

ПЛОТНОСТЬ ТУЧНЫХ КЛЕТОК В МИОКАРДЕ И ПЕРИКАРДЕ КРЫС ПРИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ, ИНДУЦИРОВАННОЙ ИЗОПРОТЕРЕНОЛОМ

© И. Л. Ерохина,¹ С. В. Оковитый,² А. Н. Куликов,² А. А. Казаченко,² М. Г. Мартынова,¹ О. М. Мусеева,³ С. Н. Шуленин,² О. И. Емельянова¹

¹ Институт цитологии РАН, ² Военно-медицинская академия и

³ Научно-исследовательский институт кардиологии им. В. А. Алмазова, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: heartdev@mail.cytspb.rssi.ru

Мультифункциональные тучные клетки (ТК), локализованные в миокарде, активно реагируют на патологию сердечно-сосудистой системы. Мы определяли плотность ТК в перикарде по сравнению с миокардом в контроле и при экспериментальной сердечной недостаточности (СН) через 24 ч и 14, 28 и 60 сут после двух (с интервалом 24 ч) инъекций изопротеренола (ИП), индуцирующих некрозы в миокарде. Выраженность СН оценивали с помощью ультразвукового исследования сердца через 28 и 60 сут после введения ИП. ТК разной степени зрелости идентифицировали цитохимически на парафиновых срезах, окрашенных альциановым голубым и сафранином. В миокарде предсердия и желудочка плотность ТК как в норме, так и в опыте была относительно невысокой и колебалась от 4 до 6 кл./мм², при этом соотношение клеток разной степени зрелости в процессе развития СН достоверно не изменялось. В фиброзном слое перикарда плотность ТК была значительно выше, чем в миокарде, и в норме составляла 48.6 ± 13.0 кл./мм². Через 24 ч и 14 сут после инъекций ИП плотность ТК в перикарде по сравнению с нормой возрастала в среднем в 1.5 раза ($P < 0.05$) за счет увеличения плотности более дифференцированных клеток, окрашивающихся сафранином, без изменения плотности менее дифференцированных клеток, окрашивающихся альциановым голубым. Через 28 сут плотность ТК в перикарде была в 2 раза выше, чем в норме ($P < 0.01$), при этом значительно повышалась плотность клеток разной степени зрелости ($P < 0.05$). Через 60 сут плотность ТК и баланс альциан- и сафранин-положительных клеток не отличались достоверно от нормы. Динамика поведения популяции ТК перикарда соответствовала тяжести СН по функциональным показателям. Полученные данные указывают на активную реакцию ТК перикарда на дисфункцию миокарда: происходят стимуляция созревания резидентных ТК и пополнение популяции за счет миграции клеток извне, что предполагает усиление секреторной функции ТК.

Ключевые слова: тучные клетки, миокард, перикард, сердечная недостаточность, изопротеренон, крысы.

Гранулярные тучные клетки (ТК), запасющие и секретирующие широкий спектр биологически активных веществ, присутствуют почти во всех органах и участвуют в различных патологических процессах. В миокарде этих клеток относительно немного, но они интенсивно реагируют на патологию сердечно-сосудистой системы. При кардиомиопатии и миокардите у человека (Patella et al., 1998; Petrovic et al., 1999; Akgul et al., 2004) и при инфаркте и гипертрофии миокарда у животных (Olivetti et al., 1989; Engels et al., 1995; Ерохина и др., 2006) возрастают количество и активность ТК. Известно, что в патофизиологию сердца вовлекается не только миокард, но и окружающий его перикард. Данные о поведении ТК перикарда при различных заболеваниях сердца фрагментарны. Так, при некоторых формах перикардита, сопровождающих миокардит, в перикарде увеличивается число дегранулирующих ТК и поднимается уровень освобождаемого гистамина (Fairweather et al., 2004). Показано участие ТК перикарда в развитии фиброзного перикардита при системном склерозе (Byers et al., 1997).

Цель настоящей работы — изучение поведения ТК перикарда при экспериментальной сердечной недостаточности (СН) на модели с инъекциями изопротеренола (ИП). ИП, сильнодействующий синтетический катехоламин, действующий на β -адренергические рецепторы, индуцирует инфарктоподобные некрозы, максимальные в субэндокардиальной зоне левого желудочка и межжелудочковой перегородки (Zbinden, Bagdon, 1963). Мы определяли количество ТК разной степени зрелости в миокарде и перикарде. ТК идентифицировали цитохимически по окраске альциановым голубым и сафранином.

Материал и методика

Эксперименты проводили на самцах крыс Вистар массой 250—270 г. Контролем служили крысы той же массы. Всего использовано 25 животных. Сердечную недостаточность вызывали двукратными подкожными инъекциями ИП с интервалом 24 ч в дозе 80 мг на 1 кг массы тела. СН оценивали на 28-е и 60-е сут после введения ИП

по степени расширения камер сердца, выраженности снижения фракции выброса и фракции укорочения по сравнению с контролем. Через 24 ч и 14, 28 и 60 сут после второй инъекции сердца фиксировали в жидкости Карнуа, заливали в парафин и готовили срезы толщиной 5 мкм. Срезы окрашивали в течение 30 мин при комнатной температуре смесью железных квасцов, альцианового голубого 8G и сафранина О, приготовленной на Уолполовском буфере, рН 1.42 (Röhlich, Csaba, 1972), промывали в дистиллированной воде и подкрашивали гематоксилином Майера—эозином. ТК подсчитывали в миокарде левых и правых отделов предсердий и желудочков и в перикарде. Определяли плотность ТК на 1 мм², учитывая отдельно клетки с альциан- и сафранин-положительными гранулами. Значимость различий сравниваемых величин оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента.

В работе использованы альциановый голубой 8G (Fluka, Швейцария) и сафранин О (Fisher Science Ed., США).

Результаты

Через 24 ч после второй инъекции ИП в миокарде видны диффузные очаги дегенерирующих и некротических мышечных волокон, которые через 14 и 28 сут замещаются скоплениями соединительнотканых клеток. Через 60 сут повреждения миокарда не заметны, встречаются лишь зоны фиброза. Эти наблюдения соответствуют описаниям ультраструктуры миокарда после воздействия ИП по идентичным схемам эксперимента. Так, резко выраженные изменения органелл мышечных клеток обнаруживаются через 12 и 24 ч, а через 3 сут некротические клетки почти полностью резорбируются и замещаются фибробластами и фиброцитами (Csaró et al., 1972).

Стенка перикарда крысы состоит из внутреннего серозного и наружного фиброзного слоев. Серозный слой, образованный мезотелиальными клетками, у корня больших сосудов, входящих в сердце и выходящих из него, переходит в эпикард, покрывающий миокард. Фиброзный слой у основания сердца переходит в адвентициальную оболочку крупных сосудов сердца. Между мезотелиальной выстилкой перикарда и эпикардом образуется перикардальная полость. В перикарде ТК в основном сосредоточены в фиброзном слое, включающем в себя соединительную и жировую ткани, в миокарде предсердия и желудочка — около сосудов и между мышечными клетками.

В норме в миокарде суммарная плотность ТК разной степени зрелости относительно низкая и в предсердии составляет 5.8 ± 3.2 , а в желудочке — 3.8 ± 1.5 кл./мм². Напротив, в перикарде плотность ТК в норме в несколько раз выше и достигает 48.6 ± 13.0 кл./мм². Как в миокарде, так и в перикарде плотность ТК подвержена значительной индивидуальной вариабельности.

В опыте в миокарде предсердия и желудочка плотность ТК также невысокая и в период от 24 ч до 60 сут после инъекций ИП в предсердии колеблется от 3 до 5, в желудочке — от 2 до 4 кл./мм² и в течение опыта достоверно не изменяется. В перикарде плотность ТК через 24 ч и 14 сут после инъекций ИП увеличивается по сравнению с нормой в среднем в 1.5 раза ($P < 0.05$) и составляет соответственно 79.3 ± 20.0 и 71.0 ± 10.0 кл./мм². Через 28 сут плотность ТК возрастает по сравнению с контролем в 2 раза ($P < 0.01$) и достигает 102 ± 18 кл./мм². Через 60 сут плотность этих кле-

ток в перикарде равна 58.5 ± 17.5 кл./мм² и достоверно не отличается от нормы ($P > 0.05$).

Популяция ТК по гистохимическим характеристикам гетерогенна (рис. 1). В миокарде и перикарде присутствуют менее зрелые клетки, содержащие гранулы, окрашивающиеся альциановым голубым, и более зрелые клетки, в которых преобладают гранулы, окрашивающиеся сафранином (Combs et al., 1965; Röhlich, Csaba, 1972; Forman et al., 2006). Анализ плотностей ТК разной степени дифференцировки отдельно в миокарде предсердия и желудочка показал отсутствие в контроле и в эксперименте достоверных различий между этими отделами, что позволило суммировать полученные данные. В миокарде плотность альциан- и сафранин-положительных клеток в течение опыта достоверно не изменяется (рис. 2).

В отличие от миокарда в перикарде плотность ТК разной степени зрелости изменяется в процессе развития патологии сердца (рис. 2). Так, через 24 ч и 14 сут после инъекций ИП по сравнению с контролем общая плотность ТК возрастает за счет значительного повышения количества более дифференцированных клеток, окрашивающихся сафранином ($P > 0.05$), без достоверного изменения плотности менее дифференцированных клеток, окрашивающихся альциановым голубым ($P > 0.05$). Можно полагать, что в течение первых 2 нед после воздействия ИП происходят стимуляция созревания менее зрелых клеток и переход их в категорию более зрелых, при этом из кровеносной системы в перикард мигрируют недифференцированные клетки и поддерживают плотность этих клеток на прежнем уровне. Через 28 сут после начала опыта по сравнению с контролем увеличивается плотность как более, так и менее зрелых ТК соответственно в 1.7 и 2.7 раза ($P < 0.05$). Через 60 сут баланс клеток разной степени зрелости приближается к контролю ($P > 0.05$).

Оценка степени нарушения сократительной активности по функциональным показателям выявляет умеренно выраженную дисфункцию миокарда через 28 сут и отсутствие четких признаков поражения сердечной мышцы через 60 сут после инъекций ИП. Итак, динамика изменения плотности как всей популяции ТК, так и плотности клеток разного уровня дифференцировки коррелирует со степенью СН по функциональным показателям.

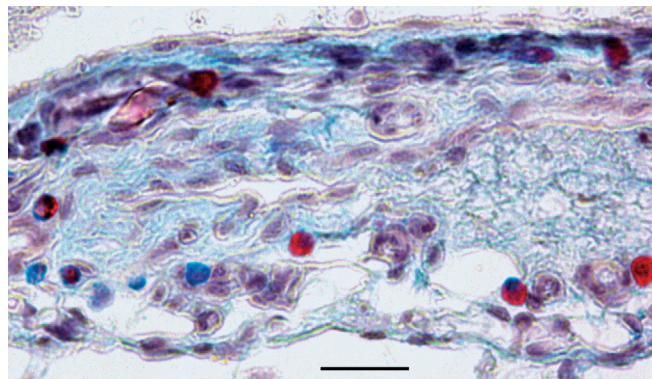


Рис. 1. Фрагмент перикарда крысы через 28 сут после инъекций изопроterenола.

Видны голубые тучные клетки с альциан-положительными гранулами (малодифференцированные клетки) и красные тучные клетки с сафранин-положительными гранулами (зрелые клетки). Масштабный отрезок — 5 мкм.

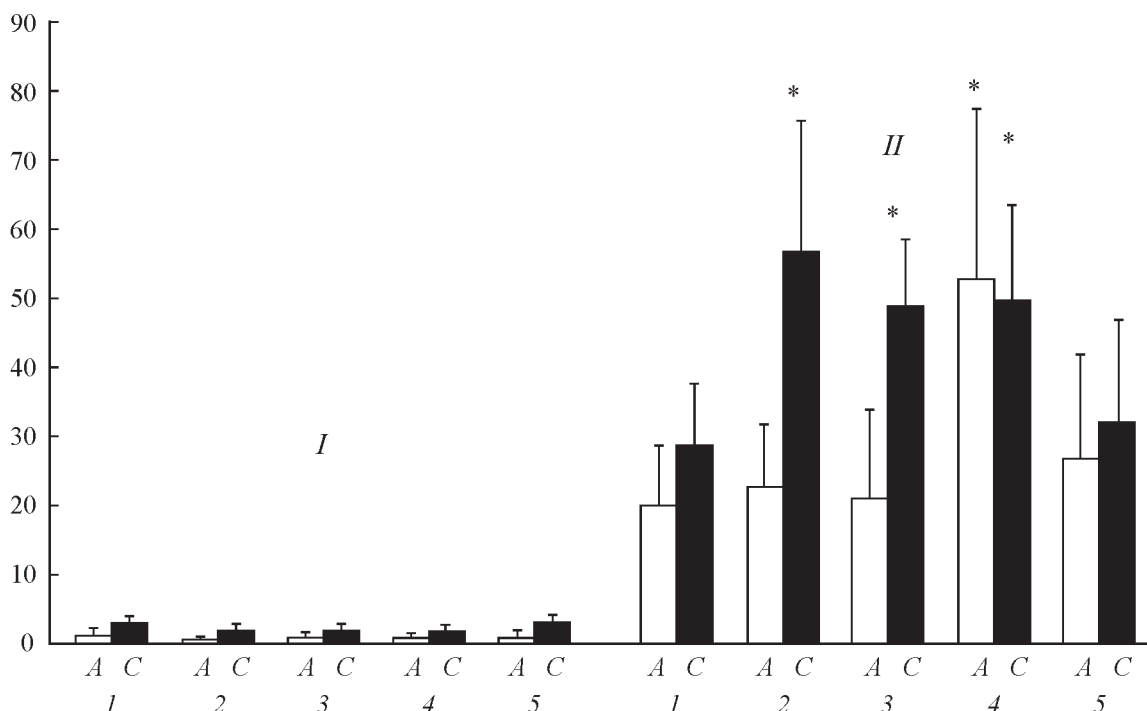


Рис. 2. Плотность тучных клеток в миокарде (I) и перикарде (II) сердца крыс.

По вертикали — плотность клеток (клет./мм²). По горизонтали: 1 — интактные крысы; 2—5 — через 24 ч, 14, 28 и 60 сут после инъекций изопроterenола. А — альциан-положительные, С — сафранин-положительные клетки. Каждая точка представляет собой среднее значение \pm SEM. Звездочка — достоверное отличие от контроля при $P < 0.05$.

Обсуждение

В отличие от вызванного перевязкой коронарной артерии экспериментального инфаркта, при котором четко прослеживается активация ТК в миокарде (Engels et al., 1995; Ерохина и др., 2006), при индукции некрозов введениями ИП выявить достоверные изменения поведения популяции ТК, локализованных в миокарде, не удалось. Нужно отметить, что хотя повреждения, возникающие при использовании этих экспериментальных моделей, морфологически похожи, механизм их образования различный. При инфаркте миокарда некрозы появляются вследствие ишемии, а при действии ИП — в результате быстрой перегрузки клеток кальцием. Кроме того, при инфаркте миокарда поражение носит очаговый характер, в то время как после введения ИП — диффузный.

Данные настоящей работы показали, что плотность ТК в перикарде не только в условиях эксперимента, но и в норме на порядок выше, чем в миокарде, и они активно реагируют на дисфункцию сердца. Значительные изменения как общего количества ТК в перикарде, так и соотношения менее и более дифференцированных клеток наблюдаются в период от 24 ч до 28 сут после индукции СН. Полученные данные показывают, что происходят стимуляция созревания резидентных ТК и пополнение популяции за счет миграции незрелых клеток извне. Можно предполагать, что наблюдаемая в течение 4 нед после введения ИП реакция перикардиальных ТК сопровождается усилением их секреторной активности. Ускоренное созревание ТК наблюдается и при других вариантах экспериментальной патологии сердца (перегрузке сердца объемом) (Forman et al., 2006). Возвращение плотности и распределения ТК по степени зрелости к нор-

мальному уровню через 60 сут после воздействия ИП, когда четкие признаки СН отсутствуют и, по-видимому, происходит компенсация СН, указывает на то, что существует зависимость между функциональным состоянием миокарда и динамикой изменений в популяции перикардиальных ТК.

При патологии сердца в литературе в основном обсуждается роль ТК, расположенных в миокарде. Содержащиеся в многочисленных гранулах ТК медиаторы могут играть как положительную, так и отрицательную роль. Так, ТК способствуют заживлению некрозов и образованию рубца при инфаркте миокарда (Ren et al., 2003). С другой стороны, активация ТК при патологии сердца способствует развитию фиброза и переходу к СН (Hara et al., 2002; Shiota et al., 2003). Подавление дегрануляции ТК предотвращает патологические изменения в миокарде (Brower, Janicki, 2005). Как уже отмечалось во введении, ТК перикарда изучались в единичных работах (Byers et al., 1997; Fairweather et al., 2004), и роль этих клеток в перикарде, как и в миокарде, неясна и требует дальнейшего изучения.

Многочисленные исследования биохимического состава перикардиальной жидкости показывают присутствие в ней натрийуретических пептидов (ANP и BNP), играющих важную роль в регуляции функции сердечно-сосудистой системы. При патологии сердца концентрация этих пептидов возрастает (Amano et al., 1993; Tanaka et al., 1998; Klemola et al., 2001; Soos et al., 2002). Одним из возможных источников поступления ANP в перикардиальную полость могут быть ТК, в которых показано наличие этого пептида (Belloni et al., 2005; Martynova et al., 2005). Эти данные подтверждают представление о том, что перикард выполняет не только функцию механической под-

держки сердечной деятельности, но и является вероятным участником эндокринной тканевой регуляции при различных поражениях сердца.

Авторы приносят искреннюю благодарность О. А. Быстровой за техническую помощь при подготовке рукописи к печати.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 05-04-49393).

Список литературы

- Ерохина И. Л., Мартынова М. Г., Моисеева О. М., Емельянова О. И. 2006. Активация тучных клеток при экспериментальном инфаркте миокарда у 3-недельных крысят. Цитология. 48 (8) : 661—664.
- Akgul A., Skrabal C. A., Thompson L. O., Loebe M., Lafuente J. A., Noon G. P., Youker K. A., Michael E. 2004. Role of mast cells and their mediators in failing myocardium under mechanical ventricular support. *J. Heart Lung Transplant.* 23 : 709—715.
- Amano J., Suzuki A., Sunamori M., Shichiri M., Marumo F. 1993. Atrial natriuretic peptide in the pericardial fluid of patients with heart disease. *Clin. Sci. (Lond.)* 85 : 165—168.
- Belloni A. S., Guidolin D., Salmasso R., Bova S., Rossi G. P., Nussdorfer G. G. 2005. Adrenomedullin, ANP and BNP are colocalized in a subset of endocrine cells in the rat heart. *Int. J. Mol. Med.* 15 : 567—571.
- Brower G. L., Janicki J. S. 2005. Pharmacologic inhibition of mast cell degranulation prevents left ventricular remodeling induced by chronic volume overload in rats. *J. Card. Fail.* 11 : 548—556.
- Byers R. J., Marshall D. A. S., Freemont A. J. 1997. Pericardial involvement in systemic sclerosis. *Ann. Rheum. Dis.* 56 : 393—394.
- Combs J. W., Lagunoff D., Benditt E. P. 1965. Differentiation and proliferation of embryonic mast cells of the rat. *J. Cell Biol.* 25 (3, Pt 1) : 577—592.
- Csapó Z., Dušek J., Rona G. 1972. Early alterations of the cardiac muscle cells in isoproterenol-induced necrosis. *Arch. Pathol.* 93 : 356—365.
- Engels W., Reiters P. H., Daemen M. J., Smits J. F., van der Vusse G. J. 1995. Transmural changes in mast cell density in rat heart after infarct induction *in vivo*. *J. Pathol.* 177 : 423—429.
- Fairweather D., Frisancho-Kiss S., Yusung S. A., Barrett M. A., Davis S. E., Gatewood S. J., Njoku D. B., Rose N. R. 2004. Interferon-gamma protects against chronic viral myocarditis by reducing mast cell degranulation, fibrosis, and the profibrotic cytokines transforming growth factor-beta 1, interleukin-1 beta, and interleukin-4 in the heart. *Amer. Pathol.* 165 : 1883—1894.
- Forman M. F., Brower G. L., Janicki J. S. 2006. Rat cardiac mast cell maturation and differentiation following acute ventricular volume overload. *Inflamm. Res.* 55 : 408—415.
- Hara M., Ono K., Hwang M.-W., Iwasaki A., Okada M., Nakatani K., Sasayama S., Matsumori A. 2002. Evidence for a role of mast cells in the evolution to congestive heart failure. *J. Exp. Med.* 195 : 375—381.
- Klemola R., Tikkanen I., Vuolteenaho O., Toivonen L., Lai- ne M. 2001. Plasma and pericardial fluid natriuretic peptide levels in postinfarction ventricular dysfunction. *Eur. J. Heart Fail.* 3 : 21—26.
- Martynova M. G., Bystrova O. A., Moiseeva O. M., Evdoin A. L., Kondratov K. A., Medvedeva N. D. 2005. The presence of ANP in rat peritoneal mast cells. *Cell Res.* 15 : 811—816.
- Olivetti G., Lagrasta C., Ricci R., Sonnenblick E. H., Capasso J. M., Anversa P. 1989. Long-term pressure-induced cardiac hypertrophy: capillary and mast cell proliferation. *Amer. J. Physiol.* 257 (6, Pt 2) : H1766—H1772.
- Patella V., Marino I., Arbustini E., Lamparter-Schummert B., Verga L., Adt M., Marone G. 1998. Stem cell factor in mast cells and increased mast cell density in idiopathic and ischemic cardiomyopathy. *Circulation.* 97 : 971—978.
- Petrovic D., Zorc M., Zorc-Pleskovic R., Vraspir-Porenta O. 1999. Morphometrical and stereological analysis of myocardial mast cells in myocarditis and dilated cardiomyopathy. *Folia Biol. (Praha)* 45 : 63—66.
- Ren G., Dewald O., Frangogiannis N. G. 2003. Inflammatory mechanisms in myocardial infarction. *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* 2 : 242—256.
- Röhlich P., Csaba G. 1972. Alcian blue—safranin staining and ultrastructure of rat mast cell granules during degranulation. *Acta Biol. Acad. Sci. Hung.* 23 : 83—89.
- Shiota N., Rysa J., Kovanen P. T., Ruskoaho H., Kokkonen J. O., Lindstedt K. A. 2003. A role for cardiac mast cells in the pathogenesis of hypertensive heart disease. *J. Hypertens.* 21 : 1935—1944.
- Soos P., Juhasz-Nagy A., Ruskoaho H., Hartyanszky I., Merke-ly B., Toth M., Horkay F. 2002. Locally different role of atrial natriuretic peptide (ANP) in the pericardial fluid. *Life Sci.* 71 : 2563—2573.
- Tanaka T., Hasegawa K., Fujita M., Tamaki S. I., Yamazato A., Kihara Y., Nohara R., Sasayama S. 1998. Marked elevation of brain natriuretic peptide levels in pericardial fluid is closely associated with left ventricular dysfunction. *J. Amer. Coll. Cardiol.* 31 : 399—403.
- Zbinden G., Bagdon R. E. 1963. Isoproterenol-induced heart necrosis, an experimental model for the study of angina pectoralis and myocardial infarct. *Rev. Can. Biol.* 22 : 257—263.

Поступила 21 VI 2007

THE DENSITY OF MYOCARDIAL AND PERICARDIAL RAT MAST CELLS IN ISOPROTERENOL-INDUCED HEART FAILURE

I. L. Erokhina,¹ S. V. Okovityy,² A. N. Kulikov,² A. A. Kazachenko,² M. G. Martynova,¹
O. M. Moiseeva,³ S. N. Shulenin,² O. I. Emelyanova¹

¹ Institute of Cytology RAS, ² Military Medical Academy and
³ V. A. Almazov Research Institute of Cardiology, St. Petersburg;
¹ e-mail: heartdev@mail.cytspb.rssi.ru

Myocardial mast cells (MC) respond to cardiovascular pathology. The behavior of MC population in myocardium and pericardium of rats has been studied 24 h, 14, 28 and 60 days after two isoproterenol injections (at 24 h intervals). The extent of heart failure has been estimated by supersonic inspection 28 and 60 days after

isoproterenol injections. The density of MCs of different degrees of maturity was estimated on paraffin sections stained with Alcian blue—Safranin. The MC density in myocardium of intact and experimental rats was relatively low: from 4 to 6 cells/mm². The MC density in pericardium of intact rats was several times higher than in myocardium: 48.6 ± 13.0 cells/mm². In 24 h and 14 days after isoproterenol injections the pericardial MC density was 1.5 times higher than in control rats ($P < 0.05$) at the expense of increase in the number of mature MCs with Safranine-positive granules without the increase in the number of immature cells with Alcian blue-positive granules. In 28 days the pericardial MC density was 2 times higher than in intact rats ($P < 0.05$) at the expense of increase in number of immature and mature cells. In 60 days after isoproterenol injections the pericardial MC density and the ratio of immature and mature cells compared with control did not reach statistical significance. The changes in pericardial MC population corresponded to severity of heart failure according to functional indices. The findings show active reaction of pericardial MCs on myocardium dysfunction that stimulates the maturation of resident immature MCs in pericardium and migration of immature cells to pericardium of damage heart.

Key words: mast cells, myocardium, pericardium, heart failure, isoproterenol, rats.
