Медицински университет – София
Медицински факултет
Катедра по анатомия, хистология и ембриология

Д-р Александър Асенов Илиев

Постнатални промени в миокарда при нормотензивни и спонтанно хипертензивни плъхове. Хистологично и имунохистохимично изследване

АВТОРЕФЕРАТ

на дисертационен труд за присъждане на
образователна и научна степен
„Доктор”

Научна специалност:
Анатомия, хистология и цитология

Научни ръководители:
Доц. д-р Бойчо Ланджов, дм
Доц. д-р Лазар Желев, дм

София, 2016 г.

Дисертационният труд е написан на 166 стандартни печатни страници и е онагледен със 78 цветни фигури, 2 схеми, 13 таблици и 12 диаграми. Библиографията обхваща 360 заглавия, от които 1 на кирилица и 359 на латиница.

Дисертационният труд е обсъден, одобрен и насочен за защита на заседание на Катедрения съвет на Катедрата по анатомия, хистология и ембриология при Медицински университет – София, състоял се на 18.12.2015 г.

Дисертантът е зачислен като докторант на самостоятелна подготовка към Катедрата по анатомия, хистология и ембриология при Медицински университет – София, където са проведени и изследванията по дисертационния труд.

Официалната защита на дисертационния труд ще се състои на 11.03.2016 г. от 16.00 ч. в Анатомична аудитория, Медицински университет – София, бул. „Пенчо Славейков" № 34 на открито заседание на научното жури в състав:

Председател:
1. Проф. д-р Димка Хинова-Палова, дм (рецензия)

Членове:
2. Проф. д-р Христо Чучков, дмн (рецензия)
3. Проф. д-р Виолета Бурнева, дмн (становище)
4. Доц. д-р Лазар Желев, дм (становище)
5. Доц. д-р Елена Джамбазова, дм (становище)

Резервни членове:
1. Доц. д-р Бойчо Ланджов, дм
2. Проф. д-р Цана Бошнакова-Празникова, дмн

Материалите по защитата са на разположение в секретариата на Катедрата по анатомия, хистология и ембриология при Медицински университет – София, ул. „Здраве" № 2 и на интернет страницата на МУ – София.

Забележка: Номерата на таблиците и фигурите в автореферата не съответстват на номерата в дисертационния труд.

Съдържание:

I. Въведение 5

II. Цел и задачи 7

III. Материал и методи 8

IV.Собствени резултати.....12

V. Обсъждане 35

VI. Изводи.....49

VII. Приноси 51

VIII. Публикации по дисертационния труд.....52

Използвани съкращения

АВ-възел – атриовентрикуларен възел

АМФ – аденозин монофосфат

АТФ – аденозин трифосфат

ДК – дясна камера

иРНК – информационна рибонуклеинова киселина

ЛК – лява камера

НАДФН - никотинамид-динуклеотид-фосфат (окислен)

НАДФН+H^+ – никотинамид-динуклеотид-фосфат (редуциран)

ФАД – флавин-аденин-динуклеотид

ФМН – флавинмононуклеотид

ХЕ – хематоксилин и еозин

цГМФ – цикличен гуанозин монофосфат

ABC – авидин-биотин пероксидазен комплекс

BH_4 –тетрахидробиоптерин

DAB – диаминобензидин

eNOS – ендотелна азотен оксид-синтаза

HSP90 – протеин на топлинния шок 90

iNOS – индуцируема азотен оксид-синтаза

nNOS – невронална азотен оксид-синтаза

NO – азотен оксид

NOS – (Nitric oxide synthase) – азотен оксид-синтаза

PKG – протеинкиназа G

PLB – фосфоламбан

RyR2 – рианодинови рецептори тип 2

SERCA – (Ca-АТФ-аза) калциева аденозин трифосфатаза

SHR – спонтанно хипертензивни плъхове

WKY – плъхове от породата Wistar-Kyoto

WR – плъхове от породата Wistar (Вистар)

I. Въведение

Много въпроси по отношение на морфологията на сърдечно-съдовата система все още очакват своя отговор. В частност, пълното проучване на архитектониката на миокарда е от особена важност за разбиране на точните механизми на съдечните функции и патогенетичните процеси, стоящи в основата на сърдечно-съдовите заболявания. Множество съвременни изследвания разкриват участието на миокарда в практически всяко заболяване – било то като първично патофизиологично звено или като обект на болестното увреждане. В действителност миокардът притежава забележителен диагностичен и терапевтичен потенциал. Ориентацията на кардиомиоцитите играе ключова роля не само по отношение на механичното съкращение, но и за електричното провеждане и енергийния метаболизъм на сърдечния мускул. Проучването на размера, подреждането и специфичните характеристики на сърдечните мускулни клетки може да даде морфологична база за диагностиката на различни сърдечни патологии.

Въпреки че в литературата се откриват значителен брой сведения за сърцето на плъха, само малка част от тях описват макроскопската и микроскопската морфометрия на сърцето при тези животни. В настоящата работа са отразени нашите усилия за изясняване на морфометричните показатели на кардиомиоцитите и на миокарда като цяло в сърца от нормотензивни и хипертензивни мъжки плъхове в различни етапи от тяхното постнатално развитие. За тази цел са използвани различни техники на оцветяване, позволяващи ясно наблюдение на срезната повърхност на кардиомиоцитите и промените в структурата на миокарда. Въпреки че изследванията са проведени върху експериментални животни, условията, в които съществуват кардиомиоцитите, имат сходства с тези в човешкото тяло и се подчиняват на общовалидни биологични закономерности.

Скоро след като е идентифициран като „мистериозният” произлизащ от ендотела релаксиращ фактор (EDRF) през 80-те години на XX век, азотният оксид (NO) бързо придобива статута на една от най-важните сигнални молекули в сърдечно-съдовата система. Сега, повече от тридесет години по-късно, повечето автори (Sears и съавт. 2004; Casadei 2006; Rastaldo и съавт. 2007) считат NO за медиатор на кардиопротекцията. В последните десетилетия се установи с неоспорими

доказателства, че NO се произвежда в сърцето, не само от съдовия ендотел, но и от самите кардиомиоцити (Balligand и съавт. 1993, 1995; Kanai и съавт. 1997). Конститутивната продукция на NO играе ключова роля в регулацията на сърдечната функция както при физиологични, така и при патологични условия (Shah и MacCarthy 2000; Paton и съавт. 2002; Casadei и Sears 2003; Massion и Balligand 2003; Sears и съавт. 2004).

До скоро се считаше, че ендотелната изоформа на азотен оксид-синтазата (eNOS) е единствената изоформа, която се експресира конститутивно в лявата камера на сърцето на бозайниците, където локализацията ѝ се открива, поне отчасти, в инвагинации на сарколемата, наречени кавеоли (Feron и съавт. 1996). В началото на 90-те години, експерименти с неспецифични инхибитори на азотен оксид-синтазите върху изолирани плъши кардиомиоцити от лява камера, показаха усилен инотропен отговор на умерена β-адренергична стимулация с изопротеренол (Balligand и съавт. 1993), което показва, че конститутивното освобождаване на NO от миокарда може да служи като ендогенен инхибитор на β-адренергичната сигнализация. Тъй като конститутивните изоформи на NOS (ендотелна и невронална) се кодират от различни гени (Wang и Marsden 1995), несъответствията между резултатите, получени с неспецифични инхибитори на NOS и при селективна делеция на гена за eNOS, могат да бъдат обяснени ако се приеме едновременното съществуване на повече от една конститутивна изоформа на NOS в кардиомиоцитите на лява камера. Наистина, Xu и съавтори първи установяват наличието на продукт на гена NOS1 в миокарда на лява камера при няколко вида бозайници, включително и човек. Това е NO, продуциран от невроналната азотен оксид-синтаза (nNOS), която всъщност е продуктът от изолирания ген (Xu и съавт. 1999).

Проблемът за ролята и ефектите на NO върху миокарда и локализацията на различните изоформи на ензима NOS, които го произвеждат, продължава да бъде актуален и да бъде обект на множество проучвания. В литературата се откриват сведения за различни аспекти на проблема по отношение на лявата камера, но има необходимост и от проучвания в тази насока по отношение на дясната камера. Откриват се противоречиви данни за влиянието на NO, произвеждан от nNOS, върху миокарда по време на постнаталното развитие. Не е достатъчно проучен морфологичният субстрат на ензимната активност в различните слоеве на сърдечната стена. Въпреки

големия брой научни сведения от последните десетилетия, все още не е направен обстоен сравнителен анализ между двете камери в различни етапи от постналталното развитие. Установяването на регионалните и възрастови различия на експресията на nNOS, ще допринесе за изясняване на сложната функция на ензима и произвеждания от него NO. Тъй като NO участва в процесите на ремоделиране и фиброза на миокарда, инициирани от хипертонията, са необходими проучвания при подходящи животински модели. Настоящата работа изследва аспекти от развитието на миокарда и кардиомиоцитите, техните възрастово обусловени изменения в съчетание с изменение на екпресията на nNOS при нормотезнивни Wistar плъхове и спонтанно хипертензивни плъхове (SHR) като модел на хипертонията при човека.

II. Цел и задачи

Цел:

Да се проследят постналталните промени в миокарда при нормотензивни и спонтанно хипертензивни плъхове чрез хистологично и имунохистохимично изследване.

Задачи:

1. Проследяване на промените в дебелината на стената на лява и дясна камера при нормотензивни плъхове на различни възрасти.
2. Характеристика на дебелината на стената на лява и дясна камера при млади и зрели спонтанно хипертензивни плъхове.
3. Морфометрична характеристика на кардиомиоцитите в стената на лява и дясна камера при различни възрасти нормотензивни плъхове.
4. Морфометрична характеристика на кардиомиоцитите в стената на лява и дясна камера при млади и зрели спонтанно хипертензивни плъхове.
5. Имунохистохимичен анализ на експресията на невронална азотен оксид-синтаза при различни възрасти нормотензивни плъхове.
6. Имунохистохимичен анализ на експресията на невронална азотен оксид-синтаза при млади и зрели спонтанно хипертензивни плъхове.

III. Материал и методи

1. Експериментални животни

В настоящата работа е използван материал от сърца на мъжки нормотензивни лабораторни плъхове от породата Wistar (WR) и мъжки спонтанно хипертензивни плъхове (SHR). Те се отглеждаха при стандартни условия – 12-часов светло-тъмен интервал и осигуряване на оптимална температура, влажност и достатъчни количества вода и стандартни гранули за гризачи. Спазени бяха международните принципи за експериментиране с животни (*Guide for the Care and Use of Laboratory Animals.* Washington DC, National Academy Press, 1996), както и етичните принципи при планиране и провеждане на експериментите според Комисията по етика на научните изследвания при Медицински университет – София (КЕНИМУС).

Данните върху миокардната морфология при нормотензивни и хипертензивни плъхове, представени в настоящата работа, са получени при анализ на сърцата на 21 мъжки плъха, разпределени в седем групи по три животни във всяка от тях:

- I група: двуседмични нормотензивни Wistar плъхове – 3 броя;
- II група: едномесечни нормотензивни Wistar плъхове – 3 броя;
- III група: тримесечни нормотензивни Wistar плъхове – 3 броя;
- IV група: шестмесечни нормотензивни Wistar плъхове – 3 броя;
- V група: дванадесетмесечни нормотензивни Wistar плъхове – 3 броя;
- VI група: едномесечни спонтанно хипертензивни плъхове– 3 броя;
- VII група: шестмесечни спонтанно хипертензивни плъхове– 3 броя.

2. Вземане и фиксиране на хистологичния материал

Животните, определени за вземане на хистологичен материал, бяха упоени с етерни пари в стъклен съд и беше извършена цервикална дислокация. След това бяха поставени по гръб и фиксирани. Гръдната кухина беше отворена послойно. Сърцето беше изолирано от гръдната кухина по следния начин: големите кръвоносни съдове бяха прерязани дистално от мястото си на вливане или излизане от сърдечните кухини за по-нататъшна детайлна дисекция. Така изолираните сърца бяха поставени за 5 минути в 0,9% разтвор на натриев хлорид (физиологичен разтвор) за промиване на кръвта от сърдечните кухини. След което, сърцата бяха третирани трикратно с разтвор на Рингер, до спиране на

тяхната помпена функция за по-добро отстраняване на кръвта от кухините. В последствие, след краткотрайна фиксация в 10% неутрален буфериран формалин (4% формалдехид) за по-финно манипулиране, те бяха прерязани напречно през средата на сърцето, малко под нивото на сърдечните клапи. След това бяха прехвърлени отново в 10% неутрален буфериран формалин (4% формалдехид) за извършване на имерсионната фиксация. Така изготвените препарати от сърцата престояха във фиксатора за 48 часа на стайна температура в отделни лабораторни съдове.

3. Обработка на хистологичния материал:

- **Изготвяне на парафинови тъканни срези**
  1. Промиване
  2. Обезводняване
  3. Включване в уплътняваща среда (разтопен лабораторен парафин)
  4. Приготвяне на срези от парафинови блокчета

- **Рутинно оцветяване с хематоксилин и еозин**

- **Оцветяване по метода на Малори**

- **Имунохистохимично изследване на nNOS**

Всички имунохистохимични реакции бяха извършени във влажна камера върху парафинови срези с дебелина на срезите 7 μm.

1. Пермеабилизиране на срезите с 0,01 M PBS (pH 7,36), съдържащ 0,3% Triton X-100 (Merck) трикратно по 5 min с цел подобряване на пенетрацията на антитялото при последваща инкубация.
2. Инхибиране на ендогенната пероксидаза с 1,2% водороден пероксид в абсолютен метанол в продължение на 30 min на стайна температура с последващо 15-минутно промиване в 0,01 M PBS / 0,3% Triton X-100.
3. Пермеабилизиране на срезите с 0,01 M PBS / 0,3% Triton X-100.
4. За редуциране на неспецифичното пероксидазно оцветяване, срезите бяха преинкубирани с 0,01 M PBS, съдържащ 5% нормален кози серум за 1 h на стайна температура. Кратко двукратно промиване по 5 min с 0,01 M PBS / 0,3% Triton X-100.

5. Инкубация на срезите с първично моноклонално анти-nNOS антитяло в разреждане 1:500. Общото инкубационно време беше 48 h, от които 24 h на стайна температура и след това още 24 h в хладилник при 4°C.
6. Промиване на срезите с 0,01 M PBS (pH 7,36) 3 x 5 min.
7. Инкубация с вторично (мостово) антитяло –биотинилиран антимиши IgG в разреждане 1:250 с 0,01 M PBS. Инкубацията с второто антитяло беше в продължение на 2 h на стайна температура.
8. Промиване на срезите с 0,01 M PBS (pH 7,36) 3 x 5 min.
9. Инкубация на срезите в ABC комплекса. Времето за инкубация беше 1 h във влажна камера на стайна температура.
10. Промиване на срезите с 0,01 M PBS 2 x 5 min.
11. Промиване на срезите с 0,05 M Tris/HCl буфер с pH 7,54 за 5 min.
12. Визуализиране на реакциите от 5 до 15 min на тъмно с помощта на 3,3' диаминобензидин (DAB) като хромоген.
13. Кратко промиване с 0,05 M Tris/HCl буфер, изплакване в дестилирана вода.
14. Контраоцветяване и включване на тъканните срези - използва се хематоксилин по Майер.
15. Следва възходяща редица от алкохоли, просветляване в ксилол и включване в ентелан (Merck).
16. Отчитане на резултата от имунохистохимичното оцветяване.

4. Микроскопиране и анализ на получените данни

Качествените и количествените данни в настоящата работа са получени при светлинно-микроскопско изследване на препарати от плъши сърца. Наблюдението и регистрирането на качествените находки беше проведено с микроскопска система Nikon Eclipse 80i (Japan). Препаратите бяха изследвани и образите заснемани на различно увеличение – x40, x100, x200 и x400. За определяне на размерната линия (size bar), нанесена на отделните микрофотографии в работата, беше използван софтуерен измервателен инструмент, проверен допълнително с обект – микрометър.

За целите на морфометричния анализ бяха използвани по пет срези от сърцето на всяко животно. Количествените данни бяха получени с компютърна система за анализиране на образи NIS-Elements Advanced Research (Ver. 2.30). При изследването на всеки препарат беше спазван следният алгоритъм на работа:

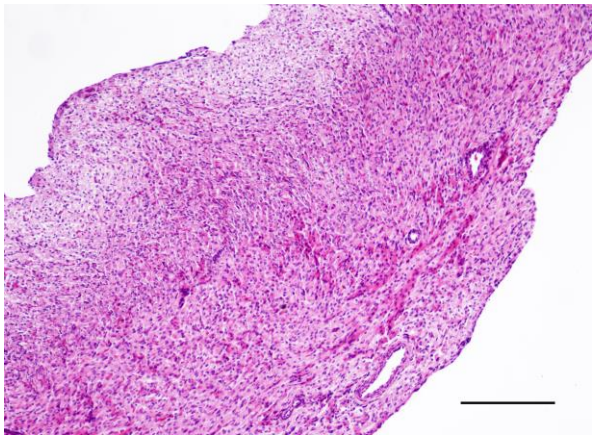
1. На малките увеличения (x100, x200) бяха намерени областите на интерес съобразно изследваната група.
2. При увеличение x400 беше заснета област от миокарда, съдържаща напречно прерязани надлъжно ориентирани кардиомиоцити, и върху нея беше маркирана област с площ от 0.04 mm^2 (400 μm^2).
3. Бяха очертани границите на кардиомиоцитите в областта. Тъй като кардиомиоцитите са издължени и често ограничителните линии минават през клетките, за доброто сравняване на данните беше прието в маркираната област да се включват тези клетки, които се допират отвън или отвътре до две взаимно перпендикулярни ограничителни линии и, съответно, да не се включват клетки, допиращи се отвън или отвътре на другите две граници.
4. С подходящ софтуерен инструмент бяха очертани границите на ядрата на кардиомиоцитите.
5. След очертаването на границите, автоматично бяха отчетени редица морфометрични параметри: **напречно сечение на кардиомиоцита (μm^2); напречно сечение на ядрото на кардиомиоцита (μm^2); ядрено-цитоплазмено отношение; гъстота на кардиомиоцитите; гъстота на капилярите.**

Събраните количествени данни, характеризиращи кардиомиоцитите в определен етап, бяха илюстрирани с различни видове диаграми и подложени на статистическа оценка със Student-T-test. Статистически значими разлики бяха отчетени при $p<0,05$. За обработка на данните, тестване на нулевата хипотеза и нагледно изобразяване на получените резултати беше използван Microsoft Office Excel 2010.

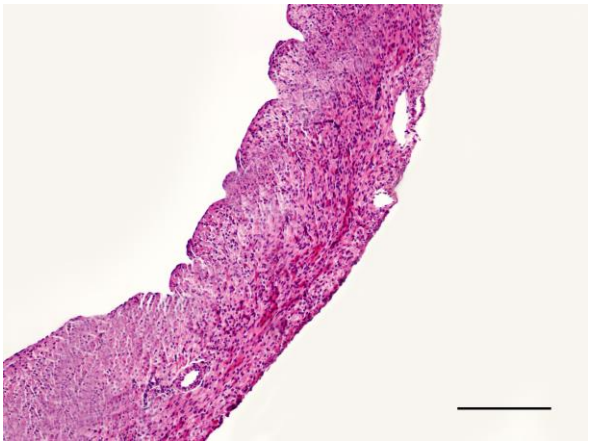
IV. Собствени резултати

1. Качествени характеристики на миокарда и кардиомиоцитите през различни етапи от постналталното развитие при нормотензивни Wistar плъхове и SHR

При двуседмичните Wistar плъхове при оцветяване с ХЕ, трудно могат да се наблюдават ясно отчетливи надлъжни и напречни слоеве от кардиомиоцити както в стената на лява, така и в стената на дясна камера. Кардиомиоцитите са слабо еозинофилни, не се наблюдава изразена напречна стриираност. Често сърдечните мускулни клетки имат едно централно разположено базофилно ядро. Мускулните влакна са обвити от изключително фина съединителна тъкан и перимизиум с богата капилярна мрежа. Сравнително рядко се откриват ядра на фибробласти, разположени между сърдечните мускулни клетки. Ядрата на фибробластите са по-плоски от тези на кардиомиоцитите и се багрят по-интензивно. Виждат се и овални структури около сърдечните мускулни клетки, които всъщност са капилярите (фиг. 1; 2).



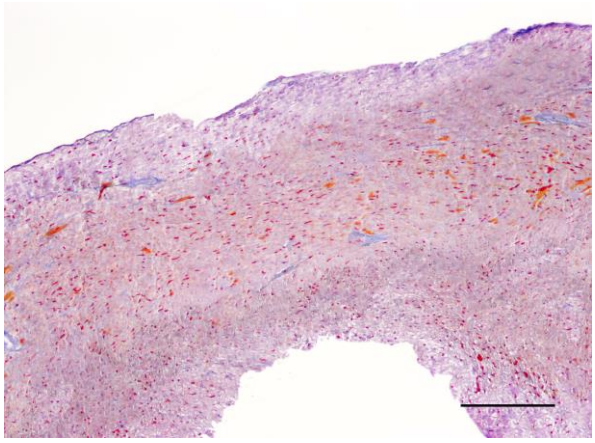
Фиг. 1. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 2 седмици, хематоксилин и еозин. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.



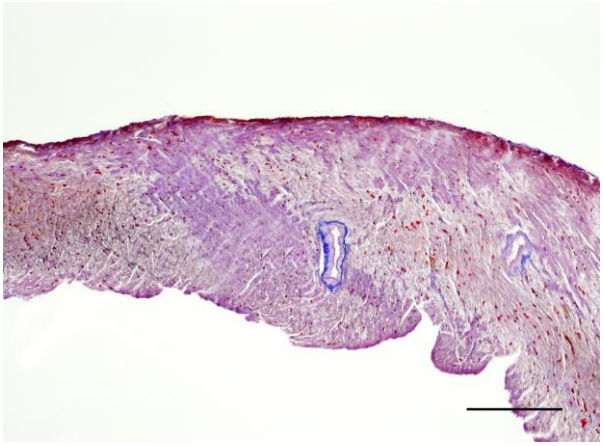
Фиг. 2. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 2 седмици, хематоксилин и еозин. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.

При трихромното оцветяване по Малори, при двуседмичните Wistar плъхове се открива незначително количество фини колагенни влакна в стената на двете камери. Наблюдават се оскъдно количество много къси и тънки съединителнотъканни влакна в интерстициалното пространство в лявата камера. По-голямо количество колагенни влакна са разположени предимно периваскуларно и в стената на кръвоносните съдове и се багрят интензивно в наситено син цвят, като се наблюдава оскъдно

прорастване на колагенни влакна от периваскуларното пространство в интерстициума (фиг. 3; 4).

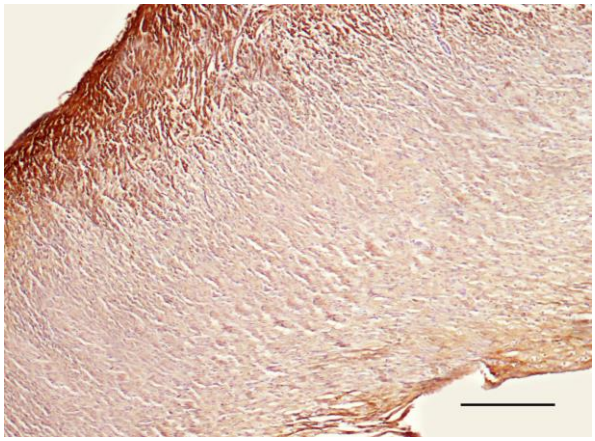


Фиг. 3. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 2 седмици, оцветяване по Малори. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.

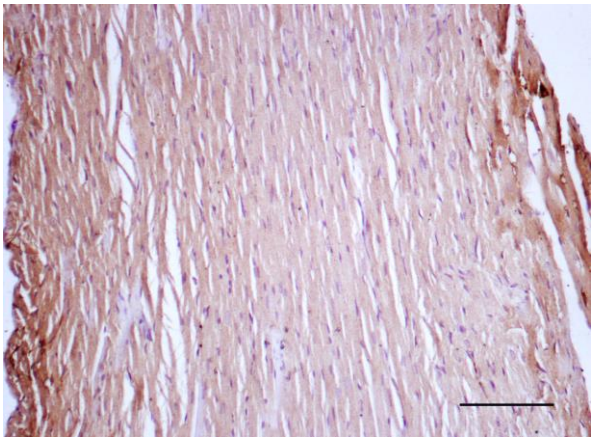


Фиг. 4. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 2 седмици, оцветяване по Малори. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.

Имунохистохимичното оцветяване за nNOS показва хетерогенно разпределение на ензима. В свободната стена на лява камера при двуседмични нормотензивни Wistar плъхове се установява умерено положително оцветяване в средния слой на стената и силно положителна активност на ензима в субепикардния и субендокардния участък. Наблюдаваната активност показва сравнително хомогенно разпределение в цитоплазмата на клетките (фиг. 5).



Фиг. 5. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 2 седмици, експресия на nNOS. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.

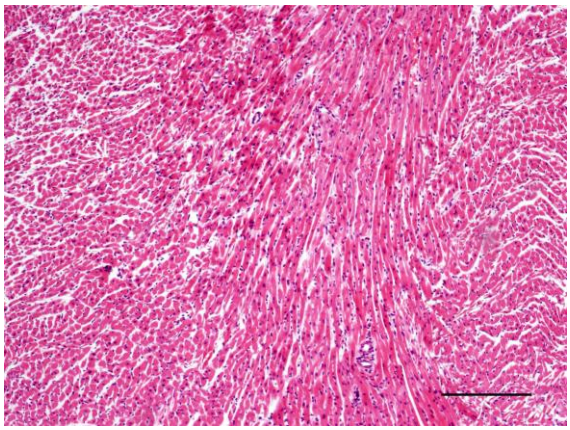


Фиг. 6. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 2 седмици, експресия на nNOS. Увеличение – x200. Размерна линия – 100 μm.

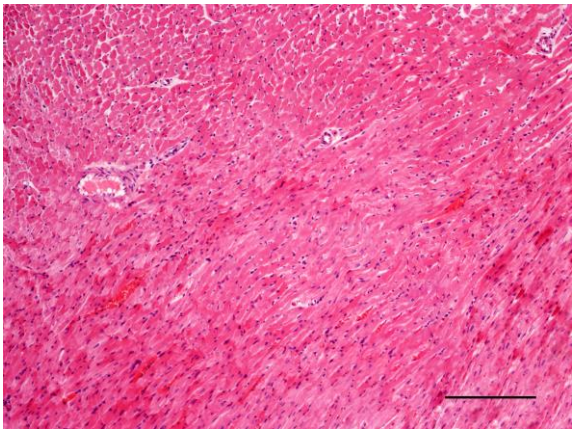
В дясната камера се наблюдава идентична експресия на ензима, като реакцията може да бъде отчетена като умерено положителна и по-слабо изразена в сравнение с тази при лява камера. Отново се забелязва силна активност на ензима в субепикардния и субендокардния участък, докато в

средните слоеве реакцията се визуализира като умерено към слабо положителна. В клетките на дясната камера се открива идентична nNOS имунореактивност с тази в клетките на лявата камера (фиг. 6).

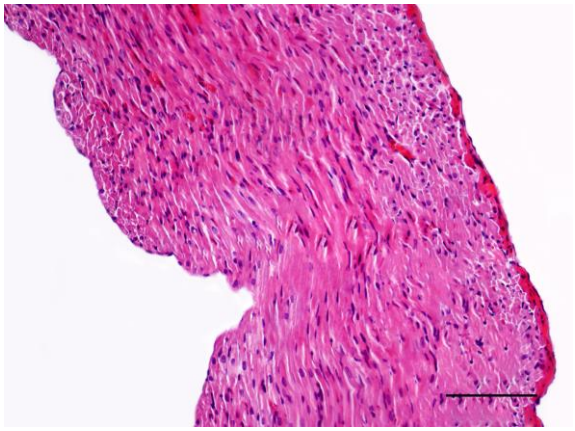
При младите възрастови групи (1 месец и 3 месеца) Wistar плъхове при оцветяването с ХЕ се наблюдават ясно морфологичната организация на слоевете на миокарда както при лява, така и при дясна камера (фиг. 7; 8; 9; 10). Ясно се забелязват сноповете от надлъжно разположени кардиомиоцити, както и субепикардните и субендокардните слоеве от напречно прерязани сърдечни мускулни влакна. Наблюдаваните оптически празни пространства в стената на двете камери са интрамуралните големи кръвоносни съдове.



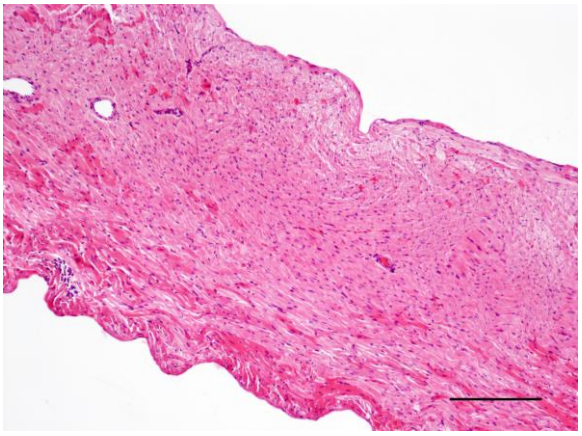
Фиг. 7. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 1 месец, хематоксилин и еозин. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.



Фиг. 8. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 3 месеца, хематоксилин и еозин. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.



Фиг. 9. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 1 месец, хематоксилин и еозин. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.

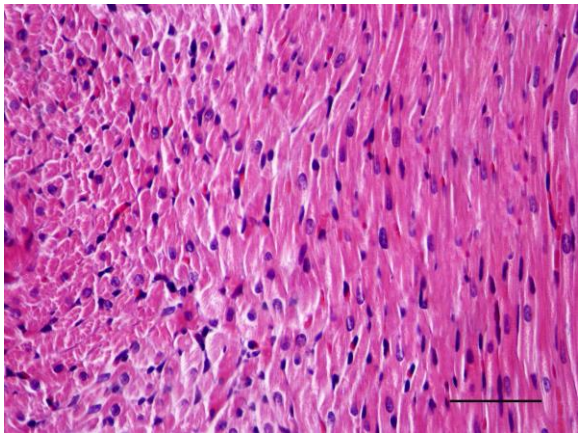


Фиг. 10. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 3 месеца, хематоксилин и еозин. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.

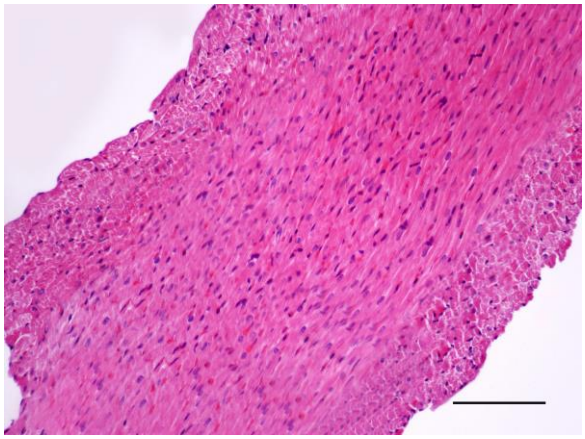
При оцветяване с ХЕ на надлъжен срез, кардиомиоцитите от лява и дясна камера изглеждат еозинофилни, напречно стриирани, имат едно или две централно разположени базофилни ядра. В някои от тях се

откриват едно или няколко интензивно оцветени ядърца. Кардиомиоцитите се разклоняват и анастомозират помежду си, формирайки сложна мрежеста структура. Всяко мускулно влакно е обвито от ендомизиум от фина съединителна тъкан и перимизиум с богата капилярна мрежа и множество влакна. Отделните влакна не винаги се визуализират, но се откриват ядра на фибробласти и фиброцити, разположени между сърдечните мускулни клетки. Ядрата на фибробластите и фиброцитите са плоски и се багрят по-интензивно базофилно от тези на кардиомиоцитите .

На напречен срез, ядрата на кардиомиоцитите са централно разположени и понякога се наблюдава по-бледо оцветена перинуклеарна зона. Между снопчетата от сърдечни мускулни клетки се наблюдава съединителна тъкан, в която се откриват ядрата на фибробластите и фиброцитите. Те могат да бъдат разположени и по периферията на мускулното влакно, тъй като всеки кардиомиоцит е самостоятелно обвит от ендомизиум. Около кардиомиоцитите се откриват множество капиляри. Задебелените части на капилярната стена маркират разположението на ядрата на ендотелните клетки. Виждат се и големи кръвоносни съдове, разположени интрамурално (фиг. 11; 12) .



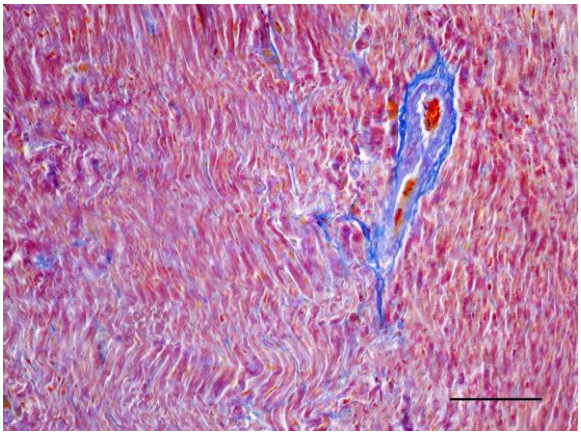
Фиг. 11. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 1 месец, хематоксилин и еозин. Увеличение – x400. Размерна линия – 50 μm.



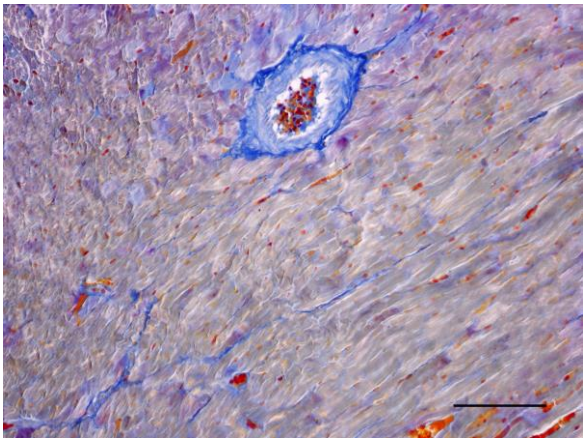
Фиг. 12. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 3 месеца, хематоксилин и еозин. Увеличение – x200. Размерна линия – 100 μm.

При трихромното оцветяване по Малори, при младите плъхове се открива незначително количество фини колагенни влакна, предимно периваскуларно и в стената на кръвоносните съдове, както при лява, така и в стената на дясна камера (фиг. 13; 14). Те се багрят интензивно в наситено син цвят. Колагенните влакна се визуализират и в

интерстициума и съединителната тъкан на перимизиума, като количеството им е по-малко и подреждането им не е строго организирано.

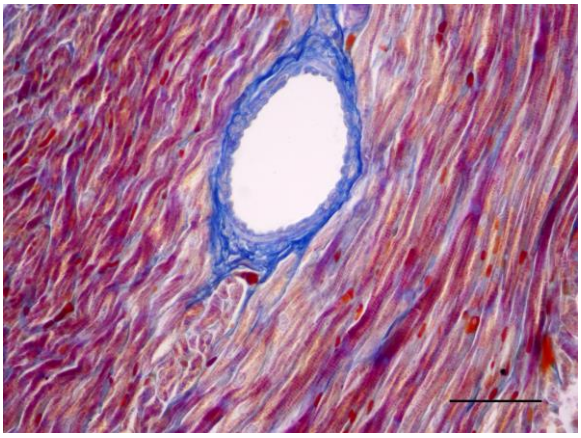


Фиг. 13. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 1 месец, оцветяване по Малори. Увеличение – x200. Размерна линия – 100 μm.

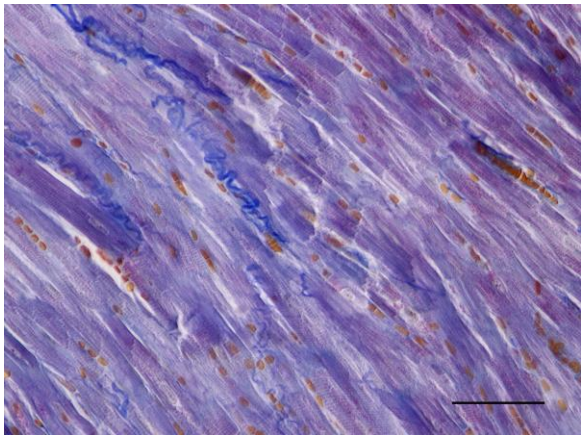


Фиг. 14. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 3 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – x200. Размерна линия – 100 μm.

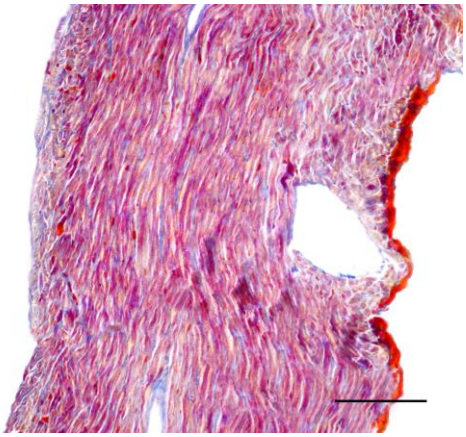
При лявата камера на тримесечните животни те са сравнително по-дебели и имат спираловидно нагънат ход, за разлика от тези в лявата камера на едномесечните животни (фиг. 15; 16). Те са сравнително по-къси и в по-малко количество. В стената на дясна камера и при двете възрастови групи се виждат изключително по-къси и в по-малко количество колагенни влакна разположени в интерстициалното пространство (фиг. 17). Забелязва се и прорастване на тънки и къси фиброзни повлекла от периваскуларното пространство между кардиомиоцитите в двете камери (фиг. 18).



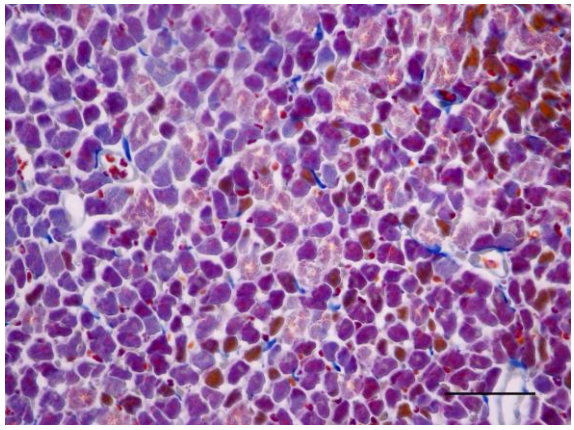
Фиг. 15. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 1 месец, оцветяване по Малори. Увеличение – x400. Размерна линия – 50 μm.



Фиг. 16. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 3 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – x400. Размерна линия – 50 μm.

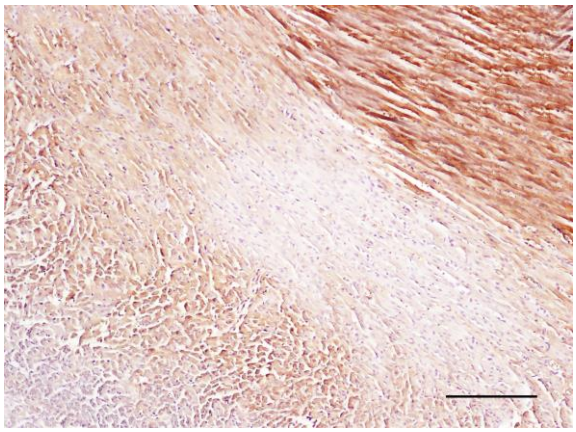


Фиг. 17. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 1 месец, оцветяване по Малори. Увеличение – x200. Размерна линия – 100 μm.

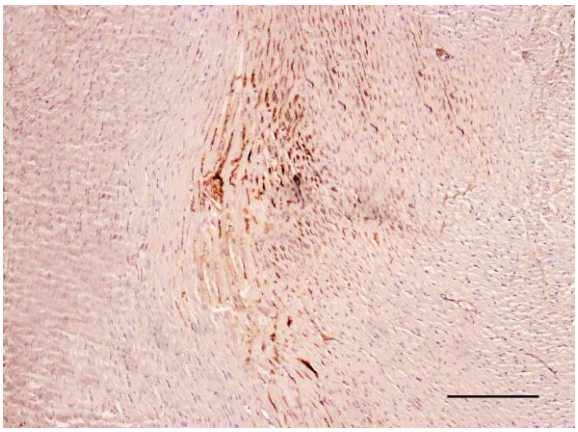


Фиг. 18. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 1 месец, оцветяване по Малори. Увеличение – x400. Размерна линия – 50 μm.

Имунохистохимичното оцветяване за nNOS показва хетерогенно разпределение на ензима. При едномесечните животни силно положителна имунореактивност се открива предимно в субендокардния участък на миокарда на лявата камера с хомогенно разпределение на ензима в клетките (фиг. 19). Едва видима остава активността в субепикардния и средния слой. При групите от тримесечни животни активността на ензима е най-интензивна в средния слой на стената на лявата камера (фиг. 20). Ензимът се визуализира предимно по периферията на кардиомиоцита, което се установява ясно както на надлъжен, така и на напречен срез.



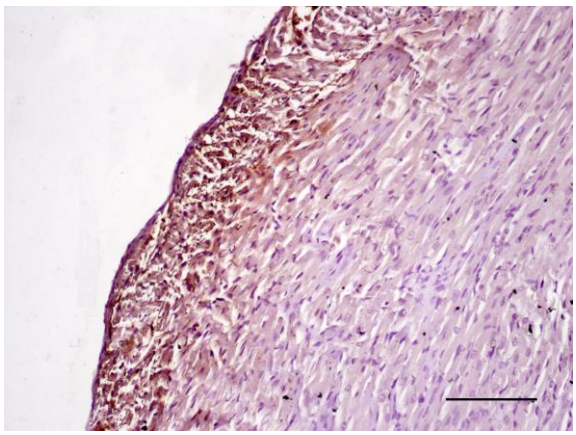
Фиг. 19. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 1 месец, експресия на nNOS. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.



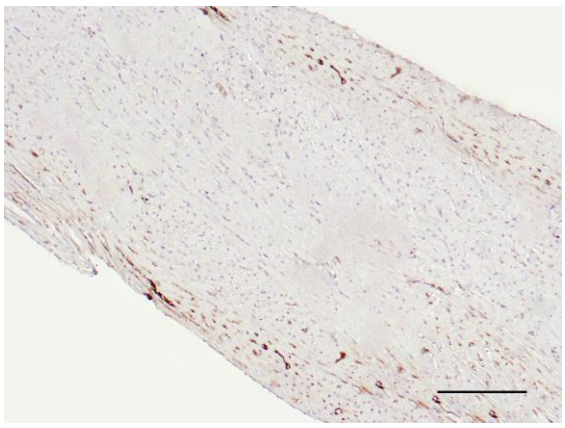
Фиг. 20. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 3 месеца, експресия на nNOS. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.

В дясната камера при едномесечните възрастови групи силно положителна имунореактивност се открива предимно в субепикардния и субендокардния участък на миокарда (фиг. 21). Едва видима остава активността в средния слой на миокарда. Подобно разпределение на

активността на ензима се наблюдава и в стената на дясната камера при тримесечни животни, като интензитетът на активността е по-слабо изразен от едномесечните и разположен по периферията на клетките (фиг. 22).

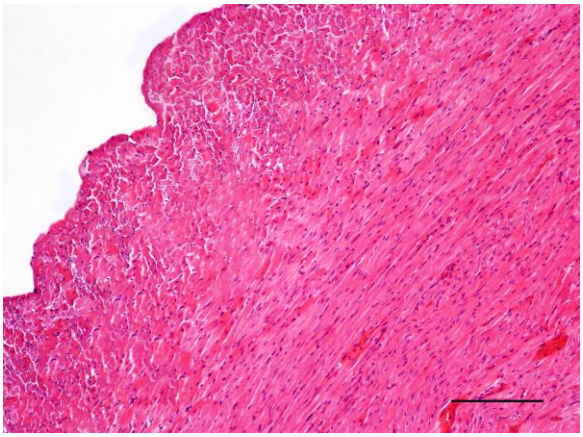


Фиг. 21. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 1 месец, експресия на nNOS. Увеличение – x200. Размерна линия – 100 μm.

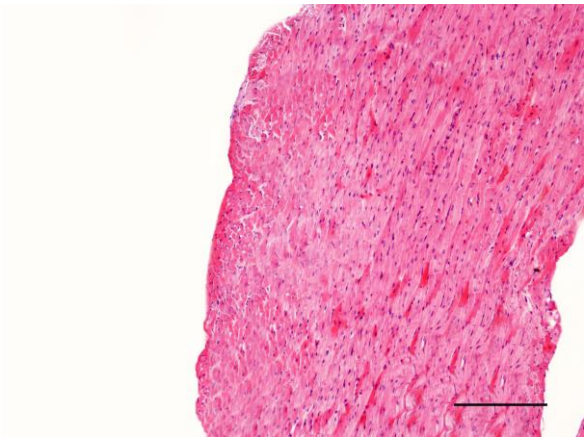


Фиг. 22. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 3 месеца, експресия на nNOS. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.

При зрелите шестмесечни Wistar плъхове при оцветяване с ХЕ кардиомиоцитите от лява и дясна камера са еозинофилни, напречно стриирани, имат едно или две централно разположени базофилни ядра. Ясно се забелязват добре изразени снопове от напречно и надлъжно разположени сърдечни мускулни влакна. Откриват се известно количество ядра на фибробласти и фиброцити, разположени между сърдечните мускулни клетки. На напречен срез, ядрата на кардиомиоцитите са централно разположени. Между снопчетата от сърдечни мускулни клетки се наблюдава умерено изразена съединителна тъкан. Около кардиомиоцитите се откриват капиляри, които изглеждат като оптически празни овални структури около сърдечните мускулни клетки. Виждат се и интрамурално разположени големи кръвоносни съдове. Наблюдава се хипертрофия на кардиомиоцитите със стесняване на интерстициалното пространство. Вижда се слабо изразена субендокардна и интерстициална фиброза, която се манифестира под формата на еозинофилни повлекла, прорастващи между сърдечните мускулни клетки. Наблюдава се умерена хиалинна дегенерация, вакуолизация и разграждане на саркомерите (Фиг. 23; 24).

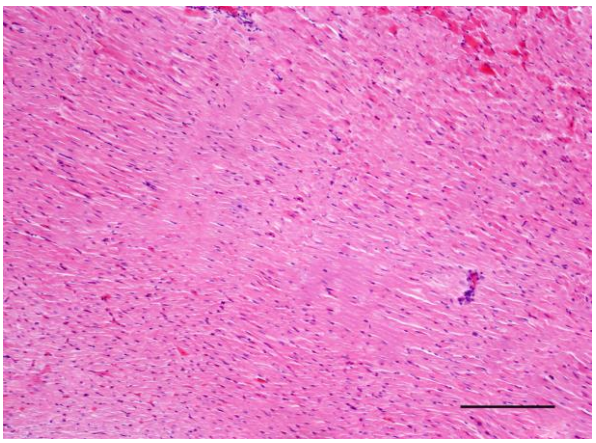


Фиг. 23. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 6 месеца, хематоксилин и еозин. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.

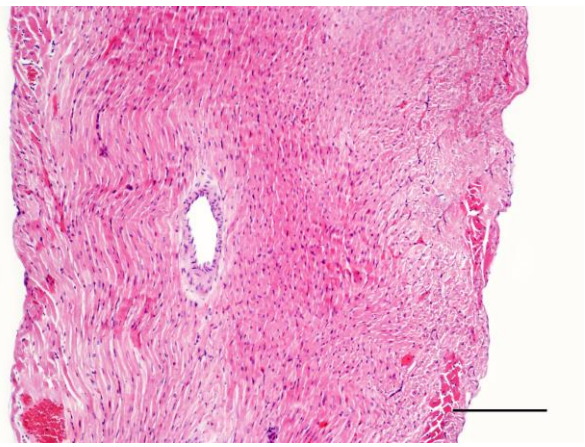


Фиг. 24. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 6 месеца, хематоксилин и еозин. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.

При възрастните дванадесетмесечни Wistar плъхове възрастово обусловените промени, наблюдавани в стената на лява и дясна камера при оцветяване с ХЕ са най-добре изразени. Наблюдават се снопове от хипертрофични сърдечни мускулни влакна с големи базофилни ядра с добре видими ядърца. Наблюдават се и хипертрофични снопове кардиомиоцити от напречните слоеве и стесняване на интерстициалното пространство. Много по-рядко се откриват капиляри в съединителната тъкан около мускулните влакна. Вижда се добре изразена левкоцитна инфилтрация, пикнотични ядра и по-ярко изразена субендокардна и интерстициална фиброза, наблюдавана като добре изразени еозинофилни повлекла. Наблюдава се и фокална миоцитолиза: изолирани кардиомиоцити, които изглеждат „празни”, т.е. в тях не се откриват ядра и напречна стриираност, а цитоплазмата се багри по-интензивно еозинофилно (фиг. 25; 26).

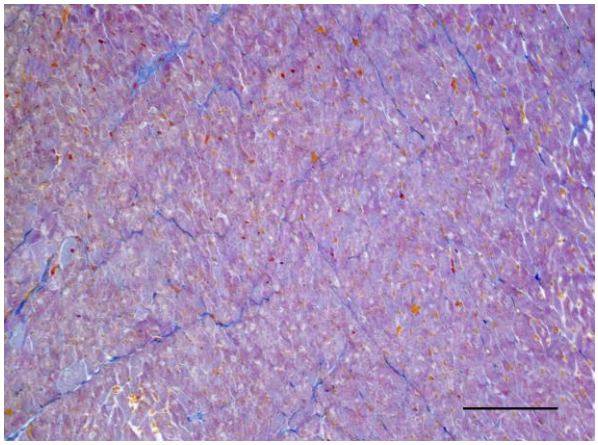


Фиг. 25. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 12 месеца, хематоксилин и еозин. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.

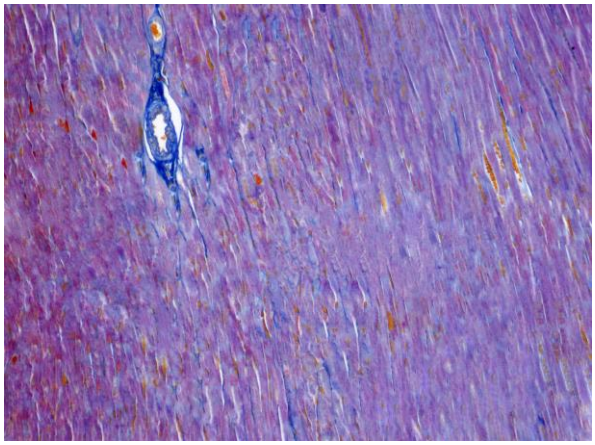


Фиг. 26. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 12 месеца, хематоксилин и еозин. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.

Умерено количество колагенни влакна, предимно периваскуларно и в интерстициума се установява при оцветяването по Малори в стената на лява камера на зрели (шестмесечни) плъхове. Виждат се интензивно сини, сравнително дълги и анастомозиращи влакна в интерстициалното пространство (фиг. 27). При възрастните (дванадесетмесечни) плъхове, колагенните влакна в стената на лява камера са в голямо количество, като подреждането им не е строго организирано (фиг. 28). Те са по-дебели и имат спираловидно нагънат ход.

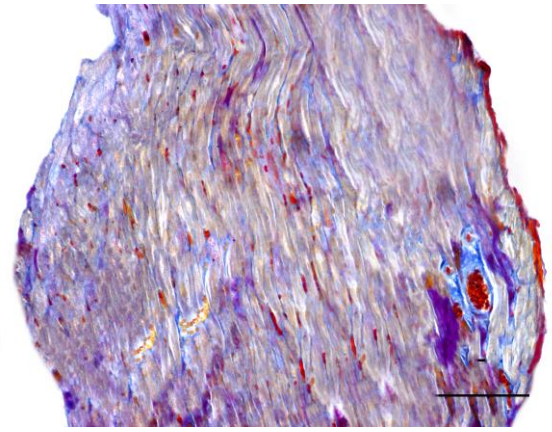


Фиг. 27. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 6 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – x200. Размерна линия – 100 μm.

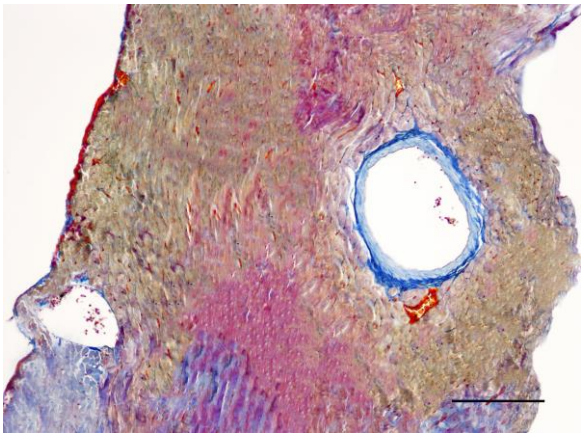


Фиг. 28. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 12 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – x200. Размерна линия – 100 μm.

В дясната камера при шестмесечните и дванадесетмесечните Wistar плъхове се наблюдават идентични промени с тези при лявата камера, но с по-умерено изразена характеристика (фиг. 29; 30). Колагенните влакна са по-тънки и по-къси. Периваскуларната съединителна тъкан е в по-малко количество и прорастването на колагенни влакна от периваскуларното пространство в интерстициума е по-слабо изразено.

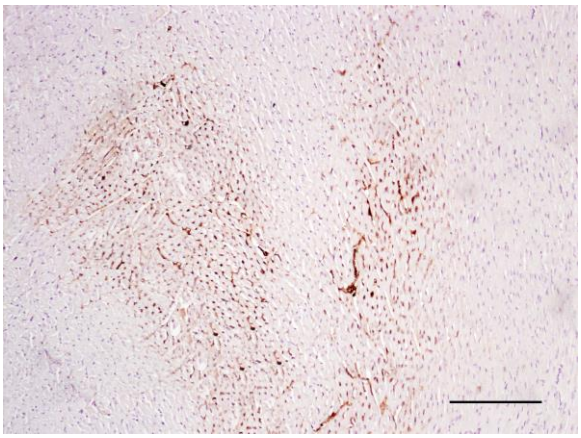


Фиг. 29. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 6 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – x200. Размерна линия – 100 μm.

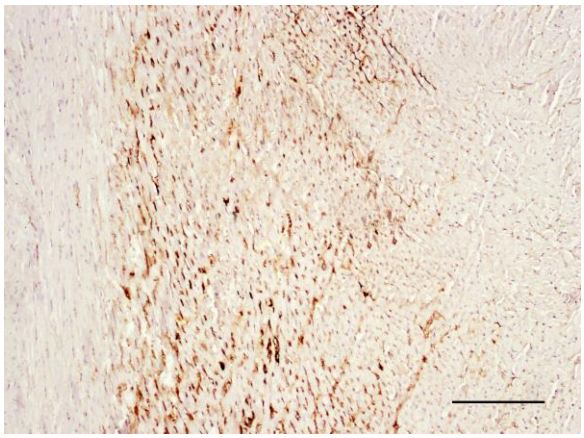


Фиг. 30. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 12 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.

Имунохистохимичното оцветяване за nNOS в лява камера при зрели (шестмесечни плъхове) и възрастни (дванадесетмесечни плъхове) животни показва силно положителна експресия предимно в средния слой на стената. Наблюдава се едва видима активност в субепикардния и субендокардния участък. Интензитетът е по-силно положителен при дванадесетмесечните животни. Наблюдава се ясно, че активността на ензима се концентрира предимно по периферията на кардиомиоцитите (фиг. 31; 32).

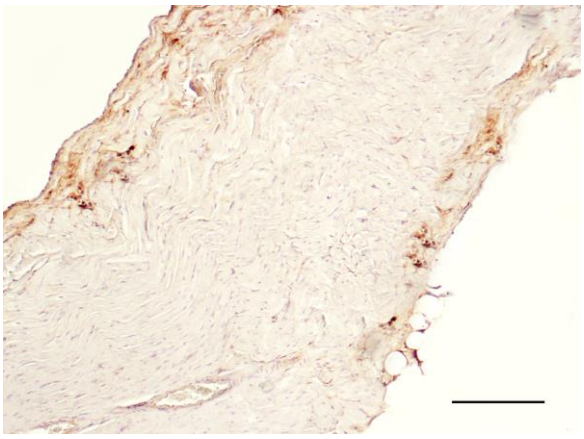


Фиг. 31. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 6 месеца, експресия на nNOS. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.

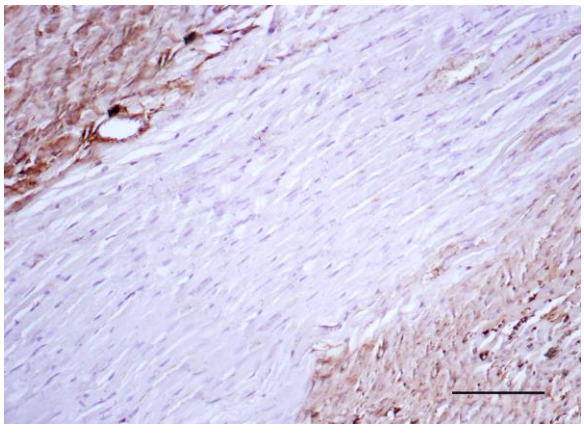


Фиг. 32. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 12 месеца, експресия на nNOS. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.

В дясната камера, силно положителна експресия на nNOS се открива предимно в субепикардния и субендокардния участък на стената на камерата при двете възрастови групи животни. Едва видима до лиспваща е активността в средния участък на стената. Интензитетът на реакцията нараства с напредване на възрастта, като активността на ензима е предимно по периферията на клетките (фиг. 33; 34).

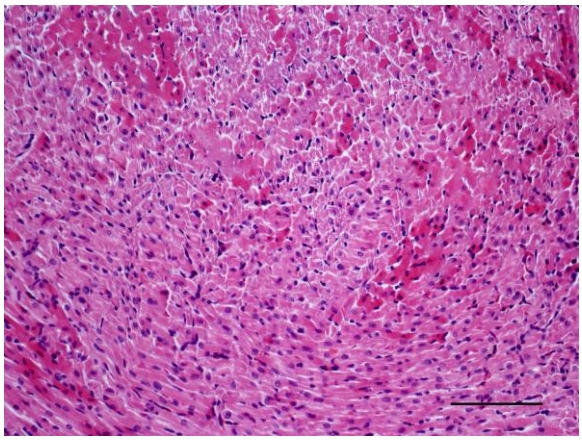


Фиг. 33. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 6 месеца, експресия на nNOS. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.

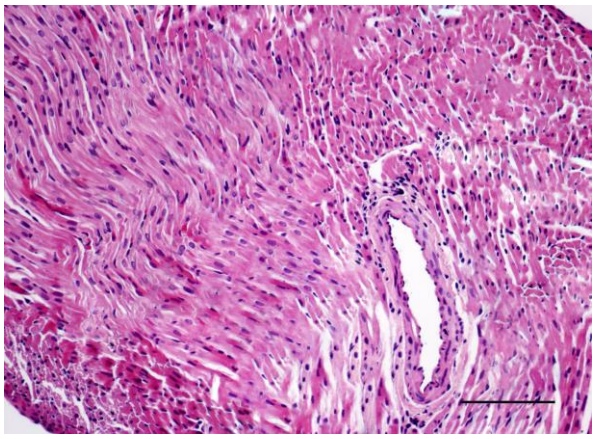


Фиг. 34. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 12 месеца, експресия на nNOS. Увеличение – x200. Размерна линия – 100 μm.

При младите (едномесечни) SHR, при оцветяването с ХЕ, на надлъжен срез, кардиомиоцитите от лявата камера са еозинофилни, напречно стриирани, имат едно или две централно разположени базофилни ядра. Всяко мускулно влакно е обвито от ендомизиум от съединителна тъкан и перимизиум с богата капилярна мрежа и голям брой влакна. Отделните влакна не винаги се визуализират, но се откриват ядра на фибробласти и фиброцити, които се багрят по-интензивно базофилно от тези на кардиомиоцитите. На напречен срез се наблюдават сравнително големи кардиомиоцити с централно разположени ядра и по-бледо оцветена перинуклеарна зона. Между снопчетата от сърдечни мускулни клетки се открива фина съединителна тъкан с множество капиляри. Виждат се и големи интрамурално разположени кръвоносни съдове, в чийто лумен се наблюдават еритроцити (фиг. 35). В дясната камера се установяват идентични промени, които са по-слабо изразени в сравнение с наблюдаваните при лявата камера. Наблюдаваните съединителнотъканни повлекла са много тънки и трудно могат да се визуализират. Ясно се забелязват и добре оформените снопове от надлъжно разположени кардиомиоцити (фиг. 36).



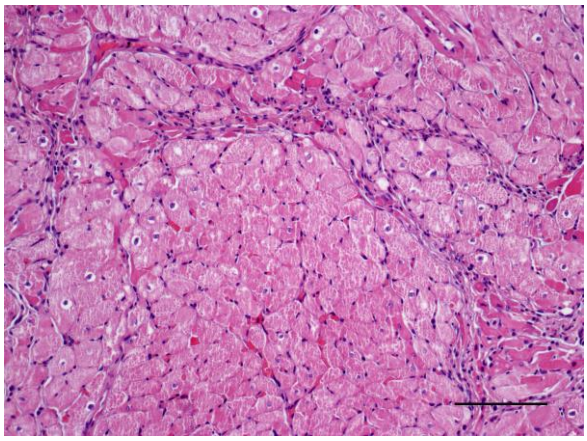
Фиг. 35. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 1 месец, SHR, хематоксилин и еозин. Увеличение – x200. Размерна линия – 100 μm.



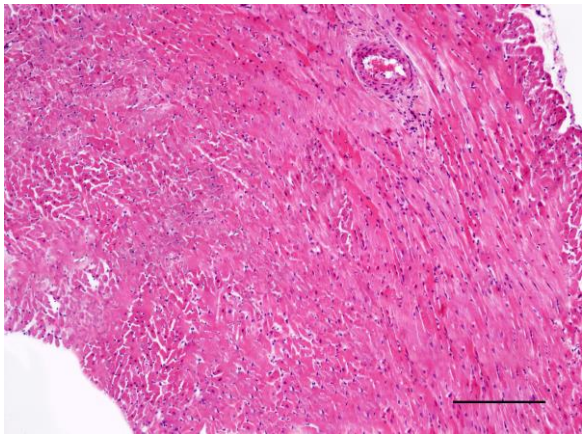
Фиг. 36. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 1 месец, SHR, хематоксилин и еозин. Увеличение – x200. Размерна линия – 100 μm.

При зрелите (шестмесечни) SHR се наблюдава ясно изразена и добре видима хипертрофия на кардиомиоцитите от надлъжните и напречните слоеве в стената на лявата камера, със стесняване на интерстициалното пространство и по-рядко се откриват капиляри в съединителната тъкан около мускулните влакна. Наблюдава се много добре изразена ядрена хипертрофия, като на места се забелязват и струпвания от голямо количество двуядрени кардиомиоцити. Ядрата са

силно базофилни, с добре изразена мрежеста структура и ясно видими ядърца. На места се забелязва неутрофилна инфилтрация, пикнотични ядра и по-ярко изразена субендокардна и интерстициална фиброза, която се манифестира под формата на еозинофилни повлекла, прорастващи между сърдечните мускулни клетки. Съединителната тъкан на ендомизиума и перимизиума е сравнително добре развита (фиг. 37). Може да се наблюдава и фокална миоцитолиза: изолирани кардиомиоцити, които изглеждат „празни", т.е. в тях не се откриват ядра и напречна стриираност, а цитоплазмата се багри по-интензивно еозинофилно. В стената на дясната камера при зрелите (шестмесечни) SHR, също както и в стената на лявата камера, ясно и отчетливо се наблюдават хипертрофичните промени в кардиомиоцитите. Капилярите и интерстициалното пространство претърпяват идентични с лявата камера морфологични промени (фиг. 38).

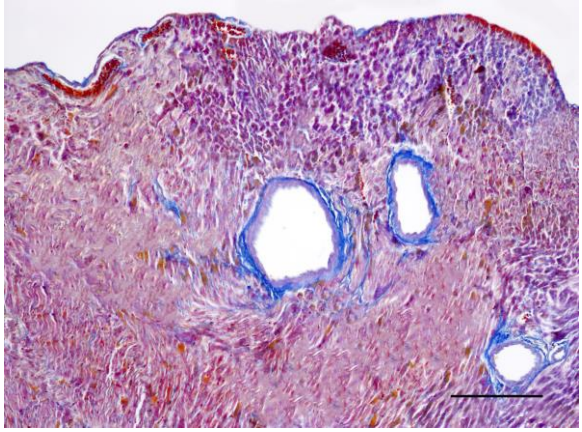


Фиг. 37. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 6 месеца, SHR, хематоксилин и еозин. Увеличение – x200. Размерна линия – 100 μm.

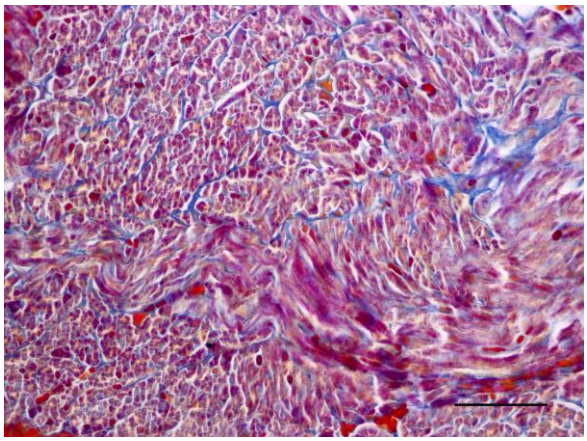


Фиг. 38. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 6 месеца SHR, хематоксилин и еозин. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.

При трихромното оцветяване по Малори, при младите (едномесечни) SHR се откриват умерено количество фини колагенни влакна, предимно периваскуларно и в стената на кръвоносните съдове. Те се багрят интензивно в наситено син цвят. Нарядко разположени, сравнително къси колагенни влакна, следващи хода на кардиомиоцитите, се наблюдават и в интерстициалното пространство (фиг. 39). В стената на дясната камера, фиброзните изменения се забелязват също ясно и отчетливо. Те наподобяват тези в стената на лявата камера, като много добре се забелязва, че съединителнотъканните влакна са сравнително дълги, но по-тънки от тези в стената на лявата камера и се свързват помежду си, образувайки мрежовидна структура (фиг. 40).

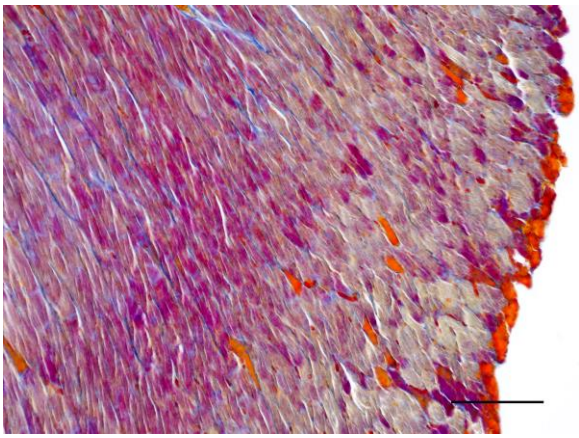


Фиг. 39. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 1 месец, SHR, оцветяване по Малори. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 μm.

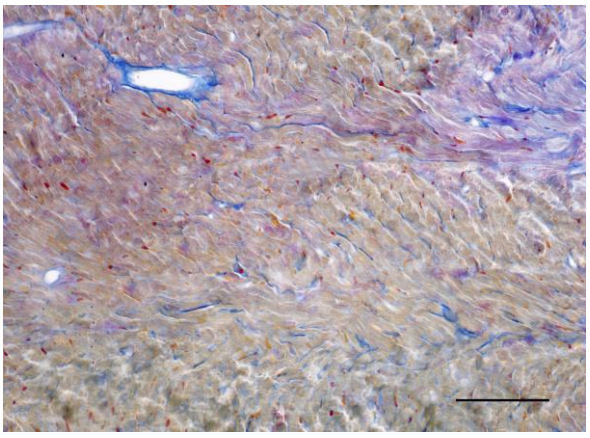


Фиг. 40. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 1 месец, SHR, оцветяване по Малори. Увеличение – x400. Размерна линия – 50 μm.

При зрелите (шестмесечни) SHR, колагенните влакна в стената на лява и дясна камера са в по-голямо количество, нагъсто разположени и се откриват както периваскуларно, така и в интерстициалното пространство и в съединителната тъкан на перимизиума, като подреждането им не е строго организирано. Те са по-дебели и имат спираловидно нагънат ход. Оформят добре изразени мрежовидни структури. Прорастването на фиброзни повлекла от периваскуларното пространство се наблюдава при почти всички интрамурално разположени кръвоносни съдове (фиг. 41; 42).



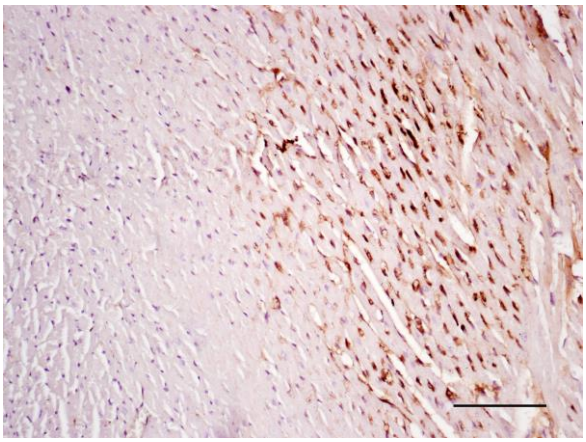
Фиг. 41. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 6 месеца, SHR, оцветяване по Малори. Увеличение – x200. Размерна линия – 100 μm.



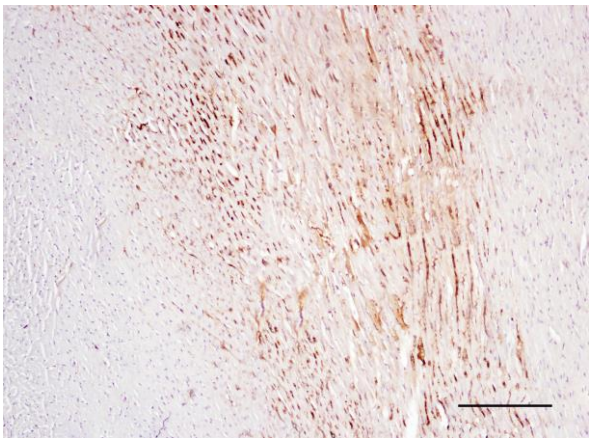
Фиг. 42. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 6 месеца, SHR, оцветяване по Малори. Увеличение – 200. Размерна линия – 100 μm.

Имунохистохимичната реакция за nNOS показва идентично разпределение на активността на ензима в стената на лявата камера при двете възрастови групи SHR. Активността на nNOS се открива предимно в средния слой на стената, като при зрелите животни може да бъде

отчетена като силно положителна, докато при младите е умерено положителна. Едва видима до липсваща остава експресията в субепикардния и субендокардния участък на стената. Освен това активността на ензима отново се наблюдава предимно по периферията на кардиомиоцита, което се установява ясно както на надлъжен, така и на напречен срез (фиг. 43; 44).

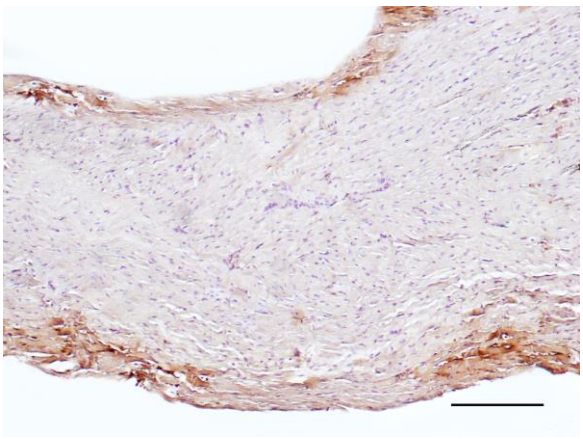


Фиг. 43. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 1 месец, SHR, експресия на nNOS. Увеличение – x200. Размерна линия – 100 µm.

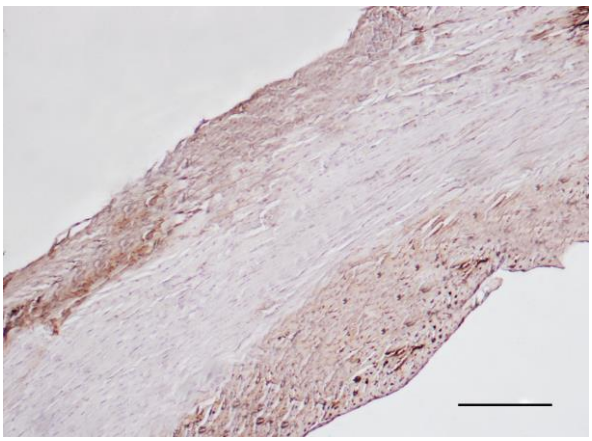


Фиг. 44. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 6 месеца, SHR, експресия на nNOS. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 µm.

В дясната камера не се наблюдават съществени различия между младите и зрелите животни при имунохистохимичната реакция. При тях силно положителна активност на ензима се открива предимно в субепикардния и субендокардния участък на миокарда. Едва видима е експресията в средния слой на стената. Интензитетът на активността показва леко нарастване с напредване на възрастта (фиг. 45; 46).



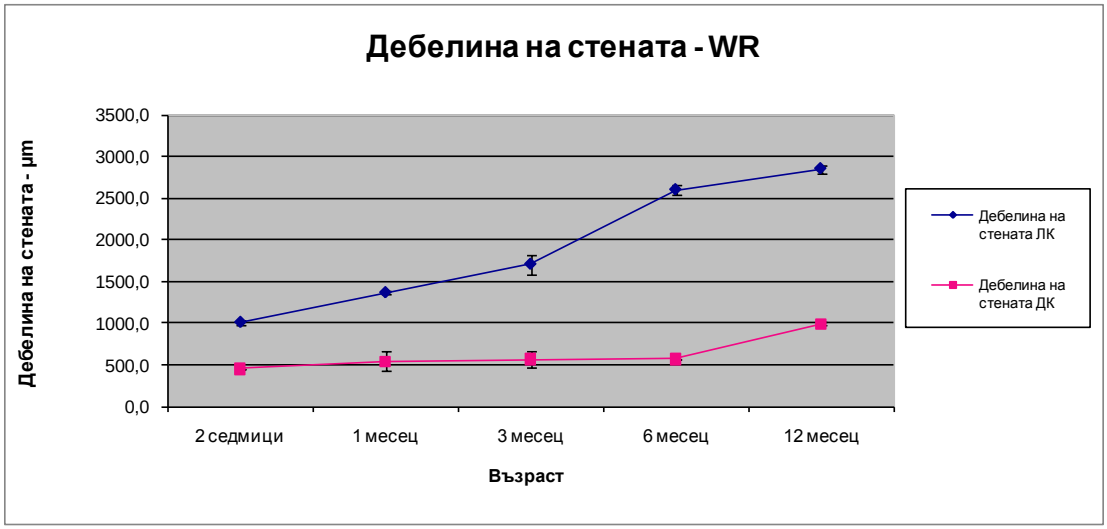
Фиг. 45. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 1 месец, SHR, експресия на nNOS. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 µm.



Фиг. 46. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 6 месеца, SHR, експресия на nNOS. Увеличение – x100. Размерна линия – 200 µm.

2. Количествени характеристики на миокарда и кардиомиоцитите през различни етапи от постналталното развитие при Wistar плъхове

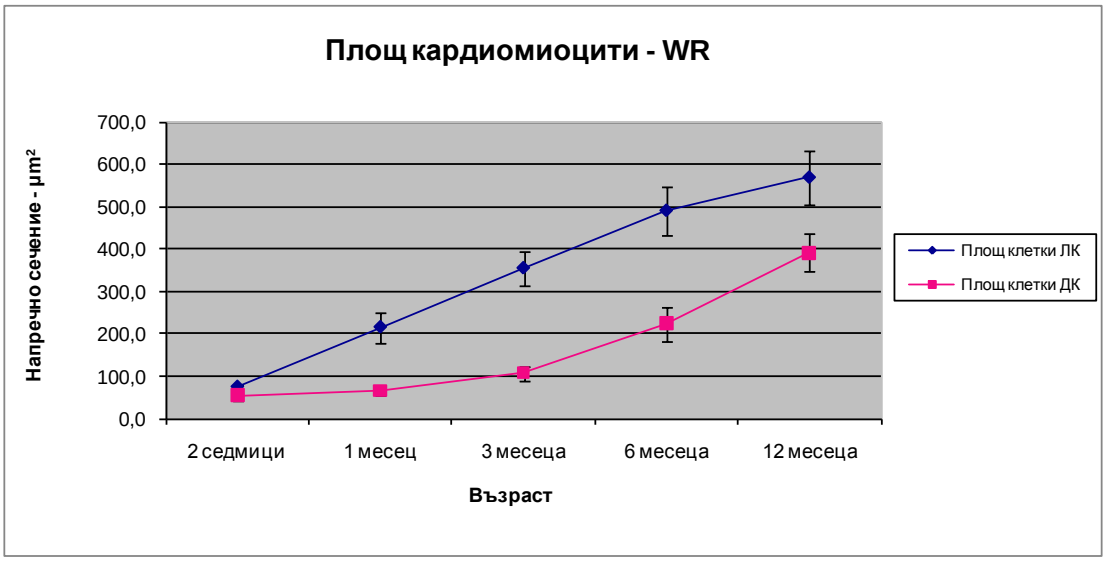
Динамиката в дебелината на свободната стена на лявата камера показва динамично нарастване в постналталния период, като значително и интензивно увеличаване на стойностите на този показател се наблюдават във възрастовите групи след трети месец. Подробното разглеждане на промените в дебелината на свободната стена на дясната камера показва, че до шестия месец не се забелязва значително повишаване на количествените характеристики на този показател. Известно увеличаване на стойностите на показателя се забелязва между шестмесечните и дванадесетмесечните животни (фиг. 47).



Фиг. 47. Дебелина на стената при Wistar плъхове

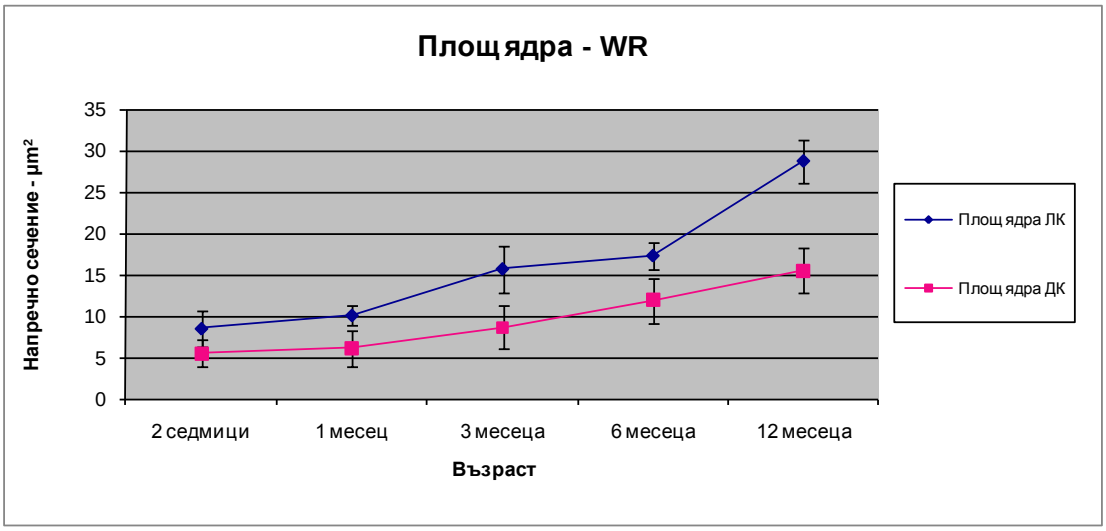
Напречното сечение на клетката отразява детайлно промените в големината на кардиомиоцитите през различните периоди. Погледнат в цялост този показател постепенно нараства, отразено с възходящия ход на кривите. При кардиомиоцитите от лява камера се отчита интензивно нарастване на напречното сечение на сърдечните мускулни клетки през всички периоди, докато при кардиомиоцитите от дясна камера най-интензивни са промените през третия, шестия и дванадесетия месец. Подробното разглеждане на промените в напречното сечение на сърдечните мускулни клетки разкрива, че при двуседмичните плъхове стойността е почти еднаква при кардиомиоцитите от лява и дясна камера, след което то нараства плавно до третия месец при сърдечните мускулни клетки от дясната камера, а при тези от лявата камера се наблюдава интензивно нарастване на стойностите през всички периоди. От

графиката се забелязва, че след третия месец, напречното сечение на кардиомиоцитите от дясната камера също нараства динамично (фиг. 48).



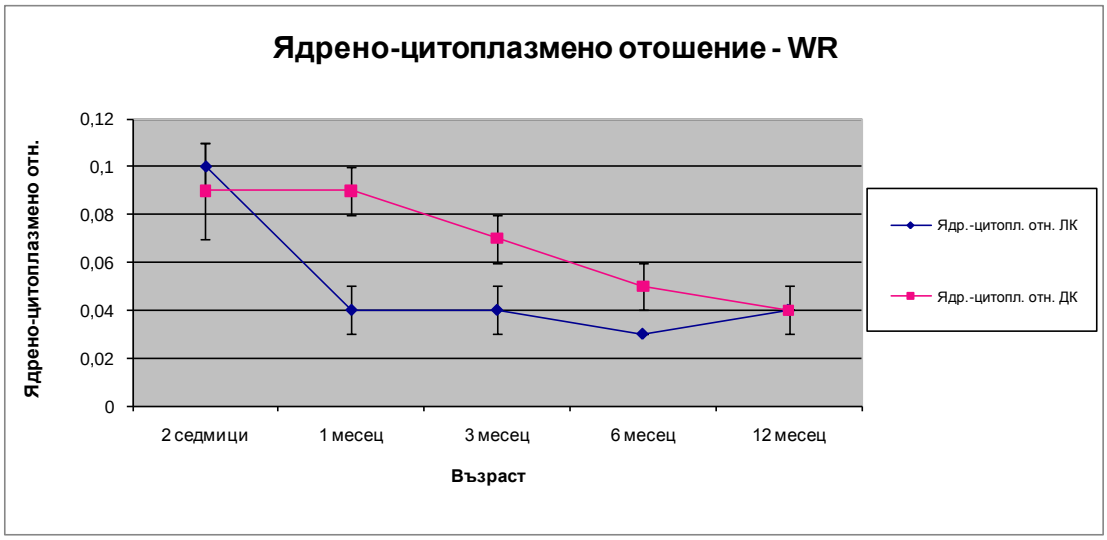
Фиг. 48. Площ на кардиомиоцитите при Wistar плъхове

Промените в напречното сечение на ядрата на сърдечните мускулни клетки от лява и дясна камера за целия постнатален период показват предимно равномерено нарастване. Интензивна динамика на този показател се наблюдава между първия и третия месец от постналното развитие на ядрата на кардиомиоцитите от лявата камера. Подобна динамика може да бъде забелязана и между шестия и дванадесетия месец отново при ядрата на сърдечните мускулни клетки от лявата камера. Аналогични промени не се регистрират при ядрата на кардиомиоцитите от дясната камера (фиг. 49).



Фиг. 49. Площ на ядрата при Wistar плъхове

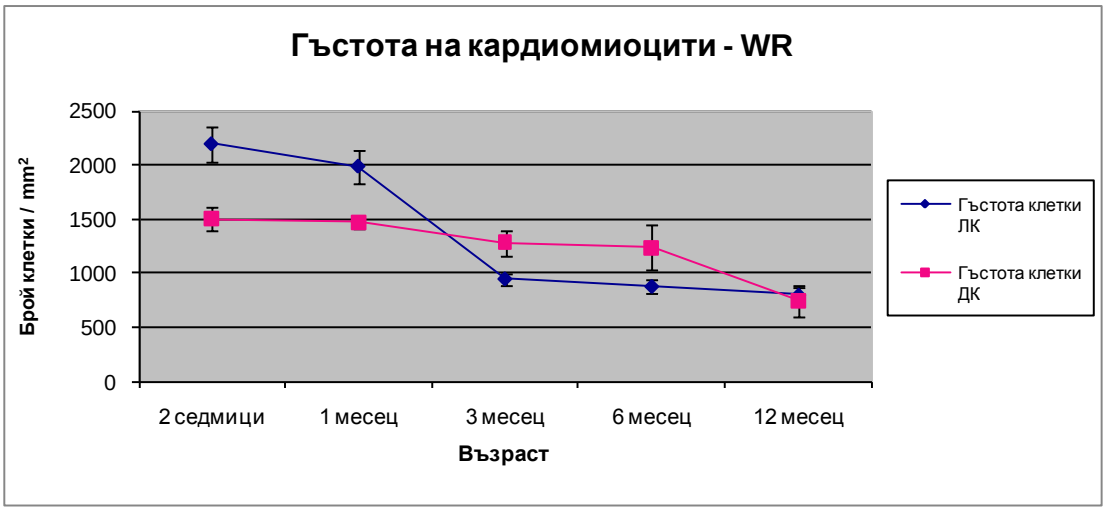
Показателят ядрено-цитоплазмено отношение зависи от отношението между напречното сечение на ядрото и напречното сечение на кардиомиоцита. Както беше посочено, като цяло, клетъчната големина и напречното сечение на ядрото нарастват постепенно и сравнително равномерно – оттук следва и сравнително равномерният характер на промените в ядрено-цитоплазменото отношение. Промените на този показател между двуседмичните и едномесечните плъхове разкрива, по-значителен спад при кардиомиоцитите от лява камера, докато при тези от дясна камера динамиката е с минимална разлика. Наблюдава се леко покачване на ядрено-цитоплазменото отношение при кардиомиоцитите от лявата камера между шестмесечните и дванадесетмесечните животни. Забелязва се, че при дванадесетмесечните плъхове ядрено-цитоплазменото отношение на кардиомиоцитите от лява и дясна камера е с еднква стойност. Стойностите на този показател се движат между 0,03-0,10 за лявата камера и 0,04-0,09 за дясната камера. Това показва еднаквост в динамиката на нарастване на площта на клетката и площта на неийното ядро от лява и дясна камера (фиг. 50).



Фиг. 50. Ядрено-цитоплазмено отношение при Wistar плъхове

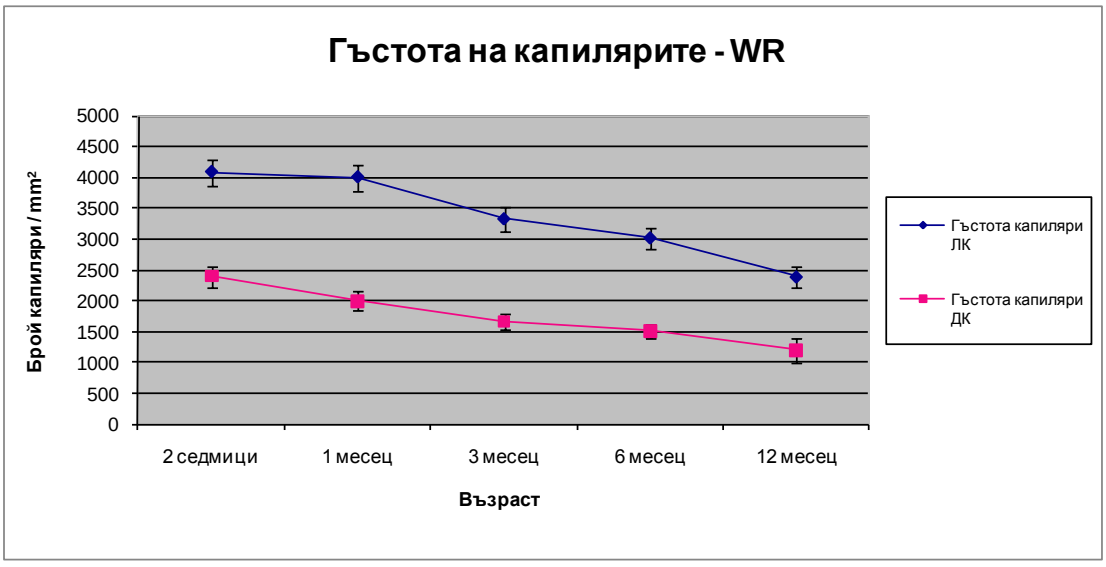
Промените в стойностите на гъстотата на кардиомиоцитите от двете камери са обратнопропорционални на тези наблюдавани за напречното сечение на клетките. За целия постнатален период стойностите на гъстотата плавно намаляват и за двете камери, но при гъстотата на сърдечните мускулни клетки от лявата камера между едномесечните и тримесечните плъхове се отбелязва значително понижаване в сравнение със същите при дясната камера. Аналогично на ядрено-цитоплазменото

отношение и гъстотата на кардиомиоцитите от лявата и дясната камера при дванадесетмесечните животни има почти еднакви стойности (фиг.51).



Фиг. 51. Гъстота на кардиомиоцитите при Wistar плъхове

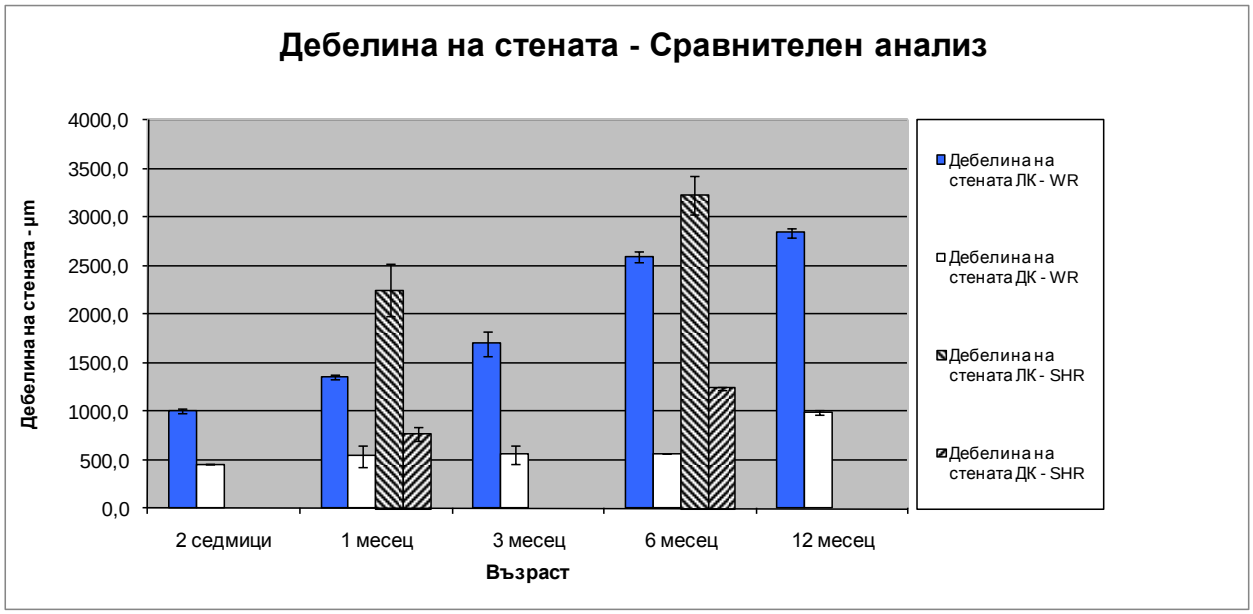
За целия постнатален период стойностите на показателя гъстота на капилярите равномерно и плавно намаляват и при двете камери. Промените в динамиката на този показател са обратнопропорционални на напречното сечение на сърдечните мускулни клетки при всички възрастови групи от постналталното развитие. Правопропорционална зависимост се установява между морфометричния показател гъстота на кардиомиоцитите от лява и дясна камера и гъстотата на капилярите. Тези сравнителни характеристики показват, че нарастването на капилярната мрежа в постналталния период от развитието на животните значително изостава в сравнение с нарастването на площта на сърдечните мускулни клетки в двете камери (фиг. 52).



Фиг. 52. Гъстота на капилярите при Wistar плъхове

3. Сравнителна характеристика на миокарда и кардиомиоцитите през различни етапи от постналталното развитие при нормотензивни Wistar плъхове и SHR

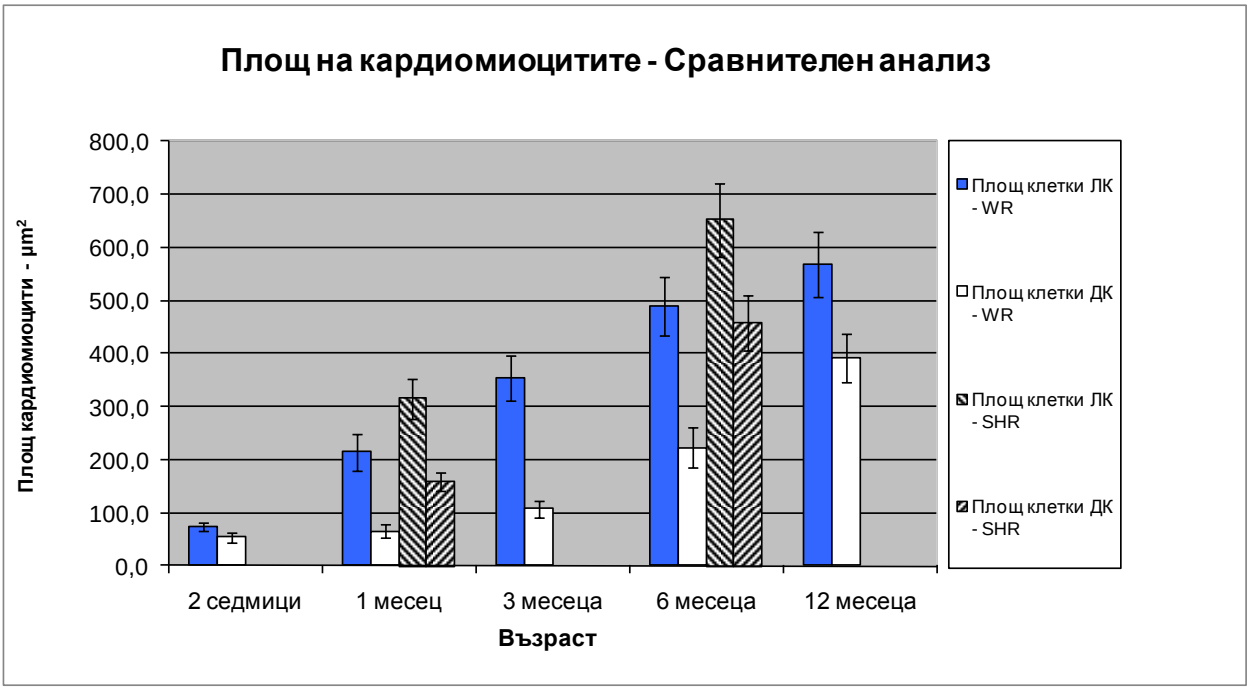
Динамиката на нарастване на дебелината на свободната стена на лявата камера при млади (едномесечни) SHR е съпоставима с тази на зрели (шестмесечни) нормотензивни Wistar плъхове. Подобни промени се наблюдават и при зрелите (шестмесечни) SHR, като дебелината на свободната стена на лявата камера при тях дори надвишава тази при възрастните (дванадесетмесечни) нормотензивни Wistar плъхове. Подробното сравнително разглеждане на промените в дебелината на свободната стена на дясната камера при нормотензивни Wistar плъхове и SHR показва плавно нарастване, без значителни скокове, като се вижда, че отново при SHR дебелината надвишава по стойност тази при съответстващи им по възраст нормотензивни Wistar плъхове (фиг. 53).



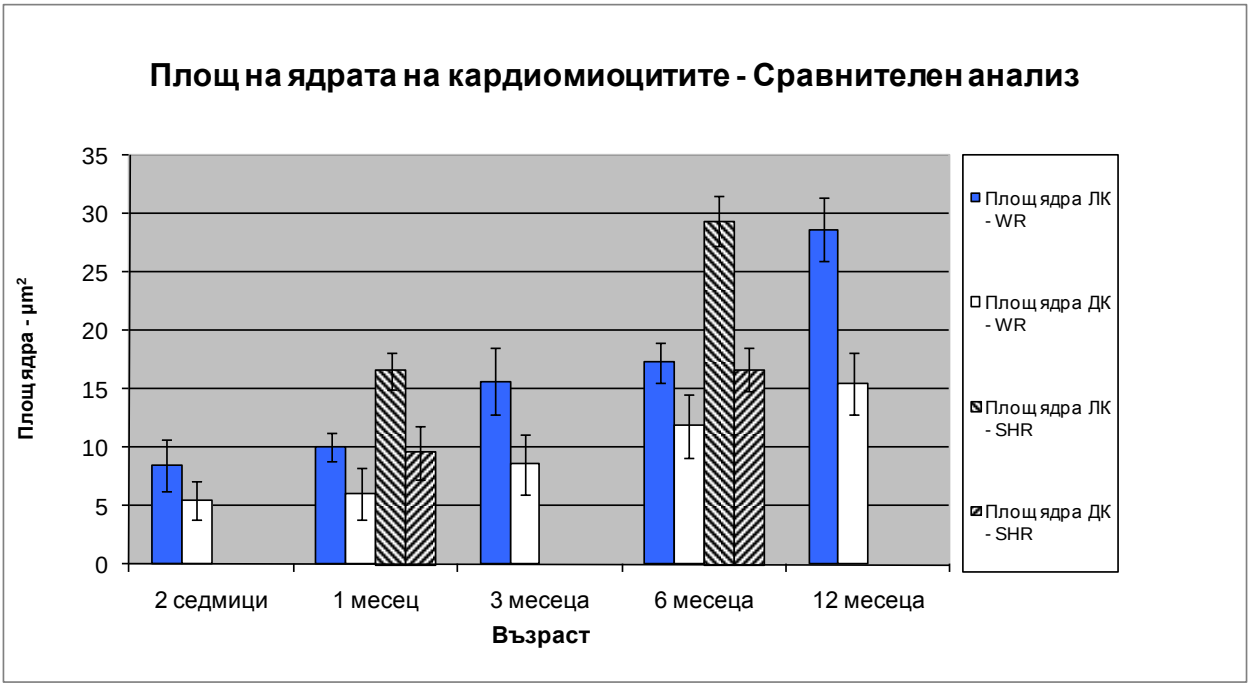
Фиг. 53. Сравнителна динамика на дебелината на стената на лява и дясна камера

Подобна динамика в стойностите се наблюдава и за напречното сечение на кардиомиоцитите и напречното сечение на техните ядра. Промените на тези показатели при кардиомиоцитите от лява камера на младите (едномесечни) SHR са съпоставими с тези на тримесечните нормотензивни Wistar плъхове, докато при сърдечните мускулни клетки от дясната камера показателите при младите (едномесечни) SHR надвишават тези на тримесечните нормотензивни Wistar плъхове. Показателите при зрелите (шестмесечни) SHR са съпоставими с тези на възрастните (дванадесетмесечни) нормотензивни Wistar плъхове както за

кардиомиоцити от лява, така и за същите от дясна камера. Въпреки това при показателя напречно сечение на кардиомиоцитите, тези стойности при зрелите (шестмесечни) SHR са по-големи от същите при възрастните (дванадесетмесечни) нормотензивни Wistar плъхове, отразявайки статистически значима разлика между двете групи (фиг. 54; 55).

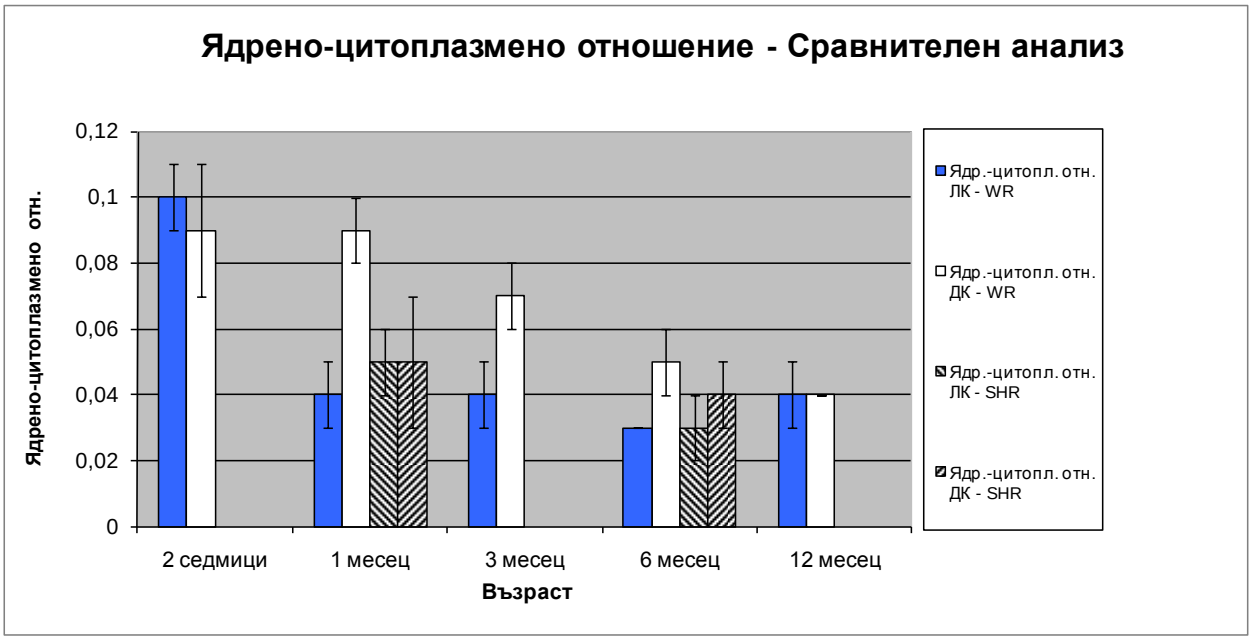


Фиг. 54. Сравнителна динамика на напречното сечение на кардиомиоцитите



Фиг. 55. Сравнителна динамика на напречното сечение на ядрата на кардиомиоцитите

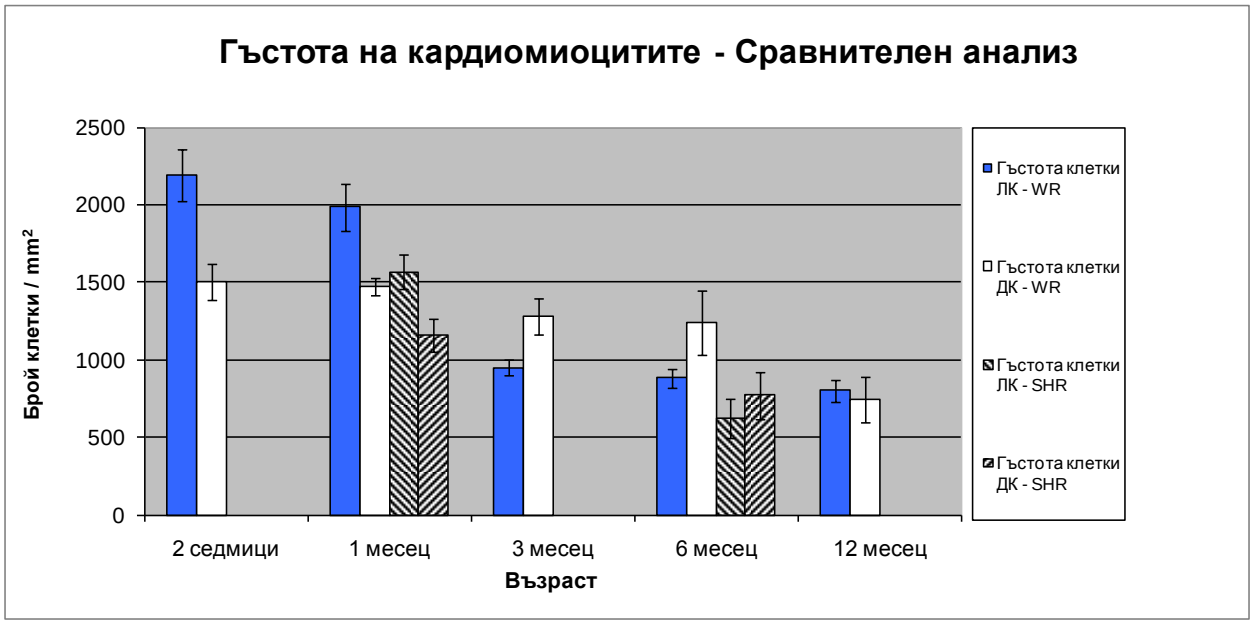
Ясно се забелязва степента на намаляване на ядрено-цитоплазменото отношение при нормотензивни Wistar плъхове и SHR. Тъй като площта на кардиомиоцитите и техните ядра от лява и дясна камера при млади (едномесечни) SHR е съпоставима с тази на тримесечните нормотензивни Wistar плъхове, очквано и ядрено-цитоплазменото отношение би трябвало да е със съизмерими стойности при тези възрасти. От графиката се забелязва, че ядрено-цитоплазменото отношение при младите (едномесечни) SHR е със стойности както при зрелите (шестмесечни) нормотензивни Wistar плъхове. При зрелите (шестмесечни) SHR стойностите на отношението са съпоставими с тези на възрастните (дванадесетмесечни) нормотензивни Wistar плъхове, което е идентично с динамиката на показателите напречно сечение на кардиомиоцитите и напречно сечение на техните ядра (фиг. 56).



Фиг. 56. Сравнителна динамика на ядрено-цитоплазменото отношение

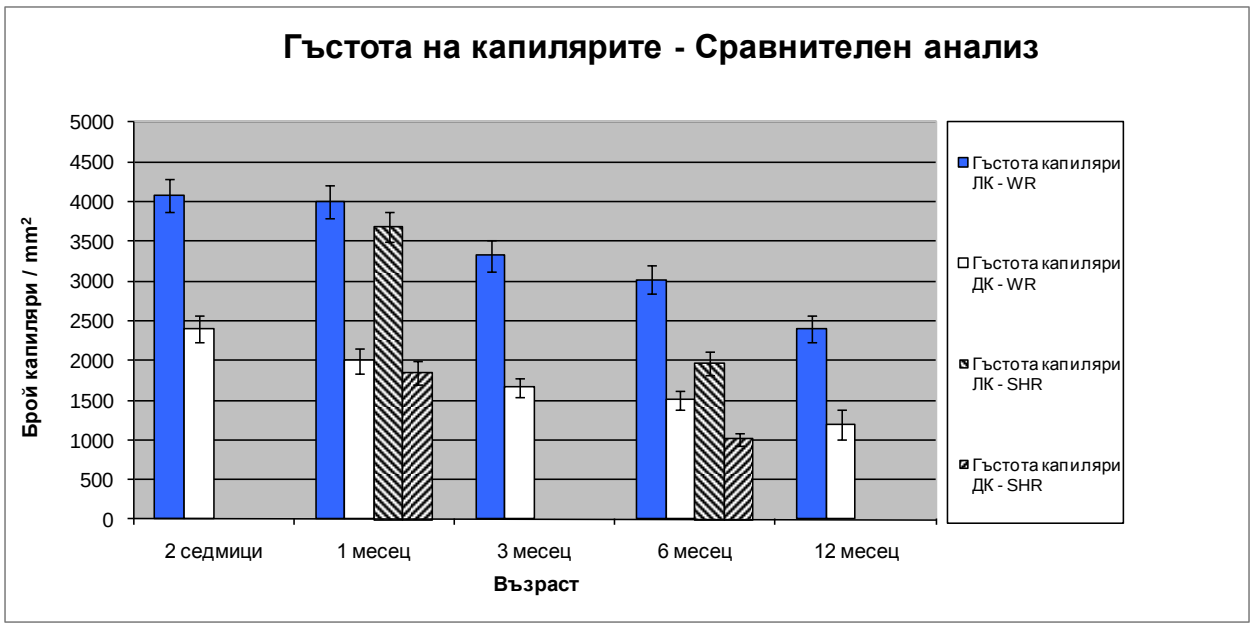
Промените в стойностите на гъстотата на сърдечните мускулни клетки от лява и дясна камера са обратнопропорционални на тези, наблюдавани за клетъчната площ. За целия постнатален период, стойностите на гъстотата и за двете камери намаляват, като се наблюдава, че при младите (едномесечни) SHR показателят при клетки от лявата камера не е съизмерим с този на зрелите (тримесечни-шестмесечни) нормотензивни Wistar плъхове, а значително го надвишава, докато гъстотата на кардиомиоцитите от дясната камера не е с такава значителна разлика. При зрелите (шестмесечни) SHR стойностите на

отношението са съпоставими с тези на възрастните (дванадесетмесечни) нормотензивни Wistar плъхове както за лява, така и за дясна камера. Подробното разглеждане на промените на гъстотата на кардиомиоцитите от лявата камера при зрелите (шестмесечни) SHR разкрива спад в стойностите спрямо тези на възрастните (дванадесетмесечни) нормотензивни Wistar плъхове (фиг. 57).



Фиг. 57. Сравнителна динамика на гъстотата на кардиомиоцитите

Сравнителният анализ на диаграмите за гъстота на капилярите показва отклонения от наблюдаваната при другите диаграми съпоставимост. При младите (едномесечни) SHR показателят както за лява, така и за дясна камера има сходни стойности с този при младите (едномесечни) нормотензивни Wistar плъхове. Отклонение от тази корелация се наблюдава както между зрели (шестмесечни) SHR и съответните им по възраст нормотензивни Wistar плъхове, така и между зрели (шестмесечни) SHR и възрастни (дванадесетмесечни) нормотензивни Wistar плъхове. Спадът на стойностите при зрелите (шестмесечни) SHR е приблизително една трета от стойностите при зрели (шестмесечни) нормотензивни Wistar плъхове, като те са по-ниски дори от съответните стойности за двете камери при възрастни (дванадесетмесечни) нормотензивни Wistar плъхове (фиг. 58).



Фиг. 58. Сравнителна динамика на гъстотата на капилярите

Наблюдаваните промени при сравнителен анализ на изследваните морфометрични показатели корелират с по-ясно изразена хипертрофия, предимно на свободната стена на лявата камера, с напредване на възрастта при SHR. Следва да се отбележи, че при нормотензивните Wistar плъхове също се наблюдава хипертрофия, която е възрастово обусловена. Промените в посока хипертрофия се отразяват детайлно от показателите напречно сечение на кардиомиоцитите (чиито стойности показват интензивно нарастване) и гъстота на капилярите (чиито стойности показват плавно намаляване). Тези промени настъпват в по-ранна възраст при SHR, в сравнение със съответстващите им по възраст нормотензивните Wistar плъхове.

V. Обсъждане

1. Характеристика на миокарда на лява и дясна камера и кардиомиоцитите на нормотензивни Wistar плъхове и SHR

Хипертрофията на сърцето, без значение от инициращото я събитие, е структурна последица от един или повече фактори. Сред тези фактори са увеличаването на броя и/или размера на кардиомиоцитите, количеството елементи на съединителната тъкан или гъстотата на кръвоносните съдове, или комбинация от всички или някои от гореизброените. Спонтанно хипертензивните плъхове представляват често анализиран модел на есенциалната хипертония у човека, където връзката между хипертонията и сърдечната хипертрофия може да бъде повлиявана и често прекъсвана (Frohlich и Tarazi 1979; Sen 1983). От особен интерес по време на морфологичното развитие на миокарда са промените в съдовете му, които настъпват по време на постнаталното развитие на нормотензивните и спонтанно хипертензивните плъхове. Wearn (1941), както и Roberts и Wearn (1941) за пръв път показват, че увеличаването на теглото на миокарда, дължащо се на по-голямо натоварване, води до значително понижаване на капилярната плътност. Тези, както и някои по-късни проучвания, предполагат, че пролиферацията на капиляри не е главен отговор от страна на миокарда към хипертрофията (Breisch и съавт. 1985; Rakusan и Poupa 1963; Rakusan и съавт. 1967; Lund и Tomanek 1978; Harrison и съавт. 1985). Тези данни се потвърждават и от настоящото изследване. В резултат на тази липса на неоваскуларизация, средното дифузионно разстояние (Rakusan 1984) се повишава значително.

Според наши и други литературни данни, хипертофията на камерните мускулни клетки при бозайниците е непрекъснато напредващ процес, който продължава през целия живот на животното (Sachs и съавт. 1977; Frenzel и Feimann 1984; Schmucker и Sachs 1985). Тъй като продължителността на живота на повечето гризачи достига до или надхвърля 2 години, анализът само на избрани групи в по-млада възраст, може да заличи потенциално важни промени, настъпващи със стареенето, които вероятно се случват едновременно с хипертрофията (Imamura 1978; Rakusan и съавт. 1984; Kawamura и съавт. 1976). Engelmann и съавтори (1987) анализират хипертрофията на сърцето в нейното начално развитие, пълното ѝ оформяне като морфологичен

белег и напредването ѝ, като оценяват морфометричните изменения в субепикардните и средните области на свободната стена на лявата камера. Техните резултати показват, че в субепикардните и средните области, най-напред се наблюдава фокална некроза, която се манифестира най-рано на шестия месец при SHR.

По време на началното развитие на сърдечна хипертрофия при SHR и нормотензивни плъхове (едно- до шестмесечни), капилярната плътност значително намалява поради увеличаване на напречното сечение на кардиомиоцитите (Engelmann и съавт. 1987). Нашите данни показват сходни резултати. Именно различията в напречното сечение, а не клетъчната дължина, са най-точният показател за хипертрофични вариации в размера на кардиомиоцитите (Gerdes и съавт. 1986). Намаляването на капилярната плътност показва, че компенсаторната неоваскуларизация не се осъществява през този период или най-малкото не е достатъчна за поддържане на нормален съдов профил в SHR. Anversa и съавтори (1984) описват различни структурни компенсаторни механизми при SHR на възраст под 2 месеца. През този период капилярната пролиферация при SHR надвишава тази при нормотензивните плъхове, макар че капилярната плътност остава непроменена. Това показва, че недостигът на капиляри, отчетен при шестмесечен SHR, натъпва след втория месец, тъй като Tomanek и Hovanec (1981) докладват, че на възраст 2, 5 и 7 месеца, SHR имат намалена капилярна плътност. Недостигът на реваскуларизацията по време на ремоделирането на камерите при SHR при развитието на сърдечна хипертрофия, може да доведе до понижаване на помпената функция и до некроза на камерите, която се наблюдава в напреднала възраст (Pfeffer и съавт. 1979). Получените в настоящата работа данни за периода 1-6 месеца при нормотензивни Wistar плъхове и млади SHR показват намаляване на гъстотата на капилярите, което е по-изразено в групата на SHR.

По време на пълното развитие на хипертрофията (6-12 месеца), дебелината на стената на лява камера при SHR остава постоянна, но напречното сечение на кардиомиоцитите продължава да нараства. При нормотензивни плъхове дебелината на стената на лява камера нараства, без съществено увеличение на напречното сечение (Engelmann и съавт. 1987). Тези данни се потвърждават и от резултатите в настоящата работа, като се наблюдава незначително нарастване на дебелината на

стената, корелиращо с увеличаване на площта на напречното сечение на кардиомиоцитите, както при лява, така и при дясна камера. В същия период изследваната при Wistar плъхове за гъстота на капилярите показва сходна степен на намаляване в двете камери. Частта от лява камера, заета от кардиомиоцити при SHR остава значително повишена, а количеството на интерстициалната тъкан е значително понижено. През същия период, при нормотензивни Wistar плъхове сърдечните мускулни клетки заемат значително по-малка част от левокамерната стена, а частта от стената, изградена от интерстициална тъкан, значително се увеличава. Както се вижда и през фазата на развитие на хипертрофията, увеличеното напречно сечение на мускулните влакна при SHR надвишава наличната неоваскуларизация и утежнява вече настъпилата съдова недостатъчност.

С напредване на хипертрофията (12-18 месеца), кръвното налягане при SHR достига постоянна стойност (плато), но дебелината на стената на лява камера и напречното сечение на сърдечните мускулни клетки продължават да нарастват (Engelmann и съавт. 1987). Този период на хипертрофия вероятно представлява вторична фаза на камерен растеж, която е свързана както с мускулни, така и с други клетъчни типове и свързания с тях екстрацелуларен матрикс (Ingwall и Fossel 1983; Caulfield 1983). Тъй като напречното сечение на кардиомиоцитите при SHR не се понижава през този период, морфометричният анализ показва, че по-малката част, заета от мускулни влакна, вероятно означава намаляване на гъстотата на клетките за сметка на по-голяма тъканна маса, заета от интерстициум. Биохимичният анализ на SHR отразява увеличено съдържание на колаген в камерите с напредване на възрастта (Gilligan и Spector 1984).

По време на крайната фаза на хипертрофията (18-24 месеца) камерият миокард показва морфологични и морфометрични характеристики на дегенерация. Въпреки че миокардът при нормотензивните плъхове показва някои клетъчни характеристики на възрастова дегенерация, в миокардът при SHR се наблюдават манифестни изменения в архитектониката. При SHR свободната стена на лява камера изтънява значително, а напречното сечение на мускулните влакна остава относително постоянно. Тези резултати показват, че изтъняването на стената на лявата камера е резултат както от загубата на кардиомиоцити, така и от образуването на фиброзни цикатрикси в

инфарцираните зони (Engelmann и съавт. 1984). Olivetti и съавтори (1986) също съобщават за загуба на сърдечни мускулни клетки в лява камера на нормотензивни плъхове с напредване на възрастта (Olivetti и съавт. 1986). Pfeffer и съавтори показват повишаването на фиброзиралата тъкан в лява камера при SHR с напредване на възрастта, като близо 50% от свободната стена е фиброзирала на възраст 90 седмици (Pfeffer и съавт. 1979).

Данните от проучвания на Anversa и съавтори (1990) показват, че с напредване на възрастта се наблюдава значителна загуба на мускулни влакна в двете камери. Сравнителният анализ на гъстотата на кардиомиоцитите в настоящата работа също потвърждават възрастово обусловената загуба на сърдечни мускулни клетки. Степента на изразеност на този феномен е почти идентична и в двете камери, но той персистира по-дълго в лявата половина на сърцето. За периода 4-12 месец е отчетено 19% намаляване на общия брой кардиомиоцити в двете камери (Anversa и съавт. 1990). В последващи възрастови интервали се откриват сходни понижения в лявата камера, докато в дясната камера първоначалната загуба претърпява цялосто обратно развитите до двадесетия месец. Това доказва, че загубата на функционална мускулна тъкан в хода на процеса на стареене предхожда настъпването на камерна дисфункция. Изследванията на Anversa и съавтори (1990) подкрепят тезата, че сходен феномен се наблюдава и в човешки сърца. На структурно ниво се установява намаляване на капилярната плътност в стареещия миокард (Rakusan и Poupa 1964; Tomanek 1970; Yin и съавт. 1982). Пониженатa капилярна плътност води до редуциране на ендотелната повърхност, участваща в кислородния обмен и до увеличаване на средното дифузионно разстояние на кислороден транспорт към кардиомиоцитите. Тези характеристики на капилярите с оглед на нарушаването на коронарния кръвен ток и неговата хемодинамика представляват главните фактори, водещи до загуба на клетки и натрупване на колаген.

Добре известно е, че с прекратяване на миоцитната пролиферация в процеса на постнатално развитите, както физиологичният, така и индуцираният растеж на миокарда се дължи главно на хипертрофия на сърдечните мускулни клетки (Korecky и Rakusan 1978). Този факт се потвърждава и от нашите морфометрични данни за гъстота на кардиомиоцитите. Други проучвания показват, че кардиомиоцитите от

предсърдия (Oberpriller и съавт. 1983) и камери (Olivetti и съавт. 1987; Anversa и съавт. 1990) могат да бъдат стимулирани, посредством индуциране на ядрена хиперплазия. Сведения в литературата подкрепят хипотезата, че ядрената хиперплазия отразява сходно увеличение и в броя на клетките (Olivetti и съавт. 1987; Olivetti и съавт. 1988). Този механизъм вероятно играе роля във възрастния миокард с цел запазване на помпената функция при настъпване на сърдечна недостатъчност и представлява последния отговор на миокарда преди настъпване на камерна дисфункция и смърт (Anversa и съавт. 1990). Според наши данни именно ядрената хиперплазия, отразена с показателя площ на напречното сечение на ядрото, е най-манифестна между 6-12 месец от постнаталното развитие, което подкрепя горната хипотеза. Сравнителният анализ в настоящето проучване дори показва, че ядрената хиперплазия при нормотензивни дванадесетмесечни Wistar плъхове е съизмерима с тази на шестмесечни SHR. Тези данни индиректно подкрепят факта, че това е един от последните начини за запазване на помпената функция на миокарда, преди настъпване на нарушения на помпената му функция.

Измерването на гъстотата на капилярите представлява метод за статистически значима оценка на капилярния растеж. Повишаването на този параметър, с оглед на нарастването на миокарда, недвусмислено показва капилярна пролиферация, тъй като такава промяна може да е резултат само от прибавяне на нови капилярни единици на квадратен милиметър тъкан. Хипертрофията на кардиомиоцитите води до латерално изместване на съседните им капиляри, израз на което е и увеличаването на площта на напречното сечение на сърдечните мускулни клетки (Anversa и съавт. 1984). Например, увеличаване на напречното сечение с 50% води до намаляване на гъстотата на капилярите до 2/3 от първоначалната стойност. Сходна корелация е отразена и в настоящето проучване. Резултатите на Anversa и съавтори (1984) при SHR показват, че гъстотата на капилярите на практика не се променя в хода на изследването. Сходни данни се получават и от групите с контролни животни (нормотензивни WKY плъхове). Нашите сравнителни данни не потвърждават и подкрепят посочените. Тези резултати от измерванията на гъстотата на капилярите показват, че се наблюдава капилярна пролиферация и в двете групи плъхове, тъй като с напредване на възрастта се наблюдава значително увеличаване на диаметъра и

напречното сечение на кардиомиоцитите. Тези данни обаче не дават оценка на степента на капилярен растеж.

В литературата не се откриват данни относно показателите напречно сечение на ядрото и ядрено-цитоплазмено отношение. Това са два морфометрични показателя, които дават обща представа за възрастово обусловените хипертрофични изменения на сърдечните мускулни клетки. Освен това те дават сравнително точна представа и за измененията на кардиомиоцитите в резултат на повишено следнатоварване на камерите (както е при хипертония). Резултите от настоящото проучване демонстрират, че темповете на растеж на ядрата следват по аналогичен начин темповете на растеж на кардиомиоцитите както при лява, така и при дясна камера. Идентична е динамиката както при възрастовите групи на нормотензивните Wistar плъхове, така и при SHR.

Промените в показателя ядрено-цитоплазмено отношение имат сравнително равномерен ход, тъй като площта на ядрата и на кардиомиоцитите равномерно нарастват. Забелязва се, че динамиката на показателя не е така добре изразена, както би се очаквало. Най-вероятната причина за това е, че с напредването на възрастта, както е отразено в горепосочените литературни данни, в резултат на развитието на хипертрофия на кардиомиоцитите, количеството на двуядрени клетки нараства. Освен това се увеличава и обемът на сърдечната мускулна клетка, а при изчисляването на показателя ядрено-цитоплазмено отношение не се взема предвид обемът на клетката. Въпреки това ядрено-цитоплазменото отношение показва известна тенденция към нарастване на кардиомиоцитите.

От проведеното изследване и събрани количествени данни, разгледани цялостно и проследени в динамика, се демонстрира сравнително детайлна и подробна оценка на промените на миокарда и кардиомицитите на лява и дясна камера свързани както с възрастово зависимата хипертрофия, така и с тази, предизвикана от хипертония.

2. Стареене на миокарда и кардиомиоцитите. Възможностти за ремоделиране на сърдечната стена и характеристика на развиващата се реактивна фиброза

Според наши резултати и данни в литературата (Lakatta и Levy 2003; Kitzman и съавт. 2001) стареенето на миокарда е свързано с лефокамерна хипертрофия и фиброза. С напредване на възрастта се нарушава нормалното изпълване на лявата камера и репаративните механизми, което води до усилено ремоделиране и влошаване на функционалния капацитет (Biernacka и Frangogiannis 2011). Възрастово обусловеното постепенно натрупване на колаген в стените на съдовете, интерстициума и периваскуларното пространство, което се демонстрира в настоящето проучване при различни възрастови групи нормотензивни Wistar плъхове и SHR, се потвърждава и от проучванята на Lakatta и Levy (2003) и води до понижаване на миокардния комплайънс. Подобни изследвания върху животински модели, основно SHR, се откриват и в проучванията на Mukherjee и Sen (1990). Терминът реактивна интерстициална фиброза се използва за описване на нарастването на интерстициалното пространство в миокарда без да е налице значителна загуба на сърдечни мускулни клетки; за ралика от това, терминът репаративна фиброза се отнася за формирането на цикатрикс след прекаран миокарден инфаркт (Weber 1989; Anderson и съавт. 1979). В хода на развитие на фиброзата се наблюдава повишено отлагане на колаген в пери- и ендомизиума, което води до интерстициална фиброза, а отлагането на колаген в адвентицията на интрамуралните коронарни артериоли води до периваскуларна фиброза (Biernacka и Frangogiannis 2011). Тези данни се подкрепят и от настоящото изследване. В моделите на SHR повишеното следнатоваране на лява камера предизвиква развитие на реактивна интерстициална фиброза, която в началото прогресира без загуба на кардиомиоцити. Тази начална реактивна фиброза протича едновременно с процес на мускулна хипертрофия и е част от адаптивен отговор, насочен към запазване на функционалния капацитет на миокарда. В по-късен етап се установява репаративна фиброза, тъй като в голяма част от кардиомиоцитите се развиват процеси на некроза и апоптоза (Isoyama и Nitta-Komatsubara 2002). В отговор на сигнали от загиващите кардиомиоцити, интерстициалните фибробласти синтезират по-голямо количество екстрацелуларен матрикс, което да замести увредените и загиващи клетки (Biernacka и Frangogiannis 2011).

Дори и при здрави Wistar плъхове, процесът на стареене е свързан с промени на анатомията на миокарда. Въпреки намаляването на общия брой кардиомиоцити, в стареещия миокард се установява прогресивно повишаване на масата на лявата камера (Olivetti и съавт. 1991). Нашите данни за намаляване на гъстотата на кардиомиоцитите и нарастване на дебелината на стената на камерата подкрепят резултатите на Olivetti и сътрудници (1991). Възрастово обусловеното ремоделиране на миокарда е свързано с кардиомиоцитна хипертрофия и интерстициална фиброза. В норма, сноповете от кардиомиоцити и отделните клетки са обвити от тънки слоеве пери- и ендомизиум. В стареещия миокард се наблюдава хипертрофия на кардиомиоцитите, трансформиране на фибробластите в миофибробласти и натрупване на протеини от екстрацелуларния матрикс в интерстициума. Моделите на SHR предоставят доказателства за хипертрофия на кардиомиоцитите, съвместно с повишаване на съдържанието на миокардния колаген.

Съдържанието на колагена се увеличава с напредването на възрастта; колагеновите влакна в ендо- и перимизиума на възрастните животни са по-дебели (Biernacka и Frangogiannis 2011). Резултатите от настоящото проучване при мъжки SHR на възраст 1 и 6 месеца, показващи по-интензивно оцветяване на колагенните влакна периваскуларно, в интерстициалното пространство, ендо- и перимизиума при зрелите животни, както и прорастване на фиброзни повлекла от периваскуларното към интерстициалното пространство, подкрепят горепосочените литературни данни. Освен това, наблюдаваните колагенни влакна при възрастните плъхове са по-дебели, по-дълги и спираловидно усукани в сравнение с младите. Данни в литературата показват, че повишената синтеза на колаген може би не е основната причина за фиброзата в стареещия миокард, за разлика от моделите на SHR, където експресията на колаген е значително повишена. Mays и съавтори (1991) установяват, че около 20% от колагена в миокарда на едномесечни нормотензивни плъхове се синтезира наново всеки ден. Нивото на синтеза остава високо и при плъхове на възраст 15 месеца и се понижава драстично до 2% на ден при животни на възраст 24 месеца.

Промените, свързани с процеса на стареене, трудно се разграничават от тези, дължащи се на заболявания при възрастни животни, най-вече хипертония, която е проучвана в модели от различни възрасти SHR. Данни в литературата сочат, че при възрастни

нормотензивни плъхове се наблюдава възрастово обусловено повишаване на количеството фиброза в дясната половина на сърцето (Burkauskiene и съавт. 2006). В друго проучване се установява фиброза и натрупване на мастна тъкан във възбудно-проводната система на сърцето (Song и съавт. 1999). Изследване на Klima и съавтори (1990) показва повишена фиброза, особено изразена в свободната стена на лявата камера. Нашите резултати от направеното оцветяване по Малори във всички групи нормотензивни Wistar плъхове показват увеличаване на количеството на колаген с напредване на възрастта както в лява, така и в дясна камера. В групите с възрастни Wistar плъхове се наблюдава отчетлива разлика в интензитета на оцветяване, между препаратите от лява и дясна камера. Сравняване на млади и възрастни SHR показва увеличаване на площта на напречното сечение на сърдечните мускулни клетки, особено от лява камера и по-слабо нарастване на площа на ядрата (Unverferth и съавт. 1986). Докато при SHR се устновява повишено отлагане на колаген в резултат на репаративна фиброза, при нормотензивните възрастни плъхове повишените нива на интерстициален колаген се дължат на пониженото му разграждане (Besse и съавт. 1994; Robert и съавт. 1997).

В заключение, стареенето на миокарда е динамичен процес, който се характеризира с хипертрофия на кардиомиоцитите, израз на което са повишеното напречно сечение на кардиомиоцитите и пониженатa капилярна плътност. При нормотензивни плъхове, както и при SHR, факторите, водещи до стареене и увреда на миокарда предизвикват повишено отлагане на колаген. С оглед на особеностите от функционална гледна точка на лява и дясна камера (по-изразения ефект на следнатоварването върху лява камера), в лявата камера процесите имат по-динамичен характер и по-рано настъпва реактивна фиброза. В дясната камера процесите имат сравнително плавен ход.

3. Азотен оксид и невронална азотен оксид-синтаза в нормални и хипертрофични кардиомиоцити

Стареенето и високото артериално налягане значително повлияват сърдечно-съдовата система както морфологично, така и функционално. Азотният оксид (NO) играе съществена роля в сърдечната функция, поради което множество проучвания се фокусират върху синтезата, освобождаването и бионаличността му при хипертония. Данни в литературата показват, че способността да се произвежда NO при SHR, оценена на базата на експресията или активността на ензима азотен окисид-синтаза (NOS), се повишава в камерните кардиомиоцити (Llorens и съавт. 2005; Nava и съавт. 1995; Hayakawa и Raij 1997). По принцип, повечето автори приемат, че при спонтанна хипертония се наблюдава индуцирано повишаване на количеството NO (Nava и съавт. 1998; Maffei и съавт. 2002; Fernandez и съавт. 2003), макар че по-ранни проучвания считат, че NO се произвежда и освобождава в по-малки количества при хипертензия, отколкото при нормотензия (Lüscher и съавт. 1992). Сходни са и сведенията за възрастни индивиди, като повечето изследвания показват, че стареенето се свързва с понижено производство на NO.

В своите изследвания, Llorens и съавтори (2005) установяват, че активността на калций-зависимата nNOS значително се повишава при възрастни нормотензивни плъхове, за разлика от млади. Други проучвания при 15-месечни плъхове, които се считат за възрастни, не откриват промени в активността на nNOS в лява камера (Piech и съавт. 2003). Llorens и съавтори (2005) установяват, че индуцирано повишаване на активността на nNOS се наблюдава и при SHR. Имунохистохимичното изследване за nNOS в настоящата работа установи увеличаване на експресията на ензима с напредване на възрастта както при нормотензивните Wistar плъхове, така и при SHR, като в съответстващи по възраст представители на двете групи, активността е по-изразена при SHR. Тези промени бяха наблюдавани в свободната стена както от лява, така и от дясна камера. Освен това, според данните на Strijdom и съавтори (2009), NO стимулира растежа и пролиферацията на кардиомиоцитите по време на феталния и ранния постнатален период. В съответствие с тези данни, при двуседмични нормотензивни Wistar плъхове, ние установихме по-висока степен на експресия на nNOS по цялата дебелина на миокардната стена, с неравномерно разпределение. По-изразена имунореактивност беше отчетена в субепикардните и

субендокардните слоеве както в лява, така и в дясна камера. Освен това, беше наблюдавано хомогенно разпределение на активността на ензима в цитоплазмата на надлъжен и напречен срез. Резултатите на Llorens и сътрудници (2005) показват много ниска активност на калций-независимата NOS, сходна във всички изследвани групи. Откритието, че се повишава активността само на калций-зависимата изоформа на ензима показва, че NO, синтезиран от този ензим, вероятно играе ключова роля във функцията на стареещото сърце.

При хипертрофия, миокардът е подложен на възстановителни процеси, за да се оздравят исхемичните зони и да се ремоделира останалата витална тъкан така, че да се приспособи към хемодинамичния стрес, дължащ се на загубата на функционална мускулна тъкан (Knoll и съавт. 2011). Въпреки големия брой проучвания през последните години, точната роля, която играе nNOS в отговор на хемодинамичния стрес и последващото ремоделиране, все още е обект на дискусии. Съществуват данни за повишена експресия и активност на nNOS след индуциране на сърдечна хипертрофия при хипертензивни плъхове, което е свързано и с транслокацията на ензима към сарколемата, посредством взаимодействие с кавеолин 3 (Bendall и съавт. 2004). Сходни резултати бяха отчетени и при нашите резултати, които показаха по-интензивна реактивност на ензима nNOS по периферията на кардиомиоцитите. Manoury и съавтори (2012) прилагат фармакологично инхибиране на nNOS, което подобрява миокардния контрактилитет при сърца. Повишена експресия и активност на ензима се наблюдават и в крайния стадий на хипертонична болест на сърцето при плъхове с миокардна хипертрофия, докато нивата на eNOS намаляват (Damy и съавт. 2004). Това повдига въпроса дали индуцираното повишаване на нивата на nNOS е свързано с адаптивен или увреждащ механизъм.

В своето изследване, Piech и съавтори (2003) проучват промените в наличността на nNOS при развитие на хипертрофия в модел на SHR, сравнен с нормотензивни плъхове на същата възраст. Те установяват, че промените в експресията на nNOS не корелират стриктно с възрастовите изменения на миокарда. Нашите резултати показаха възрастово обусловена динамика в експресията на nNOS при групите плъхове. Те съобщават и за значително повишаване на nNOS в лява камера от по-възрастни SHR в сравнение с отговарящи по възраст нормотензивни плъхове (Piech и съавт. 2003). При млади SHR, наличността на nNOS

може да бъде повишена (Nava и съавт. 1998) или понижена (Crabos и съавт. 1997). Противно на това, Bayraktutan и съавтори (1998) съобщават за селективно понижаване на нивата на nNOS в кардиомиоцити от лява камера, изолирани от тримесечни SHR. Имайки предвид увеличените размери на сърдечните мускулни клетки, както и пониженатa капилярна плътност, тези данни отговарят на резултатите на Piech и съавтори (2003), които установяват значително понижение на наличността на nNOS при петмесечни SHR, сравнени с отговарящи им по възраст нормотензивни плъхове. При петмесечните SHR се наблюдава намаляване на количеството на eNOS в лявата камера, което не е отразено от намаляване на общото количество калций-зависима NOS (Piech и съавт. 2003). Възможно обяснение на тази аномалия е компенсаторно повишаване на другата калций-зависима NOS – nNOS (Piech и съавт. 2003). Това е и едно от първите проучвания, показващи повишена експресия на nNOS при хипертрофия без сърдечна недостатъчност при SHR. Резултатите от настоящото проучване подкрепят и потвърждават изложените по-горе литературни данни.

В кардиомиоцити, изолирани от сърца, подложени на повишено следнатоварване, се отчита индуцирано повишаване на нивата на nNOS (Massion и съавт. 2003). Експресията и активността на ензима се покачват и при експериментален модел на миокарден инфаркт в плъхове (Damy и съавт. 2003; Bendall и съавт. 2004) и модел на сърдечна недостатъчност при човешки сърца (Damy и съавт. 2004) и SHR (Piech и съавт. 2002). При нормални физиологични условия, nNOS се открива по мембраните на саркоплазмения ретикулум. Проучване на Damy и сътрудници (2003) показва, че при патологични условия, nNOS може да се дислоцира от саркоплазмения ретикулум към сарколемата, което се показва чрез ко-оцветяване на nNOS със сарколемния маркер винкулин в модел на плъх с миокарден инфаркт. В настоящето проучване, с напредване на възрастта на нормотензивните Wistar плъхове и при SHR беше установена интензивна експресия на ензима предимно по периферията на кардиомиоцитите, което, в съответствие с посочените литературни данни за локализацията на ензима, може да се интерпретира като разположение на ензима под сарколемата (хиполемално). Процесът на модификация на nNOS по отношение на транслокацията между различните клетъчни домени не е напълно проучена. Въпреки че не съществуват данни за експресия на nNOS в кавеолите на

кардиомиоцитните мембрани, тази локализация е документирана при кардиомиоцити на лява камера при патологични условия (Damy и съавт. 2004). Проучванията показват, че транслокацията на nNOS се медиира предимно чрез модифициране на свързващия протеинен домен, отколкото модифициране на самата nNOS.

Наблюдават се регионални различия по отношение на експресията на nNOS (Brahmajothi и Campbell 1999). Базалната експресия на nNOS в камери от пор е по-висока в ендокарда, отколкото в епикарда, докато експресията на eNOS по-висока в епикарда на лява камера (Brahmajothi и Campbell 1999). В настоящото проучване върху нормотензивни Wistar плъхове и SHR при възрастовите групи между 1 и 12 месеца беше наблюдавана силно положителна експресия на nNOS предимно в средния слой на миокарда. Едва видима остана активността в субепикардния и субендокардния участък. Физиологичното значение на тези регионални различия не е проучено към момента. Изглежда има вариации и в експресията на отделните изоформи на NOS в различни тъкани. Miethke и съавтори (2003) отбелязват по-голямо количество РНК на nNOS в предсърдията в сравнение с камерите. Техните по-задълбочени изследвания разкриват наличие на nNOS в предсърдията и на eNOS в стените на двете камери. Локализацията на активността на НАДФ-диафораза и nNOS имунохистохимия показва наличие на nNOS в областта на сарколемата на субпопулация от предсърдни кардиомиоцити, но не и в работните и проводящите кардиомиоцити на предсърдията и камерите.

В литературата не се откриват данни за сравнение относно експресията на nNOS в миокарда и кардиомиоцитите, както и разпределението на активността на ензима в различните части на сърдечната стена на дясна камера. Ние за пръв път установихме, че експресията на nNOS в стената на дясна камера при двуседмични Wistar плъхове е идентична с тази от лявата камера. При останалите възрастови групи активността на ензима беше локализирана в субендокардните и субепикардните слоеве на миокарда от дясната камера, докато в средния слой наблюдаваната реакция за nNOS беше отчетена като липсваща. С напредването на възрастта се установи леко и плавно засилване на активността на ензима в съответните слоеве на миокарда от дясна камера. При млади и възрастни SHR беше отчетено сходно

разпределение на имунореактивността, със слабо повишена активност в сравнение с отговарящите им по възраст нормотензивни Wistar плъхове.

Както при хора, така и при плъхове хипертоничната болест на сърцето се асоциира както с повишаване (Fukuchi и съавт. 1998; Stein и съавт. 1998), така и с понижаване (Damy и съавт. 2004) на експресията и активността на миокардната nNOS, което показва, че вариации в лечението и стадия на заболяването могат да повлияят модулирането на конститутивните изоформи на NOS в миокарда на лява камера. Важната роля на NO, синтезиран от nNOS, предотвратява патологичното ремоделиране, като се предполага, че аналогичен ефект се наблюдава и по време на развиващата се реактивна фиброза в резултат на процеса на стареене на миокарда (Rastaldo и съавт. 2007). Тези данни се потвърждават и от данните в настоящето изследване. Проучванията на различни автори показват, че индуцираното повишаване на nNOS може да има протективен ефект, тъй като инхибирането на nNOS задълбочава левокамерната хипертрофия и дисфункция (Song и съавт. 2001б; Damy и съавт. 2003). Тези данни корелират и с нашите резултати от имунохистохимичния анализ на nNOS в SHR, който показва по-висока експресия на ензима в миокарда на SHR, в сравнение с отговарящи им по възраст нормотензивни плъхове.

В литературата се наблюдава подновен интерес към възможността конститутивната продукция на NO в миокарда да играе ключова роля във физиологичната регулация на сърдечната функция и възбудимост. Важна цел на бъдещи проучвания ще бъде изследването на това каква част от натрупаните познания се отнасят за човешката физиология и за разбирането и лечението на общите патологични процеси. Едва след като е получен отговор на всички въпроси, nNOS може да се счита за терапевтичен таргет при сърдечно-съдови заболявания.

VI. Изводи

Въз основа на настоящите резултати, съпоставени с литературните данни, могат да се направят следните изводи в отговор на поставените задачи:

1. Ремоделирането на миокарда по време на постналталния период на развитие е свързано със специфични промени в морфологията на кардиомиоцитите, развитие на фиброза, както и с характерна динамика в локализацията на nNOS.

2. Морфологичните промени в свободната стена на лява камера са по-интензивни и динамични, отколкото в стената на дясна камера. При това тези промени са по-изразени при SHR, отколкото при съответстващите им по възраст нормотензивни Wistar плъхове.

3. През постналталния период на развитите се наблюдава нарастване на напречното сечение на кардиомиоцитите, като съществува ясно установима разлика между сърдечните мускулни клетки в стената на лява и дясна камера

4. Абсолютните средни стойности на напречното сечение на кардиомиоцитите в стената на лява и дясна камера при SHR са по-големи от тези в лява и дясна камера при отговарящи им по възраст Wistar плъхове.

5. Наблюдава се възрастово зависима ядрена хипертрофия, най-интензивно изразена при зрелите (6 месеца) SHR и възрастни (12 месеца) Wistar плъхове.

6. С напредване на възрастта при нормотензивните Wistar плъхове и SHR се наблюдава повишено натрупване на колагенни влакна в стените на съдовете, периваскуларно и в интерстициума. По-силно изразени са тези промени при SHR.

7. Експресията на nNOS в сърдечната стена нараства с напредване на възрастта при всички изследвани групи плъхове, като имунореактивността е по-изразена при SHR.

8. Имуноекспресията на nNOS в сърдечната стена при двуседмични нормотензивни Wistar плъхове се установява по цялата дебелина на сърдечната стена с по-отчетлива реакция в субепикардните и субендокардните слоеве както в лявата, така и в дясната камера. Имунохистохимичната реакция за nNOS показа хомогенно разпределение на ензима в сърдечните мускулни клетки. При останалите групи плъхове имуноекспресията на nNOS се локализира предимно в средните слоеве на стената на лява камера и в субепикардните и субендокардните слоеве на стената на дясна камера, като реакцията е най-интензивна по периферията на кардиомиоцитите.

VII. Приноси

VII.1. Научни приноси с оригинален характер

1. Направен е подробен сравнителен анализ на nNOS имунореактивността в сърдечни мускулни клетки от лява и дясна камера при нормотензивни Wistar плъхове и сравними по възраст SHR.

2. За първи път в литературата са представени различия в имуноекспресията на nNOS в отделните слоеве от стената на дясна камера при нормотензивни Wistar плъхове и сравними по възраст SHR.

VII.2. Научни приноси с потвърдителен характер

1. Проведено е комплексно проучване върху качествените и количествените характеристики на миокарда и кардиомиоцитите в стената на лява и дясна камера при Wistar плъхове в постнаталния период от развитието.

2. Изготвен е детайлен сравнителен анализ на качествените и количествените характеристики на миокарда и сърдечните мускулни клетки при съпоставими по възраст групи нормотензивни Wistar плъхове и SHR.

3. Представена е експресията на nNOS в кардиомиоцити от различните слоеве на стената на лява и дясна камера при нормотензивни Wistar плъхове в постнаталния период от развитието.

VIII. Публикации по дисертационния труд

1. **Iliev A**, Jelev L, Landzhov B, Kotov G, Hinova-Palova D, Ovtscharoff W (2016) Postnatal changes in the myocardium of the rat. A comparative light microscopic and immunohistochemical study. Comptes rendus de l'Académie bulgare des Sciences (in press)

Impact Factor – 0,284

2. **Илиев А**, Желев Л, Ланджов Б, Котов Г, Палов А, Хинова-Палова Д (2015) Роля на невроналната азотен-оксид синтаза за нормалните физиологични функции на сърцето. Списание MD, Брой 6, стр. 106-109.

3. **Илиев А**, Желев Л, Ланджов Б, Котов Г, Хинова-Палова Д, Палов А (2016) Роля на невроналната азотен оксид-синтаза в сърдечната патология. MEDICAL Magazine (под печат)