

СОДЕРЖАНИЕ TGF- β 1, FGF-2 И ВНЕКЛЕТОЧНЫЙ МАТРИКС МИОКАРДА ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА И СТЕНКИ БРЮШНОГО ОТДЕЛА АОРТЫ КРЫС ЛИНИИ ВИСТАР ПРИ ДЛИТЕЛЬНОМ ВВЕДЕНИИ ПРОЗЕРИНА

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

TGF- β 1, FGF-2 CONTENT AND EXTRACELLULAR MYOCARDIAL MATRIX IN WISTAR RATS' LEFT VENTRICLE AND THE WALL OF AORTA ABDOMINAL REGION AFTER LONG-TERM NEOSTIGMINE ADMINISTRATION

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

Институт медицинского образования НовГУ, kafpdo@mail.ru

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

В настоящее время в качестве одного из показателей, определяющих эффективность кровообращения, используют понятие «сердечно-сосудистое сопряжение», которое оценивает соотношение жесткости (эластанса) левого желудочка и артерий. Жесткость стенки левого желудочка и артерий напрямую зависит от содержания коллагеновых волокон во внеклеточном матриксе. Статья посвящена изменениям содержания TGF- β 1, FGF-2 (как одних из основных профибротических цитокинов) и коллагеновых волокон в миокарде и аорте крыс линии Вистар при моделировании хронической ваготонической активации двухнедельным введением прозерина. Показано, что экспериментальное воздействие привело к изменениям в содержании профибротических цитокинов и коллагеновых волокон в миокарде левого желудочка и брюшного отдела аорты, причем миокард реагирует преимущественно изменениями TGF- β 1, а аорта — FGF-2. Накопление коллагеновых волокон асинхронно между левым желудочком и аортой, что может привести к неблагоприятным изменениям в соотношении их жесткости. Ремоделирование коллагеновых волокон продолжается и через месяц после прекращения экспериментального воздействия.

Ключевые слова: миокард, левый желудочек, аорта, внеклеточный матрикс, коллаген, парасимпатическая активация

Currently, the concept of "cardiovascular conjugation" is used as one of the indicators that determine the efficiency of blood circulation and evaluates the left ventricle - arteries ratio of stiffness (elastance). The stiffness of the wall of the left ventricle and arteries directly depends on the content of collagen fibers in the extracellular matrix. Changes in the content of TGF- β 1, FGF-2 and collagen fibers in the myocardium and aorta of Wistar rats in the simulation of chronic vagotonic activation are studied in the article. Chronic vagotonic activation was modeled by a two-week introduction of neostigmine. Neostigmine influence provoked changes in the content of profibrotic cytokines and collagen fibers in the left ventricular myocardium and abdominal aorta, with the myocardium responding mainly with TGF- β 1 changes, and the aorta — with FGF-2. The accumulation of collagen fibers occurred asynchronously between the left ventricle and the aorta, which can lead to adverse changes in the ratio of their stiffness. Remodeling of collagen fibers continues a month after the termination of the experimental exposure.

Keywords: myocardium, left ventricle, aorta, extracellular matrix, collagen, vagotonic activation

Введение

В кардиологической практике часто приходится сталкиваться с патологическим увеличением жесткости миокарда и артериальной стенки — как возрастным, так и осложнением гипертонической болезни, например [1-3]. У разных пациентов в этом процессе могут преобладать изменения стенки левого желудочка (ЛЖ), либо стенки артерий, что уменьшает эффективность пассивной поддержки кровотока. В последнее время используется термин «сердечно-сосудистое сопряжение»: более благоприятным считается одновременное увеличение жесткости и миокарда, и артерий, чем изолированные изменения в сердце или артериальной стенке [4-6]. Обнаружено, что развитие более или менее благоприятных вариан-

тов сердечно-сосудистого сопряжения может зависеть от вегетативной конституции пациента, преобладания симпатических или парасимпатических проявлений в ответ на стресс-тесты, например, холодную пробу [7]. В связи с этим интересным представляется изучение регуляции фиброгенеза при преобладании 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/ЕЕС). Протокол эксперимента, содержание животных и выведение их из опыта были составлены в соответствии с принципами биоэтики, изложенны-

ми 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 40 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 и имели свободный доступ к воде и пище.

Моделирование хронической ваготонической активации производилось путем введения прозерина из расчета 20 мг/кг массы тела трижды в сутки интраперитонеально на протяжении двух недель. Контрольной серии крыс вводился физиологический раствор. 10 крыс из каждой серии через 2 недели под эфирным наркозом декапитировались и производился забор материала на исследование. Оставшиеся 10 крыс каждой серии содержались на протяжении 1 месяца без медикаментозных и стрессовых воздействий, после чего у них также забирался материал (табл.1).

Таблица 1
Серии эксперимента

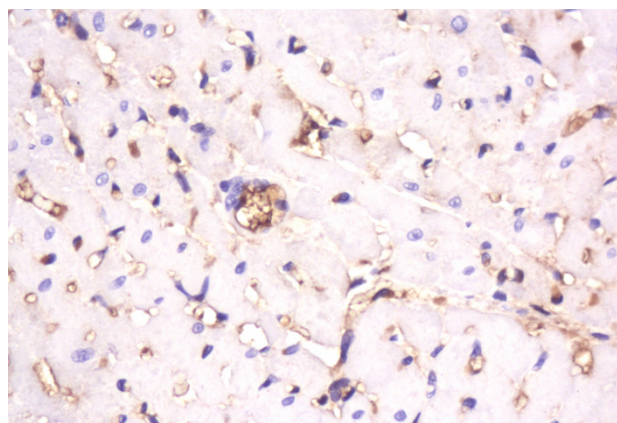
Серия	I серия	II серия
Препарат	Прозерин	—
Дозировка	20 мг/кг	0 (физиологический раствор)
Кратность введения	Трижды в сутки, интраперитонеально	Трижды в сутки, интраперитонеально
Забор материала №1	Через 2 недели введения	Через 2 недели введения
Забор материала №2	Через 1 месяц после прекращения введения (10 крыс)	Через 1 месяц после прекращения введения (10 крыс)

Образцы миокарда стенки левого желудочка (ЛЖ) фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина, дегидратировали в спиртах возрастаю-

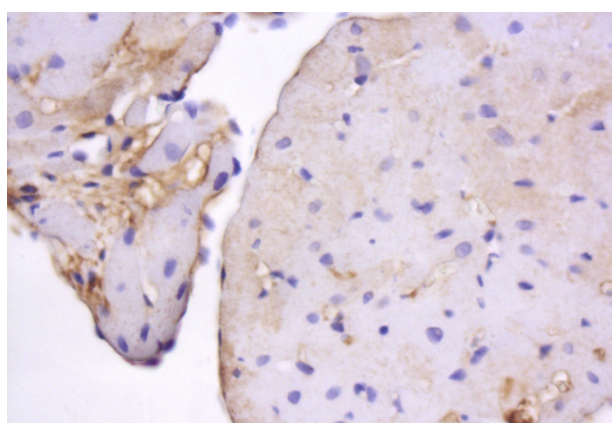
щей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике с последующим изготовлением срезов ткани толщиной 4 мкм. Парафиновые срезы окрашивались по Ван-Гизону и исследовались с использованием светооптического бинокулярного микроскопа AxioscopeA1 (Carl Zeiss, Германия). Морфометрия окрашенных срезов 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 коллагеновых волокон. Иммуногистохимическое исследование проводилось с антител к TGF- $\beta 1$ и FGF-2. Содержание факторов роста оценивалось ручным колориметрическим методом. В миокарде ЛЖ рассчитывался индекс содержания (ИС) — количество позитивных клеток, приходящихся на 1 мм^2 срезов. В стенке брюшного отдела аорты содержание цитокинов в каждом поле зрения оценивалось с использованием балльной шкалы, отдельно для интимы, меди и адвентиции: 1 балл — единичные клетки с низким содержанием; 2 балла — единичные клетки со средним содержанием; 3 балла — сплошь в поле зрения клетки с низким содержанием и единичные клетки со средним содержанием; 4 балла — сплошь в поле зрения клетки с низким содержанием и единичные клетки с высоким содержанием. Весь статистический анализ проводился с использованием программы STATISTICA 99.

Результаты исследования

Содержание TGF- $\beta 1$ в клетках миокарда ЛЖ после двухнедельного введения прозерина увеличилось до $43,62 \pm 3,77$ кл/мм² по сравнению с $23,60 \pm 5,99$ кл/мм² контрольной серии ($p < 0,05$). Изменения содержания FGF-2 в миокарде ЛЖ при моделировании хронической ваготонической активации отмечено не было, т.е. отношение содержания в миокарде FGF-2/TGF- $\beta 1$ сместилось в сторону TGF- $\beta 1$ (рис.1,2).



а)



б)

Рис.1. Содержание TGF- $\beta 1$ (а) и FGF-2 (б) в клетках миокарда левого желудочка после 2 недель введения прозерина, ИГХ реакция, ув. $\times 400$

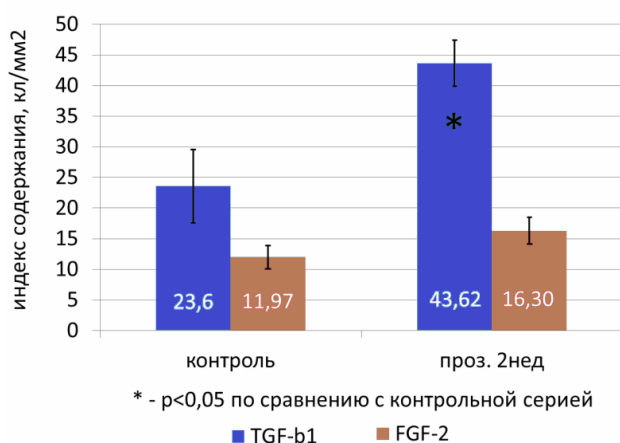
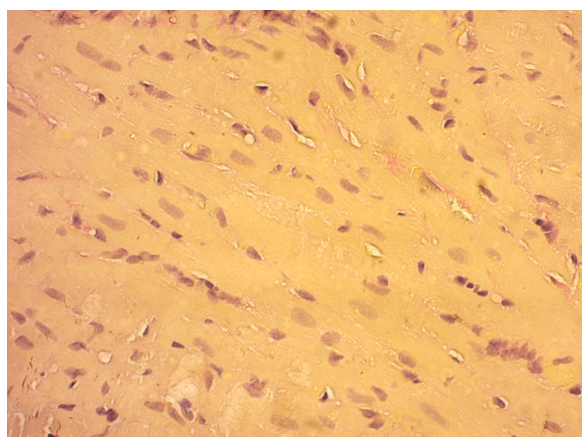
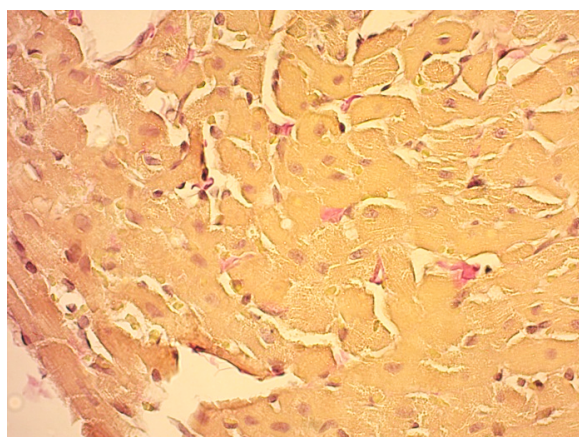


Рис.2. Индекс содержания TGF-β1 и FGF-2 в миокарде левого желудочка при длительном введении прозерина



а)



б)

Рис.3. Миокард левого желудочка крысы контрольной серии (а) и через 1 месяц после прекращения введения прозерина (б), ув. ×400, окраска по Ван Гизону

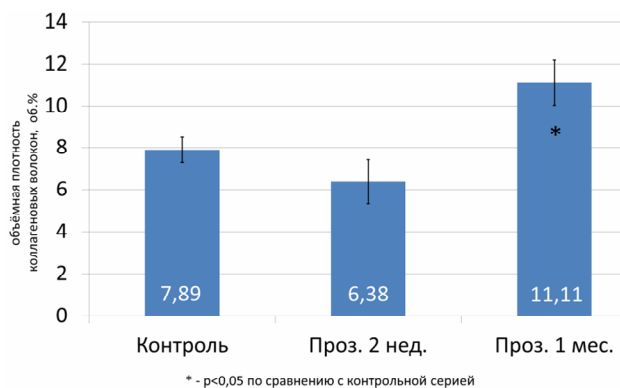


Рис.4. Объемная плотность коллагеновых волокон в миокарде левого желудочка в сериях эксперимента

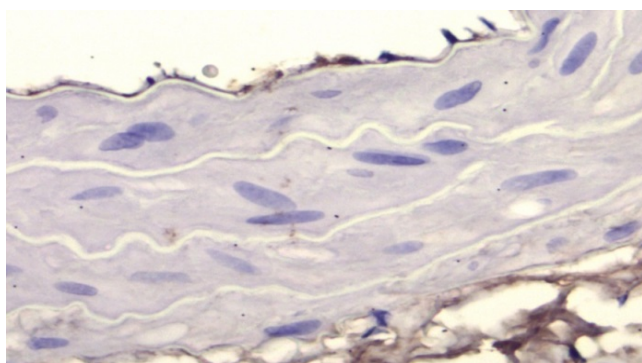
Наибольшие изменения в содержании профибротических цитокинов наблюдались в интима брюшного отдела аорты (рис.5,6): двухнедельное введение прозерина привело к увеличению показателя отношения FGF-2/TGF-β1 в 3,2 раза (с 1,24 до 4,0, $p < 0,05$), в основном, за счет увеличения содержания FGF-2. В меди и адвентиции выявлено уменьшение содержания FGF-2 и отсутствие значимых изменений содержания TGF-β1 (табл.2).

Коллагеновые волокна, обеспечивающие жесткость артериальной стенки на растяжение, расположены в основном в средней оболочке. Однако необходимо учитывать, что под воздействием профибротических цитокинов эндотелиоциты интимы спо-

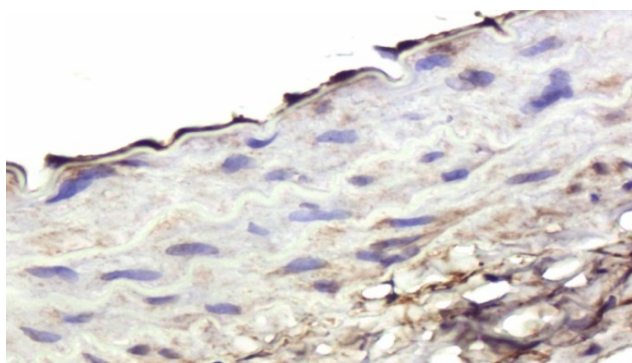
Таблица 2

Отношение содержания FGF-2 и TGF-β1 в слоях брюшного отдела аорты при длительном введении прозерина в сериях эксперимента

Серия эксперимента	Внутренняя оболочка		Средняя оболочка		Наружная оболочка	
	$\frac{\text{FGF-2}}{\text{TGF-}\beta_1}$	Δ в % к контролю	$\frac{\text{FGF-2}}{\text{TGF-}\beta_1}$	Δ в % к контролю	$\frac{\text{FGF-2}}{\text{TGF-}\beta_1}$	Δ в % к контролю
Контроль	1,24		5,1		0,88	
Прозерин 2 нед.	4,0	+222,6%	4,0	-20,6%	0,63	-28,4%

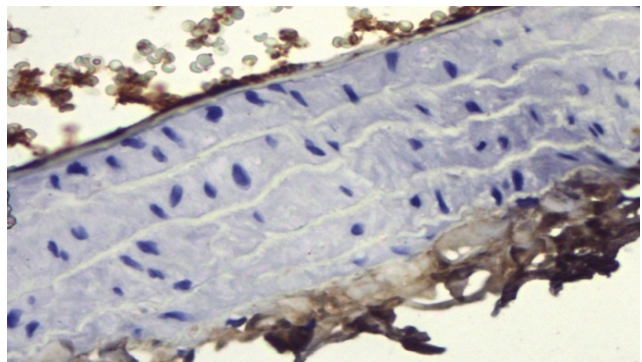


TGF-β1

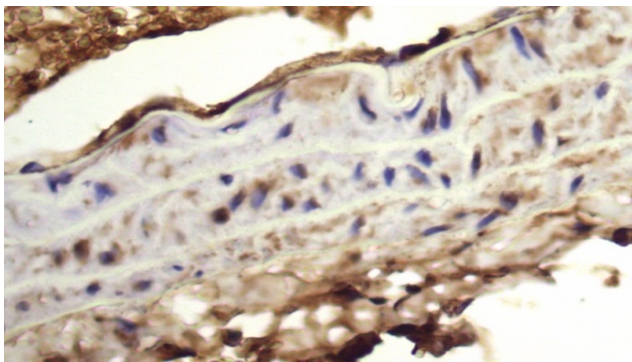


FGF-2

Рис.5. Стенка брюшного отдела аорты крыс контрольной серии, ув. ×400, ИГХ реакция

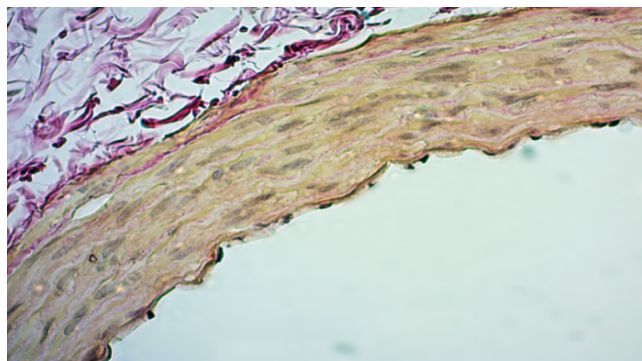


TGF-β1

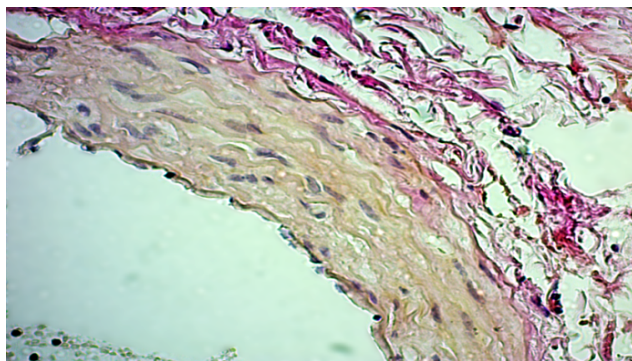


FGF-2

Рис. 6. Стенка брюшного отдела аорты крыс после 2 недель введения прозерина, ув. ×400, ИГХ реакция



а)



б)

Рис.7. Стенка брюшного отдела аорты крысы контрольной серии (а) и после 2 недель введения прозерина (б), ув. ×400, окраска по Ван Гизону

собны претерпевать эндотелиально-мезенхимальную трансформацию: мигрировать вглубь ткани и вырабатывать «жесткоостный» коллаген I и III типов [10]. Двухнедельное введение прозерина привело к накоплению коллагена (рис.7): объемная плотность коллагеновых волокон в медиі брюшного отдела аорты увеличилась на 39%, с $10,17 \pm 0,92$ об.% до $14,14 \pm 0,77$ об.% ($p < 0,05$). Отдельно следует отметить, что через 1 месяц после прекращения моделирования хронической ваготонической активации содержание коллагеновых волокон в медиі увеличилась в 2,2 раза по сравнению с контрольной серией (с $10,17 \pm 0,92$ об.% в контроле до $22,36 \pm 1,13$ об.% через 1 месяц, $p < 0,05$) и в 1,6 раза по сравнению с 2 неделями введения прозерина ($p < 0,05$) (рис.8).

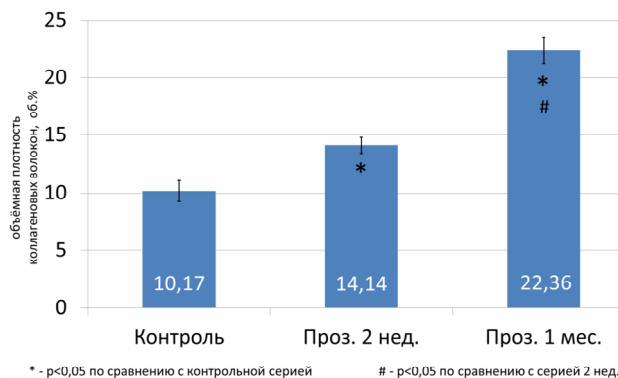


Рис.8. Объемная плотность коллагеновых волокон в медиі брюшного отдела аорты в сериях эксперимента

Заключение

Моделирование хронической ваготонической активации приводит к увеличению содержания коллагеновых волокон в миокарде ЛЖ и брюшного отдела аорты крыс линии Вистар. Данный процесс происходит не одновременно в миокарде и стенке аорты, что может отражать разную чувствительность к воздействию, а также различное «цитокиновое ремоделирование» в этих отделах сердечно-сосудистой системы. Асинхронность изменений фиброгенеза в ЛЖ и аорте, возможно, приведет к неблагоприятным сдвигам в соотношении их жесткости.

1. Драпкина О. М., Дадаева В. А. Жесткость сосудистой стенки при хронической сердечной недостаточности // Клиницист. 2013. №3-4. С.27-30.
2. 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.
3. Røe Å.T., Sjaastad I., Louch W.E. Heart failure with preserved ejection fraction // Tidsskrift for den Norske lægeforening: tidsskrift for praktisk medicin, ny række. 2017. V.137. №18. doi: 10.4045/tidsskr.16.1068.
4. Chirinos J. A., Sweitzer N. Ventricular–arterial coupling in chronic heart failure // Cardiac failure review. 2017. V.3. №1. P.12.
5. Sonaglioni A. et al. Ventricular-arterial coupling in centenarians without cardiovascular diseases // Aging clinical and experimental research. 2018. V.30. №4. P.367-373.
6. Weber T., Protogerou A. Left ventricular hypertrophy, arterial stiffness and blood pressure: exploring the Bermuda Triangle // Journal of hypertension. 2019. V.37. №2. P.280-281.
7. Жмайлова С.В., Рубанова М.П., Губская П.М. и др. Ваготоническая реакция на холодовой стресс у больных артериальной гипертензией женщин // Артериальная гипертензия. Материалы II Международного конгресса «Артериальная гипертензия от Короткова до наших дней». 2009. Т.15. Прилож. №2. С.41-42.
8. Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия: Руководство. М.: Медицина, 1990. С.114.
9. Davidson J.M., Zoia O., Liu J.M. Modulation of transforming growth factor-beta 1 stimulated elastin and collagen production and proliferation in porcine vascular smooth

muscle cells and skin fibroblasts by basic fibroblast growth factor, transforming growth factor- α , and insulin-like growth factor-I // Journal of cellular physiology. 1993. V.155. №1. C.149-156.

10. Piera-Velazquez S., Li Z., Jimenez S.A. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders // The American journal of pathology. 2011. V.179. №3. P.1074-1080.

References

1. Drapkina O. M., Dadaeva V. A. Zhestkost' sosudistoi stenki pri khronicheskoi serdechnoi nedostatochnosti [Vascular wall stiffness in chronic heart failure]. Clinician, 2013, no.3-4, pp.27-30.
2. 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.
3. Røe Å.T., Sjaastad I., Louch W.E. Heart failure with preserved ejection fraction. Tidsskrift for den Norske lægeforening: tidsskrift for praktisk medicin, ny række, 2017, vol.137, no. 18. doi: 10.4045/tidsskr.16.1068.
4. Chirinos J. A., Sweitzer N. Ventricular–arterial coupling in chronic heart failure. Cardiac failure review, 2017, vol. 3, no.1, p.12.
5. Sonaglioni A. et al. Ventricular-arterial coupling in centenarians without cardiovascular diseases. Aging clinical and experimental research, 2018, vol.30, no.4, pp.367-373.
6. Weber T., Protogerou A. Left ventricular hypertrophy, arterial stiffness and blood pressure: exploring the Bermuda Triangle. Journal of hypertension, 2019, vol.37, no.2, pp. 280-281.
7. Zhmailova S.V., Rubanova M.P., Gubskaya P.M. et al. Vagotonicheskaia reaktsiia na kholodovoi stress u bol'nykh arterial'noi gipertenziei zhenshchin [Vagotonic response to cold stress in hypertensive women]. Arterial'naia gipertenziia - Arterial hypertension. Materialy II Mezhdunarodnogo kongressa «Arterial'naia gipertenziia ot Korotkova do nashikh dnei» [Proc. II International Congress “Arterial hypertension: from Korotkov to the present day”], 2009, vol.15. Appendix 2, pp. 41-42.
8. Avtandilov G.G. Meditsinskaia morfometriia: Rukovodstvo [Medical morphometry. Handbook]. Moscow, “Medicine” Publ., 1990, p.114.
9. Davidson J.M., Zoia O., Liu J.M. Modulation of transforming growth factor-beta 1 stimulated elastin and collagen production and proliferation in porcine vascular smooth muscle cells and skin fibroblasts by basic fibroblast growth factor, transforming growth factor- α , and insulin-like growth factor-I. Journal of cellular physiology, 1993, vol. 155 no.1, pp. 149-156.
10. Piera-Velazquez S., Li Z., Jimenez S.A. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders. The American journal of pathology, 2011, vol.179, no. 3, pp. 1074-1080.