

МОРФОФУНКЦІОНАЛЬНА МІНЛИВІСТЬ СЕРЦЯ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АТЕРОСКЛЕРОЗІ ПІД ВПЛИВОМ ГЕННОЇ КОРЕКЦІЇ

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

grinchak.nata@mail.ru

Зв'язок із 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» (№ державної реєстрації 0108U001484).

Вступ. Серцево-судинна патологія залишається основною причиною захворюваності та смертності в усьому світі. Так, за даними ВООЗ, від серцево-судинних захворювань щорічно вмирає близько 17 млн людей [4]. Водночас результати чисельних експериментальних, епідеміологічних та клінічних досліджень, проведених протягом останніх 50 років, не залишають сумнівів щодо впливу порушень ліпідного обміну на розвиток атеросклерозу та його ускладнень. Передусім це стосується захворюваності та смертності внаслідок ішемічної хвороби серця (ІХС). В Україні понад 15% дорослого населення страждають на ІХС. Дисліпідемії, зокрема, підвищений рівень загального холестерину реєструють у 48,5% чоловіків віком 40–60 років і у 56,3% жінок; а поширеність та смертність від ІХС залишаються одними з найвищих у Європі [5]. Саме тому особливого значення набуває система заходів як первинної, так і вторинної профілактики серцево-судинних захворювань, що ґрунтуються на результатах масштабних клінічних досліджень і спрямовані на корекцію гіперхолестеринемії як основного фактора ризику атеросклерозу та ІХС [12]. На сьогодні доведена патогенетична спільність всіх гострих проявів коронарної хвороби серця [8]. В їх основі лежить єдиний морфологічний субстрат – розрив атеросклеротичної бляшки в коронарній артерії з формуванням на поверхні розриву на початку тромбоцитарного, а потім і фібринозного пристінкового тромбу, що обумовлює весь симптомокомплекс клінічних проявів [1,2]. Актуальною є проблема профілактики серцево-судинних катастроф на різних етапах їх розвитку. Разом з тим, терапевтична ефективність лікарських засобів, які використовуються при атеросклерозі та його ускладненнях, виходить за рамки позитивного впливу на обмін речовин та функціонування життєво важливих органів і систем [3,6,9]. Тому проводиться пошук нових не медикаментозних методів лікування та профілактики кардіоваскулярних подій. Із генетичних чинників, які причетні до атерогенезу, на сьогодні

відомі поліморфні гени аполіпротеїда В, аполі-попротеїда Е (*apoE*), ліпопротеїдліпази, рецепторів ліпопротеїдів низької щільності, білка–переносника ефірів холестерину, параоксонази, ангіотензиногена, рецепторів ангіотензину II, ендотеліальної синтетики оксида азоту, глутатіон – S – трансферази [6,7,10,11].

Метою нашої роботи стало морфофункціональної мінливості дослідження серця щурів при експериментальному атеросклерозі під впливом на нього гену *apoE* в різних режимах його введення.

Об'єкт і методи дослідження. Стан експериментального атеросклерозу моделювався на білих лабораторних щурах-самцях за методикою М.М. Анічкова. Всі піддослідні тварини були розділені на 4 груп: 1 – інтактна. Протягом 30 днів щоденно щурам 2, 3 та 4 груп внутрішньошлунково за допомогою зонду з оливою вводили холестерол в дозі 0,5 г/кг і метилтіоурацил в дозі 12 мг/кг. Тваринам 3 профілактичної групи вводили ген *apoE* по 50 мкг на тварину внутрішньом'язево в перший день досліду. Тваринам 4 групи з лікувальною метою вводили ген *apoE* в тій же дозі на 14 день досліду.

По закінченні досліду евтаназію тварин проводили під легким ефірним наркозом шляхом декапітації. Після розтину грудної клітки для мікроскопічного дослідження брали ділянки із сосочкових м'язів лівого шлуночка серця. Артерії цієї ділянки підлягають максимальному систолічному внутрішньо-шлунковому тиску, тому вони найчастіше вражаються атеросклеротичним процесом. Прижиттєвим функціональним підтвердженням структурних змін серця при атеросклерозі слугували дані електрокардіографії.

Експерименти проведені у відповідності з положенням Європейської конвенції щодо захисту хребетних тварин, яких використовують в експериментальних та інших наукових цілях (Страсбург, 1986), Директиви Ради Європи 86/609/ЕЕС (1986 р.), Закону України № 3447 – IV «Про захист тварин від жорстокого поводження», загальних етичних принципів експериментів на тваринах, ухвалених Першим національним конгресом України з біоетики (2001 р.).

Для проведення гістологічного дослідження взятий матеріал фіксували в 10% розчині нейтрального формаліну. Фіксований матеріал промивали під струменем проточної води протягом однієї доби для звільнення від фіксатора, зневоднювали в спиртах

Морфометрична порівняльна характеристика змін серцевого м'яза при різних режимах генної корекції в умовах експериментального атеросклерозу (M±m)

Показники	Групи тварин			
	1	2	3	4
Площа кардіоміоцитів(мкм ²)	144,56±22,45	181,35±6,07*	169,44±14,92**	171,15±2,54**
Площа профілю ядра(мкм ²)	12,77±2,06	15,57±0,86*	14,14±1,23**	12,56±0,24**
Периметр профілю кардіоміоцитів	48,19±4,61	54,31±0,99*	53,95±2,43**	52,88±0,41**
Периметр ядра	13,60±1,067	15,03±0,42*	14,25±0,60**	13,5±0,13**
Максимальний діаметр кардіоміоцитів(мкм)	16,60±2,13	17,76±0,08*	17,55±0,75**	17,79±0,17**
Мінімальний діаметр кардіоміоцитів(мкм)	9,76±0,48	11,1±0,48*	10,06±0,73**	10,44±0,10**
Максимальний діаметр ядра(мкм)	4,73±0,43	5,26±0,15*	5,12±0,28**	4,64±0,04**
Мінімальний діаметр ядра(мкм)	3,00±0,23	3,39±0,13*	3,04±0,17**	2,98±0,03**
Ядерно-цитоплазматичне співвідношення	0,088±0,0005	0,08585±0,002*	0,084±0,005**	0,073±0,098**
Товщина стінки (мкм)	10,68±0,59	24,63±3,32*	14,13±1,07**	15,46±0,81**
Індекс Вогенворта(%)	43,57±3,17	118,4±1,69*	67,80±2,02**	94,62±3,73**
Індекс Керногана(%)	69,65±1,40	45,77±1,34*	59,59±1,36**	51,38±1,92**

Примітки: * – достовірна різниця порівняно з інтактною групою; ** – достовірна різниця порівняно з експериментальним атеросклерозом без корекції.

зростаючої концентрації і заливали в парафін. На заморожених зрізах виявляли ліпіди за методом Лізон. Дослідження проводили під мікроскопом МІК-МЕД-1 при різних збільшення (окуляр 10, об'єктив 8, 20, 40, 90). Мікрофотографування проводили за допомогою цифрової фотокамери «Olimpus E 410» та мікроскопа Olimpus BX 41. Для вимірювання метричних характеристик використовували програмне забезпечення UTHSCSA Image Tool® for Windows® (version 2.00) (Відео Тест – розмір 5.0) в інтерактивному режимі з використанням об'єктива x40 і фотоокуляра x10. Отримані кількісні показники піддавали статистичному аналізу з використанням математично-статистичного пакету «Excel – 2003» і програми «STATISTICA 5.5».

Результати досліджень та їх обговорення.

Результати проведених досліджень показали, що у більшості експериментальних тварин в ЕКГ переважає реакція тахікардического типу : частота серцевих скорочень в 2-й групі тварин збільшується в середньому на 5,01 % в порівнянні з тваринами 1-ї групи. Змінюється амплітуда зубців : збільшується на 1,53 % у зубця R і на 2,94 % у зубця T і зменшується на 22,9 % у зубця S, скорочується тривалість інтервалу PQ на 15,38 %, інтервалу QRS – на 16,0 %, R – R – на 5,6 %, а тривалість інтервалу QT збільшується на 32,0 %. У тварин 3-ї групи показники ЕКГ мають менші відхилення від аналогічних значень тварин 1-ї групи. Так, частота сердечних скорочень збільшується тільки на 1,61 %, інтервалу RQT – на 24,5 %; мало відрізняються від норми тривалості інтервалів : PQ – на 5,76 %, R – R – на 1,4 %, амплітуда зубця S – на 10 %. У тварин 4-ї групи виявлено зменшення частоти серцевих скорочень на 12,56 % порівняно з даними тваринами 2-ї групи. Амплітуда зубця R збільшується на 5,0 %, а глибина зубця S зростає на 14,6 % порівняно з тваринами 2-ї групи. Тривалість зубців PQ, QRS, QT зростає відповідно на 2,27%, 4,76 %, 8,57 %.

В результаті проведеного мікроскопічного дослідження спостерігалось, що у тварин інтактної групи кардіоміоцити розташовані групами і оточені сарколемою. В результаті холестеринового навантаження у тварин 2-ї групи зростають майже всі мікрометричні показники, порівняно з тваринами 1-ї групи (**табл.**), а саме: площа кардіоміоцитів на 25,44%, площа ядра – на 21,92%, максимальний діаметр кардіоміоцитів – на 6,98%, мінімальний діаметр кардіоміоцитів – на 13,72%, максимальний діаметр ядра – 11,2%, мінімальний діаметр ядра – 13%, ядерно-цитоплазматичне співвідношення зменшується – на 3,5%. Таким чином, навантаження холестерином призводить до виникнення виражених структурних змін в міокарді експериментальних тварин. Використання гену апоЕ в 1 день досліду у тварин 3-ї групи призводить до наступних позитивних змін: площа кардіоміоцитів складає 177,54±17,89 мкм², що на 2,11% менше порівняно з тваринами 2-ї групи; площа ядра – 14,47±1,29 мкм², що відповідно менше на 7,07%, ядерно-цитоплазматичне співвідношення зменшується і складає 0,082±0,004, що на 3,6% менше від тварин з атеросклерозом. У тварин 4-ї групи спостерігається зменшення значень майже всіх показників по відношенню до тварин 2-ї, а саме: площа кардіоміоцитів на 5,7%, площа ядра – 19,34%, периметр кардіоміоцитів – 2,7%, периметр ядра – 10,2%, мінімальний діаметр кардіоміоцитів – 6%, максимальний діаметр ядра – 11,8%, мінімальний діаметр ядра – 2,75%, ядерно-цитоплазматичне співвідношення – 14,2% (**див. табл.**).

Ліпіди в структурах стінки серця інтактної групи тварин реакцією з суданом чорним Б не виявляються. Тільки інколи можна відмітити окремі дрібні жирові краплі в стромі органу по ходу великих судин, що можна ідентифікувати як ліпоцити периваскулярної пухкої волокнистої сполучної тканини. В кардіоміоцитах тварин 3-ї групи суданофілія не проявляється. Ліпіди у вигляді дрібних крапель зустрічаються

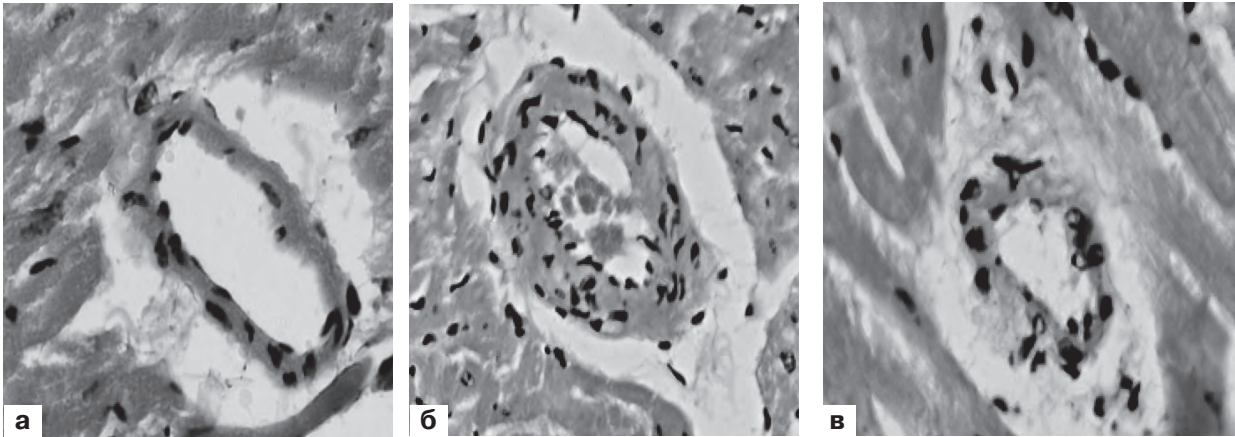


Рис. Коронарні артерії: а) серця інтактного щура без структурних порушень; б) серця щура 2 групи з потовщенням стінки і звуженням просвіту; в) серця щура 3 групи з нормалізацією товщини стінки і просвіту. Заб.: гематоксилін – еозин. Зб.: ок.10, об.40.

в жирових клітинах епікарду та інколи в периваскулярній тканині міокарду. В стінках коронарних судин 4-ї групи щурів виявляється дифузна або вогнищева ліпідна інфільтрація, що займає тільки внутрішню оболонку. Дрібні краплі ліпідів зрідка містяться в периваскулярній сполучній тканині. Кардіоміоцити утримують ліпіди рідко і лише у вигляді дрібного пилу. Атеросклеротичні зміни вінцевих артерій характеризуються порушенням структури внутрішньої і середньої оболонок судин (рис.).

Тварин 2-ї групи внутрішня оболонка має набряклий вигляд, в підендотеліальному шарі відбувається проліферація клітинних елементів і накопичення в них, а також в міжклітинній речовині великої кількості ліпідів.

При мікрометричному дослідженні судин міокарду (див. табл.) результати показали, що у тварин другої групи щурів в результаті холестеринового навантаження збільшуються наступні показники порівняно з даними тварин інтактної групи: площа поперечного перерізу артерій – на 27,5%, площу

стінки – в 2,25 разів, зовнішній діаметр – на 34,4%, товщина стінки – в 2,5 рази, індекс Вогенворта майже в 3 рази, та зменшується площа просвіту на 16,5%, внутрішній діаметр – на 3,95%, індекс Керногана – на 34,29%. Використання гену апоЕ у тварин 3-ї та 4-ї груп проявляє тенденцію до нормалізації вивчених показників (див. табл.).

Висновки

В результаті холестеринового навантаження у тварин 2 групи спостерігаються суттєві морфофункціональні зміни в артеріях та клітинах серця при різних методах його дослідження. В результаті використання гену апоЕ в різних режимах його введення спостерігається тенденція до нормалізації вивчених показників.

Перспективи подальших досліджень. Отримані результати вказують на перспективність подальшого експериментального та клінічного вивчення гену апоЕ при ішемічних та дистрофічних процесах в серці на тлі експериментального атеросклерозу.

Література

1. Влияние полиморфизма генов цитохрома P450 и аполипопротеина E на терапевтическую эффективность статинов / П.П. Малышев, З.Ю. Мальмакова, А.Н. Мешков, В.В. Кухарчук // Кардиология. – 2010. – Т. 60, № 8. – С. 69-75.
2. Влияние раннего назначения аторвастатина на динамику маркеров воспаления и показателей липидного профиля в зависимости от полиморфизма аполипопротеина E / Я.М. Тераз, Е.П. Павликова, А.В. Балацкий [и др.] // Клин. фармакол. и терапия. – 2007. – Т. 16, № 4. – С. 66-71.
3. Дзяк Г.В. Комбінована терапія артеріальної гіпертензії / Г.В. Дзяк // Внутрішня медицина. Спеціалізований науково-практичний журнал. – 2008. – № 3 (9). – С 8-12.
4. Персонализована медицина: сучасне становище і перспективи / І.І. Дедов, А.Н. Тюльпаков, В.П. Чехонин [и др.] // Вестн. РАМН. – 2012. – №12. – С. 4-12.
5. Романцова Т.І. Епідемія ожирення: очевидні і ймовірні причини / Т.І. Романцова // Ожирение и метаболизм. – 2011. – № 1. – С. 5-19.
6. Черняк О.О. Изучение адипокинов и полиморфизма генов, регулирующих обмен липидов у больных с ожирением: дис. на стиск. уч. степ. канд. биол. наук: 03.01.04 – биохимия / Черняк Ольга Олеговна. – М., 2014. – 106 с.
7. Apolipoprotein E genotype and the cardiovascular disease risk phenotype: impact of sex and adiposity (the FINGEN study) / V.M. Kofler, E.A. Miles, P. Curtis [et al.] // Atherosclerosis. – 2012. – Vol. 221 (2). – P. 467-470.
8. Apolipoprotein E gene polymorphism and its effects on plasma lipids in arteriosclerosis / P.D. Zende, M.P. Bankar, P.S. Kamble, A.A. Momin // J. Clin. Diagn. Res. – 2013. – Vol. 7 (1). – P. 2149-2152.
9. ApoE gene polymorphisms and response to statin therapy / E. Zintzaras, E.D. Kitsios, F. Triposkiadis [et al.] // Pharmacogenomics J. – 2009. – Vol. 9. – P. 248-257.
10. Genetic polymorphisms: importance for response to HMG-CoA reductase inhibitors / A.H. Maitland-van der Zee, O.H. Klungel, B.H. Stricker [et al.] // Atherosclerosis. – 2002. – Vol. 163. – P. 213-222.

11. Hubacek J.A. Effect of apolipoprotein E polymorphism on statin-induced decreases in plasma lipids and cardiovascular events / J.A. Hubacek, M. Vrablik // Drug Metabol. Drug Interact. – 2011. -Vol. 26. – P. 13-20.
12. Mangravite L.M. Clinical implications of pharmacogenomics of statin treatment / L.M. Mangravite, C.F. Thorn, R.M. Krauss // Pharmacogenomics J. – 2006. – Vol. 6. – P. 360-374

УДК 616. 12 – 008. 6: 616. 13 – 004. 6

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНА МІНЛИВІСТЬ СЕРЦЯ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ АТЕРОСКЛЕРОЗІ ПІД ВПЛИВОМ ГЕННОЇ КОРЕКЦІЇ

Піскун Р. П., Гринчак Н. М., Климчук І. М.

Резюме. Представлені результати функціональних, мікроскопічних та мікроморфометричних досліджень серця щурів в нормі, при холестеринівому атеросклерозі та його генній корекції. Встановлено ознаки атеросклеротичних змін при моделюванні. Використання гену апоЕ з метою корекції експериментального атеросклерозу в різній мірі сприяє відновленню пошкодженого міокарда.

Ключові слова: експериментальний атеросклероз, серце, генна корекція

УДК 616. 12 – 008. 6: 616. 13 – 004. 6

МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ИЗМЕНЧИВОСТЬ СЕРДЦА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ АТЕРОСКЛЕРОЗЕ ПОД ВЛИЯНИЕМ ГЕННОЙ КОРРЕКЦИИ

Піскун Р. П., Гринчак Н. Н., Климчук І. Н.

Резюме. Представлены результаты функциональных, микроскопических и микроморфометрических исследований сердца крыс в норме, при холестеринивом атеросклерозе и его генной коррекции. Установлены признаки атеросклеротических изменений при моделировании. Использование гена апоЕ с целью коррекции экспериментального атеросклероза в разной мере способствует возобновлению поврежденно-го миокарда.

Ключевые слова: экспериментальный атеросклероз, сердце, генная коррекция.

UDC 616. 12 – 008. 6: 616. 13 – 004. 6

THE MORPHOFUNCTIONAL VARIABILITY OF HEART IN EXPERIMENTAL ATHEROSCLEROSIS UNDER THE INFLUENCE OF GENE CORRECTION

Piskun R. P., Hrynchak N. M., Klymchuk I. M.

Abstract. Cardiovascular disease remains a major cause of morbidity and mortality worldwide. So, according to the WHO, cardiovascular disease annually kills about 17 million people. Dyslipidemia, particularly elevated levels of total cholesterol is recorded in 48,5% of men aged 40-60 years and 56,3% of women, and the prevalence and mortality from coronary heart disease remain the highest in Europe. Therefore, there is a search for new not medication and prevention of cardiovascular events. From the genetic factors involved in atherogenesis, are now known polymorphic genes of apolipoprotein B, apolipoprotein E (apoE), lipoprotein lipase, receptors of low density lipoprotein, protein-carrier of cholesterol esters, paraoxonase, angiotensinogen, receptors of angiotensin II, endothelial synthesis of nitric oxide, glutathione -S- transfers.

The state of experimental atherosclerosis was simulated in white laboratory male rats by the method of M.M. Anichkova. All experimental animals were divided into 4 groups: 1- intact, group 2- rats, which were simulated atherosclerosis, group 3 – rats, which were modeled atherosclerosis and injected gene apo E on the first day of experiment, group 4 – rats, which on the background of the simulation of atherosclerosis, APOE gene was injected on the 14th day of experiment.

The results of the research showed that most experimental animals have tachycardia type reaction in ECG: heart rate in the 2nd group of animals increased on the average by 5,01% compared with animals of the 1st group. The amplitude of teeth S is decreased by 22,9%, the duration of the PQ interval is reduced by 15,38%, QRS interval – on 16,0%, R-R-by5,6%, and the duration of the QT interval is increased by 32,0%. The animals of the 3rd group have parameters of ECG with smaller deviations than similar values of animals of the 1st group. So, heart rate increases by 1,61%, interval RQT – 24,5%; little difference from the norm of duration of intervals: PQ – by 5,76%, the amplitude of the tooth S – by 10%. The animals of the 4th group have a reduction of heart rate by 12,56%, compared with animals of the 2nd group, the depth of the tooth S increases by 14,6%. As a result of cholesterol loading almost all micrometers indicators group grow in the animals of the 2nd group, compared with the animals of the 1st group, namely: the area of cardiomyocytis – by 25,44%, the core area – by 21,92%, the maximum diameter of cardiomyocytis – by 6,98%, the minimum diameter of cardiomyocytis – by 13,72%, the maximum diameter of the core – 11,2%, the minimum diameter of the core – 13%. So, the cholesterol loading leads to arising expressed structural changes in the myocardium of experimental animals. In animals of the 3rd group, the using of the apo E gene on the 1st day of the experiment leads to the following positive changes: the area of cardiomyocytis decreases by 2,11% compared with the animals of the 2nd group; the core area – by 7,07%, nuclear-cytoplasm ratio – by 3,6%. The animals of the 4th group have a reduction of values of almost all indicators in relation to animals of the 2nd group, namely: the area of cardiomyocytis – by 5,7%, the core area – 19,34%, the perimeter of cardiomyocytis – 2,7%, the perimeter of the core – 10,2%, the minimum diameter of cardiomyocytis – 6%, the maximum diameter of the core – 11,8%, the minimum diameter of the nucleus – 2,75%, nuclear-cytoplasm ratio – 14,2%.

МОРФОЛОГІЯ

During micrometers research of vessels of myocardium revealed that the animals of the second group of rats, as a result of cholesterol loading have increase of following indicators compared with animals of an intact group: cross-sectional area of arteries – by 27,5%, the area of the wall – 2,25 times, the outer diameter – by 34,4%, wall thickness – 2,5 times, the index of Vogenvorta almost 3 times, and the area of lumen reduces by 16,5%, internal diameter – 3,95%, the index of Kernohan – by 34,29%. The using of apoE gene in animals of the 3rd and 4th group, shows a tendency to normalization of the studied parameters.

So, as a result of the use of apoE gene in different modes of its introduction, we can observe a decrease of manifestations of the pathological variability of heart and it is able to inhibit the progression of atherosclerosis and to stimulate recovery of myocardium.

Keywords: experimental atherosclerosis, heart, gene correction.

Рецензент – д. мед. н. Степанчук А. П.

Стаття надійшла 02.03.2016 року