

УДК 611.127

ОСОБЕННОСТИ ФИБРОГЕНЕЗА МИОКАРДА ПРИ АДРЕНЕРГИЧЕСКОМ И ХОЛИНЕРГИЧЕСКОМ СТРЕССЕ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

¹Вебер В.Р., ¹Рубанова М.П., ²Лобзин Ю.В., ¹Жмайлова С.В.,
²Карев В.Е., ¹Румянцев Е.Е.

¹ФГБОУ ВПО «Новгородский государственный университета имени Ярослава Мудрого»,
Великий Новгород, e-mail: gogathejedi@gmail.com;

²ФГБУ «НИИ детских инфекций ФМБА России», Санкт-Петербург, e-mail: vadimkarev@yandex.ru

Проблема устойчивости миокарда к стрессу изучена в основном с фармакологических позиций [2,8]. Отсутствуют работы, посвященные изучению морфологических аспектов «стрессорного» сердца с точки зрения индивидуальной, генетически детерминированной устойчивости сердечной мышцы к повреждающему воздействию. Остаются невыясненными структурные особенности повреждения миокарда в зависимости от различных видов стресса и разной его продолжительности. Не исключена возможность того, что при ведении больных с тяжелыми кардиальными событиями в зависимости от того, какой «вегетативный» вариант стресса преобладает, необходима разная фармакологическая коррекция, возможно, даже препаратами с новыми фармакологическими свойствами, отличными от используемых сегодня в практике лечения острой кардиологической патологии. Такой подход к изучаемой проблеме, на наш взгляд, может способствовать дальнейшему совершенствованию технологии моделирования стресса в эксперименте, а в дальнейшем, возможно, приведет к разработке принципов управляемой адаптационной защиты миокарда в клинической практике.

Ключевые слова: миокард, фиброз, стресс, цитокины, TGF β , FGF-2, коллаген

PARTICULARITIES OF FIBROGENESIS IN MYOCARDIUM FOLLOWING ADRENERGIC AND CHOLINERGIC STRESS

¹Weber V.R., ¹Rubanova M.P., ²Lobzin Y.V., ¹Zhmailova S.V.,
²Karev V.E., ¹Rumyantsev E.E.

¹FSBEI HPE «Yaroslav-the-Wise Novgorod State University»,
Novgorod, e-mail: gogathejedi@gmail.com;

²FSBEI SRI of Childhood infections of FMBA of Russia,
Saint-Petersburg, e-mail: vadimkarev@yandex.ru

Known cardiac stress resistance researches show predominantly pharmaceutical [2,8] aspect and researches from morphological point of view are scarce. Structural changes in myocardium following stress need further investigation, depending on stress type and duration. There is a possibility that in patients with heart failure variable pharmaceutical treatment is needed depending on prevailing «autonomic» stress type, possibly using new type medicaments, different from used in present cardiological therapy. In our opinion, morphological approach would be useful in creating more precise experimental cardiac stress model, which could possibly lead to development of controlled adaptational therapy of cardiac failure.

Keywords: myocardium, fibrosis, stress, cytokines, TGF β , FGF-2, collagen

Цель исследования: изучить патогенетические особенности фиброгенеза миокарда при экспериментальном моделировании различных вариантов острого стресса.

Материал и методы исследования

Эксперимент проводился на крысах-самцах линии Вистар, сопоставимых по возрасту и массе, 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, 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».

Острый эксперимент проводился на 2 сериях крыс (по 20 крыс в каждой серии). Моделирование острого адренергического стресса (АС): крысам I серии однократно интраперитонеально вводился

адреналин из расчета 50 мкг/кг (доза адреналина подбиралась эмпирически, и главным условием было отсутствие при данной дозе некроза кардиомиоцитов). Моделирование острого холинергического стресса (ХС): крысам II серии однократно интраперитонеально вводился антихолинэстеразный препарат «Прозерин» из расчета 20 мкг/кг. Через 2 часа, 6 часов, 24 часа и через один месяц после однократного введения адреналина и прозерина под эфирным наркозом проводилась декапитация животных и забор материала на исследование. В качестве контроля исследованы 10 крыс соответствующего возраста и массы, не подвергавшиеся медикаментозным и стрессовым воздействиям.

Образцы миокарда левого и правого желудочка сердца 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. Иммуногистохимические исследования проводились с использованием автоматической установки для иммуногистохимиче-

ского и иммуноцитохимического окрашивания препаратов Autostainer 360 (Thermo Shandon, Великобритания). Использовались мышьиные моноклональные антитела к TGF β 1 (TB21) в разведении 1/100, кроличьи поликлональные антитела к FGF-2(147) в разведении 1/400 производства Santa Cruz Biotechnology, Inc., США, антитела к коллагену I типа, а также полимерная иммуногистохимическая система визуализации EnVision (DAKO, США) в соответствии с рекомендациями производителей реагентов. В качестве оптически плотной метки, визуализирующей продукт иммуногистохимической реакции, использовался диаминобензидин. После проведения иммуногистохимической реакции гистологические препараты докрасивались гематоксилином. Учет результатов иммуногистохимической реакции проводился с использованием светооптического бинокулярного микроскопа AxioscopeA1 (Carl Zeiss, Германия), TGF β 1, FGF-2 и коллаген I – позитивные клетки имели отчетливое коричневое окрашивание. По степени окрашивания выделяли клетки с сильной, средней и слабой экспрессией. В 9 полях зрения миокарда левого желудочка (ЛЖ) и правого желудочка (ПЖ) каждой крысы

в проводимом эксперименте рассчитывался индекс экспрессии (ИЭ) – количество позитивных клеток в 1 мм² миокарда. Площадь 1 поля зрения с учетом увеличения микроскопа составляла 0,088 мм² (из расчета длина изображения 0,355 мм, умноженная на ширину изображения 0,248 мм). Так же определялся индекс активности (ИА) эндотелиоцитов, который рассчитывался как % эндотелиоцитов, экспрессирующих факторы роста фибробластов от общего количества клеток, экспрессирующих фактор роста фибробластов (%).

Результаты исследования и их обсуждение

Анализ результатов исследования показал, что при адренергическом стрессе в ЛЖ в контрольных точках 2–6 часов клеток, экспрессирующих коллаген I типа (коллаген I), не выявлено и только в контрольной точке 24 часа было обнаружено небольшое количество фибробластов, синтезирующих коллаген I – ИЭ был равен 0,32 кл./мм² (рис. 1).

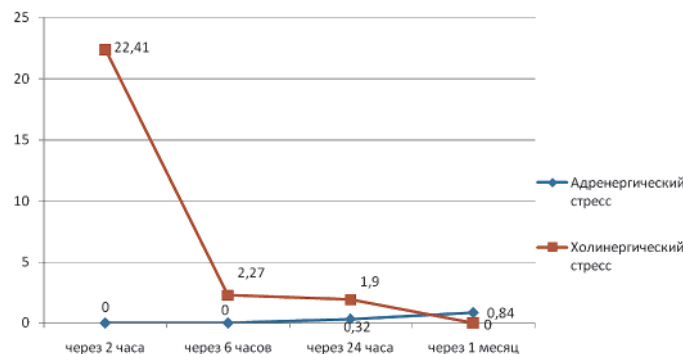


Рис. 1. Динамика показателя «Индекс экспрессии клеток» с сильной и средней экспрессией коллагена I типа в миокарде левого желудочка при адренергическом и холинергическом вариантах острого стресса

В ПЖ при АС было выявлено небольшое количество фибробластов со средней степенью экспрессии коллагена I: ИЭ = 1,58 кл./мм² в контрольной точке 2 часа, ИЭ = 1,59 кл./мм² в 6 часов и ИЭ = 0,32 кл./мм² в 24 часа (рис 2). Клеток с сильной экспрессией коллагена I обнаружено не было.

В ПЖ только в контрольной точке 6 часов в небольшом количестве (ИЭ = 0,32 кл./мм²) были выявлены эндотелиоциты-«фибробласты», синтезирующие коллаген I типа (рис. 4). Во всех других контрольных точках как в ЛЖ, так и в ПЖ эндотелиоцитов, подвергшихся эндотелиально-мезенхимальной трансформации (ЭндМТ) [4, 5, 6, 7] и синтезирующих коллаген I типа, при АС не было выявлено.

При холинергическом стрессе содержание стромальных клеток миокарда, экспрессирующих коллаген I, было значительно больше во всех контрольных точках исследования как в правом, так и в левом желудочках

сердца. Максимальная экспрессия клетками коллагена I отмечена через 2 часа после введения прозерина в миокарде обоих желудочков. Так, ИЭ с сильной и средней экспрессией в ЛЖ был равен 22,41 кл./мм² (рис. 1), а в ПЖ ИЭ = 26,05 кл./мм² (рис. 2). Причем в ЛЖ 26,8% экспрессирующих коллаген I клеток были представлены эндотелиоцитами, подвергшимися ЭндМТ и синтезирующими коллаген I со средней степенью экспрессии. В ПЖ число эндотелиоцитов-«фибробластов» составляло 2,9% от общего числа клеток с сильной и средней экспрессией коллагена I.

Кроме того, практически во всех контрольных точках как в ЛЖ, так и в ПЖ отмечалось небольшое количество эндотелиоцитов-«фибробластов» со слабой экспрессией коллагена I.

Интересно заметить, что в контрольной точке 6 часов при ХС значительно уменьшилось число клеток, экспрессирующих коллаген I: в ЛЖ – в 9,7 раза, в ПЖ – в 6,5 раза.

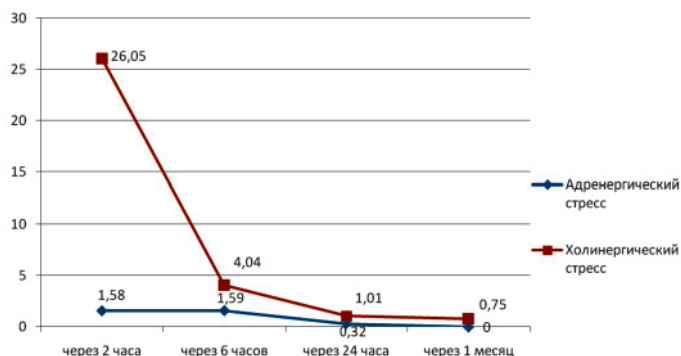


Рис. 2. Динамика показателя «Индекс экспрессии клеток» с сильной и средней экспрессией коллагена I типа в миокарде правого желудочка при адренергическом и холинергическом вариантах острого стресса

То есть уже через 6 часов после введения прозерина при ХС после значительного возрастания резко уменьшилось число экспрессирующих коллаген I клеток, остающиеся примерно на том же уровне и в контрольной точке 24 часа.

Обращает на себя внимание значительное преобладание числа эндотелиоцитов, вырабатывающих коллаген I типа при ХС, в отличие от АС (рис. 3,4). Так, из 54 наблюдений при АС только в одном (1,9%) наблюдалась экспрессия эндотелиоцитами коллагена I типа, а при ХС из 54 наблюдений в 45 случаях (83,3%), $\chi^2 = 50,140$,

$p = 0,0001$. То есть при ХС содержание эндотелиоцитов-«фибробластов» в миокарде значительно выше, а, следовательно, можно предполагать, что и ремоделирование сосудов при этом стрессе выражено сильнее. Первичность поражения сосудов или миокарда при таком стрессобуловленном заболевании, как АГ, являющаяся предметом продолжающейся дискуссии, возможно, зависит от того, какое вегетативное сопровождение переживаемого стресса имеется у больных АГ – с преобладанием адренергических или холинергических влияний.

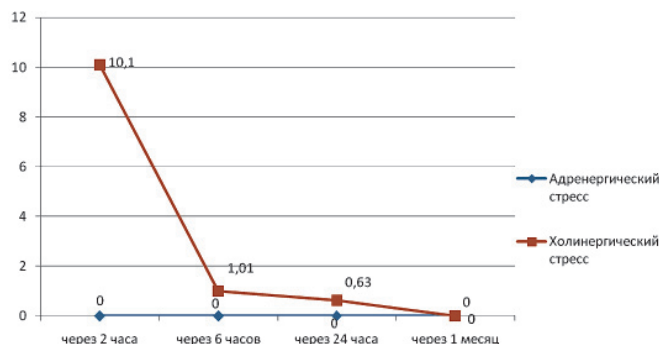


Рис. 3. Динамика показателя «Индекс экспрессии эндотелиоцитов-«фибробластов» со средней и слабой экспрессией коллагена I типа в миокарде левого желудочка при адренергическом и холинергическом вариантах острого стресса

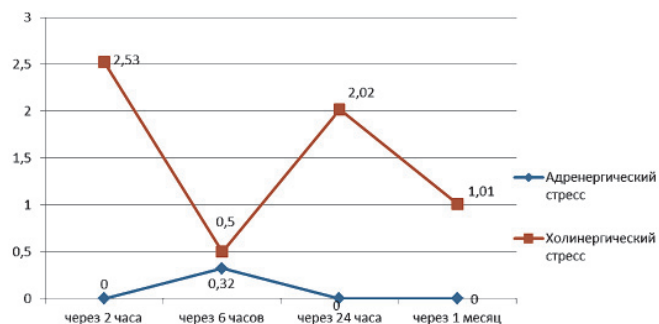


Рис. 4. Динамика показателя «Индекс экспрессии эндотелиоцитов-«фибробластов» со средней и слабой экспрессией коллагена I типа в миокарде правого желудочка при адренергическом и холинергическом вариантах острого стресса

Участие эндотелиоцитов в выработке коллагена I типа при остром холинэргическом стрессе представляет несомненный интерес, поскольку трансформация эндотелиоцитов в фибробласты вызывает такие изменения в сосудистой стенке, которые могут запускать внутрисосудистый путь свертывания крови коллагеном, который в норме не экспонирован на внутренней поверхности сосудов и появляется лишь при трансформации эндотелиоцитов. Запуск внутрисосудистого свертывания происходит при контакте крови с коллагеном базальной мембраны эндотелиоцитов, когда последние трансформируются в «фибро-

бласты» и продвигаются вглубь миокарда, обнажая базальную мембрану, соприкасающуюся с кровью до момента развития регенераторной пролиферации эндотелия и восстановления целостности эндотелиальной выстилки (рис. 5). Кроме того, в сосудах с подвергшимися ЭндМТ эндотелиоцитами, еще составляющими часть эндотелиальной выстилки и вырабатывающими мономеры коллагена в просвет сосуда можно визуализировать синтезируемый продукт в виде сильно окрашенного «позитивного вещества» в просвете сосуда в непосредственной близости от коллаген I – позитивных эндотелиоцитов (рис. 6).

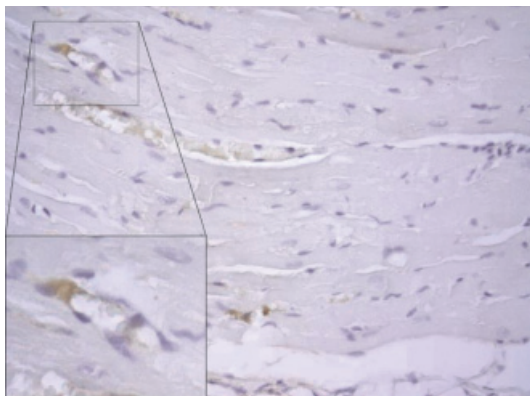


Рис. 5. Миокард правого желудочка через 6 часов после однократного введения прозерина. ИГХ реакция, ув. x400, коллаген I типа (мономеры) окрашен маркером (DAB) в коричневый цвет. Выделенный комплекс клеток – сосуд капиллярного типа, одна из эндотелиальных клеток экспрессирует коллаген

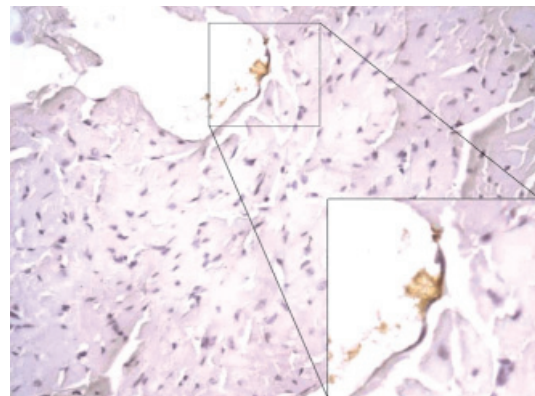


Рис. 6. Миокард правого желудочка через 2 часа после однократного введения прозерина. ИГХ реакция, ув. x400, коллаген I типа (мономеры) окрашен маркером (DAB) в коричневый цвет. Эндотелиоцит с экспрессией коллагена I типа в цитоплазме и выделяющий его в просвет сосуда

Объяснить только неспецифической иммуногистохимической реакцией такое интенсивное окрашивание в просвете сосуда в непосредственной близости от эндотелиоцита-«фибробласта» с сильной экспрессией вряд ли возможно. Интересно отметить, что при ХС уже через 2 часа визуализировались клетки, интенсивно синтезирующие металлопротеиназы-1, тогда как при АС через 2 часа от начала острого стресса клетки, синтезирующие металлопротеиназы-1, не были найдены. Продукты деградации коллагена, образующиеся при ХС в первые часы острого стресса, также могут способствовать запуску внутрисосудистого свертывания крови.

При моделировании как АС, так и ХС можно наблюдать сосуды миокарда, где эндотелий десквамирован и базальная мембрана эндотелиоцитов на большом протяжении сосуда может контактировать с кровью (рис. 7). Спазм сосудов документировался изменением ориентации клеток эндотелиальной выстилки при снижении периметра

сосуда, располагающихся перпендикулярно по отношению к внутренней мембране принимающей вид частокола – «вздыбленные» эндотелиоциты по образному выражению Савчук А.Н. [3]. Вследствие нарушения межклеточных связей и связей с базальной мембраной обнаруживается полная или частичная десквамация эндотелия с обнажением субэндотелиального слоя (рис. 8), контактирующего с кровью.

Все перечисленные изменения в сосудах миокарда способствуют запуску внутрисосудистого свертывания крови, пусковым фактором которого является XII (фактор Хагемана), активация которого происходит при контакте крови с субэндотелиальной мембраной (коллагеном) и с мономерами коллагена, экспрессируемыми эндотелиоцитами – «фибробластами» в просвет сосуда. В целом фактор Хагемана является универсальным активатором всех плазменных протеолитических систем: свертывающей, фибринолитической и системы комплемента [1]. В описываемой модели острого

стресса реализуется контактная активация фактора XII с образованием активного фраг-

мента фактора XIIa. Фактор XIIa в большей степени влияет на свертываемость крови.

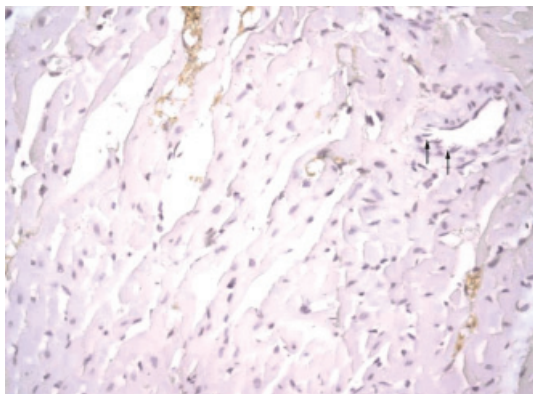


Рис. 7. Миокард правого желудочка через 2 часа после однократного введения прозерина. ИГХ реакция, ув. $\times 400$, collagen I типа (мономер) окрашен маркером (DAB) в коричневый цвет. Спазм микрососудов с нарушением ориентации эндотелиоцитов («вздыбленные» эндотелиоциты) и появлением просветов между ними

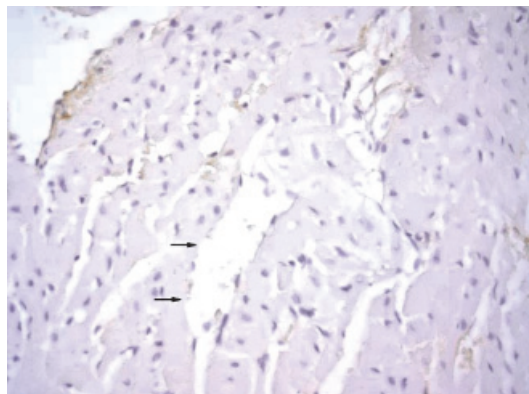


Рис. 8. Миокард правого желудочка через 24 часа после однократного введения прозерина. ИГХ реакция, ув. $\times 400$, collagen I типа (мономер) окрашен маркером (DAB) в коричневый цвет. Десквамация эндотелиоцитов сосуда с нарушением целостности эндотелиальной выстилки (возможные зоны контакта коллагена базальной мембраны с кровью)

С учетом изложенного можно полагать, что при ХС в большей степени, чем при АС в первые часы эксперимента происходит нарушение реологических свойств крови. Не исключено, что описанные изменения структуры эндотелия и последующий контакт коллагена с кровью является предтечей развития хронического ДВС-синдрома, который нередко наблюдается у больных с такими стрессобусловленными заболеваниями, как АГ и ИБС.

Список литературы

1. Баркаган З.С. Основы диагностики нарушений гемостаза // З.С. Баркаган, А.П. Момот. М., 1999 – 246 с.
2. Регенерация миокарда: пролиферативный потенциал кардиомиоцитов и индукция кардиомиогенеза при альтернативной и пластической недостаточности сердца / Л.М. Непомнящих, Е.Л. Лушников, П.М. Ларионов, М.Г. Шурыгин // Вестник Российской АМН (2010) – № 5 – С. 3–11.
3. Савчук А.Н. Морфологические изменения в артериях и веществе головного мозга при травматическом субарахноидальном кровоизлиянии // А.Н. Савчук, Д.В. Свистов, Д.Е. Мацко // Нейрохирургия. – 2002. – № 1 – С. 6–12.
4. Damian Medici, Scott Potenta and Raghu Kalluri. Transforming growth factor- $\beta 2$ promotes Snail-mediated endothelial-mesenchymal transition through convergence of Smad-dependent and Smad-independent signalling // *Biochem. J.* – 2011. – Vol. 438. – P. 515–520.
5. Ghosh A.K., Nagpal V., Covington J.W., Michaels M.A., Vaughan D.E. Molecular basis of cardiac endothelial-to-mesenchymal transition (EndMT): differential expression of microRNAs during EndMT // *Cell Signal.* – 2012. – May Vol. 24 (5). – P. 1031–1036.
6. Piera-Velazquez S., Li Z., Jimenez S.A. Role of endothelial-mesenchymal transition (EndoMT) in the pathogenesis of fibrotic disorders // *Am J. Pathol.* – 2011. – Sep Vol. 179 (3). – P. 1074–1080.
7. Yasuhiro Yoshimatsu, Tetsuro Watabe. Roles of TGF- β Signals in Endothelial-Mesenchymal Transition during Cardiac Fibrosis // *International Journal of Inflammation.* – 2011. – Vol. 10. – P. 1–8.

8. Zor'kina A.V., Inchina V.I., Kostin Ya.V. Antioxidant effect of cytochrome c under conditions of prolonged immobilization stress // *Bulletin of Experimental Biology and Medicine.* – 1997. – Vol. 123 (6). – P. 559–561.

References

1. Barkagan Z.S. *Osnovy diagnostiki narusheniy gemostaza [Basics of diagnosing haemostasis disorders]* Moscow, 1999 246 p.
2. Nepomnjashih L.M., Lushnikova E.L., Larionov P.M., Shurygin M.G. *Vestnik Rossijskoj AMN – Bulletin of RAMS*, 2010, no. 5 pp. 3–11.
3. Savchuk A.N., Svistov D.V., Macko D.E. *Nejrohirurgija – Neurosurgery* 2002, no. 1, pp. 6–12.
4. Damian Medici, Scott Potenta and Raghu Kalluri. *Biochem. J.*, 2011 Vol. 438, pp. 515–520.
5. Ghosh A.K., Nagpal V., Covington J.W., Michaels M.A., Vaughan D.E. *Cell Signal.*, 2012, May Vol. 24 (5) pp. 1031–1036.
6. Piera-Velazquez S., Li Z., Jimenez S.A. *Am J. Pathol.*, 2011, Sep Vol. 179 (3) pp. 1074–1080.
7. Yasuhiro Yoshimatsu, Tetsuro Watabe. *International Journal of Inflammation*, 2011, Vol. 10. pp. 1–8.
8. Zor'kina A.V., Inchina V.I., Kostin Ya.V. *Bulletin of Experimental Biology and Medicine*, 1997, Vol. 123 (6), pp. 559–561.

Рецензенты:

Насыров Р.А., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой патологической анатомии с курсом судебной медицины Санкт-Петербургского государственного педиатрического медицинского университета, г. Санкт-Петербург;

Цинзерлинг В.А., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией патоморфологии Санкт-Петербургского научно-исследовательского института фтизиопульмонологии, г. Санкт-Петербург.

Работа поступила в редакцию 04.04.2013.