На правах рукописи

Руденко Наталья Сергеевна

РЕГУЛЯЦИЯ ПЕПТИДНЫМИ ГОРМОНАМИ СЕРДЦА ГЕМОДИНАМИЧЕСКОЙ СТРЕСС-РЕАКЦИИ У НОРМОТЕНЗИВНЫХ КРЫС И КРЫС С НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИНДУЦИРОВАННОЙ СТРЕССОМ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ (НИСАГ)

03.03.01 – физиология

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Новосибирск
2020

Работа выполнена в Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» (г. Новосибирск).

Научный руководитель –
доктор медицинских наук Валерий Фёдорович Максимов

Официальные оппоненты:

- Наталья Борисовна Пиковская, д-р биологических наук, профессор кафедры нормальной физиологии и основ безопасности жизнедеятельности (Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Новосибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации);
- Алексей Яковлевич Багров, д-р медицинских наук, главный научный сотрудник лаборатории нейрофизиологии и патологии поведения (Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова Российской академии наук (ИЭФБ РАН, г. Санкт-Петербург).

Ведущая организация –

- ФГБОУ ВО СибГМУ Минздрава России (Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Сибирский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, г.Томск)

Защита состоится «__» _____ 2020 года в ___ часов на заседании диссертационного совета Д001.014.02 по защите докторских и кандидатских диссертаций при Федеральном государственном бюджетном научном учреждении «Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины» (630117, а/я 237, г. Новосибирск, ул. Тимакова, 4), тел. (383) 335-98-01, факс: 335-97-54, электронная почта: dissovet@phisiol.ru

С диссертацией можно ознакомиться в научной библиотеке НИИФФМ и на сайте http://www.physiol.ru/.

Автореферат разослан « __ » _____ 2020 года

Ученый секретарь
диссертационного совета,
д-р биол. наук В.Н.Мельников

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования. В начале 80-х годов прошлого столетия были открыты предсердные натрийуретические пептиды (Atrial natriuretic peptides, ANP) сердца, которые обладают выраженным натрийуретическим и диуретическим эффектом, расслабляют гладкую мускулатуру артерий и оказывают защитное антигипертрофическое и антисклеротическое действие на сердце (Potter, 2006; Gardner, 2007), т.е. являются эндогенными антагонистами стресс-реализующих систем. Из теории Г. Селье (1982) известно, что реакции организма, вызванные стрессом, являются эволюционно закрепленной защитой при сильном или длительном воздействии внешнего фактора. Классические нейрогуморальные системы стресса (ренин-ангиотензин-альдостероновая система (РААС), симпато-адреналовая система (САС), гипоталамо-гипофизарно-адреналовая система (ГГАС), медиаторы свободнорадикального окисления и др.) через повышение сосудистого тонуса и сдвиг водно-электролитного баланса фенотипически проявляются в повышении артериального давления (АД) (Меерсон, Пшенникова, 1981). Вероятно, ANP принимают участие в развитии неспецифических адаптационных реакций, как стресс-лимитирующее звено. Однако в настоящее время стресс-лимитирующие системы организма изучены недостаточно, в отличие от стресс-реализующих.

Степень разработанности темы. Секреторные клетки найдены в миокарде всех позвоночных животных. Считается, что натрийуретические гормоны являются филогенетически древней регуляторной системой (Inoue, 2006; Trajanovska, 2007; Trajanovska, 2008; Takei, 2011). У рыб, например, угрей они регулируют потребление и выведение соли и воды при переходе из пресных водоемов в соленую морскую среду, а у наземных животных – чувство жажды (Wu, 2009). Исследователи признают, что у млекопитающих гормональная система сердца начинает функционировать с середины эмбриогенеза и активно участвует в регуляции артериального давления и водно-электролитного баланса у эмбрионов так же, как и у взрослых особей.

В течение первых нескольких лет изучения ANP стремительно накапливались данные об их строении и молекулярных формах, источниках и органах-мишенях, путях биосинтеза и специфических рецепторах, физиологических эффектах у разных классов животных в онтогенезе и в экспериментальных условиях (Bonow, 1996; de Bold, 1996; Maack, 2003). Были разработаны методы и определены концентрации гормона в крови у человека в норме и при сердечно-сосудистых заболеваниях (Clerico, 2000; Emdin M., 2004). Оказалось, что это пептиды из 28-32 аминокислотных остатков, которые вырабатываются в миоэндокринных клетках предсердий и выделяются в кровь при растяжении миокарда. Обнаруженные антагонистические отношения ANP с вазопрессорными регуляторными гормональными системами (РААС, САС) и позитивное влияние на гемодинамику и сердечно-сосудистую систему ANP дали основание надеяться на их клиническое использование. К сожалению, фармакологический подход (применение нативных, синтетических, модифицированных и химерных пептидов) пока не дал приемлемых результатов

(Mohammed, 2006; Von Lueder, 2013). Возможность внешнего влияния на эндогенный уровень и биоактивность ANP требует понимания механизмов их синтеза, выделения, синергические и антагонистические взаимодействия с другими регуляторными системами. Несмотря на все достижения, до настоящего времени основные вопросы физиологии этой гормональной системы остаются неясными. Сейчас окончательно не выяснено, каким образом происходит регуляция активности, стимуляция и подавление синтеза, внутриклеточное преобразование и выделение натрийуретических пептидов. Непонятны принципы регуляции уровня гормонов в крови и их функциональные взаимоотношения с другими регуляторными системами. Морфологические исследования, которые дают привязки к определенным структурам, к сожалению, немногочисленны и фрагментарны. Неясно, участвуют ли эти гормоны на разных стадиях реализации неспецифического адаптационного синдрома, который, наряду с генетической предрасположенностью, признается основой патогенеза многих неинфекционных заболеваний.

В Институте цитологии и генетики СО РАН путем селекции на основе аутбредной линии Вистар выведена линия крыс с наследственно индуцировнной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ). Отбор происходил по высокой инивидуальной чувствительности животных к стрессу. Эти крысы отличаются более выраженными реакциями стресс-реализующих гормонов (АКТГ, кортикостерон, адреналин), в том числе альдостерона, на разные виды стресса (иммобилизационный, социальный, гиповолемический и другие). У этих животных выявлены изменения основных звеньев регуляции гемодинамики - гипофизарно-надпочечниковой, ренин-ангиотензин-альдостероновой и инсулин-адреналовой систем. В сердце обнаружены все морфологические изменения, характерные для гипертензивного статуса: большая относительная масса, умеренный кардиосклероз, гипертрофия желудочковых кардиомиоцитов, утолщение стенки и уменьшение просветов коронарных артерий. Для них характерно повышенное артериальное давление. Крысы НИСАГ являются признанной моделью эссенциальной гипертонической болезни.

Цель: изучить функциональную активность миоэндокринных клеток, синтезирующих атриальный натрийуретический пептид в правом предсердии, и оценить их участие в гемодинамической реакции на субхронический иммобилизационный стресс у крыс с различающейся стрессовой реактивностью – нормотензивной и гипертензивной линий.

Задачи исследования:

1. Определить биохимические показатели, гемодинамические характеристики и оценить эндокринную функцию кардиомиоцитов на микроскопическом и ультратруктурном уровнях в двух состояниях животных – интактном и при субхроническом действии иммобилизационного стресса –

а) у нормотензивных крыс линии WAG,

б) у гипертензивных крыс НИСАГ,

2. Провести сравнительный анализ линий по фоновой секреторной активности миоэндокринных клеток предсердия и по физиологической реакции на стресс.

Научная новизна.

- Впервые методами электронной микроскопии и стереоморфометрии было показано, что проявление стресс-реакций сопровождается изменением функциональной активности миоэндокринных клеток правого предсердия крыс у обеих изученных линий. В условиях иммобилизационного стресса резко тормозится выделение гормона при сохранении его синтеза, что приводит к накоплению большого числа специфических секреторных гранул и их активной внутриклеточной деградации в цитоплазме миоэндокринных клеток.
- Впервые в ходе исследования было продемонстрировано, что у крыс линии НИСАГ генетически обусловленная высокая стресс-чувствительность, ассоциированная со стойкой артериальной гипертензией, сопровождается накоплением в цитоплазме миоэндокринных клеток предсердий значительно большего количества секреторного продукта, чем у крыс контрольной линии WAG.
- Впервые показано, что в условиях субхронического иммобилизационного стресса при однонаправленных изменениях всех изученных параметров межлинейные различия секреторной активности миоэндокринных клеток сохраняются.
- Впервыеустановлено что у крыс НИСАГ на фоне более высокой концентрации ANP в крови и прогормона в миоэндокринных клетках лабильность этой системы слабее и адаптация к стрессу менее эффективна, чем у нормотензивных животных.
- На основании полученных данных о функциональной активности системы ANP впервые обосновано участие этой системы в реализации стресс-реакций разного характера и разной продолжительности.

Теоретическая и практическая значимость. Семейство сердечных натрийуретических пептидов изучено недостаточно. Экспериментально обоснованное новое знание, которое дополняет представление о физиологии этой системы, ее взаимодействия с другими регуляторными системами и ее участие в основных реакциях организма и поддержании гомеостаза, имеет фундаментальное значение. Методики, использованные в работе, доказали участие ANP в реализации стресс-реакций разного характера.

В ходе реализации у разных линий крыс кратковременной стресс-реакции, сопровождающейся повышением АД, секреция ANP резко сокращается. Это позволяет понять взаимодействие гипо- и гипертензивных гуморальных систем в норме и при стойкой гипертензии. В перспективе полученные данные можно будет использовать для разработки принципиально новых подходов к коррекции гемодинамических гипо- и гипертонических нарушений. Знания о регуляции выделения ANP с помощью стимуляции или ингибирования собственных эндогенных биоактивных веществ помогут

в создании фармакологических препаратов принципиально нового механизма действия.

Полученные данные о секреции ANP дают основание считать одной из важных функций пептида гипотензивную и антистрессовую, объясняют механизмы действия ANP и обосновывают применение его синтетических аналогов в клинической практике. Он нашел применение как антагонист альдостерона и вазопрессина, превышая по эффективности использование для этой цели других препаратов. В настоящее время препараты с ANP используются в качестве мочегонного, натрийвыводящего средства, а также расширяющего почечные сосуды и расслабляющего гладкую мускулатуру.

Положения, выносимые на защиту:

1. АНП являются гормонами с антиалярмным действием, препятствуя эффектам стрессовых гормонов на гемодинамику. При выбранном варианте стресса ANP задерживаются в миоэндокринных клетках, и их секреция в кровь затормаживается, что способствует полноценному проявлению начальных стадий стресса как адаптивной реакции на воздействие.
2. Гипертрофия и секреторная гиперактивность миоэндокринных клеток предсердий у крыс НИСАГ является генетически закрепленным структурным следом искусственного отбора, проведенного по признаку повышенной стрессовой реактивности.

Апробация результатов. Полученные результаты были представлены на IV-й Конференции молодых ученых и студентов «Экспериментальная и прикладная физиология» (Москва, 2013); X-м Всероссийском конгрессе «Артериальная гипертензия как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний» (Москва, 2014); на международной научно-практической конференции «Основные проблемы в современной медицине» (Волгоград, 2014); II-м международном образовательном форуме «Российские дни сердца» (Санкт-Петербург, 2014); V-м международном форуме кардиологов и терапевтов (Москва, 2016).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 4 статьи в рецензируемых отечественных журналах, 5 тезисов в сборниках материалов и конференций.

Структура и объем работы. Диссертация включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, выводы. Работа изложена на 101 странице, содержит 27 рисунков и 4 таблицы. Список литературы включает 154 источник, из них 100 иностранных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В работе были использованы самцы крыс в возрасте 6 мес. нормотензивной линии WAG и гипертензивной линии НИСАГ - всего 48 животных. Половина животных оставалась интактными, а половина подвергалась иммобилизационному стрессу: в течение 4 дней крыс помещали в тесные клетки-пеналы на 20 минут, воспроизводя модель субхронического иммобилизационного стресса. До начала эксперимента и в конце него (на 4-е сутки) непрямым способом на хвосте измеряли АД.

После окончания стрессирующего воздействия крыс забивали декапитацией и проводили Общий анализ крови с помощью гематологического автоматического анализатора SYSMEX RX21N (Roche Diagnostics, Швейцария). Содержание электролитов (K^+ и Na^+) в сыворотке крови определяли в биохимическом анализаторе BECKMAN COULTER AU480 (США). Концентрацию ANP в сыворотке крови и в ткани предсердия определяли иммуноферментным способом при помощи набора AB 108797 – ANP (NPPA) Rat ELISA Kit (Великобритания) с помощью микропланшетного фотометра MULTISKAN EX (Thermo Labsystems, Китай).

Для морфологического исследования ушко правого предсердия обрабатывали по общепринятым методикам. Материал просматривали в световом и электронном микроскопах, проводили стереоморфометрию в пакете iTEM 5.1 (Olympus, Япония).

Вариационные ряды обрабатывали и проверяли на нормальность распределения с помощью пакета Statistica 6.0. Результаты представлены в виде средних значений и их стандартной ошибки M±m (для нормальных выборок) или в виде медианы, минимальных и максимальных значений (для ненормальных выборок). Достоверность различий определяли с помощью t-критерия Стьюдента и непараметрическим критерием знаков при $p \leq 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Сравнение изученных показателей у крыс линии WAG интактных и в эксперименте. У нормотензивных крыс линии WAG было зафиксировано достоверное повышение АД в среднем на 22 мм рт. ст. или на 18% (таб. 1).

При этом масса тела за время эксперимента не изменилась. Между интактными крысами и однолинейными животными, подвергнутыми стрессу, разницы в абсолютной и относительной массе сердца (масса сердца/масса тела) не обнаружено.

За 4 дня эксперимента не выявлено сдвигов в изученных показателях крови: электролитном составе сыворотки (увеличение концентрации натрия и уменьшение калия не достигали порога достоверности в среднем по группе), содержании клеток белой и краснойкрови и тромбоцитов, концентрации гемоглобина и, соответственно, расчетные показатели (табл. 2). Единственный показатель, который достоверно уменьшился за время эксперимента на 9% - гематокрит, что свидетельствует о накоплении жидкости в сосудистом русле и увеличении объема циркулирующей крови.

На этом фоне убедительно выглядело шестикратное уменьшение концентрации ANP в сыворотке крови после стресса (табл. 2). Определение концентрации ANP в миокарде предсердия показало, что при стрессе она уменьшается приблизительно в два раза (табл. 3).

Качественные и морфометрические исследования показали, что в условиях стресса изученные тканевые структуры претерпевали значительные изменения, отражающие нарушение водно-солевого баланса с выраженным интерстициальным отёком. Объем миоэндокринных клеток в отношении к интерстицию у экспериментальных животных уменьшился к концу эксперимента на 18% (таб. 3) за

счет резкого расширения соединительно-тканного межуточного пространства, что привело к уменьшению паренхиматозно-стромального отношения в миокарде почти вдвое.

Таблица 1. Физиологические параметры у крыс линий WAG и НИСАГ, M±m

Параметр	WAG – интактные	WAG –стресс	НИСАГ-интактные	НИСАГ – стресс
Артериальное давление, мм рт. ст.	114±2,7	144±3,5#	161±0,8*	200±7,1#+
Масса тела, г	334±22	392±8,5	295±9,5	382±9,5#
Масса сердца, мг	974±61	1110±24	1025±47	1333±74#+
Масса сердца/масса тела, мг/г	2,93±0,10	2,83±0,02	3,47±0,07*	3,5±0,21+

различия значимы при $p \leq 0,05$: * - с WAG интактными (межлинейные различия); # - по сравнению с однолинейными интактными (внутрилинейная реакция на стресс); + - значимость различий с группой WAG-стресс .

Таблица 2. Показатели крови у крыс линий WAG и НИСАГ, Me (min – max)

Параметр	WAG- интактные	WAG – стресс	НИСАГ-интактные	НИСАГ – стресс
Na, моль/л	140,8 (138,9 – 142,1)	142,6 (141,8 – 143,1)	141,5 (137,8 - 142,2)	145,0 (143,4 – 149,0) #
K, моль/л	5,95 (5,58 – 13,3)	5,7 (5,29 – 5,98)	6,95 (6,7 – 7,9)	5,07 (4,79 – 5,59) #
Лейкоциты, 10^3/мкл	3,45 (2,1 – 6,3)	5,65 (2,3 – 6,7)	4,7 (3,1 – 5,8)	3,7 (3,0 – 6,2) #
Эритроциты, 10^6/мкл	8,0 (7,4 – 9,1)	7,6 (6,9 – 7,9)	8,1 (7,1 – 8,4)	7,2 (6,8 – 7,8) #
Гемоглобин, г/100мл	13,9 (13,0 – 16,0)	13,7 (12,4 – 14,4)	14,1 (12,6 – 14,9)	13,1 (12,1 – 13,9)
Гематокрит, %	41,8 (38,5 – 49,3)	38,0 (35,6 – 40,5) #	42,6 (38,4 – 43,8)	39,4 (37,2 – 41,7)
Тромбоциты, 10^3/мкл	751 (336 – 935)	630 (591 – 677)	693 (414 – 825)	770 (568 – 876)
Концентрация ANP, нг/мл	1,53 (0,34 – 2,60)	0,24 (0,10 – 2,15)#	2,55 (1,11 – 4,30)*	0,42 (0,16 – 0,84)#

в скобках – число измерений, различия значимы при $p \leq 0,05$: * - с WAG интактными (межлинейные различия); # - по сравнению с однолинейными интактными (внутрилинейная реакция на стресс)

Таблица 3. Параметры миокарда правого предсердия у крыс линий WAG и НИСАГ, M±m

Параметр	WAG- интактные	WAG – стресс	НИСАГ-интактные	НИСАГ – стресс
Диаметр кардиомиоцитов, мкм	8,9±0,20 (100)	8,4±0,21 (100)	10,7±0,26* (100)	11,0±0,30 (100)
Относительный объем, %:	(60)	(60)	(60)	(60)
кардиомиоциты	82,2±0,55	68,7±0,77#	71,1±0,45*	65,3±0.58#
строма	17,8±0,55	31,3±0,77#	28,9±0,45*	34,7±0.58#
Суммарный просвет капилляров	5,1±0,19	6,9±0,20#	6,9±0,20*	6,0±0,18
Паренхима/строма	5,0±0,22	2,3±0,07#	2,5±0,05*	1,9±0,05#
Количество капилляров/0,1 мм^2	189±12,3	163±4,26	203±10,4	149±7,78#
Относительный объем органелл, %:	(60)	(60)	(59)	(60)
миофибриллы	54,7±0,47	50,4±0,44#	51,5±0,5*	49,2±0,47#
митохондрии	33,8±0,56	36,0±0,54#	34,4±0,42	32,8±0,60# +
гликоген	2,15±0,12	1,43±0,14#	1,17±0,12*	1,53±0,13#
комплекс Гольджи	0,82±0,10	1,22±0,15#	1,44±0,15*	1,48±0,12
секреторные гранулы	2,00±0,16	4,17±0,32#	5,95±0,49*	9,30±0,72#+
остаточные тельца	0,08±0,04	0,48±0,09#	0,22±0,06	0,82±0,12#+
другие органоиды	6,28±0,23	6,37±0,22	5,34±0,17*	4,8±0,17#+
Диаметр гранул всех типов, нм:	249±3,9 (333)	324±5,1# (291)	292±4,8* (341)	386±6,6# + (290)
зрелые	291±4,8 (160)	374±4,0# (181)	364±4,2* (161)	446±4,7 # + (196)
растворяющиеся	228±5,3 (110)	281±5,8# (66)	250±4,3* (129)	308±11,2# + (52)
формирующиеся	178±4,1 (63)	181±5,0 (44)	170±3,6 (51)	204±5,8# + (42)
Количество гранул на 1000 мкм^2	183±11 (60)	348±17# (60)	402±25* (59)	494±35# + (60)
Концентрация ANP, нг/мг (Me, min – max)	1062 (793 – 1493)	510 (272 – 942)#	940 (766 – 1273)	588 (529 – 645)#

в скобках – число морфометирческих измерений; различия значимы при $p \leq 0,05$: * - сравнение с интактнымикрысами WAG (межлинейные различия); # - по сравнению с однолинейными интактными (внутрилинейная реакция на стресс); + - значимость различий с группой WAG-стресс .

Отёк интерстиция как бы «отодвинул» капилляры друг от друга, что привело к снижению их плотности на 14%. При этом просветы капилляров расширились на 35%, удельная площадь просвета единичного капилляра (0,042%) увеличилась на 60%, по сравнению с нестрессированными животными (рис. 1).

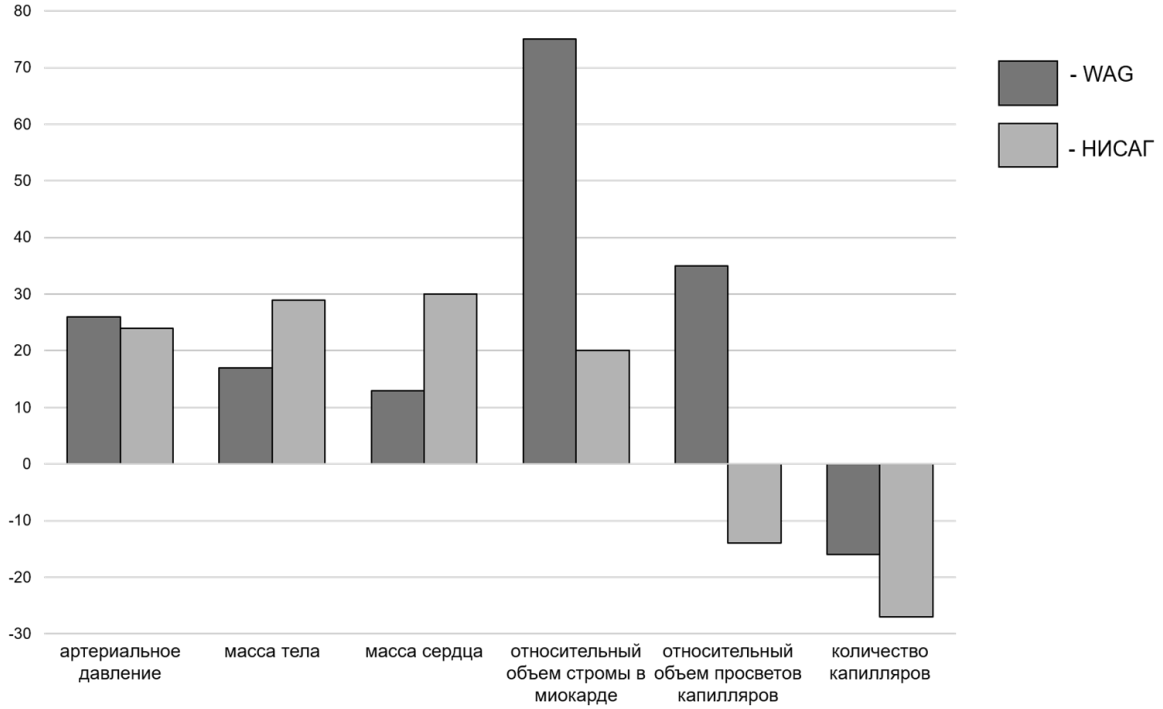

Рисунок 1. Изменения параметров (%) миокарда у крыс линий WAG и НИСАГ при стрессе (0 – базовый дострессовый уровень).

Под действием стресса у крыс линии WAG наблюдались значительные изменения в морфологии органелл миоэндокринных клеток. Например, митохондрии в условиях эксперимента набухали, матрикс их просветлялся, в нем повсеместно обнаруживались электронно-плотные отложения фосфатов кальция (рис. 3). Объемное отношение митохондрий к миофибриллам в указанных условиях увеличивалось с 0,62 до 0,71, но это не свидетельствует об улучшении энергообеспеченности сократительных структур. Так выглядит классический признак кальциевой перегрузки органоидов и нарушения его обмена в клетках.

Суммарный объем пластинчатых комплексов и секреторных гранул в миоэндокринных клетках – важная характеристика эндокринной активности. Секреторные структуры при стрессе у крыс WAG претерпевали выраженные изменения (рис. 3). Более чем двукратное увеличение относительного объема секреторных гранул объясняется почти двукратным увеличением их численной плотности при увеличении среднего диаметра каждой гранулы почти на треть. Если у интактных животных WAG фагосомы не занимали в саркоплазме и десятой доли процента, то после стресса число и размеры деградирующих гранул увеличивались многократно (объемная доля - до половины процента) (табл. 3).

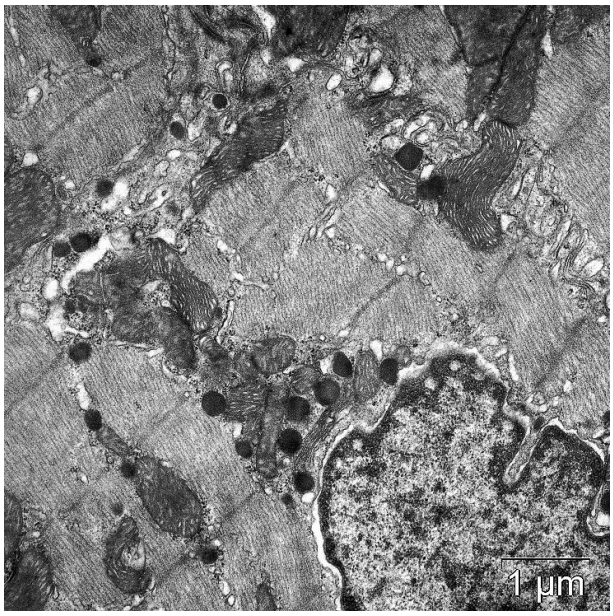

Рисунок 2. Миоэндокринные клетки правого предсердия у интактной крысы WAG. Электронограмма. Масштаб 1 мкм.

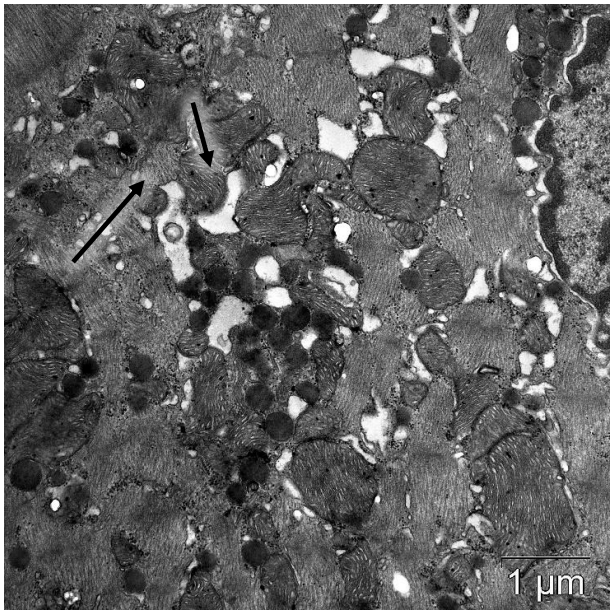

Рисунок 3. Накопление секреторных гранул, отложение фосфатов кальция в матриксе митохондрий (стрелки), в миоэндокринных клетках правого предсердия у крысы WAG при стрессе. Электронограмма. Масштаб 1 мкм

Количественный анализ пула секреторных гранул в миоэндокринных клетках у крыс WAG интактной и экспериментальной группы показал преобладание *зрелых* форм: 48% от всего пула у интактных животных и 60% у животных со стрессом. 33% составляли *растворяющиеся* формы гранул у интактных и 26% - у стрессированных. Меньше всего было *формирующихся* разновидностей: 19% и 14%. (рис. 4). Сравнивая эти показатели нельзя было не отметить, как менялся качественный состав гранул. После стресса снизились показатели растворяющихся и формирующихся форм и повысилось число зрелых. Диаметр гранул на фоне стресса увеличился во всех разновидностях: зрелые на 22%, растворяющиеся на 19%, формирующиеся на 2% (таб. 2).

Сравнение изученных показателей интактных (контрольных) крыс линии WAG и интактных крыс линии НИСАГ. Крысы линии НИСАГ, не принимавшие участие в эксперименте отличались от интактных (контрольных) WAG высокими (на 40%) показателями АД в покое и достоверно большей средней относительной массой сердца (на 18%) (табл. 1).

При анализе показателей крови (табл. 2) выяснилось, что у интактных животных межлинейные различия в биохимических показателях отсутствовали почти по всем изученным параметрам.

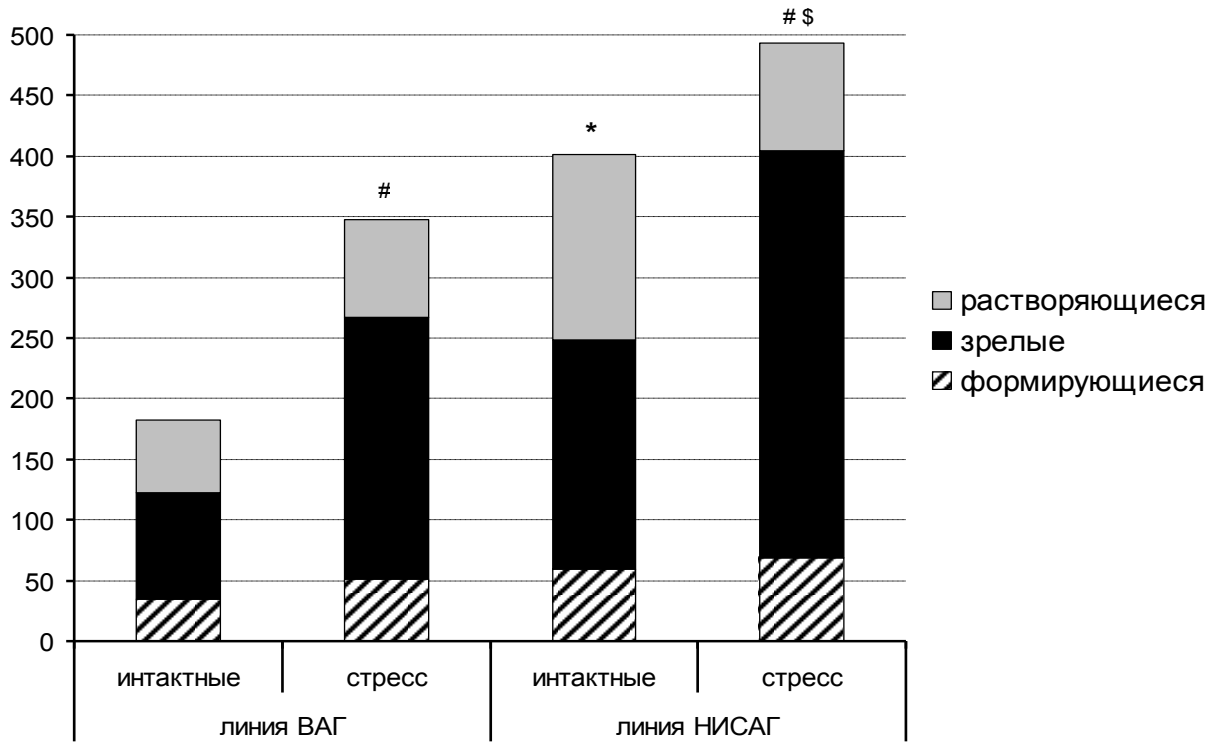

Рисунок 4. Численная плотность (на 1000 мкм^2) и состав секреторных гранул в миоэндокринных клетках правого предсердия у крыс линий WAG и НИСАГ в эксперименте. Различия значимы при $p \leq 0,05$: * - с WAG интактными (межлинейные различия); # - по сравнению с однолинейными интактными (внутрилинейная реакция на стресс); + - значимость различий с группой WAG- стресс.

Однако концентрация ANP в периферической крови, у крыс НИСАГ оказалась на 70% больше, чем у нормотензивного контроля (табл. 3). Не выявлено различий в уровне гормона в ткани миокарда обеих линий.

Результаты гистологического исследования и сравнение миокарда у интактных животных показали, что у гипертензивных крыс клетки миокарда в правом предсердии достоверно крупнее, их средний диаметр на 20% больше, чем у нормотензивного контроля.

У этих животных строма миокарда отечная, и морфометрия выявила, что паренхиматозно-стромальные отношения меньше в два раза по сравнению с аналогичным показателем у крыс линии WAG (табл. 3). В этих условиях кровоснабжение гипертрофированных миоэндокринных клеток у крыс НИСАГ обеспечено компенсаторным расширением капиллярного русла. Расчеты показывают, что относительная площадь просвета единичного капилляра у крыс НИСАГ в 1,6 раза больше, чем у крыс WAG (0,042% и 0,026%, соответственно).

Исследование на ультраструктурном уровне показало, что у интактных крыс НИСАГ секреторные органеллы занимали в саркоплазме миоэндокринных клеток достоверно большие относительные объемы, (рис. 3, 5): комплексы Гольджи – в 1,75 раза, гранулы и фагосомы – почти в 3 раза, их средний диаметр увеличился на

20%, то есть эти структуры значительно крупнее, чем у интактных крыс WAG. (табл. 3). Следует отметить, что у крыс НИСАГ электронно-микроскопическая морфология гранул более разнообразная, чем у контрольных животных. Чаще встречаются атипичные структуры, отражающие разные пути и/или стадии внутриклеточной деградации накопленного секреторного продукта. Около 2,5% составляют структуры, условно названные «рудиментарными» (остаточные тельца, напоминающие фагосомы) (рис. 6).

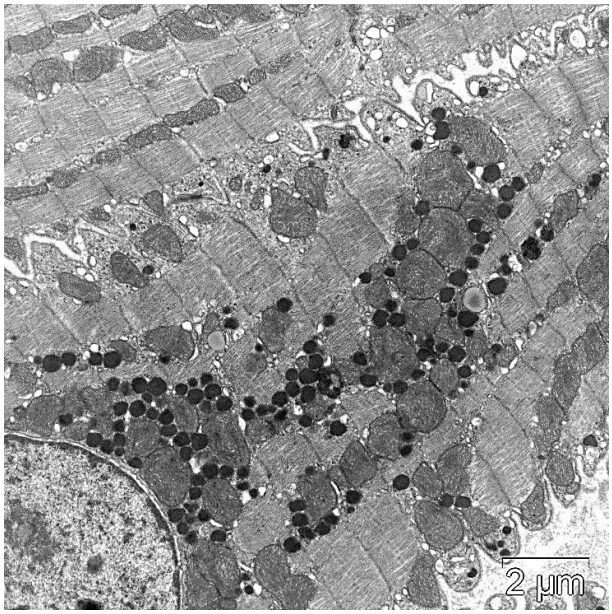

Рисунок 5. Гипертрофированная миоэндокринная клетка правого предсердия крысы НИСАГ с многочисленными секреторными гранулами. Электронограмма. Масштаб 2 мкм.

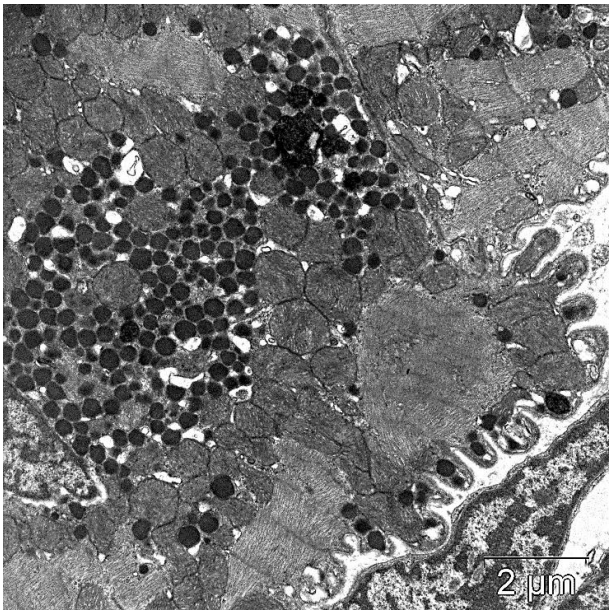

Рисунок 6. Накопление многочисленных крупных секреторных гранул в миоэндокринной клетке правого предсердия у крысы НИСАГ при стрессе. Электронограмма. Масштаб 2 мкм.

Несмотря на то, что численная плотность секреторных гранул в миоэндокринных клетках правого предсердия в покое у крыс НИСАГ в два раза больше, чем у крыс WAG (таб. 3), состав гранул по соотношению разных типов оказался сопоставимым. У животных обеих изученных линий в клетках преобладают зрелые формы (47 и 48%), более трети (33 и 38%) составляют растворяющиеся и меньше всего (15 и 19%) формирующихся разновидностей гранул (таб. 3).

Сравнение изученных показателей интактных крыс линии НИСАГ и в эксперименте. После 4-дневного иммобилизационного стресса, у крыс НИСАГ в эксперименте зафиксировано достоверное повышение АД по сравнению с интактными. Средний показатель по группе поднялся до 200 мм рт. ст., а у отдельных особей - до 210 и даже 220 мм рт. ст. (табл. 1). Разница с интактными составила 24%. Показатели массы тела и сердца достоверно увеличились на 30%,

но относительная масса сердца не изменилась, и межлинейные различия сохранились (табл. 1, рис. 1).

У крыс НИСАГ в эксперименте достоверно повышалась концентрация ионов натрия и значительно (на 21%) уменьшалась концентрация калия в сыворотке крови, на 11 и 12% уменьшалось содержание клеток красной и белой крови (табл. 2).

Содержание ANP в сыворотке крови в условиях стресса так же, как и у крыс WAG в эксперименте снижалось приблизительно в 6 раз. Параллельно почти на 40% снижалась концентрация ANP в миокарде (табл. 3).

Гистологическое исследование миокарда ушка правого предсердия при стрессе показало менее выраженные изменения у крыс НИСАГ, чем у нормотензивных животных (см. выше) – удельный объем стромы увеличился на 17% и паренхиматозно-стромальное отношение снизилось на 31% в сравнении с интактными крысами НИСАГ.

У крыс НИСАГ после стресса плотность капилляров в ткани уменьшилась на треть (36%), а суммарный относительный объем их просветов и удельная площадь просвета единичного капилляра (0,040%) при этом не изменились.

Ультраструктурные изменения были умеренными: объем комплексов Гольджи не менялся, численная плотность гранул возрастала всего на четверть при увеличении их среднего диаметра на треть (табл. 3). При этом на фоне накопления гранул в саркоплазме и увеличения их размеров происходило перераспределение их состава в пользу зрелых форм за счет уменьшения растворяющихся (20%). В условиях стресса зрелые формы гранул составляли почти 70% всего гранулярного пула (рис. 4).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ.

В работе интактные крысы линии НИСАГ рассматривались как модель адаптации к эмоциональному стрессу в его стадии резистентности. Из исследований многих авторов, основанных на гиперчувствительной особенности этих животных (Якобсон и др., 2000; Шмерлинг и др., 2005; Бузуева и др., 2011), известно о повышенном гормональном статусе и структурных перестройках органов симпатоадреналовой и адренокортикальной систем. Повышенная секреторная активность кардиомиоцитов также свидетельствует об ответной реакции (которая обусловлена генетически закрепленной гиперчувствительностью) и является следствием адаптации к постоянному эмоциональному стрессу с последующим формированием системного структурного ответа.

Реакция со стороны натрийуретических пептидов на стресс по всем изученным показателям у крыс обеих линий оказалась однонаправленной. Повышение АД послужило доказательным признаком ожидаемого эффекта. Исследованные тканевые структуры претерпевали умеренно выраженные изменения и, как показал сравнительный анализ, разница между интактными и экспериментальными группами

крыс была существенной у животных линии WAG (табл. 3, рис. 1). Стресс не оказал влияния на размеры клеток обеих линий (гипертрофия), но паренхиматозно-стромальные отношения резко уменьшились за счет отёка стромы. Объемная доля просветов капилляров при этом, существенно увеличилась у крыс WAG. Более выраженное расширение сосудистого русла при стрессе говорит о бОльших, ещё не задействованных, компенсаторных возможностях миокарда у крыс WAG, что обеспечивает лучшее питание мышечных клеток в неблагоприятных условиях. Напротив, у стрессированных крыс линии НИСАГ кровенаполнение сосудов осталось прежним, хотя изначально (у НИСАГ в покое) отличалось в большую сторону от интактных крыс WAG. Следовательно, при повышенной функциональной нагрузке в условиях стресса питание миокарда правого предсердия у крыс НИСАГ ухудшилось и по сравнению с покоем (рис. 1).

У крыс НИСАГ изначально были отмечены типичные для гипертонической болезни связанные с наследственной повышенной стресс-чувствительностью *хронические* изменения - увеличение абсолютной и относительной массы сердца, гипертрофия миокарда, увеличение диаметра кардиомиоцитов и их ультраструктурная перестройка. Поэтому реакция на стресс со стороны основных клеточных органоидов (миофибриллы, митохондрии и т.д.) и секреторных структур (комплекс Гольджи, секреторные гранулы) миоэндокринных клеток была выражена значительно слабее чем у крыс WAG.

Подробный анализ качественного и количественного состава гранул отображает объем секреторного депо как баланс между синтезом и секрецией и позволяет в условиях выбранного метода (ультраскопическое исследование) определить стадии секреторного процесса в клетках на разных этапах эксперимента. Такой подход использовался многими отечественными и зарубежными исследователями (Mifune, 1991; Azizov, 2003; Крылова, 2007; Рахчеева, Бугрова, 2010) для оценки секреторных процессов в клетках различных тканей и у различных видов животных.

Незрелый пептид, в форме прогормона, синтезируется и накапливается в секреторных гранулах кардиомиоцитов (Vesely, 2006), в активную форму он превращается при выходе из клеток и затем попадает в кровь сосудов миокарда. В работе определялась концентрация уже *зрелого (активного)* ANP, который находится вне клеток миокарда в интерстиции.

В процесс искусственного отбора крыс по признаку стрессовой гиперактивности оказалась вовлечена и функция секреции ANP. Полученные данные показывают, что снижение концентрации ANP в периферической крови при стрессе отражает уменьшение его выделения из миокарда, а не усиленную деградацию и элиминацию плазменными пептидазами и рецепторами С-типа. Можно заключить, что в условиях субхронического иммобилизационного стресса выделение ANP из миоэндокринных клеток предсердий и попадание их в кровоток тормозится в большей степени, чем их синтез. В этих условиях ANP накапливается

в саркоплазме миоэндокринных клеток внутри многочисленных крупных секреторных гранул.

В изученном эксперименте крыс подвергали умеренному стрессирующему воздействию вызывающему у животных фазу тревоги, которая обеспечивает срочный этап адаптации на основе готовых, ранее сформировавшихся физиологических механизмов. Стадия тревоги развивается до формирования системного следа в виде структурных перестроек, обеспечивающих долговременную адаптацию (Меерсон, Пшенникова, 1988). Нельзя исключить возможности, что при прекращении действия умеренного и кратковременного стресса, накопленные запасы пептидных гормонов будут быстро выделяться в кровь и, являясь частью прессорных систем, будут способствовать восстановлению исходного статуса системы без включения генома клеток и формирования долговременных структурных перестроек.

Таким образом, по сравнению с контрольными крысами линии WAG, у крыс линии НИСАГ (с наследственной повышенной чувствительностью к стрессу) в гипертрофированных миоэндокринных клетках предсердия синтез, накопление и секреция гормонов в покое пропорционально усилены, что обеспечивает повышенное содержание гормона в периферической крови. Это хорошо согласуется с концепцией «гормонального парадокса», который описан у животных с гипертензией разного генеза и у больных с сердечно-сосудистыми заболеваниями (Langenickeletal, 2000; Vesely, 2001; Soualmiaetal, 2009).

ВЫВОДЫ

1. Непродолжительный иммобилизационный стресс у крыс нормотензивной линии WAG при повышении АД вызывает в миоэндокринных клетках двукратное повышение численности секреторных гранул при увеличении их среднего диаметра почти на треть, значительная часть гранул подвергается внутриклеточной деградации. Изменение качественного и количественного состава секреторных гранул свидетельствует о торможении выделения и сохранении синтеза ANP при стрессе, что подтверждается снижением концентрация ANP в крови в 6 раз.

2. Интактные крысы линии НИСАГ характеризуются стойкой гипертензией, достоверно большей средней относительной массой сердца (на 18%) и гипертрофией предсердных миоцитов (диаметр увеличен на 20%). В миоэндокринных клетках наряду с увеличением синтеза, также усилена и секреция ANP, на что указывают увеличение: плотности и размера секреторных гранул, число растворяющихся гранул, а также повышенная концентрация ANP в сыворотке.

3. В условиях стресса у крыс обеих линий изученные параметры претерпевали однонаправленные изменения: повышалось АД, увеличивалась масса тела из-за гиперволемии и относительная масса сердца за счет повышенной обводненности миокарда, накапливались крупные зрелые секреторные гранулы в саркоплазме

миоэндокринных клеток, наблюдались отёк интерстиция в миокарде и однотипные сдвиги показателей периферической крови.

4. У крыс НИСАГ на фоне свойственных данной линии структурных изменений в сердце реакция на стресс со стороны изученных параметров выражена слабее, чем у нормотензивных животных. При более высокой концентрации ANP в крови и в миоэндокринных клетках предсердия лабильность этой системы была слабее, чем у нормотензивных животных.

5. ANP как молекулы, которые традиционно считаются регуляторами водно-солевого обмена, также участвуют в развитии стрессзависимой наследственной гипертензии и реализации стресс-реакций, сопровождающихся подъемом артериального давления.

СПИСОК ОСНОВНЫХ РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Тезисы конференций:

1. **Руденко Н.С.** Изменение ультраструктуры предсердных миоцитов при снижении артериального давления у гипертензивных крыс/ **Н.С. Руденко**// IV Конференция молодых ученых и студентов. Экспериментальная и прикладная физиология. Сборник трудов. М.: НИИ нормальной физиологии им. П.К.Анохина РАМН. – М.: Изд.-во «Перо». - 2013. – С. 34-35.

2. **Руденко Н.С.** Миоэндокринные клетки сердца и их роль в развитии гипертонии / **Н.С. Руденко**, И.М. Коростышевская, В.Ф. Максимов // Тезисы докладов X Всероссийского конгресса «Артериальная гипертония как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний». - Москва. -2014. – С. 59.

3. **Руденко Н.С.** Структурные изменения правого предсердия у гипертензивных крыс после лечения лозартаном / **Н.С. Руденко**, В.Ф. Максимов, И.М. Коростышевская // Основные проблемы в современной медицине. Сборник научных трудов по итогам международной научно-практической конференции (7 октября 2014 г). - Волгоград. - 2014. - С. 54 - 56.

4. **Руденко Н.С.** Особенности внутриклеточного синтеза, накопление и выделение сердечных натрийуретических пептидов у гипертензивных крыс / **Н.С. Руденко** // Материалы 2-го международного образовательного форума «Российские дни сердца». - Санкт-Петербург. - 2014г. - С. 178.

Статьи в журналах:

1. Максимов В.Ф. Угнетение секреторной активности предсердных миоцитов после лечения лозартаном гипертензивных крыс / В.Ф. Максимов, И.М. Коростышевская, А.Л. Маркель, Г.С. Якобсон, **Н.С. Руденко** // Бюл. экспер. биол. мед. - 2014. – Т. 158. - № 9. – С. 279 – 281.

Maksimov V.F. Inhibition of secretory activity of atrial myocytes in hypertensive rats after losartan treatment / V.F. Maksimov, I.M. Korostyshevskaya, A.L. Markel, G.S.

Jakobson, **N.S. Rudenko** // Bulletin of Experimental Biology and Medicine. - 2015. - Vol. 158 – № 3. – P. 301-303. - DOI 10.1007/s10517-015-2746-7

2. Максимов В.Ф. Изменения миоэндокринных клеток правого предсердия при гипертензии и после снижения артериального давления в эксперименте / В.Ф. Максимов, И.М. Коростышевская, С.А. Курганов, А.Л. Маркель, **Н.С. Руденко,** Г.С. Якобсон // Цитология. - 2014. - Т. 56. - № 10. – С. 725 – 734.

Maksimov V.F. Changes in myoendocrine cells in rat right atrium at hypertension and during pharmacological lowering of blood pressure / V.F. Maksimov, I.M. Korostyshevskaya, S.A. Kurganov, A.L. Markel, **N.S. Rudenko**, G.S. Jakobson // Cell and Tissue Biology. - 2015. - Vol. 9. - № 1. - P. 30-39. DOI: 10.1134/S1990519X1501006X

3. Коростышевская И.М. Натрийуретический пептид С-типа: что это, где и зачем? / И.М. Коростышевская, В.Ф. Максимов, **Н.С. Руденко** // Рос. физиол. ж. им. И.М Сеченова. - 2015. - Т. 101. - №5. - С. 515-524.

Korostyshevskaya I.M. C-type natriuretic peptide: what, where and why? / I.M. Korostyshevskaya, V.F. Maksimov, **N.S. Rudenko** // Neuroscience and Behavioral Physiology. - 2016. - Т. 46. - № 8. - С. 888-894. DOI 10.1007/s11055-016-0328-4

4. Максимов В.Ф. Секреторная активность предсердных кардиомиоцитов у нормотензивных и гипертензивных крыс при стрессе / В.Ф. Максимов, И.М. Коростышевская, **Н.С. Руденко**, А.Л. Маркель // Рос. физиол. ж. им. И.М. Сеченова. - 2016. - Т. 102. - № 2. - С. 154-166.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД – артериальное давление

АКТГ- аденокортикотропный гормон

ANP – атриальный натрийуретический пептид

WAG – Wistar Albino Glaxo – линия крыс

ГГАС - гипоталямо-гипофизарно-адреналовая система

НИСАГ – наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертензия – линия крыс

РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система

САС - симпато-адреналовая система

ХЭС – хронический эмоциональный стресс