

© Ю. В. Лискова, С. П. Саликова, А. А. Стадников, 2013  
УДК [616.127-018:616.12-008.46-039-08:615.357]-092.9

*Ю. В. Лискова, С. П. Саликова и А. А. Стадников*

## СТРУКТУРНАЯ РЕОРГАНИЗАЦИЯ МИОКАРДА ОВАРИЭКТОМИРОВАННЫХ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТЬЮ ПРИ ВВЕДЕНИИ МЕЛАТОНИНА

Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. А. А. Стадников), Оренбургская государственная медицинская академия

Целью исследования явилось изучение реорганизации миокарда левого желудочка (ЛЖ) овариэктомированных крыс ( $n=20$ ) с экспериментальной сердечной недостаточностью (ЭСН) под влиянием мелатонина. С помощью методов световой микроскопии, иммуноцитохимии, морфометрии исследовали миокард ЛЖ крыс. У животных на 14-е сутки ЭСН выявлены отчетливо выраженный гетероморфизм сократительных кардиомиоцитов (КМЦ), признаки дистрофии, пересокращения и повреждения мышечных волокон; кариопикноз, парануклеарный отек, локальная деструкция саркоплазмы; КМЦ с явлениями апоптоза. После моделирования сердечной недостаточности на 28-е сутки в миокарде происходило нарастание количества КМЦ с существенно измененными морфологическими и тинкториальными свойствами, определялись клетки с признаками апоптоза. У крыс, получавших 14 сут мелатонин, отмечался регресс патологических изменений, происходило уменьшение степени гипертрофии КМЦ и их ядер, снижение числа КМЦ с признаками апоптоза. Обсуждается кардиопротективное воздействие мелатонина на миокард ЛЖ овариэктомированных крыс при ЭСН.

**Ключевые слова:** миокард, сердечная недостаточность, дефицит эстрогенов, ремоделирование, мелатонин

Во многих клинических работах показано влияние гипозэстрогении на развитие сердечно-сосудистых заболеваний, в том числе хронической сердечной недостаточности (ХСН) [8, 11]. Однако фундаментальные механизмы формирования сердечной патологии в условиях гипофункции яичников до конца не ясны [9, 15]. В связи с этим особое значение приобретают исследования различных звеньев патогенеза ХСН при экспериментальной гипозэстрогении, в том числе в аспекте изучения морфологических закономерностей ремоделирования сердца с позиций оценки нейрогуморальной регуляции основных адаптивных и генетически детерминированных процессов. Имеются лишь немногочисленные данные о влиянии мелатонина на экспрессию генов, регулирующих клеточный цикл [13], а также процессы клеточной пролиферации, апоптоз кардиомиоцитов (КМЦ) [14]. Влияние мелатонина на структурный гомеостаз миокарда в условиях гипозэстрогении и экспериментальной сердечной недостаточности практически не изучено.

Цель настоящей работы — исследование влияния мелатонина на реорганизацию миокарда левого желудочка овариэктомированных крыс в условиях экспериментальной сердечной недостаточности (ЭСН).

Материал и методы. Исследование проведено на 25 крысах-самках линии Вистар массой 180–230 г. Контролем служили 5 интактных крыс-самок. 20 животным (через 2 мес после билатеральной овариэктомии) моделировали сердечную недостаточность по методике В. И. Инчиной и соавт. [2] путем подкожного введения в течение 14 сут 0,1 мл 1% раствора мезатона с последующим плаванием до глубокого утомления [2]. На 14-е сутки ЭСН 4 крыс вывели из эксперимента. 16 подопытных животных с ЭСН были разделены на 2 группы: 8 крысам 1-й группы вводили в течение 14 сут подкожно мелатонин (Sigma-Aldrich, США) в дозе 1 мг/кг чистого вещества, разведенного в 0,2 мл 0,9% хлорида натрия, 8 животным 2-й группы подкожно вводили 0,2 мл 0,9% хлорида натрия ежедневно. На 28-е сутки от начала опыта животных декапитировали под эфирным рауш-наркозом. Содержание крыс в виварии и проведение экспериментов соответствовали «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденным приказами МЗ СССР № 1045 от 06.04.1973 г., №1179 от 10.10.1983 г. Миокард левого желудочка контрольных и экспериментальных крыс был подвергнут стандартной однотипной обработке и изучен с помощью световой микроскопии — после окраски парафиновых срезов гематоксилином Майера — эозином, иммуноцитохимических реакций (оценка экспрессии белков Caspase-3, Bcl-2 с использованием моноклональных антител и набора реактивов (BIOCARE MEDICAL, США), методов морфометрии. После идентификации клеток с признаками апоптоза определяли индекс апоптоза как число окрашенных телец, деленное на 1000 клеток в случайно выбранных полях зрения. Морфометрию осуществляли в соответствии со сложившимися принципами системного количественного анализа [1]. Цитологический анализ структурно-функциональной

### Сведения об авторах:

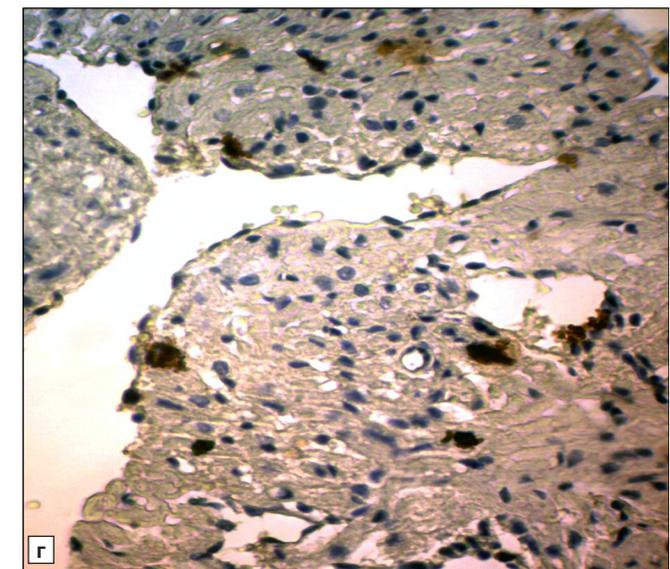
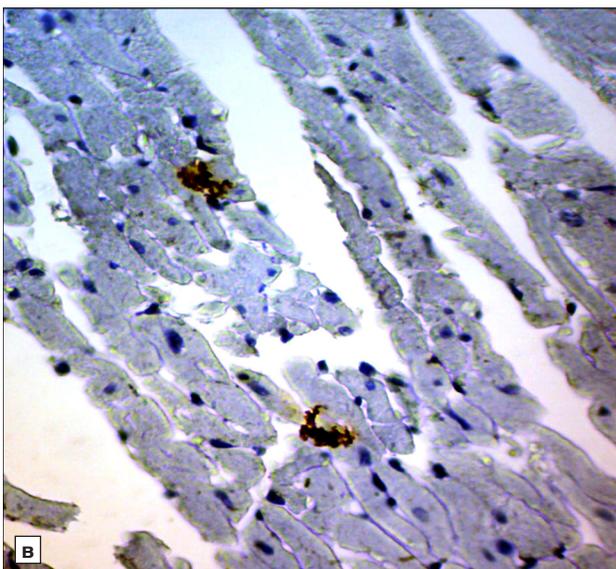
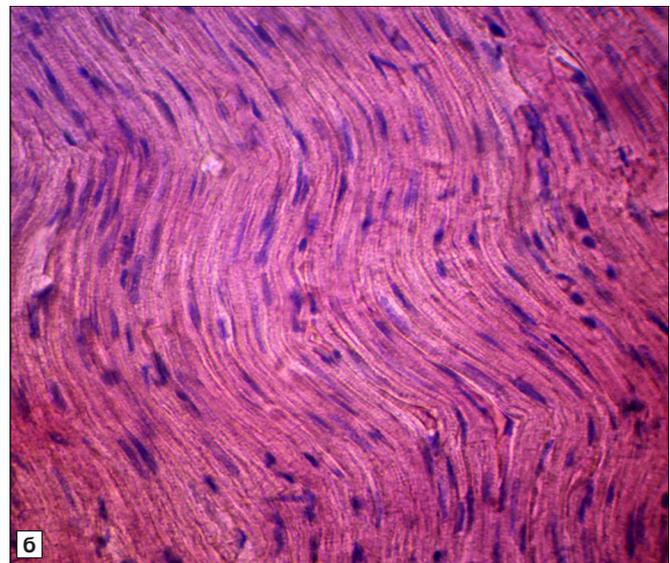
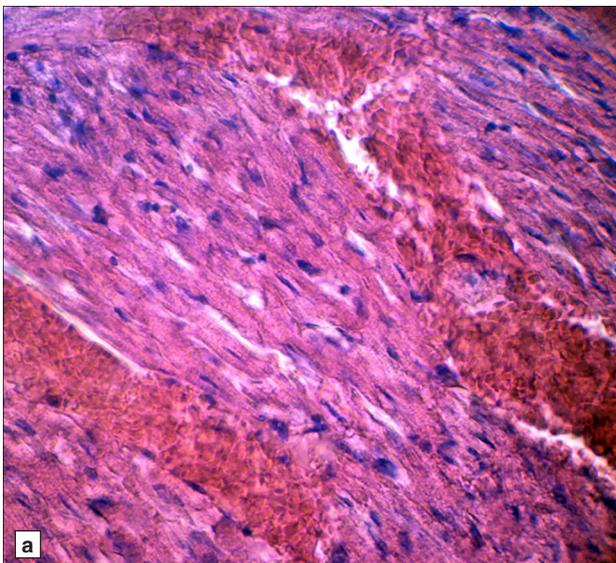
Лискова Юлия Владимировна (e-mail: 968646@bk.ru), Саликова Светлана Петровна (e-mail: cardiosvet@rambler.ru), Стадников Александр Абрамович (e-mail: alexander.stadnikov@yandex.ru), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, Оренбургская государственная медицинская академия, 460000, Оренбург, ул. Советская, 6

реорганизации мышечной и стромальной частей миокарда осуществляли в условиях поля зрения микроскопа ОРТКА В-350 (Италия), микрофотографии получали с использованием цифровой фотокамеры ScoreTek DCM 500 (Италия) и программы ScorePhoto с указанной окулярной вставкой при исследовании 20 полей зрения гистологических срезов (об. 40, ок. 20). С помощью компьютерной программы ImageJ 1,44h (США) определяли диаметр КМЦ, диаметр ядер КМЦ и ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО) у всех групп животных. Для определения объемной плотности (ОП) КМЦ, их ядер и стромы миокарда нами применено наложение квадратной сетки ( $P_t=225$ ) на микрофотографии гистологических срезов миокарда при стандартном увеличении. Статистическую обработку результатов проводили с помощью программы «Statistica 6.0»

**Результаты исследования.** В миокарде овариэктомированных крыс на 14-е сутки ЭСН преобладали КМЦ с существенно измененными морфологическими и тинкториальными свойствами.

Регистрировались как интенсивно воспринимающие эозин КМЦ, так и слабоокрашивающиеся клетки, в которых наблюдались пикнотически измененные ядра, парануклеарный отек и локальная деструкция саркоплазмы. В таких зонах отмечалось значительное разрыхление и отек соединительной ткани. Наблюдался также отек стенки сосудов микроциркуляторного русла, увеличилось число капилляров со сладжированными эритроцитами по сравнению с таковыми у крыс, находящихся 2 мес в состоянии гипозэстрогении (рисунк, а).

Именно в зонах поврежденных КМЦ выявлялись участки локальной полиморфно-клеточной инфильтрации миокарда. Отмечался более выраженный полиморфизм ядер КМЦ: варьировали как их размеры, так и форма. В миокарде левого



Миокард левого желудочка овариэктомированной крысы через 14 сут моделирования сердечной недостаточности.

а — гемокapилляры со сладжированными эритроцитами; б — участки повреждения и пересокращения сердечных мышечных волокон; в — Caspase-3-позитивные кардиомиоциты; г — Bcl-2-позитивные кардиомиоциты. а, б — окраска гематоксилином Майера — эозином; в — иммуногистохимическая реакция на Caspase-3; г — иммуногистохимическая реакция на Bcl-2. Об. 40, ок. 10

желудочка у крыс обнаружено значимое увеличение диаметра КМЦ (на 15,9%) и их ядер по сравнению с таковыми в группе контроля и после 2-месячной гипозэстрогении; наблюдалось значимое увеличение ОП стромы по сравнению с контролем и в 1,5 раза ОП КМЦ по сравнению с таковой в группе крыс после 2-месячной гипозэстрогении (табл. 1).

У животных с ЭСН через 14 сут после ежедневного введения раствора хлорида натрия (2-я группа) в миокарде левого желудочка усиливалась мозаичность окрашивания КМЦ. Возрастало количество как атрофически измененных так и гипертрофированных КМЦ. Отмечались участки с волнообразным видом мышечных волокон (см. рисунок, б), иногда их дезинтеграция по вставочным дискам. В некоторых участках миокард выглядел значительно разволокненным, усилились нарушения гемодинамики. Кровеносные сосуды находились в состоянии спазма или вторичного пареза, наблюдалось венозное и капиллярное полнокровие, геморрагические и плазморагические очаги. В межмышечных прослойках соединительной ткани, особенно в участках, где присутствовали истонченные КМЦ, отмечались диффузная инфильтрация мононуклеарными клетками и их скопления. Данные морфометрии показали, что сохранялось увеличение диаметра КМЦ на 13,8% и их ядер, ОП КМЦ значимо снижалась на 10,6% и возрастала ОП соединительной ткани по сравнению с контролем (см. таблицу).

В миокарде у крыс с введением мелатонина (1-я группа) преобладали КМЦ с неизменными морфологическими и тинкториальными свойствами. КМЦ в большинстве случаев равномерно

окрашивались гематоксилином – эозином, имели вытянутую форму, соединялись друг с другом с помощью вставочных дисков. На продольных срезах была хорошо видна поперечная исчерченность КМЦ, ядра имели овально-вытянутую форму со светлой нуклеоплазмой. Значительно реже, чем в других экспериментальных группах, отмечались участки с неоднородным окрашиванием сердечных мышечных волокон, гипертрофированные КМЦ. Встречались места с умеренными гемодинамическими расстройствами: полнокровными и расширенными капиллярами, а также в состоянии спазма и со сладжированными эритроцитами. Соединительная ткань между мышечными волокнами содержала немногочисленные фибробласты, периваскулярно и перикапиллярно встречались группы тучных клеток. У животных этой группы незначимо уменьшался диаметр КМЦ и их ядер, при этом значимо увеличивалась ОП КМЦ и уменьшалась ОП стромы по сравнению с таковыми в группе крыс с ЭСН, получавших 14 сут хлорид натрия (см. табл. 1).

При иммуноцитохимическом исследовании миокарда левого желудочка у крыс всех групп были обнаружены КМЦ с явлениями апоптоза (по критериям оценки экспрессии Caspase-3). У животных контрольной группы встречались единичные иммунопозитивные КМЦ. В миокарде овариэктомированных крыс на 14-е сутки ЭСН наблюдалось значимое увеличение количества Caspase-3-позитивных КМЦ (см. рисунок, в) как по сравнению с таковым в контрольной, так и в других подопытных группах (табл. 2). При иммуноцитохимическом исследовании антиапоптотического белка Bcl-2 иммунопозитивные КМЦ также

Таблица 1

**Морфометрические показатели кардиомиоцитов (КМЦ) левого желудочка у интактных крыс и различных экспериментальных групп ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )**

Исследованные показатели	Интактные животные, n=5 (контроль)	Экспериментальные группы			
		2 мес гипозэстрогении	14 сут ЭСН	14 сут ЭСН+14 сут NaCl	14 сут ЭСН +14 сут мелатонин
Диаметр, мкм:					
КМЦ	7,8±0,8	8,2±1,5	9,0±1,2*#	8,8±1,3*	8,04±1,12
ядра КМЦ	2,3±0,7	2,4±0,6	2,9±0,9*#	2,8±0,7*	2,5±0,6
ЯЦО, у. е.	0,43±0,13	0,39±0,08	0,46±0,25	0,47±0,17	0,45±0,16
Объемная плотность, %:					
ядра КМЦ	48,2±0,4	39,7±1,1	38,9±2,1	40,8±1,8	8,0±2,9
КМЦ	84,2±2,5	60±7*	81±4#	75±5*^	86±5
стромы миокарда	15,6±2,6	39±5*	37,1±2,1*	46,8±2,1*^	26±4
МСО, у. е.	5,4±1,1	1,6±1,0*	2,2±0,8*	1,6±1,2*^	3,2±1,7

Примечание. ЯЦО — ядерно-цитоплазматическое отношение; МСО — мышечно-стромальное отношение; ЭСН — экспериментальная сердечная недостаточность.

Здесь и в табл. 2: различия значимы при  $P < 0,05$ : \* по сравнению с контролем; # по сравнению с показателями в группе овариэктомированных крыс без ЭСН; ^ по сравнению с показателями в группе с введением мелатонина.

Таблица 2

**Экспрессия сигнальных белков (Caspase-3, Bcl-2) в миокарде левого желудочка у интактных крыс и различных экспериментальных групп ( $\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$ )**

Группа животных	Индекс апоптоза кардиомиоцитов	
	Caspase-3	Bcl-2
Интактные (контроль)	1±0,1	2,1±0,4
2 мес гипоестрогении	5,3±0,4	12,0±0,3*
14 сут ЭСН	9,1±0,4*#	11,02±0,11*
14 сут ЭСН+14 сут NaCl	6,2±1,0**^	5,1±1,0^
14 сут ЭСН+14 сут мелатонин	3,20±0,13	9,19±0,12*

Примечание. ЭСН — экспериментальная сердечная недостаточность.

были обнаружены во всех группах. Значимое увеличение Bcl-2-позитивных КМЦ (см. рисунок, г) отмечалось в группах овариэктомированных крыс до моделирования сердечной недостаточности и на 14-е сутки, а также в группе животных с введением мелатонина (см. табл. 2).

Обсуждение полученных данных. Сложные взаимоотношения сердечно-сосудистой системы и нейроэндокринных факторов в настоящее время продолжают интенсивно изучаться. Наше исследование продемонстрировало, что в условиях экспериментальных гипоестрогении и сердечной недостаточности в миокарде у крыс происходила существенная реорганизация как КМЦ, так и стромальных элементов. Выявленные структурно-функциональные изменения в миокарде левого желудочка, с одной стороны, в виде уменьшения ОП КМЦ, с другой — значительные микроциркуляторные нарушения, а также нарастание ОП стромы миокарда и диффузной инфильтрации ее мононуклеарными клетками, свидетельствуют об очаговом кардиосклерозе и развитии регенераторно-пластической недостаточности миокарда, способствующих переходу от компенсаторной гипертрофии к дисфункции левого желудочка и прогрессированию ХСН [3]. Обращает на себя внимание увеличение ОП стромы миокарда в группе крыс через 14 сут после окончания моделирования сердечной недостаточности, что указывает на стойкость и необратимость ремоделирования соединительнотканного матрикса. Данный факт можно объяснить активацией в условиях ЭСН матриксных металлопротеиназ (ММП), значение которых в патогенезе ХСН широко обсуждается. Есть данные, что в здоровом миокарде поддерживается баланс между ММП и их тканевыми ингибиторами, что не дает разрастаться внеклеточному матриксу [10]. В условиях гипертрофии КМЦ, гипоксии и ишемии происходит накопление коллагена в интерстиции за счет его повышенного синтеза, идет активное разрастание соединительной ткани, активизируется

ММП. Доминирование активности ММП над их ингибиторами при ХСН, сопровождающееся разрушением участков коллагеновой основы, создает условия для развития стойкого фиброза в миокарде [17]. Однако определение тонких механизмов, объясняющих прогрессирование соединительнотканых нарушений, требует дальнейших исследований.

Нами было установлено, что под действием мелатонина происходит регресс патологических изменений в миокарде, реже встречались участки с интерстициальным отеком, гемодинамическими нарушениями. Данные факты мы трактуем как протективное воздействие мелатонина на миокард. Механизм такой цитопротекции ряд авторов связывают с про- и антиоксидантными свойствами мелатонина [7], его стимулирующим влиянием на выработку NO-синтазы клетками эндотелия сосудов с последующим увеличением продукции оксида азота и вазодилатацией [6, 12], положительным регулирующим влиянием на соотношение ММП и тканевых ингибиторов металлопротеиназ [16]. В последние годы в патогенезе ХСН, кроме роли нейроэндокринных факторов, участвующих в регуляции тканевого гомеостаза в сердце, широко обсуждается значение апоптоза клеток миокарда [5]. В нашей работе было обнаружено увеличение числа КМЦ с признаками апоптоза во все сроки эксперимента. Однако обращает на себя внимание максимальное возрастание апоптоза КМЦ в момент окончания моделирования сердечной недостаточности (14-е сутки) с последующим снижением апоптотического индекса в отдаленный период (28-е сутки эксперимента при введении натрия хлорида). Этот факт требует дальнейшего уточнения. На наш взгляд, такую динамику количества апоптотических КМЦ можно объяснить, с одной стороны, активацией симпатико-адреналовой системы и других гуморальных факторов, стимулирующих апоптоз КМЦ в моделируемых условиях истощающих нагрузок с последующей их стабилизацией, с другой стороны — нельзя исключить включение антиапоптотических механизмов. Под воздействием мелатонина отмечалось снижение числа КМЦ с признаками апоптоза с одновременным увеличением количества Bcl-2-позитивных клеток, сопровождающееся регрессом патологических изменений в структуре миокарда, что мы расцениваем как кардиопротективное и антиапоптотическое действие мелатонина, это согласуется и с данными, имеющимися в литературе [13].

Оценка соотношения про- и антиапоптотических маркеров программируемой клеточной смерти имеет важное значение, как фактор структурного гомеостаза миокарда. В нашем исследовании отмечается тенденция к истощению антиапоптотических механизмов (уменьшение количества

Вс1-2-позитивных КМЦ) при сохранении высокого индекса апоптоза (количества Caspase-3-позитивных КМЦ) на 28-е сутки после завершения эксперимента при введении хлорида натрия, что сопровождалось существенными структурно-функциональными изменениями в миокарде левого желудочка. Данные результаты можно объяснить тем, что в условиях ЭСН альтернативным вариантом запрограммированной клеточной гибели является аутофагия, которая не связана с каспазными механизмами и опосредуется катепсинами белками и протеазами лизосом. Интенсификация аутофагии КМЦ при сердечно-сосудистой патологии позволила некоторым авторам предположить, что и эта разновидность гибели клеток также способна внести свой вклад в развитие ХСН [4]. Полученные данные согласуются с современной концепцией о роли апоптоза в ремоделировании сердца и развитии сердечной недостаточности [5].

Резюмируя изложенное, можно сделать вывод, что дефицит половых гормонов значительно нарушает клеточный гомеостаз миокарда, ЭСН на этом фоне приводит к структурно-функциональной реорганизации сердечной мышцы, активации апоптоза КМЦ, что играет важную патогенетическую роль в развитии сердечной недостаточности. Мелатонин создает необходимые условия для адекватной активации компенсаторных механизмов в КМЦ, микрососудах, интерстиции на фоне снижения апоптотической доминанты в миокарде.

*Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 11-04-97000 p\_поволжье\_a).*

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г. Г. Проблемы патогенеза и патологоанатомической диагностики болезней в аспектах морфометрии. М., Медицина, 1984.
2. Инчина В. И., Столярова В. В., Гарькин Г. Г. и Тюрягина Н. А. Состояние миокарда в модельной ситуации активации гипертензивных механизмов. В кн.: Тезисы докл. 2-го Российского конгр. по патофизиологии. М., Изд-во РАМН, 2000, с. 68.
3. Непомнящих Л. М., Лушникова Е. Л. и Семенов Д. Е. Регенераторно-пластическая недостаточность сердца: морфологические основы и молекулярные механизмы. М., Изд-во РАМН, 2003.
4. De Meyer G. R., De Keulenaer G. W. and Martinet W. Role of autophagy in heart failure associated with aging. *Heart Fail Rev.*, 2010, v. 15, № 5, p. 423–430.
5. Gerald W. and Dorn I. I. Apoptotic and non-apoptotic programmed cardiomyocyte death in ventricular remodeling. *Cardiovasc. Res.*, 2009, v. 81, p. 465–473.
6. Girotti L., Lago M., Ivanovsky O. et al. Low urinary 6-sulfatoxymelatonin levels in patients with severe congestive heart failure. *Endocrine*, 2003, v. 22, № 3, p. 245–248.
7. Girouard H., Chulak C., Lejossec M. et al. Vasorelaxant effects of the chronic treatment with melatonin on mesenteric artery and aorta of spontaneously hypertensive rats. *J. Hypertens.*, 2001, v. 19, p. 1369–1377.

8. Giuberti K., Pereira R. B., Bianchi P. R. et al. Influence of ovariectomy in the right ventricular contractility in heart failure rats. *Arch. Med. Res.*, 2007, v. 38, № 2, p. 170–175.
9. Hamilton K. L., Gupta S. and Knowlton A. A. Estrogen and regulation of heat shock protein expression in female cardiomyocytes: cross-talk with NF- $\kappa$ B signaling. *J. Mol. Cell. Cardiol.*, 2004, v. 36, p. 577–584.
10. Kandasamy A. D., Chow A. K., Ali M. A. and Schulz R. Matrix metalloproteinase-2 and myocardial oxidative stress injury: beyond the matrix. *Cardiovasc. Res.*, 2010, v. 85, p. 413–423.
11. Piro M., Della Bona R., Abbate A. et al. Sex-related differences in myocardial remodeling. *J. Am. Coll. Cardiol.*, 2010, v. 16, № 5 (11), p. 1057–1065.
12. Rechciński T., Trzos E., Wierzbowska-Drabik K. et al. Melatonin for nondippers with coronary artery disease: assessment of blood pressure profile and heart rate variability. *Hypertens. Res.*, 2010, v. 33, № 1, p. 56–61.
13. Reiter R. J. and Tan D. X. Melatonin and cardiac pathophysiology. *Heart Metab.*, 2009, v. 44, p. 31–34.
14. Rezzani R., Rodella L. F., Frascini F. et al. Melatonin delivery in solid lipid nanoparticles: prevention of cyclosporine A induced cardiac damage. *J. Pineal Res.*, 2009, v. 46, № 3, p. 255–261.
15. Sharkey L. C., Holycross B. J., Park S. et al. Effect of ovariectomy in heart failure-prone SHHF/Mcc-facp rats. *Am. J. Physiol.*, 1998, v. 275, № 6, Pt. 2, p. 1968–1976.
16. Swarnakar S., Singh L. P. and Reiter R. J. Matrix metalloproteinases in health and disease: regulation by melatonin. *J. Pineal Res.*, 2011, v. 50, № 1, p. 8–20.
17. Voloshenyuk T. G. and Gardner J. D. Estrogen improves TIMP-MMP balance and collagen distribution in volume-overloaded hearts of ovariectomized females. *Am. J. Physiol.*, 2010, v. 299, № 2, p. 683–693.

Поступила в редакцию 05.02.2013

Поступила после доработки 03.05.2013

### STRUCTURAL REORGANIZATION OF THE MYOCARDIUM IN OVARIECTOMIZED RATS WITH EXPERIMENTAL HEART FAILURE AFTER MELATONIN ADMINISTRATION

*Yu. V. Liskova, S. P. Salikova and A. A. Stadnikov*

The aim of the study was to examine the reorganization of left ventricular myocardium (LVM) in ovariectomized rats with experimental heart failure (EHF) as affected by melatonin administration. Rat LVM was studied using the methods of light microscopy, immunocytochemistry and morphometry. At day 14 of EHF, marked heteromorphism of contractile cardiomyocytes (CMC), signs of dystrophy, overcontraction and damage of muscle fibers, karyopyknosis, paranuclear edema, local sarcoplasm destruction were detected together with CMC showing signs of apoptosis. At day 28 after EHF modeling, a further increase in the number of CMC with significant changes in the morphological and tinctorial properties was found as well as the cells with signs of apoptosis. In rats given melatonin for 14 days, there was a regression of pathological changes, with the decrease in the hypertrophy of CMC and their nuclei, reduction of the number of CMC with the signs of apoptosis. Cardioprotective effect of melatonin on LVM of ovariectomized rats with EHF is discussed.

**Key words:** *myocardium structure, myocardium remodeling, heart failure, estrogen deficiency, melatonin*

Department of Histology, Cytology, and Embryology, Orenburg State Medical Academy