

© Р.П. Піскун, Н.М. Гринчак

УДК 541116: 616.12: 616.13 – 004.6.005.1: 575.113

Р.П. Піскун, Н.М. Гринчак

ОСОБЛИВОСТІ МІКРОМОРФОМЕТРИЧНИХ ЗМІН СТРУКТУР СЕРЦЯ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АТЕРОСКЛЕРОЗІ ТА ЙОГО ГЕННІЙ КОРЕКЦІЇ

Вінницький національний медичний університет ім. М.І. Пирогова (м. Вінниця)

Зв'язок роботи з науковими темами і планами: робота є фрагментом теми комплексної науково-дослідницької роботи Вінницького національного медичного університету ім. М.І. Пирогова «Морфофункціональний стан кровоносного русла та клітинних елементів органів і тканин при експериментальному атеросклерозі в умовах генної терапії» (№ держреєстрації 0108U001484).

Вступ. На сьогоднішній день в Україні спостерігається прогресування частоти серцево-судинних захворювань (ССЗ). Гострі форми ішемічної хвороби серця тривалий час займають провідне місце в загальній структурі ССЗ і смертності. Не дивлячись на значні досягнення останніх років в їх діагностуванні та лікуванні, в Україні спостерігається тенденція до помолодшення контингенту з даними захворюваннями, несприятливому протіканню захворювання і, як наслідок, збільшення кількості випадків ранньої інвалідизації та смертності осіб працездатного віку. На сьогодні основна причина розвитку ішемічної хвороби серця (ІХС) — атеросклероз — розцінюється як одна із форм хронічного запалення, в основі якого лежать порушення холестеринового обміну [3, 8]. Один із основоположників «запальної» теорії атеросклерозу, Р. Libby, вважає, що запальний процес постійно супроводжує всі стадії розвитку атеросклеротичного ураження артерій [6]. Безпосередні причини запальної відповіді в стінці судини досі залишаються нез'ясованими. Вважають, що це можуть бути різні фактори, які виявляють пряму чи опосередковану дію на ендотелій: холестерин окиснених ліпопротеїнів низької щільності, гіперглікемія, судинний стрес при артеріальній гіпертензії, вільні радикали, інфекційні агенти тощо [1, 9]. Активність і тривалість запальної реакції індивідуальні і, вірогідно, детерміновані генетично [5]. Пошкодження ендотелію супроводжується активацією нуклеарного фактора κ B, одного з найбільш ранніх промоутерів запального каскаду, який відіграє ключову роль в ініціації транскрипції генів ранніх цитокінів (фактор некрозу пухлин), хемокінів та молекул адгезії [7]. Внаслідок дії цих речовин в місці пошкодження ендотелію судин з'являються моноцити, які подолавши ендотеліальний бар'єр, трансформуються в макрофаги [10]. Трансэндотеліальна міграція моноцитів, вірогідно, є провідним фактором атерогенезу. Із генетичних чинників, які причетні до атерогенезу, на сьогодні відомі поліморфні гени аполіпротеїда В, аполіпопротеїда Е (апоЕ), ліпопротеїдліпази, рецепторів ліпопротеїдів низької щільності, білка-переносника ефірів холестерину, параоксонази, ангіотензиногена, рецепторів ангіотензину II, ендотеліальної синтетази

оксида азоту, глутатіон – S – трансферази. Значне поширення атеросклерозу та його важкі ускладнення обумовлюють необхідність пошуку нових засобів, які б мали антиатерогенні властивості і сприяли б регресу склеротичних змін в судинах, а особливо в серці. В нашій роботі ми застосовували генну корекцію з використанням гену апоЕ [2]. Відсутність комплексних досліджень структури серця при експериментальному атеросклерозі в умовах генної корекції, визначили актуальність проблеми і необхідність виконання даної роботи.

Метою роботи було дослідити мікроморфометричні зміни кардіоміоцитів та артеріальних судин серця щурів при експериментальному атеросклерозі та при його генній корекції.

Об'єкт і методи дослідження. Досліди проведени на білих лабораторних щурах-самцях масою 150-200 г. Стан експериментального атеросклерозу моделювали за класичною методикою М.М.Анічкова. Всі піддослідні тварини були розділені на 5 груп: 1 - інтактна, 2 група - щурі, яким вводився 4(6) - Метил-2-тіоурацил для пригнічення функції щитоподібної залози, 3 - щурі, яким моделювався атеросклероз, 4 група — „профілактична” – щурі, яким попередньо моделювання атеросклерозу вводився ген апоЕ, 5 група – „терапевтична” – щурі, яким на тлі моделювання атеросклерозу вводився ген апоЕ. Протягом 30 днів щоденно щурам 3, 4 і 5 груп внутрішньошлунково за допомогою зонду з оливою вводили холестерол, попередньо розчиняючи його в соняшниковій олії, в дозі 0,5 г/кг і 4(6) - Метил-2-тіоурацил в дозі 12 мг/кг. Тваринам 4 профілактичної групи вводили ген апоЕ по 50 мкг на тварину внутрішньом'язево в перший день досліду. Тваринам 5 групи з лікувальною метою вводили ген апоЕ в тій же дозі на 15 день досліду. Утримання тварин та експерименти проводилися відповідно до положень «Європейської конвенції про захист хребетних тварин, які використовуються для експериментів та інших наукових цілей» (Страсбург, 1985), «Загальних етичних принципів експериментів на тваринах», ухвалених Першим національним конгресом з біоетики (Київ, 2001).

По закінченні досліду евтаназію тварин проводили під легким ефірним наркозом шляхом декапітації. Після розтину грудної клітки забирали серця для подальшого морфологічного дослідження. Для цього його шматочки фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну. Після фіксації, промивання та зневоднення заключали в парафін. Парафінові зрізи зафарбовували гематоксилин-еозином та гематоксилин-пікрофуксином за ван Гизон для опісового та кількісного морфологічного дослідження.

МОРФОЛОГІЯ

На поперечних зрізах в сосочкових м'язах серця вимірювали площу профілю, периметр та діаметр кардіоміоцитів і їх ядер, розраховували ядерно-цитоплазматичне співвідношення. Для вимірювання мікрометричних характеристик кардіоміоцитів використовували програмне забезпечення UTHSCSA Image Tool® for Windows® (version 2.00) (Відео Тест-5.0) в інтерактивному режимі з використанням об'єктива x40 і фотоокуляра x10. Мікрофотографування проводили за допомогою цифрової фотокамери «Olimpus E 410» та мікроскопа Olimpus BX 41. Мікроморфометрію коронарних артерій проводили за методикою С.В. Шорманова [4], визначаючи

площу поперечного перерізу артерій, площу просвіту, площу стінки, зовнішній і внутрішній діаметр, товщину стінки, індекси Вогенворта та Керногана. Для вимірювання мікроморфометричних характеристик артерій використовували програмне забезпечення Quick Photo Micro 2.3 з використанням об'єктива x40 і фотоокуляра x10.

Результати досліджень та їх обговорення. В результаті проведеного дослідження ми спостерігали, що у тварин інтактної групи кардіоміоцити розташовані групами і оточені сарколемою. В результаті морфометрії отримали наступні цифрові дані, які представлені в **таблиці**.

Таблиця

Морфометрична характеристика кардіоміоцитів та артерій міокарду щурів (M ± m)

Показники	Групи тварин				
	1	2	3	4	5
Площа кардіоміоцитів(мкм ²)	144,56±22,45	144,61±4,60	181,35±6,07	169,44±14,92	171,15±2,54
Площа профілю ядра(мкм ²)	12,77±2,06	10,77±0,39	15,57±0,86	14,14±1,23	12,56±0,24
Периметр профілю кардіоміоцитів	48,19±4,61	49,09±0,81	54,31±0,99	53,95±2,43	52,88±0,41
Периметр ядра	13,60±1,067	12,49±0,23	15,03±0,42	14,25±0,60	13,5±0,13
Максимальний діаметр кардіоміоцитів(мкм)	16,60±2,13	16,63±0,33	17,76±0,085	17,55±0,75	17,79±0,17
Мінімальний діаметр кардіоміоцитів(мкм)	9,76±0,48	9,32±0,18	11,1±0,48	10,06±0,73	10,44±0,10
Максимальний діаметр ядра(мкм)	4,73±0,43	4,28±0,07	5,26±0,15	5,12±0,28	4,64±0,04
Мінімальний діаметр ядра(мкм)	3,00±0,23	2,75±0,06	3,39±0,13	3,04±0,17	2,98±0,03
Ядерно-цитоплазматичне співвідношення	0,088±0,0005	0,074±0,085	0,08585±0,0019	0,084±0,005	0,073±0,098
Площа перерізу (мкм ²)	262,42±11,90	259,10±11,07	333,43±13,02	281,03±11,49	308,94±16,77
Площа просвіту (мкм ²)	182,78±10,19	171,84±6,75	152,64±4,45	167,47±5,39	158,73±8,08
Площа стінки (мкм ²)	79,63±4,37	87,26±3,75	180,78±22,05	113,56±19,73	150,20±27,94
Зовн. діаметр (мкм)	74,81±3,94	79,91±3,37	100,60±4,04	84,75±3,73	93,33±4,93
Внутр. діаметр (мкм)	53,43±3,52	55,90±4,13	51,32±3,71	56,50±3,01	62,41±4,38
Товщина стінки (мкм)	10,68±0,59	12,00±0,85	24,63±3,32	14,13±1,07	15,46±0,81
Індекс Вогенворта(%)	43,57±3,17	50,78±3,71	118,43±1,69	67,80±2,02	94,62±3,73
Індекс Керногана(%)	69,65±1,4	66,32±1,27	45,77±1,34	59,59±1,36	51,38±1,92

У тварин другої групи з пригніченням функції щитоподібної залози всі показники практично не відрізняються від тих, що представлені у тварин інтактною групи.

В результаті холестеринового навантаження у тварин третьої групи, яким моделювали експериментальний атеросклероз, зростають майже всі показники, порівняно з тваринами інтактною групи, а саме: площа кардіоміоцитів на 25,44%, площа ядер – на 21,92%, максимальний діаметр кардіоміоцитів – на 6,98%, мінімальний діаметр кардіоміоцитів – на 13,72%, максимальний діаметр ядер – 11,2%, мінімальний діаметр ядер – 13%, в результаті чого ядерно-цитоплазматичне співвідношення зменшується – на 3,5% (**табл.**). Також спостерігається збільшення наступних показників структури судин: площі поперечного перерізу артерій – на 27,5%, площі стінки – в 2,25 разів, зовнішнього діаметру – на 34,4%, товщини стінки – в 2,5 рази, індексу Вогенворта – майже в 3 рази. При цьому зменшується площа просвіту на 16,5%, внутрішній діаметр – на 3,95%, індекс Керногана – на 34,29%.

У тварин четвертої групи, яким вводили ген апоЕ з метою профілактики, відмічаються позитивні зміни морфометричних показників, в порівнянні з групою без корекції: зменшуються площа кардіоміоцитів на 2,11%; площа їх ядер – на 7,07%, ядерно-цитоплазматичне співвідношення на 3,6%. З боку артерій спостерігається зменшення: площі перерізу – на 15,72%, площі стінки – на 37,19%, зовнішнього діаметру – на 15,76%, товщини стінки та індексу Вогенворта майже в 2 рази; збільшуються площа просвіту артерій на 9,71%, внутрішній діаметр – на 10,09%, індекс Керногана – на 30,19% (**табл.**).

В п'ятій групі тварин (лікування) дія гену призводить до зменшення значень майже всіх вивчених морфометричних показників кардіоміоцитів по відношенню до тих, які були у тварин з експериментальним атеросклерозом: площі кардіоміоцитів на 5,7%, площі ядер – 19,34%, периметру кардіоміоцитів – 2,7%, периметру ядер – 10,2%, мінімального діаметру кардіоміоцитів – 6,0%, максимального діаметру ядер – 11,8%, мінімального діаметру ядер – 2,75%, ядерно-цитоплазматичного співвідношення – 14,2%, а також призводить до зменшення площі перерізу артеріальних судин на 7,35%, площі стінки – на 16,92%, зовнішнього діаметру – на 7,23%, товщини стінки – на 37,24%, індексу Вогенворта – на 20,11%.

Висновки.

1. Застосування холестеринового навантаження призводить до гіпертрофії кардіоміоцитів та їх ядер, а також до звуження просвіту артеріальних судин, суттєвого зростання індексу Вогенворта та зменшення індексу Керногана, що супроводжується істотним погіршенням кровопостачання частин серцевого м'яза, гіпоксією, дистрофічними та некробіотичними змінами кардіоміоцитів і строми

2. Використання гену апоЕ як з метою профілактики, так і з лікувальною метою проявляє тенденцію до нормалізації вивчених показників, а отже може гальмувати прогресування атеросклерозу та стимулювати відновлення міокарду.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати можливо використовувати при розробці нових методів корекції атеросклерозу.

Список літератури

1. Ватутин Н.Т. Роль воспаления в атерогенезе / Н.Т. Ватутин, В.Н. Елаский, В.А. Чупина // Журн. АМН Украины, - 2000 - 6(3). - С. 520–533.
2. Кордюм В.А. Генотерапія атеросклерозу / В.А. Кордюм // Теоретична медицина. - 2004. - №10, 2, – С. 121.
3. Целуйко В.Й. Атеросклероз. Частина 1 / В.Й. Целуйко, Л.М. Яковлева // Ліки України. – 2008. - № 2(118). – С. 13-22.
4. Шорманов С.В. Морфологические исследования коронарных артерий при экспериментальной коарктации аорты и после ее устранения / С.В. Шорманов // Архив анатомии, гистологии, и эмбриологии. – 1982. - №1. – С.98-107
5. Caligiuri G. Immune system activation follows inflammation in unstable angina: pathogenetic implications / G. Caligiuri, G.Liuzzo, L.M. Biasucci [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol., -1998.- 32(5): 1295–1304.
6. Libby P. Inflammation and atherosclerosis / P.Libby, P.M. Ridker, A.Maseri. - Circulation, 2002.-105(9): 1135–1143.
7. Pasceri V. Direct proinflammatory effect of C-reactive protein on human endothelial cells / V.Pasceri, J.T.Willerson, E.T. Yeh. - Circulation, 2000.- 102(18): 2165–2168.
8. Poredos P. Interrelationship between peripheral arterial occlusive disease, carotid atherosclerosis and flow mediated dilation of the brachial artery / P.Poredos, Golob M., M. Jensterle // Int. Angiol., 2003.- 22(1):83–87.
9. Ross R. Atherosclerosis — an inflammatory disease / R.Ross // N. Engl. J. Med., 1999.- 340(2): 115–126.
10. Zwaka T.P. C-reactive protein mediated low density lipoprotein uptake by macrophages: implications for atherosclerosis / T.P.Zwaka, V.Hombach, J.Torzewski . - Circulation, 2001.- 103(9): 1194–1197.

УДК 54116: 616.12: 616.13 – 004.6.005.1: 575.113

ОСОБЛИВОСТІ МІКРОМОРФОМЕТРИЧНИХ ЗМІН СТРУКТУР СЕРЦЯ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АТЕРОСКЛЕРОЗІ ТА ЙОГО ГЕННИЙ КОРЕКЦІЇ

Піскун Р.П., Гринчак Н.М.

Резюме. Представлені результати мікроморфометричних досліджень серця щурів в нормі, при холестериновому атеросклерозі та його корекції. Встановлено ознаки атеросклеротичних змін при моделюванні та їх нормалізації при генній корекції.

Ключові слова: експериментальний атеросклероз, серце, генна корекція.

УДК 54116: 616.12: 616.13 – 004.6.005.1: 575.113

ОСОБЕННОСТИ МИКРОМОРФОМЕТРИЧЕСКИХ ИЗМЕНЕНИЙ СТРУКТУР СЕРДЦА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ И ЕГО ГЕННОЙ КОРРЕКЦИИ

Пискун Р.П., Гринчак Н.Н.

Резюме. Представлены результаты микроморфометрических исследований сердца крыс в норме, при холестеринном атеросклерозе и его коррекции. Установлены признаки атеросклеротических изменений при моделировании и их нормализации при генной коррекции.

Ключевые слова: экспериментальный атеросклероз, сердце, генная коррекция.

UDC 54116: 616.12: 616.13 – 004.6.005.1: 575.113

Peculiarities Of Micromorphometrical Changes Of Heart Structures In Experimental Atherosclerosis And In Its Gene Correction

Piskun R.P., Grynchak N.M.

Summary. Results of micromorphometrical investigation of heart of rats in norm, in cholesterol atherosclerosis and in its correction are represented. Features of atherosclerotic changes in modelling and their normalization in gene correction are determined.

Key words: experimental atherosclerosis, heart, gene correction.

Стаття надійшла 28.07.2011 р.