

УДК 615.127:616.8-008.615:615.365:599.323

МОРФОЛОГИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА КАРДИОМИОГЕНЕЗА КРЫС В УСЛОВИЯХ ХРОНИЧЕСКОГО СТРЕССА И ВОЗДЕЙСТВИЯ ВИТАМИНА А

Шурыгин С.А., Ямщиков Н.В., Балашов В.П., Абрамов В.Н., Шурыгина О.В.

ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет

Минздравсоцразвития России», Самара;

ФГБОУ ВПО «Мордовский государственный университет

им. Н.П. Огарева», Саранск, e-mail: sa-shur@yandex.ru

Одним из ведущих направлений современных фундаментальных исследований является изучение гистофизиологии тканей и органов. Изучение гистогенеза миокарда и его адаптивных свойств при действии на зародыш различных повреждающих факторов является актуальной проблемой современной морфологии. В настоящее время особенно актуально изучение влияния на эмбриогенез фармакологических агентов, а также сочетанного воздействия факторов. Проведено комплексное гистологическое исследование кардиомиогенеза млекопитающих. Установлено, что в эмбриональном периоде хронический стресс вызывает комплекс реактивно-дистрофических изменений в миокарде. Изменения происходят прежде всего в мембранных органоидах, нарушается организация миофибриллярного аппарата. Применение витамина А не вызывает усиления дистрофических процессов. В ответ на введение витамина А на фоне хронического стресса развиваются репаративные внутриклеточные процессы в кардиомиоцитах.

Ключевые слова: миокард, витамин А, стресс, крыса.

MORPHOLOGICAL CHARACTERISTIC OF CARDIOMYOGENESIS IN THE CONDITIONS OF THE CHRONIC STRESS AND THE VITAMIN A ACTION

Shurygin S.A., Yamschikov N.V., Balashov V.P., Abramov V.N., Shurygina O.V.

Samara State Medical University, Samara;

Ogarev Mordovia State University, e-mail: sa-shur@yandex.ru

The study of histophysiology of tissues and organs is the actual part of contemporary bases researches. The studying of myocardium hystogenesis and its adaptability is an actual problem of modern histology. Now the studying affect of pharmacologic drug and combined affect of factors is very actual. Complex histology research was carry out. The chronic stress induce the complex of responsive-dystrophic transformations of myocardium in the embryonic period. The ultrastructural organization of membranous organoids is disorder, the apparatus of muscular fibrils is disorder too. Vitamin A don't induce of increase dystrophic process. The reparative intracellular processes progress in the cardiomyocytes in the vitamin A affect.

Keywords: myocardium, vitamin A, stress, rat

Год от года смертность от сердечно-сосудистых заболеваний не снижается и занимает ведущие позиции в медицинской статистике во всем мире. Причем 62% смертности от сердечно-сосудистых заболеваний приходится именно на патологию, связанную с утратой части работоспособного миокарда (ишемия, инфаркт и др.), что приводит к нарушению основной функции сердца – нагнетательной.

В настоящее время изучение закономерностей процессов гистогенеза, морфологических основ функционирования и репаративного, и регенеративного потенциала сердечной мышечной ткани считается одной из основных проблем, имеющих как фундаментальные, так и прикладные аспекты. В связи с этим неудивительно сохранение устойчивого интереса исследователей к морфологическим изменениям кардиомиоцитов, возникающим при различных патологических процессах, нарушениях в ходе эмбриогенеза и действии различных физиологических и фармакологических факторов.

Цель настоящей работы – изучение морфологических изменений миокарда при экспериментальной патологии (синдром хронического стресса) и условиях введения витамина А.

Материал и методы исследования

В качестве объекта исследования были использованы белые беспородные крысы различных сроков эмбрионального и постнатального развития в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных». Крыс с датированным сроком беременности получали по стандартной методике (Методы биологии развития, 1977). Первым днем беременности животных считали день обнаружения сперматозоидов во влагалищных мазках. Животные были разделены на несколько групп: 1 – интактные крысы (контроль); 2 – животные, подвергнутые хронической иммобилизации; 3 – животные, подвергнутые хронической иммобилизации и получавшие витамин А в дозе 10000 МЕ ежедневно с первого дня беременности; 4 – животные, получавшие витамин А в дозе 10000 МЕ ежедневно с первого дня беременности. Иммобилизационный стресс воспроизводили ежедневным помещением животных в тесные пеналы, ограничивающие подвижность

животных. Длительность иммобилизации составляла 6 часов (25%) в течение 30 дней.

Для проведения светового исследования использовали фиксацию материала в 10% нейтральном формалине на фосфатном буфере (рН 7,4), заливку в парафин.

Для электронной микроскопии использовали префиксацию в 2,5% глутаральдегиде на 0,2 М какодилатном буфере (рН 7,4), фиксацию в 1% OsO₄ и заливали в аралдит. Для обеспечения прицельного электронно-микроскопического анализа получали серийные полутонкие срезы толщиной 1–2 мкм, которые окрашивали 1% раствором метиленового синего. Прицельные ультратонкие срезы толщиной 200–500 нм просматривали в электронном микроскопе Hitachi-HU-12. (Авторы приносят благодарность члену-корреспонденту РАМН, профессору Банину В.В. за помощь в проведении электронно-микроскопического исследования).

Результаты исследования и их обсуждение

Витамин А – вещество, являющееся компонентом пищи и очень широко используемое как БАД. Его активное применение началось с выявления биологической активности в начале 1900-х годов. В то же время витамин А является уникальным среди витаминов из-за очень узкого интервала

концентраций, при которых не проявляется ни его дефицит, ни его токсичность (малая широта терапевтического действия). Поэтому введением витамина А можно вызвать тератогенный эффект, приводящий к значительным изменениям органогенеза

Ретиноевая кислота является самым активным производным витамина А. Она участвует в регуляции эмбрионального развития, тканевого гомеостаза и клеточной дифференцировки и пролиферации.

Ультраструктурные перестройки дифференцирующихся кардиомиоцитов 18-дневных эмбрионов, по нашим данным, вероятно, вызываются действием витамина А на клеточные мембраны – плазмолемму, мембраны митохондрий. Мы отмечали митохондрии с повреждением крист разной степени, а также частично или полностью разрушенные органеллы. Наблюдавшиеся также участки повреждения плазмолеммы, вероятно, явились причиной развития внутриклеточного отека, что, как мы считаем, вызвало деструкцию и других органелл. Значительные повреждения оболочки клетки, по-видимому, явились следствием возникновения и интерстициального отека (рис. 1).

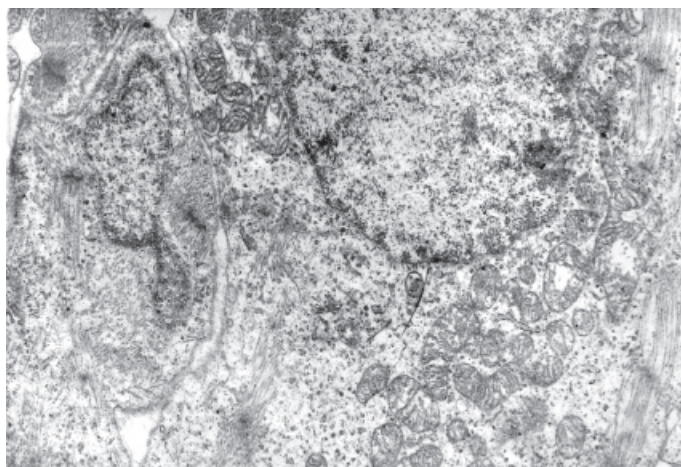


Рис. 1. Электронная микрофотография. Эмбрион крысы. 18 суток.

Предсердие. Витамин А. Фрагмент кардиомиоцита:

Я – ядро, Мх – митохондрии, Мф – миофибриллы, КГ – комплекс Гольджи. Ув. 10000

В рассматриваемый период наблюдались нарушения структуры кардиомиоцитов и в предсердиях, и в желудочках. Однако, на наш взгляд, их степень была выше в желудочках. Хотя зависимости между развитием органелл, в том числе и сократительного аппарата, мы не обнаружили. Стоит отметить и мозаичность повреждений. Так, встречались клетки с типичным строением и с повреждениями разной степени, соединенные через вставочный диск.

Действие витамина А в этом периоде развития, по нашим данным, не приводило

к усилению процессов апоптоза. Возможно, это связано с описанным в литературе антиапоптозным влиянием метаболита витамина А – ретиноевой кислоты. Так, выключение экспрессии рецепторов ретиноевой кислоты RAR и RXR вызывает апоптоз кардиомиоцитов в нормальных условиях.

У новорожденных крысят, наряду с реактивными изменениями, преобладавшими в кардиомиоцитах 18-дневных эмбрионов, наблюдали и дегенеративные нарушения ультраструктуры. Углублялись перестройки

ядер. В них появлялись глубокие инвагинации ядерной оболочки, вплоть до образования сегментов, фрагментировалась ядерная оболочка, увеличивалась электронная плотность кариоплазмы. Ядра принимали пикнотический вид. Становились более выраженными и повреждения структур ци-

топлазмы. Чаще встречались клетки с обширными зонами внутриклеточного отека. Повреждение и разрушение митохондрий вынуждало клетки использовать анаэробные пути получения энергии, о чем свидетельствует уменьшение количества гранул гликогена в цитоплазме (рис. 2).

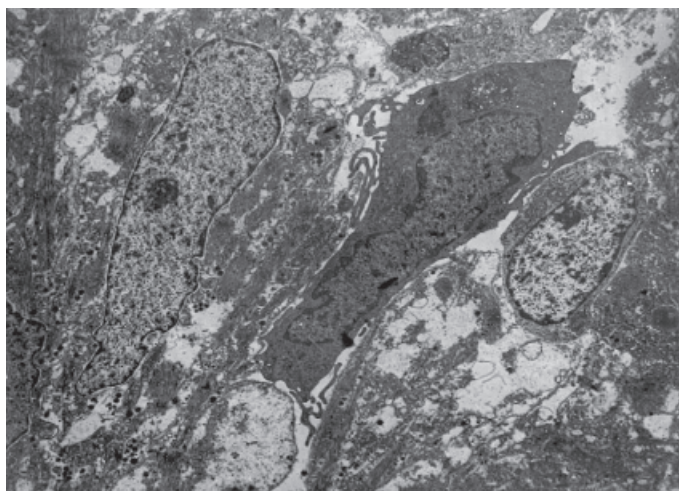


Рис. 2. Электронная микрофотография. Новорожденная крыса. Предсердие. Витамин А. Группа клеток с цитоплазмой разной электронной плотности. «Светлые» кардиомиоциты имеют многочисленные участки отека и лизиса в цитоплазме. Ув. 7000

De Oliveira и др. (2012) показали, что после введения крысам высоких доз витамина А, митохондрии *in vitro* были менее устойчивы к действию повреждающих факторов [1]. В то же время введение беременным крысам низких доз ретиноевой кислоты приводит к постнатальному уменьшению активности ферментов митохондрий в мозжечке [6].

Развитие и накопление органелл давало клетке больше возможностей для внутриклеточной регенерации. В кардиомиоцитах новорожденных мы наблюдали скопление лизосом в участках, где наблюдалось разрушение органелл. Усиление темпов миофибриллогенеза выявляло влияние витамина А и на этот процесс. Данные литературы свидетельствуют, что ретиноевая кислота положительно влияет на образование миофибрилл. В опытах Rohrer и др. (1991) ретиноевая кислота усиливала экспрессию матричной РНК тяжелых цепей миозина и альфа актинина в миоцитах новорожденной крысы в культуре [5]. A Vélez с сотр. (2003) установили, что ретиноевая кислота увеличивала уровни альфа – тропомиозина и тропонина – Т в кардиомиоцитах куриных эмбрионов на разных стадиях развития [7]. По нашим данным, с ростом миофибрилл становились более заметны и повреждения их структуры. Однако, учитывая стимулирующее действие ретиноевой кислоты на

синтез миофибриллярных белков, наблюдаемое повреждение миофибрилл скорее вторично и, вероятнее всего, связано с деструктивным действием внутриклеточного отека.

Изучение электронно-микроскопического строения миокарда на ранних постнатальных этапах развития показало постепенное уменьшение количества деструктивно измененных кардиомиоцитов и степени их поврежденности. В течение первой недели после рождения наблюдались главным образом реактивные изменения ультраструктуры, тогда как повреждения деструктивного характера почти отсутствовали (рис. 3).

Возможно это объясняется увеличением устойчивости к повреждающему действию витамина А у более дифференцированных кардиомиоцитов. Также можно предположить, что увеличение количества клеток, как мышечных, так и соединительнотканых, приводит к увеличению потребности миокарда в ретиноидах и, соответственно, снижению количества витамина А, воздействующего на одну клетку.

По нашим наблюдениям, в этом возрасте продолжает развиваться интерстициальный компонент миокарда – растут сосуды, увеличивается количество соединительнотканых клеток. Наши результаты свидетельствуют, что кардиомиоциты, по крайней мере, не поврежденные или мало поврежденные, сохраняют способность

к эндомитозу. Более того, ретиноевая кислота в малых физиологических дозах способствует возникновению гипертрофии кардиомиоцитов [2]. Увеличение количества ДНК

в клетке приведет к увеличению количества рецепторов витамина А в клетке и, соответственно, к увеличению потребности клетки в витамине А.

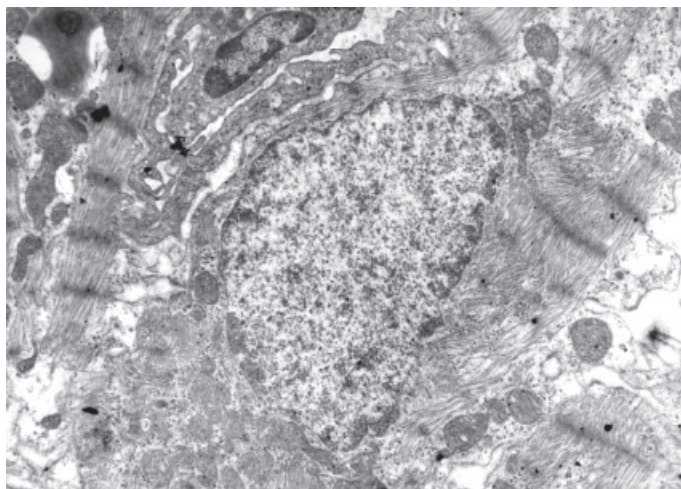


Рис. 3. Электронная микрофотография. Крыса 3 суток после рождения. Предсердие. Витамин А. Кардиомиоциты имеют зоны отека и повреждения органелл. Капилляр в интерстиции спазмирован. Ув. 7000

С возрастом, по нашим данным, происходит дальнейшее ослабление ультраструктурных проявлений действия витамина А. Так, у одномесячного крысенка уже практически не встречаются разрушающиеся клетки, а наблюдаемые изменения строения носят характер адаптивно-реактивных.

Несколько неожиданными оказались результаты, полученные при введении витамина А на фоне стресса. Данные, полученные в первой части работы, свидетельствуют о деструктивном влиянии витамина А на структуру кардиомиоцитов. Многочисленные литературные данные о влиянии стресса разного генеза на миокард также говорят о его повреждающем эффекте. Казалось бы, следует ожидать, что наложение двух повреждающих факторов приведет к суммации их воздействия на кардиомиоциты. Однако мы наблюдали незначительное увеличение как степени повреждений, так и количества поврежденных клеток. Вероятно, это обусловлено тем, что стресс вызывает у крыс уменьшение количества витамина А в печени, почках и яичках. В физиологических дозах витамин А оказывает защитное действие при стрессах, а его недостаток усиливает повреждения, вызванные окислительным стрессом и запускает программу уничтожения клетки [3, 4]. Однако, цитопротекторное влияние витамина А не смогло полностью компенсировать деструктивное влияние стресса. Об этом свидетельствуют

наблюдавшиеся нами отек и участки лизиса компонентов цитоплазмы кардиомиоцитов. Следует отметить тот факт, что митохондрии в таких клетках не имели поврежденной структуры. Это, по-видимому, также объясняется положительным влиянием витамина А. О не полном компенсировании действия стресса свидетельствуют и повреждения компонентов интерстиция, в частности капилляров, а также наблюдавшаяся нами склеротизация интерстиция в предсердиях.

Заключение

В целом, действие витамина А на кардиомиогенез характеризуется комплексом реактивных морфологических изменений, которые характеризуются интенсивностью их нарастания вплоть до рождения и последующим ослаблением в постнатальный период. Наиболее выраженным влиянием витамин А обладает на желудочковые кардиомиоциты. Введение витамина А на фоне стресса частично купирует его деструктивное влияние, защищая митохондрии, а также оказывая антиапоптозный эффект.

Список литературы

1. De Oliveira M.R., Da Rocha R.F., Pasquali M.A., Moreira J.C. The effects of vitamin A supplementation for 3 months on adult rat nigrostriatal axis: increased monoamine oxidase enzyme activity, mitochondrial redox dysfunction, increased β -amyloid(1-40) peptide and TNF- α contents, and susceptibility of mitochondria to an in vitro H₂O₂ challenge // Brain Res Bull. 2012 Mar. 10; 87(4-5):432-44. Epub 2012 Jan. 18.

2. De Paiva S.A., Zornoff L.A., Okoshi M.P., Okoshi K., Matsubara L.S., Matsubara B.B., Cicogna A.C., Campana A.O. Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003 Jun.; 284(6):H2242-6. Epub 2003 Feb. 6.

3. Korichneva I., Waka J., Hammerling U. Regulation of the cardiac mitochondrial membrane potential by retinoids // *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 May; 305(2): 426–33. Epub 2003 Jan. 24.

4. Morita A., Nakano K. Effect of chronic immobilization stress on tissue distribution of vitamin A in rats fed a diet with adequate vitamin A. // *J Nutr.* 1982 Apr; 112(4):789–95.

5. Rohrer D.K., Hartong R., Dillmann W.H. Influence of thyroid hormone and retinoic acid on slow sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and myosin heavy chain alpha gene expression in cardiac myocytes. Delineation of cis-active DNA elements that confer responsiveness to thyroid hormone but not to retinoic acid // *J Biol Chem.* 1991 May 5; 266(13):8638–46.

6. Signorile A., Sardaro N., De Rasmio D., Scacco S., Papa F., Borracci P., Carratù M.R., Papa S. Rat embryo exposure to all-trans retinoic acid results in postnatal oxidative damage of respiratory complex I in the cerebellum // *Mol Pharmacol.* 2011 Oct.; 80(4):704–13. Epub 2011 Jul. 13.

7. Vélez C., Aránega A.E., Marchal J.A., Prados J., Melguizo C., Carrillo E., Boulaiz H., Madeddu R., Sánchez-Montesinos I., Aránega A. Contractile regulatory proteins tropomyosin and troponin-T as indicators of the modulatory role of retinoic acid // *Cells Tissues Organs.* 2003; 175(1):25–33.

References

1. De Oliveira M.R., Da Rocha R.F., Pasjauali M.A., Moreira J.C., The effects of vitamin A supplementation for 3 months on adult rat nigrostriatal axis: increased monoamine oxidase enzyme activity, mitochondrial redox dysfunction, increased β -amyloid(1-40) peptide and TNF- α contents, and susceptibility of mitochondria to an in vitro H₂O₂ challenge. *Brain Res Bull.* 2012 Mar. 10; 87(4–5), pp. 432–44. Epub 2012 Jan. 18.

2. De Paiva S.A., Zornoff L.A., Okoshi M.P., Okoshi K., Matsubara L.S., Matsubara B.B., Cicogna A.C., Campana A.O., Ventricular remodeling induced by retinoic acid supplementation in adult rats. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003 Jun.; 284(6), pp. H2242-6. Epub 2003 Feb. 6.

3. Korichneva I, Shhaka J, Hammerling U., Regulation of the cardiac mitochondrial membrane potential by retinoids. *J Pharmacol Exp Ther.* 2003 May; 305(2), pp. 426–33. Epub 2003 Jan 24.

4. Morita A, Nakano K., Effect of chronic immobilization stress on tissue distribution of vitamin A in rats fed a diet with adequate vitamin A. *J Nutr.* 1982 Apr; 112(4), pp. 789–95.

5. Rohrer D.K., Hartong R., Dillmann Shh.H., Influence of thyroid hormone and retinoic acid on slow sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ ATPase and myosin heavy chain alpha gene expression in cardiac myocytes. Delineation of cis-active DNA elements that confer responsiveness to thyroid hormone but not to retinoic acid. *J Biol Chem.* 1991 May 5; 266(13), pp. 8638–46.

6. Signorile A., Sardaro N., De Rasmio D., Scacco S., Papa F., Borracci P., Carratù M.R., Papa S. Rat embryo exposure to all-trans retinoic acid results in postnatal oxidative damage of respiratory complex I in the cerebellum, *Mol Pharmacol.* 2011 Oct; 80(4), pp. 704–13. Epub 2011 Jul 13.

7. Vélez C., Aránega A.E., Marchal J.A., Prados J., Melguizo C., Carrillo E., Boulaiz H., Madeddu R., Sánchez-Montesinos I., Aránega A., Contractile regulatory proteins tropomyosin and troponin-T as indicators of the modulatory role of retinoic acid. *Cells Tissues Organs.* 2003;175(1), pp. 25–33.

Рецензенты:

Суворова Г.Н., д.м.н., профессор, заведующая кафедрой анатомии человека, ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ, г. Самара;

Колсанов А.В., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой оперативной хирургии и клинической анатомии человека с курсом инновационных технологий, ГБОУ ВПО «Самарский государственный медицинский университет» Минздравсоцразвития РФ, г. Самара.

Работа поступила в редакцию 30.10.2013.