

КОЛИЧЕСТВЕННЫЙ АНАЛИЗ МОЗГОВОГО НАТРИЙУРЕТИЧЕСКОГО ПЕПТИДА КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫС В РАННЕМ ПОСТРЕПЕРФУЗИОННОМ ПЕРИОДЕ

© Д. А. Абросимов,¹ Е. И. Яковлева, М. Л. Бугрова

Нижегородская государственная медицинская академия;

¹ электронный адрес: mirrors1990@mail.ru

Исследовали интенсивность накопления и выведения мозгового натрийуретического пептида (МНП) в раннем постреперфузионном периоде (через 5 мин и через 1 ч после начала реперфузии) в миокарде правого предсердия крыс. Тотальную ишемию моделировали по методу В. Г. Корпачева. Иммуноцитохимическое определение локализации пептида в секреторных кардиомиоцитах осуществляли на ультратонких срезах. В качестве маркеров применяли поликлональные антитела к МНП. Проводили подсчет гранул (А- и В-типов) с иммунореактивной меткой в полях зрения 38×38 мкм в трансмиссионном электронном микроскопе. Через 5 мин от начала реперфузии количество секреторных гранул, содержащих МНП, по отношению к интактным животным не изменялось. Через 1 ч постреперфузионного периода выявили интенсивное образование и выброс МНП: количество гранул А-типа увеличилось на 134 %, гранул В-типа на 210 % по сравнению с показателями интактной группы. Полученные результаты свидетельствуют о стимулирующем влиянии ишемических и реперфузионных факторов на процессы синтеза и выведения пептида в этот период.

Ключевые слова: мозговой натрийуретический пептид, ранний постреперфузионный период.

Принятые сокращения: АД — артериальное давление, КМЦ — кардиомиоциты, МНП — мозговой натрийуретический пептид, ПНП — предсердный натрийуретический пептид, ПРП — постреперфузионный период, РААС — ренин-ангиотензин-альдостероновая система, СРР — саркоплазматический ретикулум.

Открытый в 1988 г. мозговой натрийуретический пептид (МНП) является одним из активных представителей группы гормонов, имеющих сходное строение и участвующих в поддержании сердечно-сосудистого гомеостаза и водно-электролитного обмена в организме (Song et al., 1988). МНП снижает артериальное давление (АД) за счет натрийуретического, диуретического и вазодилаторного действия, является антагонистом ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС) и обладает кардиопротекторным действием (Sun et al., 2010; Ogawa, De Bold, 2014).

В настоящее время МНП активно исследуется в связи с его высокой прогностической значимостью в клинической практике в качестве маркера таких заболеваний, как инфаркт миокарда, острая декомпенсированная сердечная недостаточность, атеросклероз, ишемия и аритмия (Voulteenahe et al., 2005; Tang, 2009; Levine et al., 2014; Xin et al., 2014). Кроме того, МНП имеет большой потенциал в качестве терапевтического агента (Lee et al., 2009; Nu et al., 2014).

Ранее считалось, что МНП вырабатывается в основном в желудочках сердца (Ogawa, De Bold, 2014). Позднее было выявлено образование секреторных гранул, осуществляющих хранение и высвобождение МНП, в кардиомиоцитах (КМЦ) предсердий (Коростышевская и др., 2013). Современные исследования показали, что накопление и выброс МНП осуществляются также фибробластами сердца и эндотелиоцитами сети коронарных артерий

(Tsuruda et al., 2002; Jarai et al., 2009; De Bold, 2011). Из этих источников пептид выбрасывается в системный кровоток и, связываясь со специфическими клеточными рецепторами, через каскад цГМФ-зависимых клеточных реакций реализует свое физиологическое действие в организме.

Большинство исследований посвящено измерению содержания МНП в плазме крови. Обнаружить конкретный источник образования и секреции МНП и оценить его вклад в формирование суммарной плазменной концентрации при таком подходе не представляется возможным.

Один из способов определения интенсивности выработки и выведения МНП определенной локализации — иммуноцитохимический анализ его содержания в гранулах секреторных КМЦ правого предсердия. По одной из классификаций гранулы подразделяют на два типа: А-тип («зрелые»), осуществляющие накопление и хранение пептида, имеющие четкую мембрану и осмиофильное содержимое, и В-тип («растворяющиеся»), секретирующие пептид, не имеющие мембраны и с менее электронно-плотным содержимым (Рахчеева, Бугрова, 2010) (рис. 1). Метод подсчета разных типов гранул делает возможной оценку вклада МНП предсердий в поддержание сердечно-сосудистого гомеостаза в условиях патологий.

Таким образом, целью настоящей работы было исследование изменения количества секреторных гранул разных типов, содержащих МНП, в КМЦ правого предсердия крыс в раннем постреперфузионном периоде (ПРП) с применением метода иммуноцитохимии.

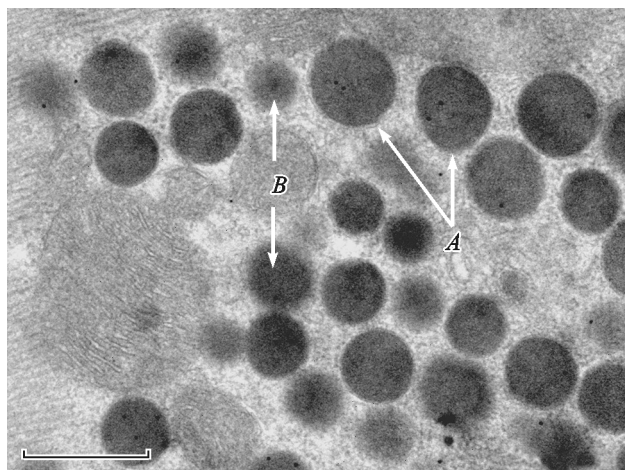


Рис. 1. Иммуноцитохимическое выявление МНП в секреторных гранулах А- и В-типов в КМЦ правого предсердия крысы. А — гранулы А-типа, В — гранулы В-типа. Масштабный отрезок — 0,5 мкм.

Материал и методика

Эксперименты проведены в соответствии с правилами лабораторной практики на 20 аутбредных крысах-самцах массой 200—250 г. Тотальную ишемию (10 мин) моделировали путем пережатия сердечно-сосудистого пучка по методу В. Г. Корпачева (Корпачев и др., 1982). Крыс наркотизировали нембуталом (25 мг/кг) внутрибрюшинно, интубировали трахею и пережимали сосудистый пучок сердца внутриторакально без вскрытия грудной клетки специальным Г-образным крючком. Реанимацию проводили с помощью наружного массажа сердца и искусственной вентиляции легких. Перед началом реанимации эндотрахеально вводили 100 мкл раствора адреналина (0,1 %).

Электронно-микроскопический анализ образцов ткани правого предсердия intactных и экспериментальных животных (через 5 мин и 1 ч ПРП) проводили по стандартной методике. Материал фиксировали в 2,5%-ном растворе глутаральдегида в фосфатном буфере (рН 7,4) и 1%-ном растворе OsO_4 с последующей заливкой в смесь Эпона с Аралдитом. Клеточную локализацию МНП выявляли на ультратонких срезах с помощью иммуноцитохимических реакций, с использованием поликлональных антител к МНП (Rabbit anti-Brain Natriuretic Peptide-32 (Rat) Serum (Peninsula Laboratories, Inc., Bachem, США)) и вторых антител Prorein-A/Gold (15 нм) (EM Grade, Electron Microscopy Sciences, США) (Рахчеева, Бугрова, 2010). После проведения реакций срезы контрастировали уранил-ацетатом и цитратом свинца и просматривали в электронном микроскопе Morgagni 268D (FEI, США). Гранулы А- и В-типов с пептидом в КМЦ считали в полях зрения (38×38 мкм). Достоверность различий относительно нормы определяли с помощью критерия Манна—Уитни ($p < 0,05$).

Результаты

Через 5 мин после возобновления кровообращения изменений в накоплении и выведении МНП по сравнению с intactными животными не выявлено (см. табли-

цу). В ткани правого предсердия большинство КМЦ сохраняло свою ультраструктуру, в некоторых выявлены просветление саркоплазмы и лизис органелл. Отметили небольшое сокращение миофибрилл, а в единичных КМЦ — пересокращение. По сравнению с intactной группой выявили расширение саркоплазматического ретикулума (СПР), набухание митохондрий с деструкцией крист и просветлением матрикса, снижение содержания цитоплазматических гранул. В ядрах преобладал эухроматин, в некоторых из них обнаружены признаки набухания, ядрышки в большинстве ядер отсутствовали или были уменьшены в размерах (рис. 2). В единичных клетках обнаружили расхождение вставочных дисков. Выявили очаговое разрыхление сарколеммы. В части наблюдений эндотелий капилляров был темный везикулярный, а в ряде случаев — с признаками набухания. В просвете капилляров выявили микроагрегаты эритроцитов и тромбоциты. В периваскулярном пространстве отмечали отдельные свободные эритроциты.

Через 1 ч постреперфузионного периода выявили увеличение числа гранул А-типа на 134 % и гранул В-типа на 210 % по сравнению с intactной серией (см. таблицу). В ткани правого предсердия наблюдали активацию синтетических процессов в КМЦ — многие ядра имели ядрышки, хорошо проявлялась гипертрофия комплекса

Соотношение гранул А- и В-типов, содержащих МНП, в предсердных миоцитах крыс в раннем ПРП

Животные	Гранулы, содержащие МНП, типа	
	А	В
Intactные (n = 10)	16.00 ± 5.44	7.53 ± 2.70
ПРП, 5 мин (n = 5)	18.67 ± 6.20 $P = 0.187502$	7.87 ± 3.00 $P = 0.754919$
ПРП, 60 мин (n = 5)	37.47 ± 18.19 ^a $P < 0.005$	23.37 ± 11.26 ^a $P < 0.005$

^a Отличие от контроля достоверно ($P < 0,05$). Данные представлены в виде среднего и его ошибки.

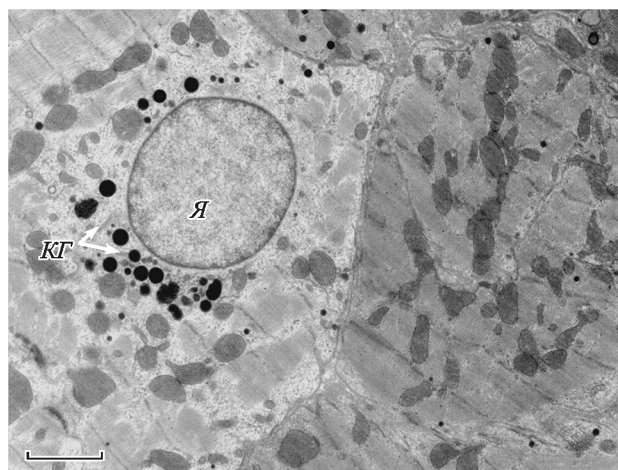


Рис. 2. Ультраструктура секреторного КМЦ через 5 мин от начала реперфузии.

КГ — комплекс Гольджи, Я — ядро. Масштабный отрезок — 2 мкм.

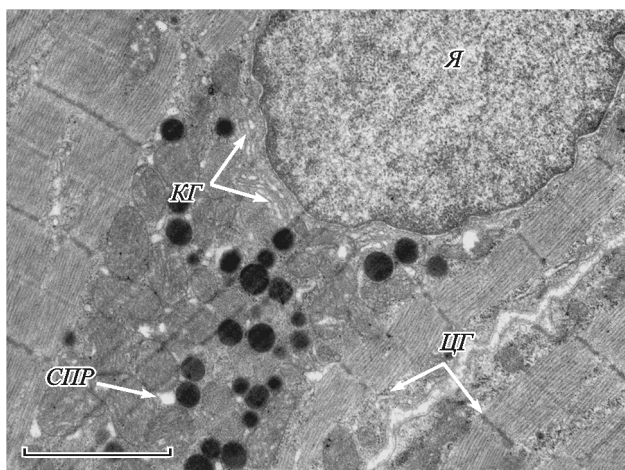


Рис. 3. Ультраструктура секреторного КМЦ через 1 ч ПРП. КГ — комплекс Гольджи, СПР — саркоплазматический ретикулум, ЦГ — цитоплазматические гранулы, Я — ядро. Масштабный отрезок — 2 мкм.

Гольджи (рис. 3), в саркоплазме обнаружено значительное содержание цитоплазматических гранул. Миофибриллы находились в состоянии релаксации. В некоторых КМЦ выявляли вакуоли. В митохондриях отмечали просветление матрикса и фрагментацию крист. В большинстве клеток отмечено расширение СПР. Сарколемма в основном сохраняла свою структуру.

К 60-й мин ПРП в большей части капилляров отмечали восстановление микроциркуляции. Эндотелий был с выростами люминальной поверхности и очаговыми набуханиями базального слоя. В интерстициальном пространстве обнаруживали единичные эритроциты, макрофаги и лимфоциты.

Обсуждение

В настоящее время многочисленные исследования демонстрируют быструю реакцию МНП на действие патологических факторов (Ogawa, De Bold, 2014). Вместе с тем Рамос с соавторами показали, что мРНК, несущая информацию о пептиде, экспрессируется спустя 15 мин после начала реперфузии у крыс (Ramos et al., 2009). Отсутствие изменения количества секреторных гранул КМЦ, содержащих МНП, через 5 мин ПРП, показанное в нашем эксперименте, подтверждает данные о том, что активация синтеза и секреции пептида не происходит мгновенно после возобновления кровообращения, что, по-видимому, связано с нарушением ультраструктуры секреторных КМЦ и микроциркуляции в этот период.

Через 1 ч ПРП увеличенное количество «зрелых» и «растворяющихся» форм гранул с МНП свидетельствовало о его активном накоплении и высвобождении в этот период. На сегодняшний момент в литературе нет данных о реакции МНП в условиях ПРП. Известно, что ответ МНП на действие различных патологических факторов и динамика изменения его концентрации в плазме крови во многом близки с реакцией предсердного натрийуретического пептида (ПНП) (Ogawa, De Bold, 2014). По-видимому, это связано с тем, что оба пептида имеют сходное строение и механизм действия, используют одни и те же

клеточные рецепторы для реализации своих эффектов, совместно синтезируются и хранятся в секреторных гранулах предсердных КМЦ (Рахчеева, Бугрова, 2010; Ogawa, De Bold, 2014).

В предыдущих работах с использованием этой же экспериментальной модели нами было показано значительное увеличение метаболической активности ПНП на 60-й мин ПРП (Бугрова и др., 2012). В настоящей работе продемонстрирована аналогичная реакция МНП в те же временные сроки. Известно, что на образование ПНП и МНП влияют активируемые гипоксией факторы HIF-1 α и ET-1 (эндотелин 1). Установлено, что HIF-1 α запускает промотор в последовательностях, кодирующих МНП и ПНП, и стимулирует транскрипцию их мРНК (Weidemann et al., 2007; Arjamaa, Nikinmaa, 2011). Повышение концентрации ET-1 в плазме крови также способствует увеличению уровня секреции этих пептидов (Ogawa, De Bold, 2014). В работах, посвященных ПНП, достоверно установлено, что усиление транспорта ионов Ca²⁺ способствует увеличению синтеза и формированию секреторных гранул, содержащих пептид (De Bold, 2011). Недавние исследования подтвердили важную роль ионов кальция в формировании реакций МНП. Известно, что в ответ на гипоксию и на недостаток АТФ запускается адаптивная реакция — захват Ca²⁺ в матрикс митохондрий посредством кальциевого унипортера (mitochondrial calcium uniporter), расположенного на их мембране. Повышенный ток ионов кальция в митохондриальный матрикс приводит к гибели клетки (Pan et al., 2013). Сан с соавторами установили, что в условиях ишемии/реперфузии активно секретируемый КМЦ МНП путем блокировки кальциевого унипортера препятствует входу больших доз Ca²⁺ в митохондрии и таким образом предотвращает гибель клетки (Sun et al., 2010). В другой работе показано, что после инфаркта миокарда МНП препятствует обратному захвату ионов Ca²⁺ и способствует возникновению спонтанных кальциевых волн (Thigau et al., 2012). Отсутствие выраженных деструктивных изменений в ультраструктуре КМЦ, показанное в настоящей работе, может быть связано с кардиопротекторным действием МНП в исследуемые сроки ПРП.

Таким образом, МНП, имея высокое сходство с ПНП, активируется под влиянием тех же факторов в условиях ПРП. За счет способности регулировать внутриклеточный транспорт Ca²⁺ МНП поддерживает энергетический баланс в клетке, оказывает кардиопротекторное действие и участвует в формировании комплексного противоишемического ответа в ранние сроки ПРП.

Возрастание количества секреторных гранул, содержащих МНП, через 1 ч ПРП подтверждает данные о его быстрой активации в ответ на развитие патологии сердечно-сосудистой системы и указывает на возможность использования МНП как эффективного прогностического агента на ранних этапах лечения пациентов после остановки кровообращения. Результаты влияния пептида на органном, тканевом и клеточном уровнях позволяют рассматривать его в качестве перспективного терапевтического агента с широким спектром действия.

Работа выполнена в рамках ведомственной НИР Министерства здравоохранения РФ «Механизмы регуляции физиологических функций при экспериментальных состояниях организма» (2015—2017 гг.).

Список литературы

- Бугрова М. Л., Яковлева Е. И., Абросимов Д. А. 2012. Взаимосвязь интенсивности синтеза, накопления и секреции предсердного натрийуретического пептида кардиомиоцитов с уровнем регуляции сердечного ритма у крыс в условиях раннего постреперфузионного периода. СТМ. 1 (3) : 26—30. (Bugrova M., Yakovleva E. I., Abrosimov D. A. 2012. The relationship of synthesis intensity, accumulation and secretion of natriuretic atrial peptide of cardiac myocytes with cardiac rhythm regulation in rats in early postperfusion period. STM. 1 (3) : 26—30.)
- Коростышевская И. М., Максимов В. Ф., Курганов С. А. 2013. Возможности ультраструктурной оценки секреторной активности предсердных кардиомиоцитов. Цитология. 55 (8) : 739—747. (Korostyshevskaya I. M., Maksimov V. F., Kurganov S. A. 2013. Ultrastructural estimation facilities of atrial cardiomyocyte secretory activity. Tsitologiya, 55 (8) : 739—747.)
- Корпачев В. Г., Лысенков С. П., Тель Л. З. 1982. Моделирование клинической смерти и постренимационной болезни у крыс. Патол. физиол. и эксперим. терапия. 3 : 78—80. (Korpachev V. G., Lysenkov S. P., Tel' L. Z. 1982. Modeling clinical death and postresuscitation disease in rats. Patol. Fiziol. Eksp. Ter. 3 : 78—80.)
- 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. Tsitologiya. 52 (8) : 629—633.)
- Arjamaa O., Nikinmaa M. 2011. Hypoxia regulates the natriuretic peptide system. Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol. 3 (3) : 191—201.
- De Bold A. J. 2011. Thirty years of research on atrial natriuretic factor: historical background and emerging concepts. Can. J. Pharmacol. 89 : 527—531.
- Hu G., Huang X., Zhang K., Jiang H., Hu X. 2014. Anti-inflammatory effect of B-type natriuretic peptide postconditioning during myocardial ischemia-reperfusion: involvement of PI3K/Akt signaling pathway. Inflammation. Publ. online: doi: 10.1007/s10753-014-9895-0.
- Jarai R., Kaun C., Weiss T. W., Speidl W. S., Rychlik K., Maurer G., Huber K., Wojta J. 2009. Human cardiac fibroblasts express B-type natriuretic peptide: fluvastatin ameliorates its up-regulation by interleukin-1 alpha, tumour necrosis factor-alpha and transforming growth factor-beta. J. Cell. Mol. Med. 13 (11—12) : 4415—4421.
- Lee C. Y., Chen H. H., Lisy O., Swan S., Cannon C., Lieu H. D., Burnett J. C., jr. 2009. Pharmacodynamics of a novel designer natriuretic peptide, CD-NP, in a first-in-human clinical trial in healthy subjects. J. Clin. Pharmacol. 49 (6) : 668—673.
- Levine Y. C., Rosenberg M. A., Mittleman M., Samuel M., Methachittiphan N., Link M., Josephson M. E., Buxton A. E. 2014. B-type natriuretic peptide is a major predictor of ventricular tachyarrhythmias. Heart Rhythm. 11 (7) : 1109—1116.
- Ogawa T., De Bold A. J. 2014. The heart as an endocrine organ. Endocrine Connections. Publ. online:doi: 10.1530/EC-14-0012.
- Pan X., Liu J., Nguyen T., Liu C., Sun J., Teng Y., Ferguson M. M., Rovira I. I., Allen M., Springer D. A., Aponte A. M., Guccek M., Balaban R. S., Murphy E., Finkel T. 2013. The physiological role of mitochondrial calcium revealed by mice lacking the mitochondrial calcium uniporter (MCU). Nat. Cell Biol. 15 (12) : 1464—1472.
- Ramos L. W., Murad N., Goro E., Antônio E. L., Silva J. A., Jr., Tucci P. F., Carvalho A. C. 2009. Ischemia/reperfusion is an independent trigger for increasing myocardial content of mRNA B-type natriuretic peptide. Heart Vessels. 24 (6) : 454—459.
- Song D. L., Kohse K. P., Murad F. 1988. Brain natriuretic factor. Augmentation of cellular cyclic GMP, activation of particulate guanylate cyclase and receptor binding. FEBS. Lett. 232 (1) : 125—129.
- Sun Y., Deng T., Lu N., Yan M., Zheng X. 2010. B-type natriuretic peptide protects cardiomyocytes at reperfusion via mitochondrial calcium uniporter. Biomed. Pharmacother. 64 (3) : 170—176.
- Tang W. H. 2009. B-type natriuretic peptide: a critical review. Heart Failure. Publ. online: doi: 10.1111/j.1527-5299.2007.05622.
- Thireau J., Karam S., Fauconnier J., Roberge S., Cassan C., Cazorla O., Aimond F., Lacampagne A., Babuty D., Richard S. 2012. Functional evidence for an active role of B-type natriuretic peptide in cardiac remodelling and pro-arrhythmogenicity. Cardiovasc. Res. 95 (1) : 59—68.
- Tsuruda T., Boerrigter G., Huntley B. K., Noser J. A., Cataliotti A., Costello-Boerrigter L., C. et al. 2002. Brain natriuretic peptide is produced in cardiac fibroblasts and induces matrix metalloproteinases. Circ. Res. 91 : 1127—1131.
- Voulteenahe O., Ala-Kopsala M., Ruskoaho H. 2005. BNP as marker in heart disease. Adv. Clin. Chem. 40 : 1—36.
- Weidemann A., Klanke B., Wagner M., Volk T., Willam C., Wiesener M., Eckardt K., Warnecke C. 2007. Hypoxia, via stabilization of hypoxia-inducible factor HIF-1 α is a direct and sufficient stimulus for brain-type natriuretic peptide induction. Biochem. J. Immediate Publ. 409 (1) : 233—242.
- Xin W., Lin Z., Mi S. 2013. Does B-type natriuretic peptide-guided therapy improve outcomes in patients with chronic heart failure? A systematic review and meta-analysis of randomized controlled trials. Heart Failure Rev. Publ. online: doi: 10.1007/s10741-014-9437-8.

Поступила 1 XII 2014

QUANTITATIVE ANALYSIS OF BRAIN NATRIURETIC PEPTIDE OF CARDIAC MUSCLE CELLS IN EARLY POSTREPERFUSION PERIOD IN RATS

D. A. Abrosimov,¹ E. I. Yakovleva, M. L. BugrovaNizhny Novgorod State Medical Academy; ¹ e-mail: mirrors1990@mail.ru

The intensity of accumulation and release of brain natriuretic peptide (BNP) in right atrial cardiac muscle cells was investigated in rats after 5 and 60 min from the reperfusion start. Total ischemia was simulated by cardiovascular bundle compression according to V. G. Korpachev. Immunocytochemical identification of BNP in atrial myocyte granules was investigated in ultrathin cuts. We applied polyclonal antibodies to BNP. The calculation of granules (A- and B-types) with BNP was carried out in (38 × 38 μ m) visual fields in transmission electronic microscope. The results were assessed using Mann—Whitney U-test ($p < 0.05$). After 5 min from the reperfusion start, the amount of the granules with BNP did not change compared to intact animals rate. On the 60th min of the post-reperfusion period was shown active accumulation and release of BNP; the amount of A-type granules increased by 134 %, B-type granules increased by 210 % in comparison with intact level. The results showed stimulating effect of ischemic and reperfusion factors on the processes of the brain natriuretic peptide synthesis and secretion in the early post-reperfusion period.

Key words: brain natriuretic peptide, early postreperfusion period.