 сут мелатонин	+ / + + (30/70 %)

*Примечание.* ЭСН – экспериментальная сердечная недостаточность; МТР2 – мембранные мелатониновые рецепторы 2 типа.

В миокарде ЛЖ крыс всех групп регистрировались КМЦ с признаками апоптоза (по критериям оценки экспрессии Caspase-3). В миокарде ЛЖ животных контрольной группы встречались единичные иммунопозитивные миоциты. Наблюдалось достоверное увеличение количества Cas-позитивных КМЦ (рис. 2) в миокарде животных на 14 сут моделирования ЭСН и в группе животных с ЭСН и введением хлорида натрия по отношению к контролю и к группе с ЭСН и введением мелатонина (табл. 3). Значимое уменьшение Cas-3-позитивных КМЦ отмечалась в группе животных с введением мелатонина, что доказывает антиапоптотическое действие мелатонина на миокард ЛЖ при сердечной недостаточности.

Таблица 3

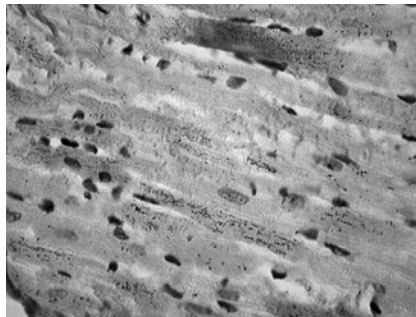
**ЭКСПРЕССИЯ СИГНАЛЬНЫХ БЕЛКОВ (CASPASE-3)  
В МИОКАРДЕ ЛЖ КРЫС В ГРУППАХ (M±M)**

Группы животных	ИА, % Caspase-3
Интактные самцы	1 ± 0,1
Самцы 14 сут ЭСН	8 ± 0,4*, **
Самцы 14 сут ЭСН+14 сут NaCl 0,9 %	9 ± 1,2*, **
Самцы 14 сут ЭСН+14 сут мелатонин	3 ± 0,1

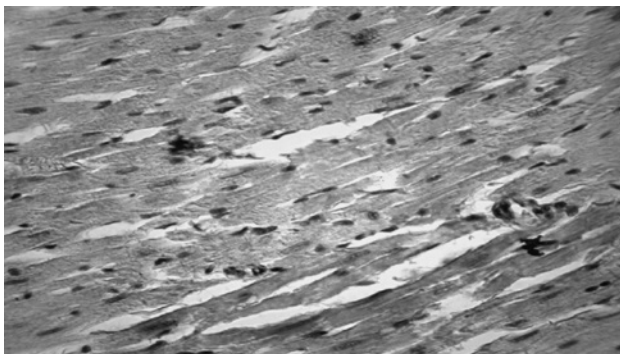
*Примечание.* ИА – индекс апоптоза (количество иммунопозитивных КМЦ).

\*  $p < 0,05$  при сравнении с контролем;

\*\*  $p < 0,05$  при сравнении с группой мелатонина.



*Рис. 1.* Фрагмент миокарда левого желудочка крысы на 14 сут ЭСН. MT2-позитивные кардиомиоциты. Окраска: иммуноцитохимическая реакция для идентификации экспрессии MT2-рецепторов. Ув. 400×



*Рис. 2.* Фрагмент миокарда левого желудочка крысы на 14 сут ЭСН. Cas-3-позитивные кардиомиоциты. Окраска: иммуноцитохимическая реакция для идентификации экспрессии Caspase-3. Ув. 400×

Резюмируя изложенное, можно сделать заключение, что при ЭСН происходит структурно-функциональная реорганизация миокарда, активация апоптоза КМЦ, играющего важную патогенетическую роль в развитии сердечной недостаточности. Наблюдаемые изменения в экспрессии МТ2-рецепторов при ЭСН показывает их прямое участие в реализации защитных механизмов действия мелатонина на миокард ЛЖ. Кардиопротективные эффекты экзогенного мелатонина, наблюдаемые в нашем исследовании, создают необходимые условия для поддержания гомеостаза в миокарде и адекватной активации компенсаторных механизмов в КМЦ, микро-сосудах и интерстиции при сердечной недостаточности.

## ЛИТЕРАТУРА

1. *Rechciński T., Trzos E., Wierzbowska-Drabik K., Krzemińska-Pakuła M., Kurpesa M.* Melatonin for nondippers with coronary artery disease: assessment of blood pressure profile and heart rate variability // *Hypertens Res.* 2010. Vol. 33. № 1. P. 56–61.
2. *Russel J. Reiter, Dun X. Tan.* Melatonin and cardiac pathophysiology // *Heart Metab.* 2009. Vol.44. P. 31–34.
3. *Ahmet Korkmaz, Russel J. Reiter, Turgut Topal, Lucien C Manchester, Sukru Oter, Dun-Xian Tan.* Melatonin: An Established Antioxidant Worthy of Use in Clinical Trials // *Mol. Med.* 2009. 15 (1–2). P. 43–50.
4. *Gerdin M. J., Masana M. I., Ren D., Miller R. J., Dubocovich M. L.* Short-term exposure to melatonin differentially affects the functional sensitivity and trafficking of the hMT1 and hMT2 melatonin receptors // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. № 304. P. 931–939.
5. *Ekmekcioglu C., Thalhammer T., Humpeler S., Mehrabi M. R., Glogar H. D., Hölzenbein T., Markovic O., Leibetseder V. J., Strauss-Blasche G., Marktl W.* The melatonin receptor subtype MT2 is present in the human cardiovascular system // *J. Pineal Res.* 2003. Vol. 35. № 1. P. 40–44.
6. *Genade S., Genis A., Ytrehus K., Huisamen B., Lochner A.* Melatonin receptor-mediated protection against myocardial ischaemia/reperfusion injury: role of its anti-adrenergic actions. // *J. Pineal Res.* 2008. Vol. 45. № 4. P. 449–458.
7. *Yaprak M., Altun A., Vardar A., Aktoz M., Ciftci S., Ozbay G.* Decreased nocturnal synthesis of melatonin in patients with coronary artery disease // *Int. J. Cardiol.* 2003. Vol. 89. P. 103–107.
8. *Girotti L., Lago M., Ianovsky O., Elizari M. V., Dini A., Lloret S. P., Albornoz L. E., Cardinali D. P.* Low urinary 6-sulfatoxymelatonin levels in patients with severe congestive heart failure // *Endocrine.* 2003. Vol. 22. № 3. P. 245–248.
9. *Автандилов Г. Г.* Проблемы патогенеза и патологоанатомической диагностики болезней в аспектах морфометрии. М.: Медицина, 1984.
10. *Лискова Ю. В., Саликова С. П., Стадников А. А.* Особенности ремоделирования внеклеточного матрикса миокарда левого желудочка крыс с экспериментальной сердечной недостаточностью при введении периндоприла и мелатонина // *Кардиология.* 2014. Т. 54. № 9. С. 52–56.
11. *Ahmet Ozer Shirlı, Derya Koyun, Sermin Tetik, Derya Ozsavc, Omer Yiginer et al.* Melatonin protects against ischemic heart failure in rats // *J. Pineal Res.* 2013. Vol. 55. P. 138–148.