

ИЗМЕНЕНИЯ МИОЭНДОКРИННЫХ КЛЕТОК ПРАВОГО ПРЕДСЕРДИЯ У КРЫС ПРИ ГИПЕРТЕНЗИИ И ПОСЛЕ СНИЖЕНИЯ АРТЕРИАЛЬНОГО ДАВЛЕНИЯ

© В. Ф. Максимов, И. М. Коростышевская,* С. А. Курганов, А. Л. Маркель, Н. С. Руденко, Г. С. Якобсон

Научно-исследовательский институт физиологии и фундаментальной медицины СО РАМН, Новосибирск;

* электронный адрес: kor@physiol.ru

Известно, что кардиомиоциты предсердий наряду с сократительной функцией осуществляют синтез, накопление в секреторных гранулах и выделение натрийуретических пептидов. Основные физиологические эффекты натрийуретических пептидов сводятся к антагонизму с ренин-ангиотензин-альдостероновой системой, однако их участие в развитии гипертензии остается спорным. Цель данного исследования — с помощью электронной микроскопии оценить секреторную активность миоэндокринных клеток предсердия у крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (линия НИСАГ). Показано, что у крыс НИСАГ при артериальном давлении около 180 мм рт. ст. в предсердных миоэндокринных клетках имеются признаки усиленного синтеза, чрезмерного накопления и выделения натрийуретических пептидов по сравнению с нормотензивным контролем. У крыс, получавших лозартан (блокатор ангиотензиновых рецепторов), при стойком снижении артериального давления до 140 мм рт. ст. в миоэндокринных клетках изменяется состав, уменьшаются количество и диаметр секреторных гранул, редуцируются пластинчатые комплексы и усиливается внутриклеточное разрушение запасов секреторного продукта. Параллельно в миокарде наблюдали резкое полнокровие капилляров и отек интерстиция. Таким образом, у крыс с тяжелой наследственной гипертензией секреторная активность миоэндокринных клеток резко повышена и прямо соотносится с уровнем артериального давления. Это доказывает активное участие натрийуретических пептидов в регуляции гемодинамики при сердечно-сосудистой патологии.

Ключевые слова: кардиомиоцит, натрийуретические пептиды, артериальная гипертензия, лозартан, электронная микроскопия.

Принятые сокращения: АД — артериальное давление, РААС — ренин-ангиотензин-альдостероновая система.

Миоэндокринные клетки — это номенклатурное название предсердных кардиомиоцитов, у которых сократительная функция сочетается с секрецией натрийуретических пептидов. Сердечные гормоны были открыты, идентифицированы и синтезированы в конце прошлого века, о них накоплено уже много разнообразной информации, которая постоянно дополняется и обобщается в научных обзорах (Maack, 2006; Potter et al., 2006; Gardner et al., 2007; Максимов, Коростышевская, 2011; Коростышевская, Максимов, 2012). Подавляющий объем знаний о сердечных натрийуретических пептидах получен с помощью биохимических, молекулярно-генетических, иммуноферментных и других самых современных методов исследования. Согласно общепризнанной концепции, существует два основных сердечных пептида: ANP (atrial natriuretic peptide) из 28 аминокислотных остатков, который продуцируется предсердными миоцитами в норме, и BNP (brain natriuretic peptide) из 32 аминокислотных остатков, продукция которого резко усиливается в предсердиях и появляется в желудочках при сердечно-сосудистой патологии, особенно в тяжелых и осложненных случаях (Langenickel et al., 2000; Cameron, Ellmers, 2003).

В предсердных кардиомиоцитах содержится в основном атриальный натрийуретический прогормон, который в ответ на растяжение клеток выделяется в форме гормона, а затем в крови претерпевает дальнейшие метаболические превращения (Ogawa et al., 1999; Goetze et al., 2003; Goetze, 2010). Предсердные пептиды определяются в плазме крови в пиколярных концентрациях и оказывают выраженное натрийуретическое, сосудорасширяющее и гипотензивное действие, т. е. являются антагонистами ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) (Bonow, 1996). Постоянная «борьба» прессорных и депрессорных регуляторов поддерживает водно-солевой баланс в организме, а преобладание вазоконстрикторов приводит к развитию гипертензии и других сердечно-сосудистых нарушений. Интересно, что при гипертензии выделение сердечных пептидов не подавляется, а нарастает. Более того, чем тяжелее сердечная дисфункция, тем выше концентрация гипотензивных гормонов в крови. Причины и механизмы этого гормонального парадокса до конца не исследованы (Vesely, 2006, 2007).

Неоднократно доказано, что пептиды накапливаются в саркоплазме предсердных миоцитов разных видов жи-

вотных в специфических секреторных гранулах диаметром 50—500 нм (Navaratnam et al., 1989; Baertschi et al., 2001; Marei, 2002; Крылова, 2007; Рахчеева, Бугрова, 2010). Недостаток современных морфологических исследований тормозит изучение механизмов функционирования гипотензивной натрийуретической системы в норме и при патологии. Электронно-микроскопические методы снабжают ценной информацией об истинной секреторной активности клеточных источников гормонов, которую трудно получить другими способами. Накопленный авторами многолетний опыт ультраструктурного исследования миоэндокринных клеток предсердий позволил выработать оптимальный алгоритм морфометрических приемов, дающих наиболее полную информацию о состоянии секреторного аппарата этих клеток, о его хронических и острых реакциях на изменения гемодинамики (Жоростышевская и др., 2013). Такой подход дает возможность адекватно оценивать секреторную активность миоэндокринных клеток в различных физиологических, патологических и экспериментальных условиях.

Задача настоящей работы — оценить секреторную активность миоэндокринных клеток предсердия у крыс с наследственной гипертензией и описать изменения их ультраструктуры на фоне устойчивого фармакологического снижения артериального давления (АД).

Материал и методика

Линия крыс НИСАГ с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией как модель эссенциальной гипертонии была получена в Институте цитологии и генетики СО РАН путем селекции на основе аутбредной линии Вистар (Маркель, 1985). Для взрослых крыс-самцов линии НИСАГ характерно высокое АД в покое (до 180 мм рт. ст.) и особенно в условиях эмоционального стресса (до 220 мм рт. ст.). Комплексное исследование выявило у этих животных изменения гормональных звеньев регуляции гемодинамики — гипофизарно-надпочечниковой, РААС и инсулин-адреналовой систем (Маслова и др., 2002).

В экспериментальной группе пять самцов в возрасте 6 мес получали ежедневно в 9 ч утра антагонист рецепторов ангиотензина II (АТ1-подтип) лозартан (Losartan, Merck Sharp & Dohme, Нидерланды) в дозе 10 мг/кг в виде водного раствора через зонд в желудок в течение 16 сут. Пять одновозрастных животных в группе плацебо получали такую же дозу воды при тех же условиях. До начала эксперимента, на 10-е и 16-е сут эксперимента измеряли АД сфигмографическим методом на хвосте (tail-cuff method) на фоне кратковременного эфирного рауш-наркоза, что позволило избежать влияния стресса, связанного с процедурой измерения. На 17-е сут крыс умерщвляли гильотинированием под эфирным наркозом согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» и директиве Европейского сообщества (86/609/ЕС). Одновозрастные крысы-самцы линии ВАГ (WAG) служили нормотензивным контролем.

Для морфологического исследования ушко правого предсердия фиксировали в растворе 2,5 %-ного глутарового альдегида и 2 %-ного параформа, дофиксировали в 1 %-ном растворе OsO_4 и заливали в смесь Эпона с Аралдитом. Полутонкие поперечные срезы (около 1 мкм) миокарда окрашивали толуидиновым синим, просматривали

в микроскопе Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия) при увеличении объектива 40 \times и фотографировали камерой AxioCam ICc 3 (Carl Zeiss, Германия). Ультратонкие продольные срезы миокарда (около 50 нм) контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца, просматривали в электронном микроскопе JEM-1400 (Jeol, Япония) и фотографировали камерой Veleta 4 Mpxl (Olympus, Япония). Стереоморфометрию проводили в пакете iTEM 5.1 (Olympus, Япония). На светооптическом уровне с помощью открытой квадратной тестовой решетки с шагом 10 мкм определяли относительные объемы кардиомиоцитов, соединительной ткани и отдельно просветов капилляров в миокарде, подсчитывали численную плотность капилляров на единицу площади среза и вычисляли паренхимно-стромальное отношение. На ультраструктурном уровне измеряли размеры кардиомиоцитов в области ядра и диаметры секреторных гранул в них. Не менее чем на 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.

Для анализа гранулярного пула в миоэндокринных клетках оказалось удобным выделять несколько основных ультраструктурных разновидностей гранул, условно соотносящихся со стадиями секреторного процесса: формирующиеся, зрелые и растворяющиеся формы. Согласно разработанным критериям, к формирующимся гранулам относили мелкие гранулы, располагающиеся в зоне Гольджи. Их сердцевина имеет тонкозернистую структуру, а под мембраной различается тонкий светлый ободок. Зрелые гранулы — самые крупные, как правило, округлой формы, с плотной гомогенной сердцевиной, к которой прилежит ограничительная мембрана. К растворяющимся формам относили менее плотные гранулы, часто с крупнозернистым содержимым, с размытыми контурами без целостной мембраны, наиболее отдаленные от комплексов Гольджи. Учитывали также разные формы внутриклеточной деградации гранул. В ходе обработки электронных микрофотографий каждую гранулу относили к какой-либо из описанных категорий, определяли ее диаметр и подсчитывали общее количество гранул на той площади цитоплазмы миоэндокринной клетки, которая попала в срез. Это позволило определить не только 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. Как было показано ранее, такая методика достаточно чувствительна, информативна и позволяет оценивать состояние секреторного аппарата мышечных клеток предсердий (Жоростышевская и др., 2013).

Статистическую обработку вариационных рядов и проверку их на нормальность распределения проводили в пакете Statistica 6.0. Результаты представлены в виде средних значений и их ошибки. Достоверность различий с контролем определяли с помощью *t*-критерия Стьюдента для $P < 0.05$.

Реактивы: глутаровый альдегид, параформальдегид, эпоксидные смолы, уранил-ацетат, цитрат свинца, толуидиновый синий (Serva feinbiochemica GmbH, Германия) и четырехокись осмия (Реахим, Московский химзавод им. П. Л. Войкова, Россия).

Т а б л и ц а 1

Параметры кардиомиоцитов правого предсердия крыс линий ВАГ и НИСАГ

Параметр	Контроль	НИСАГ	
	ВАГ	плацебо	лозартан
Артериальное давление, мм рт. ст.	121 ± 4	178 ± 2.6 ^a	142 ± 4.2 ^b
Относительный объем, %:			
миофибрилл и митохондрий	85.30 ± 0.50 (60)	83.90 ± 0.81 (40)	87.60 ± 0.67 ^b (50)
гликогена	2.80 ± 0.18 (60)	0.70 ± 0.12 ^a (40)	0.60 ± 0.09 (50)
комплекса Гольджи	1.30 ± 0.14 (60)	2.20 ± 0.23 ^a (40)	0.70 ± 0.11 ^b (50)
гранул	2.70 ± 0.31 (60)	6.40 ± 0.57 ^a (40)	4.50 ± 0.48 ^b (50)
фагосом			0.90 ± 0.16 (50)
других органоидов	8.20 ± 0.39 (60)	6.80 ± 0.41 ^a (50)	5.70 ± 0.29 ^b (50)
Диаметр гранул, нм:			
всех типов	252.0 ± 5.3 (241)	297.0 ± 6.5 ^a (286)	223.0 ± 3.6 ^b (362)
зрелых	269.0 ± 4.9 (122)	396.0 ± 5.8 ^a (129)	348.0 ± 9.9 ^b (34)
растворяющихся	241 ± 10 (109)	256.0 ± 7.3 ^a (73)	218.0 ± 3.5 ^b (233)
формирующихся	167.0 ± 12.7 (10)	183.0 ± 4.7 (77)	—
рудиментарных	—	163.0 ± 16.3 (7)	189.0 ± 5.3 (95)
Количество гранул на 1000 мкм ²	309 ± 20 (60)	557 ± 45 ^a (40)	337 ± 28 ^b (50)

Примечание. В скобках — число измерений у 6 крыс ВАГ и у 5 крыс в каждой группе НИСАГ. ^a Различия между контролем и НИСАГ группы «плацебо» достоверны при $P < 0.05$. ^b Различия между НИСАГ группы «лозартан» и НИСАГ группы «лозартан» достоверны при $P < 0.05$.

Результаты

В эксперимент были взяты 6-месячные крысы-самцы линии ВАГ и НИСАГ массой около 350 г. У крыс НИСАГ до начала эксперимента систолическое АД составляло в среднем 174 ± 3.9 мм рт. ст., что значительно превышало АД нормотензивных крыс ВАГ (121 ± 4 мм рт. ст.). В группе крыс НИСАГ, получавших в ходе эксперимента воду, динамики АД не выявлено. В группе крыс НИСАГ,

получавших лозартан, уже на 10-е сут лечения АД было снижено до 146 ± 5.2 мм рт. ст., или на 16.5 % ($P < 0.05$), по сравнению с группой, получавшей воду (170 ± 2.4 мм рт. ст.). Еще через 1 нед, в конце эксперимента, межгрупповая разница у крыс НИСАГ составляла 36 мм рт. ст., или 20 % (табл. 1).

Известно, что для миоцитов предсердий в отличие от желудочков характерно наличие хорошо развитых органоидов, участвующих в синтезе, накоплении и выделении

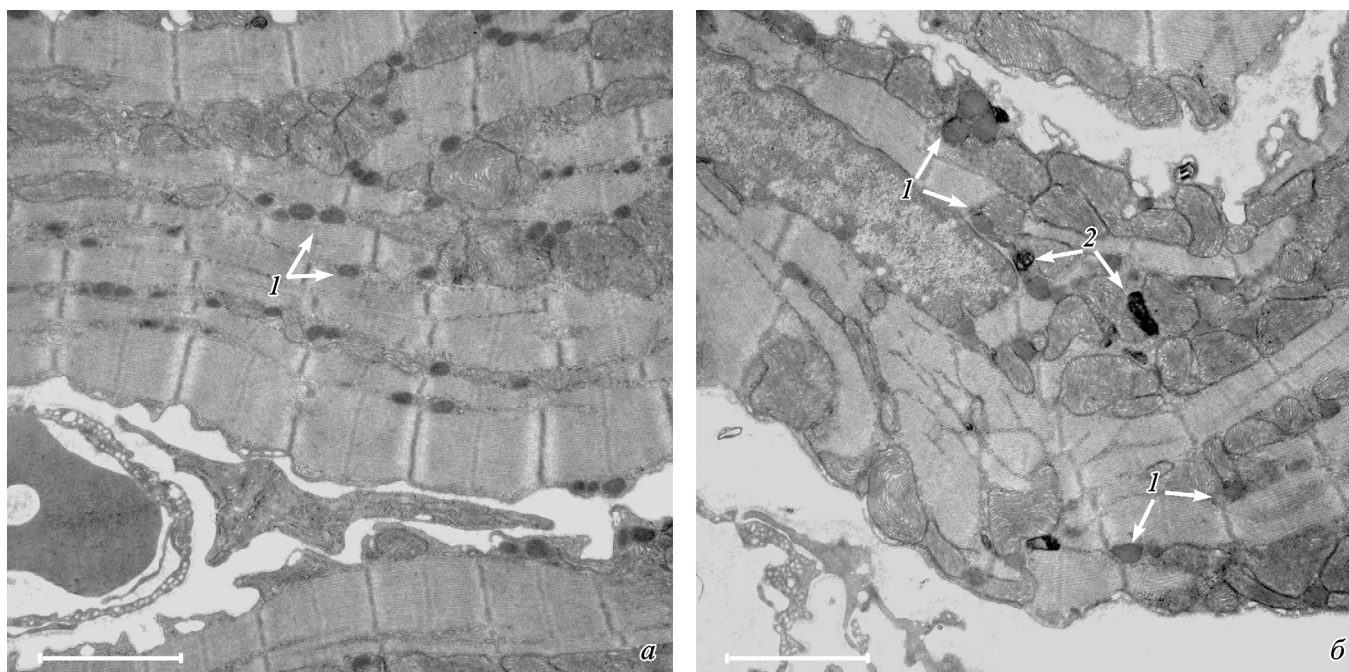


Рис. 1. Миоэндокринные клетки правого предсердия у крыс с гипертензией линии НИСАГ в группе «плацебо» (а) и в группе, получавшей лозартан (б).

1 — секреторные гранулы, 2 — рудиментарные тельца. Масштабные отрезки — 2 мкм.

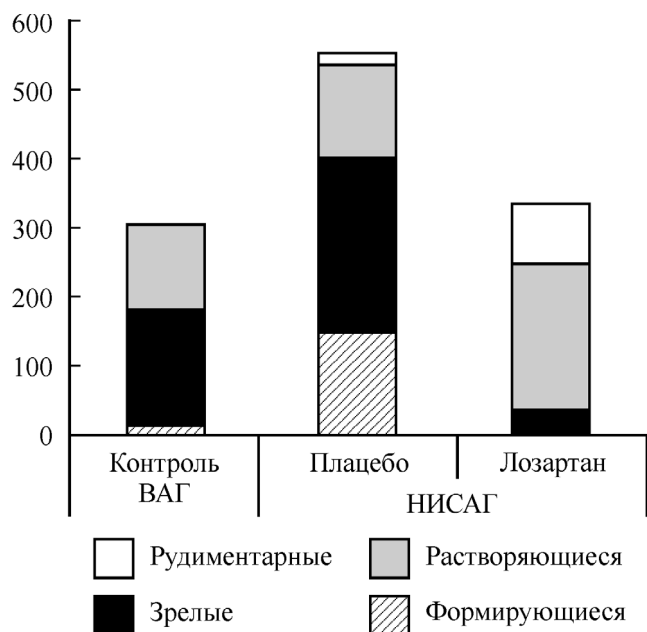


Рис. 2. Число (на 1000 мкм² саркоплазмы) и состав секреторных гранул (формирующиеся, зрелые, растворяющиеся формы, рудиментарные) в миоэндокринных клетках правого предсердия у разных линий крыс в контроле и эксперименте.

секреторных продуктов (Волкова и др., 2006; Chimenti et al., 2010). Проведенное ультраструктурное исследование и полученные стереоморфометрические показатели миоэндокринных клеток крыс однозначно свидетельствуют о том, что пластинчатый комплекс и секреторные гранулы в клетках каждой группы имеют характерные качественные и количественные особенности. Как следует из данных табл. 1, в миоэндокринных клетках крыс нормотензивной линии ВАГ относительный объем пластинчатых комплексов и секреторных гранул в саркоплазме составляет в сумме 4 %, а у гипертензивных крыс НИСАГ в группе «плацебо» — в 2 с лишним раза больше (около 8.5 % объема саркоплазмы). Разница относительного объема секреторных гранул обусловлена как большими размерами (средний диаметр увеличен на 18 %), так и в большей степени увеличением их численной плотности в 1.5 раза по сравнению с контролем.

В цитоплазме миоэндокринных клеток крыс НИСАГ многочисленные секреторные гранулы располагаются не только в околоядерной зоне, но и между миофибриллами и под сарколеммой (рис. 1, а). Из диаграммы (рис. 2) видно, что в миоэндокринных клетках у крыс группы «плацебо» около половины гранул — зрелые, а формирующихся и растворяющихся гранул в саркоплазме клеток приблизительно поровну, что свидетельствует о достаточно сбалансированном процессе секреции. Расчеты показали, что при общем увеличении численной плотности секреторных гранул в клетках крыс НИСАГ в 1.8 раза по сравнению с контролем встречаемость формирующихся разновидностей превышает контрольные цифры на порядок (150 и 15 на единицу площади саркоплазмы соответственно). Перечисленные морфологические и морфометрические данные дают основание сделать заключение о том, что у крыс-гипертоников с повышенной чувствительностью к стрессу в предсердных кардиомиоцитах имеется выраженная стойкая секреторная гиперфункция с активным синтезом и сбалансированным выделением продукта.

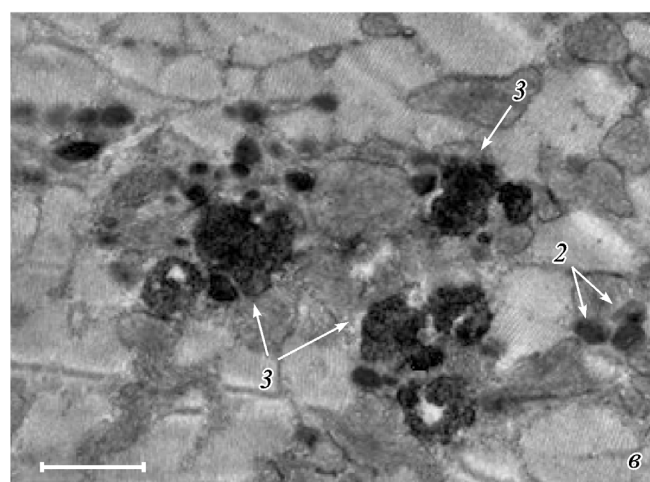
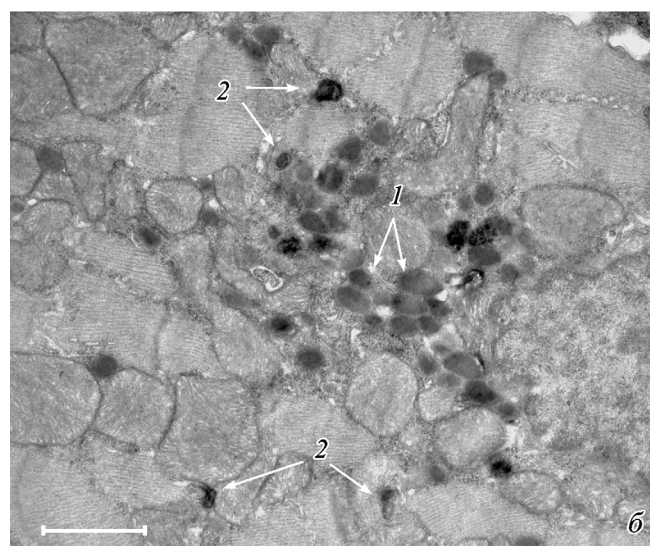
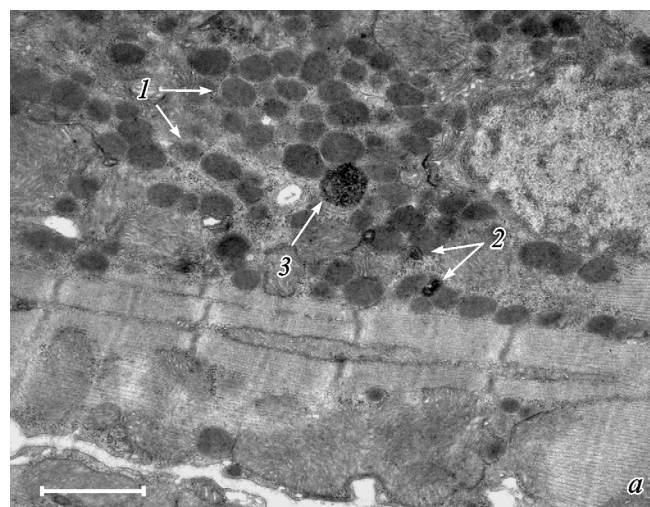


Рис. 3. Внутриклеточная деградация секреторных гранул в миоэндокринных клетках у крыс линии НИСАГ в группе «плацебо» (а) и группе, получавшей лозартан (б, в).

1 — гранулы неправильной формы и с содержимым сниженной электронной плотности, 2 — мелкие рудиментарные тельца с миелиноподобным плотным содержимым, 3 — кринофагия с формированием крупных «остаточных телесц». Масштабные отрезки — 1 мкм.

Таблица 2

Морфометрические параметры миокарда правого предсердия крыс линии НИСАГ

Параметр	Плацебо	Лозартан
Диаметр кардиомиоцитов, мкм	7.90 ± 0.26 (60)	9.40 ± 0.25 ^a (78)
Площадь сечения ядра, мкм ²	12.40 ± 0.81 (60)	19.10 ± 1.12 ^a (78)
Относительный объем в миокарде, %:		
кардиомиоцитов	76.00 ± 1.26 (22)	69.30 ± 1.65 ^a (22)
стромы	24.00 ± 1.26 (22)	30.70 ± 1.65 ^a (22)
капиллярного русла	3.26 ± 0.49 (22)	7.80 ± 0.77 ^a (22)
Паренхимо-стромальное отношение	3.40 ± 0.23 (22)	2.50 ± 0.21 ^a (22)
Количество капилляров на 0.1 мм ²	146.0 ± 14.5 (22)	207.5 ± 10.0 ^a (22)
Кавеолы сарколеммы:		
количество на 10 мкм длины	9.30 ± 0.62 (40)	30.00 ± 1.40 ^a (50)
диаметр, нм	125.0 ± 6.4 (40)	121.0 ± 6.9 (50)

Примечание. В скобках — число измерений у 5 крыс в каждой группе. ^aРазличия между группами «плацебо» и «лозартан» достоверны при $P < 0.05$.

Следует отметить, что у крыс НИСАГ электронно-микроскопическая морфология гранул более разнообразная, чем у контрольных животных. Чаше встречаются различные атипичные их разновидности, отражающие разные пути и (или) стадии внутриклеточной деградации накопленного секреторного продукта. В некоторых клетках преобладают гранулы с фрагментарным растворением (исчезновением) электронно-плотной сердцевины, что придает гранулам неправильные и причудливые очертания. В части клеток наблюдается равномерное снижение электронной плотности сердцевины гранул с исчезновением подмембранного ободка при сохранении целостности окружающей мембраны. Около 2.5 % составляют структуры, условно названные «рудиментарными». Это мелкие

(менее 200 нм в диаметре) тельца без ограничительной мембраны с очень уплотненным неомогенным содержимым неопределенной формы, напоминающие по ультраструктуре миелоноподобные тельца. Среди гранул встречаются крупные (около и более 500 нм в диаметре) «остаточные тельца», напоминающие фагосомы (рис. 3, а).

В экспериментальной группе крыс НИСАГ на фоне стабильного фармакологического снижения АД до 140 мм рт. ст. в миоэндокринных клетках правого предсердия обнаружены признаки угнетения секреторной активности. У крыс, получавших лозартан, относительный объем пластинчатых комплексов в саркоплазме миоцитов уменьшен в 3 раза, а секреторных гранул — на 30 % по сравнению с аналогичными показателями в группе «плацебо»

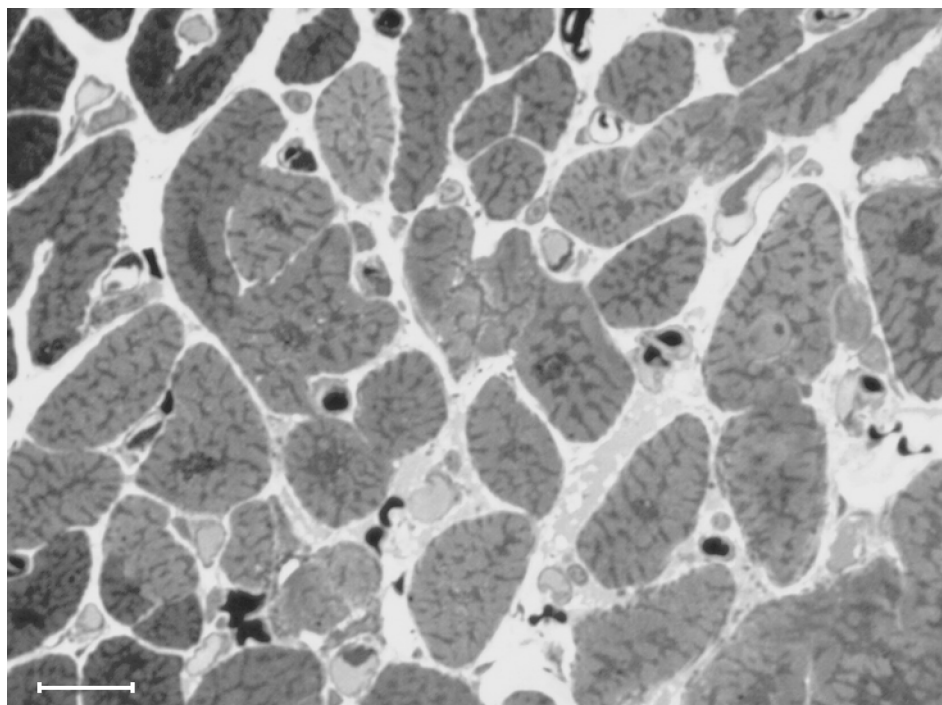


Рис. 4. Отек стромы и полнокровные кровеносные капилляры в миокарде правого предсердия у крыс линии НИСАГ, получавших лозартан.

Поперечный полутонкий срез. Окраска толудиновым синим. Масштабные отрезки — 10 мкм.

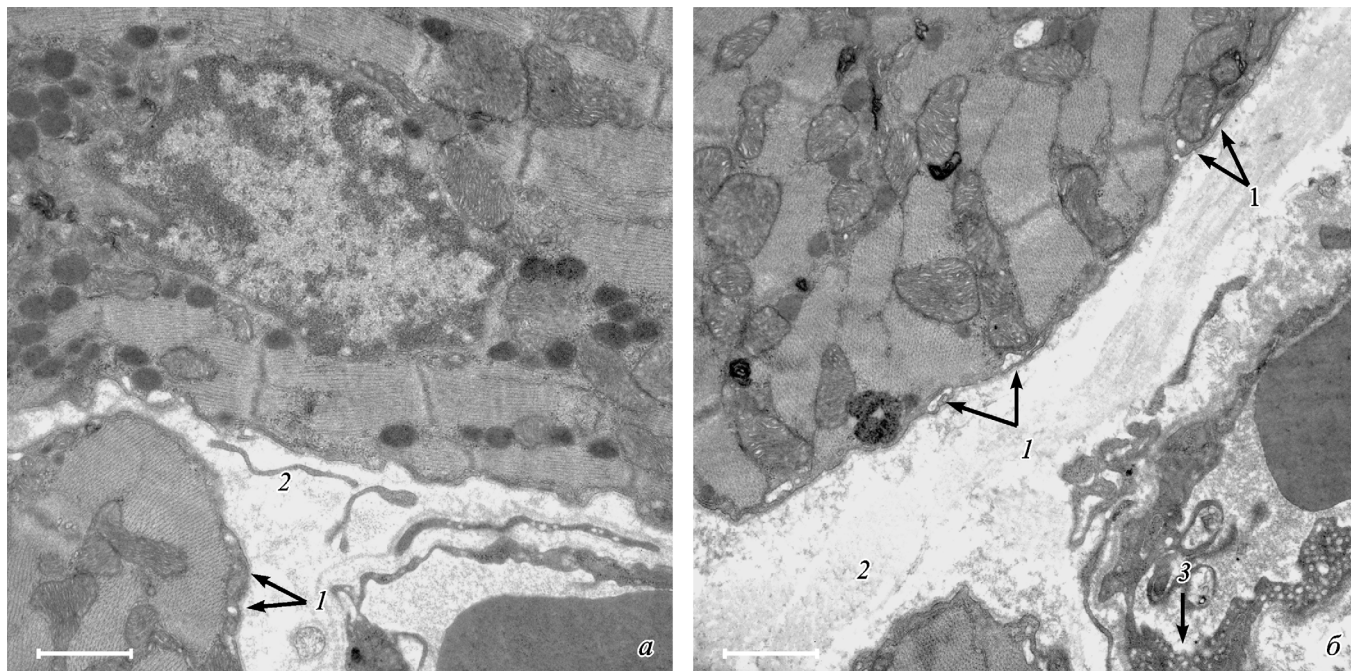


Рис. 5. Миокард правого предсердия у крыс линии НИСАГ в группе «плацебо» (а) и в группе, получавшей лозартан (б). 1 — субсарколеммальные кавеолы, 2 — строма, 3 — многочисленные пиноцитозные везикулы эндотелиоцитов. Масштабные отрезки — 1 мкм.

(табл. 1). Уменьшение совокупного запаса секреторного продукта в клетках крыс этой группы было обусловлено как мелкими размерами гранул (диаметр гранул на четверть меньше, чем у крыс НИСАГ, получавших воду), так и снижением их численной плотности почти на 40 % (рис. 1, б).

Не только количественные показатели, но и качественный состав секреторных гранул претерпевает существенные изменения у гипертензивных животных при стабильном снижении АД. На рис. 2 видно, что у крыс, получавших лозартан, в миоэндокринных клетках предсердия в зоне редуцированного комплекса Гольджи формирующиеся гранулы вообще отсутствуют, а зрелые формы составляют менее 10 % всего запаса в цитоплазме. Почти все гранулы имеют признаки разных стадий деградации, причем большинство можно отнести к типичным растворяющимся формам. Однако около четверти гранулярного пула пришлось на мелкие «рудиментарные» формы (рис. 3, б), что в абсолютном исчислении приблизительно в 6 раз больше, чем в группе «плацебо» (88 и 14 на единицу площади саркоплазмы соответственно). Кроме того, крупные лизосомоподобные остаточные тельца были столь многочисленны, что их относительный объем в саркоплазме удалось определить на уровне 1 %, в то время как в группе НИСАГ «плацебо» и у контрольных нормотензивных крыс они были единичные и встречались не во всех клетках. По электронным микрофотографиям можно воссоздать этапы кринофагии: сердцевина гранул претерпевает мелкозернистое перерождение, они сливаются в конгломераты, содержимое которых в центре постепенно уплотняется и гомогенизируется, а по периферии еще различаются контуры слившихся гранул (рис. 3, в).

Таким образом, морфометрические данные и ультраструктурные изменения свидетельствуют о том, что у крыс-гипертоников после стабильного снижения АД эндокринная активность предсердных миоцитов резко снижалась, что морфологически выражалось в уменьшении

размеров и численной плотности секреторных гранул, изменении их качественного состава и редукции пластинчатых комплексов.

Снижение АД при введении лозартана у гипертензивных крыс НИСАГ сопровождалось не только описанными выше субклеточными, но и тканевыми перестройками. Число открытых капилляров на единицу площади среза оказалось выше в полтора раза, а объемная плотность микроциркуляторного русла увеличилась более чем вдвое (табл. 2). Увеличение размеров кардиомиоцитов и их ядер по сравнению с группой, получавшей плацебо, дает основания полагать, что в условиях эксперимента с лозартаном кардиомиоциты подвергаются отеку. При этом сдвиг паренхимо-стромальных соотношений в пользу стромы свидетельствует о задержке жидкости преимущественно в межклеточном пространстве (рис. 4). Об активном трансканевом переносе жидкости свидетельствуют и ультраструктурные данные. Так, в миоэндокринных клетках предсердий у крыс НИСАГ, получавших лозартан, отмечено значительное (более чем в 3 раза) увеличение плотности везикул (кавеол) на сарколемме кардиомиоцитов (табл. 2). Электронно-прозрачные пузырьки без клатрина не всегда правильной округлой формы имели средний диаметр около 120 нм и были непосредственно связаны с мембраной или находились в непосредственной близости под ней. Пузырьки были очень многочисленны в эндотелиоцитах капилляров, где они заполняли весь срез клетки, придавая им «вспененный» вид (рис. 5), а иногда обнаруживались под мембранами клеток межучной ткани. Из приведенных данных можно заключить, что введение лозартана гипертензивным крысам сопровождается полнокровием и отеком миокарда правого предсердия.

Обсуждение

Проведенное ультраструктурное исследование правого предсердия показало, что у крыс НИСАГ на фоне высокого АД в саркоплазме миоцитов накапливается значительно больше секреторных гранул и они крупнее, чем у нормотензивного контроля. Более того, полученные результаты свидетельствуют об активном обмене этого секреторного запаса: с одной стороны, пластинчатые комплексы крупные, содержат много формирующихся гранул, с другой — очень разнообразны пути их деградации путем растворения, кринофагии и «сморщивания» в рудиментарные тельца. Нужно отметить, что классический экзоцитоз содержимого гранул при стандартной методике приготовления препаратов наблюдается редко. Высокое содержание натрийуретических пептидов в крови обнаруживается у крыс при экспериментальной гипертензии разного генеза — спонтанно гипертензивной линии SHR, при стенозе почечных артерий, при аортокаваальных анастомозах и др. (Thibault et al., 1992; Qing, Garcia, 1993; Kawakami et al., 1996; Langenickel et al., 2000). Гиперсекреция натрийуретических пептидов у больных при гипертензии, особенно осложненной сердечной недостаточностью, отеками или инфарктом, была зафиксирована во многих независимых исследованиях (Bonow, 1996; Vesely, 2001; Clerico, Emdin, 2004; Soualmia et al., 2009).

Эти факты позволили сформулировать необъяснимый «гормональный парадокс»: при сердечной патологии натрийуретических пептидов много, а эффекта нет. Причем непонятны оба составляющих парадокса. Во-первых, почему много гипотензивных натрийуретических пептидов при гипертензии? Во-вторых, почему они неэффективны и не сдерживают рост АД? Превалирующая в литературе гипотеза о несостоятельности и (или) уменьшении численности специфических рецепторов пока не получила подтверждения (Qing, Garcia, 1993; Goetze, 2010). Можно предположить, что на каком-то этапе повреждаются механизмы синтеза, внутриклеточного процессинга или выделения натрийуретических пептидов из миоэндокринных клеток. Возможно, изменяется реакция самих клеток на стимулирующие или ингибирующие сигналы. Ясность в ответы на поставленные вопросы могли бы внести результаты тщательного иммуноферментного и иммуноцитохимического исследования содержания различных форм гормона (пре-прогормона, прогормона и гормона) в миоэндокринных клетках и его каталитических производных в крови. К сожалению, в настоящее время таких технологий нет даже в самых специализированных лабораториях мира. Полученные данные о состоянии секреторного аппарата миоэндокринных клеток предсердия у крыс-гипертоников в группе, получавшей плацебо, можно рассматривать как ультраструктурное отражение этого парадокса.

В ходе проведенного эксперимента мы добились у взрослых крыс-гипертоников с генетически обусловленной гиперчувствительностью к стрессу стойкого фармакологического снижения АД до верхней границы нормы. В качестве лекарственного препарата был выбран лозартан — широко применяемый в клинике препарат группы сартанов, механизм действия которого достаточно понятен. Он действует через свои активные метаболиты на ангиотензиновые рецепторы подтипа 1 (AT1) как неконкурентный антагонист ангиотензина II. Как и другие блокаторы ангиотензиновых рецепторов, лозартан хорошо переносится, редко вызывает побочные эффекты в

других органах и действует при любом варианте гемодинамики (Полосьянец, 2008). Гипотензивный эффект лозартана был неоднократно подтвержден в разных экспериментальных моделях гипертензии: у спонтанно-гипертензивных крыс SHR (Koprdiva et al., 2009; Kristek et al., 2013), при сужении почечной артерии (Moubarak et al., 2012) и др. Менее однозначны сведения о взаимодействии лозартана и натрийуретических пептидов. В литературе преобладает мнение о том, что у больных с гипертензией и у крыс при экспериментальных гипертензиях после лечения лозартаном концентрация натрийуретических пептидов в крови снижается (Soualmia et al., 1996; Koprdiva et al., 2009; Shiga et al., 2012; Araujo et al., 2013), но некоторые исследователи подобного эффекта не обнаружили (Christoffersen et al., 2006; Oh et al., 2011).

Представленные нами морфометрические данные и ультраструктурные изменения предсердных миоцитов в ответ на субхроническое введение лозартана свидетельствуют о том, что у крыс-гипертоников при стабильном снижении АД эндокринная активность подавляется. Морфологически это выражалось в уменьшении совокупного содержания секрета в клетках. При этом, с одной стороны, тормозился синтез пептидов (редукция пластинчатого комплекса, отсутствие формирующихся гранул), а с другой — усиливались выделение (преобладание растворяющихся форм) и внутриклеточная утилизация продукта за счет разрушения гранул в форме накопления в саркоплазме крупных фагосом и рудиментарных телец. Если предположить, что при нормализации АД потребность в гипотензивных регуляторных пептидах снижается, выделение тормозится, то накопленный ранее запас должен быть утилизирован внутри миоэндокринных клеток. Однако в предыдущих исследованиях мы отмечали усиление внутриклеточного разрушения содержимого секреторных гранул в форме кринофагии у крыс старческого возраста (на 13-м мес жизни), причем как у тяжелых гипертоников линии НИСАГ, так и у контрольных животных. При этом в клетках отмечались морфологические признаки активного белкового синтеза и параллельно обнаруживались огромные запасы гранул в саркоплазме (Коростышевская, Максимов, 2013). Избыточный ли прогормон, гормон ли нормального или измененного строения утилизируется внутри клеток, как эти механизмы связаны с регуляцией секреторного процесса в миоэндокринных клетках, какие внешние стимулы их вызывают в норме и при патологии, остается пока неясным. Можно лишь предположить, что обнаруженные морфологические формы разрушения гранул отражают различные пути выделения секрета в ответ на разные стимулы. Например, в норме происходят растворение гранул и их экзоцитоз, при резкой стимуляции секреции от гранул остаются рудиментарные тельца с миелиноподобной деградацией «остатков» и мионорных белков, при торможении — кринофагия.

Проведенный нами эксперимент со стойким снижением давления при лечении лозартаном позволил ответить хотя бы на некоторые конкретные вопросы. Было установлено, что система натрийуретических пептидов при развитии тяжелой гипертензии изменяется обратимо, а миоэндокринные клетки сердца сохраняют на фоне высокого АД способность реагировать на специфические регуляторные сигналы.

По ходу решения основной задачи об эндокринной активности предсердных миоцитов у крыс-гипертоников нам удалось зафиксировать признаки усиления микроциркуляции и развития отека в миокарде правого пред-

сердца на фоне введения лозартана. Перерастянутые просветы многочисленных капилляров, отек межклеточного пространства и — менее выраженное — набухание кардиомиоцитов однозначно свидетельствуют о сдвиге водно-солевого равновесия. Активный перенос жидкости из сосудистого русла в межклеточное вещество и далее в клетки подтверждается наличием многочисленных везикул в эндотелиоцитах и кавеол под наружными мембранами клеток. Функции этих органелл в кардиомиоцитах неясны. Иммуногистохимическими методами было показано, что кавеолы тесно контактируют с секреторными гранулами на периферии клеток, с их мембранами связаны рецепторы натрийуретических пептидов, а в просветах обнаруживаются сами пептиды и альбумины крови. Выказываются предположения о том, что кавеолы могут служить альтернативным путем нерегулируемого выделения сердечных гормонов из кардиомиоцитов. С другой стороны, они могут или захватывать излишки гормонов из интерстиция, или переносить альбумины плазмы из кровеносного русла (гиповолемический эффект), или регулировать ионные потоки (отрицательный инотропный эффект, объем клеток) (Page et al., 1994; Doyle et al., 1997; Sabrane et al., 2005; Chen et al., 2012). Каскад процессов, запускаемый сартанами для снижения АД, очень разветвленный, включает в себя агонистические и антагонистические взаимоотношения с многообразными регуляторными факторами, поддерживающими водно-солевой баланс в организме, отдельных органах и тканях (Полосьянц, 2008). Как мы показали, влияют они и на выработку натрийуретических пептидов в предсердиях.

Бифункциональность миокарда предсердий (сократительная и гормональная активность) обуславливает их принципиальное отличие от миокарда желудочков, в том числе и по реакции на расстройства гемодинамики. В предыдущих исследованиях мы уже описывали онтогенетические особенности миоэндокринных клеток предсердий у интактных крыс линии НИСАГ (Коростышевская, Максимов, 2013). Было установлено, что секреторный аппарат этих клеток развит значительно сильнее, чем у одновозрастного контроля, не только на фоне высокого АД у взрослых и старых животных, но и на 1-м мес жизни (12- и 21-суточные крысята) и даже у 18-суточных эмбрионов, когда гипертензии еще нет. Было сделано заключение, что изменения секреторного аппарата в предсердных кардиомиоцитах предшествуют повышению давления, т. е. являются патогенетическим звеном становления и поддержания гипертензии (Максимов и др., 2013). В противоположность этому признаки гипертрофии левого желудочка у крыс линии НИСАГ проявляются только на 2-м мес жизни, т. е. являются ответной компенсаторной реакцией на стойкое повышение АД (Шмерлинг и др., 2005).

Таким образом, проведенное морфологическое, стереоморфометрическое и ультраструктурное исследование показало, что у крыс с высокой чувствительностью к стрессу и артериальной гипертензией в предсердных миоэндокринных клетках имеются признаки повышенной секреторной активности. Усиленный синтез, чрезмерное накопление и выделение натрийуретических пептидов на фоне высокого АД подтверждают неэффективность этого гипотензивного звена регуляции гемодинамики. Это является структурным отражением известного «гормонального парадокса». Стабильное медикаментозное снижение АД сопровождается торможением синтеза и усиленным внутриклеточным разрушением за-

пасов секреторного продукта в миоэндокринных клетках. Полученные данные позволяют заключить, что натрийуретические пептиды принимают участие в регуляции гемодинамики при сердечно-сосудистой патологии, поскольку у крыс-гипертоников секреторная активность миоэндокринных клеток коррелирует с уровнем АД.

Результаты многосторонних, в том числе и морфологических, исследований сердечных натрийуретических пептидов как гипотензивного звена регуляции АД должны найти отражение в концепциях возникновения и развития эссенциальной гипертензии.

Список литературы

- Волкова Н. Н., Драпкина О. М., Ивашкин В. Т. 2006. Ультраструктурные и функциональные особенности кардиомиоцитов предсердий и желудочков. *Клин. мед.* 11 : 16—20. (Volkova N. N., Drapkina O. M., Ivashkin V. T. 2006. Ultrastructural and functional peculiarities of atrial and ventricular cardiomyocytes. *Klin. Med.* 11 : 16—20.)
- Коростышевская И. М., Максимов В. Ф. 2012. Где и когда в сердце секретируются натрийуретические пептиды. *Онтогенез.* 43 (3) : 1—12. (Korostyshevskaya I. M., Maksimov V. F. 2012. Where and when natriuretic peptides are secreted in the heart. *Russian J. Devel. Biol.* 43 (3) : 185—195.)
- 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. (Korostyshevskaya I. M., Maksimov V. F. 2013. Age-related structural and functional characteristics of cardiac myoendocrine cells of rats in a normal state and with hereditary hypertension. *Russian J. Devel. Biol.* 44 (2) : 57—68.)
- Коростышевская И. М., Максимов В. Ф., Курганов С. А. 2013. Ультраструктурная оценка секреторной активности миоэндокринных клеток сердца. *Цитология.* 55 (8) : 539—547. (Korostyshevskaya I. M., Maksimov V. F., Kurganov S. A. 2013. Ultrastructural determination of atrial cardiomyocyte secretory activity. *Cell Tissue. Biol. (Tsitologiya).* 7 (6) : 528—538.)
- Крылова М. И. 2007. Хромогранин А: иммуноцитохимическая локализация в секреторных гранулах кардиомиоцитов предсердия лягушки. *Цитология.* 49 (7) : 538—543. (Krylova M. I. 2007. Chromogranin A: immunocytochemical localization in secretory granules of frog atrial cardiomyocytes. *Tsitologiya.* 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. (Maksimov V. F., Korostyshevskaya I. M. 2011. Cardiac hormonal system as a link in hemodynamic regulation and water-salt homeostasis. *Russian J. Physiol.* 97 (3) : 263—275.)
- Максимов В. Ф., Коростышевская И. М., Маркель А. Л., Бузуева И. И., Филюшина Е. Е., Яковсон Г. С. 2013. Натрийуретические пептиды и артериальная гипертензия: экспериментальное исследование. *Вестник РАМН.* 1 : 4—9. (Maksimov V. F., Korostyshevskaya I. M., Markel A. L., Buzueva I. I., Filyushina E. E., Jakobson G. S. 2013. Cardiac natriuretic peptides and hypertension: experimental study. *Annals of the Russian Academy of Medical Sciences.* 1 : 4—9.)
- Маркель А. Л. 1985. Генетическая модель индуцированной стрессом артериальной гипертензии. *Изв. АН СССР. Сер. биол.* 3 : 466—469. (Markel A. L. 1985. The genetic model of stress-induced arterial hypertension. *Izvestiya. Ser. Biol.* 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. (Maslova L. N., Bulygina V. V., Markel A. L. 2002. The effect of chronic stress during prepurbertal period of life on development of inherited arterial hypertension. *Russian J. Physiol.* 88 (6) : 774—780.)

- Полосьянц О. Б. 2008. Сартаны в кардиологической практике. Рус. мед. журн. 16 (11) : 1593—1597. (Polosjanz O. B. 2008. Sartans in cardiologic practice. Russian Med. J. 16 (11) : 1593—1597.)
- Рахчеева М. В., Бугрова 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. (Rakhcheeva M. V., Bugrova M. L. 2010. 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. Tsytologiya. 52 (8) : 629—633.)
- Шмерлинг М. Д., Бузуева И. И., Коростышевская И. М., Лазарев В. А., Максимов В. Ф., Филюшина Е. Е., Маркель А. Л., Якобсон Г. С. 2005. Стереоморфометрическое исследование органов-мишеней у крыс с наследственной артериальной гипертензией в разные периоды постнатального онтогенеза при изменении условий вскармливания. Морфология. 128 (4) : 85—90. (Shmerling M. D., Buzueva I. I., Korostyshevskaya I. M., Lazarev V. A., Maksimov V. F., Filyshina Ye. Ye., Jakobson G. S. 2005. Stereomorphometric study of target organs in rats with hereditary stress-induced arterial hypertension at different periods of postnatal ontogenesis under changed conditions of nursing. Morphology. 128 (4) : 85—90.)
- Araujo I. G., Elias L. L., Antunes-Rodrigues J., Reis L. C., Mecawi A. S. 2013. Effects of acute and subchronic AT1 receptor blockade on cardiovascular, hydromineral and neuroendocrine responses in female rats. *Physiol. Behav.* 122 : 104—112.
- 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.
- Bonow R. O. 1996. New insights into the cardiac natriuretic peptides. *Circulation.* 93 : 1946—1950.
- Cameron V. A., Ellmers L. J. 2003. Minireview: natriuretic peptides during development of the fetal heart and circulation. *Endocrinology.* 144 : 2191—2194.
- Chen W., Gassner B., Borner S., Nikolaev V. O., Schlegel N., Waschke J., Steinbronn A., Strasser R., Kuhn M. 2012. Atrial natriuretic peptide enhances microvascular albumin permeability by the caveolae-mediated transcellular pathway. *Cardiovasc. Res.* 93 : 141—151.
- Chimenti C., Russo M. A., Carpi A., Frustaci A. 2010. Histological substrate of human atrial fibrillation. *Biomed. Pharmacother.* 64 : 177—183.
- Christoffersen T. E., Aplin M., Strom C. C., Sheikh S. P., Skott O., Busk P. K., Haunso S., Nielsen L. B. 2006. Increased natriuretic peptide receptor A and C gene expression in rats with pressure-overload cardiac hypertrophy. *Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 290 : H1635—H1641.
- Clerico A., Emdin M. 2004. Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: a review. *Clin. Chem.* 50 : 33—50.
- Doyle D. D., Ambler S. K., Upshaw-Earley J., Bastawrous A., Goings G. E., Page E. 1997. Type B atrial natriuretic peptide receptor in cardiac myocyte caveolae. *Circ. Res.* 81 : 86—91.
- 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.
- Kawakami H., Okayama H., Hamada M., Hiwada K. 1996. Alteration of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide gene expression associated with progression and regression of cardiac hypertrophy in renovascular hypertensive rats. *Clin. Sci.* 90 : 197—204.
- Koprdoва R., Cebova M., Kristek F. 2009. Long-term effect of losartan administration on blood pressure, heart and structure of coronary artery of young spontaneously hypertensive rats. *Physiol. Res.* 58 : 327—335.
- Kristek F., Malekova M., Cacanyiova S. 2013. Long-term effect of prazosin and losartan administration on blood pressure, heart, carotid artery, and acetylcholine induced dilation of cardiovascular system of young Wistar rats and SHR. *Gen. Physiol. Biophys.* 32 : 235—243.
- 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.
- Moubarak M., Jabbour H., Smayra V., Chouery E., Saliba Y., Jebara V., Fares N. 2012. Cardiorenal syndrome in hypertensive rats: microalbuminuria, inflammation and ventricular hypertrophy. *Physiol. Res.* 61 : 13—24.
- 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.
- 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 : H1977—H1986.
- Oh Y. B., Gao S., Shah A., Kim J. H., Park W. H., Kim S. H. 2011. Endogenous angiotensin II suppresses stretch-induced ANP secretion via AT1 receptor pathway. *Peptides.* 32 : 374—381.
- Page E., Upshaw-Earley J., Goings G. E. 1994. Localization of atrial natriuretic peptide in caveolae of *in situ* atrial myocytes. *Circ. Res.* 75 : 949—954.
- 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.
- Qing G., Garcia R. 1993. Characterisation of plasma and tissue atrial natriuretic factor during development of moderate high output heart failure in the rat. *Cardiovasc. Res.* 27 : 464—470.
- Sabrane K., Kruse M. N., Fabritz L., Zetsche B., Mitko D., Skryabin B. V., Zwiener M., Baba H. A., Yanagisawa M., Kuhn M. 2005. Vascular endothelium is critically involved in the hypotensive and hypovolemic actions of atrial natriuretic peptide. *J. Clin. Invest.* 115 : 1666—1674.
- Shiga Y., Miura S., Mitsutake R., Uehara Y., Inoue A., Saku K. 2012. Effect of fixed-dose losartan/hydrochlorothiazide on brain natriuretic peptide in patients with hypertension. *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 13 : 107—112.
- Soualmia H., Ayadi I., Omar S., Feki M., Drissa H., Mebazaa A., Kaabachi N. 2009. Atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide release in human essential hypertension. *Clin. Lab.* 55 : 120—127.
- Soualmia H., Masson F., Barthélemy C., Maistre G., Carayon A. 1996. Cellular mechanism of angiotensin II-induced atrial natriuretic peptide release in rat right atrial tissue. *Life Sci.* 58 : 1621—1629.
- Thibault G., Charbonneau C., Bilodeau J., Schiffrin E. L., Garcia R. 1992. Rat brain natriuretic peptide is localized in atrial granules and released into the circulation. *Amer. J. Physiol.* 263 : R301—R309.
- Vesely D. L. 2001. Atrial natriuretic peptides in pathophysiological diseases. *Cardiovasc. Res.* 51 : 647—658.
- 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.

CHANGES OF RIGHT ATRIAL MYOENDOCRINE CELLS DURING HYPERTENSION
AND AFTER ARTERIAL PRESSURE DECREASE

V. F. Maksimov, I. M. Korostyshevskaya, S. A. Kurganov, A. L. Markel,
N. S. Rudenko, G. S. Jakobson*

State Research Institute of Physiology and Fundamental Medicine, Siberian Branch of RAMS, Novosibirsk;
* e-mail: kor@physiol.ru

It is well known now that atrial cardiomyocytes carry out both contractile and endocrine activities — they synthesize, accumulate in specific secretory granules and release the natriuretic peptides. The main physiological effects of natriuretic peptides are antagonistic to the renin-angiotensin-aldosterone system, but their role in the development of hypertension is still disputable. The aim of this investigation is to estimate using electron microscopy the secretory activities of atrial myoendocrine cells in rats with inherited stress-induced arterial hypertension (ISIAH stain). It has been shown that myoendocrine cells in the ISIAH rats with arterial pressure about 180 mm Hg reveal morphological features of increased synthesis, extra accumulation and release of natriuretic peptides compared with normotensive control rats. In the ISIAH rats treated with losartan (angiotensin II receptor blocker) and therefore having a sustained decrease in arterial pressure to 140 mm Hg, changes in granular pool composition, reduction of the number and diameter of the secretory granules, reduction of Golgi complexes, and increased intracellular degradation of secretory stores were found in the myoendocrine cells. At the same time the marked capillary hyperemia and interstitial edema in the myocardium were observed. Thus, in rats with severe inherited hypertension, the secretory activity of heart myoendocrine cells is sharply increased and directly depends on the arterial blood pressure level. This proves that natriuretic peptides actively participate in the regulation of hemodynamics during with cardiovascular pathology.

Key words: cardiomyocyte, natriuretic peptides, arterial hypertension, losartan, electron microscopy.
