

## ВОЗМОЖНОСТИ УЛЬТРАСТРУКТУРНОЙ ОЦЕНКИ СЕКРЕТОРНОЙ АКТИВНОСТИ ПРЕДСЕРДНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ

© И. М. Коростышевская,<sup>1</sup> В. Ф. Максимов, С. А. Курганов

*Институт физиологии СО РАМН, Новосибирск;*

<sup>1</sup> *электронный адрес: kor@physiol.ru*

Многолетний опыт изучения ультраструктуры миоэндокринных клеток предсердий у разных видов животных в норме и в эксперименте позволил нам предложить оптимальные методологические приемы, дающие наиболее полную информацию о состоянии секреторного аппарата этих клеток. Показано, что определенный совокупный набор качественных характеристик и стереоморфометрических показателей миоэндокринных клеток предсердий позволяет оценивать соотношение синтеза, накопления и выделения секреторных гранул, содержащих натрийуретические пептиды, а также хронические и острые реакции этой системы в ответ на изменения гемодинамики. Информативность такого подхода продемонстрирована на примерах онтогенетического изучения правого предсердия у двух линий крыс: с нормальным артериальным давлением и с наследственной артериальной гипертензией, индуцированной стрессом. Предложенная методология достаточно чувствительна и информативна, что очень актуально в свете недостатка других общепризнанных, специфических и точных методов изучения натрийуретических пептидов сердца.

Ключевые слова: кардиомиоцит, натрийуретический пептид, электронная микроскопия, стереоморфометрия.

После того как морфологи получили возможность использовать электронный микроскоп, появились многочисленные подробные описания миокарда у разных видов животных в экспериментальных моделях и при разной патологии у человека. В первую очередь экспериментаторов и клиницистов интересовала тонкая структура клеток в наиболее гемодинамически нагруженных отделах сердца — желудочках. Мышечные клетки предсердий в течение долгого времени интересовали лишь функционалистов — аритмологов. Ситуация изменилась в начале 80-х годов прошлого века, после того как Де Болд с коллегами (De Bold et al., 1981) показали, что в предсердиях секретируется гормон белковой природы, вызывающий усиление натрийуреза, диуреза и снижающий артериальное давление. Вскоре полипептид был идентифицирован, синтезирован и назван атриальным натрийуретическим пептидом (АНП), или предсердным натрийуретическим фактором (ПНФ) (Kangawa, Matsuo, 1984). К настоящему времени у всех позвоночных животных обнаружена целая группа родственных натрийуретических пептидов, основным физиологическим назначением которых является регуляция гемодинамики и водно-солевого баланса. Это гипотензивное звено антагонистично ренин-ангиотензин-альдостероновой системе (Stephenson, Pipkin, 1990; Van Kimmenade, Januzzi, 2009).

Иммунорфологическими методами неоднократно и на разных объектах было показано, что натрийуретические пептиды синтезируются в мышечных клетках предсердий и накапливаются в специфических секреторных гранулах саркоплазмы (Navaratnam et al., 1989; Baertschi et al., 2001; Marei, 2002; Крылова, 2007; Рахчеева, Бугро-

ва, 2010). Именно наличие секреторных гранул диаметром 50—500 нм наряду с меньшими размерами клеток, меньшим содержанием миофибрилл и более развитым пластинчатым комплексом является отличительной особенностью клеток предсердий от миоцитов желудочков у взрослых позвоночных животных (Румянцев, 1982; Волкова и др., 2006).

Период первичного накопления данных о сердечных пептидах, полученных самыми передовыми методами, принес обильный материал о новой регуляторной системе, который обобщен в многочисленных научных обзорах (Maack, 2006; Potter et al., 2006; Gardner et al., 2007; Максимов, Коростышевская, 2011; Коростышевская, Максимов, 2012). Однако в настоящее время интерес к проблеме несколько угас из-за возникших теоретических и методических трудностей. Биохимики и молекулярные биологи не могут разработать общепризнанный точный и специфичный метод определения концентрации пептидов в крови из-за сложных и неоднозначных путей их метаболического распада (Clerico et al., 2000; Clerico, Emdin, 2004). Клиницисты и патофизиологи не могут объяснить «гормональный парадокс», суть которого в том, что при тяжелых формах сердечной дисфункции на фоне высокой гипертензии и отеков в крови обнаруживаются огромные концентрации сердечных пептидов, но они неэффективны (Langenickel et al., 2000; Vesely, 2006, 2007). Специалисты клеточной биологии пока не могут однозначно определить пути синтеза, накопления и выделения секреторного продукта, а также механизмы регуляции этих процессов (Goetze et al., 2003; Woodard, Rosado, 2007; Goetze, 2010). В этой связи метод электронной мик-

роскопии может служить ценным инструментом для решения некоторых актуальных проблем.

Цель настоящей работы — выяснить, насколько информативными являются качественные (ультраструктурные) и количественные характеристики миоэндокринных клеток сердца для оценки их секреторной активности.

### Материал и методика

Ультраструктуру миокарда правого предсердия изучали у крыс линии ВАГ (WAG) на разных этапах онтогенеза: у эмбрионов — на 18-е сут развития, у крысят — на 12-е и 21-е сут после рождения, у самцов — на 6 и 13 мес жизни. Для исследования структурных перестроек миоэндокринных клеток в ответ на специфические воздействия использовали крыс линии НИСАГ (ISIAH) с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (Маркель, 1985; Маслова и др., 2002) в те же сроки онтогенеза. Животных содержали в стандартных условиях вивария с водой и пищей без ограничения, умерщвляли под эфирным наркозом гильотинированием согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» и директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС).

Для электронно-микроскопического исследования правое предсердие (от 5—6 животных в каждой группе) фиксировали в растворе 2.5%-ного глутаральдегида и 2%-ного параформа, дофиксировали в 1.5%-ном растворе  $OsO_4$  и заливали в смесь Эпона с Аралдитом. Ультратонкие срезы контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца, просматривали в электронном микроскопе JEM-1400 (Jeol, Япония) и фотографировали камерой Velteta 4 Mpxl (Olympus, Япония). В пакете iTEM 5.1 (Olympus, Япония) измеряли кардиомиоциты в области ядра и диаметры секреторных гранул в них. Не менее чем в 15 случайных полях зрения каждого образца при увеличении  $10\,000\times$  с помощью квадратной тестовой решетки с шагом 1 мкм определяли относительные объемы органоидов в цитоплазме кардиомиоцитов и подсчитывали численную плотность секреторных гранул (Непомнящих и др., 1986; Автандилов, 1990).

Статистическую обработку вариационных рядов и проверку их на нормальность распределения проводили в пакете Statistica 6.0. Результаты представлены в виде среднего и ошибки среднего ( $M \pm m$ ). Достоверность различий с контролем определяли с помощью  $t$ -критерия Стьюдента при  $P < 0.05$ .

Методические приемы ультраструктурного исследования продольных срезов миоэндокринных клеток: 1) описание особенностей строения и определение диаметра клеток — измерение ширины ядросодержащей части клеток; 2) стереоморфометрия цитоплазмы клеток для определения относительного объема (объемной плотности) основных структур, включая комплекс Гольджи и секреторные гранулы; 3) изучение качественного состава гранул с выделением зрелых, формирующихся, растворяющихся и атипичных форм; 4) измерение диаметра и числа гранул каждой разновидности на определенной площади среза цитоплазмы клетки; 5) статистическая обработка вариационных рядов.

Реактивы: глутаральдегид, параформальдегид, эпоксидные смолы, уранил-ацетат, цитрат свинца (Serva feibiochemica GmbH, Германия) и четырехокись осмия (Реахим, Московский химзавод им. Войкова, Россия).

### Результаты

Миоэндокринные клетки предсердий — это типичные вытянутые кардиомиоциты с центрально расположенным овальным ядром и хорошо развитыми межклеточными контактами, как боковыми, так и вставочными дисками. Несколько пучков миофибрилл располагается вдоль длинной оси клетки под сарколеммой, оставляя около полюсов ядра достаточно обширное пространство, заполненное митохондриями, пластинчатыми комплексами, секреторными гранулами, между которыми встречаются мембранные структуры, лизосомы, рибосомы, гликоген и редко — центриоли (рис. 1).

Многолетний опыт изучения миоэндокринных клеток предсердий разных классов животных в эксперименте (Максимов, Коростышевская, 2012) и у человека при патологии (Коростышевская, Максимов, 1989) позволил нам отобрать такие качественные и количественные морфометрические показатели, которые в совокупности позволяют получать достаточно объективную информацию об эндокринной активности этих клеток. Прежде всего необходимо определить абсолютные размеры клеток, для чего на продольных срезах мы измеряли поперечные размеры миоцитов в зоне ядра. На рис. 2 видно, что миоэндокринные клетки у крыс гипертензивной линии НИСАГ в постнатальном онтогенезе, по крайней мере с 12-х сут жизни, достоверно крупнее, чем у контрольных животных. Гипертрофия достигает максимума у старых крыс.

Соблюдая правила проведения стереоморфометрии, определяли относительные объемы (объемные доли) основных органоидов саркоплазмы, и в первую очередь, исходя из поставленной задачи, секреторного аппарата. Суммарный объем пластинчатых комплексов Гольджи и секреторных гранул в кардиомиоците — важная характеристика эндокринной активности. Степень развития пла-

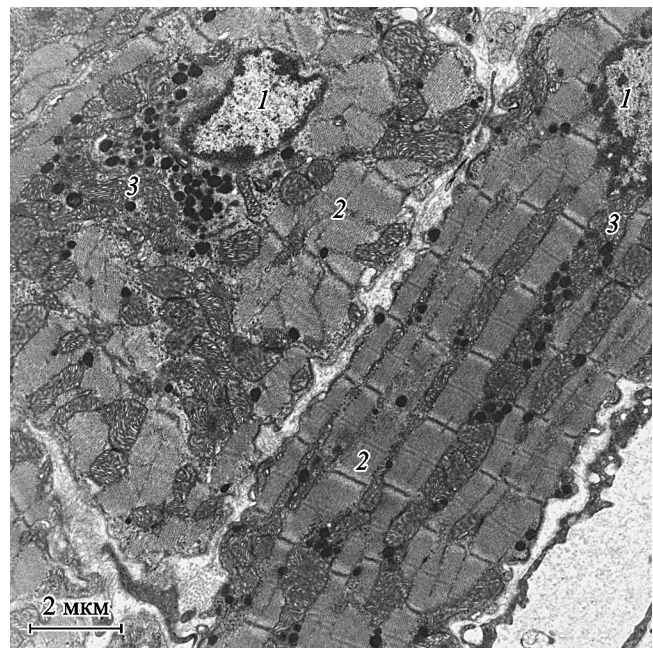


Рис. 1. Общая архитектура мышечных (миоэндокринных) клеток правого предсердия крысы.

1 — ядро, 2 — миофибриллы, 3 — многочисленные митохондрии и секреторные гранулы в околоядерном пространстве. Масштабная линейка — 2 мкм.

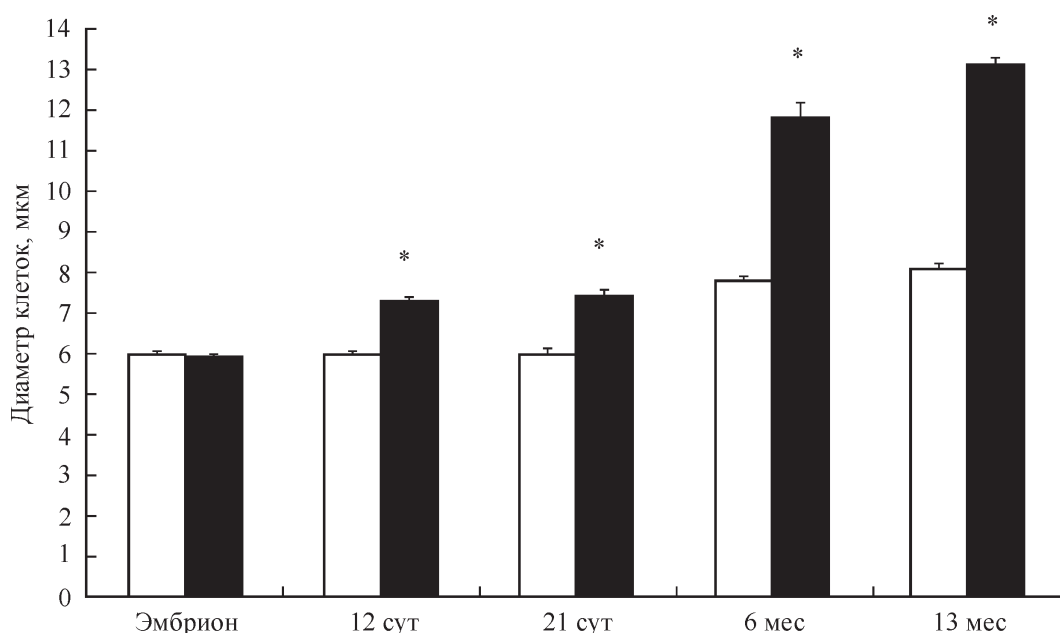


Рис. 2. Изменение диаметра кардиомиоцитов у крыс линии ВАГ (светлые столбцы) и гипертензивной линии НИСАГ (черные столбцы) по ходу онтогенеза.

Звездочкой показана достоверность межлинейных различий при  $P < 0.05$ .

стинчатого комплекса и количество секреторных гранул очень варьируют даже в соседних клетках одного образца. Объемные доли компартментов дают представление о соотношении стадий синтетического процесса в клетках: развитие комплексов Гольджи отражает активность синтеза продукта, а содержание секреторных гранул — баланс синтеза и выделения. Как показали расчеты, секреторный аппарат в целом у крыс гипертензивной линии развит сильнее даже у 18-суточных эмбрионов. Видно (рис. 3), что на ранних этапах онтогенеза (у эмбрионов и 12-суточных крысят) синтез и быстрое выделение пептидов преобладают над накоплением гранул в саркоплазме.

На более поздних этапах жизни синтез пептидов несколько ослабевает, но более резко тормозится процесс выделения продукта, и как результат — объем секреторных гранул в клетках прогрессивно увеличивается, достигая максимума у старых крыс-гипертоников.

Секреторные гранулы миоэндокринных клеток предсердий по ультраструктуре очень схожи с таковыми других пептидпродуцирующих эндокринных клеток — передней доли гипофиза, островков поджелудочной железы, APUD системы кишечника и др. На ультратонких срезах это, как правило, тельца строго округлой формы, диаметр которых варьирует у разных видов животных от

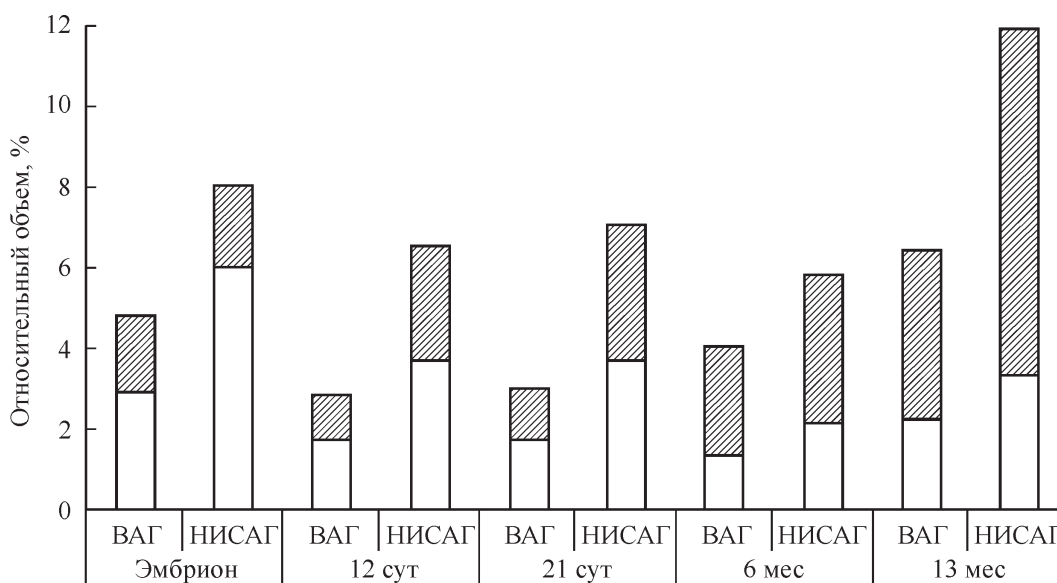


Рис. 3. Относительный объем секреторных структур — специфических гранул (заштрихованная часть столбцов) и комплексов Гольджи (светлая часть) в миоэндокринных клетках правого предсердия у разных линий крыс (ВАГ и НИСАГ) в онтогенезе.

Все межлинейные различия достоверны при  $P < 0.05$ .

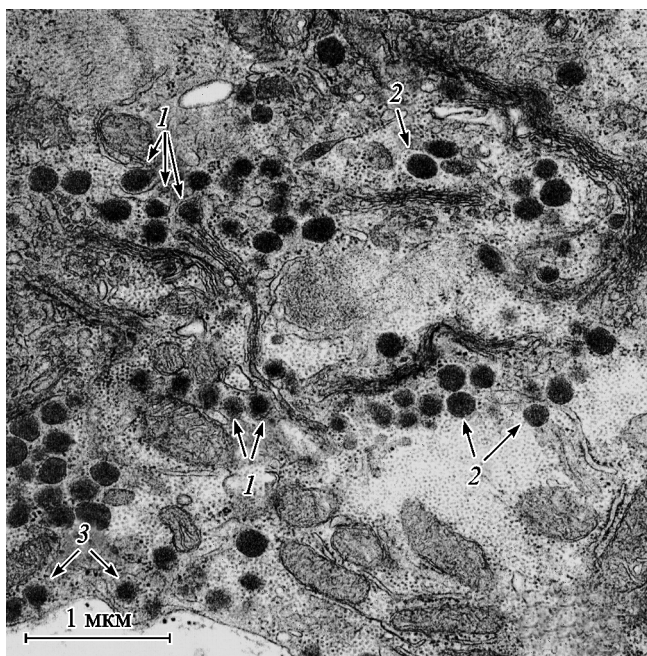


Рис. 4. Разнообразные формы секреторных гранул в миоэндокринных клетках правого предсердия крысы.

1 — формирующиеся, 2 — зрелые, 3 — растворяющиеся. Масштабная линейка — 1 мкм.

50 до 500 нм. Электронно-плотная гомогенная или тонкозернистая сердцевина гранул окружена одноконтурной мембраной, под которой иногда просматривается тонкий светлый ободок — гало.

Для анализа секреторного пула оказалось удобным выделять три основные ультраструктурные разновидности гранул, условно соотносящиеся со стадиями секреторного процесса: формирующиеся, зрелые и растворяющиеся формы (рис. 4). Согласно разработанным нами критериям, к формирующимся формам гранул относили мелкие гранулы, располагающиеся в зоне Гольджи. Как правило, их сердцевина имеет тонкозернистую структуру, а под мембраной различается тонкий светлый ободок.

Сам процесс формирования секреторных гранул можно восстановить на основании изучения большого количества электронных фотографий. На удачно прошедших срезах в просветах диктиосом Гольджи обнаруживается скопление рыхлого зернистого вещества, не прилегающего к мембране. Еще реже удается зафиксировать картину каплеобразного расширения на конце цистерны, в просвете которого располагается округлое тонкозернистое вещество умеренной электронной плотности. Понятно, что при другой ориентации срезов эти же структуры будут выглядеть как мелкие круглые вакуоли с плотным содержимым. Зрелые гранулы — самые крупные, как правило, округлой формы, с плотной гомогенной сердцевиной, к которой прилежит ограничительная мембрана. К растворяющимся формам относили менее плотные гранулы с размытыми контурами без целостной мембраны, как правило, отдаленные от комплексов Гольджи. Иногда гранулы теряют свое содержимое только с одного края, поэтому приобретают неправильные «изъеденные» или серповидные очертания. Серцевина таких гранул может быть неровной плотности или зернистой.

В ходе обработки электронных микрофотографий каждую гранулу относили к какой-либо из трех описанных категорий, определяли ее диаметр и подсчитывали общее количество гранул на той площади цитоплазмы миоэндокринной клетки, которая попала в срез. Это позволило не только определить процентный состав гранулярного пула в выборке, но и рассчитать показатели для всех гранул и для каждого подтипа — средний диаметр и количество на единицу площади цитоплазмы клеток. Абсолютные параметры (диаметры клеток и гранул, численная плотность профилей гранул на единицу площади цитоплазмы) позволяют сравнивать одноименные показатели в совершенно разных выборках — при воздействиях, у разных видов животных, в норме и при патологии. Нами было показано, что у эмбрионов кур и крыс на одинаковом этапе развития (18 из 21 сут, или 0.8 эмбриогенеза) степень развития секреторного аппарата в миоэндокринных клетках правого предсердия резко различается: у крыс гранул на порядок больше, чем у кур (в среднем  $349 \pm 22$  и  $21.20 \pm 2.38$  на  $1000 \text{ мкм}^2$  соответственно), и они в 1.5 раза крупнее ( $180.0 \pm 2.3$  и  $111.0 \pm 2.3$  нм в диа-

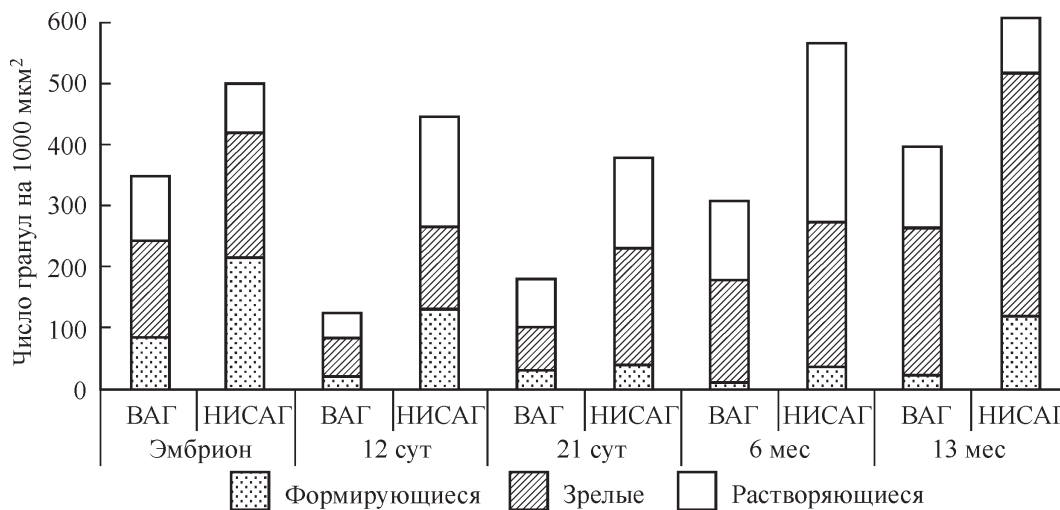


Рис. 5. Число (на  $1000 \text{ мкм}^2$ ) и состав секреторных гранул в миоэндокринных клетках правого предсердия у разных линий крыс в онтогенезе.

Все межлинейные различия достоверны при  $P < 0.05$ .

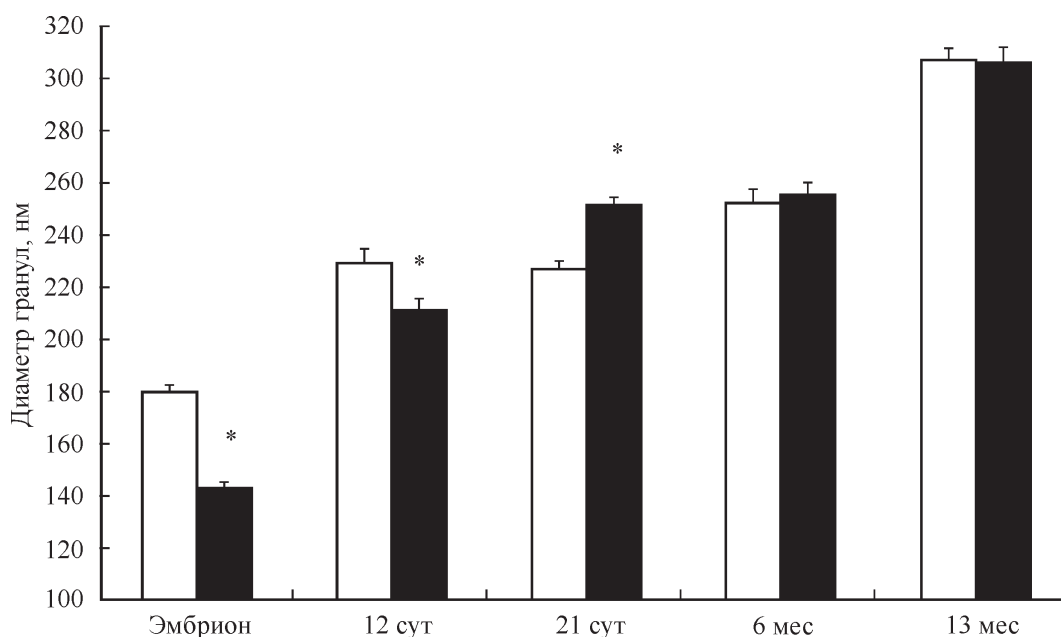


Рис. 6. Изменение диаметра (нм) секреторных гранул в миоэндокринных клетках у крыс линии ВАГ (светлые столбцы) и гипертензивной линии НИСАГ (черные столбцы) по ходу онтогенеза. Звездочкой показана достоверность межлинейных различий при  $P < 0.05$ .

метре соответственно) (Максимов, Коростышевская, 2012).

Такой методический подход способен выявлять достоверность и не столь явных различий анализируемых показателей. Например, стало понятно, почему у эмбрионов разных линий крыс при одинаковом диаметре миоэндокринных клеток (рис. 2) и содержании в них миофибрилл (36—37%), гликогена (22—23%) и секреторных гранул (около 2%) относительные объемы пластинчатых комплексов различаются вдвое (у линии ВАГ —  $2.90 \pm 0.21$ , у НИСАГ —  $6.00 \pm 0.31$  % соответственно). Оказалось, что у эмбрионов НИСАГ гранул в клетках в 1.5 раза больше, чем в контроле, они значительно мельче ( $143.0 \pm 1.9$  и  $180.0 \pm 2.3$  нм в диаметре соответственно), причем около половины составляют формирующиеся формы (рис. 5, 6). Эти данные позволяют заключить, что на 18-е сут развития у эмбрионов линии НИСАГ имеется повышенная потребность в натрийуретических пептидах, которые очень активно синтезируются и сразу выделяются из клеток, не накапливаясь в гранулярном депо.

На рис. 5 и 6 видно, что не только количество, но и средние размеры и качественный состав секреторных гранул в клетках претерпевают закономерные изменения по ходу онтогенеза и что эти параметры достоверно различаются у изученных линий крыс. У контрольных крыс ВАГ диаметр гранул по ходу онтогенеза постепенно увеличивается, а в постнатальный период неуклонно увеличивается и количество гранул в клетках. В составе гранул тоже отмечается динамика: у эмбрионов и крысят присутствие разных форм гранул достаточно равномерное, но по мере роста животных в клетках становится меньше формирующихся, а накапливаются зрелые формы, особенно на поздних этапах жизни.

Интересные заключения можно сделать на основании полученных данных о состоянии секреторной активности у старых крыс НИСАГ с тяжелой гипертензией и другими признаками сердечной дисфункции (расширенные полости сердца, дряблый миокард, отеки и др.). На втором

году жизни кардиомиоциты правого предсердия у крыс этой линии сильно гипертрофированы (рис. 2), объемные доли основных структур (миофибрилл и митохондрий) уменьшены (86.7 и 81.9 % соответственно), а присутствие секреторных структур увеличено почти вдвое по сравнению с одновозрастным контролем. Детализируя, отметим, что объем комплексов Гольджи повышен приблизительно в 1.5 раза, а секреторных гранул — в 2 раза

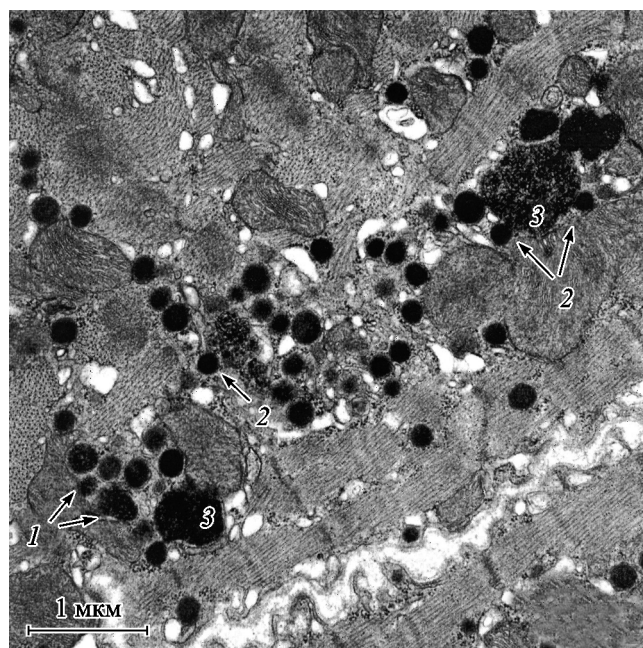


Рис. 7. Внутриклеточная утилизация секреторного продукта по типу кринофагии в миоэндокринных клетках правого предсердия у старых крыс-гипертоников линии НИСАГ.

1 — зернистое перерождение сердцевин гранул, 2 — слияние гранул, 3 — остаточные тельца. Масштабная линейка — 1 мкм.



Рис. 8. Экзоцитоз секреторных гранул в миоэндокринных клетках правого предсердия у крыс.

Масштабная линейка — 0,5 мкм.

(рис. 3). Эти данные хорошо согласуются с расчетными показателями, полученными другим морфометрическим способом, что свидетельствует в пользу объективности метода исследования: при одинаковом диаметре гранул (рис. 6) их численная плотность в 1.5 раза выше у крыс НИСАГ, чем ВАГ (рис. 5). Подробный анализ состава гранул в клетках старых крыс-гипертоников позволяет предположить нарушение в них секреторного процесса.

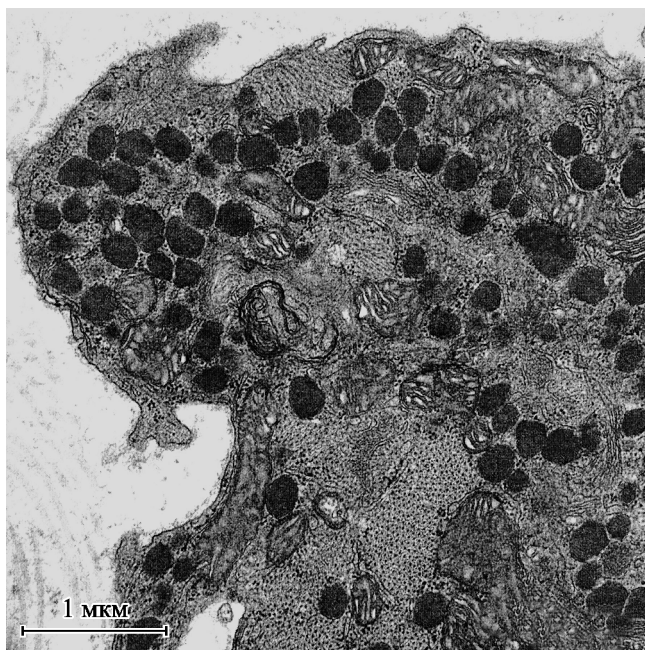


Рис. 9. Секреторные гранулы неправильной формы («мягкие») в саркоплазме миоэндокринных клеток правого предсердия крысы.

Масштабная линейка — 1 мкм.

Клетки активно продуцируют гранулы с секретом (гипертрофированы комплексы Гольджи и много формирующихся форм), но выделение гранул заторможено, поэтому в саркоплазме накапливается большое количество зрелых гранул (рис. 3, 5). В подтверждение тому в миоэндокринных клетках предсердий старых крыс-гипертоников обнаруживаются морфологические картины внутриклеточной утилизации секреторного продукта по типу «кринофагии». В срез одной гипертрофированной миоэндокринной клетки может попасть сразу несколько «пунктов переработки» излишков секреторного продукта в виде слившихся в крупный конгломерат гранул, который становится похожим на вторичную лизосому или остаточное тельце (рис. 7).

Описанный выше способ изучения секреторной деятельности миоэндокринных клеток позволяет оценивать не только «хронические» состояния (например, онтогенетическую динамику), но и «острые» изменения в ответ на специфические воздействия. Это можно продемонстрировать на примере 6-месячных крыс линии НИСАГ, у которых состав секреторных гранул в клетках показывает выраженное преобладание (более половины) растворяющихся форм при очень низкой скорости их формирования (всего 6.5%). Такая диспропорция может отражать реакцию стресс-чувствительных животных на условия эксперимента (перенос животных в другое помещение, измерение артериального давления, эфирный наркоз, резкие звуки и т. п.). Повышение артериального давления до 220 мм рт. ст. и другие изменения сердечно-сосудистой системы и гемодинамики в условиях эмоционального стресса вызывают ускоренное выделение секреторного продукта, накопленного в гранулах. На рис. 5 видно, что одновозрастные контрольные животные, более устойчивые к стрессу, содержат в миоэндокринных клетках более сбалансированный по составу пул секреторных гранул. Картины классического экзоцитоза гранул в миоэндокринных клетках наблюдались на электронно-микроскопических фотографиях наших образцов крайне редко (рис. 8), поскольку мы не использовали специальные методики для визуализации процесса — обработку тканей таниновой кислотой или быструю заморозку ультратонких срезов (Newman, Severs, 1990).

Не все разновидности гранул вписываются в предложенную классификацию. Иногда, особенно у животных на ранних стадиях онтогенеза, когда средний диаметр гранул в клетках не превышает 250 нм, в цитоплазме некоторых клеток обнаруживаются единичные округлые, типичные по структуре, но сверхкрупные гранулы, диаметр которых 500 нм и более. Является ли это результатом «сбоя» процесса формирования гранулы в аппарате Гольджи или особой формой запаса продукта впрок путем слияния гранул, неизвестно. У взрослых и старых крыс обеих изученных линий в саркоплазме предсердных миоэндокринных клеток гранулы много крупнее — средний диаметр около 350 нм, поэтому гранулы диаметром 500 нм входят в верхние перцентили выборки. В некоторых миоэндокринных клетках секреторные гранулы имели неправильные «мягкие» очертания, слегка зернистую сердцевину несколько пониженной плотности и интактную оболочку (рис. 9). Такие гранулы при подсчетах относили к зрелым формам.

Процессы транскрипции, трансляции и последующего процессинга полипептидов в миоэндокринных клетках изучены крайне слабо и не имеют четкого ультраструктурного проявления. Активация ядра при транскрипции

проявляется в изменении соотношения гетеро- и эухроматина, увеличении размеров, изменении структуры ядрышкового аппарата и нарастании плотности пор в оболочке. Соответствующие различия стереометрических показателей были нами обнаружены в ядрах предсердных миоцитов у 6-месячных крыс линий НИСАГ и ВАГ (контроль) (Максимов и др., 2004). К сожалению, эти признаки неспецифичны и отражают суммарную активность белкового синтеза в клетках. Нужно учитывать, что кардиомиоциты у крыс с высокой артериальной гипертензией гипертрофированы и содержат повышенный объем сократительных белков, поэтому однозначно соотнести данные об активации ядерного аппарата только с внешнесекреторной функцией, строго говоря, нельзя. Однако другие признаки гиперсекреции, такие как количество и относительный объем секреторных гранул и комплексов Гольджи в саркоплазме, дают основание именно для такой интерпретации полученных данных.

По нашим наблюдениям, белок-синтетический аппарат хорошо развит в миоэндокринных клетках только на стадии роста и дифференцировки в эмбриогенезе. Он представлен преимущественно свободными рибосомами и полисомами, которые пространственно связаны с формирующимися сократительными белками в миофибриллах. Шероховатая саркоплазматическая сеть в клетках взрослых особей развита слабо. Она подвергается выраженной гипертрофии в клетках больных с приобретенными пороками и тяжелыми формами сердечной дисфункции, когда в гипертрофированных предсердных миоцитах миофибрилярный аппарат атрофируется, а секреторная функция в клетках сохраняется (Коростышевская, Максимов, 1989; Щукин и др., 1990).

### Обсуждение

Миоэндокринные клетки — термин, не входящий в гистологическую номенклатуру (Семченко и др., 1999), но употребляемый в мировой специальной литературе для обозначения кардиомиоцитов, сочетающих сократительную активность с эндокринной секрецией. Основным морфологическим признаком этих клеток является наличие в саркоплазме специфических секреторных гранул. Обобщенный ультроструктурный образ миоэндокринной клетки предсердия у взрослых млекопитающих достаточно подробно описан в специальной литературе (Румянцев, 1982). Поскольку такие миоциты найдены в миокарде всех позвоночных животных, считается, что натрийуретические гормоны являются филогенетически очень древней регуляторной системой (Reinhart, Zehr, 1994; Inoue, Takei, 2006; Trajanovska et al., 2007; Trajanovska, Donald, 2008; Takei et al., 2011). У большинства животных наибольшая плотность миоэндокринных клеток обнаружена в правом предсердии, что позволяет мониторировать гемодинамику и незамедлительно усиливать выделение гормонов из миоцитов в ответ на механическое растяжение стенки предсердия при избыточном давлении или объеме крови, поступающей в сердце по большому кругу кровообращения.

Известно, что у эмбрионов все кардиомиоциты на стадии дифференцировки обладают эндокринной активностью, но в процессе гистогенеза, с увеличением гемодинамических нагрузок и сократительной активности, миоциты желудочков эту способность теряют (Nava-

ratnam et al., 1989). У взрослых особей при патологиях с тяжелой сердечной недостаточностью и гемодинамическими нарушениями наблюдаются «разблокирование» эмбриональных генов и восстановление секреции натрийуретических пептидов в миокарде желудочков (De-Bold et al., 1996; Cameron, Ellmers, 2003). Можно предположить, что бифункциональность клеток предсердий является отражением их менее глубокой дифференцировки и расплатой (наградой) за слабую сократительную способность.

Количество гранул в клетках, особенности их строения и распределения очень разнятся у разных видов животных, у животных одного вида в разных функциональных состояниях. Неоднократно предпринимались попытки использовать морфологические и морфометрические показатели гранул для оценки эндокринной активности клеток (Gall et al., 1990; Avramovitch et al., 1995; Azizov, Muradova, 2003; Gama et al., 2007; Tylkova et al., 2008). Однако до сих пор нет общепризнанных критериев и однозначных показателей, поскольку нет и четкого понимания особенностей внутриклеточных молекулярно-биохимических процессов, участвующих в синтезе, накоплении и выделении натрийуретических пептидов. Поясним на конкретных примерах. В предсердных миоцитах у старых 13-месячных крыс накапливается очень много секреторных гранул (Коростышевская, Максимов, 2013). Это свидетельствует о повышенной эндокринной активности клеток или, наоборот, гранулы накапливаются из-за замедленного их выделения? Или если гранул в миоцитах мало, как у куриных эмбрионов (Максимов, Коростышевская, 2012), то что это — низкая активность или быстрое выделение синтезированного продукта при повышенной потребности в нем?

Остаются открытыми вопросы о том, все ли клетки предсердий теоретически и практически способны к секреции натрийуретических пептидов, сохраняется ли эта способность на протяжении всей жизни особи, обратимо или необратимо она изменяется при разных функциональных состояниях. Если гранул в клетке мало или они кучно расположены в зоне Гольджи, то при неудачной ориентации среза клетки (косой или поперечный вне ядерной зоны) секреторные гранулы могут не попадать в ультратонкий срез клетки, и тогда однозначно отнести конкретную клетку к миоэндокринным или сократительным разновидностям нельзя. В этой связи для объективизации данных о морфофункциональном состоянии миоэндокринных клеток очень важно соблюдение правил забора материала из топографически одинаковых участков миокарда предсердия, строгой ориентации срезов для качественного и количественного исследования, репрезентативности выборок и других принципов стереоморфометрии.

Процессы выделения натрийуретических пептидов из миоэндокринных клеток изучены очень недостаточно и с физиологической (специфическая регуляция и стимулы), и с молекулярно-биохимической (процессинг из прогормонов в гормоны и другие производные), и с морфологической (везикулярный транспорт, внутриклеточное растворение гранул, экзоцитоз) точек зрения (Suzuki et al., 1992; De Bold et al., 1996; Ogawa et al., 1999; Baertschi et al., 2001; Zhang, Pasumarthi, 2007; Goetze, 2010). Установлено (O'Donnell et al., 2003; Muth et al., 2004), что в составе секреторных гранул миоэндокринных клеток насчитывается до ста разных белков, из них идентифицировано только около шестидесяти. Больше всего среди бел-

ков предсердного натрийуретического пептида в форме прогормона, сигнальный пептид которого отделяется под действием фермента корина в процессе выделения секрета из клетки. Назначение других компонентов секреторных гранул доподлинно неизвестно.

**Заключение.** Накопленный нами многолетний опыт ультраструктурного исследования миоэндокринных клеток предсердий позволил выработать оптимальный алгоритм морфометрических приемов, дающих наиболее полную информацию о состоянии секреторного аппарата в этих клетках. Несмотря на некоторую условность деления гранул на три типа, наличие переходных форм между ними и обнаружение атипичных гранул, при достаточном опыте оператора, соблюдении принципов морфометрии и наборе репрезентативных выборок можно получить достаточно выразительные результаты. Такой подход использовался в разных модификациях и другими исследователями для оценки секреторных процессов в различных клетках и у различных видов животных (Mifune et al., 1991; Azizov, Muradova, 2003; Крылова, 2007; Рахчеева, Бургова, 2010).

Предложенный методологический подход, включающий в себя ультраструктурное качественное и стереоморфометрическое исследование функциональной активности клеток, не лишен существенных ограничений. Во-первых, метод электронной микроскопии очень трудоемкий и подразумевает высокую квалификацию исследователей. Во-вторых, он не позволяет получить данные о количестве и распределении миоэндокринных клеток в миокарде у конкретных видов животных для совокупной оценки активности натрийуретической системы. Для аргументированной интерпретации полученных морфологических данных не хватает сведений о посттрансляционном процессинге натрийуретических пептидов и о биохимическом составе секреторных гранул, о содержании гормонов в миокарде и в периферической крови.

На примере онтогенетического изучения двух линий крыс показано, что определенный совокупный набор качественных и количественных параметров миоэндокринных клеток предсердий позволяет оценивать состояние натрийуретической (гипотензивной) гуморальной системы и ее хронические и острые реакции в ответ на изменения гемодинамики. Такой подход достаточно чувствителен и информативен, что очень актуально в свете недостатка в настоящее время других общепризнанных, специфических и точных методов изучения натрийуретических пептидов сердца.

### Список литературы

Автандилов Г. Г. 1990. Медицинская морфометрия. М.: Медицина. 384 с.

Волкова Н. Н., Драпкина О. М., Ивашкин В. Т. 2006. Ультраструктурные и функциональные особенности кардиомиоцитов предсердий и желудочков. Клиническая медицина. 11 : 11—16.

Коростышевская И. М., Максимов В. Ф. 1989. Ультраструктурные особенности гормон-продуцирующих кардиомиоцитов в некоторых экспериментальных и клинических условиях. Архив АГЭ. 2 : 42—49.

Коростышевская И. М., Максимов В. Ф. 2012. Где и когда в сердце секретируются натрийуретические пептиды. Онтогенез. 43 (3) : 1—12.

Коростышевская И. М., Максимов В. Ф. 2013. Возрастные особенности миоэндокринных клеток сердца у крыс в норме и при наследственной гипертензии. Онтогенез. 44 (2) : 1—13.

Крылова М. И. 2007. Хромогранин А: иммуноцитохимическая локализация в секреторных гранулах кардиомиоцитов предсердия лягушки. Цитология. 49 (7) : 538—543.

Максимов В. Ф., Коростышевская И. М. 2011. Гормональная система сердца как звено регуляции гемодинамики и водно-солевого гомеостаза. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 97 (3) : 263—275.

Максимов В. Ф., Коростышевская И. М. 2012. Морфогенез и реакция на гипоксию миоэндокринных клеток предсердия у куриных эмбрионов (*Gallus gallus*). Журн. эволюц. биохим. физиол. 48 (5) : 502—508.

Максимов В. Ф., Коростышевская И. М., Маркель А. Л., Шмерлинг М. Д., Якобсон Г. С. 2004. Структурные особенности кардиомиоцитов правого предсердия у крыс гипертензивной линии НИСАГ. Бюл. эксперим. биол. мед. 138 (7) : 4—8.

Маркель А. Л. 1985. Генетическая модель индуцированной стрессом артериальной гипертензии. Изв. АН СССР. Сер. биол. 3 : 466—469.

Маслова Л. Н., Булыгина В. В., Маркель А. Л. 2002. Влияние хронического стресса в препубертатном периоде на развитие наследственной артериальной гипертензии. Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. 88 (6) : 774—780.

Непомнящих Л. М., Е. Л. Лушикова, Г. И. Непомнящих. 1986. Морфометрия и стереометрия гипертрофии сердца. Новосибирск: Наука. 304 с.

Рахчеева М. В., Бургова М. Л. 2010. Изменение соотношения гранул А- и В-типов, содержащих предсердный и мозговой натрийуретические пептиды, в предсердных миоцитах крыс в условиях вазоренальной гипертензии. Цитология. 52 (8) : 629—633.

Румянцев П. П. 1982. Кардиомиоциты в процессах репродукции, дифференцировки и регенерации. Л.: Наука. 288 с.

Семченко В. В., Самусев П. П., Моисеева М. В., Колосова З. Л. 1999. Международная гистологическая номенклатура (на латинском, русском и английском языках). 3-е изд. Омск: Омская мед. акад. 156 с.

Щукин В. С., Максимов В. Ф., Коростышевская И. М., Валька Е. Н. 1990. Различия в перестройке ультраструктуры миоцитов предсердий и желудочков на этапах коррекции митральных пороков сердца. Архив патол. 4 : 25—30.

Avramovitch N., Hoffman A., Winaver J., Haramati A., Lewinson D. 1995. Morphometric analysis of atrial natriuretic peptide-containing granules in atrioocytes of rats with experimental congestive heart failure. Cell Tissue Res. 279 : 575—583.

Azizov V. A., Muradova S. R. 2003. Immunohistochemical and electron-microscopic characterization of secretory cardiomyocytes in experimental myocardial infarction. Anadolu Kardiol. Derg. 4 : 299—302.

Baertschi A. J., Monnier D., Schmidt U., Schmidt U., Levitan E. S., Fakan S., Roatti A. 2001. Acid prohormone sequence determines size, shape, and docking of secretory vesicles in atrial myocytes. Circ. Res. 89 : E23—E29.

Cameron V. A., Ellmers L. J. 2003. Minireview: natriuretic peptides during development of the fetal heart and circulation. Endocrinology. 144 : 2191—2194.

Clerico A., Emdin M. 2004. Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: a review. Clin. Chem. 50 : 33—50.

Clerico A., Ry S. D., Giannessi D. 2000. Measurement of cardiac natriuretic hormones (atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and related peptides) in clinical practice: the need for a new generation of immunoassay methods. Clin. Chem. 46 : 1529—1534.

De Bold A. J., Borenstein H. B., Veress A. T., Sonnenberg H. 1981. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats. Life Sci. 28 : 89—94.

De Bold A. J., Bruneau B. G., de Bold M. L. 1996. Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart. Cardiovasc. Res. 31 : 7—18.

Gall J. A., Alcorn D., Fernley R., Coghlan J. P., Ryan G. B. 1990. Qualitative and quantitative analysis of granules in atrial ap-



pendage cardiocytes in different physiological states. *Cell Tissue Res.* 259 : 529—534.

Gama E. F., Liberti E. A., de Souza R. R. 2007. Effects of pre- and postnatal protein deprivation on atrial natriuretic peptide-(ANP) granules of the right auricular cardiocytes. An ultrastructural morphometric study. *Eur. J. Nutr.* 46 : 245—250.

Gardner D. G., Chen S., Glenn D. J., Grigsby C. L. 2007. Molecular biology of the natriuretic peptide system. Implications for physiology and hypertension. *Hypertension.* 49 : 419—426.

Goetze J. P. 2010. Biosynthesis of cardiac natriuretic peptides. *Results Probl. Cell Differ.* 50 : 97—120.

Goetze J. P., Kastrup J., Rehfeld J. F. 2003. The paradox of increased natriuretic hormones in congestive heart failure patients: does the endocrine heart also fail in heart failure? *Eur. Heart J.* 24 : 1471—1472.

Inoue K., Takei Y. 2006. Molecular evolution of the natriuretic peptide system as revealed by comparative genomic. *Comp. Biochem. Physiol.* 1 : 69—76.

Kangawa K., Matsuo H. 1984. Purification and complete amino acid sequence of  $\alpha$ -human atrial natriuretic polypeptide ( $\alpha$ -hnp). *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 118 : 131—139.

Langenickel T., Pagel I., Hohnel K., Dietz R., Willenbrock R. 2000. Differential regulation of cardiac ANP and BNP mRNA in different stages of experimental heart failure. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 278 : H1500—H1506.

Maack T. 2006. The broad homeostatic role of natriuretic peptides. *Arq. Bras. Endocrinol. Metab.* 50 : 198—207.

Marei H. E. 2002. Fine structural and immunohistochemical localization of cardiac hormones (ANP) in right atrium and hypothalamus of the white rat. *Eur. J. Morphol.* 40 : 37—41.

Mifune H., Suzuki S., Noda Y., Mohri S., Mochizuki K. 1991. Fine structure of atrial natriuretic peptide (ANP)-granules in the atrial cardiocytes of the mouse, rat and Mongolian gerbil. *Jikken Dobutsu.* 40 : 183—193.

Muth E., Driscoll W. J., Smalstig A., Goping G., Mueller G. P. 2004. Proteomic analysis of rat atrial secretory granules: a platform for testable hypotheses. *Biochim. biophys. acta.* 1699 (1—2) : 263—275.

Navaratnam V., Woodward J. M., Skepper J. N. 1989. Specific heart granules and natriuretic peptide in the developing myocardium of fetal and neonatal rats and hamsters. *J. Anat.* 163 : 261—273.

Newman T. M., Severs N. J. 1990. Arrested exocytosis of atrial secretory granules. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 22 : 771—786.

O'Donnell P. J., Driscoll W. J., Back N., Muth E., Mueller G. P. 2003. Peptidylglycine- $\alpha$ -amidating monooxygenase and pro-atrial natriuretic peptide constitute the major membrane-associated proteins of rat atrial secretory granules. *J. Mol. Cell. Cardiol.* 35 : 915—922.

Ogawa T., Vatta M., Bruneau B. G., de Bold A. J. 1999. Characterization of natriuretic peptide production by adult heart atria. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 276, Issue 6 : H1977—H1986.

Potter L. R., Abbey-Hosch S., Dickey D. M. 2006. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions. *Endocrine Rev.* 22 : 47—72.

Reinhart G. A., Zehr J. E. 1994. Atrial natriuretic factor in the freshwater turtle *Pseudemys scripta*: a partial characterization. *Gen. Comp. Endocrinol.* 96 : 259—269.

Stephenson T. J., Pipkin F. B. 1990. Atrial natriuretic factor: the heart as an endocrine organ. *Arch. Dis. Child.* 65 : 1293—1294.

Suzuki E., Hirata Y., Kohmoto O., Sugimoto T., Hayakawa H., Matsuo H., Sugimoto T., Kojima M., Kangawa K., Minamino N. 1992. Cellular mechanisms for synthesis and secretion of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in cultured rat atrial cells. *Circ. Res.* 71 : 1039—1048.

Takei Y., Inoue K., Trajanovska S., Donald J. 2011. B-type natriuretic peptide (BNP), not ANP, is the principal cardiac natriuretic peptide in vertebrates as revealed by comparative studies. *Gen. Comp. Endocrinol.* 171 : 258—266.

Trajanovska S., Donald J. A. 2008. Molecular cloning of natriuretic peptides from the heart of reptiles: loss of ANP in diapsid reptiles and birds. *Gen. Comp. Endocrinol.* 156 : 339—346.

Trajanovska S., Inoue K., Takei Y., Donald J. A. 2007. Genomic analyses and cloning of novel chicken natriuretic peptide genes reveal new insights into natriuretic peptide evolution. *Peptides.* 28 : 2155—2163.

Tylkova L., Novotova M., Zahradnik I., Kiss A. 2008. Evaluation of changes in secretory granules of atrial myocytes: a morphometric approach. *Anal. Quant. Cytol. Histol.* 30 : 53—59.

Van Kimmenade R. R., Januzzi J. L. 2009. The evolution of the natriuretic peptides — Current applications in human and animal medicine. *J. Vet. Cardiol.* 11 (Suppl. 1) : S9—S21.

Vesely D. L. 2006. Which of the cardiac natriuretic peptides is most effective for the treatment of congestive heart failure, renal failure and cancer? *Clin. Exp. Pharm. Physiol.* 33 : 169—176.

Vesely D. L. 2007. Discovery of new cardiovascular hormones for the treatment of congestive heart failure. *Cardiovasc. Hematol. Disord. Targets.* 7 : 47—62.

Woodard G. E., Rosado J. A. 2007. Recent advances in natriuretic peptide research. *J. Cell. Mol. Med.* 11 : 1263—1271.

Zhang F., Pasumarthi K. B. 2007. Ultrastructural and immunohistochemical characterization of undifferentiated myocardial cells in the developing mouse heart. *J. Cell. Mol. Med.* 11 : 552—560.

Поступила 15 IV 2013

## ULTRASTRUCTURAL ESTIMATION FACILITIES OF ATRIAL CARDIOMYOCYTE SECRETORY ACTIVITY

I. M. Korostyshevskaya,<sup>1</sup> V. F. Maksimov, S. A. Kurganov

Institute of Physiology SB RAMS, Novosibirsk;

<sup>1</sup> e-mail: kor@physiol.ru

The wide experience in the ultrastructural study of myoendocrine cells of different animal species in normal and experimental conditions allows us to choose the optimal methodology that gives the most complete information about the state of intracellular secretory apparatus. It is revealed that the combined set of atrial myoendocrine cell qualitative and quantitative parameters allows defining the natriuretic regulatory system status, as well as its acute and chronic responses to hemodynamic changes. The information value of such approach is illustrated by examples of the ontogenetic investigation in two rat lines: with normal arterial blood pressure and with inherited stress-induced arterial hypertension. The proposed methodology is quite sensitive and descriptive; so it is of high importance due to insufficiency of other universal, specific, and accurate methods for cardiac natriuretic peptides investigation.

Key words: cardiomyocyte, natriuretic peptide, electron microscopy, stereomorphometry.