

## ИЗМЕНЕНИЕ СООТНОШЕНИЯ ГРАНУЛ А- И В-ТИПОВ, СОДЕРЖАЩИХ ПРЕДСЕРДНЫЙ И МОЗГОВОЙ НАТРИЙУРЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ, В ПРЕДСЕРДНЫХ МИОЦИТАХ КРЫС В УСЛОВИЯХ ВАЗОРЕНАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

© М. В. Рахчеева, М. Л. Бугрова

*Нижегородская государственная медицинская академия;  
электронный адрес: maryax@mail.ru*

Система сердечных натрийуретических пептидов (НП) является основным фактором, противостоящим действию ренин—ангиотензин—альдостероновой (РААС), симпатoadреналовой систем (САС), вазопрессина и направленным на снижение уровня артериального давления (АД). В настоящей работе количественным морфометрическим методом с использованием двойного иммуноцитохимического мечения гранул, содержащих НП, впервые проанализировано выведение предсердного (ANP) и мозгового (BNP) натрийуретических пептидов миоцитами правого предсердия крыс в условиях вазоренальной гипертензии, индуцированной путем перевязки почечной артерии. На 30-е сут после операции в миоцитах предсердия снижается общее количество секреторных гранул на 18 %, при этом доля гранул А-типа уменьшается на 53 %, а гранул В-типа увеличивается на 64 % по сравнению с этими показателями у интактных животных. Полученные результаты свидетельствуют об активной секреции НП в условиях вазоренальной гипертензии. Сохранение высокого уровня АД объясняется снижением экспрессии рецепторов НП при данной патологии.

Ключевые слова: предсердный натрийуретический пептид, мозговой натрийуретический пептид, вазоренальная гипертензия.

Принятые сокращения: АД — артериальное давление, КМЦ — кардиомиоциты, НП — натрийуретические пептиды, РААС — ренин-ангиотензин-альдостероновая система, САС — симпатoadреналовая система, СПР — саркоплазматический ретикулум, ANP — предсердный натрийуретический пептид, BNP — мозговой натрийуретический пептид.

Многочисленные вазоактивные пептиды играют важную физиологическую роль в регуляции АД, сосудистого тонуса и реактивности сердечно-сосудистой системы (Bialik et al., 2001; Persson, 2003; Callere et al., 2007). Известно, что НП сердца вызывают гипотензию благодаря своему диуретическому, натрийуретическому и сосудорасширяющему действию. Кроме того, НП уменьшают концентрацию ренина и альдостерона в крови (Gunning, Brenner, 1992; Sea, 2005; Lee, Burnett, 2007; Мартынова и др., 2008). Существует несколько НП, среди которых два пептида сходны по механизму действия: мозговой натрийуретический (BNP) и предсердный натрийуретический (ANP) (Daniels, Maisel, 2007). Хранение их осуществляется в гранулах секреторных кардиомиоцитов (КМЦ): при этом ANP запасается в основном в гранулах миоцитов предсердия, тогда как BNP находится преимущественно в гранулах миоцитов желудочка (Biondo et al., 2003). Известен целый ряд различных морфологических классификаций гранул. Одни исследователи выделяют 3 типа. Первый (молодые вновь сформированные гранулы) характеризуется высокой электронной плотностью и гомогенизированным матриксом, который окружен мембраной и электронно-прозрачным околосмембранным ободком. Гранулы второго типа (зрелые) содержат менее

электронно-плотный матрикс, имеют мембрану, околосмембранный ободок практически отсутствует. Гранулы третьего типа (диффундирующие) содержат наиболее электронно-прозрачный матрикс без мембраны (Jamieson et al., 1964; Скибинская, 1999).

По другой классификации, использованной в нашей работе, определяют 2 субпопуляции гранул: гранулы А- и В-типов. Гранулы А имеют четко выраженное мембранное окружение и мало структурированное осмиофильное содержимое, которое равномерно распределяется в ограниченном мембраной пространстве гранул или, реже, имеет незначительные уплотнения. Диаметр гранул у крысы составляет в среднем  $212 \pm 50$  нм. Гранулы В-типа лишены мембраны и имеют «размытую» периферию в еще большей степени, чем мембранные, варьируют по размерам и электронной плотности; в ряде случаев в саркоплазме КМЦ обнаруживаются лишь «тени» безмембранных гранул. Среднее значение диаметра безмембранных специфических гранул составляет в предсердиях у зрелых крыс  $125 \pm 21$  нм. Переходные формы (с частично сохраненными мембранами) обнаруживаются крайне редко (Mifune et al., 1991; Твердохлеб, 1996). Предполагается, что гранулы А (мембранные) являются запасующими, гранулы В (безмембранные) — выделяющими пептиды

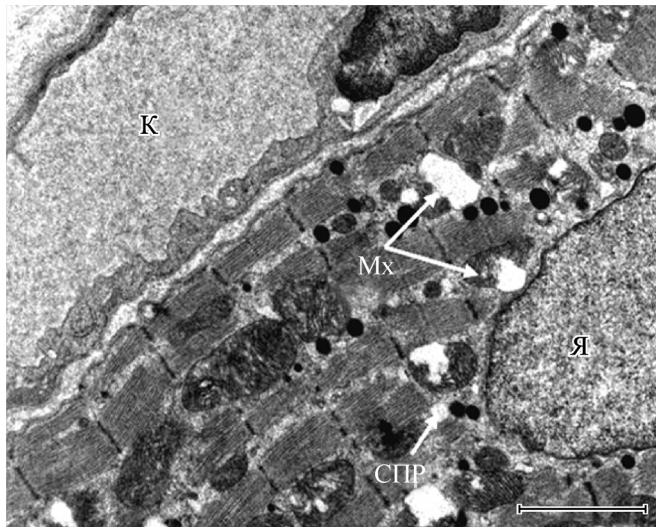


Рис. 1. Ультраструктура секреторных кардиомиоцитов правого предсердия крысы на 30-е сут развития вазоренальной гипертензии.

К — капилляр с осмиофильной плазмой, Я — ядро, Мх — вакуолизованные митохондрии, СПР — незначительное расширение саркоплазматического ретикулума. Масштабный отрезок — 2 мкм.

(Коростышевская, Максимов, 1989). На основании морфометрических подсчетов разных типов гранул можно сделать выводы о выделении НП. Однако интенсивность выделения ANP и BNP и их влияние на уровень АД в условиях патологии исследованы недостаточно.

Целью настоящей работы явилось изучение изменения соотношения гранул А и В, содержащих ANP и BNP, в КМЦ правого предсердия крысы при экспериментальной вазоренальной гипертензии, развившейся вследствие ишемии почки.

### Материал и методика

Эксперименты проведены с учетом правил проведения работ с экспериментальными животными на 20 белых лабораторных нелинейных крысах-самцах массой 180—220 г. Вазоренальную гипертензию изучали на двухпочечной модели с перевязкой одной левой почечной артерии по Когану (1962). Наркотизированную (нембуталом в дозе 25 мг/кг внутривенно) крысу иммобилизовали и выстригали шерсть на спине в области нижних грудных и поясничных позвонков. Через разрез кожи длиной 2—3 см слева, параллельно позвоночнику, отступя 0.5 см, извлекали почку и накладывали лигатуру на отпрепарированную почечную артерию. АД измеряли до перевязки артерии инвазивным методом через хвостовую артерию (по: Guo, Zhou 2003) и через 30 сут после этой операции.

Электронно-микроскопический анализ образцов ткани правого предсердия интактных и экспериментальных животных (на 30-е сут после перевязки левой почечной артерии) проводили по стандартной методике (Саркисов, Перов, 1996). Материал фиксировали в 2.5%-ном растворе глутаральдегида на какодильном буфере (pH 7.4) и в 1%-ном растворе OsO<sub>4</sub> с последующей заливкой в смесь Эпона с Аралдитом. Ультратонкие срезы контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе Morgagni 268D фирмы FEI с

использованием программы AnalySIS. Гранулы А- и В-типов подсчитывали в полях зрения 37×37 мкм<sup>2</sup> ( $n = 157$ ). Клеточную локализацию ANP и BNP выявляли на ультратонких срезах материала, заключенного в эпоксидные смолы. Иммуноцитохимические реакции проводили для каждого антитела отдельно. Срезы, помещенные на никелевые сеточки, обрабатывали 3%-ной перекисью водорода в течение 20 мин для разрыхления смолы и повышения иммунореактивности ткани. Далее срезы инкубировали в растворе поликлональных антител к ANP (Rabbit anti-Atrial Natriuretic Factor (1-28) (rat)) и BNP (Rabbit anti-Brain Natriuretic Peptide-32 (Rat) Serum, Peninsula Lab. Inc., Bachem, США) при разведении 1 : 2000 в течение 1 сут при 4 °С. В качестве вторых антител использовали белок А, конъюгированный с коллоидным золотом (диаметр частиц 15 нм) (Protein-A/Gold, 15 nm, EM Grade, Electron Microscopy Sciences, USA), при разведении 1 : 20. Полученные данные обрабатывали с помощью программы Statistica 6.0. Для парных межгрупповых сравнений средних использовали критерий Манна—Уитни.

### Результаты

Через 30 сут у экспериментальных животных наблюдалось развитие вазоренальной гипертензии: АД увеличилось на 28 % ( $n = 15$ ,  $P = 0.000134$ ).

Электронно-микроскопический анализ ткани правого предсердия экспериментальных животных показал незначительные изменения ультраструктуры в сравнении с тканью интактных животных. В большинстве клеток не было видимых структурных изменений. В ряде КМЦ ядра имели инвагинации кариолеммы. Сарколемма большинства КМЦ была сохранена, лишь в некоторых случаях выявлены небольшие участки разрыхления мембран. Миофибриллы находились в состоянии релаксации, в единичных случаях наблюдали их гиперсокращение и лизис. В отдельных митохондриях выявлены крупные вакуоли (рис. 1). Отмечено расширение канальцев саркоплазматического ретикулума (СПР) (рис. 1) и цистерн аппарата Гольджи, в единичных случаях наблюдались отек СПР и деструкция компонентов аппарата Гольджи. В микроциркуляторном русле в части сосудов обнаружены агрегированные эритроциты. Эндотелиоциты большинства капилляров содержали набухшие ядра и вакуолизованные митохондрии.

Морфометрия показала, что у интактных животных преобладают гранулы А-типа, которые составляют 63 % от общего количества гранул (см. таблицу). Соотношение типов гранул в КМЦ экспериментальных животных в сравнении с миоцитами интактных животных выглядело

Изменение соотношения гранул типов А и В в предсердных секреторных миоцитах крысы (M ± SD)

Животные	Гранулы типа А	Гранулы типа В	Общее число гранул
Интактные ( $n = 5$ )	111.37 ± 43.27	66.05 ± 26.49	177.42 ± 51.31
Экспериментальные на 30-е сут ( $n = 6$ )	52.44 ± 34.35, $P = 0.00000$	93.56 ± 40.82, $P = 0.000004$	146 ± 59.63, $P = 0.001428$

$P$  — различия значений достоверны относительно интактных животных (по тесту Манна—Уитни).



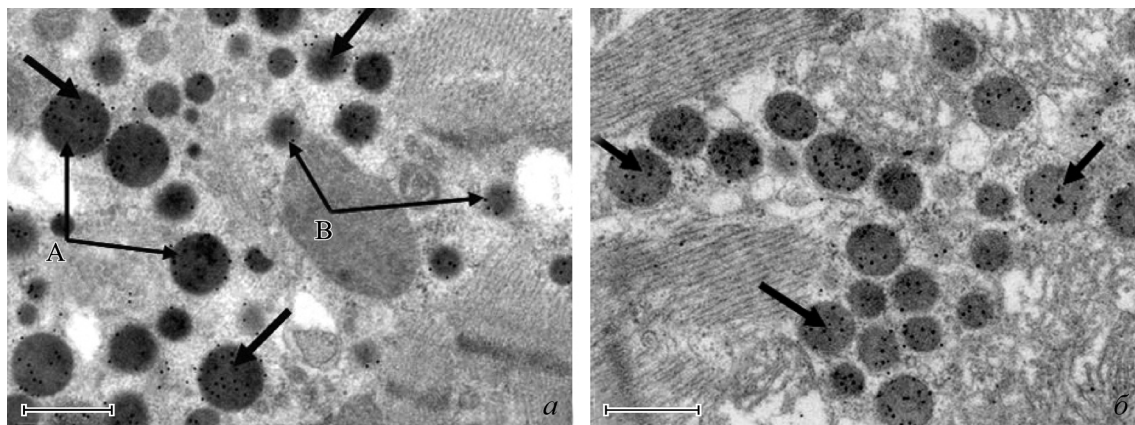


Рис. 2. Иммуноцитохимическое выявление предсердного натрийуретического пептида ANP в секреторных гранулах (стрелки) кардиомиоцитов правого предсердия крысы.

*a* — кардиомиоцит интактной крысы; *б* — кардиомиоцит крысы на 30-е сут развития вазоренальной гипертензии. А и В — типы гранулы. Масштабные отрезки — 0,5 мкм.

следующим образом: общее количество гранул снижалось на 18 %, при этом доля гранул А уменьшалась на 53 %, тогда как доля гранул В увеличивалась на 64 % (см. таблицу).

В КМЦ интактных и экспериментальных животных выявлен ANP- и BNP-иммунореактивный материал в гранулах обоих типов (рис. 2, 3). Следует отметить, что все гранулы были помечены обоими антителами, т. е. содержали и ANP, и BNP. Интенсивность мечения антителами к гранулам А- и В-типов визуально не различалась.

### Обсуждение

Нами показано, что в ультраструктуре миокарда правого предсердия крыс с вазоренальной гипертензией слабо выражены деструктивные процессы по сравнению с миокардом интактных животных: в миоцитах расширены цистерны аппарата Гольджи и канальцев СПР, увеличено количество митохондрий с вакуолями, ядра эндотелиоцитов капилляров набухшие.

Методом электронной иммуноцитохимии обнаружен ANP- и BNP-иммунореактивный материал в гранулах КМЦ правого предсердия. В экспериментах на кошках другими исследователями были выявлены гранулы 2 типов по содержанию НП: гранулы первого типа, содержащие только ANP, и гранулы второго типа, содержащие ANP и BNP (Hasegawa et al., 1991). В КМЦ правого предсердия крысы нами показаны гранулы второго типа.

Обнаруженное снижение числа гранул в предсердных миоцитах экспериментальных животных совпадает с данными исследователей, выявивших снижение количества гранул КМЦ левого предсердия у крыс через 6 нед с момента развития аденалрегенераторной гипертензии (Нилова, Хирманов, 1991). Однако мы не наблюдали полного исчезновения гранул, которое показали другие авторы (Corazza et al., 1993) через 48—72 ч после сужения обеих почечных артерий и которое сохраняется до 6 нед. Кроме того, в отличие от авторов, утверждающих, что синтез НП осуществляется при патологии (Knowles et al., 2001), нами обнаружены секреторные гранулы, содержащие

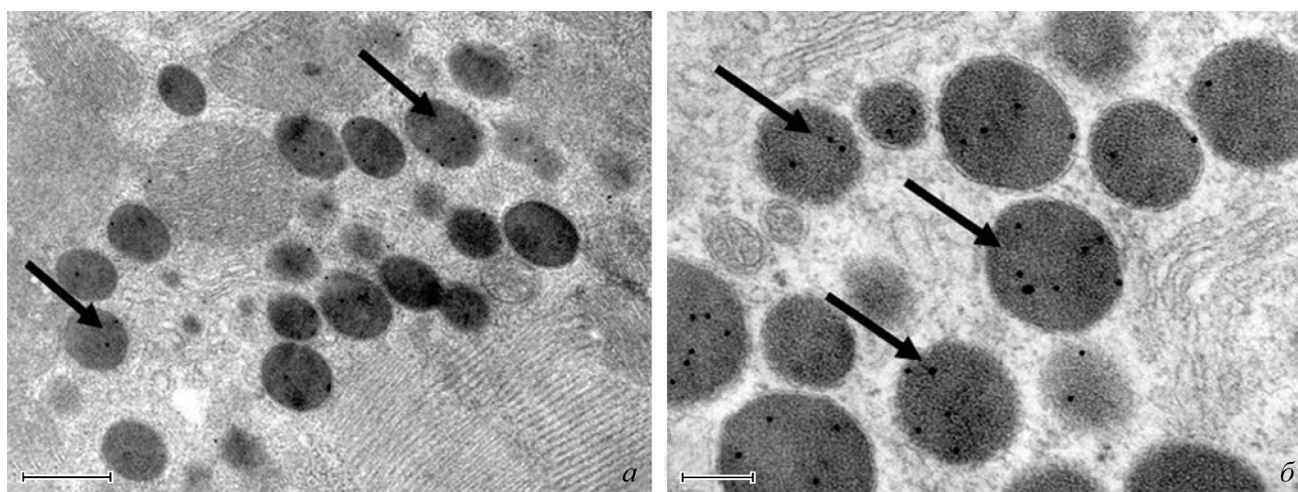


Рис. 3. Иммуноцитохимическое выявление BNP в секреторных гранулах (стрелки) кардиомиоцитов правого предсердия крысы.

*a* — кардиомиоцит интактной крысы; *б* — кардиомиоцит крысы на 30-е сут развития вазоренальной гипертензии. Масштабные отрезки: 0,5 (*a*) или 0,2 (*б*) мкм.

ANP и BNP, не только у экспериментальных, но и у интактных животных.

Выявленное на 30-е сут после перевязки почечной артерии увеличение количества в предсердных миоцитах гранул В и снижение количества гранул А свидетельствует о быстром выведении ANP и BNP из клеток. Активизация секреторной деятельности КМЦ является, по-видимому, компенсаторной реакцией на развившуюся гипертензию.

В нашем эксперименте, несмотря на активное выделение НП, не только не наблюдалось снижения АД, но, наоборот, выявлено дальнейшее его повышение. Основной механизм действий НП осуществляется посредством экспрессии рецепторов на клубочках нефронов, что приводит к ингибированию выработки ренина и впоследствии альдостерона (Lee, Burnett, 2007). Показано снижение плотности рецепторов к ANP и BNP, локализованных на клубочках нефрона, при вазоренальной гипертензии, развившейся вследствие перевязки или сужения одной или двух почечных артерий (Figueroa et al., 1990; Puyo et al., 1998). В наших экспериментах, по-видимому, происходило снижение количества рецепторов к НП, что приводило к ослаблению антагонистического действия ANP и BNP на РААС и поддержанию высокого уровня АД.

Таким образом, выявленные в КМЦ экспериментальных животных по морфологической классификации преобладание гранул В-типа и снижение количества гранул А-типа свидетельствуют об активизации секреции ANP и BNP в условиях гипертензии. В миоцитах правого предсердия крысы локализованы секреторные гранулы второго типа, содержащие одновременно ANP- и BNP-иммунореактивный материал. Сохранение высокого уровня АД, по-видимому, было связано с низкой экспрессией рецепторов НП в условиях патологии.

Авторы выражают сердечную благодарность за научные консультации при подготовке статьи М. Г. Мартыновой (Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург).

#### Список литературы

- Коган А. Х. 1962. Воспроизведение экспериментальной гипертонии у крыс стенозированием почечных артерий. Патол. физиол. эксперим. терапия. 3 : 79—80.
- Коростышевская И. Н., Максимов В. Ф. 1989. Ультраструктурные особенности гормонопродуцирующих кардиомиоцитов в некоторых экспериментальных и клинических условиях. Арх. анат. 96 (2) : 42—49.
- Мартынова М. Г., Накацева Е. В., Емельянова М. И., Моисеева О. М., Ерохина И. Л. 2008. Иммунолокализация предсердного натрийуретического пептида в тучных клетках перикарда крысы и человека. Цитология. 50 (3) : 237—242.
- Нилова В. К., Хирманов В. Н. 1991. Закономерности перестройки эндокринного аппарата предсердий крыс в процессе развития адrenaлрегенераторной гипертензии. Цитология. 33 (9) : 91—92.
- Саркисов Д. С., Перов Ю. Л. 1996. Микроскопическая техника: Руководство. М.: Медицина. 544 с.
- Скибинская Т. Р. 1999. Ультраструктурные особенности эндокринной функции сердца при легочной гипертензии. Вест. проблем биол. мед. Полтава—Харьков. 3 : 70—74.
- Твердохлеб И. В. 1996. Гетерогенность миокарда и ее развитие в нормальном кардиомиогенезе. Днепропетровск: Пороги. 224 с.
- Bialik G. M., Abassi Z. A., Hammel I., Winaver J., Lewinson A. 2001. Evaluation of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in atrial granules of rats with experimental congestive heart failure. J. Histochem. Cytochem. 49 : 1293—1300.
- Biondo A. W., Ehrhart E. J., Sisson D. D., Bulmer B. J., De Moraes H. S. A., Solter P. F. 2003. Immunohistochemistry of atrial and brain natriuretic peptides in control cats and cats with hypertrophic cardiomyopathy. Vet. Pathol. 40 : 501—506.
- Callere G., Tostes R., Savoia C., Muscara M. N., Touyz R. M. 2007. Vasoactive peptides in cardiovascular (patho)physiology. Expert Rev. Cardiovasc. Ther. 5 : 531—532.
- Cea L. B. 2005. Natriuretic peptide family: new aspects. Curr. Med. Chem. Cardiovasc. Hematol. Agents. 3 : 87—98.
- Corrazza J. P., Vega G. W., Roson M. I., de la Rive I. J., Pellegrino de Iraldi A. 1993. Ultrastructural study of atrial specific granules in experimental renovascular hypertension elicited by the constriction of both renal arteries. Medicina (B Aires). 53 : 497—502.
- Daniels L. B., Maisel A. S. 2007. Natriuretic peptide. J. Amer. Coll. Cardiol. 50 : 2357—2368.
- Figueroa C. D., Lewis H. M., MacIver A. G. 1990. Cellular localization of atrial natriuretic factor in the human kidney. Nephron Dial Transplant. 5 : 25—31.
- Gunning M. E., Brenner B. M. 1992. Natriuretic peptides and the kidney: current concepts. Kidney Int. 42 : S127—S133.
- Guo Z. K., Zhou L. 2003. Dual tail catheters for infusion and sampling in rats as an efficient platform for metabolic experiments. Lab. Animal. 32 : 684—693.
- Hasegawa K., Fujiwara H., Itoh H., Nakao K., Fujiwara T., Imura H., Kawai C. 1991. Light and electron microscopic localization of brain natriuretic peptide in relation to atrial natriuretic peptide in porcine atrium. Immunohistochemical study using specific monoclonal antibodies. Circulation. 84 : 1203—1209.
- Jamieson J. D., Palade G. E. 1964. Specific granules in atrial muscle cells. J. Cell Biol. 23 : 151—172.
- Knowles J. W., Esposito G., Mao L. 2001. Pressure-independent enhancement of cardiac hypertrophy in natriuretic peptide receptor A-deficient mice. J. Clin. Invest. 107 : 975—984.
- Lee C. Y., Burnett J. C., Jr. 2007. Natriuretic peptides and therapeutic applications. Heart Fail Rev. 12 : 131—142.
- Mifune H., Suzuki S., Noda Y., Mobri S., Mochizuki K. 1991. Fine structure of atrial natriuretic peptide (ANP)-granules in the atrial cardiocytes in the pig, cattle and horse. J. Vet. Med. Sci. 53 : 561—568.
- Persson P. B. 2003. The kidney and hypertension. Amer. J. Physiol. Integrativ. Comp. Physiol. 284 : 1176—1178.
- Puyo A. M., Vega G. W., Pelligrino de Iraldi A., Albornoz L. E., Roson M. I., Scaglia P., Celentano M. M., Corazza J. P., Palumbo E. L., Fernandez B. E., de la Riva I. J. 1998. Atrial natriuretic factor in two kidney — two clip renovascular hypertension in the rat. Medicina (B Aires). 58 : 165—170.

CHANGES IN THE PROPORTION OF A- AND B-TYPES OF GRANULES CONTAINING  
ATRIAL AND BRAIN NATRIURETIC PEPTIDES IN ATRIAL MYOCYTES  
IN VASORENAL HYPERTENSION IN RATS

*M. V. Rakhcheeva, M. L. Bugrova*

Nizhny Novgorod State Medical Academy;  
e-mail: maryrax@mail.ru

The system of cardiac natriuretic peptides (NP) is a very important factor opposing the effects of the renin—angiotensin—aldosterone system (RAAS), sympathoadrenal system and vasopressin to reduce blood pressure. In the present study, we analyzed the release of atrial and brain natriuretic peptides in the myocytes of the right atrium in rats by the quantitative morphometric method using double immunocytochemical labeling of atrial granules comprising NP in vasorenal hypertension induced by the renal artery ligation. The decrease in the total amount of secretory granules in atrium myocytes by 18 % was detected on the 30<sup>th</sup> day after the operation. The number of the A-type granules was reduced by 53 %, and the number of B-type granules was increased by 64 % in comparison with the intact animals. Our data indicate activation of NP secretion in vasorenal hypertension. The results suggest that high arterial pressure might be explained by reduced expression of NP receptors in this pathology.

Key words: atrial and brain natriuretic peptides (ANP, BNP), vasorenal hypertension.

---