

ИССЛЕДОВАНИЕ ЗАКОНОМЕРНОСТЕЙ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ КЛЕТОЧНЫХ ЭЛЕМЕНТОВ МИОКАРДА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ПАТОЛОГИИ СЕРДЦА**Л.Г.Прошина, С.В.Жмайлова, Л.М.Шевцова, А.В.Прошин, О.С.Быкова, Н.П.Федорова, М.В.Григорьева****STUDY OF MYOCARDIAL CELL UNDER EXPERIMENTAL HEART FAILURE IN RATS****L.G.Proshina, S.V.Zhmailova, L.M.Shevtsova, A.V.Proshin, O.S.Bykova, N.P.Fedorov, M.V.Grigor'eva***Новгородский государственный университет имени Ярослава Мудрого, Lyubov.Shevtsova@novsu.ru*

Изучена реакция клеточных элементов миокарда при экспериментальном стрессе и сердечной недостаточности. Выявлено, что экспериментальные модели патологии сердца вызывают функциональную и структурную перестройку тканей миокарда и предрасположенность кардиомиоцитов к апоптозу. Для работы использовались самцы белых лабораторных крыс линии Wistar половозрелого возраста средней массой $250,0 \pm 14,3$ гр. Морфологическое исследование проведено с использованием светооптического бинокулярного микроскопа AxioscopeA1 (Carl Zeiss, Германия). В качестве модели эмоционального стресса использовали иммобилизацию животных с дополнительным аperiодическим электрокожным раздражением. Модель хронической сердечной недостаточности воспроизводилась по методу В.И.Инчиной (2000 г.) путем 20-минутного плавания крыс до глубокого утомления с предварительным введением им за 10-15 минут до плавания 0,1 мл 1%-го раствора мезатона в течение 14 дней. Об интенсивности процессов перекисного окисления липидов в сердечной ткани судили по содержанию диеновых конъюгатов и малонового диальдегида. Материалом исследования служили ткани миокарда. Выявлено, что реактивные изменения клеток и тканей миокарда при исследованных экспериментальных ситуациях носят адаптивно-компенсаторный характер

Ключевые слова: *адаптация, стресс, кардиомиоциты, экспериментальная сердечная недостаточность, апоптоз*

The reaction of the cellular elements of the myocardium under experimental stress and heart failure was studied. It was revealed that experimental models of cardiac pathology cause functional and structural rearrangement of myocardial tissues and the predisposition of cardiomyocytes to apoptosis. For work we used male white laboratory rats of the Wistar line of sexually mature age, with an average weight of rats of $250,0 \pm 14,3$ g. Morphological research was carried out using an AxioscopeA1 light-optical binocular microscope (Carl Zeiss, Germany). Immobilization of animals with additional aperiодic electrodermal irritation was used as a model of emotional stress. The model of chronic heart failure was reproduced according to the method of V.I. Inchina (2000), by 20 minutes swimming the rats to deep fatigue, with their preliminary introduction 10-15 minutes before swimming 0.1 ml 1% mesatone solution for 14 days. The intensity of LPO processes in cardiac tissue was judged by the content of diene conjugates (DC) and malondialdehyde (MDA). The research material was myocardial tissue. It was revealed that reactive changes in myocardial cells and tissues in the studied experimental situations are adaptive-compensatory in nature.

Keywords: *adaptation, stress, cardiomyocytes, experimental cardiac failure, apoptosis*

Патология сердечнососудистой системы является современной проблемой медицины. Адаптивные перестройки тканей имеют в своей основе метаболическую подстройку, отсюда значимый интерес представляет изучение цитохимических изменений тканей и клеточных структур (определяющих их функциональные потенции) при экстремальных воздействиях. В структуре заболеваемости и смертности сердечно-сосудистые заболевания занимают лидирующие место [1]. Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) является тяжелым осложнением практически всех болезней сердца, отягочающим их течение и прогноз. В настоящее время установлена четкая взаимосвязь между психоэмоциональным состоянием и патологией миокарда. Изучение морфологической базы адаптивных, реактивных и регенераторных изменений миокарда при патологии различного генеза, в частности при ХСН и стрессе, является важной составляющей современной медицины. ХСН встречается достаточно часто, поэтому поиск новых маркеров прогнозирования ее течения и эффективных средств

терапии остается актуальным [2]. Кардиомиоциты являются детерминированными клетками миокарда, их потеря при экстремальных воздействиях и, в частности, ХСН и стрессе различной этиологии, в значительной мере определяет степень нарушения его сократительной способности [3,4]. В настоящее время имеется значительное количество публикаций о патологии сердца [5,6 и др.], однако данные о функциональных возможностях клеток миокарда при различной степени деструктивных изменений в процессе перестройки сердца под влиянием экспериментальных моделей ХСН и стресса противоречивы и недостаточны, неоднозначны материалы об индуктивных воздействиях и вкладе апоптоза в процессы гибели кардиомиоцитов.

Целью настоящего исследования является мониторинг структурно-функциональных перестроек миокарда, используемых в поддержании адаптационных реакций организма в норме, предпатологии на экспериментальных моделях хронической сердечной недостаточности и эмоционального стресса.

Материалы и методы

Экспериментальное исследование выполнено на 135 крысах-самцах Wistar массой 150-250 г, полученных из питомника ФГПУ «Рапполово» РАМН (Ленинградская обл.) Животные содержались в стандартных условиях вивария с соблюдением Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях, а также правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и 51000.4-96) и Приказа МЗ РФ №267 от 19.06.2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики» (GLP). Морфологическое исследование проведено с использованием светооптического бинокулярного микроскопа AxioscopeA1 (Carl Zeiss, Германия). Для анализа морфологических, иммуногистохимических и цитохимических особенностей кардиомиоцитов были сформированы три группы животных:

I. Интактные (контроль) — содержались на стандартном рационе вивария.

II. Группа животных с хронической сердечной недостаточностью (ХСН). Модель ХСН воспроизводилась по методу В.И.Инчиной (2000 г.), путем 20-минутного плавания крыс до глубокого утомления, с предварительным введением им за 10—15 минут до плавания 0,1 мл 1% раствора мезатона в течение 14 дней.

III. Группа животных с эмоциональным стрессом. С целью определения индивидуально-типологических особенностей поведения и прогностической оценки устойчивости крыс к эмоциональному стрессу, их предварительно подвергали модифицированному тесту «Открытое поле» (ОП). В качестве модели эмоционального стресса использовали иммобилизацию животных с дополнительным аperiодическим электрокожным раздражением. Через трое суток после тестирования в открытом поле крыс помещали в индивидуальные плексигласовые боксы, ограничивающие движения. Электрокожное раздражение наносили в области хвоста по стохастической схеме пороговым значением переменного тока напряжением 4-6 В, частотой 50 Гц, длительностью импульсов 1 мсек. Продолжительность каждой стимуляции составляла 30 сек — 1 мин. В качестве критериев устойчивости животных к экспериментальному стрессу использовали следующие показатели:

- 1) показатели поведения в тесте «ОП»;
- 2) изменение органов стресс-маркеров в условиях экспериментального стресса — гипертрофия надпочечников, инволюция тимуса;
- 3) критерий выживаемости в условиях эмоционального стресса [7].

Материалом исследования служили ткани миокарда. Парафиновые срезы для морфологического исследования окрашивали гематоксилином-эозином и по Ван-Гизону. Морфометрически оценивалось количество (в объемных процентах, об.%) кардиомиоцитов (КМЦ), сосудов и межклеточного вещества. Вычисляли соотношение КМЦ и межклеточного вещества, включающего соединительную ткань.

Известно, что стрессовая ситуация сопровождается изменением окислительно-восстановительного гомеостаза. Об интенсивности процессов перекисного окисления липидов (ПОЛ) в сердечной ткани судили по содержанию диеновых конъюгатов (ДК) и малонового диальдегида (МДА) [8]. Исследовали активность ферментов антиоксидантной системы защиты (АОС): супероксиддисмутазы (СОД) и каталазы (КАТ) в тканях сердца [9].

В настоящее время имеются сведения о значительной роли апоптоза при ишемических повреждениях сердца и инфаркте миокарда [2,3,6], в связи с чем в данном исследовании изучали роль апоптоза в деструктивных изменениях тканей сердца. Определение экспрессии кардиомиоцитами ключевых белков-регуляторов апоптоза (bcl-2 и bax) выполнялось при помощи двухэтапного авидин-биотинового метода с демаскировкой антигена (путем высокотемпературной обработки ткани) на парафиновых срезах с использованием моноклональных антител и визуализирующей системы фирмы «Dako Cytomation» [9]. Результаты иммуногистохимической реакции оценивались в световом микроскопе: для апоптоза — как отношение прореагировавших клеток к их общему количеству в 10 полях зрения. Функциональная активность кардиомиоцитов оценивалась по содержанию ключевых ферментов: лактатдегидрогеназы (ЛДГ); сукцинатдегидрогеназы (СД) и гликогена по Э.Пирсу (1962) в собственной модификации.

Результаты исследования

Сравнительный анализ миокарда контрольных групп животных продемонстрировал следующую картину. При средней массе крыс $250,0 \pm 14,3$ грамма масса сердца составляла $95,7 \pm 38,3$ мг. Относительная масса сердца к массе тела (мг на 1 грамм) равнялась 3,8. Объемная плотность кардиомиоцитов равна $85,5 \pm 5,2$ об.%; межклеточного вещества (включавшего аморфное вещество и коллагеновые волокна) — $14,5 \pm 0,1$ об.%. Соотношение КМЦ и межклеточного вещества составляет 5,9. Строма миокарда представлена рыхлой соединительной тканью, оплетающей кардиомиоциты и включающей большое количество капилляров, объемная плотность которых составляет $7,4 \pm 0,1$ об.%.

Экспериментальная сердечная недостаточность привела к деструкции мышечных волокон. Выявляются контрактурные повреждения кардиомиоцитов, в ряде клеток имеет место ослабление анизотропии дисков А или исчезновение анизотропных структур в отдельных кардиомиоцитах. Объемная плотность кардиомиоцитов II группы животных уменьшилась на 27%, а III группы — на 23% по сравнению с интактными. Объемная плотность капилляров снизилась на 17% и на 15% соответственно. Содержание межклеточного вещества возросло у II группы животных на 32%, у III группы — на 28% по сравнению с интактными крысами (I группа животных). Соотношение КМЦ и стромальных компонентов миокарда при хронической сердечной недостаточности составило 1,5, а при эмоциональном стрессе — 3,5, что практически в 4 и в 2 раза меньше, чем у интактных животных (5,9).

Иммуногистохимическое исследование показало, что экспрессия кардиомиоцитами антиапоптотического белка bcl-2 в группе контроля (группа I) выше, чем в группах с ХСН (группа II) и эмоционального стресса (группа III), достоверных различий экспрессии этого белка в экспериментальных группах не выявлено. Частота экспрессии проапоптотического белка bax повышается в экспериментальных группах (II, III) в 2,5 и в 2 раза соответственно (рис.1).

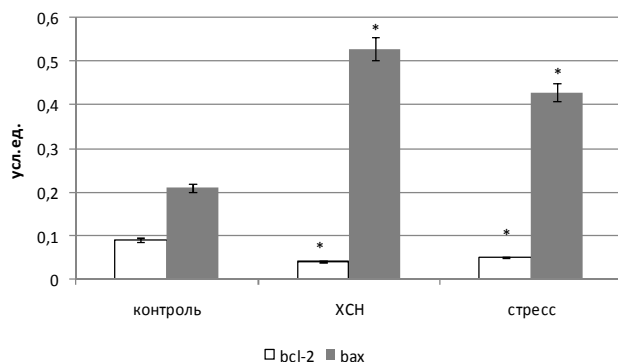


Рис.1. Частота экспрессии кардиомиоцитами антиапоптотического белка bcl-2 и проапоптотического белка bax в норме, при экспериментальной сердечной недостаточности (ХСН) и при эмоциональном стрессе (ЭМС). $p < 0,05$ по сравнению с контролем

Анализ полученных данных свидетельствует о повышении содержания в кардиомиоцитах белка bax, который является маркером запуска программированной гибели клеток при ХСН и стрессе. Частота экспрессии кардиомиоцитами проапоптотического белка bax при ХСН выражена больше, в то время как экспрессия антиапоптотического белка bcl-2 при ХСН выражена меньше. Вышеизложенное свидетельствует о значительном вкладе апоптоза в процесс гибели кардиомиоцитов и, по всей видимости, послужило индукцией для развития соединительнотканых компонентов (в частности, коллагеновых волокон). Исследование содержания гликогена в кардиомиоцитах показало, что его уровень во II экспериментальной группе снизился на 64%, во III группе — на 21%; активность ЛДГ — на 42% и на

72%; СДГ — на 23% и на 12% соответственно по сравнению с кардиомиоцитами интактных животных (рис.2). Иначе говоря, как при ХСН, так и при эмоциональном стрессе прослеживается снижение метаболической активности исследуемых ферментов, следовательно, и функциональных возможностей кардиомиоцитов, однако интенсивность падения энзимов в различных ситуациях неоднозначна, что, очевидно, свидетельствует о различном вкладе исследуемых ферментов в патогенез ХСН и стресса.

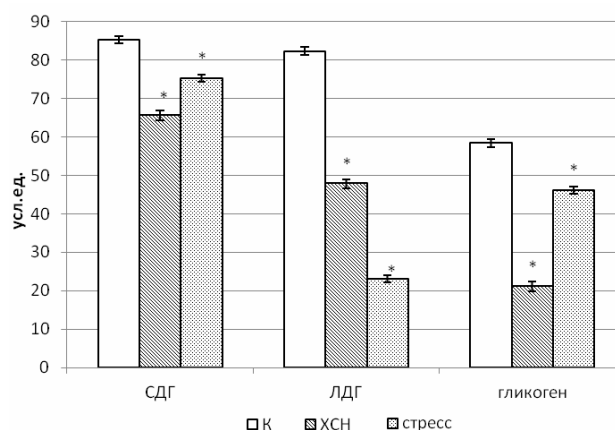


Рис.2. Активность СДГ, ЛДГ и гликогена в кардиомиоцитах крыс линии Wistar в I, II и III экспериментальных группах. * — $p < 0,05$ по сравнению с контролем

В норме содержание ДК в тканях миокарда составляет $0,87 \pm 0,05$ Е/г ткани, МДА — $0,695 \pm 0,041$ нмоль/500 мг ткани в час. Активность СОД и КАТ составляет $1,71 \pm 0,14$ ед/мин.мг белка и $0,233 \pm 0,015$ ед/мин.мг белка соответственно. В условиях экспериментальной хронической сердечной недостаточности и эмоционального стресса наблюдается значительное повышение содержания продуктов ПОЛ на 215% и 126% соответственно. Активность ферментов АОС при хронической сердечной недостаточности снижается: СОД — на 87%, КАТ — на 88%. При эмоциональном стрессе активность СОД снизилась на 76%, КАТ — на 69% (см. табл.).

Анализ содержания ДК, МДА в кардиомиоцитах свидетельствует о смещении окислительно-

Содержание продуктов ПОЛ и ферментов АОС в тканях сердца у крыс линии Wistar в норме при экспериментальной хронической сердечной недостаточности и эмоциональном стрессе

Серия эксперимента	ДК, Е/г ткани	МДА, нмоль/500 мг ткани в час	СОД, ед/мин.мг белка	КАТ, ед/мин.мг белка
Контроль I группа	$0,87 \pm 0,05$	$0,695 \pm 0,041$	$1,71 \pm 0,14$	$0,233 \pm 0,015$
Хроническая сердечная недостаточность II группа	$1,67 \pm 0,05^*$	$0,859 \pm 0,050^*$	$0,65 \pm 0,16^*$	$0,326 \pm 0,011$
Эмоциональный стресс III группа	$1,87 \pm 0,08^*$	$1,302 \pm 0,043^*$	$0,41 \pm 0,07^*$	$0,073 \pm 0,006^*$

Примечание: * — $p < 0,05$, по сравнению с контролем.

восстановительного гомеостаза в сторону прооксидантов, что может быть интерпретировано как оксидативный стресс, присутствующий как при ХСН, так и при эмоциональном стрессе. Однако при эмоциональном стрессе отмечается более выраженное падение антиоксидантных ферментов.

Заключение

Таким образом, мониторинг структурно-функциональных перестроек миокарда в экспериментальных ситуациях хронической сердечной недостаточности и эмоционального стресса показал, что они носят неспецифический характер: как при ХСН, так и при стрессе наблюдается уменьшение объемной плотности кардиомиоцитов и повышение объемной плотности соединительнотканного компартмента. Однонаправлена, но с разной степенью выражена метаболическая активность СДГ, ЛДГ и гликогена. На модификацию функциональной активности и структурной организации миокарда, очевидно, оказывает определенное влияние окислительный стресс. Аналитический обзор исследованных экспериментальных моделей позволил отметить более выраженную предрасположенность кардиомиоцитов к запуску программы гибели клеток в условиях повышенной нагрузки при ХСН. Структурно-функциональные преобразования носят адаптивно-компенсаторный характер и вызваны реакцией клеток и тканей на экстремальные воздействия ХСН и стресса.

Статья подготовлена при финансовой поддержке Минобрнауки России в рамках базовой части государственного задания.

1. Казаков В.А., Суходоло И.В., Шипулин В.М., Миллер А.А. Ультраструктурные аспекты постинфарктного ремоделирования левого желудочка // Сибирский медицинский журнал. 2009. №4. Вып.1. С.6-11.
2. Бершова Т.В., Монаенкова С.В., Гасанов А.Г. Патогенетическое значение апоптоза кардиомиоцитов при сердечной недостаточности // Педиатрия. 2009. Т.88. №5. С.147-154.
3. Залесский В.Н., Гавриленко Т.И., Фильченков А.А. Апоптоз при ишемии и реперфузии миокарда // Лікарська справка. 2002. №1. С.21-24.
4. Bing O.H. Hypothesis: apoptosis may be a mechanism for the transition to heart failure with chronic pressure overload // J. Mol. Cell Cardiol. 1994. V.26(8). P.943-948.
5. Fukuda N., Granzier H. Role of the giant elastic protein titin in the Frank-Starling mechanism of the heart // Curr. Vasc. Pharmacol. 2004. V.2. P.135-139.

6. Хлапов А.П., Вечерский Ю.Ю., Рязанцева Н.В. и др. Роль апоптоза кардиомиоцитов в механизмах ишемического ремоделирования миокарда // Бюллетень сибирской медицины. 2008. №3. С.33-38.
7. Шеголева А.Н., Коплик Е.В., Прошина Л.Г. Влияние эмоционального стресса на функциональную морфологию сердечной мышечной ткани // Актуальные проблемы современной медицины. 2006. Т.8. С.176-177.
8. Гаврилов В.Г., Мешкорудная М.И. Спектрофотометрическое определение содержания гидроперекисей липидов в плазме крови // Лаб. дело. 1983. №3. С.33-35.
9. Эллиниди В.Н., Аникеева Н.В., Максимова Н.А. Практическая иммуногистоцитохимия: Методические рекомендации. СПб.: ВЦЭРМ МСЧ России, 2001. С.36.

References

1. Kazakov V.A., Suhodolo I.V., Shipulin V.M., Miller A.A. Ul'trastrukturnye aspekty postinfarkt'nogo remodelirovaniya levogo zheludochka [Ultrastructural aspects of postinfarction remodeling of the left ventricle]. Sibirskij medicinskij zhurnal [Siberian Medical Journal], 2009, no.4, iss.1, p.6-11.
2. Bershova T.V., Monayenkova S.V., Gasanov A.G. Patogeneticheskoe znachenie apoptoza kardiomiocitov pri serdechnoj nedostatochnosti [Pathogenetic significance of cardiomyocyte apoptosis in heart failure]. Pediatrija [Pediatrics], 2009, vol. 88, no. 5, pp. 147-154.
3. Zaleskij V.N., Gavrilenko T.I., Fil'chenkov A.A. Apoptoz pri ishemii i reperfuzii miokarda [Apoptosis in ischemia and myocardial reperfusion]. Likarska spravka [Medical Help], 2002, no. 1, pp. 21-24.
4. Bing O.H. Hypothesis: apoptosis may be a mechanism for the transition to heart failure with chronic pressure overload. J. Mol. Cell Cardiol., 1994, 26(8), pp. 943-948.
5. Fukuda N., Granzier H. Role of the giant elastic protein titin in the Frank-Starling mechanism of the heart. Curr. Vasc. Pharmacol., 2004, no. 2, pp. 135-139.
6. Hlapov A.P., Vecherskij Ju.Ju., Rjazanceva N.V., Kaljuzhin V.V., Mustafina L.R., Shipulin V.M., Novickij V.V. et al. Rol' apoptoza kardiomiocitov v mehanizmah ishemicheskogo remodelirovaniya miokarda [The role of cardiomyocyte apoptosis in the mechanisms of ischemic myocardial remodeling]. Bjulleten' sibirskoj mediciny [Bulletin of Siberian Medicine], 2008, no. 3, pp. 33-38.
7. Shhegoleva A.N., Koplik E.V., Proshina L.G. Vlijanie jemotional'nogo stressa na funkcionálnuju morfologiju serdechnoj myshechnoj tkani [Influence of emotional stress on functional morphology of cardiac muscle tissue]. Aktual'nye problemy sovremennoj mediciny [Actual Problems of Modern Medicine], 2006, vol. 8, pp.176-177.
8. Gavrilov V.G., M.I. Meshkorudnaja Spektrofotometricheskoe opredelenie soderzhanija gidroperekisej lipidov v plazme krovi [Spectrophotometric determination of lipid hydroperoxides in blood plasma]. Laboratornoye delo, 1983, no.3, p.33-35.
9. Jellinidi V.N., Anikeeva N.V., Maksimova N.A. Prakticheskaja immunogistocitohimija: Metodicheskie rekomendacii [Practical immunohistology: Methodical recommendations]. Saint-Petersburg, Ministry of the Russian Federation for Affairs for Civil Defence, Emergencies and Elimination of Consequences of Natural Disasters Publ., 2001. P.36.