

ВЛИЯНИЕ МОДЕЛЕЙ ХРОНИЧЕСКОЙ СИМПАТИЧЕСКОЙ И ВАГОТОНИЧЕСКОЙ АКТИВАЦИИ НА ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ПРОСТРАНСТВА И КОЛЛАГЕНОВЫЕ ВОЛОКНА МИОКАРДА ЖЕЛУДОЧКОВ КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР

М.П.Рубанова, С.В.Жмайлова, Л.Г.Прошина, П.М.Губская, Е.Е.Румянцев, И.А.Атаев, В.Е.Карев*

CHRONIC SYMPATHETIC AND VAGOTONIC ACTIVATION MODELS INFLUENCE EXTRACELLULAR SPACES AND COLLAGENIC FIBERS OF WISTAR RAT MYOCARDIUM

M.P.Rubanova, S.V.Zhmailova, P.M.Gubskaya, L.G.Proshina, Y.Y.Rumyantsev, I.A.Ataev, V.E.Karev*

Новгородский государственный университет имени Ярослава Мудрого, kafpdo@mail.ru

** НИИ детских инфекций ФМБА России, Санкт-Петербург*

Статья посвящена изменениям объемной плотности внеклеточных пространств и коллагеновых волокон в миокарде крыс линии Вистар при моделировании хронической вегетативной активации, в симпатическом и парасимпатическом варианте. Хроническая симпатическая активация моделировалась введением адреналина, ваготоническая активация — введением антихолинэстеразного препарата прозерина. Исследовался миокард желудочков сердца, с применением морфометрии срезов, окрашенных по Ван Гизону. Показано, что экспериментальное воздействие привело к изменениям в объемной плотности внеклеточных пространств и коллагеновых волокон в миокарде желудочков сердца, причём миокард левого и правого желудочков реагирует на воздействие асинхронно, а выраженность ремоделирования отличается в зависимости от варианта экспериментальной модели вегетативной активации. Отмеченные изменения могут быть морфологической основой диастолической дисфункции, проявляющейся по-разному в зависимости от вегетативной реактивности организма.

Ключевые слова: *миокард, левый желудочек, правый желудочек, внеклеточный матрикс, коллаген, симпатическая активация, парасимпатическая активация*

The article is devoted to changes in the content of extracellular spaces and collagen fibers in myocardium of Wistar rats when modeling chronic autonomic activation, in sympathetic and parasympathetic variants. Chronic sympathetic activation was modeled by the administration of adrenaline, vagotonic activation — by cholinesterase inhibitor neostigmine. Morphometric study on ventricular myocardium was performed using Van Gieson stained sections. It was shown that the experimental effect led to changes in the content of extracellular spaces and collagen fibers in ventricles of the heart, with the myocardium of the left and right ventricles reacting asynchronously, and the severity of remodeling differs depending on the variant of the experimental model of vegetative activation. The noted changes can be the morphological basis of diastolic dysfunction, which manifests itself differently depending on the vegetative reactivity of the subject organism.

Keywords: *myocardium, left ventricle, right ventricle, extracellular matrix, collagen, sympathetic activation, vagal activation*

Введение

Внеклеточные компоненты миокарда во многом определяют жесткость стенки сердца на растяжение. Ремоделирование, особенно накопление коллагеновых волокон приводит к диастолической дисфункции и формированию так называемой сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса [1-5]. Известно, что диастолическая дисфункция левого желудочка может иметь различную выраженность у пациентов с разной вегетативной реактивностью (например, по результатам холодовой пробы) [6,7]. В связи с этим интересным представляется изучение морфологических основ этих изменений — ремоделирования внеклеточных компонентов миокарда при преобладании симпатической или парасимпатической вегетативной активации в эксперименте.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование проводилось в соответствии с Европейской конвенцией о защите животных, используемых в эксперименте (Директива 86/609/EEC). Протокол эксперимента, содержание

животных и выведение их из опыта были составлены в соответствии с принципами биоэтики, изложенными в «Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных» (1985) и приказе МЗ РФ №267 от 19.06.2003 «Об утверждении правил лабораторной практики».

Эксперимент проводился на 60 крысах самцах линии Вистар, сопоставимых по возрасту и массе (200 ± 20 г). Животные содержались в помещении с температурой воздуха 22°C с 12-часовым циклом свет/темнота. Животные имели свободный доступ к воде и пище.

Эксперимент осуществлялся на 3 сериях крыс, по 20 крыс в каждой.

Воздействие на организм крыс производилось путем интраперитонеального введения три раза в день лекарственных препаратов, дозы которых были максимальными терапевтическими для человека в пересчете на килограмм массы тела (доза каждого препарата разводилась в стерильном физиологическом растворе до 1 мл). Хроническая симпатическая активация моделировалась введением адреналина,

ваготоническая активация — введением антихолинэстеразного препарата прозерина.

Таблица 1

Дозировка препаратов в эксперименте

Адреналин I серия	Прозерин II серия	Контроль III серия
50 мкг/кг	20 мг/кг	физраствор

Контрольную серию составили 20 крыс, сопоставимых по возрасту и массе (200 ± 20 г). Крысы контрольной серии содержались в отдельном помещении и не подвергались стрессовым воздействиям. Интраперитонеально каждой крысе контрольной серии вводился 1 мл стерильного физиологического раствора трижды в сутки на протяжении 2 недель.

10 крыс каждой серии через 2 недели введения (первая точка) и 10 крыс каждой серии через один месяц от прекращения введения препаратов (вторая точка) под эфирным наркозом декапитировались и производился забор материала на исследование.

Образцы миокарда стенки левого (ЛЖ) и правого желудочка (ПЖ) фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике с последующим изготовлением срезов ткани толщиной 4 мкм. Парафиновые срезы окрашивались по Ван-Гизону и исследовались с использованием светооптического бинокулярного микроскопа Axioscope A1 (Carl Zeiss, Германия). Морфометрия окрашенных срезов проводилась планиметрическим методом. Относительный объем коллагеновых волокон оценивался по относительной площади, занимаемой ими на фотографиях микропрепаратов. Относительная площадь структур измерялась с подсчетом с помощью сетки Г.Г.Автандилова [8] при суммарном увеличении $\times 400$. Производился подсчет в объемных процентах (об.%) объемной плотности внеклеточных пространств и коллагеновых волокон. Весь статистический анализ проводился с использованием программы STATISTICA 99.

Результаты исследования

Морфологические изменения в миокарде при длительном введении адреналина и прозерина проявлялись перичеллюлярным и интрацеллюлярным отеком, накоплением коллагеновых волокон внеклеточно-

го матрикса, в результате чего относительный объем, занимаемый кардиомиоцитами, уменьшался (см.рис.).

Таблица 2

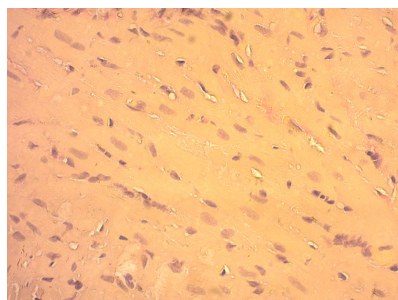
Объемная плотность компонентов внеклеточного матрикса в миокарде в сериях эксперимента

Внеклеточные пространства						
	ЛЖ			ПЖ		
	М	СОС	N	М	СОС	N
Контроль	6,83	0,3	45	6,09	0,33	45
Адрен. 2 нед.	16,62	1,49	45	14,37	1,54	36
Адрен. 1 мес.	14,17	1,52	36	13,85	1,25	36
Проз. 2 нед.	10,76	10,6	45	18,2	1,22	45
Проз. 1 мес.	8,47	0,9	45	13,27	0,63	45
Адр.+Энап 2 нед.	11	0,82	27	9,82	0,81	27
Проз.+Энап 2 нед.	7,94	0,93	27	12,6	1,13	27
Коллагеновые волокна						
	ЛЖ			ПЖ		
	М	СОС	N	М	СОС	N
Контроль	7,89	0,6	45	8,21	0,45	45
Адрен. 2 нед.	14,94	1,38	45	13,41	1,28	36
Адрен. 1 мес.	14,13	1,43	36	20,41	1,63	36
Проз. 2 нед.	6,38	1,04	45	11,79	1,34	45
Проз. 1 мес.	11,11	1,08	45	9,05	1,84	45
Адр.+Энап 2 нед.	11,3	0,35	27	12,9	1,03	27
Проз.+Энап 2 нед.	15,2	1,97	27	15,1	1,3	27

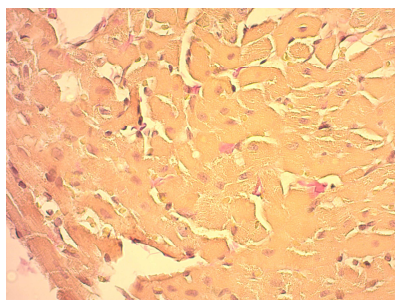
М — медиана, СОС — стандартное отклонение среднего, N — число полей зрения.

Морфометрическое исследование показало, что медиана значений объема ВКП в миокарде обоих желудочков (табл.2) через 2 недели введения адреналина значительно увеличилась по сравнению с контрольной серией крыс: в ЛЖ в 2,2 раза (с $M = 6,76 \pm 2,04$ об.% в контроле до $M = 14,80 \pm 7,39$ об.% через 2 недели введения адреналина; $\chi^2 = 26,947$, $p = 0,0001$), а в ПЖ — в 2,4 раза ($M = 5,52 \pm 1,76$ об.% в контроле до $M = 13,41 \pm 7,69$ об.% через 2 недели введения адреналина; $\chi^2 = 11,111$, $p = 0,0009$).

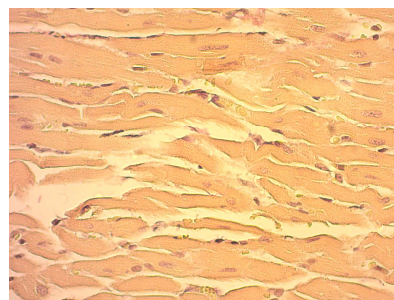
Через месяц после прекращения моделирования хронической симпатической активации объемная плотность ВКП была значительно выше, чем в контрольной серии, и была сопоставима со значениями объема ВКП через 2 недели введения адреналина как в ЛЖ ($M = 14,17 \pm 7,69$ об.%), так и в ПЖ ($M = 13,85 \pm 7,50$ об.%).



а



б



в

Миокард левого желудочка крыс серий эксперимента, ув. $\times 400$, окраска по Ван Гизону: а — контроль, б — адреналин 2 нед., в — прозерин 2 нед.

Другими словами, под влиянием двухнедельного введения адреналина в миокарде обоих желудочков отмечался значительный отек внеклеточных пространств, который сохранялся и через месяц после прекращения введения адреналина.

Через 2 недели моделирования ваготонической активации при обработке полученных данных по Фридману—Кендаллу значительных изменений объемной плотности ВКП в миокарде ЛЖ (табл.2) по сравнению с контрольной серией не выявлено ($M = 6,83 \pm 1,99$ об.%, в контрольной серии и $M = 10,76 \pm 7,13$ об.% через 2 недели введения прозерина, $p > 0,05$).

Через месяц после прекращения введения прозерина (табл. 2) медиана объема ВКП ($M = 8,47 \pm 6,06$ об.%) также достоверно не отличалась ни от значений контрольной серии ($M = 6,83 \pm 1,99$ об.%, $p > 0,05$), ни от значений медианы ВКП через 2 недели введения прозерина ($M = 10,76 \pm 7,13$ об.%, $p > 0,05$).

В ПЖ через 2 недели введения прозерина объемная плотность ВКП (табл.2) увеличилась почти в 3 раза (с $M = 6,09 \pm 2,27$ об.% в контрольной серии до $M = 17,52 \pm 6,93$ об.% через 2 недели; $\chi^2 = 36,364$ $p < 0,0001$).

Через месяц «отдыха» в ПЖ (табл.2) произошли положительные изменения — объемная плотность ВКП уменьшилась по сравнению со значениями объема ВКП через 2 недели введения прозерина (с $M = 17,52 \pm 6,93$ об.% через 2 недели до $13,27 \pm 4,21$ об.% через один месяц ($\chi^2 = 11,756$; $p < 0,0006$), но оставалась в 2,2 раза выше, чем в контрольной серии ($M = 6,09 \pm 2,27$ об.%; $\chi^2 = 34,381$; $p < 0,0001$).

При моделировании хронической симпатической активации объемная плотность коллагеновых волокон ЛЖ составила $14,94 \pm 1,38$ об.% через 2 недели введения адреналина по сравнению со значениями контрольной серии ($7,89 \pm 0,6$ об.%; $t = -4,5052$; $p = 0,000048$) (табл.2). В ПЖ объемная плотность коллагеновых волокон увеличилась с $8,21 \pm 0,45$ об.% в контроле до $13,41 \pm 1,28$ об.% после двух недель введения адреналина ($t = -3,62978$; $p = 0,0009$).

Через один месяц после прекращения введения адреналина объемная плотность коллагеновых волокон в миокарде ЛЖ оставалась на том же уровне, что и после 2 недель воздействия (табл.2). В правом желудочке изменения нарастали, объемная плотность коллагеновых волокон через месяц после моделирования хронической симпатической активации составила $20,41 \pm 1,63$ об.%, что достоверно больше по сравнению с значениями после 2 недель введения адреналина ($13,41 \pm 1,28$ об.%, $t = -2,98143$, $p = 0,005$) (табл.2).

Через 2 недели моделирования хронической ваготонической активации объемная плотность коллагеновых волокон в миокарде ЛЖ достоверно не отличалась от значений контрольной серии. В ПЖ после двух недель введения прозерина объемная плотность коллагеновых волокон увеличилась до $11,79 \pm 1,34$ об.% по сравнению с контрольной серией ($8,21 \pm 0,45$ об.%, $t = -2,65378$, $p = 0,011$).

Через один месяц после прекращения моделирования ваготонической активации в левом желудочке объемная плотность коллагеновых волокон соста-

вила $11,11 \pm 1,08$ об.% и была больше значений серии 2 недель ($6,38 \pm 1,04$ об.%, $t = -3,33502$, $p = 0,002$). В ПЖ объемная плотность коллагеновых волокон через месяц после прекращения воздействия оставалась на уровне 2 недель введения прозерина.

В правом желудочке через 2 недели введения препаратов объемная плотность коллагеновых волокон в серии прозерина была больше по сравнению с серией адреналина ($7,25 \pm 0,52$ об.% и $13,41 \pm 1,28$ об.% соответственно, $t = 4,42517$, $p = 0,0001$).

Через месяц после прекращения введения препаратов в ПЖ значение объемной плотности коллагеновых волокон в серии адреналина составило $20,41 \pm 1,63$ об.%, что более чем в 2 раза превышает значение серии прозерина ($9,05 \pm 1,84$ об.%, $t = 8,82666$, $p = 0,00001$).

Заключение

Ремоделирование внеклеточных пространств в ЛЖ и в ПЖ при моделировании хронической ваготонической активации происходит по-разному: в ЛЖ достоверных изменений объемной плотности ВКП не происходит, тогда как в ПЖ они значительны. По сравнению с контролем увеличение почти в 3 раза через 2 недели и в 2,2 раза — через месяц после прекращения моделирования хронической ваготонической активации.

Что касается ремоделирования коллагеновых волокон миокарда, при хронической адренергической активации через 2 недели в обоих желудочках увеличивается объемная плотность коллагеновых волокон. Через месяц «отдыха» изменения содержания коллагеновых волокон сохраняются в ЛЖ, а в ПЖ даже прогрессируют. В ЛЖ наиболее выраженное увеличение объемной плотности коллагеновых волокон происходило через 2 недели моделирования симпатической активации. Обращает на себя внимание тот факт, что наибольшее значение объемной плотности коллагеновых волокон зафиксировано в ПЖ через один месяц после прекращения введения адреналина.

В миокарде ПЖ через 2 недели более выраженное накопление коллагеновых волокон ВКМ происходило при моделировании хронической симпатической активации, через месяц после прекращения введения препаратов в экспериментальных сериях содержание коллагеновых волокон в миокарде достоверно не отличалось.

Обращает на себя внимание разница не только в выраженности, но и во времени ремоделирования внеклеточного матрикса между желудочками при двухнедельном введении прозерина: содержание коллагеновых волокон в миокарде увеличивается только в ПЖ, а в ЛЖ увеличение объемной плотности коллагеновых волокон наступает позже, через месяц после прекращения воздействия.

Описываемые особенности ремоделирования миокарда, выявленные при моделировании хронической симпатической и парасимпатической активации, возможно, оказывают влияние на жесткость стенки желудочков, диастолическую функцию и механизмы формирования сердечной недостаточности у пациентов с различной вегетативной реактивностью.

References

1. Губская П.М., Рубанова М.П., Вебер В.Р. и др. Вегетативное сопровождение стресса и ремоделирование миокарда у больных артериальной гипертензией симпатотоников // Сб тезисов «Кардиостим-2014». Санкт-Петербург, 27 февраля-1 марта 2014. С.229.
2. Либис Р.А., Душина А.Г., Олейник Е.А. Особенности течения хронической сердечной недостаточности с сохраненной фракцией выброса у пациентов с эссенциальной артериальной гипертензией // Артериальная гипертензия. 2013. №19(6). С.513-519.
3. Borlaug B.A., Paulus W.J. Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment // European heart journal. 2010. V.32. №6. P.670-679.
4. Lu L., Guo J., Hua Y. et al. Cardiac fibrosis in the ageing heart: Contributors and mechanisms // Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology. 2017. V.44. P.55-63.
5. Røe Å.T., Sjaastad I., Louch W. E. Heart failure with preserved ejection fraction // Tidsskrift for den Norske lægeforening: tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke. 2017. V.137. №18. doi: 10.4045/tidsskr.16.1068.
6. Жмайлова С.В., Рубанова М.П., Губская П.М. и др. Вегетоническая реакция на холодовой стресс у больных артериальной гипертензией женщин // Артериальная гипертензия. 2009. Т.15. Прилож. №2 (мат. II Междунар. конгресса «Артериальная гипертензия от Короткова до наших дней»). С.41-42.
7. Жмайлова С.В., Рубанова М.П., Вебер В.Р. и др. Особенности вегетативного сопровождения стресса у здоровых мужчин и женщин при проведении холодовой и психоэмоциональной проб // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2014. Мат. III Международного форума кардиологов и терапевтов. Москва, 24-26 марта 2014. С.37.
8. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство. М.: Медицина, 1990. С.114.
1. Gubskaya P.M., Rubanova M.P., Veber V.R. et al. Vegetativnoye soprovozhdeniye stressa i remodelirovaniye miokarda u bol'nykh arterial'noy gipertenziyey simpatotonikov [Vegetative stress support and myocardial remodeling in patients with sympathotonic hypertension. Coll. of abstracts 'Cardiostim-2014']. St. Petersburg, February 27-March 1, 2014. P. 229.
2. Libis R.A., Dushina A.G., Oleynik E.A. Osobennosti techeniya khronicheskoy serdechnoy nedostatochnosti s sokhranennoy fraktsiyey vybrosa u patsiyentov s essentsial'noy arterial'noy gipertenziyey [Features of the course of chronic heart failure with a preserved ejection fraction in patients with essential arterial hypertension]. Arterial'naya gipertenziya, 2013, no.19(6), pp.513-519.
3. Borlaug B. A., Paulus W. J. Heart failure with preserved ejection fraction: pathophysiology, diagnosis, and treatment. European heart journal, 2010, vol.32, no. 6, pp.670-679.
4. Lu L., Guo J., Hua Y. et al. Cardiac fibrosis in the ageing heart: Contributors and mechanisms. Clinical and Experimental Pharmacology and Physiology, 2017, v.44, p.55-63.
5. Røe Å. T., Sjaastad I., Louch W. E. Heart failure with preserved ejection fraction. Tidsskrift for den Norske lægeforening: tidsskrift for praktisk medicin, ny raekke, 2017, vol. 137, no.18. doi: 10.4045/tidsskr.16.1068.
6. Zhmaylova S.V., Rubanova M.P., Gubskaya P.M. et al. Vagotonicheskaya reaktsiya na kholodovoy stress u bol'nykh arterial'noy gipertenziyey zhenshchin [Vagotonic reaction to cold stress in women with arterial hypertension]. Arterial'naya gipertenziya. 2009, v.15, appendix 2, pp.41-42.
7. Zhmaylova S.V., Rubanova M.P., Veber V.R. et al. Osobennosti vegetativnogo soprovozhdeniya stressa u zdorovykh muzhchin i zhenshchin pri provedenii kholodovoy i psikhoemotsional'noy prob [Features of vegetative stress support in healthy men and women during cold and psychoemotional tests]. Kardiovaskulyarnaya terapiya i profilaktika, 2014, no.13.P.37.
8. Avtandilov G.G. Meditsinskaya morfometriya. Rukovodstvo [Medical morphometry. Guidelines]. Moscow, Medicina Publ., 1990. P.114.