

Експериментальна медицина та морфологія

УДК 591.4:616.831-005:615.874:577.16

І.І.Андрушко, О.О.Пентюк

МОРФОЛОГІЧНІ ЗМІНИ В АОРТІ ТА СЕРЦІ ЩУРІВ ЗА УМОВ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЇ ГІПЕРГОМОЦИСТЕЇНЕМІЇ ТА КОРЕКЦІЇ ЇЇ ВІТАМІННО-МІНЕРАЛЬНИМ КОМПЛЕКСОМ

Кафедра внутрішньої медицини № 1 (зав. – проф. М.А.Станіславчук)
Вінницького національного медичного університету ім. М.І.Пирогова

Резюме. Оцінено морфологічну структуру серця та аорти в щурів за умов хронічної тіолактонової гіпергомоцистеїнемії (ГГЦ), її поєднання з артеріальною гіпертензією та корекції ГГЦ вітамінно-мінеральним комплексом. У тварин з ГГЦ виявлено морфологічні зміни в судинах (стази, тромбози, десквамація ендоте-

лію, гіпертрофія та гіперплазія гладеньком'язових клітин) і дистрофічні зміни в міокарді. Призначення тваринам вітамінно-мінерального комплексу (ВМК) зменшувало негативний вплив ГГЦ на серцево-судинну систему.

Вступ. Результати численних епідеміологічних досліджень встановили, що ГГЦ є незалежним чинником ризику серцево-судинних захворювань, включаючи ішемічну хворобу серця, інсульти, захворювання периферійних судин [1, 8, 2] та гіпертонічну хворобу [1].

Механізм несприятливої дії надлишку гомоцистеїну (ГЦ) на серцево-судинну систему (ССС) пов'язують з його токсичною дією на ендотелій судин через стимуляцію проліферації гладеньком'язових клітин судин, посилення оксидативного стресу, активацію агрегації тромбоцитів і коагуляційного каскаду, гальмування антикоагуляційної системи [8, 5, 9, 10]. Однак морфологічні прояви, індукованих ГГЦ змін у ССС чітко не ідентифіковані, як це, наприклад, зроблено для атерогенезу, асоційованого з дисліпідемією, для якого встановлена чітка стадійність процесу від появи ліпідних плям до формування атеросклеротичної бляшки [4]. У дослідженнях на міні-свинях продемонстровано, що індукована метіоніном ГГЦ супроводжується гіпертрофією ендотеліальних клітин, ущільненням субендотеліального простору, зміщенням еластичної мембрани, гіпертрофією гладеньких м'язових клітин, розшаруванням середньої оболонки в артеріальних судинах [7]. У щурів метіонінова ГГЦ викликала пошкодження ендотеліальних клітин та проліферацію гладеньких м'язових клітин [3]. Слід зауважити, що ці дослідження проведені на метіоніновій моделі ГГЦ і торкались судин, а вплив, власне ГЦ, на стан судин та серця залишається невивченим. Залишається невідомим характер морфологічних змін у ССС при комбінуванні ГГЦ з артеріальною гіпертонією (у клінічній практиці таке поєднання трапляється досить часто) та їх динаміка за умов фармакологічної корекції.

Мета дослідження. Оцінити морфологічні структури серця та аорти за умов хронічної тіола-

ктонової ГГЦ та її поєднання з артеріальною гіпертензією, викликаній введенням інгібітора синтази оксиду азоту L-NAME та корекції ГГЦ вітамінно-мінеральним комплексом.

Матеріал і методи. Дослідження проведені на 40 білих безпородних щурах-самцях масою 160-250 г, яких утримували в стандартних умовах експериментальної клініки ВНМУ ім. Пирогова М.І. Експерименти проведені з дотриманням Європейської конвенції по захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментах та інших наукових цілях (Страсбург, 1986). Тварини були розподілені на чотири дослідні групи, кожна з яких включала 10 тварин. Щури 1-ї групи (інтактні) отримували стандартний сухий раціон, збалансований за всіма нутрієнтами, виробництва НВП ФУД (м. Київ). Щурам 2-ї групи на фоні стандартної дієти вводили інтрагастрально тіолактон ГЦ з розрахунку 100 мг/кг на 1 % розчині крохмалю протягом чотирьох тижнів. Тваринам 3-ї групи вводили інтрагастрально тіолактон ГЦ з розрахунку 100 мг/кг у комбінації з L-NAME в дозі 30 мг/кг/день на 1 % розчині крохмалю протягом чотирьох тижнів. За даними літератури, L-NAME в дозах 20-40 мг/кг викликає артеріальну гіпертензію, ремоделювання та фіброз міокарда [6].

Щури 4-ї групи на фоні введення тіолактонової ГЦ та L-NAME отримували з дієтою ВМК, який забезпечував надходження в організм кожної тварини по 0,714 мг вітаміну В₆, 0,143 мг вітаміну В₉ та 0,0143 мг вітаміну В₁₂ на 1 кг маси тіла щура, цинку – 1 мг/кг, хрому – 7,5 мкг/кг, ванадію – 0,93 мкг/кг.

Для мікроскопічного дослідження шматочки серця та аорти фіксували у 10 % розчині нейтрального формаліну за стандартною методикою, зневоднювали в етанолі зростаючої концентрації та заключали в парафін. Гістологічні зрізи тов-

щиною 3-5 мкм фарбували гематоксиліном та еозином, вивчали та фотодокументували за допомогою мікроскопа МБІ-6.

Результати дослідження та їх обговорення.

Загальний рівень ГЦ у крові тварин з тіолактоновою ГГЦ виявився в 2,5 раза вищим за такий у щурів контрольної групи ($15,2 \pm 1,05$ проти $6,02 \pm 0,56$ мкмоль/л). Уведення тваринам тіолактону ГЦ разом з L-NAME зумовлювало підвищення рівня загального ГЦ у 2,7 раза (до $16,7 \pm 1,03$ мкмоль/л). Застосування ВМК перешкоджало розвитку ГГЦ, і вміст загального ГЦ у цих тварин виявився на 42,6 % нижчим, порівняно з щурами, які отримували тіолактон ГЦ + L-NAME (відповідно $9,60 \pm 0,66$ проти $16,7 \pm 1,03$ мкмоль/л).

Гістологічне дослідження аорти щурів з експериментальною тіолактон-індукованою ГГЦ виявило наявність агрегатів еритроцитів у просвіті судини. Ендотеліоцити в аорті не утворювали суцільний шар, відмічалися ділянки їх виразної десквамації. У зрізах аорти виявлені вогнища проліферації ендотеліоцитів у вигляді «частоколу». У місцях десквамації ендотелію реєструвався виразний набряк внутрішньої оболонки аорти і в таких ділянках часто виявляли проліферацію гладеньких міоцитів. Тромбоцити та еритроцити утворювали тромби, прикріплені до ендотелію. У середній оболонці аорти відмічається розволокнення вікончастих еластичних мембран, гіперплазія та гіпертрофія гладеньких міоцитів. У зовнішній оболонці аорти відмічено лейкоцитарну інфільтрацію, а судини – гіперемовані, в артеріолах розташовані пристінкові тромби (рис. 1).

У тварин, яким протягом чотирьох тижнів вводили інтрагастрально тіолактон ГЦ у комбінації з L-NAME, відмічено виразну агрегацію еритроцитів у просвіті аорти, досить часто такі агрегати займали більшу частину просвіту аорти з утворенням пристінкових тромбів.

Ендотеліальна вистилка аорти не утворювала суцільного шару клітин. При ретракції тромба виявлялись ділянки десквамації ендотеліоцитів та значний набряк інтими в цих місцях (рис. 2).

Однак, на відміну від групи дослідних тварин із тіолактон-індукованою ГГЦ, проліферація ендотеліоцитів у вогнищах десквамації менш виражена. Відмічено розволокнення еластичних мембран у середній оболонці та виразну гіпертрофію і гіперплазію гладеньких міоцитів, а також значну гістіолімфоцитарну інфільтрацію зовнішньої оболонки аорти (рис. 3).

У тварин, яким на фоні введення тіолактону ГЦ у комбінації з L-NAME призначали ВМК, в аорті виявлено менш виразну агрегацію тромбоцитів та еритроцитів порівняно з тваринами без корекції. Загальний план будови стінки аорти подібний до контрольних тварин (рис. 4), хоча, подекуди виявлялися незначні ділянки десквамації ендотеліоцитів, поодинокі пристінкові тромби, менші, ніж у тварин попередніх груп.

Набряк інтими у тварин, що отримували ВМК, незначний, еластичні мембрани в середній

оболонці аорти не відрізнялися за будовою від контрольних тварин, значно меншою виявилася проліферація гладеньких міоцитів середньої оболонки аорти порівняно з тваринами без корекції.

Аналіз результатів гістологічного дослідження серця тварин з тіолактон-індукованою ГГЦ показав, що загальний план будови міокарда є подібним до такого в щурів контрольної групи. Морфологічні зміни виявлялися в судинах мікроциркуляторного русла (МЦР), стромі та паренхімі.

Зміни в артеріолах проявлялися наявністю тромбів в їх просвітах, неоднорідністю діаметрів артеріол, потовщенням їх стінки, гіпертрофією гладеньких міоцитів у медії. В ендотеліальному шарі виявляли ділянки десквамації та проліферації ендотеліоцитів. Навколо артеріол виявлено набряк стромі міокарда. Просвіти венул значно розширені з наявністю в них пристінкових тромбів, ендотеліальна вистилка неоднорідна, подекуди ендотеліоцити розташовані у вигляді «частоколу» (рис. 5).

Ядра кардіоміоцитів просвітлені, видовжені порівняно з контролем, подекуди в них виявлені інвагінації нуклеоплазми. Трапляються кардіоміоцити з відсутньою поперечною посмугованістю.

Також спостерігали поширені вогнища некрозу кардіоміоцитів, виражену гіпертрофію та гіперплазію фібробластів і гістіолімфоцитарна інфільтрацію.

У групі тварин, яким вводили тіолактон ГЦ з L-NAME, при морфологічному дослідженні міокарда виявлено гіперемію артеріол та наявність в їх просвітах тромбів. Середня оболонка артеріол характеризувалася гіпертрофією та гіперплазією гладеньких міоцитів. Навколо артеріол реєструвався виразний набряк стромі (рис. 6), а в просвіті венул – тромби.

Просвіти капілярів розширені, гіперемовані, ендотеліальна вистилка не суцільна, виявлено ділянки десквамації ендотеліоцитів та наявність складу еритроцитів у просвітах капілярів. У кардіоміоцитах спостерігали набряк саркоплазми, втрату посмугованості, вакуольну дистрофію, іноді вогнища некрозу кардіоміоцитів з гістіолімфоцитарною інфільтрацією, в яких була виражена гіперплазія та гіпертрофія фібробластів.

На фоні застосування ВМК у щурів 3-ї групи (ГЦ в комбінації з L-NAME), зміни з боку міокарда менш виразні порівняно з тваринами без корекції. Проте у тварин цієї групи в артеріолах виявили повнокров'я, але на відміну від групи щурів без корекції ВМК не виявлено тромбів у просвітах судин. Ендотеліоцити в стінці артеріол неоднорідні за забарвленням цитоплазми та ядер. Так, більшість ендотеліальних клітин нормохромні за наявності певної кількості клітин з гіпохромною цитоплазмою, а хроматин в їх ядрах конденсований на периферії. Набряк інтими артеріол слабкий, меншою була гіпертрофія та гіперплазія гладеньких міоцитів у середній оболонці, ніж у групах тварин з ГГЦ без корекції ВМК. Просвіти вен розширені, гіперемовані, однак ендотеліаль-

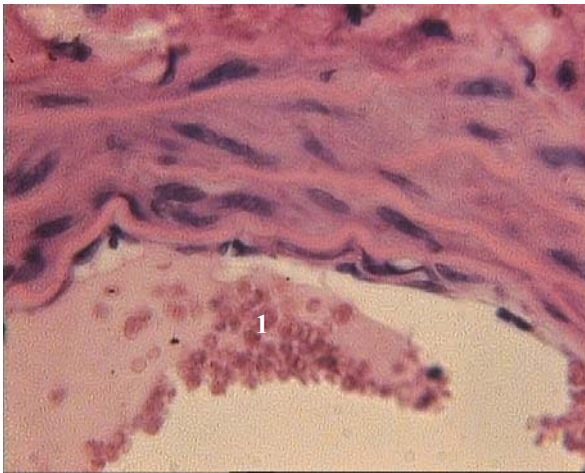


Рис. 1. Світлооптична будова фрагмента аорти щура при тіолактон-індукованій гіпергомоцистеїнемії. 1 – пристінкові тромби в артеріолах. Гематоксилін-еозин. Зб. × 400

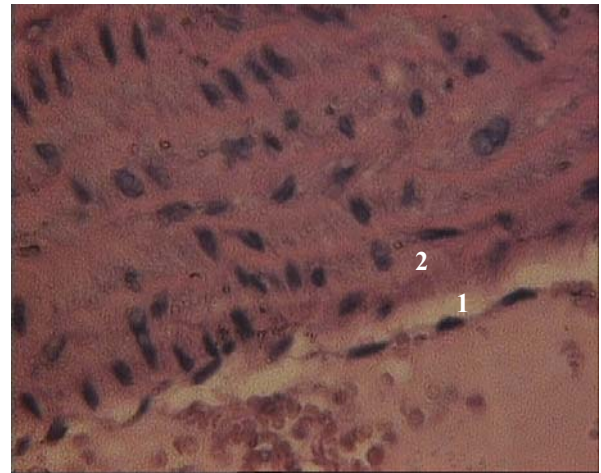


Рис. 2. Світлооптична будова фрагмента аорти щура при тіолактон-індукованій гіпергомоцистеїнемії в комбінації з L-NAME. 1 – ділянки десквамації ендотеліоцитів; 2 – набряк інтими. Гематоксилін-еозин. Зб. × 400

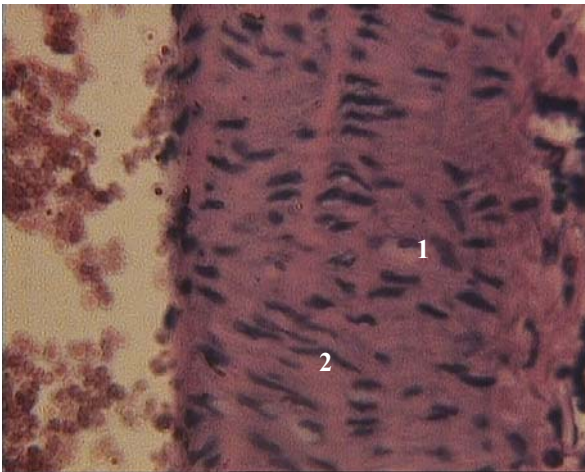


Рис. 3. Світлооптична будова фрагмента аорти щура при тіолактон-індукованій гіпергомоцистеїнемії в комбінації з L-NAME. 1 – розволокнення еластичних мембран у середній оболонці аорти; 2 – гіпертрофія і гіперплазія гладеньких міоцитів. Гематоксилін-еозин. Зб. × 400

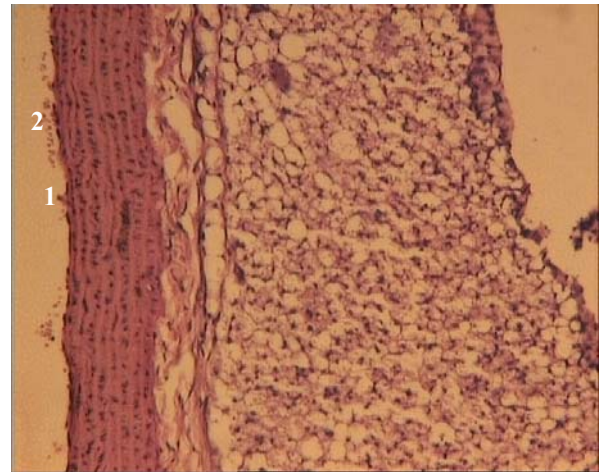


Рис. 4. Світлооптична будова фрагмента аорти щура при тіолактон-індукованій гіпергомоцистеїнемії в комбінації з L-NAME та ВМК. 1 – вогнища десквамації ендотеліоцитів; 2 – пристінкові тромби. Гематоксилін-еозин. Зб. × 100

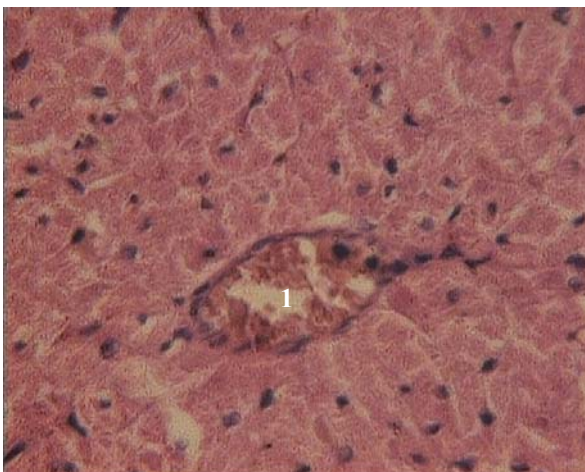


Рис. 5. Мікроскопічна організація серця щура при тіолактон-індукованій гіпергомоцистеїнемії в поєднанні з L-NAME. 1 – пристінкові тромби в просвітах венул. Гематоксилін-еозин. Зб. × 400

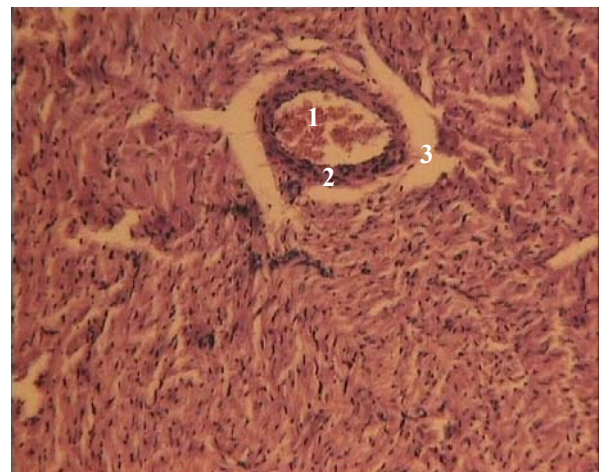


Рис. 6. Мікроскопічна організація серця щура при тіолактон-індукованій гіпергомоцистеїнемії в поєднанні з L-NAME. 1 – тромби в просвіті артеріол; 2 – гіпертрофія та гіперплазія гладеньких міоцитів у середній оболонці; 3 – набряк строми навколо артеріол. Гематоксилін-еозин. Зб. × 100

ний шар цілісний, без ділянок десквамації. Набряк інтерстицію менш виражений, не виявлялася лейкоцитарна інфільтрація в периваскулярному просторі порівняно з тваринами з ГГЦ без корекції ВМК.

Просвіти кровососних капілярів розширені, гіперемовані, проте не виявлено стази еритроцитів та адгезії тромбоцитів і еритроцитів до ендотеліальної вистилки капілярів. Ендотеліальний шар цілісний, подекуди виявлялися гіпертрофовані ендотеліоцити з великими ядрами.

Кардіоміоцити були неоднорідні за формою, розмірами та забарвленням. Більша частина клітин мала нормохромне забарвлення із збереженою поперечною посмугованістю міофібрил і за будовою не відрізнялись від тварин контрольної групи. Однак траплялися поодинокі кардіоміоцити з розволоненими міофібрилами без поперечної посмугованості, а також міоцити з деструкцією саркоплазми та некротизовані кардіоміоцити. В осередках некрозу розташовані лейкоцити, фібробласти.

Таким чином, у тварин з тіолактон-індукованою ГГЦ виявлялися агрегація еритроцитів і тромбоцитів у просвіті аорти, адгезія еритроцитів до ендотелію аорти, утворення пристінкових тромбів, розміри яких вирізнялися своєю варіабельністю. Виявлено деструкцію ендотеліоцитів, порушення цілісності ендотеліального шару, набряк інтими, розволонення еластичних мембран, гіперплазію та гіпертрофію гладеньких міоцитів у середній оболонці аорти, гіперемію судин зовнішньої оболонки аорти та порушення цілісності ендотелію в їх стінці.

ГГЦ викликала патологічні зміни і в судинах МЦР міокарда, деструктивні зміни в кардіоміоцитах, проліферацію сполучної тканини, а саме: у судинах МЦР утворювалися тромби в просвітах артеріол та венул. Зменшувався просвіт артеріол за рахунок гіпертрофії та гіперплазії гладеньких міоцитів. Той факт, що в деяких артеріолах тромби займали весь простір або більшу його частину, а подекуди були і ретрагованими, тоді як здебільшого тромби розташовувалися пристінково, вказує на те, що тромби утворювалися постійно протягом усього експерименту. Стаз еритроцитів у капілярах та деструкція ендотеліоцитів призводили до порушення обміну речовин, ішемії міокарда. У кардіоміоцитах виявляли вакуолярну дистрофію саркоплазми, втрату посмугованості міофібрил. Ділянки перескорочених кардіоміоцитів свідчать про порушення енергетичного балансу в клітинах. Виявлено значні ділянки некрозу кардіоміоцитів з виразною лейкоцитарною інфільтрацією, фіброзом та склерозом строми та рубцевими змінами. Разом з цим виявлено ділянки некрозу з лейкоцитарною інфільтрацією та проліферацією фібробластів. Така «мозаїчна» структура міокарда вказує, що процес деструкції кардіоміоцитів триває перманентно, протягом всього періоду експерименту.

Призначення ВМК значно зменшує негативний вплив ГГЦ на морфологічну структуру ССС. Відмічено зменшення агрегації тромбоцитів та еритроцитів у просвіті аорти, зменшення числа тромбів та їх розмірів. Менш виразні зміни в ендотеліоцитах, зокрема, ділянки десквамації незначні, менший набряк в інтимі, еластичні мембрани за своєю будовою не вирізнялися від еластичних мембран контрольної групи тварин. Меншою була гіперплазія гладеньких міоцитів у стінці аорти.

Щодо міокарда, то призначення ВМК хоча і не призводило до повної корекції негативного впливу ГГЦ на міокард, проте, додавання його зменшувало морфологічну перебудову міокарда та більша частина кардіоміоцитів за будовою була схожа до такої у тварин контрольної групи, що свідчить про кардіопротекторну дію ВМК. Виявлення в судинах МЦР поодиноких і зменшених за площею пристінкових тромбів, а також наявність невеликих ділянок десквамації ендотеліоцитів свідчить про ендотелійпротекторну дію ВМК.

Висновки

1. Вміст загального гомоцистеїну в крові значно вищий за такий у щурів контрольної групи як у групі тварин, яким вводили тіолактон гомоцистеїну (у 2,5 раза), так і в групі з комбінованим введенням його з L-NAME (у 2,7 раза).

2. У тварин із тіолактон-індукованою гіпергомоцистеїнемією виявлено агрегацію еритроцитів і тромбоцитів у просвіті аорти, адгезію еритроцитів до ендотелію аорти, утворення пристінкових тромбів, розміри яких вирізнялися своєю варіабельністю. Зазначено деструкцію ендотеліоцитів, порушення цілісності ендотеліального шару, набряк інтими, розволонення еластичних мембран, гіперплазію та гіпертрофію гладеньких міоцитів у середній оболонці аорти, гіперемію судин зовнішньої оболонки аорти та порушення цілісності ендотелію.

3. Додаткове призначення тваринам вітамінно-мінерального комплексу на фоні введення тіолактону гомоцистеїну разом з L-NAME зменшувало вміст загального гомоцистеїну на 42,6 % порівняно з такими без корекції. Призначення вітамінно-мінерального комплексу також зменшувало проатерогенні та протромботичні тіолактон-індуковані зміни в аорті та міокарді.

Перспективи подальших досліджень. Хоча зв'язок високого рівня гомоцистеїну з ураженням судин підтверджений як клінічно, так і експериментально, однак безпосередні молекулярні механізми пошкоджуючої дії надлишку ГЦ залишаються невідомими і тому потребують подальшого з'ясування. Це дало б можливість розробити патогенетично обґрунтовані підходи до корекції несприятливої дії надлишку ГЦ на серцево-судинну систему.

Література

1. Андрушко І.І. Гіпергомоцистеїнемія у пацієнтів з гіпертонічною хворобою та її зв'язок з

- важкістю перебігу / І.І.Андрушко, В.К.Серкова, О.О.Пентюк // Укр. кардіол. ж. – 2003. – № 2. – С. 52-56.
2. Homocysteine and coronary atherosclerosis: from folate fortification to the recent clinical trials / C.Antoniades, A.S.Antonopoulos, D.Tousoulis [et al.] // Eur Heart J. – 2009. – Vol. 30, № 1. – P. 6-15.
 3. Homocysteine and arterial disease. Experimental mechanisms / J.W.Cook, L.M.Taylor, S.L.Orloff [et al.] // Vascul Pharmacol. – 2002. – Vol. 38, № 5. – P. 293-300.
 4. Doran A.C. Role of smooth muscle cells in the initiation and early progression of atherosclerosis / A.C.Doran, N.Meller, C.A.McNamara // Arterioscler Thromb Vasc Biol. – 2008. – Vol. 28, № 5. – P. 812-819.
 5. Jakubowski H. The pathophysiological hypothesis of homocysteine thiolactone-mediated vascular disease / H.Jakubowski // J. Physiol. Pharmacol. – 2008. – Vol. 59, № 9. – P. 155-167.
 6. L-NAME-induced protein remodeling and fibrosis in the rat heart / O.Pechánová, I.Bernátová, V.Pelouch [et al.] // Physiol. Res. – 1999. – Vol. 48, № 5. – P. 353-362.
 7. Hyperhomocysteinemia-Induced Vascular ge in the Minipig Captopril-Hydrochlorothiazide Combination Prevents Elastic Alterations / P.H.Rolland, A.Friggi, A.Barlatier [et al.] // Circulation. – 1995. – № 91. – P. 1161-1174.
 8. Methionine-induced hyperhomocysteinemia modulates lipoprotein profile and oxidative stress but not progression of atherosclerosis in aged apolipoprotein E knockout mice / Y.Song, M.Cho, C.Cho [et al.] // J. Med. Food. – 2009. – Vol. 12, №1. – P. 137-144.
 9. A comparative study on pathogenic effects of homocysteine and cysteine on atherosclerosis / J.Su, S.Wang, Y.Hunag [et al.] // Wei Sheng Yan Jiu. – 2009. – Vol. 38, № 1. – P. 43-46.
 10. Trabetti E. Homocysteine, MTHFR gene polymorphisms, and cardio-cerebrovascular risk / E.Trabetti // J. Appl. Genet. – 2008. – Vol. 49, № 3. – P. 267-282.
 11. Zhou J. Contributions of hyperhomocysteinemia to atherosclerosis: Causal relationship and potential mechanisms / J.Zhou, R.C.Austin // Biofactors. – 2009. – Vol. 35, № 2. – P. 120-129.

МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ В АОРТЕ И СЕРДЦЕ КРЫС В УСЛОВИЯХ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ И КОРРЕКЦИЯ ЕЕ ВИТАМИННО-МИНЕРАЛЬНЫМ КОМПЛЕКСОМ

И.И.Андрушко, О.О.Пентюк

Резюме. Оценена морфологическая структура сердца и аорты у крыс в условиях хронической тиолактоновой гипергомоцистеинемии (ГГЦ), ее сочетания с артериальной гипертензией и коррекция ГГЦ витаминно-минеральным комплексом. У животных с ГГЦ обнаружены морфологические изменения в сосудах (стазы, тромбозы, десквамация эндотелия, гипертрофия и гиперплазия гладкомышечных клеток) и дистрофические изменения в миокарде. Назначение животным витаминно-минерального комплекса уменьшает токсическое влияние ГГЦ на сердечно-сосудистую систему.

Ключевые слова: гомотеин, L-NAME, морфологические изменения в аорте и миокарде

MORPHOLOGICAL CHANGES IN THE RAT AORTA AND HEART UNDER THE CONDITIONS OF EXPERIMENTAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA AND ITS CORRECTION BY MEANS OF A VITAMIN-MINERAL COMPLEX

I.I.Andrushko, O.O.Pentiuk

Abstract. The morphologic structure of the rat heart and aorta under the conditions of chronic thiolacton-induced hyperhomocysteinemia (HHC), its combination with arterial hypertension and a correction of HHC by a vitamin-mineral complex have been evaluated. In the animals with HHC morphologic changes in the vessels (stases, thromboses, endothelial desquamation, hypertrophy and dystrophy of smooth muscle cells) and myocardial dystrophic changes have been detected. A prescription to animals of a vitamin-mineral complex (VMC) diminished the negative effect of HHC on the cardiovascular system.

Key words: homocysteine, L-NAME, aortic and myocardial morphological changes.

National Medical University (Vinnytsia)

Рецензенти: проф. Ю.Є.Роговий,
проф. І.С.Давиденко

Buk. Med. Herald. – 2010. – Vol. 14, № 1 (53). – P. 105-109

Надійшла до редакції 14.09.2009 року