

ВЕБЕР В. Р., ГУБСКАЯ П. М.,
РУБАНОВА М. П., ЖМАЙЛОВА С. В.,
ПРОШИНА Л. Г., АТАЕВ И. А.,
РУМЯНЦЕВ Е. Е., КУЛИК Н. А.

Изменения эластического каркаса брюшного отдела аорты при моделировании различных вариантов хронического стресса и возможности их коррекции эналаприлом в эксперименте

*Новгородский государственный университет имени Ярослава Мудрого, 173003, ул. Большая Санкт-Петербургская, д. 41, г. Великий Новгород, Россия
e-mail: zhmailova.svetlana@yandex.ru*

Реферат

Статья посвящена изучению изменений эластического каркаса меди аорты при моделировании различных вариантов хронического стресса. Авторами показано, что как при хроническом адренергическом стрессе, так и при хроническом холинергическом стрессе, происходит значительное уменьшение содержания эластина в стенке брюшной аорты, причем темпы деградации эластина выше при хроническом холинергическом стрессе. Изменения эластического каркаса сохраняются и в течение 1 месяца по окончании моделирования обоих вариантов стресса. Выявлено, что введение ингибитора АПФ эналаприлата в течение 2-х недель одновременно с адреналином и одновременно с прозеринем не только не предотвращает изменения эластического каркаса аорты, а, напротив, наблюдается еще более выраженное достоверное снижение плотности эластина.

Ключевые слова: *ремоделирование, хронический адренергический стресс, хронический холинергический стресс, аорта, эластин, энал.*

Эластин — белок из группы склеропротеинов, наиболее распространен в стенке магистральных артерий и составляет основную массу эластичных волокон соединительной ткани. Содержание эластина в стенке аорты составляет до 40 % в расчете на сухую массу [4].

Считается, что самые начальные изменения во внеклеточном матриксе (ВКМ) происходят в жидкостных пространствах [2, 3, 5, 7], затем происходит изменение эластической мембраны (фрагментация, ее истончение), а процессы фиброзного ремоделирования являются вторичными [6].

Цель исследования: изучить изменения эластического каркаса брюшного отдела аорты при моделировании различных вариантов хронического стресса и возможности их коррекции эналаприлом.

Материал и методы исследования

Эксперимент проводился на крысах-самцах линии Вистар, сопоставимых по возрасту и массе (200±20 г). Животные содержались в помещении с температурой воздуха 22 °С с 12-часовым циклом «свет/темнота». Животные имели свободный доступ к воде и пище.

Экспериментальное исследование проводилось в соответствии с Европейской конвенцией о защите животных, используемых в эксперименте (Директива 86/609/ЕЕС). Протокол эксперимента, содержание

животных и выведение их из опыта были составлены в соответствии с принципами биоэтики, изложенными в Международных рекомендациях по проведению медико-биологических исследований с использованием животных (1985) и Приказе МЗ РФ № 267 от 19 июня 2003 г. «Об утверждении правил лабораторной практики».

В эксперименте создавались модели двух вариантов стресса — хронического адренергического стресса (ХАС) и хронического холинергического стресса (ХХС). Моделирование обоих вариантов стресса производилось путем интраперитонеального введения лекарственных препаратов, дозы которых были максимальными терапевтическими для человека в пересчете на килограмм массы тела. Главным условием было отсутствие при данной дозе препарата некроза кардиомиоцитов.

В I серии эксперимента при моделировании хронического адренергического стресса 20 крысам на протяжении 2-х недель три раза в сутки интраперитонеально вводился адреналин из расчета 50 мкг/кг.

Во II серии эксперимента при моделировании хронического холинергического стресса 20 крысам на протяжении 2-х недель три раза в сутки интраперитонеально вводился антихолинэстеразный препарат прозерин из расчета 20 мкг/кг.

Кроме того, при экспериментальном исследовании оценивались возможности протективного

действия ингибитора ангиотензинпревращающего фермента на структурное ремоделирование стенки брюшной аорты при моделировании ХАС и ХХС. В качестве ингибитора ангиотензинпревращающего фермента нами был выбран препарат энап для внутривенного введения. Фармакодинамика энапа не зависит от способа введения (интраперитонеального или внутривенного), так как энап Р, используемый нами в эксперименте, содержит действующее вещество эналаприлат — метаболит эналаприла, не требующий метаболизма в печени.

В III серии эксперимента создавалась модель ХАС с коррекцией энапом — 10 крысам на протяжении 2-х недель три раза в сутки одновременно интраперитонеально вводились адреналин в дозе 50 мкг/кг и ингибитор ангиотензин-превращающего фермента (ИАПФ) для внутривенного введения энап (эналаприлат) в дозе 20 мкг/кг.

В IV серии эксперимента создавалась модель ХХС с коррекцией энапом — 20 крысам на протяжении 2-х недель три раза в сутки одновременно интраперитонеально вводились прозерин в дозе 20 мкг/кг и энап (эналаприлат) в дозе 20 мкг/кг.

Через 2 недели введения препаратов под эфирным наркозом проводилась декапитация 10 животных из каждой серии эксперимента и осуществлялся забор материала на исследование. Оставшиеся 10 крыс I и II серий эксперимента после прекращения двухнедельного введения препаратов в течение месяца содержались в обычных условиях без каких-либо медикаментозных и стрессовых воздействий, после чего под эфирным наркозом также проводилась декапитация животных и забор материала на исследование.

Контрольную серию составили 20 крыс, сопоставимых по возрасту и массе (200 ± 20 г). Крысы контрольной серии содержались в отдельном помещении и не подвергались никаким медикаментозным и стрессовым воздействиям. 10 крыс контрольной серии через 2 недели и 10 крыс контрольной серии через 1 месяц от начала эксперимента под эфирным наркозом декапитировались, и производился забор материала на исследование. Кусочки стенки брюшной аорты фиксировали в 10 %-м растворе нейтрального формалина, дегидратировали в спиртах возрастающей концентрации и заливали в парафин по общепринятой методике с последующим изготовлением срезов ткани толщиной 4 мкм. Парафиновые срезы, окрашенные по ван Гизону, исследовались с использованием светооптического бинокулярного микроскопа Axioscope A1 (Carl Zeiss, Германия). В 9 полях зрения ($0,42 \times 0,32$ мм, площадь кадра — $0,13$ мм²) при увеличении $\times 400$ у каждой крысы в меди брюшного отдела аорты во всех сериях эксперимента с помощью сетки Г. Г. Автандилова [1] производился подсчет в объемных процентах (об. %) объема внеклеточных пространств (ВКП).

Для исследования изменения эластинового каркаса аорты парафиновые срезы окрашивали орсеином по Шиката. Морфометрия парафиновых срезов, окрашенных орсеином, проводилась планиметрическим методом. Относительный объем структур оцени-

вался по относительной площади, занимаемой ими на фотографиях микропрепаратов. Относительная площадь структур измерялась с помощью сетки Г. Г. Автандилова. Измерения проводились в 11 полях зрения ($1,08 \times 0,81$ мм, площадь кадра — $0,87$ мм²) при увеличении $\times 400$ у каждой крысы во всех сериях эксперимента. Производился подсчет в объемных процентах (об. %) плотности эластина в средней оболочке брюшной аорты.

При статистической обработке полученных данных из методов непараметрической статистики использовался метод сравнения данных по медиане ($M \pm Sd$) — критерий Фридмана и конкордация Кэндалла. Для визуализации полученных результатов исследования использовался графико-аналитический метод. Весь статистический анализ проводился с использованием программы «STATISTICA 99» (Stat Soft, Inc).

Результаты исследования и их обсуждение

Показано, что при моделировании ХАС произошли значительные изменения содержания эластина в стенке брюшного отдела аорты (рис. 1).

Если в контроле содержание эластина было $M=49,87 \pm 7,19$ об. %, то через 2 недели эксперимента — $M=38,55 \pm 9,42$ об. % ($\chi^2=13,363$; $p<0,00026$). Интересно отметить, что доля препаратов с плотностью эластина ≥ 50 об. % в контрольной группе составляла 39,4 %, тогда как при ХАС — 23,6 % ($\chi^2=6,820$; $p<0,009$).

Через месяц после прекращения моделирования ХАС восстановление эластинового каркаса не произошло и плотность эластина осталась примерно такой же, как через 2 недели введения адреналина ($M=38,54 \pm 9,42$ об. % через 2 недели и $M=34,09 \pm 6,45$ об. % через 1 месяц, $p>0,05$).

По плотности эластина в стенке аорты при моделировании ХАС в контрольных точках «2 недели» и «1 месяц» достоверных различий не было выявлено. Однако анализ числа препаратов с плотностью эластина ≥ 50 об. % показал, что через 2 недели их доля составила 26,3 %, тогда как через 1 месяц после прекращения введения адреналина препаратов с плотностью эластина ≥ 50 об. % вообще не было обнаружено ($\chi^2=26,165$; $p<0,0009$).

При визуализации морфологических препаратов (рис. 2–4) эластический каркас аорты имел признаки дегенерации — уменьшение количества эластических мембран (ЭМ), разрушение эластических мостиков между ЭМ, истончение самих мембран, появление в меди аорты пространств, полностью лишенных эластических волокон. Такие качественные и количественные изменения эластического каркаса приводят к потере эластических свойств аорты и нарушению ее функции.

Таким образом, полученные результаты позволяют высказать мысль, что дегенерация эластических волокон аорты происходит не только в период моделирования ХАС, но и после окончания эксперимента, причем процесс этот идет достаточно интенсивно, несмотря на то, что экспериментальные животные не подвергались стрессовому воздействию в течение

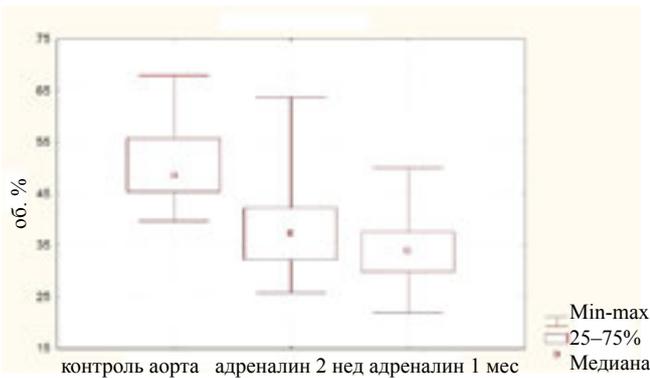


Рис. 1. Динамика плотности эластина (в об. %) через 2 недели введения адреналина и через месяц после прекращения моделирования ХАС по сравнению с контролем

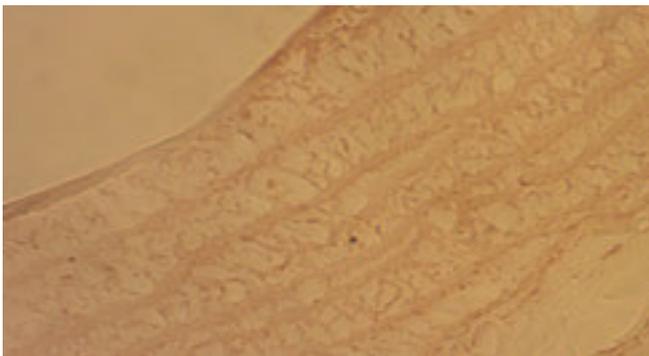


Рис. 3. Стенка брюшной аорты крысы после 2 недель введения адреналина, ув.×400 (размеры поля зрения — 1,08×0,81 мм, площадь — 0,87 мм²), окраска орсеином по Шиката. Отмечаются утолщение, прерывистость эластических мембран, неравномерность их расположения

месяца — эластический каркас аорты не восстанавливался. При ХХС (рис. 5) также происходило значительное снижение содержания эластина в стенке аорты с $M=49,87\pm 7,19$ об. % в контроле до $M=40,99\pm 4,83$ об. % через 2 недели введения препарата ($\chi^2=9,323$; $p<0,00227$). Через 1 месяц «отдыха», несмотря на отсутствие каких-либо стрессовых воздействий, плотность эластина продолжала уменьшаться. Если через 2 недели $M=40,99\pm 4,83$ об. %, то через 1 месяц $M=32,38\pm 5,99$ об. % ($\chi^2=18,939$; $p<0,00001$).

При визуализации препаратов обращает на себя внимание большая выраженность повреждения эластического каркаса на прозерине как через 2 недели, так и через 1 месяц (рис. 6–8).

Следует отметить, что при ХХС уже через 2 недели введения прозерина доля препаратов с плотностью эластина ≥ 50 об. % была достоверно меньше, чем при моделировании ХАС (3 и 23,6 % соответственно) ($\chi^2=5,520$; $p<0,019$). То есть под влиянием прозерина деградация эластиновых волокон через 2 недели была более выраженной по сравнению с изменениями эластических волокон после двухнедельного введения адреналина. Через 1 месяц содержание эластина было примерно одинаково как при ХАС, так и при ХХС: $M = 34,09\pm 6,45$ и $32,38\pm 5,99$ ($p>0,05$).

Доля препаратов с плотностью эластина ≥ 50 об. % через 1 месяц после введения препаратов составляла 0 % при ХАС и 1,8 при ХХС ($p>0,05$).

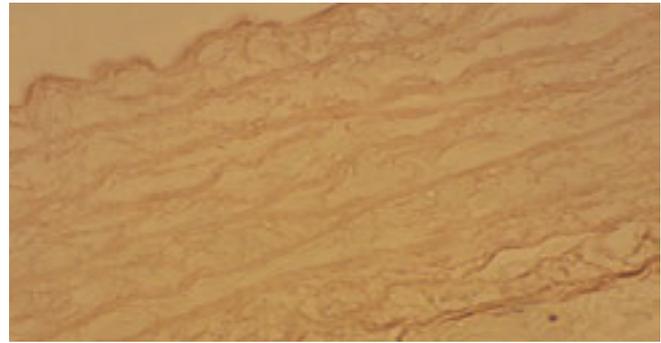


Рис. 2. Стенка брюшной аорты крысы контрольной серии, ув.×400 (размеры поля зрения — 1,08×0,81 мм, площадь — 0,87 мм²), окраска орсеином по Шиката. Эластические волокна в мидии организованы в концентрические эластические мембраны, между которыми проходят тонкие эластиновые мостики

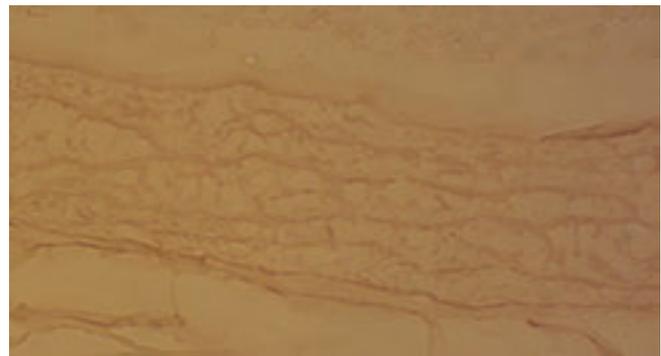


Рис. 4. Стенка брюшной аорты крысы через 1 месяц после отмены адреналина, ув.×400 (размеры поля зрения — 1,08×0,81 мм, площадь — 0,87 мм²), окраска орсеином по Шиката. Отмечаются уменьшение количества слоев эластических мембран, выраженная дезорганизация, деструкция эластических мембран, уменьшение содержания эластина в мидии

Таким образом, деградация эластических волокон при ХХС наступала раньше, чем при ХАС, но после окончания эксперимента процессы деградации эластических волокон продолжались при обоих вариантах стресса, и через месяц после прекращения эксперимента содержание эластических волокон в аорте становилось примерно одинаковым при различных вариантах стресса. Исследование возможностей медикаментозной коррекции изменений эластического каркаса аорты при различных вариантах хронического стресса показало, что в серии крыс, которым в течение 2-х недель вводили адреналин и энап (рис. 9), эластический каркас значительно уменьшился как по сравнению с контрольной серией крыс (плотность эластина $M=49,87\pm 7,19$ об. % в контроле и $M=30,27\pm 8,45$ об. % через 2 недели одновременного введения адреналина и энапа, $\chi^2=25,485$; $p<0,00001$), так и по сравнению с серией крыс, которым в течение 2-х недель вводили только адреналин ($M=38,55\pm 9,42$ об. % в серии ХАС и $M=30,27\pm 8,45$ об. % через 2 недели одновременного введения адреналина и энапа, $\chi^2=13,364$; $p<0,00026$).

Аналогичные изменения эластического каркаса аорты были найдены при одновременном введении прозерина и энапа (рис. 10). Так, через 2 недели одновременного введения прозерина и энапа плотность эластина составила $M=33,41\pm 5,56$ об. %, тогда как в контрольной серии — $M=49,87\pm 7,19$ об. %

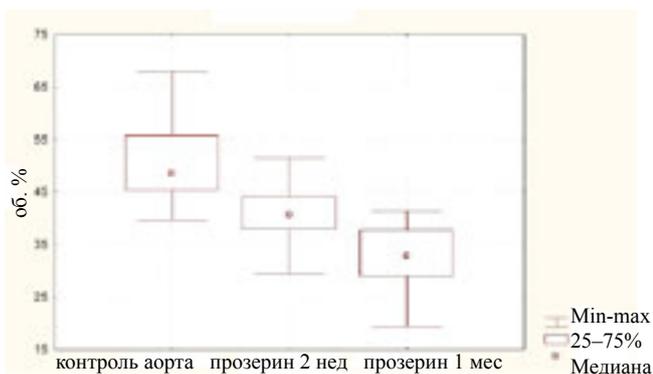


Рис. 5. Динамика плотности эластина (в об. %) через 2 недели введения прозерина и через месяц после прекращения моделирования ХХС по сравнению с контролем



Рис. 6. Стенка брюшной аорты крысы контрольной серии, ув.×400 (размеры поля зрения — 1,08×0,81 мм, площадь — 0,87 мм²), окраска орсеином по Шиката. Эластические волокна в мидии организованы в концентрические эластические мембраны, между которыми проходят тонкие эластиновые мостики



Рис. 7. Стенка брюшной аорты крысы после 2-х недель введения прозерина, ув.×400 (размеры поля зрения — 1,08×0,81 мм, площадь — 0,87 мм²), окраска орсеином по Шиката. Отмечаются дезорганизация эластических мембран, их фрагментация, уменьшение содержания эластина в мидии

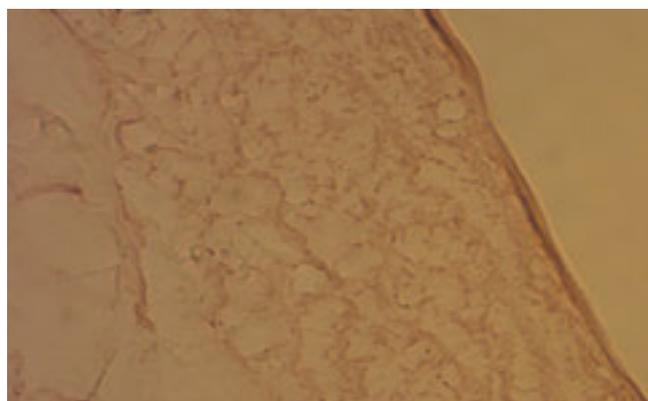


Рис. 8. Стенка брюшной аорты крысы через 1 месяц после отмены прозерина, ув.×400 (размеры поля зрения — 1,08×0,81 мм, площадь — 0,87 мм²), окраска орсеином по Шиката. Отмечаются выраженная деструкция эластических мембран с распадом на мелкие фрагменты, уменьшение содержания эластина в мидии

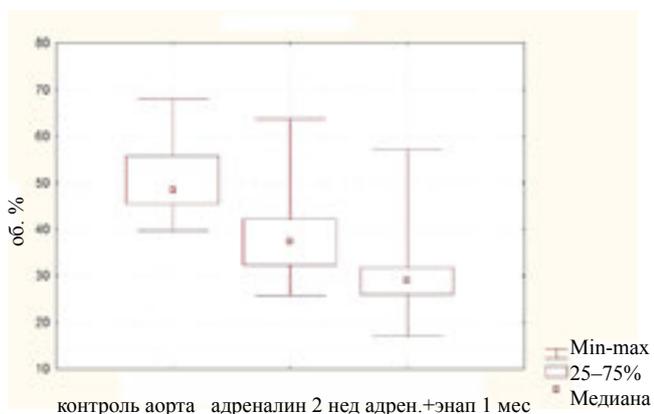


Рис. 9. Динамика плотности эластина (в об. %) через 2 недели введения адреналина и через 2 недели одновременного введения адреналина и энапа по сравнению с контролем

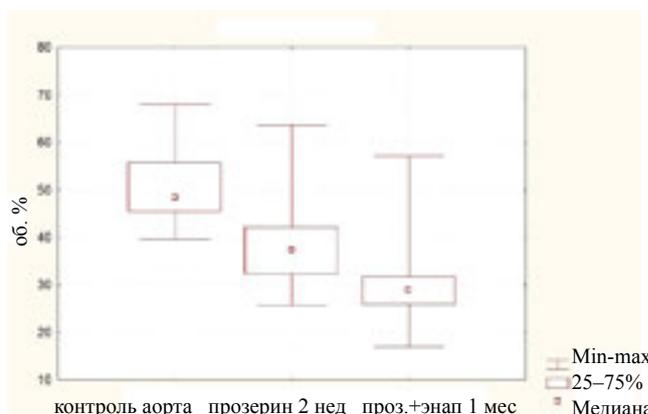


Рис. 10. Динамика плотности эластина (в об. %) через 2 недели введения прозерина и через 2 недели одновременного введения прозерина и энапа по сравнению с контролем



Рис. 11. Стенка брюшной аорты крысы после 2-х недель введения адреналина, ув.×400 (размеры поля зрения — 1,08×0,81 мм, площадь — 0,87 мм²), окраска орсеином по Шиката. Отмечаются утолщение, прерывистость эластических мембран, неравномерность их расположения

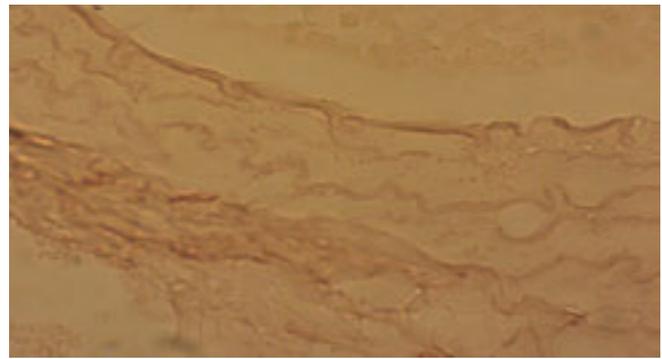


Рис. 12. Стенка брюшной аорты крысы через 2 недели после введения адреналина и энапа, ув.×400, окраска орсеином по Шиката. Отмечаются уменьшение количества слоев эластических мембран, выраженная дезорганизация, деструкция эластических мембран, уменьшение содержания эластина в меди

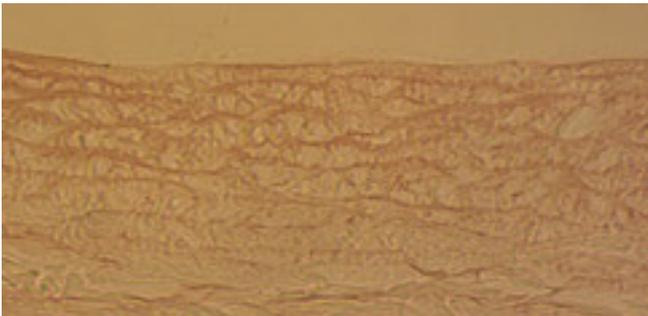


Рис. 13. Стенка брюшной аорты крысы после 2-х недель введения прозерина, ув.×400 (размеры поля зрения — 1,08×0,81 мм, площадь — 0,87 мм²), окраска орсеином по Шиката. Отмечаются истончение меди, дезорганизация эластических мембран, их фрагментация, уменьшение содержания эластина в меди

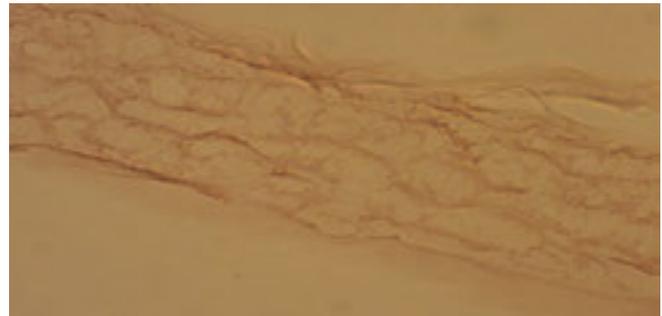


Рис. 14. Стенка брюшной аорты крысы через 2 недели после введения прозерина и энапа, ув.×400, окраска орсеином по Шиката. Отмечаются уменьшение количества слоев эластических мембран, выраженная дезорганизация, деструкция эластических мембран, уменьшение содержания эластина в меди

($\chi^2=33,000$; $p<0,0001$). В стенке аорты крыс, которым в течение 2-х недель одновременно вводился прозерин и энап, плотность эластина также была значительно меньше по сравнению с данными морфометрии через 2 недели введения только прозерина (с $M=40,99\pm 4,83$ об. % на прозерине и $M=33,41\pm 5,56$ об. % через 2 недели одновременного введения прозерина и энапа, $\chi^2=13,364$; $p<0,00026$).

Таким образом, введение энапа как при ХАС (рис. 11; 12), так и при ХХС (рис. 13; 14) не только не уменьшает, но и усиливает деградацию эластина в стенке аорты.

Выраженные изменения эластического каркаса меди аорты, вероятно, связаны, как это показано в наших предыдущих работах (Рубанова М. П. и др., 2013; Вебер В. Р. и др., 2014), прежде всего, с увеличением жидкостных пространств. Известно, что межклеточная (интерстициальная) жидкость играет важнейшую роль промежуточной среды, через которую осуществляется двусторонний обмен веществами (вода, органические и неорганические вещества) между кровью и клетками других тканей [2, 3]. Отек внеклеточных пространств приводит к колоссальным нарушениям микроциркуляции, что, вероятно, способствует деградации эластических волокон. Парадоксальный эффект, который получен при применении эналаприла, вероятно, связан с тем, что эналаприл, как все ИАПФ, снижает АД в результате выраженного периферического вазодилатирующего

эффекта. Снижение АД и вазодилатирующий эффект создают условия для задержки жидкости в измененном внеклеточном матриксе, что способствует дальнейшему еще большему увеличению ВКП и усилению деградации эластических волокон. В многочисленных работах показан протективный эффект ИАПФ на миокард как ЛЖ, так и ПЖ, при стрессовых воздействиях. Результаты исследования показали, что на эластический каркас аорты энап не оказывает протективного эффекта, мало того, утяжеляет ремоделирование эластического каркаса аорты.

Выводы

1. Как при хроническом адренергическом стрессе, так и при хроническом холинергическом стрессе происходит значительное уменьшение содержания эластина в стенке брюшной аорты.

2. Темпы деградации эластина при хроническом холинергическом стрессе выше по сравнению с хроническим адренергическим стрессом: содержание эластина во внеклеточном матриксе аорты достоверно ниже через 2 недели введения прозерина по сравнению с содержанием эластина через 2 недели введения адреналина.

3. В течение месяца после прекращения эксперимента содержание эластина продолжает уменьшаться и становится примерно одинаковым при обоих вариантах хронического стресса. То есть механизмы деградации эластина, запущенные в период моде-

лирования обоих вариантов хронического стресса, продолжают «работать» и в течение месяца после окончания эксперимента.

4. При введении ингибитора АПФ эналаприлата в течение 2-х недель одновременно с адреналином (III серия) и одновременно с прозеринном (IV серия) наблюдается еще более выраженное достоверное

снижение плотности эластина. Вероятно, это связано с усилением отека внеклеточных пространств в результате гипотензивного и вазодилатирующего эффектов эналаприлата. Действие препарата еще более усугубляет развивающуюся под влиянием адреналина и прозерина деградацию эластиновых волокон.

Литература

1. Автандилов Г. Г. *Медицинская морфометрия: руководство*. М.: Медицина, 1990. С. 204–205.

2. Вебер В. Р., Рубанова М. П., Жмайлова С. В. и др. Влияние однократного и длительного введения катехоламинов на жидкостные пространства миокарда крыс // *Росс. мед. журн.* 2011. № 2. С. 23–27.

3. Вебер В. Р., Губская П. М., Жмайлова С. В., Белозеров В. К. Изменение внеклеточных пространств по оси: сердце-аорта-бедренная артерия при хроническом адренергическом стресса в эксперименте // *Кардиоваскулярная терапия и профилактика*. 2014. № 13. С. 23.

4. Гауровиц Ф. *Химия и функции белков / пер. с англ.* 2-е изд., М., 1965; N.-Y.; London: *Elastin and Elastic tissue*, 1977.

5. Шабалин В. Н., Шатохина С. Н. *Морфология биологических жидкостей человека*. М.: Медицина, 2001. 304 с.

6. Avolio A., Chen S. G., Wang R. P. et al. Effects of aging on changing arterial compliance and left ventricular load in a northern Chinese urban community // *Circulation*. 1983. Vol. 68. № 1. P. 50–58.

7. Shabalin V. N., Shatokhina S. N. Diagnostic markers in the structures of human biological liquids // *Singapore med. J.* 2007. Vol. 48. № 5. P. 440–447.

UDK [616-092.19-036.12:616.136]-08-092.4

Veber V. R., Gubskaya P. M., Rubanova M. P., Zhmailova S. V., Proshina L. G., Romyantsev Y. Y., Ataev I. A., Kulik N. A.

Changes in elastic skeleton of abdominal aorta under modeling of different types of chronic stress in experiment and possibilities of their correction by enalapril

Yaroslav-the-Wise Novgorod State University, 173003, Bolshaya Sankt-Peterburgskaya str. 41, Novgorod, Russia
e-mail: zhmailova.svetlana@yandex.ru

Abstract

Article describes changes in elastic skeleton of the aortic tunica media under modeling of different types of chronic stress. In the experimental study on male Wistar rats, two versions of the model of chronic stress were used: 1) by a two-week intraperitoneal administration of epinephrine (chronic adrenergic stress) and 2) anticholinesterase inhibitor neostigmine (chronic cholinergic stress). The authors have shown that in both cases of chronic stress there was a significant decrease of elastin content in the wall of the abdominal aorta, and the proportion of areas with elastin density ≥ 50 vol % after 2 weeks of administration of neostigmine was significantly less than after 2 weeks of administration of epinephrine, which suggests that elastin degradation is more pronounced in chronic cholinergic stress. Changes in elastic skeleton persist even 1 month after cessation of modeling of both types of stress. It was revealed that two-week introduction of angiotensin inhibitor enalaprilate simultaneously with epinephrine or neostigmine does not prevent changes in elastic skeleton of aorta. In both cases, statistically reliable reduction of elastin content was noted.

Keywords: adrenergic stress, chronic cholinergic stress, aorta, elastin, enalaprilate.

References

1. Avtandilov G.G. *Medicinskaja morfometrija. Rukovodstvo*. [Medical morphometry. Guideline]. Moscow: «Medicine». 1990. P. 204-205. [In Russian].

2. Veber V.R., Rubanova M.P., Zhmajlova S.V., Gubskaja P.M., Kopina M.N. Vlijanie odnokratnogo i dlitel'nogo vvedenija kateholaminov na zhidkostnye prostranstva miokarda krys. [Influence of bolus and protracted introduction of catecholamines on liquid spaces of myocardium of rats] // *Rossijskij medicinskij zhurnal*. [Russian medical journal]. 2011. N 2. P. 23-27. [In Russian].

3. Veber V.R., Gubskaja P.M., Zhmajlova S.V., Belozеров V.K. Izmenenie vnekletочnyh prostranstv po osi: serdce-aorta-bedrennaja arterija pri hronicheskom adrenergicheskom stressa v jeksperimente. [Changes of extracellular spaces on an axis: a heart-aorta-femoral artery at chronic adrenergic stress in experiment] // *Kardiovaskuljarnaja terapija i*

profilaktika. [Cardiovascular therapy and prevention]. 2014. N 13. P. 23. [In Russian].

4. Gaurovic F., Himija i funkcii belkov, per. s angl., 2-e izd. [Chemistry and functions of proteins, translation from English, 2nd ed.]. Moscow. 1965. [In Russian].

5. Shabalin V.N., Shatokhina S.N. *Morfologija biologicheskijh zhidkostej cheloveka* [Morphology of human biological liquids]. Moskva: «Medicina». [Moscow: «Medicine»]. 2001. P. 304. [In Russian].

6. Avolio A., Chen S.G., Wang R.P. et al. Effects of aging on changing arterial compliance and left ventricular load in a northern Chinese urban community // *Circulation*. 1983. V. 68. N 1. P. 50- 58.

7. Shabalin V.N., Shatokhina S.N. Diagnostic markers in the structures of human biological liquids/ *Singapore med J.* 2007; V. 48.N5. P. 440-447.