

Хлопонин П. А., Хлопонин Д. П.

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАРДИОПРОТЕКТОРНОЙ АКТИВНОСТИ β -АДРЕНОБЛОКАТОРОВ III ПОКОЛЕНИЯ ПРИ АДРИАМИЦИНОВОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ У КРЫС

Кафедра гистологии (заведующий – проф. П. А. Хлопонин) Ростовского государственного медицинского университета, Ростов-на-Дону, e-mail: khloponin@list.ru

Актуальность проблемы кардиопротекции определяется неизменно высокими показателями заболеваемости и смертности от сердечно-сосудистой патологии и, в первую очередь, хронической сердечной недостаточности (ХСН). Поэтому объективный экспериментально-морфологический и клинико-лабораторный анализ влияния лекарственных препаратов (ЛП) на кардиальное ремоделирование как ключевой компонент патогенеза ХСН, его предотвращение и в перспективе реверсию – одна из приоритетных задач фармакотерапии.

Целью работы был гистологический и гистохимический анализ влияния β -адреноблокаторов (β -АБ) III поколения небиволола (НБ) и карведилола (КВ) на тканевые элементы миокарда при моделировании ХСН у крыс.

Материал и методы исследования. Сердца контрольных (12) и экспериментальных (24) животных обрабатывали по стандартной методике и после заливки в аралдит, ультрамикротомии и контрастирования срезы просматривали в электронных микроскопах ЭМВ-100 К и Tecnai G2 Spirit Bio Twin. В целях регистрации апоптоза в миокарде наряду с морфологическим проводили анализ транслокации фосфатидилсерина (ФС) по его связыванию с FITC-меченым аннексином-5 (А5) [6].

Использовались 3 группы контроля: I уровня (K_0) – стандартный контроль; II уровня (АДР) – моделирование ХСН путем хронического в/бр введения адриамицина (АДР) [4, 5] и III уровня ($K_{нб}$, $K_{кв}$) – введение крысам в течение 10 недель НБ и КВ в дозах 1 и 10 мг/кг/сут *per os* соответственно.

Животным экспериментальных групп (НБ и КВ) *per os* вводили либо НБ (1 мг/кг/сут), либо КВ (10 мг/кг/сут) параллельно с АДР. Продолжительность эксперимента составляла 10 недель.

Результаты исследования и их обсуждение. Полученный нами материал в виде световых и электроннооптических снимков вентрикулярного и атриального миокарда контрольных групп крыс полностью подтверждает сложившиеся современные представления о его структуре [1–3]. Проведенный анализ влияния изучаемых ЛП на миокард интактных крыс (группы $K_{нб}$ и $K_{кв}$) также свидетельствует об отсутствии достоверных изменений микро- и субмикроскопического строения как сократительных и сократительно-секреторных КМЦ, так и тканевых элементов интерстициального компонента миокарда.

Световая микроскопия тонких и полутонких гистологических срезов, а также электронная микроскопия миокарда левого желудочка крыс группы АДР 10 недель спустя после введения курсовой кардиотоксической дозы АДР (рис. 1, а–г)

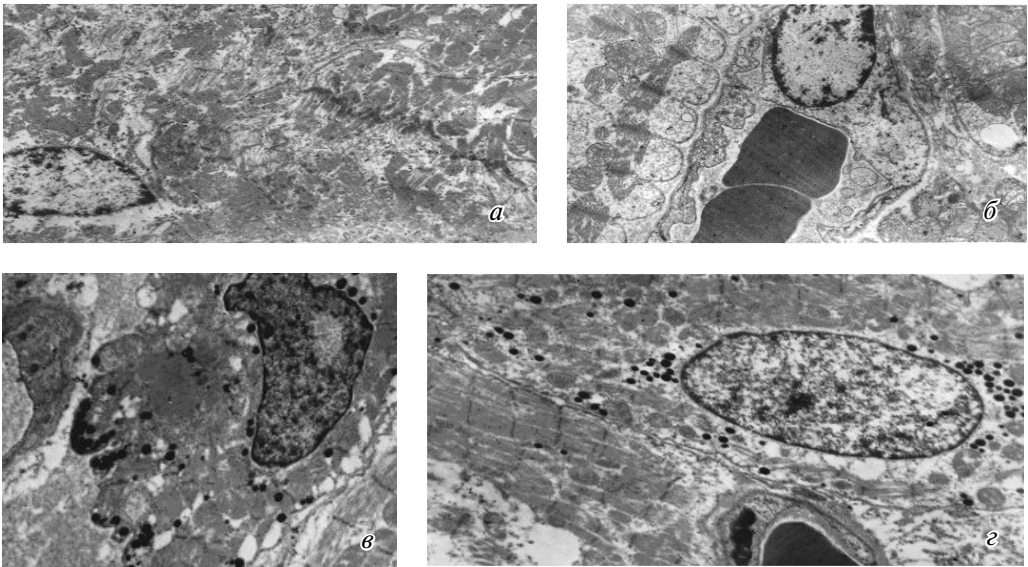


Рис. 1 а, б. Ультраструктурные проявления внутриклеточных изменений КМЦ и отека интерстициального компонента миокарда ЛЖ крыс группы АДР. Ув.: а) 8500; б) 4700
Рис. 1 в, г. Апоптотическая гибель КМЦ (а) и эндотелиоцита кровеносного капилляра (б) в атриальном миокарде крысы группы АДР. Ув.: а) 8200; б) 7000

убеждают прежде всего в явной гетероморфности вентрикулярных КМЦ. Акцентируя внимание на ядерном компартменте последних, о специфике изменений организации которого на 1-й неделе воздействия АДР сообщали [3], к концу эксперимента мы наблюдали в нем признаки эухроматизации ядер и относительное выравнивание контуров ядерной оболочки. Ядрышки, однако, были небольших размеров, в них редуцировался гранулярный и преобладал фибриллярный компонент, нередко фрагментировалась нуклеолома.

Закономерно, что в основной массе еще оставшихся жизнеспособными, но структурно и функционально измененных КМЦ были очевидны проявления значительной утраты или резкого уменьшения содержания свободных рибосом. Лишь у немногих уже гипертрофированных к этому сроку сердечных миоцитов можно отметить близкую к нормальной структуру и локализацию миофибрилл (МФ) и митохондрий (МХ), элементов саркоплазматического ретикулума (СПР) и других внутриклеточных структур.

Объективным подтверждением негативного влияния АДР на сердечную мышечную ткань является тот факт, что занимающие значительную часть объема вентрикулярных КМЦ миофибриллы нередко имели локальные нарушения структуры саркомеров с фрагментацией материала Z-дисков; также очевидным было смещение саркомеров друг относительно друга в рядом расположенных МФ; разрыхление упаковки их с дезориентацией миофиламентов в саркоплазме.

Обнаруживаемое нередко аномальное расположение МФ и дезориентация пучков миофиламентов в реорганизованных КМЦ позволяют полагать

о нарушениях синтеза и сборки не только белков сократительного аппарата, но и цитоскелета. Наряду с подобными КМЦ, содержащими обычно 2–3 МФ в значительном объеме бесструктурной («запустевшей») цитоплазмы, встречались и атрофичные сердечные миоциты, в которых наблюдался аутофагоцитоз деструктивно измененных органелл. Характерной чертой адриамицинового повреждения большинства мышечных клеток сердца были выраженные изменения количества, формы и размеров МХ, их пространственной локализации, плотности матрикса, а также нарушенный рисунок крист. В исследованном материале на фоне имеющихся изменений ультраструктуры КМЦ постоянно наблюдалось разобщение и рассредоточение МХ как в околоядерной зоне, так и в межмиофибриллярных пространствах.

От характера и степени дезорганизации сократительного аппарата была зависима структура идентифицируемых по ходу вставочных дисков межмиоцитарных соединений. При этом наиболее изменялась организация «зон входа миофиламентов», обычно сохраняли свою целостность десмосомальные контакты, в связи с уменьшением плотности цитоплазматического матрикса демаскировались и заметно уменьшались в количестве «щелевые» соединения. В расширенных межмембранных пространствах вставочных дисков встречались ограниченные мембраной и выделяемые экзоцитозом гранулы, ламеллярные мембранные образования. На обзорных снимках видны признаки выраженного интерстициального и внутриклеточного отека.

Закономерной гетероморфностью КМЦ (как и в вентрикулярном миокарде) характеризуется предсердная мышечная ткань крыс группы АДР. Парадоксальным следует признать факт обилия специфических предсердных гранул в атриальных КМЦ и слабого развития в них органелл экстрацеллюлярного биосинтеза. Здесь же порой обнаруживали лизосомы и аутофагосомы, крупные, иногда содержащие везикулы, вакуоли. Для «светлых» миоцитов предсердий, зачастую располагавшихся вблизи интерстиция, были типичны низкая плотность матрикса саркоплазмы, небольшие относительные объемы МФ и МХ, диффузное распределение предсердных гранул, часто обнаруживаемых под сарколеммой и даже в контакте с ней изнутри, упрощенная организация вставочных дисков.

Описываемой картине пластической ХСН сопутствовали явления внутриклеточного отека многих предсердных КМЦ, межмышечного отека, изменения в структуре миогематического барьера, гетероморфность в организации эндотелиоцитов и перицитов, хорошо контурируемая, но разрыхленная базальная мембрана под эндотелием капилляров и др.

В миокарде крыс группы АДР нередко обнаруживались апоптотически погибающие КМЦ, а также эндотелиоциты, лейомиоциты и перициты сосудов. Однако механизмы и проявления апоптоза сердечных миоцитов были не совсем типичными, по сравнению с клетками интерстиция. Наблюдавшийся диффузный фиброз стромы миокарда представлял собой пролонгированную реакцию соединительнотканых клеток на элиминацию атрофирующихся и погибающих апоптозом сердечномышечных клеток. Закономерным проявлением продолжающейся инволюции последних было обнаружение активных форм макрофагов, фагоцитировавших фрагменты погибших клеток.

Таким образом, исследуемая в качестве контроля экспериментальная «адриа-мициновая» структурная перестройка миокарда, безусловно, связана с явным угнетением процессов внутриклеточного синтеза белка, прогрессирующей инволюцией внутриклеточных структур КМЦ и их атрофией, элиминацией значительного количества КМЦ путем апоптоза [1], развитием диффузного кардиосклероза.

К морфологическим проявлениям действия высокоселективного β -АБ НБ на деструктивно измененный под влиянием АДР миокард левого желудочка и правого предсердия крыс (группа НБ), по нашим наблюдениям, относятся: активация процессов внутриклеточной регенерации и заметное уменьшение гетероморфности КМЦ; достоверное снижение числа КМЦ с АДР-индуцированным повреждением структуры ядер и особенно ядрышек, отсутствие апоптозов (отсроченных) и увеличение количества двуядерных КМЦ, относительная целостность сарколеммы и межмиоцитарных вставочных дисков, сохраняющаяся дезорганизация органелл цитоплазмы и ее вакуолизация, присутствие очагов миоцитолизиса, низкое содержание энергетических метаболитов, обнаружение локусов внутриклеточной регенерации (рис. 2, а–г). Для этой группы также свойственны уменьшение внутриклеточного и интерстициального отека миокарда; наличие признаков отсроченной апоптотической гибели эндотелия, перицитов и гладких миоцитов сосудов микроциркуляторного русла; торможение фиброза интрамиокардиальной стромы; реальность де- и редифференцировки ЭТЦ и перицитов некоторых кровеносных капилляров.

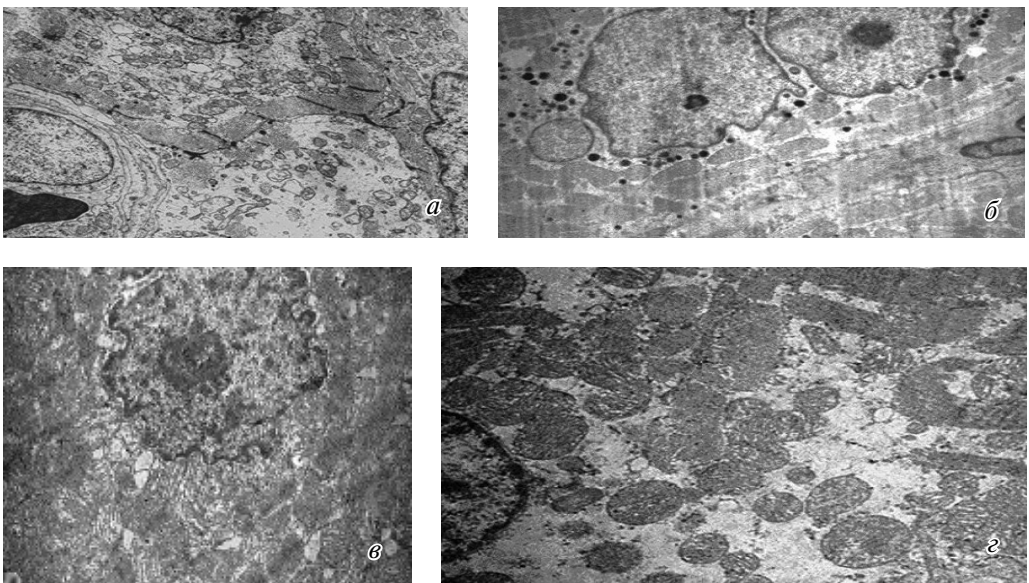


Рис. 2. Гетероморфность вентрикулярных КМЦ (а) и появление двуядерных атриальных КМЦ (б) в миокарде крыс группы НБ. Ув.: а) 4500; б) 8500. Ультраструктурные проявления активации процессов внутриклеточной регенерации КМЦ ЛЖ сердца крыс группы НБ. Ув.: в) 8200; г) 9900

Нередко в обедненной органеллами околядерной саркоплазме среди сети ее микрофиламентов наряду с многочисленными предсердными гранулами (и без них — в желудочковых КМЦ), единичными МХ и мелкими диктиосомами аппарата Гольджи обнаруживались лизосомы и аутофагосомы. Последние зачастую достигали крупных размеров, имели разнородную структуру и интерпретировались нами как маркерные проявления аутофагии.

Применение КВ (группа КВ) также приводило к заметной стабилизации структуры сердечной мышечной ткани, несмотря на наличие «следов» негативного воздействия АДР (рис. 3, а, б).

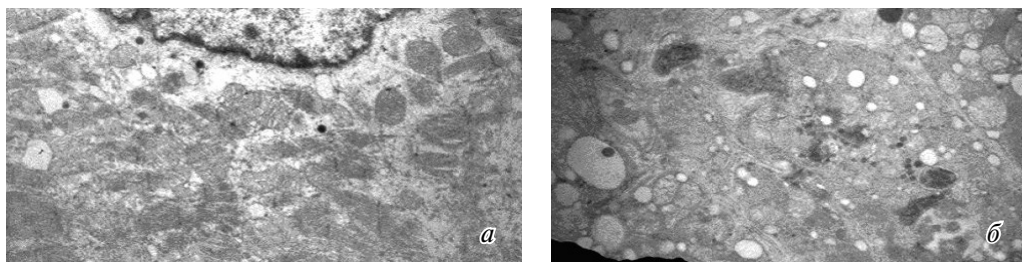


Рис. 3. Проявления внутриклеточной регенерации (а) и аутофагии (б) в атриальных миоцитах правого предсердия сердца крыс группы КВ. Ув.: а) 8500; б) 8200

Достоверный, как и для НБ, кардиопротекторный эффект КВ, по нашим наблюдениям, был обусловлен его способностью поддерживать структурно-функциональную репарацию ядерного компартмента, обеспечивать относительную целостность сарколеммы и межмиоцитарных вставочных дисков, нормализовывать ультраструктуру МФ, МХ и СПР, активировать процессы внутриклеточной регенерации, снижать морфофункциональную активность фибробластов и т. д. Торможение β -АБ апоптотической гибели КМЦ и других клеток в миокарде подтверждают результаты анализа транслокации ФС. Было установлено, что при пластической ХСН (группа АДР) происходит индукция апоптоза, о чем говорит в 8,5 раза увеличенное по сравнению с группой K_0 связывание А5 с мембранами клеток миокарда. Прием и НБ, и КВ приводил к достоверному подавлению этой формы клеточной гибели в миокарде, о чем свидетельствовало понижение на 53 и 46 % показателей апоптотического индекса в группах НБ и КВ соответственно.

Таким образом, результаты комплексного ультраструктурного и гистохимического анализа собственного экспериментального материала позволяют не только обстоятельно охарактеризовать кардиопротекторный потенциал НБ и КВ, но и свидетельствуют о достоверном снижении частоты регистрации апоптотически измененных клеток в атриальном и вентрикулярном миокарде при их применении.

По сравнению с контролем II уровня, к проявлениям β -АБ-индуцируемой кардиопротекции относились прежде всего менее выраженные различия структурно-функциональных характеристик КМЦ, достоверное уменьшение не только внутриклеточного и интерстициального отека, но и фиброза в миокарде.

Для многих КМЦ и вентрикулярного, и атриального миокарда к концу эксперимента было характерно замедленное разворачивание внутриклеточных репаративных процессов, сопровождающихся соответствующими им проявлениями (рис. 4, а, б), включая и увеличение числа 2-ядерных КМЦ (особенно в миокарде предсердия), подтверждающих возможность пролиферативных процессов в сердечной мышечной ткани. Вполне возможно и существенное влияние β -АБ на образование и распределение, депонирование и выведение содержимого секреторных предсердных гранул.

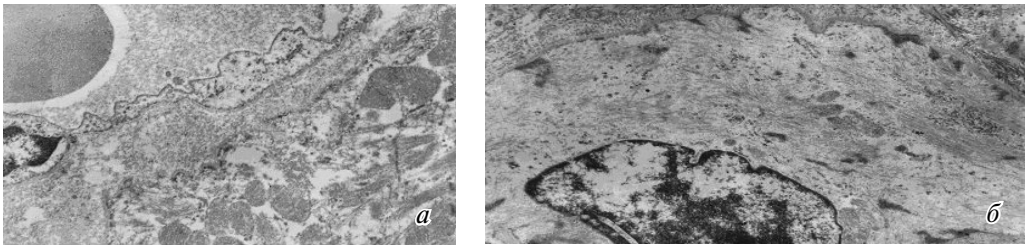


Рис. 4. Ультраструктурные проявления внутриклеточной регенерации КМЦ, ЭТЦ и лейомиоцита кровеносного сосуда в миокарде правого предсердия крыс группы НБ. Ув.: а) 7200; б) 8200

В претерпевающей перестройку интерстициальном компоненте миокарда обнаруживалась гетероморфность ЭТЦ, перicyтов и гладких миоцитов сосудов микроциркуляции, обусловленная проявлениями их структурной реорганизации и внутриклеточной регенерации, апоптоза. В отношении указанных элементов интерстиция у исследованных β -АБ можно предполагать наличие антипролиферативного эффекта. Обнаруживаемое ослабление явлений фиброза миокарда коррелирует с проявлениями незначительной биосинтетической активности фибробластов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Непомнящих Л. М., Лушникова Е. Л., Семенов Д. Е. Регенераторно-пластическая недостаточность сердца. Морфологические основы и молекулярные механизмы. М.: Изд-во РАМН, 2003.
2. Румянцев П. П. Кардиомиоциты в процессах репродукции, дифференцировки и регенерации. Л.: Наука, 1982.
3. Семенова Л. А., Непомнящих Л. М., Семенов Д. Е. Морфология пластической недостаточности мышечных клеток сердца. Новосибирск: Наука, 1985.
4. Siveski-Iliskovic N., Kaul N., Singal P. K. Probucol promotes endogenous antioxidants and provides protection against adriamycin-induced cardiomyopathy in rats // Circulation. 1994. Vol. 89. P. 2829–2835.
5. Tong J., Ganguly P. K., Singal P. K. Myocardial adrenergic changes at two stages of heart failure due to adriamycin treatment in rats // Am. J. Physiol. 1991. Vol. 260. P. H909–H916.
6. Yamanaka S., Tatsumi T., Shiraishi J., Mano A., Keira N., Matoba S., Asayama J., Fushiki S., Fliss H. Amlodipine inhibits doxorubicin-induced apoptosis in neonatal rat cardiac myocytes // J. Am. Coll. Cardiol. 2003. Vol. 41. P. 870–878.

Целуйко С. С., Красавина Н. П., Горбунов М. М.

СТВОЛОВЫЕ КЛЕТКИ В ТКАНЯХ ОРГАНОВ ДЫХАНИЯ ПРИ ХОЛОДОВЫХ ВОЗДЕЙСТВИЯХ

*Кафедра гистологии (заведующий – проф. С. С. Целуйко) Амурской государственной
медицинской академии, Благовещенск*

Неблагоприятные климатические условия, вызывающие респираторные заболевания человека, или их моделирование в эксперименте на животных [4] выступают в роли этиопатогенетических пусковых механизмов, сопровождающихся отклонениями от нормального функционирования легких, наиболее чувствительных к неблагоприятным условиям среды. Эти изменения, выявленные в динамике экспериментального воздействия, коррелируют с патологией органов дыхания, в том числе возникновением острых и хронических респираторных заболеваний. Репаративная регенерация эпителия воздухоносного отдела легких изучена у животных после воздействия окиси азота, озона, высоких концентраций кислорода, антиоксидантов, химических агентов и лекарственных препаратов, которые повреждают эпителиальную выстилку бронхиол и расположенных рядом с ними альвеол. При этом часть клеток подвергается дистрофии и деструкции. Степень повреждения эпителия трахеи, бронхов и альвеол, а также масштабы ответной пролиферации клеток определяются главным образом дозой и длительностью действия патологического агента. Из-за сравнительно низкого уровня пролиферативной активности и продолжительного времени обновления отдельных типов клеток эпителиальную выстилку слизистой оболочки воздухоносных путей относят к медленно обновляющимся тканевым системам. В настоящее время считают, что в дыхательной системе присутствуют малодифференцированные клетки с высоким потенциалом к развитию [1, 2]. Стволовые клетки органов дыхания способны длительное время находиться в состоянии покоя, при этом они редко делятся и имеют значительную продолжительность клеточного цикла. Их специфическое поведение обычно зависит от совокупности факторов, обеспечивающих жизнеспособность и дифференциацию, то есть процесс превращения неспециализированных стволовых клеток в специализированные. Он определяется внутренними, которые контролируются генами самой клетки, и внешними сигналами окружающих клеток – «ниша», включающая в себя базальную мембрану, внеклеточный матрикс, присутствие соседних клеток, продуцирующих различные регуляторы на фоне действия различных факторов [3, 8].

В литературе отсутствуют данные о состоянии стволовых клеток и «нишах», окружающих эти клетки в слизистой оболочке трахеи при холодовом стрессе, на фоне выраженного окислительного стресса, что и определило цель исследования.

Материал и методы исследования. Работа выполнена на беспородных белых крысах. Возраст молодых половозрелых крыс, включенных в исследование, составил 3–4 месяца, вес – в пределах 150,0–180,0 г.

Одним из основных условий объективной характеристики дыхательной системы в динамике реализации основных функций системного комплекса явилось создание адекватной модели изучения холодовых нагрузок в эксперименте, по-