

**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***

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.

## **Съдържание:**

<b>I. Въведение.....</b>	<b>1</b>
<b>II. Литературен обзор.....</b>	<b>3</b>
1. Нормална морфология на миокарда – основният функционален слой на сърцето.....	3
2. Произход и развитие на миокарда.....	9
3. Нормална морфология на сърдечните мускулни клетки.....	14
4. Количествени характеристики на сърдечната стена и на кардиомиоцитите.....	20
5. Азотен оксид (NO) и азотен оксид-синтаза (Nitric oxide synthase, NOS).....	23
5.1 Роля на азотния оксид и механизъм на синтез.....	23
5.2 nNOS – експресия и локализация.....	29
5.3 Ефекти на nNOS в кардиомиоцита.....	34
5.4 Регулация на активността на nNOS.....	35
<b>III. Цел и задачи.....</b>	<b>38</b>
<b>IV. Материал и методи.....</b>	<b>39</b>
1. Експериментални животни.....	39
2. Вземане и фиксиране на хистологичния материал.....	40
3. Изготвяне на парафинови тъканни срези.....	41
4. Оцветяване с хематоксилин и еозин.....	42
5. Оцветяване по метода на Малори.....	43
6. Методика на имунохистохимичната процедура.....	44
7. Микроскопиране и анализ на получените данни.....	47
<b>V. Собствени резултати.....</b>	<b>49</b>
1. Възможности на хистологичните техники за получаване на препарати от свободната стена на лява и дясна камера на плъх.....	49
2. Качествени характеристики на миокарда и кардиомиоцитите през различни етапи от постнаталното развитие при нормотензивни Wistar плъхове и SHR.....	52
3. Количествени характеристики на миокарда и кардиомиоцитите през различни етапи от постнаталното развитие при Wistar плъхове.....	76
4. Сравнителна характеристика на миокарда и кардиомиоцитите през различни етапи от постнаталното развитие при нормотензивни Wistar плъхове и SHR.....	84
<b>VI. Обсъждане.....</b>	<b>94</b>
1. Характеристика на миокарда на лява и дясна камера и кардиомиоцитите при нормотензивни Wistar плъхове и SHR.....	94
2. Стареене на миокарда и кардиомиоцитите. Възможности за ремоделиране на сърдечната стена и характеристика на развиващата се реактивна фиброза.....	113
3. Азотен оксид и невронална азотен оксид-синтаза в нормални и хипертрофични кардиомиоцити.....	120
4. Роля на невроналната азотен оксид-синтаза (nNOS) в процеса на стареене на миокарда и в различни модели на сърдечни заболявания.....	132
<b>VII. Изводи.....</b>	<b>136</b>
<b>VIII. Приноси.....</b>	<b>138</b>
<b>IX. Публикации по дисертационния труд.....</b>	<b>139</b>
<b>X. Библиография.....</b>	<b>140</b>

## ***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+Н<sup>+</sup>** – никотинамид-динуклеотид-фосфат (редуциран)

**ФАД** – флавин-аденин-динуклеотид

**ФМН** – флавинмононуклеотид

**ХЕ** – хематоксилин и еозин

**цГМФ** – цикличен гуанозин монофосфат

**АВС** – авидин-биотин пероксидазен комплекс

**ВН<sub>4</sub>** –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** – рианоудинови рецептори тип 2

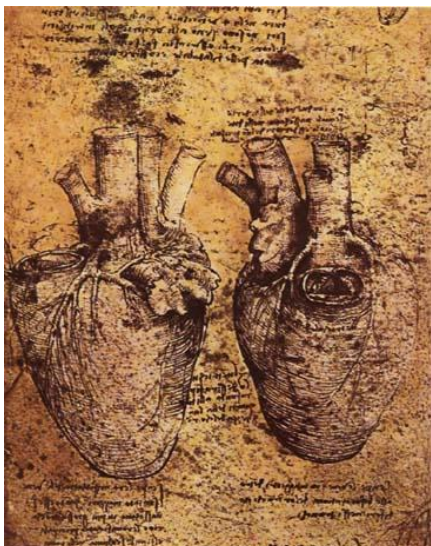
**SERCA** – (Ca-АТФ-аза) калциева аденозин трифосфатаза

**SHR** – спонтанно хипертензивни плъхове

**WKY** – плъхове от породата Wistar-Kyoto

**WR** – плъхове от породата Wistar (Вистар)

**XOR** – ксантин оксидоредуктаза



Сърце и кръвоносни съдове  
Леонардо да Винчи, XV век

## *I. Въведение*

Много въпроси по отношение на морфологията на сърдечно-съдовата система все още очакват своя отговор. В частност, пълното проучване на архитектурата 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. Откриването на ензима невронална азотен-оксид синтаза, участващ в конститутивната продукция на NO в миокарда едва през 1999 г, води до изясняване на сложната роля на този медиатор в наблюдаваните промени в сърдечната морфология при нормални и патологични условия и в различни периоди от развитието. В настоящия труд са отразени нашите усилия за доизясняване на променящата се активност на ензима в различни периоди от постнаталното развитие на плъха, както и корелацията между активността на ензима и морфометричните характеристики на кардиомиоцитите.

## ***II. Литературен обзор***

### **1. Нормална морфология на миокарда – основният функционален слой на сърцето**

Сърдечната мускулатура представлява неволеви напречно-набразден мускул, който се открива само в сърдечната стена. Това е специализирана мускулна тъкан, която, макар и в някои основни насоки сходна с гладката и скелетната мускулна тъкан, притежава уникална структура и функции, които я отличават от мускулната тъкан в други части на тялото. Както и останалите мускули, сърдечният мускул може да се съкращава, но в него може да възниква и акционен потенциал (т.е. притежава електропроводимост), както невроните, изграждащи нервната тъкан. Освен това, някои от клетките имат способността сами да генерират акционен потенциал – свойство, известно като автоматизъм на сърцето (Ward 2001).

За да работи сърцето правилно и за да има необходимите вълнови съкращения за изтласкване на кръвта, кардиомиоцитите трябва да се съкращават по сложно координиран начин. Така всяка клетка осигурява по-голяма функция за цялото тяло, което позволява на сърцето да бие равномерно, получавайки на свой ред жизненоважни хранителни вещества от тялото. Координацията на кардиомиоцитите е съществена. Ако те се съкращават на случаен принцип, сърцето не би могло да се контрахира по синхронизиран начин и да изтласква кръвта, в резултат на което тялото (и клетките му) биха загинали (Ward 2001).

Мускулатурата на сърцето се нарича миокард. Той е изграден от специализирана тъкан, състояща се от снопчета мускулни клетки, наричани миоцити. Миоцитът, или мускулното влакно, е единичната клетка на мускулната тъкан. Мускулните влакна съдържат множество миофибрили – контрактилните единици на мускула. Миофибрилите достигат от единия до другия край на клетката и представляват редуващи

се снопчета от тънки филаменти, съдържащи основно актин, и дебели филаменти, съдържащи основно протеина миозин. Както при гладката и скелетната мускулна тъкан, сърдечният мускул се съкращава на базата на покачване на нивото на калций в клетката, което позволява на актина и миозина да взаимодействат (Ward 2001).

Сходството между сърдечната и скелетната мускулна тъкан се изразява в това, че и двете изглеждат напречно набраздени, тъй като съдържат саркомери. При напречно набраздените мускули, като скелетните и сърдечния мускул, актиновите и миозиновите филаменти имат специфична, постоянна дължина от порядъка на няколко микрометра, значително по-малко от дължината на издължената мускулна клетка (няколко милиметра при човешките скелетни мускулни клетки). Филаментите са организирани в повтарящи се субединици по дължината на клетката. Тези субединици се наричат саркомери. Наличието на саркомери е това, което придава на скелетната и сърдечната мускулатура напречно набраздения вид от редуващи се тесни тъмни и светли ивици, дължащ се на паралелното подреждане на актиновите и миозиновите филаменти. Миофибрилите на гладкомускулните клетки не са подредени в саркомери. Напречно набраздените мускули (скелетни и сърдечен) се съкращават и отпускат на кратки, интензивни интервали, докато гладките мускули поддържат по-дълги или дори почти постоянни съкращения. Сърдечният мускул има много общи черти и с гладката мускулна тъкан, включително контрола от страна на вегетативната нервна система и спонтанните съкращения (автоматизъм) (Ward 2001).

Въпреки това, сърдечният мускул притежава уникални характеристики за разлика от скелетните мускули. Първо, кардиомиоцитите са значително по-къси и по-тесни от скелетните мускулни клетки, с дължина около 0,1 mm (100µm) и ширина около 0,02 mm (20µm) (Ward 2001). Освен това, докато скелетните мускулни влакна са подредени в правилни, паралелни снопчета, сърдечните мускулни влакна са разположени под разклоняващи

се, неправилни ъгли. От анатомична гледна точка, мускулните влакна са типично разклонени като клони на дърво. В допълнение, сърдечните мускулни влакна се свързват към съседните посредством интеркалатни дискове и формират структура, наподобяваща функционален синцитиум (непрекъснат клетъчен материал). Тези интеркалатни дискове, които изглеждат като неправилно разграничени тъмни ивици между миоцитите, са уникална и съществена характеристика на сърдечния мускул (Ward 2001).

Интеркалатните дискове са уникална, отличителна и важна характеристика на сърдечния мускул. Интеркалатният диск представлява вълнообразна двойна мембрана, разделяща съседните мускулни влакна. Те притежават две съществени функции. Първо, те изпълняват ролята на „лепило“, поддържащо миоцитите заедно, така че те да не се разделят при съкращението на сърцето. Второ, те осъществяват електрична връзка между клетките, което подпомага синхронизираното съкращение на сърдечната тъкан. Те лесно могат да бъдат визуализирани чрез надлъжен срез на тъканта.

В рамките на интеркалатния диск съществуват три типа мембранны свързвания: fascia adherens, macula adherens и цепковидни контакти (gap junctions) (Junqueira и съавт. 2013; Borg и съавт. 1983; Kostin и съавт. 1998; Pyle и Solaro 2004). Адхезионните контакти или fasciae adherentes служат като залавни места на актиновите филаменти, които се свързват към най-близкия саркомер (Takada и съавт. 2001; Gregorio и Antin 2000). Macula adherens предотвратява разделянето по време на съкращение, като свързва интермедиерните филаменти, които държат клетките заедно (нарича се още десмозома). Цепковидни контакти или нексуси или maculae communicantes са важни структури за йонния транспорт между съседните кардиомиоцити (Fatkin и Graham 2002). Те съдържат пори и позволяват на акционните потенциали да се разпространяват между кардиомиоцитите посредством преминаването между клетките на йони, които предизвикват

деполяризацията на сърдечната мускулатура. В този тип междуклетъчно свързване могат да участват и клетки на миокарда, които не са от мускулен произход (Junqueira и съавт. 2013; Gupta и Gupta 1997). При наблюдение под микроскоп, интеркалатните дискове са една от характеристиките на клетките на сърдечния мускул.

Кардиомиоцитите показват напречна набразденост, дължаща се на редуването на сегменти от дебели и тънки протеинови филаменти, които се залавят за сегменти, наречени Т-линии. При наблюдение под светлинен микроскоп, актиновите филаменти, като по-тънки, са причината за по-светлия изглед на I-ивиците, докато миозиновите филаменти са по-дебели и придават по-тъмния изглед на редуващите се А-ивици в сърдечния мускул. Друга хистологична разлика между сърдечната и скелетната мускулатура е наличието при първата на по-големи и по-широки Т-тубули, които навлизат към Z-дискосвете. Броят на Т-тубулите е по-малък, отколкото при скелетните мускули. Освен това, при сърдечния мускул, между Т-тубулите и саркоплазмения ретикулум се формират диади, а не триади, както при скелетните мускули.

На светлинен микроскоп, интеркалатните дискове изглеждат като тънки, обикновено тъмно оцветени линии, които разделят съседните кардиомиоцити. Интеркалатните дискове са ориентирани перпендикулярно спрямо посоката на мускулните влакна. На електронен микроскоп, посоката на интеркалатния диск изглежда много по-сложна. На малко увеличение, тя може да наподобява извита, електроннопълтна структура, насложена върху позицията на скритата Z-линия. На голямо увеличение, посоката на интеркалатния диск изглежда още по-извита и на надлъжен срез се наблюдават както надлъжни, така и напречни участъци. Наблюдават се цепковидните контакти (или нексуси), fascia adherens (наподобяваща zonula adherens) и десмозомите. На напречен срез, интеркалатният диск показва лабиринтен строеж и може да се наблюдават отделни интердигитации.

В по-голямата част от сърцето съкращението се предизвиква от възникването на акционен потенциал в даден кардиомиоцит, който се предава през цепковидните контакти на съседен кардиомиоцит. Като следствие от стимулацията на съседните клетки, през сърцето се разпространява вълна на активация и, съответно, на съкращение; резултатът от това е синхронизацията на съкращението по продължение на сърдечния мускул. Специализирани кардиомиоцити, разположени в пейсмейкърния участък на сърцето, са отговорни за инициирането на сърдечните удари (Ward 2001).

Синоатриалният възел, локализиран в пейсмейкърната област на дясното предсърдие, съдържа миоцити със специализирана функция (Ward 2001). За разлика от скелетните мускули, които се съкращават в отговор на нервна стимулация, специализираните пейсмейкърни клетки на входа на дясното предсърдие притежават свойството автоматизъм и са миогенни, т.е. могат да се самовъзбуждат без необходимостта от електричен импулс от централната нервна система. Останалата част от миокарда провежда тези акционни потенциали чрез електричните синапси, наречени цепковидни контакти.

Предсърдията и камерите са разделени от зона, която, с изключение на атриовентрикуларния възел, не провежда импулсите. Той се състои от малки миоцити, които забавят провеждането на импулса от пейсмейкъра, което позволява на предсърдията да се съкращават преди камерите (Ward 2001).

Макар че централната нервна система не създава директно импулсите, водещи до съкращението на сърцето, тя изпраща сигнали за ускоряване или забавяне на сърдечния пулс посредством вегетативната нервна система чрез два противоположни начина на модулация: симпатикова и парасимпатикова нервна система. Тъй като сърдечният мускул е миогенен, ролята на пейсмейкъра е сведена до това да модулира и координира съкращенията. Кардиомиоцитите биха се съкращавали и в отсъствието на

функциониращ пейсмейкърен синоатриален възел, но по разстроен и неефективен начин. Заслужава отбелязване и фактът, че сърцето може да бие правилно дори при пълно прекъсване на връзките му с централната нервна система (Ganong 2005).

## 2. Произход и развитие на миокарда

Първичното и вторичното сърдечно поленце, сърдечният неврален гребен и проепикардът са четирите основни ембриологични зони, участващи в процеса на развитие на сърцето при гръбначните. Всяка от тях има важен принос за цялостното развитие на сърцето и в частност на миокарда, което се осъществява под сложна регулация (Srivastava и Olson 2000). Главният източник на миокардните прогениторни клетки се намира в чифтни поленца на мезодермата в ранния ембрион, които се наричат прекардиална мезодерма, сърце-формиращи поленца или първично сърдечно поленце. Точното местоположение на прекардиалната мезодерма дълги години е било въпрос на спор. С изучаването на молекулярните и генетичните фактори на ембрионалното развитие на миокарда при плешки ембриони, е определен Nkx2.5 ген, като фактор, който предопределя съдбата на миокарда (Ehrman and Yutzey, 1999 and Schultheiss and Lassar, 1999). По-задълбочените и детайлизирани изследвания доказват, че само крайният домен на Nkx2.5 гена е отговорен за тези процеси (Redkar и съавт. 2001).

Клетките, от които ще произлезе сърцето, са едни от първите клетъчни линии, които се формират в човешкия ембрион (Hatada и Stern 1994; Yutzey и Kirby 2002). До 15-ия ден от развитието на човека се формира примитивната бразда (Sherman и съавт. 2001) и първите мезодермални клетки, които ще мигрират през нея, са тези, от които ще се развие сърцето (Garcia-Martinez и Schoenwolf 1993; Psychoyos, и Stern 1996). Тези мезодермални клетки мигрират в предна и латерална посока, формирайки билатерални първични сърдечни поленца (DeHaan 1963). Задната граница на билатералните първични сърдечни поленца достига първия сомит на латералната мезодерма от двете страни на срединната линия (Mjaatvedt и съавт. 2001; Ehrman, и Yutzey 1999).

На 18-ия ден от развитието плочката на латералната мезодерма се разделя на два слоя: соматоплеврален и спланхноплеврален (Sherman и

съавт. 2001). Именно в спланхноплевралния слой на мезодермата се намират прекурсорите на клетките на миокарда и ендокарда, в зоната на първичните сърдечни поленца, определена по-горе. Предполагаемите клетки на ендокарда се деламинират от спланхноплевралната мезодерма и срастват посредством васкулогенеза, за да формират две латерални ендокардиални тръби (Harvey и съавт. 1998).

По време на третата седмица от развитието, двата билатерални слоя миокард, заграждащи ендокардиалните тръби, се изместват към вентралната срединна линия при затварянето на вентралното първично черво чрез кранио-каудално и латерано прегъване на ембриона (Sherman и съавт. 2001). Латералните граници на слоевете на миокардната мезодерма са първите сърдечни структури, които се сливат, следвани от сливането на двете ендокардиални тръби, при което се формира една ендокардиална тръба, обградена от миокард, произхождащ от спланхноплевралната мезодерма. Последни се сливат медиалните граници на слоевете на миокардната мезодерма (Kirby 2002). По време на сливането на ендокардиалните тръби, миокардът секретира ацелуларен матрикс, формирайки по този начин сърдечния желеподобен слой, който разделя миокарда от ендокарда.

При започването на прегъването и нагъването от 22-28-ия ден епикардни клетки покриват външния слой на сърдечната тръба, което води до формирането на четири слоя на сърдечната тръба: ендокард, желеподобен слой, миокард и епикард (Sherman и съавт. 2001).

Първичната съдечна тръба се прегъва към дясната страна на ембриона и се нагъва, което позволява сливането на входящия (венозен) и изходящия (артериален) край. Този процес се осъществява преди разделянето на сърдечната тръба на четири кухини и е необходим за правилното подреждане и разделяне на зрелите сърдечни кухини.

По време на процеса на прегъване, първичната тръба значително повишава дължината си (четири до пет пъти), при което миокардът на

предсърдията се измества назад и нагоре, дорзално от формиращите се камери (Lohr и Yost 2000). По време на този процес, входящият (венозен) полюс, предсърдията и атрио-вентрикуларната зона срастват със задния участък на сдвоените първични сърдечни поленца; миокардът на проксималния изходящ тракт (конус) и дисталния изходящ тракт (трункус) се прибавят към артериалния полюс от вторичното сърдечно поленце (Kelly и съавт. 2001; Mjaatvedt и съавт. 2001).

Вторичното сърдечно поленце се намира по хода на спланхноплевралната мезодерма на мястото на прикрепяне на дорзалния мезокард (Kelly и съавт. 2001; Mjaatvedt и съавт. 2001; Waldo и съавт. 2001). По време на прегъването, клетките на вторичното сърдечно поленце претърпяват трансформация от епителни към миокардни при полюса на изходящия поток (артериален полюс) и прибавят допълнителни миокардни клетки към оформящия се изходящ тракт.

По този начин, до 28-ия ден от развитието, кухините на сърцето са разположени на мястото си и се отграничават от забележими стеснени и разширени пространства, означаващи местата на sinus venosus, общата кухина на предсърдията, атриовентрикуларната бразда, камерната кухина и conotruncus (проксимален и дистален изходящ тракт) (Sherman и съавт. 2001; Kirby 2002).

Сърдечният неврален гребен представлява екстракардиална популация от клетки (извън първичните и вторичните сърдечни поленца), която произхожда от невралната тръба в областта на първите три сомита. Тези клетки са необходими за цялостното раделяне на изходящия тракт и камерите, което завършва до деветата седмица от развитието.

Първата стъпка в разделянето на сърдечните пространства е частичното преграждане на предсърдията чрез сливане на две ембрионални прегради-septum primum и septum secundum. Преградите имат широки отвори, които позволяват прехода на кръвта отдясно наляво по време на бременността. Около 26-ия ден покривът на първичното предсърдие е притиснат в

средата от надлежащия конотрункус. В резултат на това през 28-ия ден се развива сърповидно клинообразно разрастване на тъкан от горнозадната част на предсърдието, наречено *septum primum*. През петата седмица свободният край на преградата нараства в каудална посока и разделя непълно широкия атриовентрикуларен канал между първичното предсърдие и камера на оформящите се ляво и дясно предсърдие. Оставащият отвор между тях е известен като *ostium primum*. Удължаването на преградата се съпровожда от появата на четири възглавнички (ендокардни възглавнички). Те участват в образуването на преграда (*septum medium*), която се слива със *septum primum* и се поставя началото на разделяне на общия атриовентрикуларен канал на лява и дясна част. В резултат *ostium primum* облитерира. Интересно е, че преди неговото затваряне в горния край на *septum primum* се появява нов малък отвор, известен като *ostium secundum*. Кратко време след прорастването на първичния септум от пода на дясната част на предсърдието прораства друга, но вече немембранозна мускулна преграда - *septum secundum*, която нараства в долно-задно направление, но не достига до *septum intermedium*. По този начин на пода на дясната част на предсърдието остава отвор, известен като овален отвор, *foramen ovale*. Посредством него се създава нов шънт между дясното и лявото предсърдие (Sherman и съавт. 2001).

Преграждането на общия атриовентрикуларен канал е свързано със създаване на преграда между бъдещите дясна и лява камера. В началото на петата седмица атриовентрикуларният канал е разположен предимно вляво и е разграничен от конотрункуса чрез булбовентрикуларно прорастване. В края на същата седмица този израстък се удължава и достига до основата на горната ендокардна възглавничка, с което се подпомага изместването на канала надясно. От друга страна самият канал се разширява надясно и по този начин разграничава почти симетрично двете камери. Създаването на *septum intermedium* и сливането му с булбовентрикуларния израстък, разделя общия канал на лява и дясна част в горната половина на бъдещите

лява и дясна камера. В същото време нарастването на мускулната стена на камерите в срединна посока обуславя изграждането на мускулния интервентрикуларен септум, който в средата на седмата седмица почти достига долния край на *septum intermedium*. Създаденото пространство (*foramen interventriculare*) свързва кухините на двете камери. След изграждане на преградата на сърдечния конус, съществуващия *foramen interventriculare* се стеснява значително. Неговото пълно затваряне е резултат от разрастването на долната ендокардна възглавничка към върха на интервентрикуларния мускулен септум. След пълното затваряне на отвора се образува мембранозната част на интервентрикуларната преграда (Sherman и съавт. 2001).

Въпреки че сърцето на ембриона е напълно формирано и функционално активно към единадесетата седмица от бременността то продължава да расте и зрее, като голям брой промени настъпват след раждането. По време на развитието на сърцето на плода или от момента на пълно формиране на ембриона през първия триместър на бременността до раждането, сърцето нараства предимно чрез процес на клетъчно делене (Anderson 2000; Huttenbach и съавт. 2001; Kern и съавт. 1996; Kim и съавт. 1992). До няколко седмици след раждането, водещият механизъм на растеж е клетъчна хипертрофия; с други думи съществуващите клетки се уголемяват, а не увеличават значително броя си (Anderson 2000; Huttenbach и съавт. 2001; Kern и съавт. 1996).

Разбирането на механизмите на развитие на сърцето осигурява данни за етиологията както на вродените, така и на придобитите сърдечни заболявания. Въпреки това, към момента, генетичните и молекулните механизми на тези процеси са в процес на доизясняване и охарактеризиране. (Dees и Baldwin 2002; McFadden и Olson 2002).

### 3. Нормална морфология на сърдечните мускулни клетки

Нормалната сърдечна дейност зависи от координираната активност на няколко основни типа клетки в миокарда: клетки на синоатриалния възел, за които се знае, че инициират сърдечния ритъм; клетки на Пуркиние, основен компонент на специализираните проводни пътища, по които импулсът бързо се разпространява; работни клетки на предсърдията и камерите (съкратителни кардиомиоцити), които извършват механична работа. Въпреки че принципните роли на възбудно-проводните и съкратителните клетки са доста различни, много от ултраструктурните им характеристики са идентични. Освен единично ядро, всички мускулни влакна съдържат вериги от съкратителни единици (саркомери), всички притежават митохондрии, които генерират енергия за работата на клетката и всички имат саркоплазмен (гладък ендоплазмен) ретикулум, който има значение за отпускането на клетката (Legato 1973).

В изследвания на James и сътрудници (1964; 1966) се описва популация от клетки както в синусовия, така и в атриовентрикуларния възел, която се състои от относително примитивни клетки. Те са кръгли или елипсоидни, не се разклоняват и се характеризират с относителна липса на електронно-плътна материя в цитоплазмата. С изключение на голямото, ексцентрично разположено ядро, те съдържат само малък брой дребни митохондрии и оскъдна популация от миофибрили с неравномерно разпределение и дължина едва няколко саркомера. Поради оптически празния изглед на саркоплазмата им в сравнение с другите клетки на сърцето, James ги нарича бледи („pale”) или „Р-клетки”. В повечето случаи, клетъчните мембрани контактуват една с друга рядко, в тесни зони; между тези клетки не се откриват интеркалатни дискове или други ултраструктурни специализирани свързвания (Legato 1973).

Съкратителните кардиомиоцити в предсърдията имат овална форма и по принцип не се разклоняват. Диаметърът им е около 6-8  $\mu\text{m}$ , а дължината достига приблизително 20-30  $\mu\text{m}$  (Legato 1973). Във вътрешността на

клетката се откриват плътни подредени вериги от саркомери, между които са разположени елипсовидни митохондрии със сложна система от нагънати мембрани или кристи, върху които се реализират реакциите, свързани с производството на енергия.

За разлика от клетките на камерите, мнозинството от предсърдните клетки не притежават система от инвагинации на сарколемата, които навлизат от клетъчната повърхност през цитоплазмата на мускулното влакно (известни като трансверзална тубулна система или Т-система). Отсъствието на Т-система намалява общата повърхност на мембраната в сравнение с клетките на камерите.

Системата от междуклетъчни контакти в предсърдията е уникална и се различава от тази в другите части на миокарда. Мускулатурата на предсърдията е изградена от снопчета от по две или три клетки, разположени много близо една до друга с латералните си повърхности. Междуклетъчното разстояние, в най-широката си част, достига едва 0,2-0,3  $\mu\text{m}$ . То прогресивно се стеснява до формирането на поредица от десмозоми и цепковидни контакти между съседни сарколеми – своеобразен тип къс, почти линеен и напълно хоризонтално ориентиран интеркалатен диск, който е уникален за клетките на предсърдията (Legato 1973). Срещат се и къси зони на контакти между клетките, наподобяващи стандартния интеркалатен диск, който се открива в мускулните влакна на камерите, тъй като са ориентирани перпендикулярно спрямо дългата ос на клетката и имат стъпаловидна конфигурация. Този тип контакти са по-редки от хоризонтално ориентираните свързвания. Междуклетъчните пространства са изпълнени с обилно количество колаген, в който се разполага мрежа от капилляри и нервни влакна. Така описаната подредба на междуклетъчните контакти позволява на импулса да преминава между клетките както в надлъжна, така и в напречна посока.

Клетките на камерите са най-големите в сърцето и могат да достигнат до 100  $\mu\text{m}$  на дължина. За разлика от това, средният им диаметър (10-15

μm) заема междинно положение спрямо този на малките клетки на предсърдията и този на по-широките влакна на Пуркиние.

Цялостната организация на тъканта и на системата от междуклетъчни свързвания се различава от тази на предсърдията. Мускулните влакна в камерите са много близко разположени, формират широки повлекла от разклоняващи се клетки, които по-често се свързват в надлъжна посока чрез специализираните интеркалатни дискове.

Вътрешността на камерния кардиомиоцит е изпълнена с редуващи се вериги от саркомери и митохондрии (Legato 1973). Наблюдава се добре развита T-система, чиито T-тубули се свързват с тръбички с по-малък диаметър, които имат ход, успореден на дългата ос на клетката. Така се образува т. нар. трансверзо-аксиална тубуларна система (Овчаров и Такева 2008). На нивото на саркомера, T-тубулът е интимно разположен спрямо специализирани разширения на саркоплазмения ретикулум, наречени „латерални цистерни”, формират по този начин характерните диади (Legato 1973). Диадата се състои от T-тубул, разположен от едната страна на цистерна на ретикулума (Овчаров и Такева 2008).

Клетките на Пуркиние са специализирани, бързо провеждащи влакна на мускулатурата на камерите (Sommer и Johnson 1968). Диаметърът им е 70-80 μm, което ги прави най-широките клетки в сърцето и е една от причините за бързото провеждане. Влакната на Пуркиние притежават обилно количество линейно подредени саркомери, хомогенно разпределени подобно на камерните съкратителни кардиомиоцити. Порездането на миофибрилите е прекъснато на места от големи, относително оптически празни полета от саркоплазма, изпълнена с гликогенови гранули, митохондрии и тубули на саркоплазмения ретикулум (Weidman 1970).

Клетките на Пуркиние не притежават T-тубуларна система. Откриват се само единични триади или диади в преходните клетки между влакната на Пуркиние и работния миокард. Fozzard (1965) открива, че капацитетът на

мембраната на клетките на Пуркиние е по-голям от този на камерните миокардни клетки. Това може да се обясни с наличието на голямата повърхност, осигурена от интеркалатния диск, който е значително по-сложно устроен при влакната на Пуркиние.

Често срещан начин на подреждане е под формата Y, с участието на три клетки на Пуркиние. Съществуват и зони с мозаично подреждане на клетките. Въпреки липсата на десмозоми и цепковидни контакти, съседните сарколеми са разположени на не повече от 30-40 nm. Този тип клетъчна организация, както и наличието на сложно устроен интеркалатен диск, играят роля в бързото провеждане от клетките на Пуркиние (Legato 1973).

Berger и Rona (1971) са описали популация от клетки в предсърдията на плъх, разположени в субендокардния мускулен слой, които притежават много от характеристиките на клетките на Пуркиние в камерите. Те твърдят, че на този тип клетки се дължи бързото и специализирано провеждане в миокарда на предсърдията.

Част от сърдечната мускулатура предимно в областта на предсърдията има и характеристика на ендокринна жлеза. Клетките, които я изграждат, са наречени ендокринни или секреторни кардиомиоцити. В тези клетки около двата полюса на ядрото, но понякога и между миофибрилите и сарколемата, се намират електроннопълтни везикули с диаметър 300-400 nm (около 600 на една клетка). Тези везикули съдържат хормон с протеинов характер – предсърден натрийуретичен пептид, наречен още аурикулин, атриопептид или кардиодилатин (Овчаров и Такева 2008).

За да бъде описана сложната субклетъчна организация на кардиомиоцитите, е целесъобразно да се направи следната класификация:

а. интеркалатен диск – специфична характеристика на кардиомиоцита (Junqueira и съавт. 2013; Borg и съавт. 1983);

б. латерална сарколема; това понятие отразява разликите в топографията между латералната сарколема и интеркалатния диск, който е отделна зона по отношение както на структура, така и на функция;

в. цитоскелет;

г. клетъчни органели.

Кардиомиоцитът е цилиндрична клетка, с диаметър от около 10 – 15  $\mu\text{m}$  и дължина от около 100  $\mu\text{m}$  (Marian и Roberts 2001). Обикновено той е разклонен и се свързва със съседните си клетки в надлъжна посока посредством интеркалатните дискове. Кардиомиоцитът е набразден и има едно или две централно разположени, леко удължени ядра с ниска плътност (Junqueira и съавт. 2013; Borg и съавт. 1983; Marian и Roberts 2001; Kostin и съавт. 1998).

Подреждането на кардиомиоцитите води до формирането на мрежа или функционален синцитиум, който е основната градивна единица на миокарда. Въпреки това, в миокарда се откриват и други клетъчни типове: фибробласти, ендотелни клетки и гладкомускулни клетки (Junqueira и съавт. 2013; Gupta и Gupta 1997; Kumarapeli и Wang 2004). Съединителната тъкан, която огражда кардиомиоцита, включва, разположени отвън навътре: епимизиум, перимизиум и ендомизиум. Нормалният извънклетъчен матрикс (кардиогел) се произвежда както от самите сърдечни клетки, така и от миокардните фибробласти. Той е изграден от колаген тип I, III и IV, ламин, фибронектин и протеоглики. Изглежда, че той играе ключова роля при формирането на миофибрилите и интеркалатните дискове по време на диференциацията и узряването на миокардните клетки от сърдечните стволови клетки (Kumarapeli и Wang 2004; Hein и съавт. 2000; Capetanaki 2002; Schweitzer и съавт. 2001; Miller и съавт. 2004; Perriard и съавт. 2003)

Зоната на латералната сарколема обхваща сарколемата, която не е включена в интеркалатните дискове. В тази част от мембраната са разположени специализирани зони с ключово значение за хомеостазата на

кардиомиоцита. Тези зони се наричат костамери. Това са подструктури на сарколемата, свързани към контрактилните елементи на кардиомиоцита, формирайки перицелуларна мрежа (Solaro 2005; Bloch и Gonzalez-Serratos 2003). Костамерите представляват места за свързване на няколко цитоскелетни мрежи, образувайки „комуникационен център” между извънклетъчния матрикс, сарколемата и Z-диска (Solaro 2005; Gregorio и съавт. 1999). Преобладава мнението, че те служат като зони за свързване с извънклетъчния матрикс с цел стабилизиране на сарколемата, както и за изпълнение на пътищата на сигнална трансдукция, участващи в предаването на механичната сила (Russel и съавт. 2000; Solaro и Van Eyk 1996; Vahouny и съавт. 1979; Borg и съавт. 2000).

Важен компонент на латералната сарколема, разположен на нивото на Z-диска, е трансверзалната тубулна система или Т-системата (Borg и съавт. 1983). Т-системата се състои от нагъвания на сарколемата, навлизащи дълбоко във вътрешността на клетката, което позволява бързо и еднакво предаване на акционния потенциал на мембраната към мускулното влакно.

Цитоскелетът е структурата, която осигурява механична поддръжка, с което допринася за пространственото подреждане на другите субклетъчни елементи. Той запазва структурния и функционалния интегритет на кардиомиоцита. Освен това, някои от компонентите на цитоскелета участват в различни клетъчни процеси като хипертрофия, клетъчно делене, миграция, вътреклетъчен транспорт на везикули, правилно подреждане и функциониране на клетъчните органели, разположение на мембранните рецептори и междуклетъчна комуникация. Предполага се, че цитоскелетът играе важна роля в механичната сигнална трансдукция на клетката (Schweitzer и съавт. 2001; Solaro и Van Eyk 1996).

#### **4. Количествени характеристики на сърдечната стена и на кардиомиоцитите**

Миогенезата и развитието на сърцето са широко обсъждана тема в науката през последните 100 години (Rumyantsev 1977). Плъхът е едно от най-използваните животни за проучвания на сърдечната морфология при бозайниците (Mayhew и съавт. 1997; Kalishnik и съавт. 1998). До скоро, в литературата съществуваше консенсус, че растежът на кардиомиоцитите по време на феталното и постнаталното развитие на плъха се дължи основно на хиперплазия, но в даден момент от ранния период на постнатално развитие на сърцето, пролиферацията на кардиомиоцитите спира и през късния постнатален период хипертрофията на сърцето се дължи на хипертрофия на сърдечните мускулни клетки. По тази причина, при здрави плъхове не се наблюдават съществени промени в броя и размера на кардиомиоцитите. Brüel и съавтори (2002a) показват, че броят на ядрата на кардиомиоцитите продължава да нараства при възрастни плъхове, макар че не може да се каже със сигурност дали това отразява по-голям брой ядра на един кардиомиоцит или хиперплазия. Средният размер на кардиомиоцитите се увеличава паралелно с растежа на тялото по време на постнаталното развитие, като те притежават възможността за допълнителна хипертрофия в отговор на увеличено натоварване (Anversa и съавт. 1978; Korecky и Rakusan 1978; Loud и съавт. 1978). Освен това, популацията на сърдечните мускулни клетки показва бързо нарастващ процент на двуядрени клетки по време на ранното постнатално развитие (Katzberg и съавт. 1977). В повечето проучвания се използва морфометрична методология за *in situ* измерване на средния размер на клетката, брой и процент на двуядрени кардиомиоцити (Anversa и съавт. 1978; Loud и съавт. 1978), с цел изследване на тези свойства на кардиомиоцитите и степента на растежа им в миокард от лява и дясна камера по време на ранния постнатален период.

Малък е броят на проучванията, които оценяват регионалните различия в големината на сърдечните мускулни клетки при нормални и хипертрофирани сърца. Повечето сведения в литературата се ограничават само до измервания на клетъчния диаметър или площта на напречното сечение и само малък брой автори опитват да определят дължината на клетката (Aherne 1968; Ashley 1945). Поради неправилната форма на кардиомиоцитите и локализацията на интеркалатните дискове, определянето на дължината на отделните клетки става трудно в тъканни срези. При проучване на нормални човешки сърца, Ashley (1945) измерва диаметъра на кардиомиоцитите на нивото на ядрото и установява, че той е по-голям при клетки от папиларните мускули, отколкото при клетки от свободната стена както на лявата, така и на дясната камера; освен това, мускулните влакна на лявата камера са по-големи от тези на дясната. При млади спонтанно хипертензивни плъхове, диаметърът на клетките от папиларен мускул на лява камера е по-голям, отколкото на клетки от свободната стена; от двадесет и първата седмица нататък, клетките от свободната стена са по-големи в диаметър от тези на папиларните мускули (Bishop и съавт. 1979). Anversa и съавтори (1980) показват по-голяма площ на напречното сечение при субендокардни клетки от нормални плъхове, но при хипертрофия, дължаща се на хипертония, субепикардните клетки нарастват повече, отколкото субендокардните. Тези автори съобщават и че измерената клетъчна дължина в тъканни срези е по-голяма при клетки от субепикарда, отколкото при клетки от субендокарда, както при нормотензивни, така и при спонтанно хипертензивни плъхове.

В проучванията на клетъчните размери, повечето автори измерват диаметъра на клетките на хистологични напречни срези, приемайки цилиндричен модел на клетката (Linzbach 1950). Диаметърът се измерва или директно при отделните клетки или се определя индиректно. В случай на директно измерване трудностите произхождат от това, че клетките не винаги са прерязани перпендикулярно на дългата си ос и по тази причина,

напречното сечение изглежда елипсовидно, а не кръгло. За това, някои автори измерват само най-късия диаметър (Murakam 1974), докато други измерват поне два диаметъра за всяка клетка (Ashley 1945; Rakusan и Poura 1963; Aherne 1968). Korecky и Rakusan (1978) използват надлъжни срези за измерване на диаметъра, но в този случай не всички клетки биват прерязани точно по надлъжната ос, поради което е възможно диаметърът да изглежда по-малък. Индиректното определяне се основава на измерването първо на общата площ, която на тъканен напречен срез е покрита само от кардиомиоцити; тази площ след това се разделя на броя клетки в този срез (Wydra 1972).

## 5. Азотен оксид (NO) и азотен оксид-синтаза (Nitric oxide synthase, NOS)

### 5.1 Роля на азотния оксид и механизъм на синтез

Основополагащото откритие от 1987 г., че преди това неизвестната молекула, наречена „произхождащ от ендотела релаксиращ фактор” всъщност е азотен оксид (NO), води до изместване на парадигмата на разбиранията на учени и клиницисти по отношение на физиологията и патофизиологията на сърдечно-съдовата система. На тримата учени (Furchgott, Ignarro, Murad), участвали в това епохално откритие, е присъдена Нобеловата награда по физиология или медицина за 1998 г.

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). Въпреки това, сложността на сигналната каскада, водеща началото си от NO и пълният набор от вътреклетъчни таргети за NO в сърцето, едва сега се разкриват, като някои аспекти от този комплексен механизъм са все още неясни.

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  $\beta$ -адренергична стимулация с

изопротеренол (Balligand и съавт. 1993), което показва, че конститутивното освобождаване на NO от миокарда може да служи като ендегенен инхибитор на  $\beta$ -адренергичната сигнализация. В следствие, допълнителни изследвания върху NOS инхибиторите в кардиомиоцити от лява камера на морски свинчета, показват цикличен гуанозин монофосфат (цГМФ)-зависимо увеличаване на амплитудата на калциевия ток през мембраната (Gallo и съавт. 1998, 2001). Това свидетелства за тоничния инхибиторен ефект на NO върху базовия инотропен ефект и калциевата медиация.

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).

Азотният оксид е газообразна сигнална молекула с характеристиките на свободен радикал (Tamargo и съавт. 2010). Има кратък плазмен полуживот, поради вазимодействието си с различни протеини (напр. хемоглобин, миоглобин) (Tamargo и съавт. 2010). Той дифундира бързо от мястото си на образуване и се окислява до нитрит и нитрат, с което сигналната му активност се прекратява. По тази причина синтезата на NO трябва да протича бързо и в зависимост от изискванията при физиологични условия (Miller и Megson 2007). Като свободен радикал, NO може да реагира с голям брой молекули в тялото (Brune и Lapetina 1995; O'Donnell и съавт. 1999; Yermilov и съавт. 1995), а газообразната му форма позволява лесното преминаване между клетките и тъканите (Bredt 2003). Вероятно по

тази причина NO притежава изключително широк спектър на действие и упражнява ефекти върху разнообразни функции в организма. Изброяването на всички структури, върху които NO оказва влияние, е изключително трудно, независимо от краткия времеви интервал (последните 20 години), в който са получени експерименталните резултати. В по-обобщен вид могат да бъдат представени следните системи и функции, върху които NO оказва влияние: сърдечно-съдова система; различни структури на нервната система (Dzambazova и съавт. 2011a и б; Ninova-Palova и съавт. 2014); имунна система и свързаните с нея процеси на възпаление (Georgiev 2015; Landzhov и съавт. 2012), както и някои заболявания; различни видове инфекции и ракови заболявания; различни други въздействия върху белите дробове, храносмилателната система; ендокринната система (регулация на секреция на инсулин); кожа (Bocheva и съавт. 2012) и др., които трудно се поддават на обобщение. В таблица 1 са изброени биологичните ефекти (често противоположни един на друг) на NO по отношение на сърдечно-съдовата система (Strijdom и съавт. 2009):

Таргетна клетка/тъкан/орган	Ефект
Съдове <ul style="list-style-type: none"> <li>• Гладка мускулатура</li> <li>• Тромбоцити</li> <li>• Клетки на възпалението</li> <li>• Кислородни радикали</li> <li>• Ендотелни клетки</li> </ul>	Релаксация → вазодилатация
	Антиагрегантен ефект
	Противовъзпалителен ефект
	Антиоксидантен ефект
	Ангиогенеза
Сърце <ul style="list-style-type: none"> <li>• Миокард</li> </ul>	Растеж и развитие по време на феталния и постнаталния период ↑↓ Контрактилната функция Антихипертрофичен ефект Кардиопротективен ефект по отношение на исхемията Клетъчно размножаване и пролиферация Антиапоптозен ефект; усилва преживяемостта на клетките
	<ul style="list-style-type: none"> <li>• Кардиомиоцити</li> </ul> При високи концентрации уврежда кардиомиоцитите: усилва апоптозата и некрозата

Таблица 1

*Биологични ефекти на азотния оксид (NO) върху сърдечно-съдовата система*

Синтезата на NO се осъществява под действието на каталитичната активност на групата ензими азотен оксид-синтаза (NOS), по отношение на превръщането на L-аргинин в L-цитрулин (Ziolo и съавт. 2008). В сърцето се експресират три различни изоформи на NOS: nNOS или NOS1 (невронална); iNOS или NOS2 (индуцируема); eNOS или NOS3 (ендотелна) (Ziolo и съавт. 2008). Активността и експресията на nNOS и eNOS се различават от тези на iNOS. И трите форми могат да свързват калмодулин, който на свой ред свързва калциеви йони. Въпреки това активността на nNOS и eNOS е калций-зависима, за разлика от калций-независимата активност на iNOS. Въпреки това, активността на nNOS по отношение на синтезата на азотен оксид, е шест пъти по-голяма от тази на eNOS (Nishida и Ortiz de Montellano 1998). Освен това, степента на синтез на NO от която и да е изоформа зависи и от индивидуалните вариации в протеините, алостеричните регулатори и наличието на субстратите – L-аргинин, кислород и ко-факторите никотинамид аденин динуклеотид фосфат (НАДФ), калмодулин, флавинови редуктази (флавинадениндинуклеотид (ФАД) и флавинмононуклеотид (ФМН)), хем и тетрахидробиоптерин (BH<sub>4</sub>). Невроналната и ендотелната NOS се експресират конститутивно в здравето сърце (Brahmajothi и Campbell 1999), докато iNOS се експресира под действието на повишеното количество цитокини при патологични условия (Arstall и съавт. 1999). Невроналната NOS се експресира в кардиомиоцитите и вегетативните нерви на сърцето, докато eNOS – в ендотела на коронарните съдове, ендокарда и в по-малка степен в кардиомиоцитите (Tamargo и съавт. 2010). Освен това, експресията на nNOS и eNOS е разделена пространствено в специфични микродомени от кардиомиоцити, като nNOS е локализирана в мембраната на саркоплазмения ретикулум (Xu и съавт. 1999), а eNOS е локализирана в кавеолите на Т-тубулната система на сарколемата (Feron и съавт. 1996). Съществуват сходства в структурно и функционално отношение между nNOS и eNOS. Основният катализатор на синтезата на NO в

кардиомиоцитите е nNOS. В активно състояние, nNOS съществува като хомодимер. Всеки мономер се състои от C-терминален редуктазен домен и N-терминален оксигеназен домен, свързани от секвенция с афинитет към калмодулин (Zhang и съавт. 2014). Върху редуктазния домен се намират свързващи места за НАДФН+Н<sup>+</sup>, ФАД и ФМН. Оксигеназният домен съдържа свързващи места за L-аргинин, хем и ВН<sub>4</sub> и е мястото, в което се синтезира NO. Окислението на НАДФН+Н<sup>+</sup> до НАДФ<sup>+</sup> генерира електрон, който се транспортира от редуктазния домен до желязото в оксигеназния домен посредством ФАД и ФМН. Този процес се улеснява от свързването на калмодулин, който действа като алостеричен активатор на nNOS (Zhou и Zhu 2009). Калмодулин се дисоциира от nNOS при ниски концентрации на вътреклетъчен калций, което забавя потока на електрони между ФАД и ФМН и инактивира nNOS (Matsuda и Iyanagi 1999). С това се обяснява ролята на концентрацията на вътреклетъчен калций като основен регулатор на активността на nNOS. Активността ѝ може да се регулира и посредством други механизми, напр. фосфорилиране (Song и съавт. 2004; Rameau и съавт. 2004).

Под формата на мономер, nNOS е неактивна. Димеризацията изисква свързването на L-аргинин и ВН<sub>4</sub>. Свързването на ВН<sub>4</sub> е фундаментален акт и играе ключова роля за стабилизирането на димера, предпазва nNOS от протеолиза, повишава афинитета към L-аргинин и осигурява електрон, който е от съществено значение за превръщането на L-аргинин в L-цитрулин (Munzel и съавт. 2005). Цинкът също подпомага стабилизирането на димера, като се свързва с оксигеназния домен на всеки мономер и предотвратява разделянето (Zou и съавт. 2002). При патофизиологични условия nNOS се разделя, което води до генерирането на супероксид и пероксинитрит и електроните се пренасочват към кислород, а не към L-аргинин. Неселективният NOS инхибитор N-нитро-L-аргинин антагонизира електронния трансфер към L-аргинин или кислород, инхибирайки по този начин продукцията на NO и супероксид, в димерна и

мономерна NOS съответно (Munzel и съавт. 2005). През 1996 година, Jaffrey и Snyder идентифицират ендегенен протеинен инхибитор на nNOS. Той действа като специфичен инхибитор на nNOS посредством дестабилизиране на димеризацията на nNOS, която е от ключово значение за нейната функционална активност (Jaffrey и Snyder 1996).

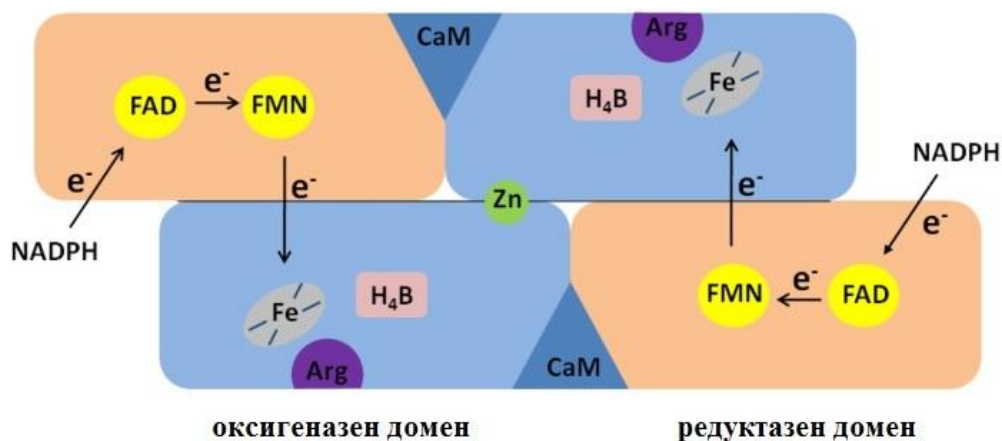


Схема 1

Схематично представяне на димерната структура на NOS (по Fischmann и съавт. 1999)

Азотният оксид реализира своите ефекти посредством поне два различни механизма – цГМФ-зависим и цГМФ-независим (Ziolo 2008). Ефектите, зависими от цГМФ са резултат от активирането на гуанилатциклаза от NO, което води до повишаване на нивата на цГМФ, а той от своя страна модулира активността на протеинкиназа G (PKG) и на цГМФ-регулираните фосфодиестерази. Ефектите, независими от цГМФ се реализират основно посредством S-нитрозилиране – важна модификация в клетъчната сигнализация (Stamler и съавт. 2001). В допълнение, NO може да се свързва с реактивни кислородни и азотни съединения и да доведе до формирането на сходни съединения като пероксинитрит. Съединения от този тип също могат да повлияят миокардния контрактилитет и в някои случаи имат ефекти, значително различаващи се от тези на NO. По тази причина не е изненадващо, че в литературата съществуват значими противоречия и парадоксални резултати по отношение както на

положителните, така и на отрицателните ефекти на NO и сходните му съединения. Все пак, някои по нови проучвания разрешават тези противоречия, като определят, че контрактилните ефекти на NO значително се повлияват от локализацията на изоформата на NOS (Barouch и съавт. 2002; Ziolo и Bers 2003) и от активирането на специфични цГМФ-зависими и независими сигнални пътища, чиито таргети са отделни протеини, отговарящи за куплирането (т.е. координирането) на възбуждане и съкращение. Допълнителни проучвания са определили, че тези контрактилни ефекти се повлияват и от фактори като пол (Sun и съавт. 2006), място на синтез (Katori и съавт. 2006; Walsh и съавт. 2004), сходни съединения (Kohr и съавт. 2008a; Ziolo и съавт. 2001; Tocchetti и съавт. 2007), концентрация (Kojda и съавт. 1996; Kohr и съавт. 2008a) и контрактилно състояние на кардиомиоцитите (Ziolo и съавт. 2001; Kohr и съавт. 2008b). Тези фактори са от значение за контрактилните ефекти на NO и на сходните му съединения както при физиологични, така и при патологични условия и са чувствителни по отношение на състоянието на клетъчните редокс-системи.

## 5.2 nNOS – експресия и локализация

Генът на nNOS е картиран в късото рамо на 12 хромозома (Kishimoto и съавт. 1992) и е дълъг повече от 4500 базови двойки и се състои от 29 екзона. Хомоложни гени се откриват на 5 хромозома в мишия геном (Lee и съавт. 1995) и на 12 хромозома в плъшия геном (Deng и съавт. 1995). Инициращият кодон е локализиран в екзон 2, а терминаращият кодон – в екзон 29. Протеинът nNOS се експресира като димер с оксидазен домен в N-терминалния край и редуктазен домен в C-терминалния край. Няколко свързващи домена за ко-фактори и субстрати (напр. за НАДФН+H<sup>+</sup>, ФМН, ФАД, ВН<sub>4</sub>, хем и L-аргинин) се разпространяват по протежение на секвенцията от 5' към 3' края на белтъчната верига (Nathan и съавт. 1994; Stamler и съавт. 2001; Newton и съавт. 2003). Генът за nNOS е извънредно

сложен и експресията му се регулира от голям брой алтернативни инициаторни екзони, което води до алтернативен сплайсинг на иРНК (Wang и съавт. 1999). Съществуват известен брой варианти на nNOS. Например, nNOS<sub>μ</sub> е вариант, който има 102 нуклеотида повече от изоформата на nNOS, която обикновено се открива в нервната тъкан и в напречноабраздената мускулатура (nNOS<sub>α</sub>). Тази nNOS<sub>μ</sub> изоформа се открива в скелетните мускули и вероятно в сърцето (Silvagno и съавт. 1996; Lin и съавт. 1998). Известни са още поне шест варианта (Brennan и съавт. 1997), напр. nNOS<sub>β</sub> и nNOS<sub>γ</sub>, чиято физиологична роля все още е неясна.

Подобно на eNOS, протеинът на топлинния шок 90 (HSP90) стимулира активността на nNOS чрез усилване на свързването на комплекса Ca<sup>2+</sup>/калмодулин към ензима. В допълнение, известно е, че половите хормони като естрадиол повишават нивата на иРНК на nNOS (Weiner и съавт. 1994). Въпреки това, значението на пола за експресията на nNOS остава не дотам обяснено. Едно изследване показва по-високи нива на експресията на nNOS в сърца на женски плъх в сравнение със сърца от мъжки плъх (Chen и съавт. 2003). Според друго проучване, не се открива разлика между нивата на експресия в мъжки и женски сърца (Cross и съавт. 2002). Все пак, това несъответствие вероятно произтича от различията във вида на опитните животни (плъх и мишка) и/или вариациите на менструалния цикъл.

Известно е, че съществува тясна връзка между nNOS и Ca<sup>2+</sup>. Например, транскрипцията на nNOS се регулира от калциеви йони (Sasaki и съавт. 2002), а активността ѝ е зависима от Ca<sup>2+</sup>. Биосинтезата на азотния оксид включва електронен трансфер от С-терминалния (флавинов) към N-терминалния (хем) домен. Свързването на Ca<sup>2+</sup>/калмодулин вероятно предизвиква този електронен трансфер (Abu-Soud и Stuehr 1993; Abu-Soud и съавт. 1994) посредством изместване на автоинхибиращия компонент (Weissman и съавт. 2002). В допълнение nNOS показва съвместна локализация с калций-свързани протеини; например в неврони, nNOS е

закотвена към NMDA-рецепторните калциеви канали. Няколко проучвания са демонстрирали имунохистохимично оцветяване на nNOS в кардиомиоцити (Brahmajothi и Campbell 1999; Planitzer и съавт. 2002). По-специално, nNOS е локализирана по сарколемата (Xu и съавт. 2003) и по мембраните на саркоплазмения ретикулум, където ко-имунопреципитира с рианодиновия рецептор (Xu и съавт. 1999; Barouch и съавт. 2002). При базални нива на вътреклетъчния калций, nNOS вероятно е неактивна, но активността ѝ се повишава при покачване на калциевите нива (Bredt и Snyder 1990; Schmidt и съавт. 1991). Освен това предварителни проучвания показват, че NO, синтезиран от миокардната nNOS, може да инхибира активността на  $\text{Ca}^{2+}$  АТФ-аза върху мембраните на саркоплазмения ретикулум (Xu и съавт. 1999). От тези данни може да се заключи, че нарушаването на функцията на миокардната nNOS, ще доведе до получаването на фенотип, сходен с наблюдавания при аблация на физиологичния инхибитор на  $\text{Ca}^{2+}$  АТФ-аза – фосфоламбан. Липсата на фосфоламбан води до по-бързо връщане на калция в цистерните на саркоплазмения ретикулум на кардиомиоцитите на лява камера, последствие от което е повишаването на калциевото съдържание в ретикулума (Luo и съавт. 1994). В резултат на това се наблюдава повишен инотропен ефект в миокарда.

Ролята на nNOS е доста спорна. Асоциираната със саркоплазмения ретикулум nNOS (Xu и съавт. 1999) може да модулира сигнализацията посредством калциеви йони. Предполага се, че nNOS вероятно упражнява тоничен инхибиторен ефект върху базалната регулация на калциевия ток през калциевите канали от L-тип и вътреклетъчните транзитни калциеви токове (Sears и съавт. 2003а), въпреки че тази роля на ензима е обект на дискусия (Khan и съавт. 2003). Според някои проучвания се наблюдава повишаване на клетъчния отговор към ниски дози  $\beta$ -агонисти (Ashley и съавт. 2002), докато други докладват за противоположен ефект при високи дози (Barouch и съавт. 2002).

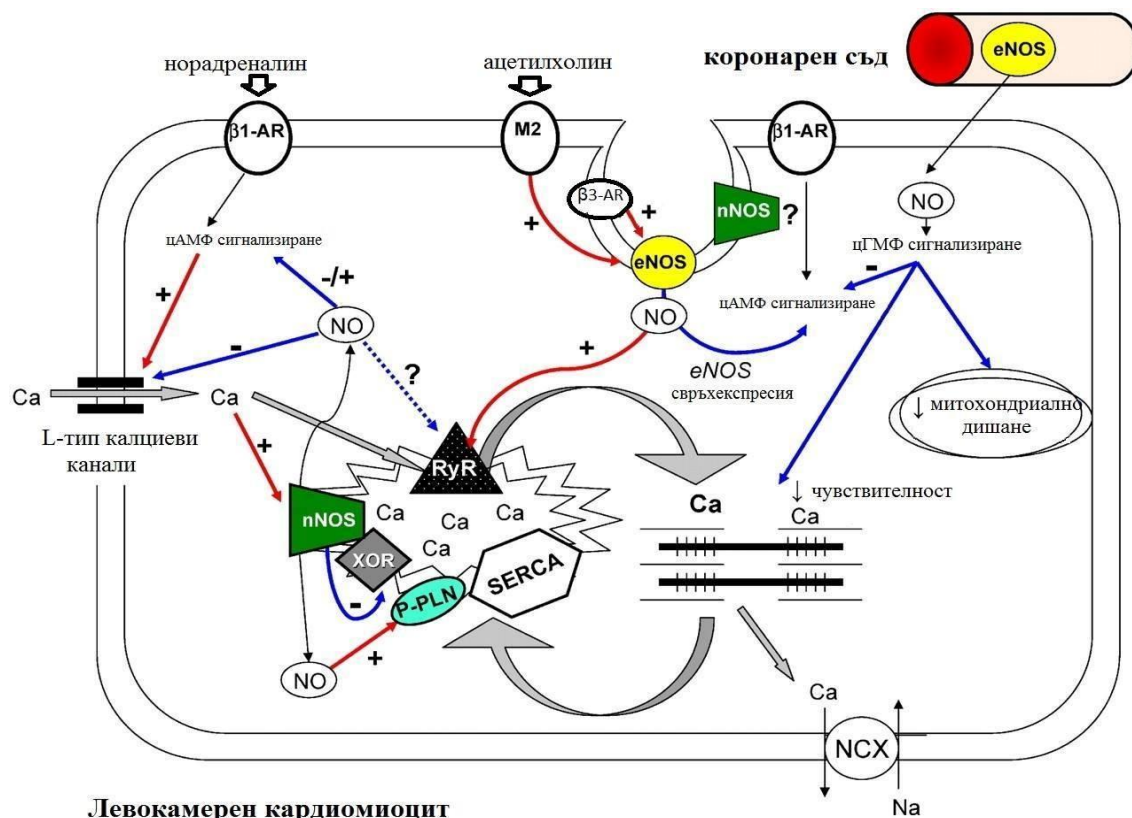


Схема 2

Вътреклетъчни пътища, посредством които nNOS участва в регулацията на съкращението на кардиомиоцита и калциевите каскади (по Sears и съавт. 2004)

Проучвания по отношение на ко-имунопреципитацията и имунофлуоресценцията показват, че при нормален миокард nNOS може да бъде частично локализирана съвместно с рианодиновите рецептори по мембраните на саркоплазмения ретикулум и да взаимодейства с тях (Varouch и съавт. 2002; Damy и съавт. 2003, 2004; Vendall и съавт. 2004). Липсата на nNOS води до повишено диастолно излизане на калциеви йони посредством рианодиновия рецептор. Това повишено излизане може да доведе до намаляване на запасите на калций в цистерните на саркоплазмения ретикулум. Установено е, че друг таргет на сигнализацията посредством nNOS са калциевите канали от L-тип. Невралната NOS медира намаляване на калциевия ток през каналите от L-тип, в резултат на което се намалява базалното съкращение, стимулирано от β-адренорецепторите (Sears и съавт. 2003a). Заслужава отбелязване фактът, че всички тези ефекти се реализират посредством

цГМФ-независими сигнални пътища (Wang и съавт. 2008; Zhang и съавт. 2008; Gonzalez и съавт. 2007). В обобщение, nNOS модулира съкращението на кардиомиоцитите главно посредством цГМФ-независими сигнални пътища и нейни таргети са множество протеини, отговарящи за куплирането на възбуждане и съкращение, включително фосфоламбан, рианодиновия рецептор и калциевите канали от L-тип.

Митохондриите на кардиомиоцитите също съдържат nNOS (Kanaï и съавт. 2001; Elfering и съавт. 2002). Това е интересно откритие, на фона на факта, че NO инхибира клетъчното дишане (Borutaite и Brown 1996; Brown и съавт. 1997). Въпреки това, тъй като активността на митохондриалната изоформа изглежда е изключително ниска в сърцето и поради липсата на ефект от страна на NOS инхибитори върху степента на дишане при изолирани митохондрии от свиня (French и съавт. 2001), физиологичната роля на тази локализация е в процес на уточняване.

Инервацията на сърцето се осъществява еферентни симпатикови неврони, произхождащи предимно от стелатните ганглии и парасимпатикови влакна от блуждаещия нерв, които образуват синапси само с вътрешни холинергични ганглии, от които произлизат следвъзлови неврони. Съществуват и аферентни неврони, носещи сетивна информация към ЦНС посредством различни невронални пътища. Всички вътрешни сърдечни неврони инервират голям брой зони в сърцето, като се предполага, че активността на повечето от тях се модулира от азотния оксид. Все пак, по-голямата част от вътрешните сърдечни неврони, съдържащи ензима nNOS, е по-вероятно да бъдат парасимпатикови, тъй като се наблюдава и едновременна експресия на холин ацетилтрансфераза (Choate и съавт. 2001). Само малка част от вътрешните ганглионарни клетки съдържат nNOS; в предсърдия от морски свинчета, едва 5% от холин ацетилтрансфераза-експресиращите неврони експресират и nNOS (Mawe и съавт. 1996). Също така, nNOS се открива в едва 4% от вътрешните сърдечни неврони на плъх (Klimaschewski и съавт. 1992). В по-

скорошни проучвания е установено, че nNOS се експресира в 16% от холин ацетилтрансфераза-експресиращите неврони в сърдечните ганглии в миши предсърдия (Danson и Paterson 2003). Разликите в тези данни вероятно отразяват видовите различия в броя на вътрешните неврони, експресиращи nNOS. Това вероятно показва и че в сравнение с другите гризачи, мишката използва в по-голяма степен NO, синтезиран от nNOS (Danson и Paterson 2003).

### 5.3 Ефекти на nNOS в кардиомиоцита

Механизмите, стоящи зад повишаването на контрактилитета при липсата на nNOS, са изследвани обстойно в изолирани кардиомиоцити от лява камера (Sears и съавт. 2003a), където е показано, че положителният инотропен ефект при инхибиране на nNOS или разрушаване на гена, е свързан с ефектите на nNOS върху ролята на калция. При разрушаване на гена за nNOS, се повишават калциевият ток през каналите от L-тип и натоварването на саркоплазмения ретикулум с калциеви йони. Повишеното навлизане на калциеви йони посредством каналите от L-тип при липса на nNOS осигурява допълнителен стимул за калций-индуцираното освобождаване на калций и може да допринесе за по-голямо натоварване на саркоплазмения ретикулум и по-силно съкращение. Според други изследователи, не се наблюдават такива промени по отношение на калциевата роля в миокарда при липса на nNOS. Данните на Sears и съавтори (2004) показват наличие на повишен калциев ток през каналите от L-тип при разрушаване на гена за nNOS или остра фармакологична блокада.

Съществуват данни за ролята на nNOS в контрола и на други протеини, имащи отношение към калциевата активност в клетката, например калциевите канали, медиращи освобождаването на калций от саркоплазмения ретикулум, наречени рианодинови рецептори. В литературата има сведения както за стимулиращата (Stoyanovsky и съавт.

1997; Xu и съавт. 1998), така и за потискащата роля на NO (Zahradnikova и съавт. 1997). Според други проучвания, не съществува разлика във времето за достигане на пика на калциевия транзиентен ток при наличие и липса на nNOS, което предполага липса на ефект на синтезирания от nNOS азотен оксид върху рианодиновия рецептор (Sears и съавт. 2003a).

#### 5.4 Регулация на активността на nNOS

В последните години броят на регулаторните механизми, имащи отношение към контрола на биосинтезата на nNOS и NO, се е увеличил значително. Изглежда, че nNOS е изключително чувствителна по отношение на механизмите за контрол на генната експресия, посттранскрипционни и посттранслационни модификации, фосфорилирането, редокс модулация и взаимодействията протеин-протеин.

Регулацията на синтезата на иРНК за nNOS зависи от голям брой физични, химични и биологични агенти (Forstermann и съавт. 1998). Изследвано е зависимостта от времето повишаване на нивата на иРНК след хипоксия (Guo и съавт. 1997). Това индуцирано повишаване може би се дължи на два отделни механизма: общ клетъчен стресов отговор или директна активация на генната транскрипция посредством свързването на хипоксия-индуцирани фактори към специфични цис-елементи, както се наблюдава и при други хипоксия-индуцирани гени, например гена за еритропоетин (Kvietikova и съавт. 1995). Интересно е, че нивата на nNOS в хомогенизирани предсърдия от морски свинчета се намаляват след излагане на животните на действието на умерена хипоксия за 21 дни (Mohan и съавт. 2001). Освен това, този отговор е придружен от понижаване на нивата на стресовите протеини (включително протеини на топлинния шок 70 и 90) (Mohan и съавт. 2001), което вероятно показва, че стресовият отговор на клетките може в някои случаи да определя

хипоксичния отговор при контрола на експресията на nNOS в сърдечна тъкан.

Регулацията на nNOS посредством фосфорилиране е важен механизъм чрез който се постига отрицателна регулация (Dinerman и съавт. 1994). Към момента в молекулата на nNOS са описани само места за фосфорилиране на серин, за разлика от описаните при eNOS места за фосфорилиране на серин, треонин и тирозин, повечето от които стимулират ензимната активност (Fleming и Busse 2003). Според множество проучвания, активирането на калций/калмодулин-зависими протеинкинази 1 (Song и съавт. 2004) и 2 (Hayashi и съавт. 1999) може да индуцира фосфорилиране на серина и да намали ензимната активност на nNOS.

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 постнаталното 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. Актуалността на тематиката се определя от водещото значение на заболяемостта от хипертония в световен мащаб.

Настоящата работа изследва аспекти от развитието на миокарда и кардиомиоцитите, техните възрастово обусловени изменения в съчетание с изменение на експресията на nNOS при нормотезивни Wistar плъхове и спонтанно хипертензивни плъхове (SHR) като модел на хипертонията при човека.

### ***III. Цел и задачи***

#### **Цел:**

Да се проследят постнаталните 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.

## ***IV. 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:

- Първа група: двуседмични нормотензивни Wistar плъхове – 3 броя животни;
- Втора група: едномесечни нормотензивни Wistar плъхове – 3 броя животни;
- Трета група: тримесечни нормотензивни Wistar плъхове – 3 броя животни;
- Четвърта група: шестмесечни нормотензивни Wistar плъхове – 3 броя животни;
- Пета група: дванадесетмесечни нормотензивни Wistar плъхове – 3 броя животни;

- Шеста група: едномесечни спонтанно хипертензивни плъхове– 3 броя животни;
- Седма група: шестмесечни спонтанно хипертензивни плъхове– 3 броя животни.

## **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 третираны 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.

Всички експериментални процедури, хистологичните и имунохистохимичните изследвания бяха извършени в Катедрата по анатомия, хистология и ембриология към Медицински университет – София.

### **3. Изготвяне на парафинови тъканни срези**

- **Промиване**

Материалът престоя 24 часа във формалин (10%), след което беше промит с вода за отстраняване на формалина.

- **Обезводняване**

Процесът беше извършен, като пробите преминаха през спиртова редица с различна концентрация (70-80-96% + 2 броя абсолютен алкохол) и след това последва 3 броя ксилол и 3 броя парафин.

- **Включване в уплътняваща среда**

Включване на тъканните късчета в разтопен лабораторен парафин, специално приготвен за тази цел и съхраняван в термостат при температура 56-60°C. За включването са използвани специфични форми, поставени върху метална плоча. Оформяне на тъканните късчета в парафинови блокчета.

- **Приготвяне на срези от парафинови блокчета**

1. Подготовката на предметните стъкла, върху които бяха залепени срезите, премина през обработка с глицерин – белтък.
2. Фиксиране на микротомната пластина и подготвяне за рязане (ъгълът на пластината беше стандартизиран за движение в определен период).
3. Поставяне на парафиновото блокче на микротомната глава.
4. Определяне на дебелината на микротомния срез – 7-10 µm.
5. Извършване на среза, пренос върху предметното стъкло и опъване в периферните зони.
6. Подреждане на готовите препарати върху електрически нагревател за отстраняване на парафина от материала.

#### **4. Оцветяване с хематоксилин и еозин**

Отстраняване на парафина от предметните стъкла преди стартиране на процедурата. Преминаване на пробите през 3 броя ксилол за 30 минути. Последва премахване на ксилола чрез обработване на пробите с 3 броя етанол с низходяща концентрация. Извършване на промиване с течаща вода и попиване. Последва стартиране на процедурата по оцветяване на готовите препарати.

- **Методика**

1. Оцветяване с хематоксилин в рамките на 5 минути.
2. Вода за диференциране за 5-30 минути.
3. Диференциране в 1% разтвор на солна киселина в 70% спирт с продължителност 5-10 секунди.
4. 1% разтвор на еозин в рамките на 10 минути.
5. Течаща вода за 5 минути.
6. Диференциране в спирт.
7. Просветляване и включване на хистологичните препарати. Просветляването беше извършено чрез накапване на ксилол, а за включването използвахме специфична среда – ентелан.

- **Работни разтвори**

1. За приготвянето на 0,2% разтвор на еозин се разтваря 1 грам еозин в 50 ml 70% разтвор на спирт.
2. За приготвянето на хематоксилин се разтваря 1 грам хематоксилин в 1 литър дестилирана вода на топло. На следващия етап, към разтвора се прибавя 0,2 грама натриев или калиев йодат до пълното му разтваряне, след което се добавя 50 грама калиево-алуминиева стипца и 50 грама хлоралхидрат. След тяхното разтваряне се добавя 0,5 грама лимонена киселина.

- **Обработка и анализ на изображенията**

Препаратите бяха проучени и заснети с микроскопска система Nikon Eclipse 80i (Japan).

## **5. Оцветяване по метода на Малори**

След фиксацията във формалин се проведе допълнителна фиксация в сместа на Ценкер за 15-30 минути, след което препаратите бяха поставени в йодна тинктура за премахване на сублиматните утайки. Последва депарафиниране на срезите и процедурата по оцветяване на готовите препарати.

- **Методика**

1. Поставяне на препаратите в 1% разтвор на кисел фуксин за 1 – 2 минути.
2. Изплакване в дестилирана вода за 1 – 2 минути.
3. Пренасяне в 1% разтвор на фосфомолибденова киселина за 3 – 5 минути.
4. Изплакване в дестилирана вода.
5. Поставяне на срезите в прясно филтрирана смес от анилиново синьо, оранж G и оксалова киселина за 2 минути.
6. Промиване в дестилирана вода.
7. Диференциране в 96% спирт за 3 – 5 минути, докато под микроскоп не се появиха колагенните влакна, оцветени в синьо.
8. Просветляване и включване на хистологичните препарати. Просветляването беше извършено чрез накапване на ксилол, а за включването използвахме специфична среда – ентелан.

- **Работни разтвори**

1. 0,1 % воден разтвор на кисел фуксин.
2. 1% разтвор на фосфомолибденова киселина.

3. Смес от 0,5 грама анилиново синьо, 2 грама оранж G, 2 грама оксалова киселина и 100 ml дестилирана вода. Сместа беше загрята до кипване, след което охладена и филтрирана непосредствено преди провеждане на процедурата по оцветяване на препаратите.

- **Обработка и анализ на изображенията**

Препаратите бяха проучени и заснети с микроскопска система Nikon Eclipse 80i (Japan).

## **6. Методика на имунохистохимичната процедура**

- Фиксиране в неутрален формалин на късчетата тъканен материал и включване в лабораторен парафин.
- Приготвяне срези с дебелина 7  $\mu\text{m}$  от парафиновото блокче и монтирането им върху предметни стъкла, които предварително бяха обработени с адхезив.
- Пригответените слайдове бяха инкубирани за 2 часа на 50°C в термостат и обработени с ксилол за депарафиниране. Беше проведено рехидратиране на срезите с низходяща концентрация на алкохоли до вода, като се премина през следните етапи:

- 1) ксилол III – 5 min
- 2) ксилол II – 5 min
- 3) ксилол I – 5 min
- 4) абсолютен 100% етилов алкохол – 2 min
- 5) 96% етилов алкохол – 2 min
- 6) 80% етилов алкохол – 2 min
- 7) 70% етилов алкохол – 2 min
- 8) дестилирана вода I – 5 min
- 9) дестилирана вода II – 5 min

Следва имунохистохимична процедура:

При имунохистохимичните реакции в настоящето изследване беше прилагана авидин-биотин пероксидаза комплекс (АВС) техниката съгласно Hsu и съавтори (1981). Всички имунохистохимични реакции бяха извършени във влажна камера върху парафинови срези с дебелина на срезите 7  $\mu\text{m}$ .

В тази група експерименти бяха използвани първични антисеруми/антитела, които бяха насочени срещу невроналната азотен-оксид синтаза. Имунореакциите бяха визуализирани с видово-специфичен биотинилиран вторичен антисерум. По-конкретно имунохистохимичните реакции бяха осъществени по следния начин:

- Пермеабелизиране на срезите с 0,01 М PBS (рН 7,36), съдържащ 0,3% Triton X-100 (Merck) трикратно по 5 min с цел подобряване на пенетрацията на антитялото при последваща инкубация.
- 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 М PBS / 0,3% Triton X-100.
- Пермеабелизиране на срезите с 0,01 М PBS / 0,3% Triton X-100.
- За редуциране на неспецифичното пероксидазно оцветяване, срезите бяха преинкубирани с 0,01 М PBS, съдържащ 5% нормален кози серум за 1 h на стайна температура. Кратко двукратно промиване по 5 min с 0,01 М PBS / 0,3% Triton X-100.
- 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.
- Промиване на срезите с 0,01 М PBS (рН 7,36) 3 x 5 min.
- Инкубация с вторично (мостово) антитяло –биотинилиран антимиши IgG в разреждане 1:250 с 0,01 М PBS. Инкубацията с второто антитяло беше в продължение на 2 h на стайна температура.
- Промиване на срезите с 0,01 М PBS (рН 7,36) 3 x 5 min.

- Инкубация на срезите в ABC комплекса. Времето за инкубация беше 1 h във влажна камера на стайна температура.
- Промиване на срезите с 0,01 M PBS 2 x 5 min.
- Промиване на срезите с 0,05 M Tris/HCl буфер с pH 7,54 за 5 min.
- Визуализиране на реакциите от 5 до 15 min на тъмно с помощта на 3,3' диаминобензидин (DAB) като хромоген.
- Кратко промиване с 0,05 M Tris/HCl буфер, изплакване в дестилирана вода.
- Контраоцветяване и включване на тъканните срези - използва се хематоксилин по Майер. Поставяне на слайдовете в кювета със съответния хематоксилин. Времето за оцветяване се определя от силата и качеството на хематоксилина.
- Следва възходяща редица от алкохоли, просветляване в ксилол и включване в ентелан (Merck), а именно:
  - 1) дестилирана вода – 5 min
  - 2) 70% етилов алкохол – 2 min
  - 3) 80% етилов алкохол – 2 min
  - 4) 96% етилов алкохол – 2 min
  - 5) абсолютен 100% етилов алкохол – 2 min
  - 6) ксилол 2x 10 min
- Отчитане на резултата от имунохистохимичното оцветяване - препаратите бяха проучени и заснети с микроскопска система Nikon Eclipse 80i (Japan).

- **Специфичност на антителата**

За тестването на специфичността на антителата в това проучване, бяха използвани позитивни и негативни контроли:

Позитивна контрола – използвани са тъкани от различни области на мозък с известно и постоянно оцветяване, монтирани на същото предметно стъкло.

Негативна контрола – използвана е тъкан, която преминава през всички стъпки на имунооцветяването, като първичното антитяло беше заместено с фосфатен буфер.

## **7. 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  $0.04 \text{ mm}^2$  ( $400 \text{ }\mu\text{m}^2$ ).
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 ( $\mu\text{m}^2$ )**
  - **напречно сечение на ядрото на кардиомиоцита ( $\mu\text{m}^2$ )**
  - **ядрено-цитоплазмено отношение** – съотношението между напречното сечение на ядрото и напречното сечение на кардиомиоцита.
  - **гъстота на кардиомиоцитите** – определя се като брой на клетките на единица площ от препарата (**брой клетки/ $\text{mm}^2$** ); кардиомиоцитите бяха определени като обща популация.
  - **гъстота на капилярите** – определя се като брой на капилярите на единица площ от препарата (**брой капиляри/ $\text{mm}^2$** ).

Събраните количествени данни, характеризиращи кардиомиоцитите в определен етап, бяха илюстрирани с различни видове диаграми и подложени на статистическа оценка със Student-T-test. За целта беше използвана компютърна програма за статистически анализ. 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.

## ***V. Собствени резултати***

### **1. Възможности на хистологичните техники за получаване на препарати от свободната стена на лява и дясна камера на плъх**

Прилагането на рутинното оцветяване с хематоксилин и еозин (ХЕ) дава ясна представа за морфологията на сърдечната стена. При напречен срез на сърцето по средата, малко под нивото на сърдечните клапи, ясно се очертават свободните стени на лява и дясна камера, както и преградата между тях. Поради начина на изготвяне на среза обикновено се виждат слоевете на сърдечната стена – най-отвътре се забелязват ендокардът, изграден от еднослоен плосък епител и субендокардният слой, най-отвън се наблюдават епикардът, който е мезотелна обвивка на сърдечната стена и субепикардният слой. Между ендокарда и епикарда ясно се очертава и средният слой на сърдечната стена, изграден от сърдечна напречнонабраздена мускулна тъкан – миокардът. Тези специфики на изотвянето на среза позволяват да се измери дебелината на свободната стена на лява и дясна камера при плъха и да се изготви сравнителен анализ на този морфометричен показател при различни възрасти от постнаталното развитие на плъха.

При обичайното оцветяване с ХЕ се наблюдава ясно подредането на сърдечните мускулни клетки в напречни и надлъжно ориентирани слоеве и може да се оцени обстойно морфологията на цитоплазмата и ядрата на кардиомиоцитите. Обичайно сърдечните мускулни клетки от надлъжния слой имат по едно - две централно разположени нормохромно оцветени ядра с овална форма, разположени равномерно. При тях често се визуализира напречната набразденост, като имат удължена, почти цилиндрична форма с раздвоени краища. Тъй като клетките са плътно разположени една до друга трудно се забелязват границите помежду им.

Сърдечните мускулни клетки в напречния слой, поради начина на преминаване на среза, са с кръгла или леко удължена форма с централно разположено нормохромно овално или елипсовидно ядро. Техните граници са ясно видими и очертани, което дава възможност да се изготви обстоен морфометричен анализ на кардиомиоцитите и техните ядра в различните възрастови групи плъхове. Често може да се наблюдава и морфологията на междуклетъчните свързвания на светлинномикроскопско ниво, които се оцветяват интензивно от еозина. Освен това се установява, че кардиомиоцитите са заобиколени от съединителна тъкан, съставена от ретикуларни, колагенни и еластични влакна, в която се забелязва капилярната мрежа, като може да бъде оценена и нейната морфологична характеристика.

По-детайлна и контрастна оценка на елементите на сърдечната стена се получава при трихромното оцветяване по Малори. Това оцветяване дава възможност да се направи оценка на колагенните и ретикуларните влакна между кардиомиоцитите, които се оцветяват в тъмносин цвят. По този начин може да се направи обстойна сравнителна оценка и анализ на промените в структурата на миокарда на отделните възрастови групи плъхове. Освен това, при този метод на оцветяване капилярната мрежа на миокарда се визуализира по-контрастно в сравнение с оцветяването с ХЕ. Еритроцитите се оцветяват в червено-оранжев цвят, а адвентицията на капилярите се багри в син цвят. Това позволява да се направи ясен морфометричен анализ на гъстотата на капилярната мрежа на миокарда в свободните стени на лява и дясна камера. Самите кардиомиоцити са оцветени в червено-виолетов цвят с оранжев оттенък, може да се наблюдава добре напречната набразденост на надлъжния слой от кардиомиоцити. Недостатък на този метод е, че ядрата не се визуализират отчетливо. Допълнителни структури, които се оцветяват и могат да се наблюдават с метода по Малори са глиалните елементи в сърдечната стена, които се багряват в червено-виолетов оттенък.

За доказване на експресията на nNOS в кардиомиоцитите от свободните стени на лява и дясна камера при плъх е използвана имунохистохимична методика с първично моноклонално анти-nNOS антитяло и авидин-биотин комплекс. Резултатът от имунохистохимичното оцветяване ясно и отчетливо показва хетерогенност на имунореактивността на nNOS в сърдечните мускулни влакна от миокарда. Ясно може да се наблюдават разликите в активността на ензима в субепикардния, средния и субендокардния слой на сърдечния мускул, както и разликите в експресията на ензима в различните домени на кардиомиоцитите – било то по периферията на клетката или интензивна активност вътре в цитоплазмата, перинуклеарно. Тези специфични характеристики на имунохистохимичната реакция позволяват да се направи сравнително точна и ясна качествена оценка на интензивността на оцветяването – липса на оцветяване, едва видимо оцветяване, умерено положително оцветяване и силно положително оцветяване, когато резултатът от реакцията е ясно видим. Прилагането на контраоцветяване с хематоксилин дава по-ясна и контрастна оценка на имунохистохимичната реакция, като диференцирано може да се отчете дали положителната активност на ензима е перинуклеарно, вътре в цитоплазмата или по периферията на кардиомиоцита. Направените положителни и отрицателни контроли доказват спецификата на имунохистохимичното изследване. Така получените резултати за имунореактивността на nNOS могат да се съпоставят в различните периоди и групи плъхове.

Постнаталните промени в кардиомиоцитите от лява и дясна камера на нормотензивни Wistar плъхове и SHR могат да се проследят и сравнят въз основа на комбинацията от проведеното сравнително хистологично изследване и имунохистохимичния анализ на експресията на nNOS.

## **2. Качествени характеристики на миокарда и кардиомиоцитите през различни етапи от постнаталното развитие при нормотензивни Wistar плъхове и SHR**

Върху хистологичните препарати от сърцата на плъховете бяха проследени промените в различните периоди от постнаталното развитие на нормотензивни Wistar плъхове и SHR. Отчетени бяха измененията в морфологията на свободната стена на лява и дясна камера, както и промените на изграждащите ги кардиомиоцити. Известно е, че най-интензивен растеж на тялото на плъховете се наблюдава до втория месец след раждането. Ето защо през този период състоянието на миокарда беше проследено при двуседмични и едномесечни плъхове. Освен това, установено е, че най-динамични промени в кардиомиоцитите при плъхове се наблюдават в периода преди настъпването на пубертета им (около 2 седмици след раждането), както и в ранния следпубертетен период (около 1 месец след раждането). След втория месец темповете на растеж се забавят и в шестия месец животните се намират в зряла възраст. По тази причина анализът на сърдечната стена на лява и дясна камера беше направен на тримесечни и шестмесечни животни.

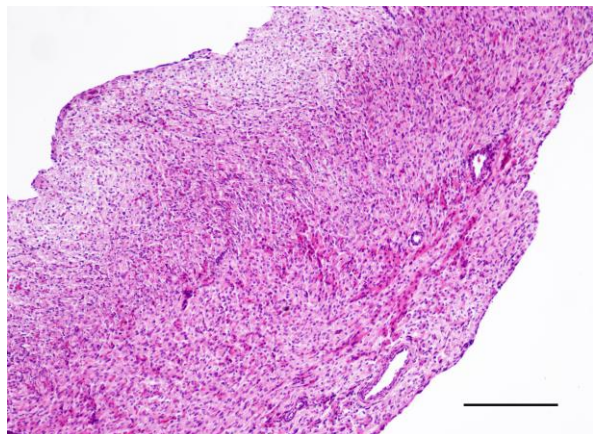
По литературни данни продължителността на живота на плъховете е от 2 до 3,5 години (Pass и Freeth 1993; Sharp и La Regina 1998). След двегодишна възраст, честотата на инфекциозните и неоплазмени заболявания нараства и голяма част от животните загиват. Затова групата изследвани животни в периода на старост в настоящата работа е дванадесетмесечни плъхове. Всички плъхове за изследване бяха подбрани в добро общо състояние и без физически установими белези на заболяване. Бяха отбелязани и някои особености във вземането и фиксирането на сърцата на животните. Най-проблемната група беше тази на двуседмичните животни, поради малките размери на сърцето. Тези особености създаваха проблеми при изваждането на сърцето и

последващите етапи на обработката му. Трудно беше приготвянето на хистологични срези, които да съдържат запазени стени на камерите.

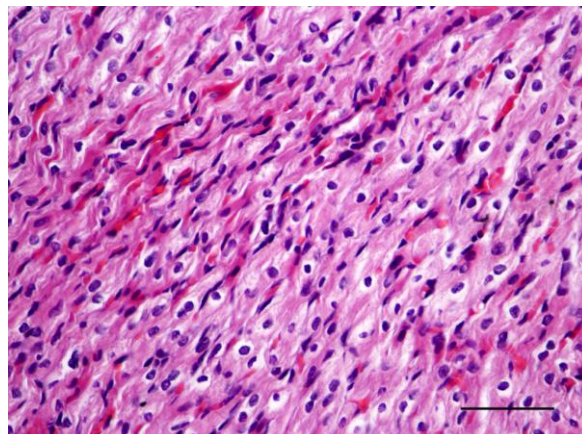
Групата на SHR беше разделена на два възрастови периода – млади животни (около 1-2 месец след раждането) и зрели животни (около 6 месец след раждането). Причината за това е, че при тази група плъхове развитието на хипертонията започва около 5-6 седмици след раждането, достигайки стойности 180-200 mmHg в зряла възраст. Така между шестия и дванадесетия месец от живота им започват да се развиват и органни промени и увреждания в резултат на хипертонията, и в частност хипертрофия на миокарда (Frohlich и Tarazi 1979; Imamura 1978). С напредването на възрастта на SHR има риск от развитие на инсулт и затова по-възрастни плъхове от тази група за целите на нашето изследване не са подходящи и не са използвани. Затова групата на зрелите животни около шестмесечна възраст е особено подходяща за установяване на хипертрофични изменения в миокарда и кардиомиоцитите и за сравнителен анализ със съответстващи им по възраст нормотензивни Wistar плъхове. Артериалната хипертония на тези групи плъхове е инструментално установена и документирана с неинвазивен метод на измерване, посредством поставяне на маншета на апарата на опашката на животното („tail-cuff” метод).

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 стрираност. Често сърдечните мускулни клетки имат едно централно разположено базофилно ядро. Понякога се откриват едно или няколко ядърца, а останалата част от ядрото има фина мрежеста организация. 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

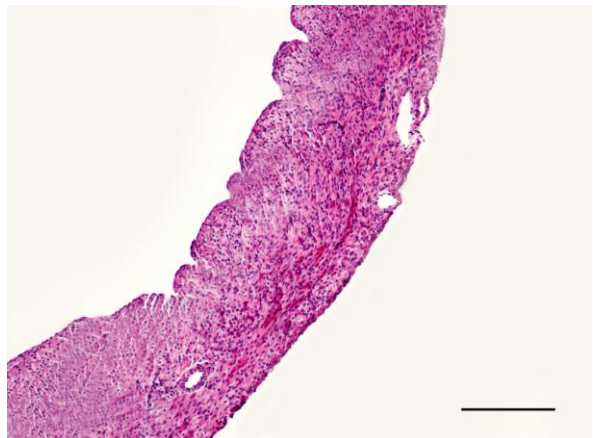
мускулни клетки. Ядрата на фибробластите са по-плоски от тези на кардиомиоцитите и се багрят по-интензивно. Наблюдава се добре изразена, по-бледо оцветена перинуклеарна зона. Виждат се и овални структури около сърдечните мускулни клетки, които всъщност са капиляри. Те са изпълнени с еритроцити (фиг. 1; 2; 3; 4).



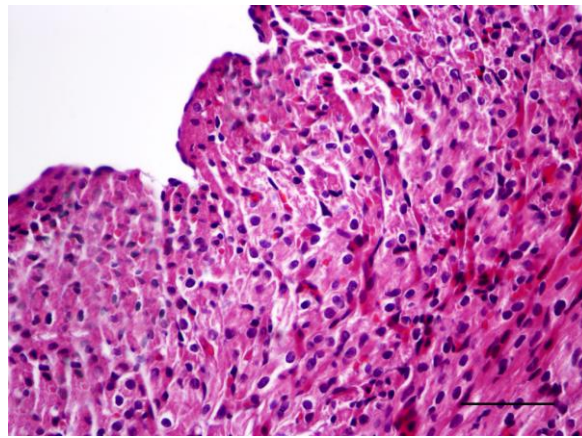
Фиг. 1. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 2 седмици, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .



Фиг. 2. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 2 седмици, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 400$ . Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .

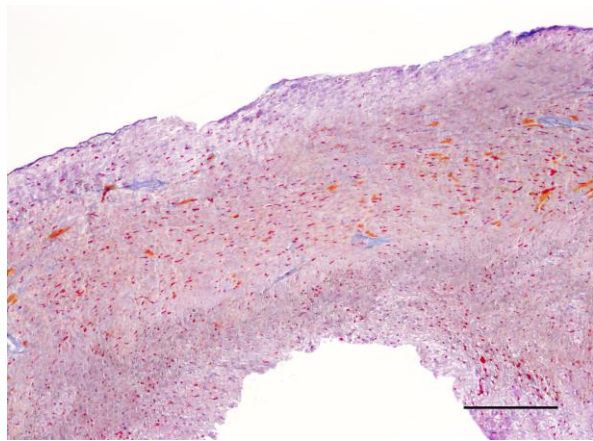


Фиг. 3. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 2 седмици, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .

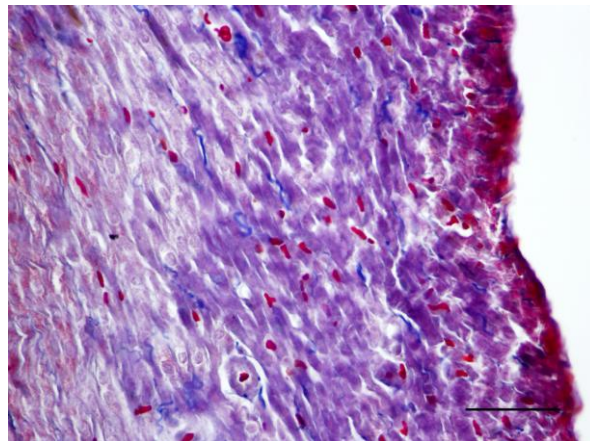


Фиг. 4. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 2 седмици, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 400$ . Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .

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 (фиг. 5; 6).



Фиг. 5. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 2 седмици, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .

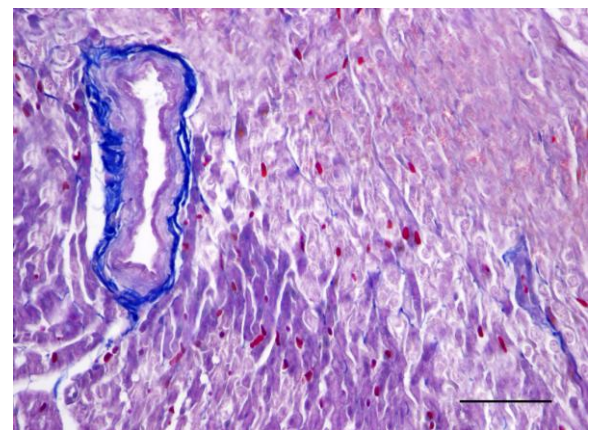


Фиг. 6. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 2 седмици, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 400$ . Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .

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. 7; 8).



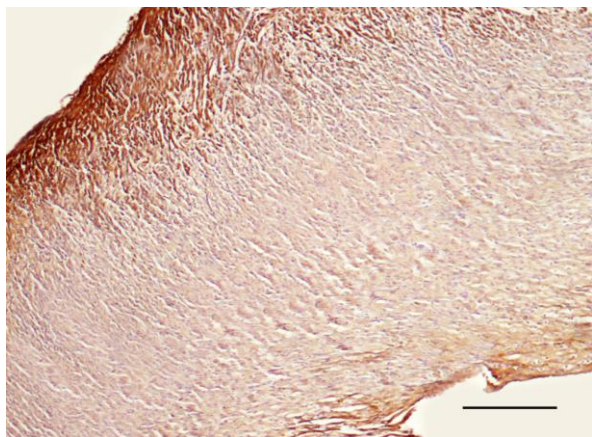
Фиг. 7. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 2 седмици, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .



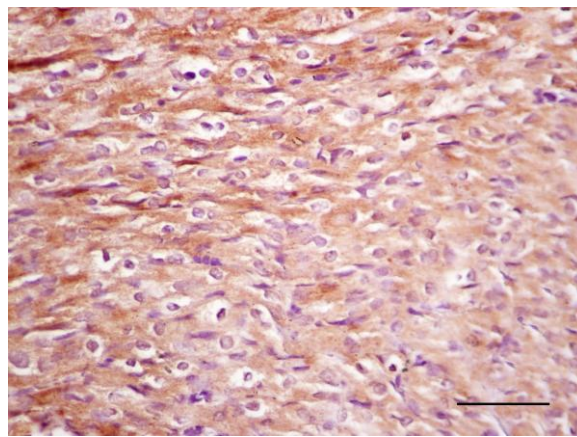
Фиг. 8. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 2 седмици, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 400$ . Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .

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 от надлъжните и напречните слоеве (фиг. 9; 10).

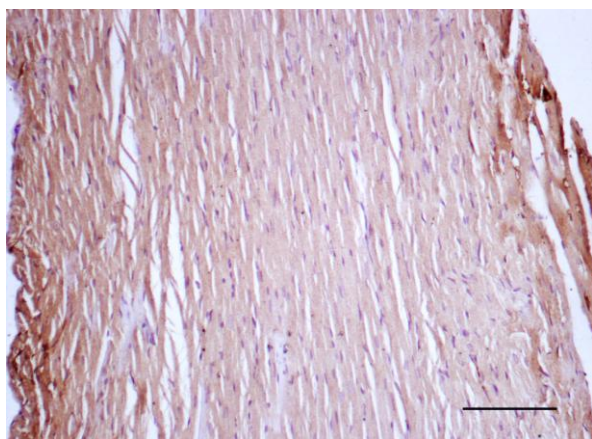


Фиг. 9. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 2 седмици, експресия на pNOS. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .

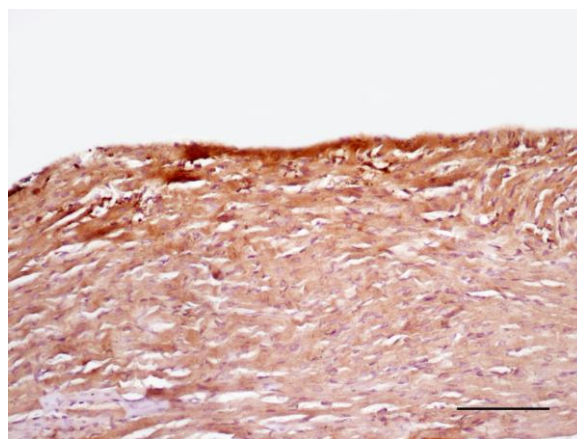


Фиг. 10. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 2 седмици, експресия на pNOS. Увеличение –  $\times 400$ . Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .

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 pNOS имунореактивност с тази в клетките на лявата камера (фиг. 11; 12).

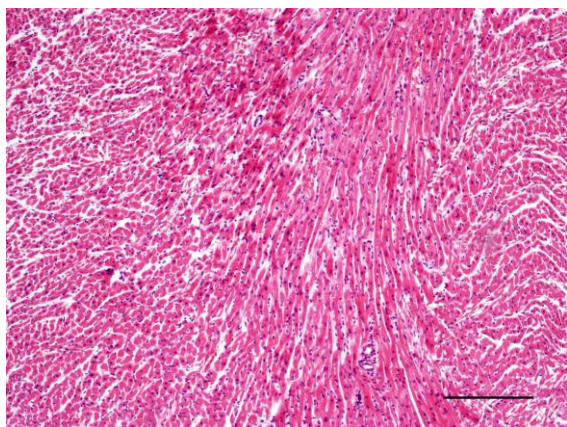


Фиг. 11. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 2 седмици, експресия на pNOS. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .

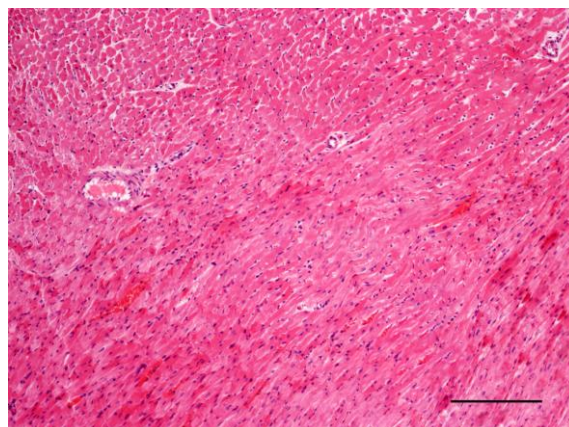


Фиг. 12. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 2 седмици, експресия на pNOS. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .

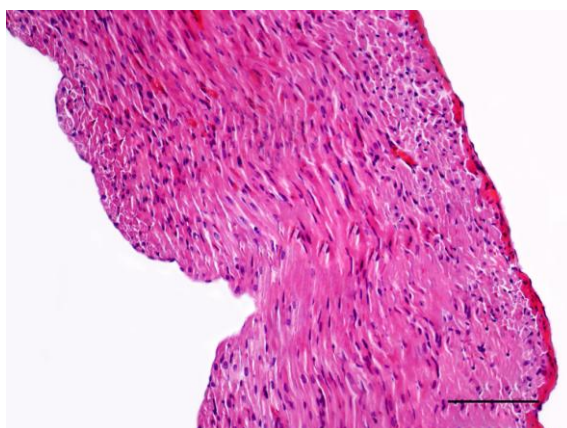
При младите възрастови групи (1 месец и 3 месеца) Wistar плъхове при оцветяването с ХЕ на увеличение  $\times 100$  се наблюдават ясно морфологичната организация на слоевете на миокарда както при лява, така и при дясна камера (фиг. 13; 14; 15; 16). Ясно се забелязват сноповете от надлъжно разположени 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.



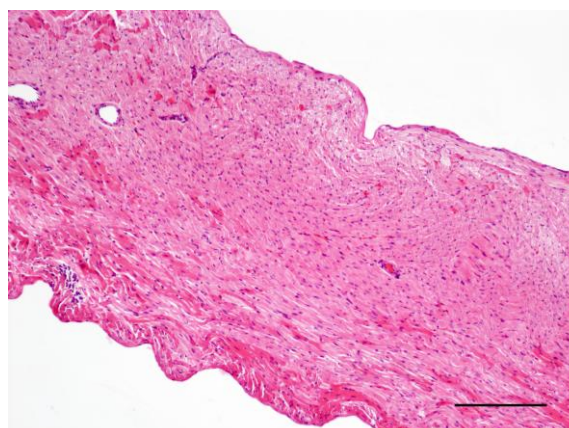
Фиг. 13. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 1 месец, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .



Фиг. 14. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 3 месеца, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .



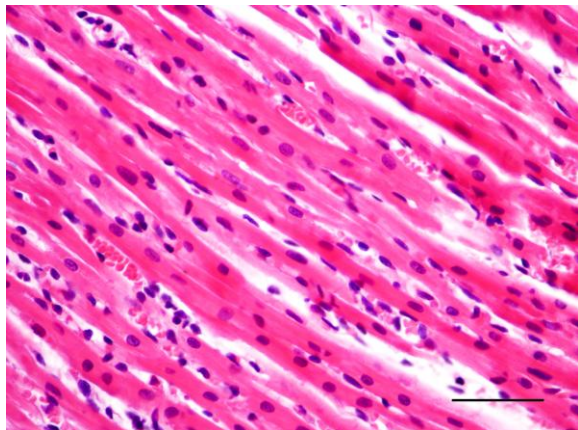
Фиг. 15. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 1 месец, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .



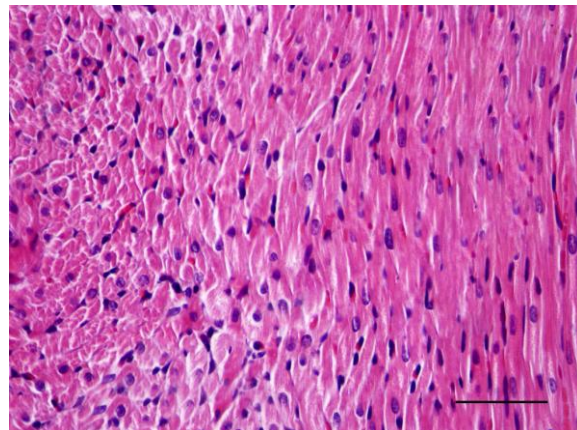
Фиг. 16. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 3 месеца, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .

При увеличения  $\times 200$  и  $\times 400$  при оцветяване с ХЕ на надлъжен срез, кардиомиоцитите от лява и дясна камера изглеждат еозинофилни, напречно стриирани, имат едно или две централно разположени базофилни

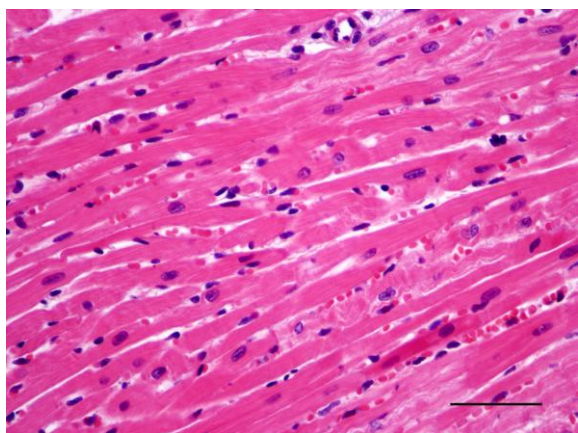
ядра (фиг. 17; 18; 19; 20). В някои от тях се откриват едно или няколко интензивно оцветени ядърца, а останалата част от ядрото има фина мрежеста организация. Изглежда, че миофибрилите заобикалят ядрото, като често в перинуклеарната зона не се наблюдава стрираност.



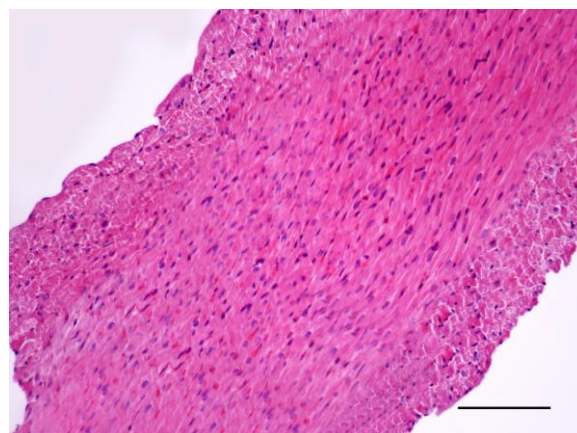
Фиг. 17. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 1 месец, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 400$ . Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$



Фиг. 18. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 1 месец, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 400$ . Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .



Фиг. 19. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 3 месеца, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 400$ . Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .



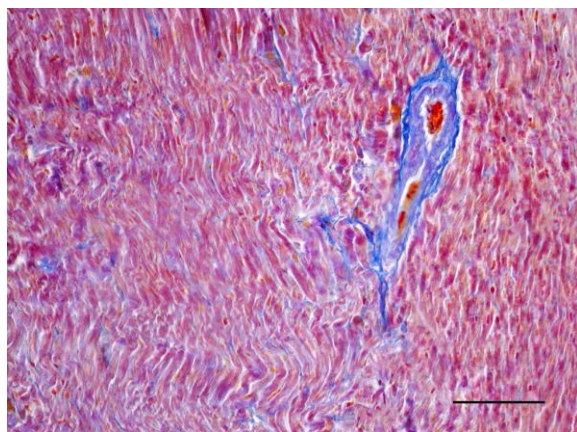
Фиг. 20. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 3 месеца, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .

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

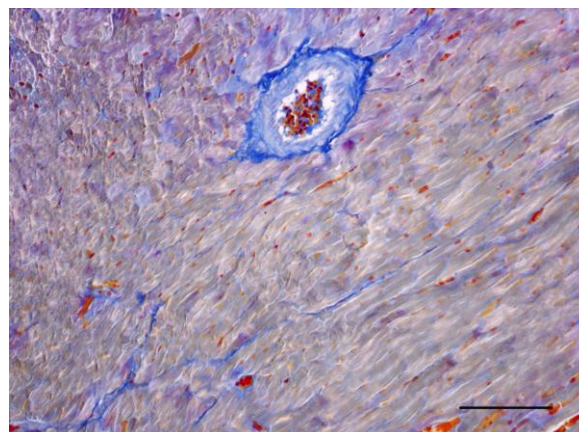
фибробластите и фиброцитите са плоски и се багрят по-интензивно базофилно от тези на кардиомиоцитите .

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 капилляри. Наблюдаваните малки, оптически празни овални структури около сърдечните мускулни клетки са именно капиллярите. Задебелените части на капилярната стена маркират разположението на ядрата на ендотелните клетки. Виждат се и големи кръвоносни съдове, в чийто лумен се откриват еритроцити. Характерно е, че те са разположени интрамурално.

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. 21; 22; 23; 24; 25). 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 подредането им не е строго организирано.

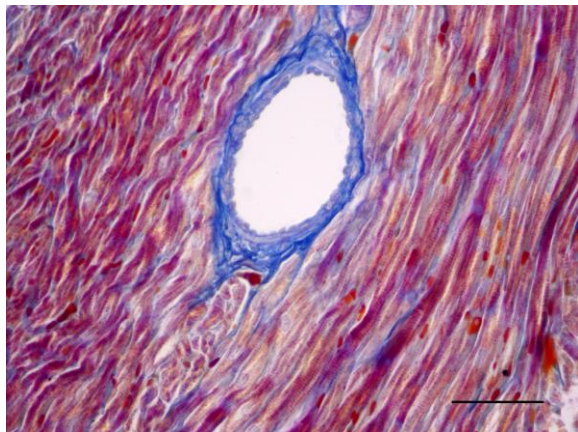


Фиг. 21. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 1 месец, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .

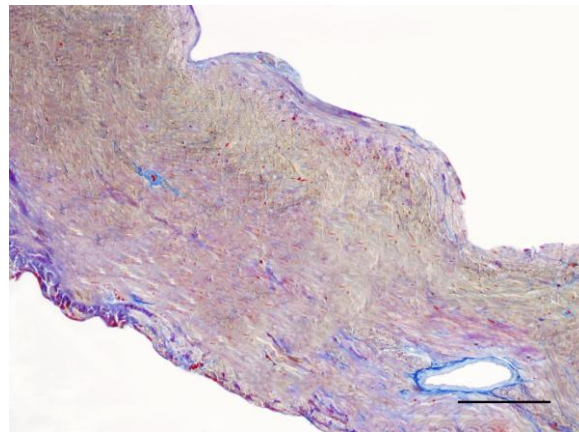


Фиг. 22. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 3 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .

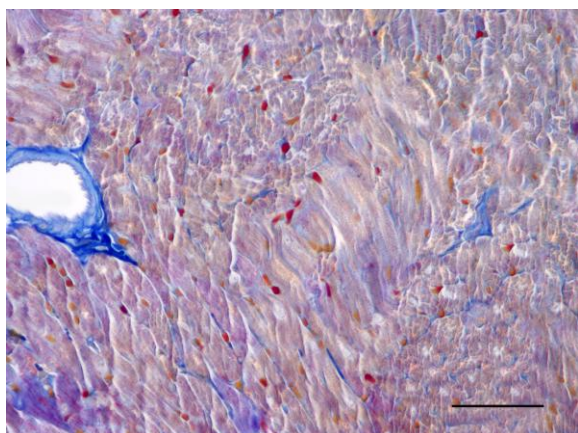
При лявата камера на тримесечните животни те са сравнително по-дебели и имат спираловидно нагънат ход, за разлика от тези в лявата камера на едномесечните животни (фиг. 22; 26). Те са сравнително по-къси и в по-малко количество. В стената на дясна камера и при двете възрастови



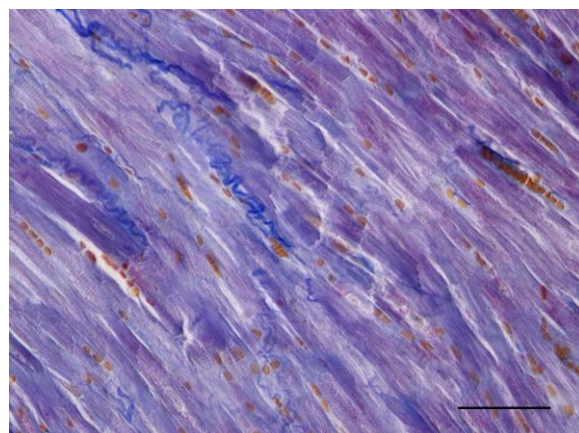
Фиг. 23. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 1 месец, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 400$ . Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .



Фиг. 24. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 3 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .



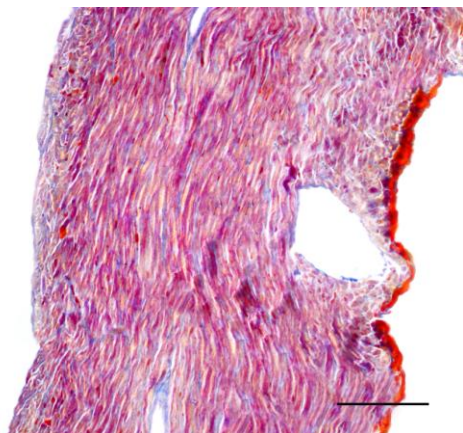
Фиг. 25. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 3 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 400$ . Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .



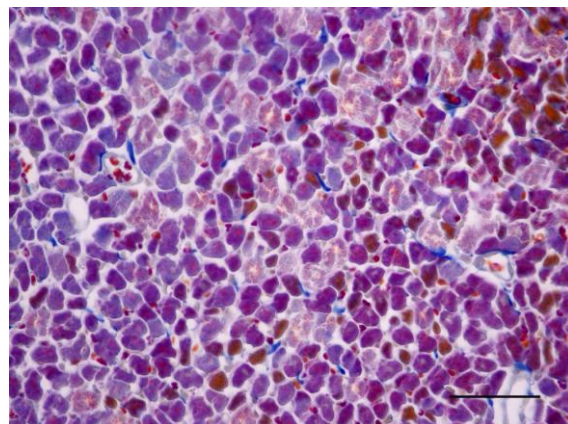
Фиг. 26. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 3 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 400$ . Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .

групи се наблюдават изключително по-къси и в по-малко количество колагенни влакна разположени в интерстициалното пространство (фиг. 24; 25; 27). Забелязва се и прорастване на тънки и къси фиброзни повлекла от периваскуларното пространство между кардиомиоцитите в двете камери (фиг. 22; 23; 25; 28). Кардиомиоцитите и ядрата им се оцветяват в червено-лилаво с различен интензитет, а на надлъжен срез се наблюдава напречна

стрираност. Еластичните влакна се багрят в розово, а еритроцитите - в жълто или червено-оранжево.

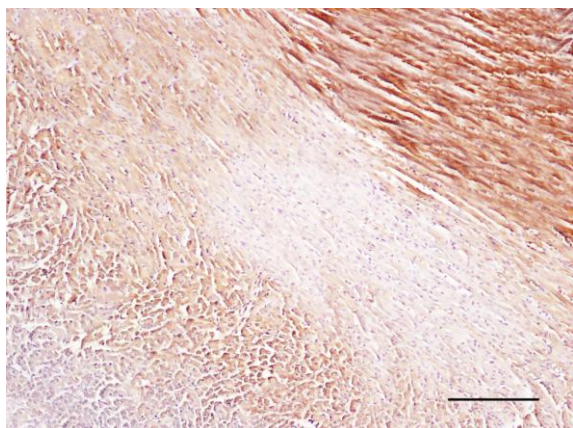


Фиг. 27. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 1 месец, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .

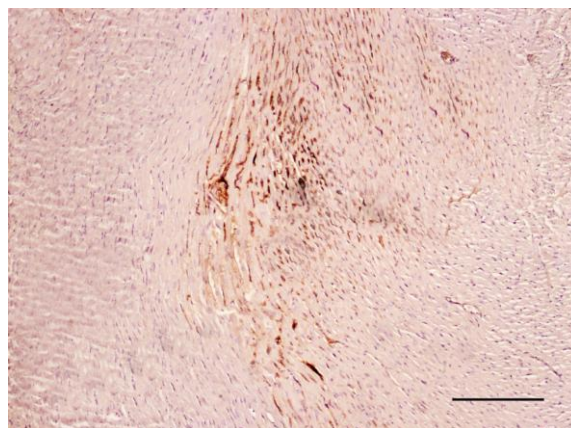


Фиг. 28. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 1 месец, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 400$ . Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .

Имунохистохимичното оцветяване за pNOS 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. 29). 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. 30, 31).



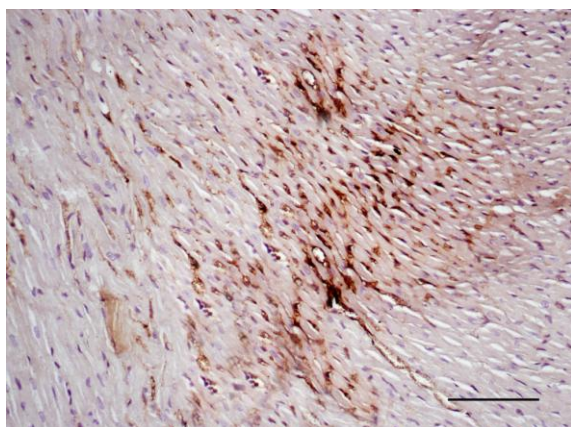
Фиг. 29. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 1 месец, експресия на pNOS. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .



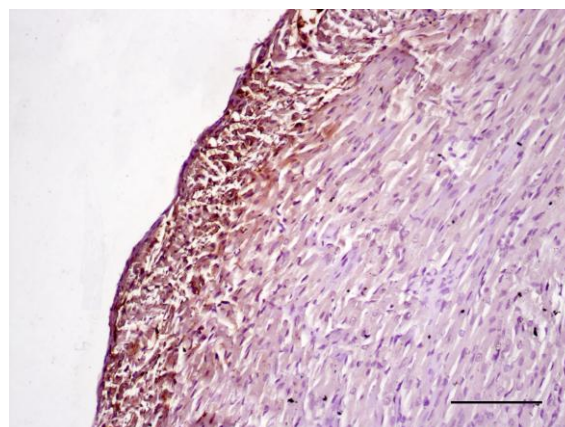
Фиг. 30. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 3 месеца, експресия на pNOS. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .

Ензимът се визуализира предимно по периферията на кардиомиоцита, което се установява ясно както на надлъжен, така и на напречен срез (фиг. 31).

В дясната камера при едномесечните възрастни групи силно положителна имунореактивност се открива предимно в субепикардния и субендокардния участък на миокарда (фиг. 32). Едва видима остава активността в средния слой на миокарда.

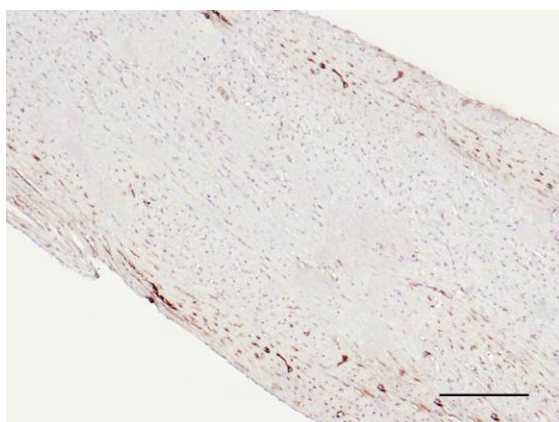


Фиг. 31. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 3 месеца, експресия на pNOS. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия –  $100 \mu\text{m}$ .

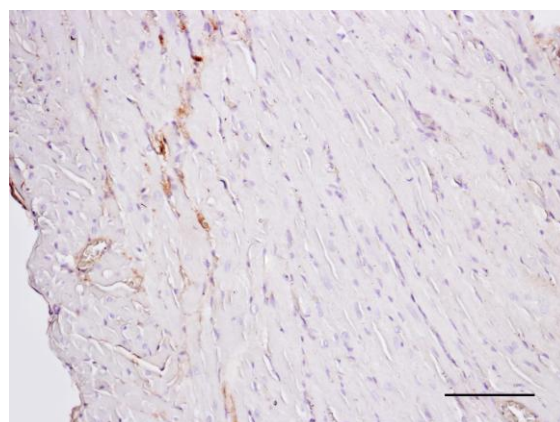


Фиг. 32. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 1 месец, експресия на pNOS. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия –  $100 \mu\text{m}$ .

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. 33; 34).

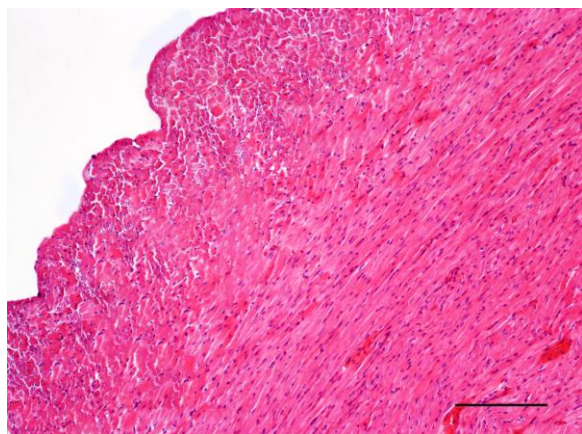


Фиг. 33. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 3 месеца, експресия на pNOS. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия –  $200 \mu\text{m}$ .

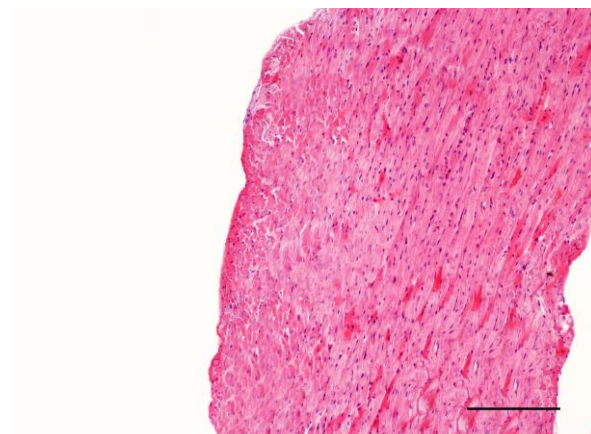


Фиг. 34. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 3 месеца, експресия на pNOS. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия –  $100 \mu\text{m}$ .

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 (фиг. 35; 36). В перинуклеарната зона не се наблюдава стрираност. Ясно се забелязват добре изразени снопове от напречно и надлъжно разположени сърдечни мускулни влакна. Кардиомиоцитите се разклоняват и анастомозират помежду си, формирайки сложна мрежеста структура. Всяко мускулно влакно е обвито от ендомизиум от съединителна тъкан и перимизиум с капилярна мрежа. Откриват се известно количество 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.



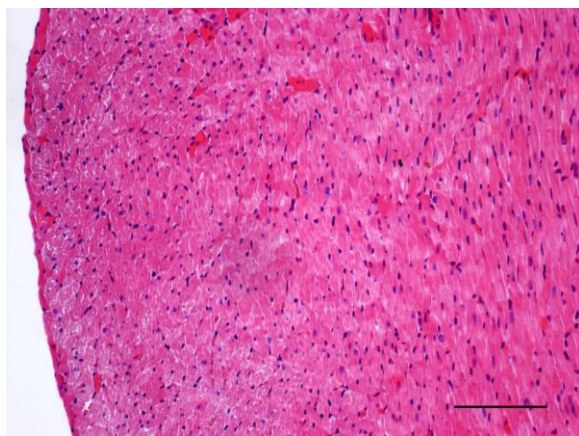
Фиг. 35. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 6 месеца, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .



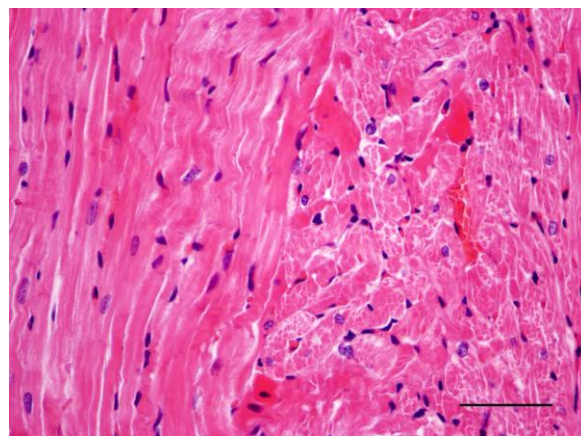
Фиг. 36. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 6 месеца, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .

На напречен срез, ядрата на кардиомиоцитите са централно разположени (фиг. 37; 38). Между снопчетата от сърдечни мускулни клетки се наблюдава умерено изразена съединителна тъкан, в която се откриват ядрата на фибробластите и фиброцитите. Те могат да бъдат разположени и по периферията на мускулното влакно. Около кардиомиоцитите се откриват капиляри, които изглеждат като оптически празни овални структури около сърдечните мускулни клетки. Задебелените части на капилярната стена маркират разположението на ядрата на

ендотелните клетки. Виждат се и интрамурално разположени големи кръвоносни съдове. Наблюдава се хипертрофия на кардиомиоцитите със стесняване на интерстициалното пространство. Вижда се лека неутрофилна инфилтрация, пикнотични ядра и 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.



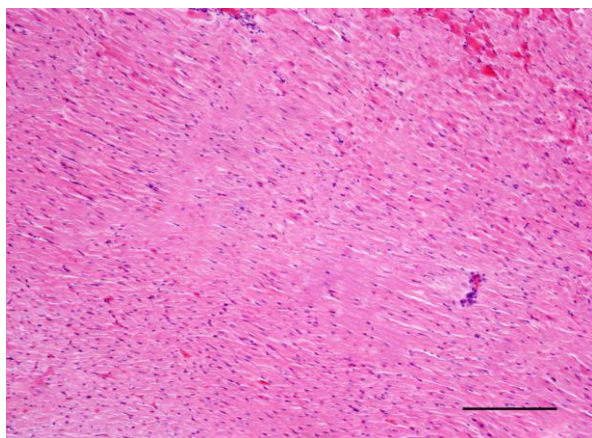
Фиг. 37. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 6 месеца, хематоксилин и еозин. Увеличение – х200. Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .



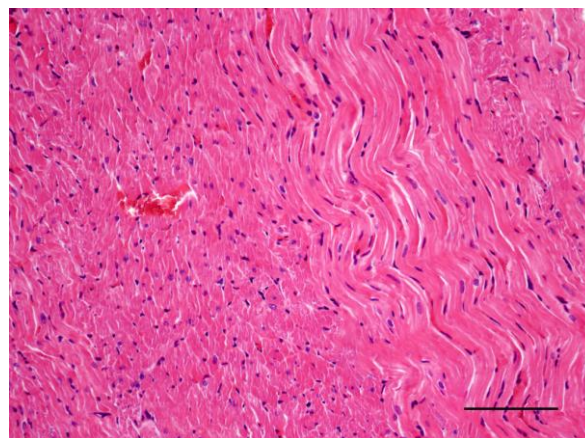
Фиг. 38. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 6 месеца, хематоксилин и еозин. Увеличение – х400. Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .

При възрастните дванадесетмесечни Wistar плъхове възрастово обусловените промени, наблюдавани в стената на лява и дясна камера при оцветяване с ХЕ са най-добре изразени (фиг. 39; 40; 41). Наблюдават се снопове от големи надлъжно разположени хипертрофични сърдечни мускулни влакна с големи базофилни ядра с мрежовидна структура и добре видими ядърца. Наблюдават се и хипертрофични снопове кардиомиоцити от напречните слоеве и стесняване на интерстициалното пространство. Много по-рядко се откриват капилляри 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 миоцитолита: изолирани

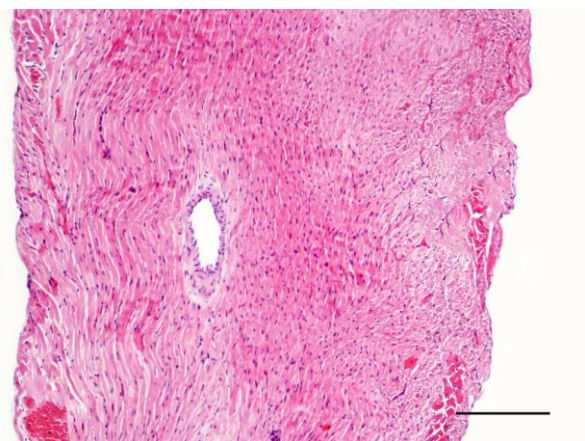
кардиомиоцити, които изглеждат „празни”, т.е. в тях не се откриват ядра и напречна стриираност, а цитоплазмата се багри по-интензивно еозинофилно (фиг. 42).



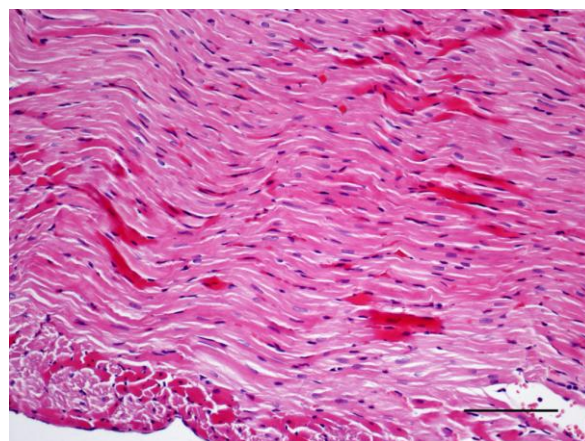
Фиг. 39. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 12 месеца, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .



Фиг. 40. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 12 месеца, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .



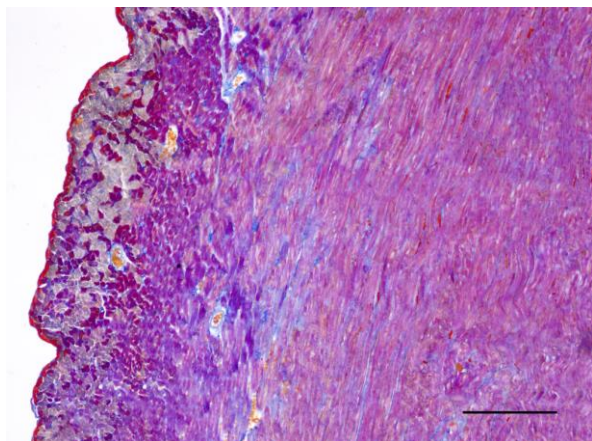
Фиг. 41. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 12 месеца, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .



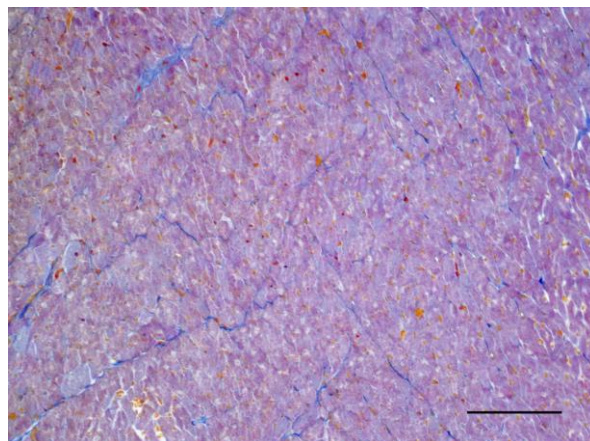
Фиг. 42. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 12 месеца, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .

Умерено количество колагенни влакна, предимно периваскуларно и в интерстициума се установява при оцветяването по Малори в стената на лява камера на зрели (шестмесечни) плъхове (фиг. 43). Виждат се интензивно сини, сравнително дълги и анастомозиращи помежду си колагенни влакна в интерстициалното пространство (фиг. 44). При възрастните (дванадесетмесечни) плъхове, колагенните влакна в стената на лява камера са в голямо количество в периваскуларното пространство и в интерстициума, като подреждането им не е строго организирано (фиг. 45).

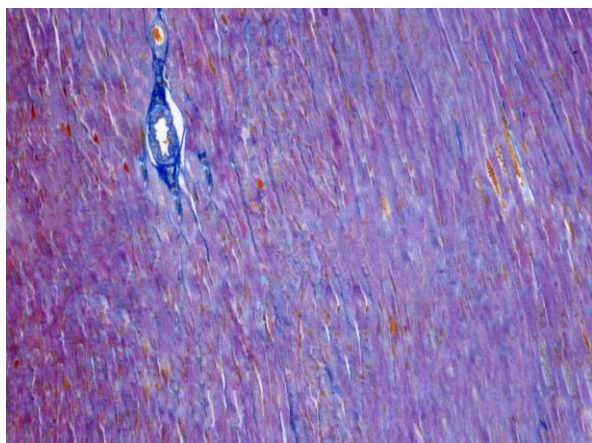
Те са по-дебели и имат спираловидно нагънат ход (фиг. 46). Съединителната тъкан на перимизиума е добре изразена. Кардиомиоцитите и ядрата им се оцветяват в червено-лилаво с различен интензитет, а на надлъжен срез се наблюдава напречна стрираност. Еластичните влакна се багрят в розово, а еритроцитите - в жълто или червено-оранжево.



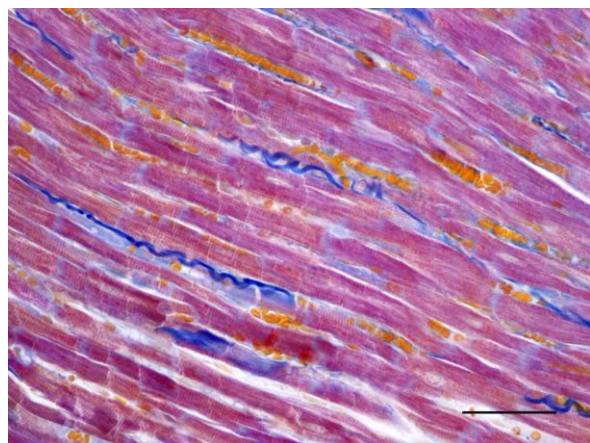
Фиг. 43. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 6 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .



Фиг. 44. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 6 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .



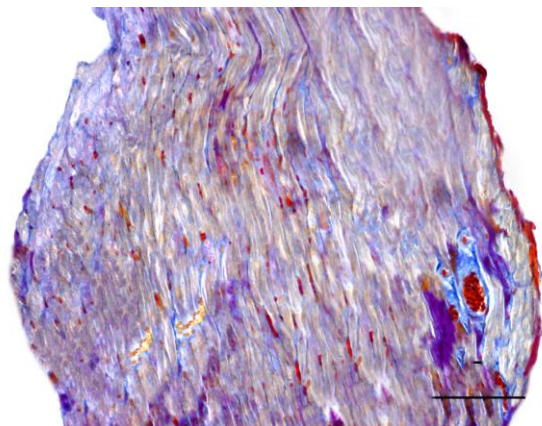
Фиг. 45. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 12 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .



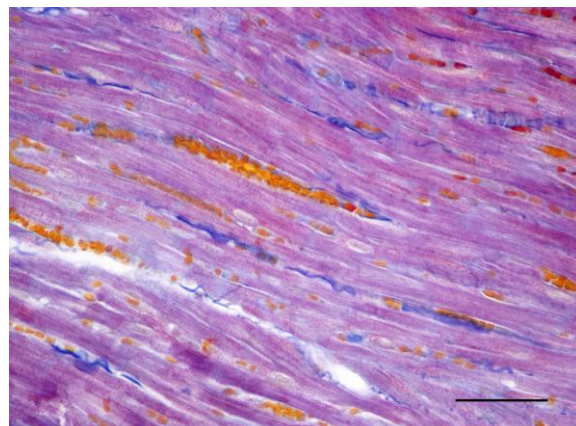
Фиг. 46. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 12 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 400$ . Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .

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. 47; 48; 49; 50). Колагенните влакна са по-тънки и по-къси. Периваскуларната съединителна тъкан е в

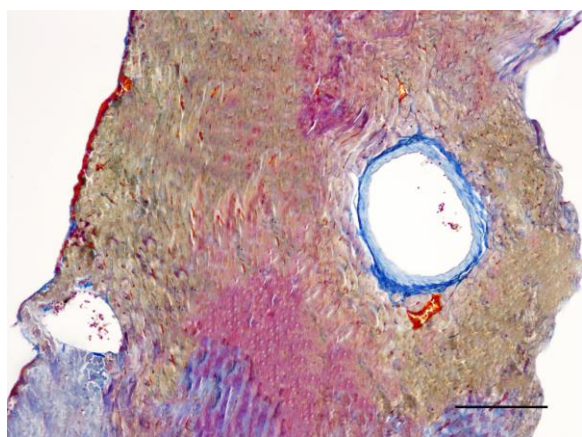
по-малко количество и прорастването на колагенни влакна от периваскуларното пространство в интерстициума е по-слабо изразено.



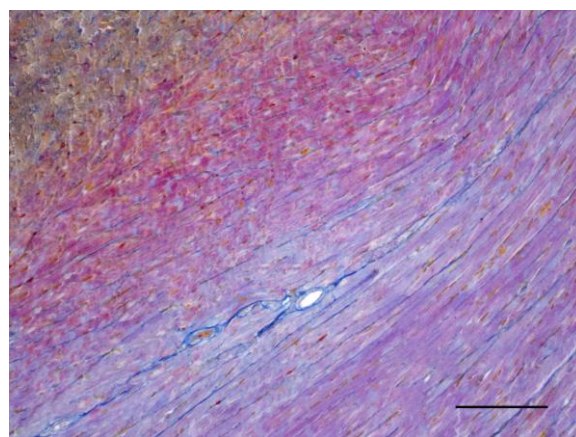
Фиг. 47. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 6 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .



Фиг. 48. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 6 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 400$ . Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .



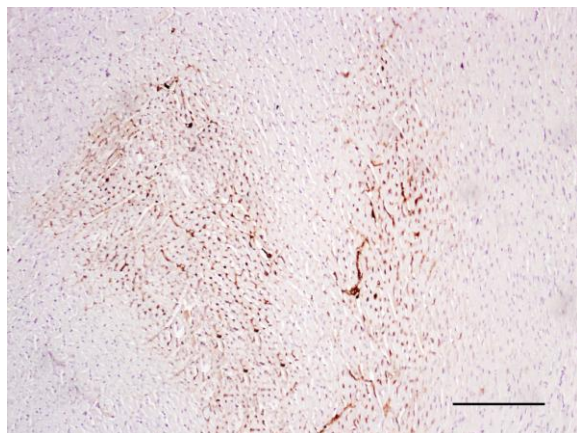
Фиг. 49. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 12 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .



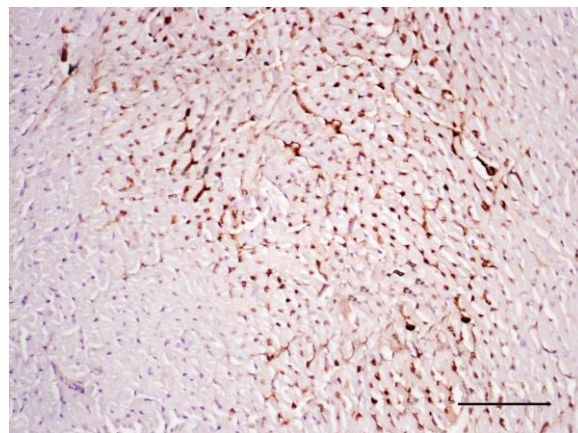
Фиг. 50. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 12 месеца, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .

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 (фиг. 51; 52; 53; 54). Наблюдава се едва видима активност в субепикардния и субендокардния участък от стената на камерата. Интензитетът е по-силно положителен при дванадесетмесечните животни, като отново се локализира в средния участък на стената на лявата камера. Наблюдава се ясно, че активността на ензима се концентрира предимно по периферията на кардиомиоцитите (фиг. 55). Забеляват се централно разположените

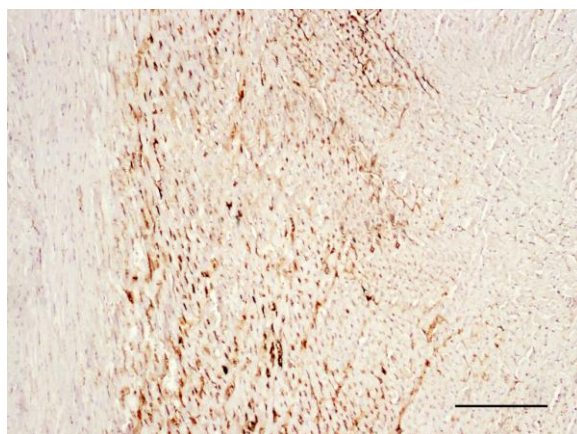
базофилно оцветени ядра от хематоксилина на сърдечните мускулни клетки и оптически празно пространство около тях.



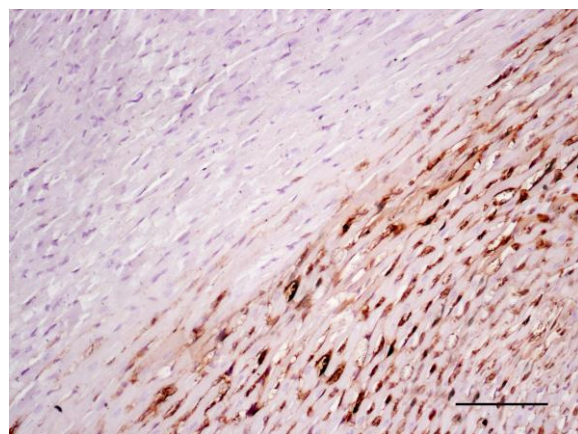
Фиг. 51. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 6 месеца, експресия на pNOS. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .



Фиг. 52. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 6 месеца, експресия на pNOS. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .

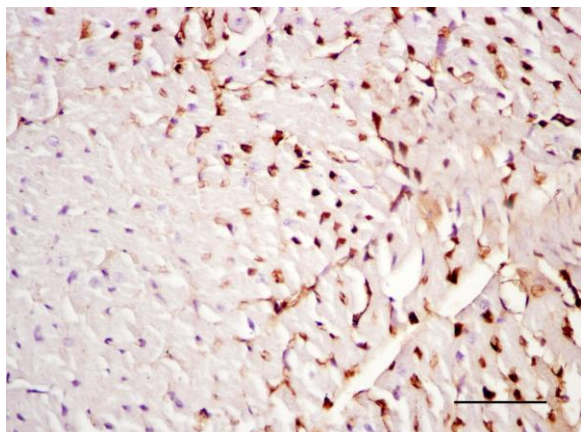


Фиг. 53. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 12 месеца, експресия на pNOS. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .

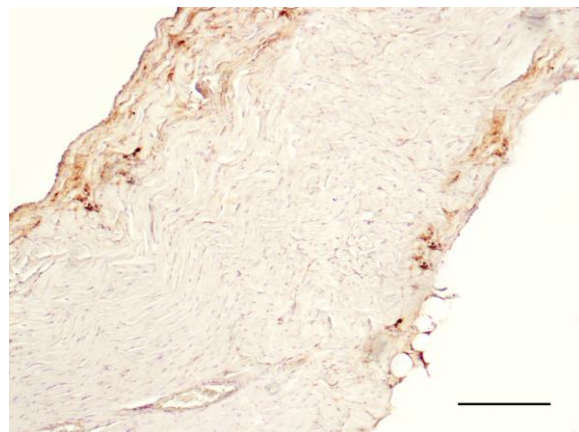


Фиг. 54. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 12 месеца, експресия на pNOS. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .

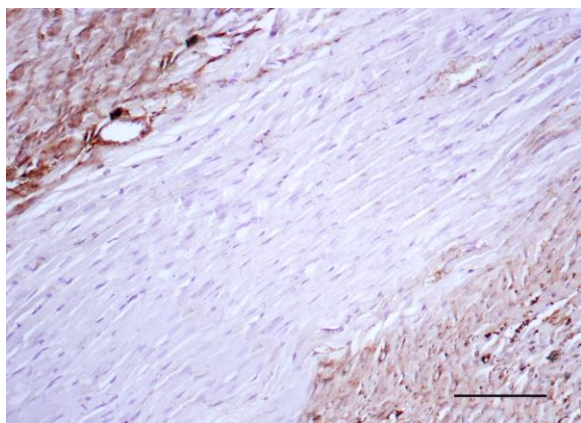
В дясната камера, силно положителна експресия на ензима pNOS се открива предимно в субепикардния и субендокардния участък на стената на камерата, както при шестмесечните, така и при дванадесетмесечните животни (фиг. 56; 57). Едва видима до липсваща е активността в средния участък на стената. Интензитетът на имунохистохимичната реакция нараства с напредване на възрастта. Наблюдава се отчетливо локализиране на активността на ензима предимно по периферията на кардиомиоцитите (фиг. 58). Отново се виждат ясно централно разположени базофилни ядра, с оптически празно пространство около тях.



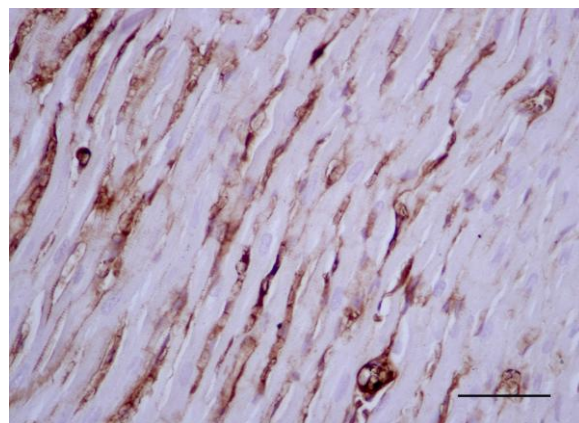
Фиг. 55. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 6 месеца, експресия на pNOS. Увеличение – x400. Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .



Фиг. 56. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 6 месеца, експресия на pNOS. Увеличение – x100. Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .



Фиг. 57. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 12 месеца, експресия на pNOS. Увеличение – x200. Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .

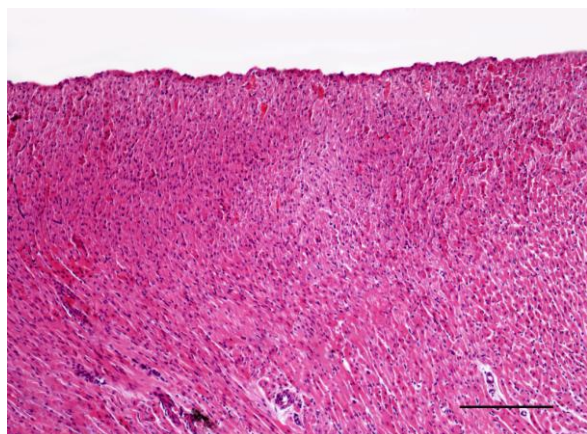


Фиг. 58. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 12 месеца, експресия на pNOS. Увеличение – x400. Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .

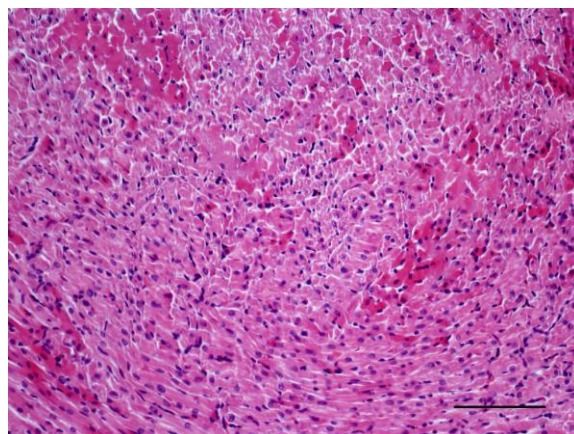
При младите (едномесечни) SHR, при оцветяването с ХЕ, на надлъжен срез, кардиомиоцитите от лявата камера са еозинофилни, напречно стриирани, имат едно или две централно разположени базофилни ядра. В повечето от тях се откриват едно или няколко интензивно оцветени ядръца, а останалата част от ядрото има фина мрежеста организация. Кардиомиоцитите се разклоняват и анастомизират помежду си, формирайки сложна мрежеста структура. 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, разположени между сърдечните мускулни клетки. Ядрата на фибробластите и фиброцитите са плоски и се багрят по-интензивно базифилно 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, в която се разполагат ядрата на фибробластите и фиброцитите. Около кардиомиоцитите се откриват множество капиляри. Наблюдаваните малки, оптически празни овални структури около сърдечните мускулни клетки са именно капилярите. Виждат се и големи интрамурално разположени кръвоносни съдове, в чийто лумен се наблюдават еритроцити (фиг. 59; 60).

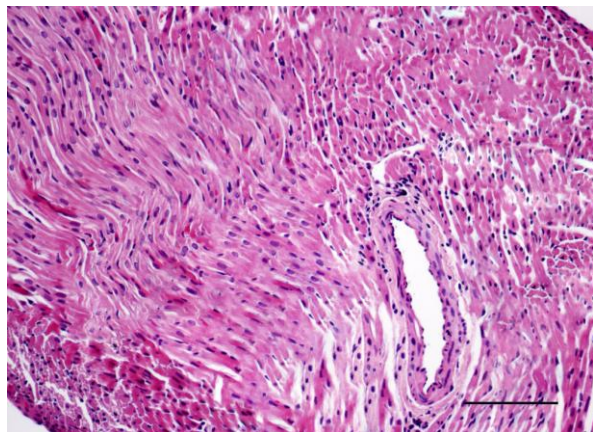


Фиг. 59. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 1 месец, SHR, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .

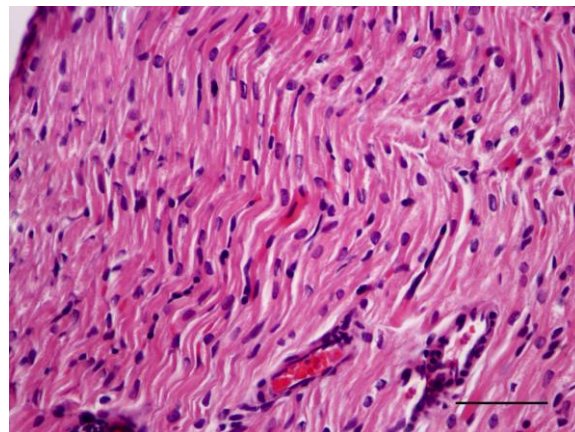


Фиг. 60. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 1 месец, SHR, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .

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. Виждат се интрамурално разположените кръвоносни съдове. Ясно се забелязват и добре оформените снопове от надлъжно разположени кардиомиоцити (фиг. 61; 62).

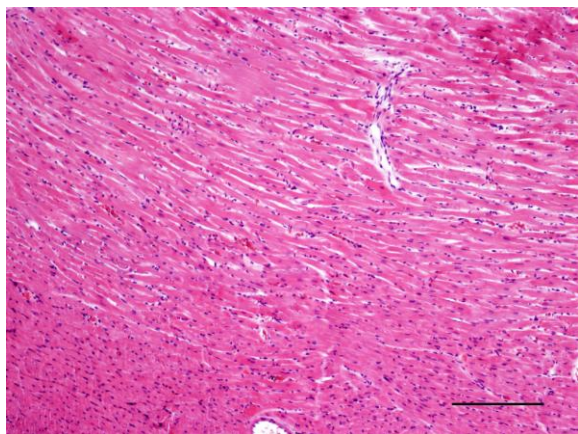


Фиг. 61. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 1 месец, SHR, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .

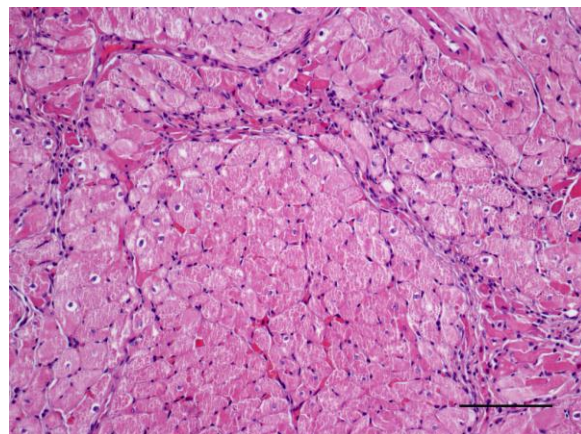


Фиг. 62. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 1 месец, SHR, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 400$ . Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .

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. Може да се наблюдава и фокална миоцитолита: изолирани кардиомиоцити, които изглеждат „празни”, т.е. в тях не се откриват ядра и напречна стрираност, а цитоплазмата се багри по-интензивно еозинофилно. В нея се наблюдава хиалинна дегенерация, вакуолизация и разграждане на саркомерите (фиг. 63; 64).

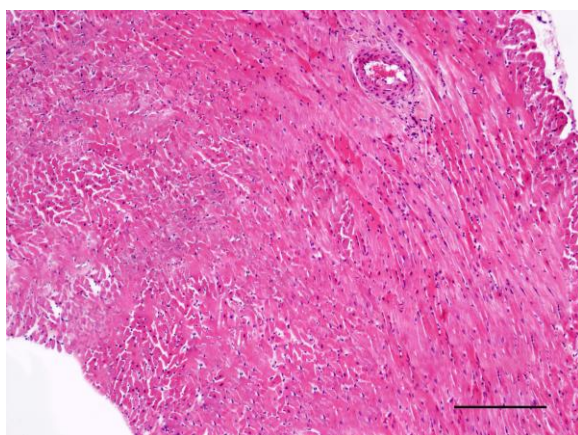


Фиг. 63. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 6 месеца, SHR, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .

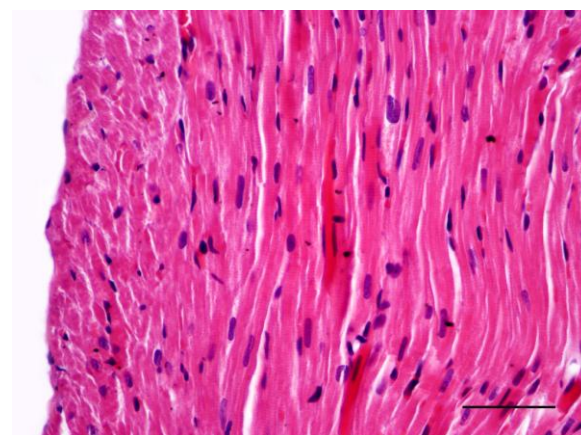


Фиг. 64. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 6 месеца, SHR, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .

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. 65; 66).



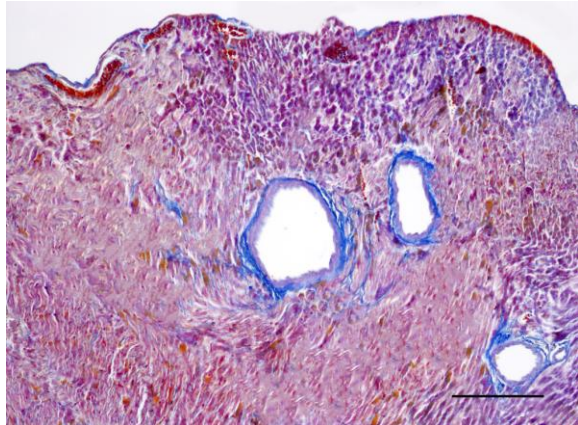
Фиг. 65. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 6 месеца SHR, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .



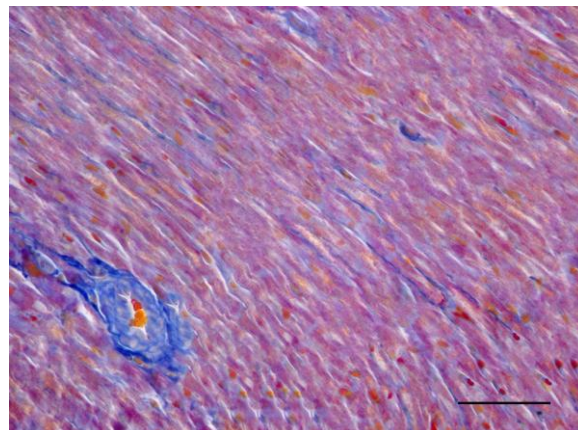
Фиг. 66. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 6 месеца, SHR, хематоксилин и еозин. Увеличение –  $\times 400$ . Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .

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 багряват интензивно в наситено син цвят. Нарядко разположени, сравнително къси

колагенни влакна, следващи хода на кардиомиоцитите, се наблюдават и в интерстициалното пространство (фиг. 67; 68).

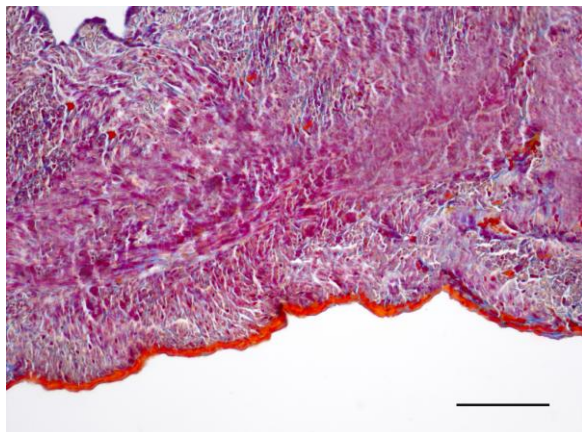


Фиг. 67. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 1 месец, SHR, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .

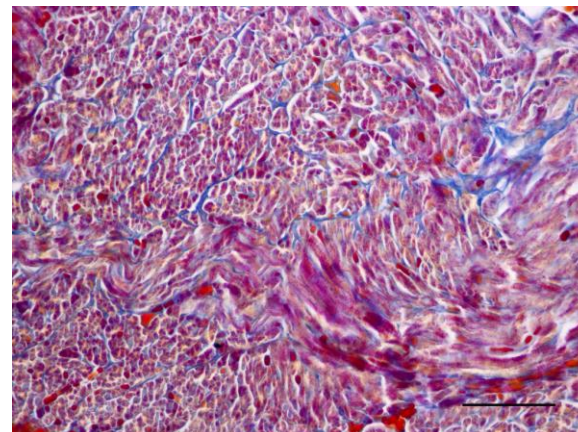


Фиг. 68. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 1 месец, SHR, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 400$ . Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .

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. 69; 70).



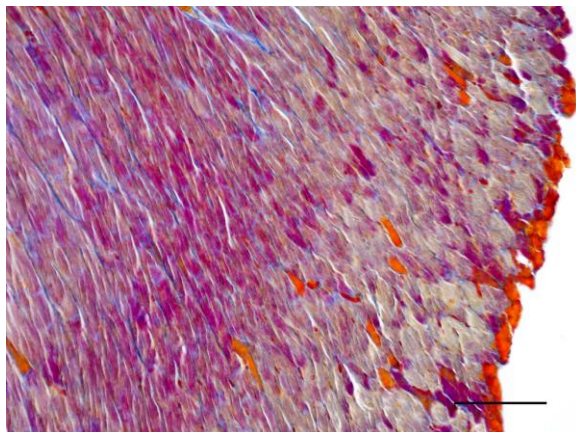
Фиг. 69. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 1 месец, SHR, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .



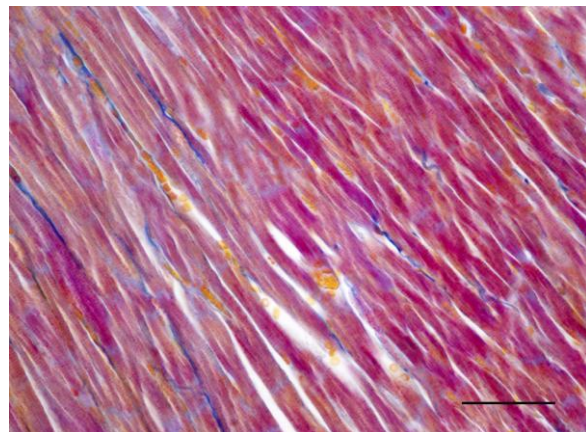
Фиг. 70. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 1 месец, SHR, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 400$ . Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .

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

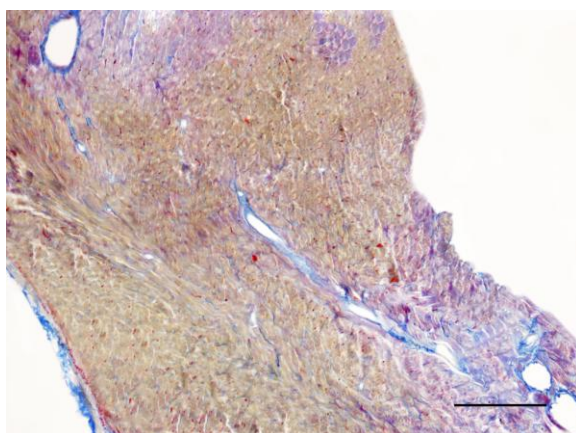
в съединителната тъкан на перимизиума, като подреждането им не е строго организирано. Те са по-дебели и имат спираловидно нагънат ход. Оформят добре изразени мрежовидни структури. Прорастването на фиброзни повлекла от периваскуларното пространство се наблюдава при почти всички интрамурално разположени кръвоносни съдове (фиг. 71; 72; 73; 74).



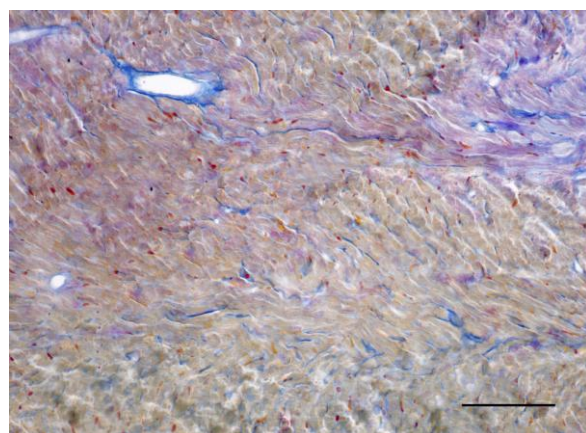
Фиг. 71. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 6 месеца, SHR, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .



Фиг. 72. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 6 месеца, SHR, оцветяване по Малори. Увеличение –  $\times 400$ . Размерна линия – 50  $\mu\text{m}$ .



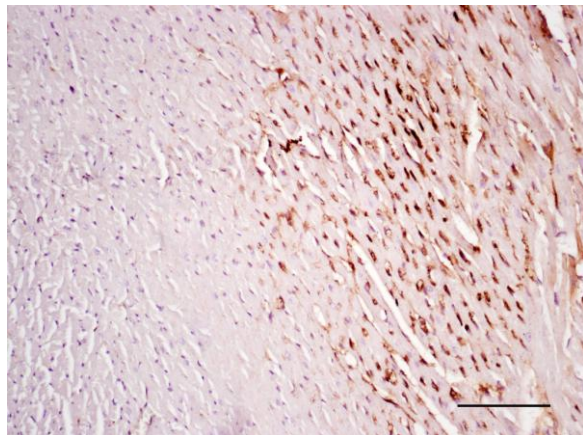
Фиг. 73. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 6 месеца, SHR, оцветяване по Малори. Увеличение – 100. Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .



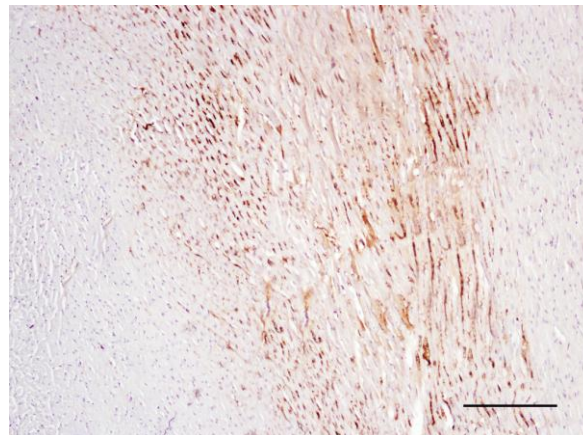
Фиг. 74. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 6 месеца, SHR, оцветяване по Малори. Увеличение – 200. Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .

Имунохистохимичната реакция за nNOS показва идентично разпределение на активността на ензима в стената на лявата камера при млади (едномесечни) и зрели (шестмесечни) 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. 75; 76).

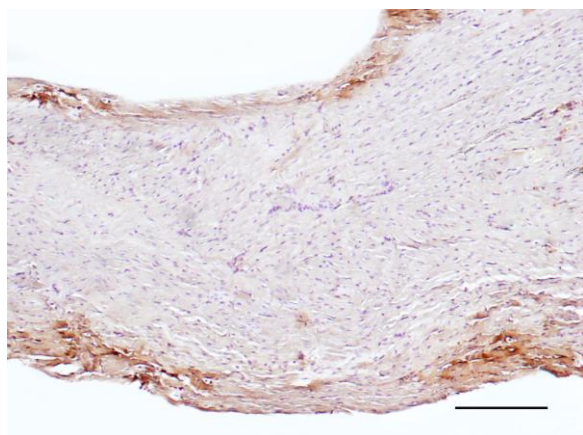


Фиг. 75. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 1 месец, SHR, експресия на pNOS. Увеличение –  $\times 200$ . Размерна линия – 100  $\mu\text{m}$ .

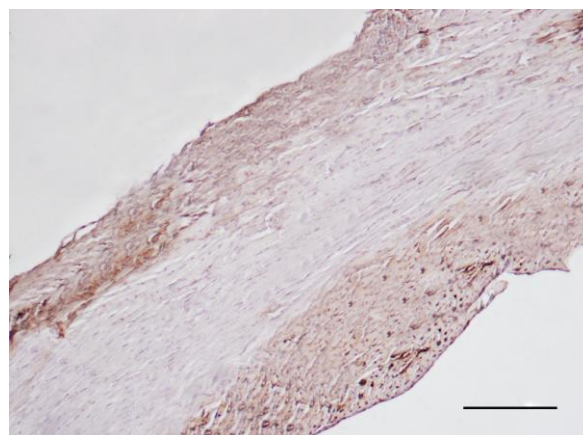


Фиг. 76. Препарат от миокард на лява камера, възраст – 6 месеца, SHR, експресия на pNOS. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .

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. 77; 78).



Фиг. 77. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 1 месец, SHR, експресия на pNOS. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .



Фиг. 78. Препарат от миокард на дясна камера, възраст – 6 месеца, SHR, експресия на pNOS. Увеличение –  $\times 100$ . Размерна линия – 200  $\mu\text{m}$ .

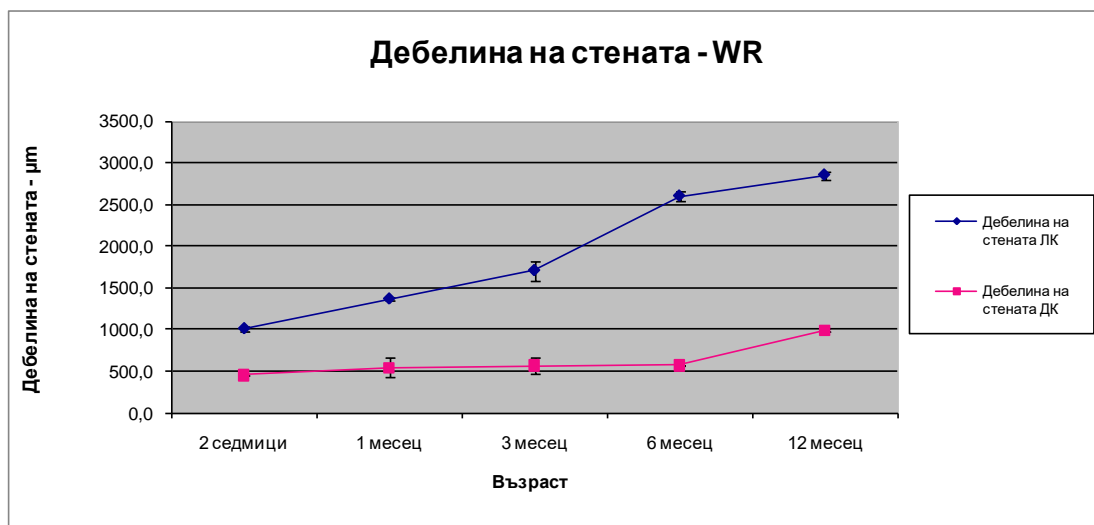
### **3. Количествени характеристики на миокарда и кардиомиоцитите през различни етапи от постнаталното развитие при Wistar плъхове**

Количествените данни върху морфологията на свободната стена на лява и дясна камера при нормотензивни Wistar плъхове, както и на кардиомиоцитите бяха получени при анализ на произволно подбрани области, без големи и масивни разкъсвания на миокарда предизвикани от лабораторната обработка на препаратите. Морфометричните характеристики са представени систематизирано в следващите страници и са организирани в следната последователност:

- Индивидуални данни за дебелината на сърдечната стена на лява и дясна камера за всяка отделна възрастова група при Wistar плъховете.
- Индивидуални данни за основните морфометрични показатели на кардиомиоцитите и гъстотата на капилярната мрежа в миокарда на лява и дясна камера за всяка отделна възрастова група при Wistar плъховете.

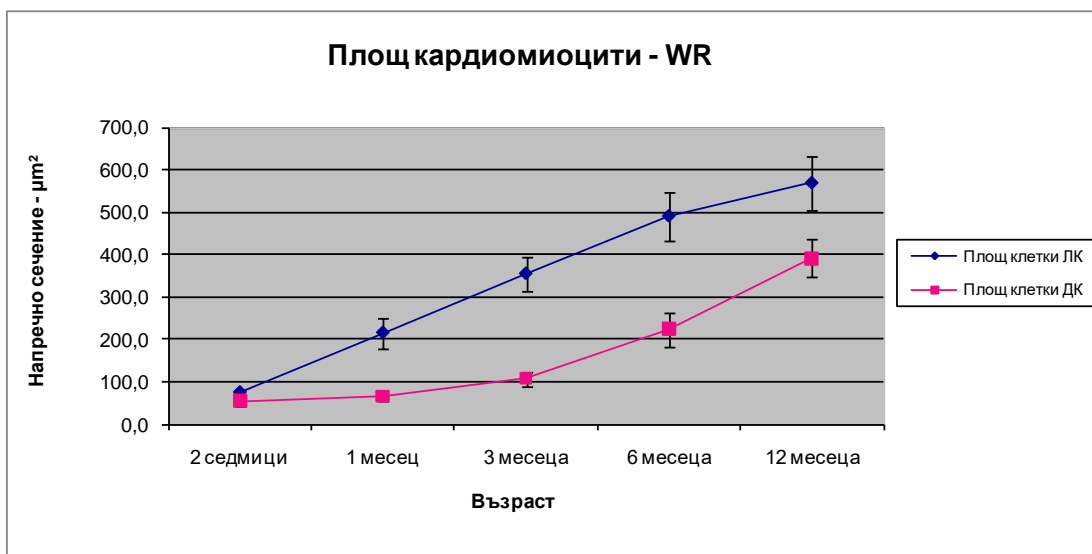
Следват графики и диаграми, представящи анализ в динамиката на отделните количествени показатели през различни периоди от постнаталното развитие на нормотензивни Wistar плъхове:

- Дебелина на свободната стена на лява и дясна камера ( $\mu\text{m}$ );
- Напречно сечение на кардиомиоцитите ( $\mu\text{m}^2$ );
- Напречно сечение на ядрата на кардиомиоцитите ( $\mu\text{m}^2$ );
- Ядрено-цитоплазмено отношение;
- Гъстота на кардиомиоцитите (брой клетки/ $\text{mm}^2$ );
- Гъстота на капиляриите (брой капиляри/ $\text{mm}^2$ ).

**Динамика на дебелината на стената на лява и дясна камера:**

WR	Лява камера		Дясна камера		TTEST
	Дебелина стена		Дебелина стена		
Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	Ср. стойност	Ст. откл.	
2 седмици	1006,0	22,6	455,7	2,1	p<0,001
1 месец	1362,0	21,2	540,7	114,5	p<0,001
3 месец	1702,7	123,7	561,3	96,8	p<0,001
6 месец	2596,3	60,1	571,3	2,12	p<0,001
12 месец	2848,3	47,3	989,8	21,2	p<0,001

Промените в показателя дебелина на свободната стена на лява и дясна камера при различните възрастови групи плъхове показват значителни разлики. Динамиката в дебелината на свободната стена на лявата камера показва динамично нарастване в постнаталния 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.

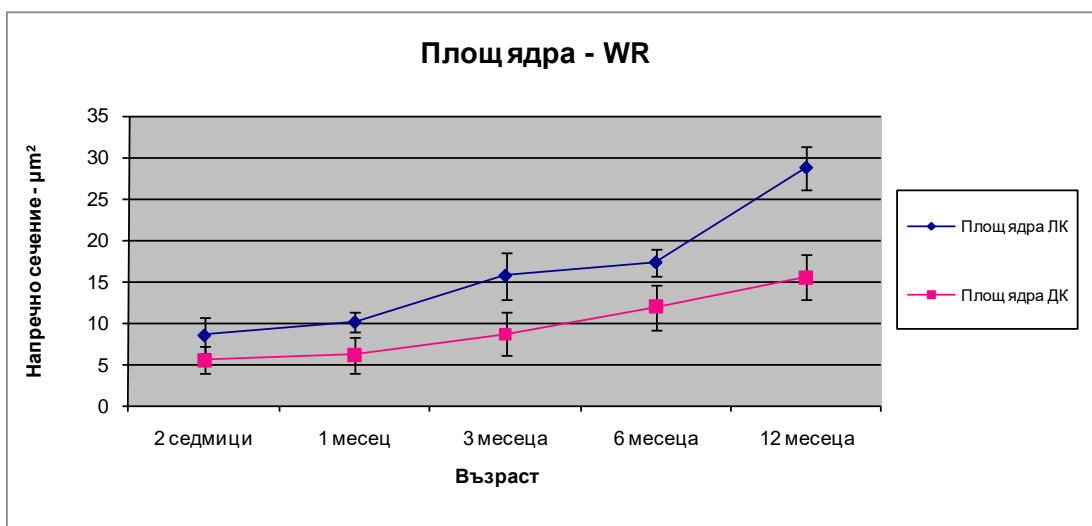
**Динамика на напречното сечение на кардиомиоцитите:**

WR	Лява камера		Дясна камера			TTEST
	Площ кардиомиоцити	Ст. откл.	Възраст	Площ кардиомиоцити	Ст. откл.	
<b>Възраст</b>	Ст. стойност	Ст. откл.	<b>Възраст</b>	Ст. стойност	Ст. откл.	
<b>2 седмици</b>	73,6	8,1	<b>2 седмици</b>	54,2	10,1	p<0,001
<b>1 месец</b>	214,7	35,3	<b>1 месец</b>	65,8	12,6	p<0,001
<b>3 месец</b>	354,2	41,1	<b>3 месец</b>	107,7	16,6	p<0,001
<b>6 месец</b>	490,1	55,9	<b>6 месец</b>	223,6	39,2	p<0,001
<b>12 месец</b>	568,5	62,4	<b>12 месец</b>	391,6	45,5	p<0,001

Като един основен морфометричен показател, напречното сечение на клетката отразява детайлно промените в големината на кардиомиоцитите през различните периоди. Погледнат в цялост за различните групи от постнаталното развитие 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

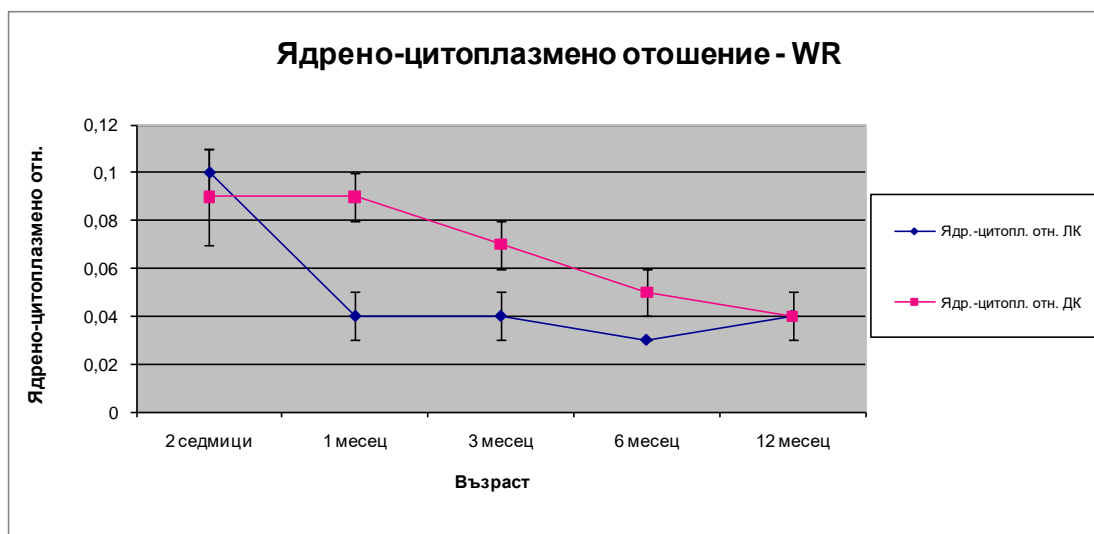
наблюдава интензивно нарастване на стойностите през всички периоди. От графиката се забелязва, че след третия месец, напречното сечение на кардиомиоцитите от дясната камера също нараства динамично.

### *Динамика на напречното сечение на ядрата на кардиомиоцитите:*



WR	Лява камера		Дясна камера			TTEST
	Площ ядра		Площ ядра			
Възраст	Ст. стойност	Ст. откл.	Възраст	Ст. стойност	Ст. откл.	
2 седмици	8,5	2,2	2 седмици	5,5	1,6	p<0,001
1 месец	10,1	1,2	1 месец	6,1	2,2	p<0,001
3 месец	15,7	2,8	3 месец	8,6	2,6	p<0,001
6 месец	17,3	1,7	6 месец	11,9	2,7	p<0,001
12 месец	28,7	2,7	12 месец	15,5	2,7	p<0,01

Промените в напречното сечение на ядрата на сърдечните мускулни клетки от лява и дясна камера за целия постнатален период показват предимно равномерно нарастване. Интензивна динамика на този показател се наблюдава между първия и третия месец от постнаталното 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.

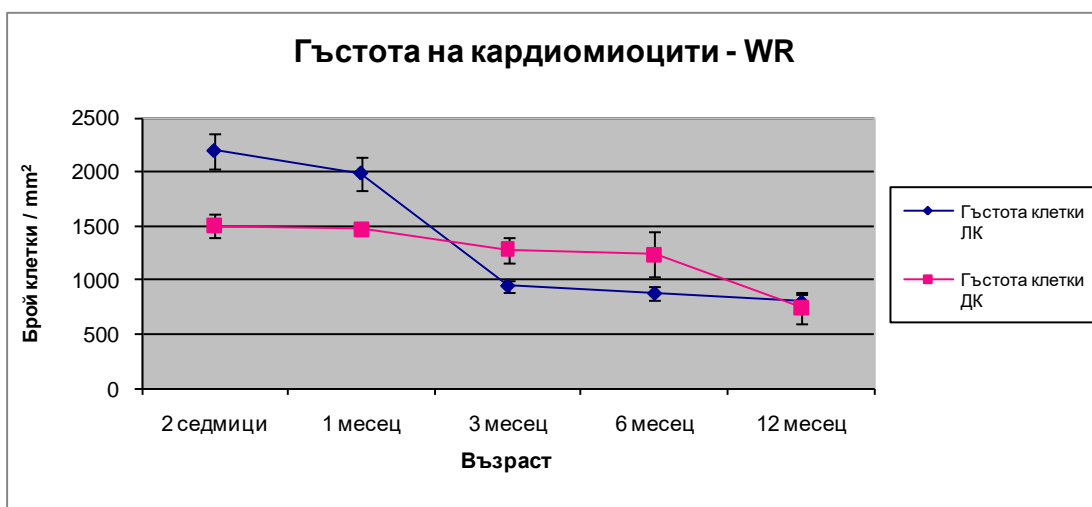
**Динамика на ядрено-цитоплазменото отношение:**

WR	Лява камера		Дясна камера			TTEST
	Отношение		Отношение			
Възраст	Ст. стойност	Ст. откл.	Възраст	Ст. стойност	Ст. откл.	
2 седмици	0,1	0,01	2 седмици	0,09	0,02	p<0,001
1 месец	0,04	0,01	1 месец	0,09	0,01	p<0,001
3 месец	0,04	0,01	3 месец	0,07	0,01	p<0,001
6 месец	0,03	0	6 месец	0,05	0,01	p<0,001
12 месец	0,04	0,01	12 месец	0,04	0	p<0,05

Показателят ядрено-цитоплазмено отношение в настоящата работа зависи от отношението между напречното сечение на ядрото и напречното сечение на кардиомиоцита. Както беше посочено, като цяло, клетъчната големина нараства постепенно и сравнително равномерно. Показателят напречно сечение на ядрото има почти идентична динамика – оттук следва и сравнително равномерният характер на промените в ядрено-цитоплазменото отношение. Подробното и детайлно разглеждане на промените на този показател между двуседмичните и едномесечните плъхове разкрива интересен, по-значителен спад при кардиомиоцитите от лява камера, докато при сърдечните мускулни клетки от дясна камера динамиката е с минимална разлика. Интересно е да се отбележи, че се наблюдава леко покачване на ядрено-цитоплазменото отношение при кардиомиоцитите от лявата камера между шестмесечните и

дванадесетмесечните животни. Тази динамика е резултат от значителното нарастване на напречното сечение на ядрото при кардиомиоцитите от лявата камера при същите групи животни. Забелязва се, че при дванадесетмесечните плъхове ядрено-цитоплазменото отношение на кардиомиоцитите от лява и дясна камера е с еднаква стойност. За целия постнатален период 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 ядрото на кардиомиоцитите от лява и дясна камера през периодите от постнаталното развитие.

### *Динамика на гъстотата на кардиомиоцитите:*

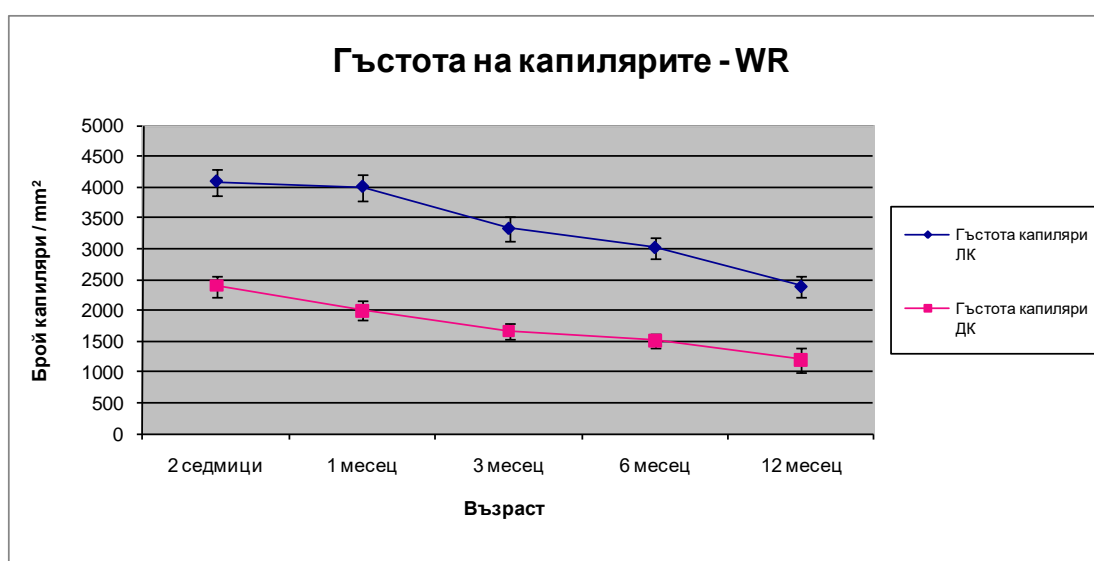


WR	Лява камера		Дясна камера			TTEST
	Брой клетки/mm <sup>2</sup>	Ст. откл.	Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	
<b>Възраст</b>	Ср. стойност	Ст. откл.	<b>Възраст</b>	Ср. стойност	Ст. откл.	
<b>2 седмици</b>	2193,5	168,6	<b>2 седмици</b>	1502,2	113,3	p<0,001
<b>1 месец</b>	1987,3	150,9	<b>1 месец</b>	1468,6	55,9	p<0,001
<b>3 месец</b>	950,5	54,1	<b>3 месец</b>	1281,3	114,6	p<0,001
<b>6 месец</b>	880,7	65,2	<b>6 месец</b>	1237,1	208,1	p<0,001
<b>12 месец</b>	800,6	73,7	<b>12 месец</b>	743,9	143,1	p<0,05

Промените в стойностите на гъстотата на кардиомиоцитите от лява и дясна камера 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.

### *Динамика на гъстотата на капилярите:*



WR	Лява камера		Дясна камера			TTEST
	Брой капиляри/mm2		Брой капиляри/mm2			
Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	
2 седмици	4081,6	213,1	2 седмици	2400,1	170,3	p<0,001
1 месец	3997,6	209,5	1 месец	1998,1	152,6	p<0,001
3 месец	3325,1	198,9	3 месец	1662,3	115,9	p<0,001
6 месец	3019,4	176,1	6 месец	1509,8	118,8	p<0,001
12 месец	2395,5	171,1	12 месец	1197,3	195,9	p<0,001

За целия постнатален период стойностите на показателя гъстота на капилярите равномерно и плавно намаляват както при дясната камера, така и при лявата камера. Промените в динамиката на този показател са обратнопропорционални на напречното сечение на сърдечните мускулни клетки при всички възрастови групи от постнаталното 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 постнаталния период от развитието на животните значително изостава в сравнение с нарастването на площта на сърдечните мускулни клетки както при лява, така и при дясна камера.

Наблюдаваните промени в показателите отразяват тенденция на възрастово обусловена хипертрофия. Те са по-динамични и с по-ранно начало в лявата камера и настъпват значително по-плавно в дясната камера.

#### **4. Сравнителна характеристика на миокарда и кардиомиоцитите през различни етапи от постнаталното развитие при нормотензивни Wistar плъхове и SHR**

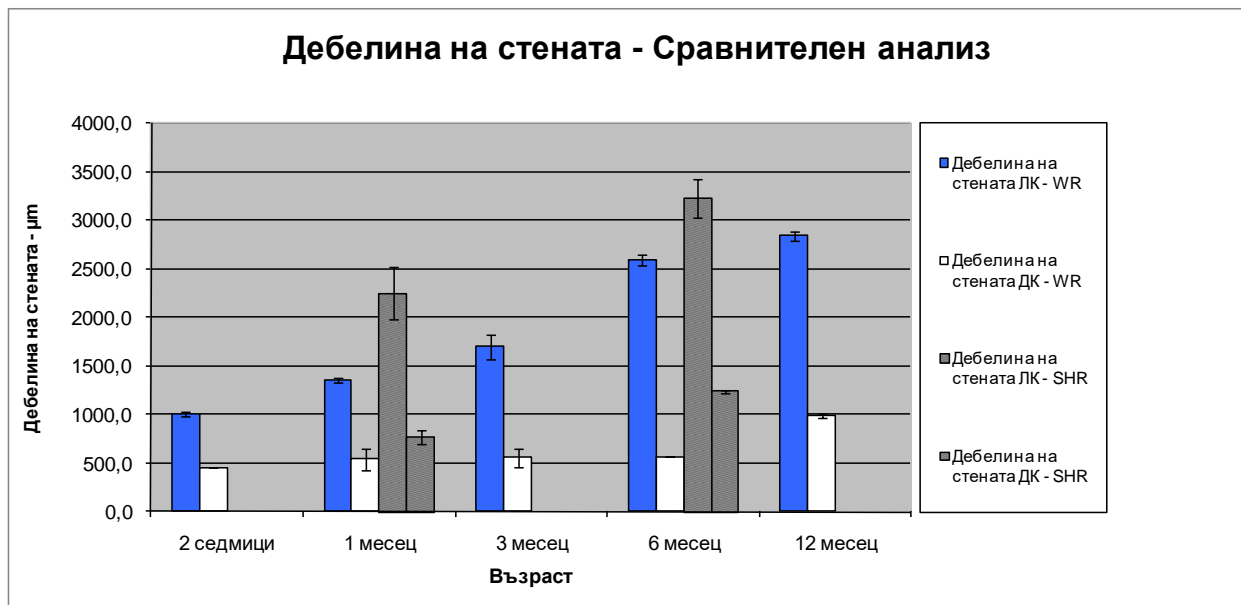
Сравнителните количествени данни върху морфологията на свободната стена на лява и дясна камера през различни периоди от постнаталното развитие на нормотензивни Wistar плъхове и SHR, както и на кардиомиоцитите, бяха получени при анализ на произволно подбрани области на миокарда, без големи и масивни разкъсвания в резултат на обработката на препаратите. Сравнителните морфометрични характеристики са представени систематизирано в следващите страници и са организирани в следната последователност:

- Сравнителни количествени данни за дебелината на сърдечната стена на лява и дясна камера за всяка отделна възрастова група при нормотензивните Wistar плъхове и SHR.
- Сравнителни количествени данни за основните морфометрични показатели на кардиомиоцитите и гъстотата на капилярната мрежа в миокарда на лява и дясна камера за всяка отделна възрастова група при нормотензивните Wistar плъхове SHR.

Следват сравнителни графики и диаграми, представящи анализ в динамиката на отделните количествени показатели през различни периоди от постнаталното развитие на нормотензивни Wistar плъхове и SHR:

- Дебелина на свободната стена на лява и дясна камера ( $\mu\text{m}$ );
- Напречно сечение на кардиомиоцитите ( $\mu\text{m}^2$ );
- Напречно сечение на ядрата на кардиомиоцитите ( $\mu\text{m}^2$ );
- Ядрено-цитоплазмено отношение;
- Гъстота на кардиомиоцитите (брой клетки/ $\text{mm}^2$ );
- Гъстота на капилярите (брой капиляри/ $\text{mm}^2$ ).

## Сравнителна динамика на дебелината на стената на лява и дясна камера:



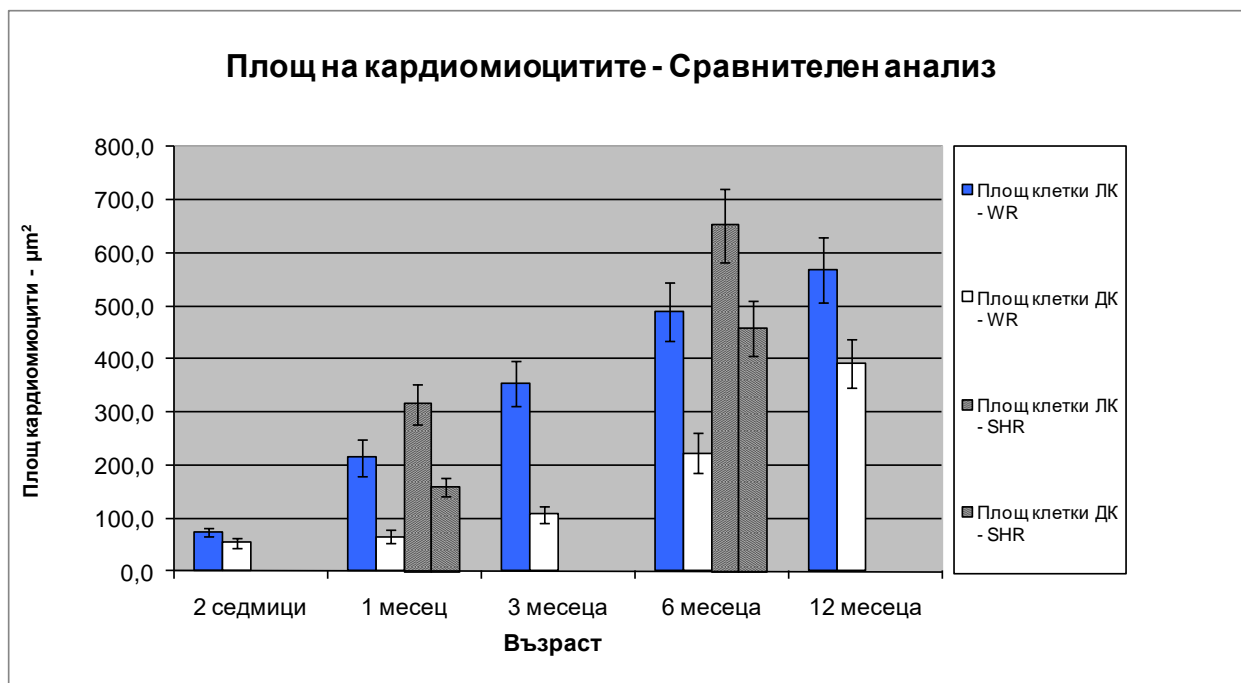
### Дебелина стена

WR	Лява камера		SHR	Лява камера		TTEST	
	Възраст	Ср. стойност		Ст. откл.	Възраст		Ср. стойност
2 седмици		1006,0	22,6				
1 месец		1362,0	21,2	1 месец	2252,3	266,5	p<0,001
3 месец		1702,7	123,7				
6 месец		2596,3	60,1	6 месец	3224,8	200,1	p<0,001
12 месец		2848,3	47,3				

### Дебелина стена

WR	Дясна камера		SHR	Дясна камера		TTEST	
	Възраст	Ср. стойност		Ст. откл.	Възраст		Ср. стойност
2 седмици		455,7	2,1				
1 месец		540,7	114,5	1 месец	771,2	70	p<0,001
3 месец		561,3	96,8				
6 месец		571,3	2,12	6 месец	1239,0	18,3	p<0,001
12 месец		989,8	21,2				

## Сравнителна динамика на напречното сечение на кардиомиоцитите:



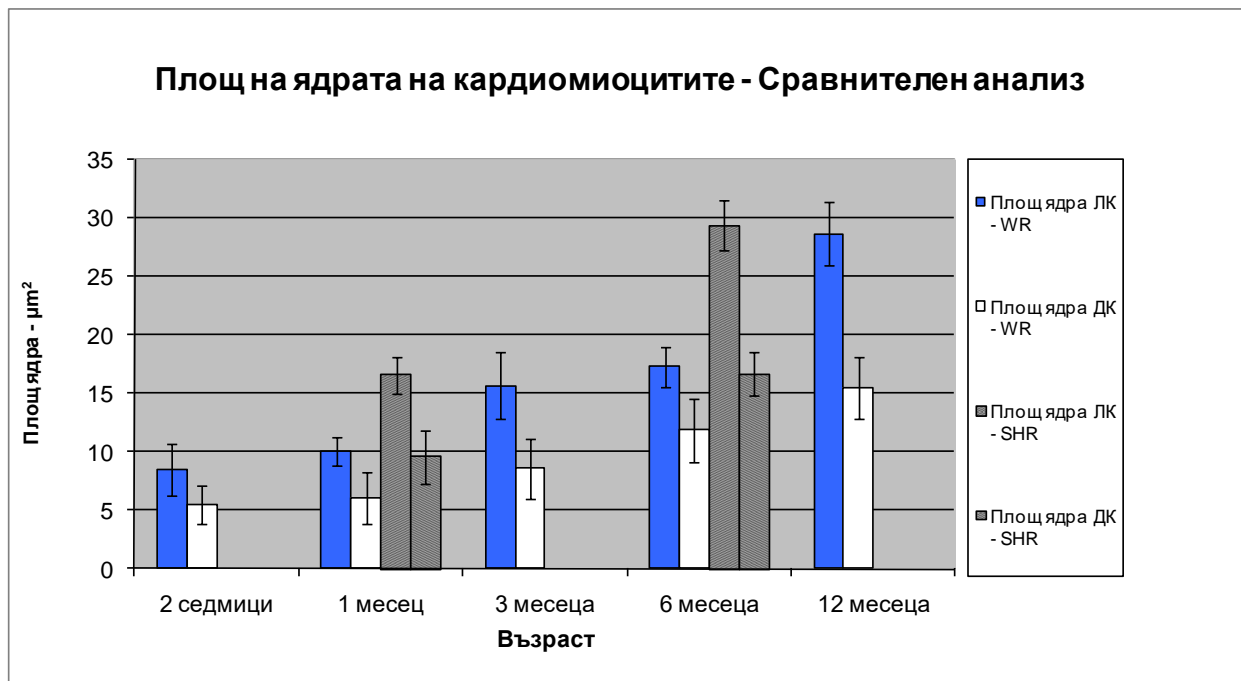
### Площ кардиомиоцити

WR	Лява камера		SHR	Лява камера		
Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	TTEST
2 седмици	73,6	8,1				
1 месец	214,7	35,3	1 месец	315,3	37,7	p<0,001
3 месец	354,2	41,1				
6 месец	490,1	55,9	6 месец	652,7	69,2	p<0,001
12 месец	568,5	62,4				

### Площ кардиомиоцити

WR	Дясна камера		SHR	Дясна камера		
Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	TTEST
2 седмици	54,2	10,1				
1 месец	65,8	12,6	1 месец	158,8	18,1	p<0,001
3 месец	107,7	16,6				
6 месец	223,6	39,2	6 месец	457,4	51,6	p<0,001
12 месец	391,6	45,5				

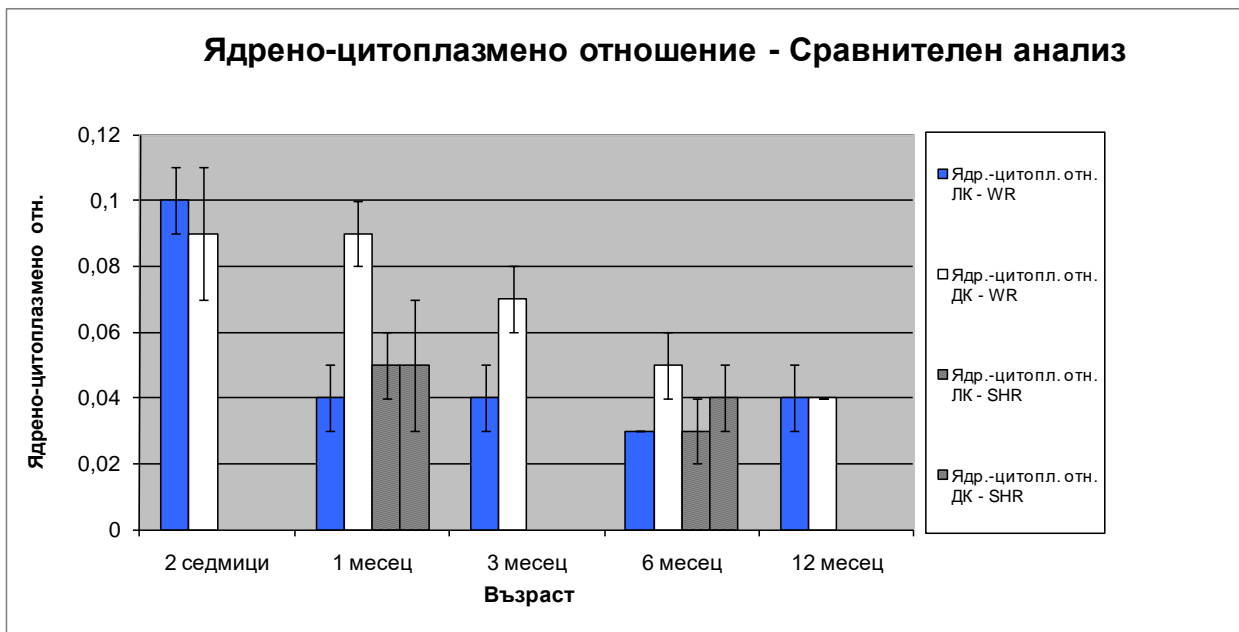
## Сравнителна динамика на напречното сечение на ядрата на кардиомиоцитите:



Лява камера			Лява камера			
WR	Площ ядра		SHR	Площ ядра		
Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	TTEST
2 седмици	8,5	2,2				
1 месец	10,1	1,2	1 месец	16,6	1,6	p<0,001
3 месец	15,7	2,8				
6 месец	17,3	1,7	6 месец	29,4	2,1	p<0,001
12 месец	28,7	2,7				

Дясна камера			Дясна камера			
WR	Площ ядра		SHR	Площ ядра		
Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	TTEST
2 седмици	5,5	1,6				
1 месец	6,1	2,2	1 месец	9,6	2,3	p<0,001
3 месец	8,6	2,6				
6 месец	11,9	2,7	6 месец	16,7	1,8	p<0,001
12 месец	15,5	2,7				

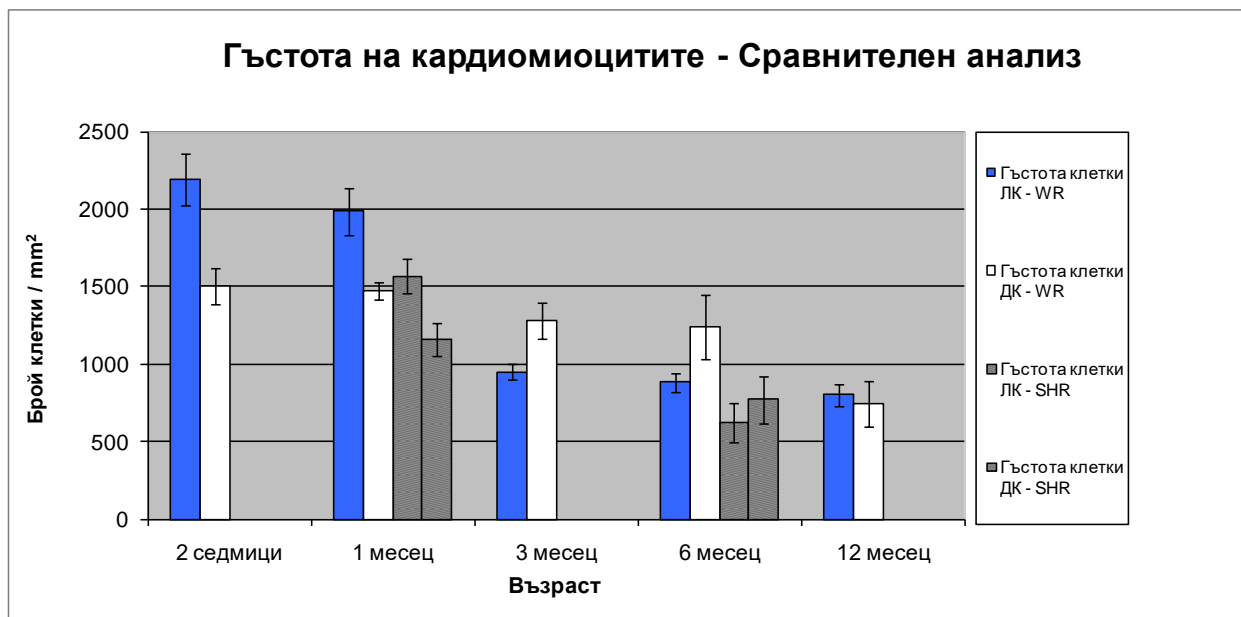
## Сравнителна динамика на ядрено-цитоплазменото отношение:



WR	Лява камера		SHR	Лява камера		TTEST
	Отношение	Ст. откл.		Отношение	Ст. откл.	
<b>Възраст</b>	Ср. стойност	Ст. откл.	<b>Възраст</b>	Ср. стойност	Ст. откл.	
<b>2 седмици</b>	0,1	0,01				
<b>1 месец</b>	0,04	0,01	<b>1 месец</b>	0,05	0,01	p<0,001
<b>3 месец</b>	0,04	0,01				
<b>6 месец</b>	0,03	0	<b>6 месец</b>	0,03	0,01	p<0,05
<b>12 месец</b>	0,04	0,01				

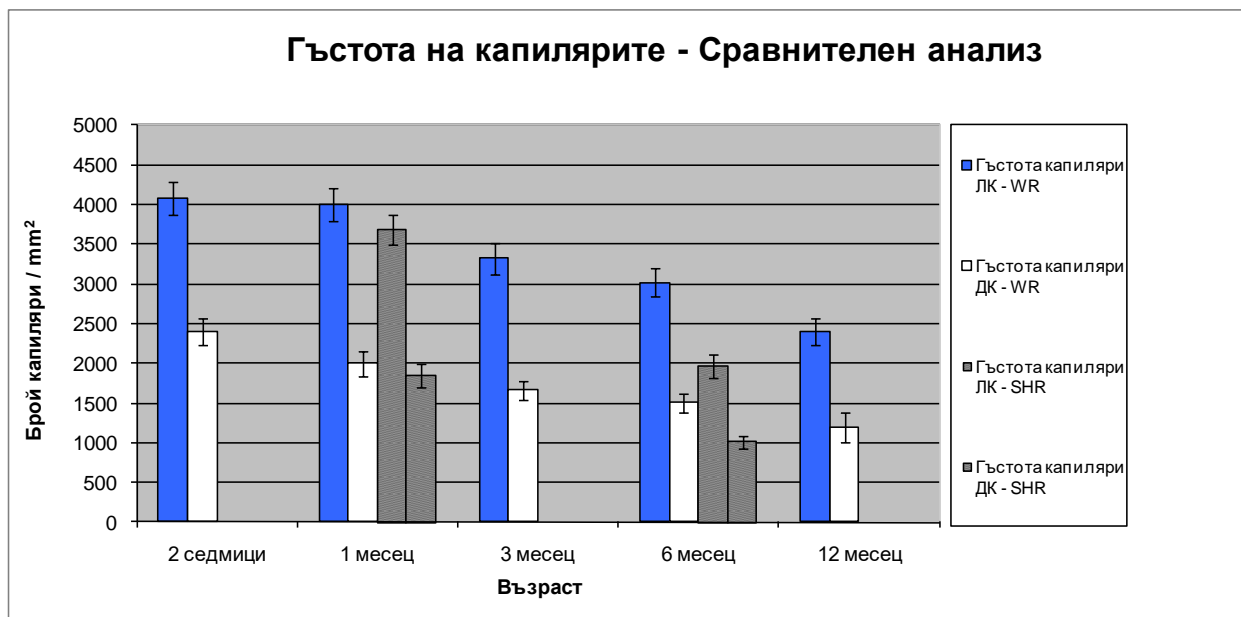
  

WR	Дясна камера		SHR	Дясна камера		TTEST
	Отношение	Ст. откл.		Отношение	Ст. откл.	
<b>Възраст</b>	Ср. стойност	Ст. откл.	<b>Възраст</b>	Ср. стойност	Ст. откл.	
<b>2 седмици</b>	0,09	0,02				
<b>1 месец</b>	0,09	0,01	<b>1 месец</b>	0,05	0,02	p<0,001
<b>3 месец</b>	0,07	0,01				
<b>6 месец</b>	0,05	0,01	<b>6 месец</b>	0,04	0,01	p<0,001
<b>12 месец</b>	0,04	0				

**Сравнителна динамика на гъстотата на кардиомиоцитите:**

WR	Лява камера		SHR	Лява камера		TTEST
	Брой клетки/mm <sup>2</sup>			Брой клетки/mm <sup>2</sup>		
Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	
2 седмици	2193,5	168,6				
1 месец	1987,3	150,9	1 месец	1567,1	108,6	p<0,001
3 месец	950,5	54,1				
6 месец	880,7	65,2	6 месец	624,8	128,3	p<0,001
12 месец	800,6	73,7				

WR	Дясна камера		SHR	Дясна камера		TTEST
	Брой клетки/mm <sup>2</sup>			Брой клетки/mm <sup>2</sup>		
Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	
2 седмици	1502,2	113,3				
1 месец	1468,6	55,9	1 месец	1159,5	109,6	p>0,05
3 месец	1281,3	114,6				
6 месец	1237,1	208,1	6 месец	773,7	151,5	p<0,001
12 месец	743,9	143,1				

**Сравнителна динамика на гъстотата на капилярите:**

Лява камера			Лява камера			
WR	Брой капиляри/mm <sup>2</sup>		SHR	Брой капиляри/mm <sup>2</sup>		
Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	TTEST
2 седмици	4081,6	213,1	1 месец	3689,6	185,2	p<0,001
1 месец	3997,6	209,5	6 месец	1963,7	149,4	p<0,001
3 месец	3325,1	198,9				
6 месец	3019,4	176,1				
12 месец	2395,5	171,1				

Дясна камера			Дясна камера			
WR	Брой капиляри/mm <sup>2</sup>		SHR	Брой капиляри/mm <sup>2</sup>		
Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	Възраст	Ср. стойност	Ст. откл.	TTEST
2 седмици	2400,1	170,3	1 месец	1844,6	154,3	p<0,05
1 месец	1998,1	152,6	6 месец	1008,8	86,6	p<0,001
3 месец	1662,3	115,9				
6 месец	1509,8	118,8				
12 месец	1197,3	195,9				

Сравнителният анализ на диаграмите, показващи основните морфометрични показатели между съответстващи по възраст групи нормотензивни Wistar плъхове и SHR дава представа за степента на нарастване на миокарда, кардиомиоцитите и ядрата в зависимост от степента на следнатоварване на съответната камера. 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.

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.

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 техните ядра.

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.

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.

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. По-динамични промени се установяват в лявата камера, тъй като повишеното артериално налягане в системното кръвообращение оказва ефект предимно върху нейното следнатоварване. 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.

## ***VI. Обсъждане***

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

Като цяло, в настоящата работа са анализирани редица параметри (дебелина на стената, площ на напречното сечение на кардиомиоцитите, площ на напречното сечение на ядрата, ядрено-цитоплазмено отношение, гъстота на кардиомиоцитите, гъстота на капилярите), проследени в пет възрастови групи при нормотензивни Wistar плъхове и в две възрастови групи (млади – едномесечни и зрели – шестмесечни) SHR. Независимо от малките размери на циркулаторната система, артериалното налягане при плъхове съответства значително на това при човека. По тази причина, за настоящото изследване използвахме нормотензивни Wistar плъхове. Според данните на Büttner и съавтори (1983) средната стойност на систолното налягане при нормотензивни Wistar плъхове е  $126 \pm 6$  mmHg. Сходни резултати съобщават и Aiello и съавтори (2003), според които систолното налягане при нормотензивни Wistar плъхове е  $118,5 \pm 1$  mmHg.

През 1963 г. в Киото (Kyoto), Япония, селективно са отгледани SHR от Wistar плъхове. През годините, те са се наложили като най-използваният животински модел на есенциална хипертония (Kurtz и Morris 1987). Като контрола за SHR най-често се използват нормотензивни плъхове, произлизащи от нормотензивни Wistar плъхове, получени през 1971 г. в Киото, наречени Wistar-Kyoto (WKY) (Kurtz и Morris 1987). В проучването на Aiello и съавтори (2003) е измерена и средната стойност на систолното налягане при нормотензивни Wistar-Kyoto плъхове, която е  $119,8 \pm 1,6$  mmHg. Оценено е и съотношението между теглото на лявата камера и телесното тегло. При нормотензивни WKY плъхове, неговата стойност е само 1,4 пъти по-голяма от измерената при нормотензивни Wistar плъхове, но и при двете породи, хипертрофията на лявата камера е значително по-

малка от наблюдаваната при SHR. Съотношението между теглото на дясната камера и телесното тегло има почти еднакви стойности при нормотензивни Wistar плъхове и нормотензивни WKY плъхове, като за разлика от SHR, също не се отчита хипертрофия на камерата (Aiello и съавт. 2003). Тези данни дават убедително основание за съпоставяне на получените резултати в настоящата работа с литературните сведения за нормотензивни WKY плъхове, които са предпочитаният животински модел при повечето проучвания.

Динамичните промени на част от клетъчните параметри (площ на напречното сечение на ядрата, ядрено-цитоплазмено отношение и гъстота на кардиомиоцитите) са изследвани за първи път в литературата и не са открити съответствия. Постнаталните промени в някои основни параметри като дебелина на стената, площ на напречното сечение на кардиомиоцитите и гъстота на капилярите са представяни и от други автори, което ни дава възможност за сравнение.

В литературата съществуват несигурни данни за това кога след раждането и как точно кардиомиоцитите престават да пролиферират и започва процесът на хипертрофия. Приема се, че има преходен период, през който сърцето нараства чрез едновременна пролиферация и хипертрофия на кардиомиоцитите. Предположенията за продължителността на този период са от 6 до 14 дни след раждане или до отбиването или дори малко след него (Rumyantsev 1977; Clubb и Bishop 1984). Повечето от доказателствата за наличието на такъв преходен период се основават на автордиографски изследвания и на някои морфологични проучвания. Li и съавтори (1996) оспорват наличието на такъв преходен период. Те стигат до заключението, че пролиферацията на сърдечните мускулни клетки приключва на четвъртия ден след раждането, но процентът на двуядрените клетки продължава да се повишава от 31% на шестия ден до 91% на единадесетия ден от раждането, което е и количеството при възрастни. Те предполагат, че тези данни за

допълнителна пролиферация всъщност показват образуването на двуядрени кардиомиоцити, а не хиперплазия. В своето изследване, Wulfsohn и съавтори (2004) не определят разпределението на едно- и двуядрени кардиомиоцити, тъй като границите между сърдечните мускулни влакна не могат ясно да бъдат определени на светлинна микроскопия. Те обаче установяват значително повишен брой кардиомиоцитни ядра при 125-дневни плъхове. Brüel и съавтори (2002a) откриват, че броят на ядрата в лява камера продължава да нараства с напредване на възрастта дори и при възрастни плъхове. Те също не успяват да докажат дали тази промяна показва наистина нарастване на общия брой кардиомиоцити или увеличен брой ядра на един кардиомиоцит. Този въпрос е от особен интерес, тъй като нови данни показват, че при възрастни плъхове също може да се наблюдава миоцитна хиперплазия, нещо, което преди се считаше за невъзможно (Anversa и Nadal-Ginard 2002).

С използването на специфична морфометрична техника (Anversa и съавт. 1978; Loud и съавт. 1978), е възможно да се покаже принципната разлика в растежа между лява и дясна камера в периода 1-11 ден след раждането, а именно, че се наблюдава по-голяма пролиферация на сърдечни мускулни клетки в миокарда на лява камера. Популацията от кардиомиоцити в свободната стена на лява камера се повишава със 100% (7,3 милиона клетки), докато тази на дясна камера се увеличава само с 1,5 милиона клетки. През този период, обемът на кардиомиоцита нараства 2,44 до 2,73 пъти, дължината му се удвоява, а средната стойност на напречното му сечение се увеличава с 21-35%. От наличните данни се установява, че миоцитната пролиферация е особено проявена през периода 1-5 ден след раждането и значително намалява между 5-11 ден. От друга страна пролиферацията на ядрата е особено манифестна и в двете камери до 5 ден, като персистира в лява камера и през периода 5-11 ден. Разликата между

пролиферацията на клетките и на ядрата се дължи на значителното увеличение на броя на двуядрените кардиомиоцити и в двете камери.

Резултатите на Anversa и съавтори (1980) показват, че клетъчното и/или ядреното делене на кардиомиоцитите е по-изразено и продължава по-дълго в лява камера, отколкото в дясна камера през ранното постнатално развитие. Резултатът от тази разлика е трансформирането на съотношението лява/дясна камера от неонаталните стойности (приблизително 1:1) до нормалните стойности при възрастни (почти 2:1). Все още не е известно дали това се дължи изцяло на по-голямото налягане, упражнявано върху лява камера след раждането. В някои последни проучвания е показано, че по-голямото налягане, резултат от констрикцията на аортата по време на отбиването на плъховете, стимулира митотичната активност на мускулните влакна в лява камера (Dowell и McManus 1978) – отговор, който не се наблюдава у миокарда при възрастни плъхове.

Размерите на сърдечните мускулни клетки и в двете камери се увеличават значително между 1-11 ден от постнаталното развитие. Ако се приеме цилиндричният модел на клетката, отношението дължина/диаметър на кардиомиоцита нараства от 2,9 на първия ден до 4,6 на петия ден и до 5,2 на единадесетия ден. Морфометричните изследвания, проведени *in situ*, показват, че отношението дължина/диаметър при субепикардни кардиомиоцити на възрастни плъхове е по-голямо от наблюдаваното при субендокардни клетки и че тези стойности се понижават при индуцирана хипертрофия поради относително по-голямото нарастване на клетъчния диаметър (Anversa и съавт. 1978).

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. Увеличеното средно дифузионно разстояние може да има значителен ефект върху метаболитните и функционалните характеристики на миокарда. Някои по-късни проучвания оспорват тази хипотеза и предполагат, че понижаването на капилярната плътност, което настъпва с развитието на хипертрофията, претърпява обратно развитие след стабилизирането на хипертрофичния процес (Tomanek и Novanec 1981; Tomanek и съавт. 1982).

Според наши и други литературни данни, хипертрофията 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. Въпреки че субендокардът на лявата камера изглежда е по-податлив на увреждане от транзиторни исхемични атаки, той може да бъде защитен от хронична исхемична некроза посредством дифузия на кислород от камерната кухина по начин, аналогичен на наблюдавания при големите еластични артерии, чиито вътрешни 2/3 от стената са аваскуларни (Hoffman 1981; Wolinsky и Glagov 1967). Противно на това, субепикардните и средните зони на стената са изцяло зависими от капилярната мрежа. Ранната фокална исхемия и некроза в тези зони, която с възрастта се разпространява, вероятно се дължи на повишеното дифузионно разстояние, произтичащо от кардиомиоцитната хипертрофия (Engelmann и съавт. 1987).

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 WKY 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 Novanec (1981) докладват, че на възраст 2, 5 и 7 месеца, SHR имат намалена капилярна плътност. Във връзка с недостатъчната неоваскуларизация при SHR, нарастващият обем на кардиомиоцитите води до значително увеличаване на средното дифузионно разстояние. Докато на възраст 1 месец средното дифузионно разстояние както при SHR, така и при нормотензивните плъхове, е сходно, то при шестмесечен SHR то нараства дотолкова, че не се различава съществено от средното дифузионно разстояние на 24-месечен нормотензивен Wistar плъх. 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).

Някои автори (Rakusan и съавт. 1984; Pfeffer и съавт. 1979; Ingwall и Fossel 1983) съобщават за вторична фаза на растеж на лява камера при SHR, а според други (Tomanek и Novanec 1981; Tomanek и съавт. 1982) се наблюдава стабилизиране на камерния растеж между 7 и 15 месеца. Tomanek и съавтори (1982) съобщават данни за капилярната плътност само в „полета, съдържащи гъсто разположени кардиомиоцити и капиляри с на практика неразличимо разделение между клетките”. Engelmann и съавтори (1987) проучват зони както на фокална, така и на разпространена некроза,

тъй като тези тъканни промени отразяват реалните патологични последици от сърдечната хипертрофия, медирана от хипертонията. Увеличеното интерстициално пространство, стареенето на кардиомиоцитите и нарастването на средното дифузионно разстояние вероятно допринасят за камерната недостатъчност, която се наблюдава в края на хипертрофията (Engelmann и съавт. 1987; Gilligan и Spector 1984).

По време на крайната фаза на хипертрофията (18-24 месеца) камерният миокард показва морфологични и морфометрични характеристики на дегенерация. Въпреки че миокардът при нормотензивни WKY плъхове показва някои клетъчни характеристики на възрастова дегенерация, в миокардът при SHR се наблюдават манифестни изменения в архитектурата. 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 фиброзираната тъкан в лява камера при SHR с напредване на възрастта, като близо 50% от свободната стена е фиброзирана на възраст 90 седмици (Pfeffer и съавт. 1979).

В литературата е известно, че голяма част от разликата в растежа между лява и дясна камера се дължи на по-голямата пролиферация (с 61%) на кардиомиоцити в миокарда на лява камера основно между 1-5 ден от постнаталното развитие (Anversa и съавт. 1980). Съставът на миокарда в двете камери се променя драстично между 1 и 11 ден в резултат на увеличаването на количеството на интерстициума от 14 на 24%. Нарастването на обема на интерстициума в лява камера е 151% по-голямо от това в дясната камера на единадесетия ден от раждането. На практика

цялото разрастване на интерстициалния компартмент се дължи на растежа на капилярната мрежа (Olivetti и съавт. 1980). Известно е, че кръвотокът в миокарда се увеличава през периода на постнатално развитие (Yuan и съавт. 1966), достигайки стойности като при възрастните на 16 ден от раждането (Hopkins и съавт. 1973). Ясно е, че работният потенциал на мускулната тъкан зависи от кръвотока, израз на който е капилярната плътност. Отношението между капилярните и кариомиоцитните профили на напречни срези от миокарда се повишава 5 пъти в лява камера и 4 пъти в дясна камера (Rakusan и съавт. 1965). На 11 ден от раждането, капилярната плътност в миокарда е сравнима с тази на миокарда при възрастни. Тези данни се базират на морфометрични (Anversa и съавт. 1978; 1979) и *in vivo* микроскопски техники (Henquell и Honig 1976; Henquell и съавт. 1977). С последващото нарастване на напречното сечение на кардиомиоцитите (Katzberg и съавт. 1977; Anversa и съавт. 1978; Rakusan и съавт. 1978) настъпва и почти пропорционална пролиферация на капиляри. Сходни данни, базирани на сравнителния морфометричен анализ между различните възрастови групи нормотензивни плъхове и SHR, са демонстрирани и в настоящата работа.

С изключение на разликата в теглото и дебелината на стената (2 пъти повече в полза на лява камера), характеристиките на левия и десния миокард на ниво тъканна организация, са почти идентични на 11 ден от постнаталното развитие. Растежът на дясна камера по време на ранния постнатален период се дължи на процес на ексцентрична хипертрофия, за разлика от растежа на лява камера, който се дължи както на ексцентрична, така и на концентрична хипертрофия (Anversa и съавт. 1980). Olivetti и съавтори (1980) установяват, че без да има значима промяна в дебелината на стената, изчислените среден брой и гъстота на кардиомиоците в стената на дясна камера намаляват с 21% между 1 и 11 ден, а в същото време средното напречно сечение се увеличава с 21%. Тези морфометрични данни показват наличие на пространствено пренареждане на мускулните

влакна, което допринася, заедно с увеличените брой, дължина и гъстота, за нарастване на обема на камерите (Anversa и съавт. 1980). Тези данни нито потвърждават, нито изключват възможността това пространствено пренареждане да бъде нормален процес на ранното постнатално развитие на свободната стена на лявата камера.

Многократни наблюдения показват, че отношението напречна повърхност/обем при кардиомиоцитите остава забележително постоянно при стойности от около  $0,5-0,6 \mu\text{m}^2/\mu\text{m}^3$  по време на нормален растеж (Page и съавт. 1974) и хипертрофия (Page и McCallister 1973; Anversa и съавт. 1978, 1979). При възрастния миокард, това равновесие се поддържа основно чрез компенсаторно повишаване на напречната повърхност на сарколемните инвагинации, формиращи T-системата (Page и съавт. 1974). Проучване на Olivetti и съавтори (1980) показва, че до момента на развитие на T-системата, съотношението напречна повърхност/обем има същата стойност като наблюдаваната при възрастен миокард (на възраст 1, 5 и 11 ден), но в този случай поддържането му се дължи на удължаването на клетките.

Според наши данни различният темп на постнатален растеж при лява и дясна камера при плъховете води до по-голямо увеличаване на броя на кардиомиоцитите в лява камера. Тези данни се потвърждават и от проучванията на Anversa и сътрудници (1980). Въпреки това кардиомиоцитите и в двете камери показват почти еднаква средна стойност на клетъчна хипертрофия. Освен това, абсолютният брой на цитоплазмените структури в сърдечни мускулни клетки от двете камери е значително различен 5 дни след раждането, което обаче не се наблюдава на 1 и 11 ден. Това показва, че хемодинамичните промени, които се наблюдават след раждане, индуцират различен ход на субклетъчния растеж в интервалите 1-5 и 5-11 ден (Olivetti и съавт. 1980). Не е напълно ясно до каква степен тези различия отразяват относителните изисквания към контрактилната функция и до колко са свързани с диференциалната

пролиферативна активност на кардиомиоцитите от двете камери (Hollenberg и съавт. 1977; Anversa и съавт. 1980). Следва да се отбележи, че митохондриалният растеж в мускулните влакна е значително по-изразен, отколкото растежът на миофибрилите. Това показва, че тази фаза на миоцитна хипертрофия се различава съществено от хипертрофията, дължаща се на работно натоварване, което се индуцира при възрастни кардиомиоцити от SHR, при която се отчита изоставане на митохондриалния спрямо миофибрилния растеж (Richter 1974). Тъй като развитието на миокарда се дължи на повишаване както на тъканния обем, така и на броя на кардиомиоцитите, промените в относителните морфометрични характеристики за отделната сърдечна мускулна клетка не са достатъчни, за да обяснят цялостния процес на растеж. Общото повишаване на теглото на свободната стена на дясна (3,4 пъти) и на лява камера (6,2 пъти) е резултат от растеж на всеки от компонентите, изграждащи тези структури в интервалите 1-5 и 5-11 ден (Olivetti и съавт. 1980).

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 цялостно 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. Механизмите, стоящи в основата на загубата на кардиомиоцити и формирането на зони на интерстициална и заместителна фиброза не са напълно ясни. Предполага се участие на местната исхемия, тъй като в процеса на стареене отслабват адаптивните възможности на коронарния съдов резерв и устойчивост (Nachamovitch и съавт. 1989). На структурно ниво се установява намаляване на капилярната плътност в стареещия миокард (Rakusan и Poupa 1964; Tomanek 1970; Yin и съавт. 1982). Понижената 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.

В предходни проучвания, показателите, използвани за характеризиране на сърдечната хипертрофия, индуцирана в хода на процеса на стареене, на клетъчно ниво, бяха промените в повърхността на напречното сечение (Yin и съавт. 1982), среден обем на кардиомиоцита (Anversa и съавт. 1986) и среден обем на колагеназа-дисоциирани кардиомиоцити (Katzberg и съавт. 1977). Данните от проучването на Anversa и съавтори (1990) показват, че клетъчната хиперплазия също участва в хипертрофичния отговор на миокарда по време на стареенето. По тази причина, измерването само на среден обем на кардиомиоцита може да доведе до недостатъчно прецизна оценка на растежа на сърдечните мускулни клетки, който се наблюдава с напредване на възрастта. Продължителната загуба на функционални клетки в камерите очаквано води до по-голямо работно натоварване на останалите кардиомиоцити, което вероятно играе ролята на хроничен механичен стимул на клетъчния растеж (Anversa и съавт. 1986). Сходно клетъчно натоварване се отчита и в експериментални модели в настоящата работа на хипертрофия при млади и зрели SHR, кардиомиопатии (Factor и съавт. 1981, 1982) и миокарден инфаркт (Anversa и съавт. 1986).

Ефектът на стареенето върху двете камери има различно количествено измерение, което се потвърждава и от нашето изследване. Въпреки че в проучването на Anversa и съавтори (1990), загубата на кардиомиоцити в двете камери показва сравними резултати, степента на клетъчна хиперплазия в дясната половина на сърцето е по-голяма от тази в

лявата. В хода на проучвания 25-месечен интервал, мускулният компонент се повишава 1,75 пъти в дясна камера и 2,2 пъти в лява. В заключение, може да се твърди, че миокардът на дясна камера има значително по-голям резерв по отношение на растежа, в сравнение с този на лява камера. Допуска се, че тези разлики се дължат на по-голямото налягане, упражнявано върху лявата камера през периода на постнатално развитие, което изчерпва компенсаторния капацитет на тъканта в по-ранна възраст.

Процесът на клетъчна хиперплазия води до значително повишаване на броя кардиомиоцити в камерната стена, който се нормализира към третата седмица от постнаталното развитие. Освен това се наблюдава прогресивно увеличаване на напречното сечение на кардиомиоцитите, което е отразено и в резултатите в настоящето проучване. Този механизъм протича съвместно с процеса на удължаване на сърдечните мускулни клетки (Olivetti и съавт. 1980; Page и съавт. 1974). Увеличаващото се работно натоварване върху миокарда в хода на постнаталното развитие изисква и съответно адекватен кислороден транспорт към сърдечните мускулни клетки. Миокардният кръвоток се увеличава прогресивно след раждане (Yuan и съавт. 1966). Количественият анализ на структурните особености на капилярите показва линейно увеличение на капилярната гъстота с напредване на възрастта, с което се поддържа отношението брой капиляри на единица обем кардиомиоцити (Anvesa и съавт. 1986). Увеличаващото се следнатоварване при възрастни плъхове индуцира развитие на концентрична камерна хипертрофия с увеличаване на дебелината на стената без увеличаване на камерната кухина (Grossman и съавт. 1975). Съизмерими резултати са получени и в настоящата работа, като ние отчитаме намаление на капилярната гъстота с напредване на възрастта на плъховете. В литературата съществуват сведения за хипертрофичен растеж на различни слоеве от свободната стена на лявата камера, междукамерния септум и папиларните мускули. Констрикция на коремната аорта при плъхове води до 51% увеличаване на масата на

папиларния мускул след 8 дни, което се дължи на съответно увеличаване на средното напречно сечение на мускула, без промяна в дължината му. На микроскопско ниво, тази адаптация се изразява в сходни промени в кардиомиоцитната популация, с 53% уголемяване на клетките и 55% нарастване на средната стойност на площта на напречното сечение (Anversa и съавт. 1986). Този хипертрофичен отговор на мускулните влакна вероятно се дължи, поне отчасти, на гъстотата на капилярите, тъй като повишеният клетъчен растеж и метаболитни изисквания водят до компенсаторно нарастване на кислородния приток към функционално натоварената миокардна тъкан.

Съществуват три основни морфометрични параметри за оценка на капилярната мрежа, които се използват за оценка на капилярната пролиферация в условия на физиологичен и индуциран миокарден растеж: отношение на капилярните към кардиомиоцитните профили (McElroy и съавт. 1978; Olivetti и съавт. 1980; Rakusan и съавт. 1965); гъстота на капилярите (Anversa и съавт. 1978; Lund и Tomanek 1978; Wallenstein и съавт. 1980); обща дължина на капилярите в цялата стена на камерата (Anversa и съавт. 1978; Olivetti и съавт. 1980). 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. При корекция на стойностите на гъстотата на капилярите с големината на пространствено раздалчаване, дължащо се на нарастването на кардиомиоцитите, се отчита 68% нарастване на абсолютния брой капиляри при SHR на възраст между 21 и 45 дни (гъстота на капилярите на 21 ден =  $6,146/\text{mm}^2$ ; на 45 ден =  $5,850/\text{mm}^2$ ; площ на напречното сечение на 21 ден =  $60,1 \mu\text{m}^2$ ; на 45 ден =  $106,1 \mu\text{m}^2$ ; % нарастване на площта на напречното сечение от 21 до 45 ден = 77%). Следователно, нарастването на абсолютния брой капиляри при SHR е  $5,850 \times 1.77/6,146 = 1.68$ . Получената стойност при контролната група нормотензивни плъхове е само 24% (Anversa и съавт. 1984).

Наблюдаваната пролиферация на капиляри в миокарда на лява камера при SHR е показана в редица изследвания при различни етапи от постнаталното развитие както чрез количествени, така и чрез качествени проучвания (Imamura 1978; Kawamura и съавт. 1976; Tomanek и Novanec 1981; Tomanek и съавт. 1982). Все пак, процесът на капилярен растеж не е непременно паралелен на процеса на кардиомиоцитен растеж (Tomanek и Novanec 1981; Tomanek и съавт. 1982). Наблюдаваната капилярна пролиферация при SHR надвишава тази при нормотензивните контроли, което е индикатор, че миокардната хипертрофия, индуцирана от хипертонията, е свързана с ускорен капилярен растеж в сравнително млади животни (Anversa и съавт. 1984). В тази връзка, в литературата съществуват данни за бързия темп на нарастване на капилярната мрежа по

време на постнаталното развитие (Olivetti и съавт. 1980; Rakusan и съавт. 1965, 1967). Според наши и литературни данни (Rakusan и съавт. 1967; Anversa и съавт. 1978; 1980) капацитетът за увеличаване на капилярната мрежа в условия на хипертрофия, дължаща се на повишено следнатоварване, е застъпен при млади, но не и при възрастни животни.

Различните показатели на кардиомиоцитен растеж при SHR и нормотензивни плъхове се дължат на различното работно натоварване върху камерите, което се дължи на по-високите стойности на системното артериално налягане при SHR. При тях се наблюдава 151% повишаване на клетъчния обем, което се постига чрез 77% нарастване на площта на напречното сечение и 42% общо увеличаване на надлъжния размер на кардиомиоцитната популация (Anversa и съавт. 1984). За разлика от това, при нормотензивни WKY плъхове се открива 124% повишаване на масата на кардиомиоцитите, дължащо се на 47% нарастване на площта на напречното сечение и 53% увеличаване на надлъжния размер на сърдечните мускулни клетки (Anversa и съавт. 1984). Тези данни показват, че при тази група плъхове, нарастването на диаметъра (21%) е по-малко от половината на отчетеното увеличаване на надлъжния размер (53%), докато стойностите на нарастването на диаметъра (33%) и дължината (42%) са по-близки при SHR. Установено е, че прогресивното нарастване на диаметъра и площта на напречното сечение при SHR се дължи на продължителното повишаване на системното артериално налягане (Imamura 1978; Kawamura и съавт. 1976; Takatzu и Kashii 1972; Tanijivi 1975; Tomanek и съавт. 1979). Тези изменения в показателите могат да се интерпретират като компенсаторен отговор на миокарда на клетъчно ниво на организация, чиято цел е да намали ефекта на повишеното пред- и следнатоварване на сърцето (Anversa и съавт. 1984).

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). Резултате 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 кардиомиоцитите на лява и дясна камера свързани както с възрастово зависимата хипертрофия, така и с тази, предизвикана от хипертония.

## **2. Стареење на миокарда и кардиомиоцитите. Възможности 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 проучванията 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). Усиленото развитие на фиброза е основна детерминанта на миокардната ригидност, която, съвместно с нарушената релаксация, води до дисфункция на миокарда (Burlaw 2004). 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 разлика 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 настоящето 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. Хистологичните анализи на стареещи сърца от нормотензивни WKY плъхове показват прогресивна загуба на кардиомиоцити поради некроза и апоптоза (Kajstura и съавт. 1996). Съхранените сърдечни мускулни клетки претърпяват процес на хипертрофия (Anversa и съавт. 1990). Изследване на Eghbali и съавтори (1989) показва повишаване на колагенното съдържание в лява камера от

5,5% от общото количество протеини при млади нормотензивни плъхове до 12% при възрастните животни. Установява се и промяна в съотношението между колаген тип I и колаген тип III. Maus и съавтори (1988) наблюдават прогресивно увеличаване на количеството колаген тип III в миокарда на мъжки нормотензивни плъхове. Сходни резултати се установяват и при мъжки SHR. 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. Maus 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 (Maus и съавт. 1991).

С напредване на възрастта намалява общият брой кардиомиоцити. Загубата на сърдечни мускулни клетки поради некроза или апоптоза води до компенсаторна или заместителна хипертрофия на останалите кардиомиоцити и до натрупването на екстрацелуларен колаген (Chimenti и съавт. 2003). Максималният обем, който кардиомиоцитите могат да достигнат, е около  $90000 \mu\text{m}^3$ , а максималната площ на напречното сечение е приблизително  $600\text{-}900 \mu\text{m}^2$  (Chimenti и съавт. 2003; Urbanek и съавт.

2003). Сама по себе си, хипертрофията на кардиомиоцитите е физиологичен процес, протичащ в отговор на повишени изисквания (напр. физическо натоварване) и по тази причина възрастово обусловената хипертрофия може да се разглежда като развиваща се по сходен механизъм. За разлика от физиологичната хипертрофия, възрастово обусловената хипертрофия е резултат на загуба на кардиомиоцити в резултат на стареенето и понижаването на тяхната устойчивост, което увеличава натоварването върху останалите здрави клетки (Bernhard и Laufer 2008). Въпреки че развитието на хипертрофия протича с напредването на възрастта, важно е да се отбележи, че способността за увеличаване на клетъчната площ е по-ниска при остарелите кардиомиоцити (Chimenti и съавт. 2003; Urbanek и съавт. 2003). По тази причина съотношението остарели към млади кардиомиоцити, заедно с общия брой на кардиомиоцитите, може да се използва като прогностичен показател за способността на миокарда да поддържа или да наруши функцията си (Bernhard и Laufer 2008). В подкрепа на това, различни проучвания са показали, че загубата на кардиомиоцити и компенсаторната хипертрофия на останалите здрави клетки предхождат хипертрофията на камерите, поради което се смята, че този процес е причина, поне отчасти, за хипертрофията на камерите. В заключение, може да се каже, че с напредване на възрастта морфологията и функцията на сърцето се нарушава както на ниво орган, така и на нивото на отделния кардиомиоцит (Bernhard и Laufer 2008).

При остарелите кардиомиоцити се наблюдава цялостна тенденция за понижена адаптация към стреса, за което свидетелства понижената експресия на конститутивните изоформи на NOS и антиоксидантни ензими; понижената и променена функция на митохондриалните ензими, което води до оксидативен стрес и увреда; увеличената ригидност в резултат на реактивната фиброза, дължаща се на повишено отлагане на колаген (Bernhard и Laufer 2008). Счита се, че основните механизми, които

инициират стареенето на кардиомиоцитите, са оксидативният стрес и последващата увреда на сърдечните мускулни клетки, но роля за този процес имат и възпалението и фактори от страна на съдовете, екстрацелуларният матрикс и фибробластите (Bernhard и Laufer 2008).

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 WKY 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 площта на ядрата (Unverferth и съавт. 1986). Докато при SHR се установява 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).

Под въздействието на хемодинамично натоварване и неврохормонални фактори (известни като прохипертрофични фактори) кардиомиоцитите нарастват както в напречна, така и в надлъжна посока (Gosse 2005). Данните в литературата имат противоречив характер по отношение на

ролята на NO, синтезиран от калций-независимата iNOS, като такъв прохипертрофичен фактор; следва да отбележим, че NO, синтезиран от конститутивните изоформи на NOS (nNOS и eNOS), вероятно има антихипертрофичен ефект (Umar и van der Laarse 2009). Някои автори считат, че iNOS има и проапоптотичен и профибротичен ефект и индуцира ремоделиране на лявата камера. Към момента не е проучвана ролята на nNOS в процесите на апоптоза и последваща фиброза. Нашите данни показват, че ензимът се експресира в по-голямо количество в условия на хипертрофия, което най-вероятно има протективен ефект по отношение на процеса на ремоделиране. Сходни и съизмерими резултати се откриват и в проучването на Umar и van der Laarse (2009). При млади SHR се наблюдава индуцирано повишаване на nNOS както преди, така и след започването на хипертонията. По тази причина, развитието на хипертонията не е резултат от първично нарушаване на производството на NO при SHR, а напротив, производството на NO се увеличава както преди, така и след началото на хипертонията (Vaziri и съавт. 1998).

Счита се, че кардиомиоцитната хипертрофия се дължи на нарушаване на баланса между сигналните пътища на хипертрофията и атрофията (Razeghi и Taegtmeyer 2006). Възможно е увеличаването на размерите на сърдечните мускулни клетки в отговор на патологични процеси да бъде важен, но не единствен фактор за развитие на миокардна дисфункция. Например повишената синтеза на колаген периваскуларно, в ендо- и перимизиума и в интерстициалното пространство на миокардната тъкан в отговор на прохипертрофични фактори може да доведе до увеличаване на средното дифузионно разстояние и понижено снабдяване на кардиомиоцитите с кислород, което в последствие ги уврежда (Shih и съавт. 2011). Броят на кардиомиоцитите както при плъхове (нормотензивни и SHR), така и при хора, намалява с възрастта (Anversa и съавт. 1990). Ниската степен на клетъчна смърт в нормалното сърце, както и наличието на кардиомиоцитна хипертрофия и фиброза като

компенсаторни механизми за клетъчната загуба, вероятно намаляват необходимостта от кардиомиоцитна регенерация (Anversa и съавт. 1990). Нови данни показват, че вероятно съществуват два източника за обновяване на кардиомиоцитите: клетъчно делене на вече съществуващите кардиомиоцити и диференциране на прекурсорни клетки (Nadal-Ginard и съавт. 2003; Veltrami и съавт. 2001). Загубата на кардиомиоцити с напредване на възрастта вероятно се дължи на два отделни механизма: загуба на клетките в резултат на изчерпване на адаптивните механизми (нарушено делене на кардиомиоцитите и узряване на сърдечните прогениторни клетки) и активна загуба на клетки поради активиране на процеса на апоптоза (Shih и съавт. 2011). Освен това нарушаването на кардиомиоцитната функция е и възрастово обусловено. Всичко това води до предиспозиция към нарушаване на функцията на миокарда. Наличието на комбинация от стресови условия при възрастни SHR (стареене и хипертония) води до понижена възможност за адаптация на миокарда и по-изразено ремоделиране. В хода на процеса на стареене се установява и дисфункция на фибробластите, което води до по-изразени фибротични изменения, с което също се смущава функцията на миокарда.

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 понижената 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. В по-тесен смисъл, нарушената релаксация на камерите, тяхната фиброза, намаленият минутен обем на сърцето са само някои от патологиите, които се наблюдават при възрастни представители от породата WKY и при SHR (Folkow и Svanborg 1993). В много случаи, повишеното артериално налягане ускорява настъпването на измененията, които се наблюдават при възрастни индивиди (Susic и съавт. 1998). 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 оксид-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. Освен това, хипертензивните плъхове до такава степен наподобяват възрастните индивиди, че някои автори използват младите SHR, третирани с NO-блокери като модел при проучвания на процеса на стареене (Llorens и съавт. 2005).

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. Тъй като NO модулира миокардния контрактилитет, кислородната консумация и апоптозата, може да се заключи, че индуцираното повишаване на активността на nNOS има за цел да поддържа тези функции във възрастния организъм. 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 (Vendall 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.

Наблюдават се и протективни ефекти от страна на nNOS, които вероятно произхождат от способността му да противодейства на дисбаланса, който се наблюдава при хипертрофия, посредством инхибиране на XOR и на производството на свободни радикали в митохондриите (Hare и Stamler 2005). При тези условия се наблюдава и транслоциране на nNOS към митохондриите посредством механизъм, зависим от HSP 90. Връзката на nNOS с инхибирането на XOR и производството на свободни радикали от митохондриите, вероятно допринасят за протективния ефект на ензима по отношение на ремоделирането (Manoury и съавт. 2012).

Производството на NO намалява в различни модели на хемодинамично натоварване. При SHR с левокамерна хипертрофия ендотел-медираната дилатация намалява. Изчерпването на производството на NO изглежда

уврежда миокарда още в началните стадии на хипертония при SHR (Fujita и съавт. 1995). Освен това, концентрацията на L-аргинин, който е субстрат на nNOS при производството на NO, също намалява в отговор на стресови стимули при SHR за разлика от нормотензивни WKY плъхове (Hasegawa и съавт. 1992). Хроничното инхибиране на nNOS от L-аргининови аналози индуцира устойчива системна хипертония при нормотензивни плъхове (Arnal и съавт. 1992; Baylis и съавт. 1992; Ribeiro и съавт. 1992; Pollock и съавт. 1993). При този модел, активността на nNOS се инхибира не само в лява камера, но и в аорта, мозък и бъбреци (Bernatova и съавт. 1996), което корелира с понижаването на нивата с цГМФ (Pechanova и Bernatova 1996, 2000). Мнозина автори (Mandarim-de-Lacerda и Pereira 1997; Devlin и съавт. 1998; Anderson и съавт. 1999; Uhlenius и съавт. 1999) съобщават, че хроничното инхибиране на nNOS води до хипертрофия на лявата камера. Въпреки това, според други автори не се наблюдава левокамерна хипертрофия при хроничен дефицит на NO (Banting и съавт. 1997; Wickman и съавт. 1997; Matsubara и съавт. 1998). Изглежда, че развитието на левокамерна хипертрофия зависи от времето на прилагане и дозата на nNOS-инхибиторите (Michel и съавт. 1996; Pereira и съавт. 1998; Pessanha и съавт. 1999), както и от други модулиращи фактори, например възраст и порода на животните. Тъй като при нормални условия, NO се отделя непрекъснато в циркулацията, регулирайки по този начин кръвното налягане (Lüscher 1990), пониженото производство на NO се счита за един от основните фактори, причиняващи хипертония.

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. Повишаването на нивата на nNOS в лява камера от по-млади SHR е свързано както с

повишаване на HSP 90, така и с намаляване на кавеолин 1 и 3. 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 понижената 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; Vendall 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-цветяване 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). Възможно е да настъпват промени в молекулното тегло на nNOS в сърцето, които се индуцират от стресови условия или от възрастта. В кардиомиоцити в двете предсърдия (Herring и съавт. 2000), както и в камерите (Piech и съавт. 2003), повишаването на nNOS се счита за последствие от напредналата възраст. Все още не е ясно как този факт корелира с функцията. 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 медира предимно чрез модифициране на свързващия протеинен домен, отколкото модифициране на самата nNOS.

В кардиомиоцитите съществуват два добре известни протеинни модулатори: кавеолин-3 (инхибиторен ефект) и протеин на топлинния шок 90 (HSP 90; активиращ ефект). Предполага се, че и двата модулатора регулират nNOS посредством промяна на активацията ѝ от калций/калмодулин. Въпреки това, съществуват различия в литературата за това дали и двата механизма оперират като прости регулатори и дали взаимодействието на nNOS с кавеолини или HSP 90 служи като основен механизъм за включване на други регулатори. Струва си да се отбележи, че промени в експресията на кавеолин-3 (Hare и съавт. 2000; Bendall и съавт. 2004) или на HSP 90 (Piech и съавт. 2003) не винаги водят до очакваните

ефекти върху активността на nNOS в кардиомиоцитите, което предполага, че ролите им в регулацията са изключително сложни. В друго проучване е показано, че плъши кардиомиоцити от лява камера в патологични условия, експресират повишени нива на кавеолин-3 и мембранно-свързана nNOS, както и че ко-имунопреципитацията на nNOS с кавеолин-3 се повишава в кардиомиоцити от лява камера след миокарден инфаркт (Bendall и съавт. 2004). Според Damy и съавтори (2003) вместо да има инхибиращ ефект, повишената мембранна компартментализация на nNOS чрез кавеолин-3 може да доведе до увеличаване на бионаличността на nNOS и NO.

Увеличаването на експресията на nNOS в лява камера на млади SHR е съпроводено от значително понижаване на наличността на кавеолин 1 и 3 (Piech и съавт. 2003). Това контрастира с повишените нива на HSP 90. В свое проучване, Fujita и съавтори (2001) не установяват промени в кавеолин 1 и 3 на лява камера при едномесечни SHR, но откриват понижаване на кавеолин 3 при шестмесечни SHR, което предполага повишаване на нивата на nNOS в условията на хипертрофия. Би следвало да се очаква, че намаляването на кавеолин 1 и 3 (като инхибитори на NOS) и, съответно, увеличаването на HSP 90, ще усилят активността на nNOS (и вероятно на eNOS) в лява камера. Координираните промени в експресията на nNOS и неговите регулатори (кавеолини и HSP 90) може да се разглежда като компенсаторен механизъм за поддържане на продукцията на NO в отговор на повишен оксидативен стрес. За разлика от това, известно е, че HSP 90 значително повишава афинитета на nNOS към калмодулин (Song и съавт. 2001a). Интересен е фактът, че HSP 90 намалява синтезата на супероксиди от nNOS за сметка на синтезата на NO (Song и съавт. 2002). Ко-имунопреципитацията на HSP 90 и nNOS се повишава при кардиомиоцити от лява камера при патологични условия (Damy и съавт. 2004) и в плъши сърца с хипертрофия или след миокарден инфаркт (Damy и съавт. 2003). Този ефект е свързан с повишаване на активността на nNOS, въпреки че ролята на HSP 90 в конкретния случай не е известна. В

допълнение, повишената експресия на nNOS и HSP 90 в кардиомиоцити от лява камера на хипертензивни плъхове няма ефект върху синтезата на азотен оксид (Piech и съавт. 2003). В изследвания на Piech и съавтори (2003) се оценява и тъканното съдържание на цГМФ, за да се установят функционалните импликации на тези промени в експресията, тъй като каскадата чрез цГМФ е основният ефекторен механизъм, посредством който NO, продуциран от nNOS, реализира ефектите си върху миокарда. Както и в по-ранни проучвания (Nava и съавт. 1998; Matsuoka и съавт. 1996), съдържанието на цГМФ в лява камера остава непроменено при различните възрасти и породи. Данните на Zieman и съавтори (2001) за увеличени нива на nNOS съвпадат с тези на Cernadas и съавтори (1998), които съобщават за повишаване на експресията на nNOS и цГМФ в миокарда на нормотензивни плъхове с напредване на възрастта. Тези данни се подкрепят и от данните в настоящото проучване за изменение на активността на nNOS с напредване на възрастта при групите плъхове.

В своето проучване, Alvarez и съавтори (2008) показват, че повишаването на оксидативния стрес се асоциира с по-силно изразено развитие на хипертрофия в сърца от възрастни SHR в сравнение с отговарящи им по възраст нормотензивни WKY плъхове. Оксидативният стрес е с основно значение за процеса на стареене (Fukagawa 1999) и изглежда е общ механизъм на различни хипертензивни патологии (Dobrian и съавт. 2003; Vaziri и Sica 2004; Swei и съавт. 1997). По-конкретно, свободните радикали водят до функционален дефицит на NO, което допринася за патогенезата на възрастово-обусловената хипертрофия и последиците ѝ за стареенето на миокарда. В съответствие с проучванията на Zalba и съавтори (2001), Alvarez и съавтори (2008) установяват усилена продукция на супероксиди в сърца на възрастни SHR в сравнение с отговарящи им по възраст нормотензивни WKY плъхове. Освен това в проучването си, Alvarez и сътрудници (2008), използвайки сърца от четиримесечни SHR и нормотензивни WKY плъхове, установяват, че по-

високата степен на левокамерна хипертрофия, наблюдавана при млади SHR в сравнение с отговарящи им по възраст нормотензивни WKY плъхове не се наблюдава съвместно с по-голяма увреда от азот-съдържащи свободни радикали. Възрастните нормотензивни плъхове показват по-голямо съдържание на нитротирозин (съединение, което се получава в резултат на взаимодействието на азот-съдържащи свободни радикали, например пероксинитрит, с тирозин) в сравнение с по-младите. Това повишаване на нитротирозина е по-ниско от наблюдаваното при възрастни SHR, което показва, че наличието и на хипертрофия при процеса на стареене, води до по-голяма степен на нитриране, поради увеличение на дисбаланса между продукцията на NO, произвеждан от nNOS, и супероксиди. По тази причина, по-високите нива на нитротирозин в сърцата на възрастни SHR се отдават на повишаването на количествата на пероксинитрит, получаващи се от ексцесивната продукция както на NO, така и на супероксиди. Друго възможно обяснение за по-голямото ниво на оксидативния стрес, наблюдавано при възрастни SHR в сравнение с нормотензивни плъхове, е понижаването на наличността на NO, произвеждан от nNOS, за сметка на увеличената продукция на супероксиди (Alvarez и съавт. 2008). Проучване на Fantinelli и съавтори (2012) показва, че стойността на индекса на хипертрофия е най-висока при 19-месечни SHR и е значително по-висока от съответната стойност при отговарящите им по възраст нормотензивни плъхове, т.е. оксидативният стрес може да се разглежда или като резултат, или като причина за персистирането на повишеното системно артериално налягане и за напредналата степен на хипертрофия.

Изглежда, че активността на nNOS е високочувствителна на оксидативен стрес (Hobbs и съавт. 1994; Schmidt и съавт. 1996). Не е ясно дали всички тези ефекти се дължат на модулацията на nNOS от свободни радикали посредством директни и индиректни механизми. Все пак, H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, NO<sup>-</sup>, ONOO<sup>-</sup>, както и самият азотен оксид проявяват автоинхибиторна

активност към nNOS (Kotsonis и съавт. 1999). Най-големи флукутации по отношение на оксидативния стрес се наблюдават по време на физическо натоварване (Salo и съавт. 1991). Сходно повишаване се наблюдава с напредване на възрастта (Ferrari и съавт. 1998), което се потвърждава и от получените данни в нашето изследване. Нарастването с времето на нивата на супероксиди се наблюдава и в лява камера на хипертензивни плъхове (Piech и съавт. 2003). Вероятно тези ефекти намаляват бионаличността на NO и може да натоварят другите регулаторни механизми, контролиращи активността на nNOS за поддържане на нормални нива на NO.

Някои проучвания показват, че активността на XOR се повишава в миокард на лява камера от мишки с липса на nNOS (Khan и съавт. 2004; Kinugawa и съавт. 2005), което показва, че усилената продукция на кислородни радикали може да има адитивен ефект по отношение на патологичното ремоделиране на лява камера при инфарцирани мишки с липса на nNOS. Освен това, Kinugawa и съавтори (2005) показват, че стимулирането на активността на XOR може да доведе до намаляване на бионаличността на NO, синтезиран от eNOS при мишки с липса на nNOS (чрез повишаване на медираното от кислородните радикали изчерпване на азотния оксид), което показва, че различните аспекти на миокардния фенотип при мишки с липса на nNOS може да произлиза от съвместното нарушаване на активността на nNOS и eNOS. Все пак, тъй като ролята на сърдечната XOR в оксидативния стрес в миокарда на лява камера при хора е ограничена (Eddy и съавт. 1987; De Jong и съавт. 1990; Janssen и съавт. 1993), значението на тези открития за човешката патофизиология е несигурно. В заключение, би могло да се твърди, че повишените нива на супероксиди и произтичащия от тях оксидативен стрес, се асоциират с по-голяма степен на хипертрофия на възрастни SHR, в сравнение с отговарящи им по възраст нормотензивни плъхове. Може да се твърди, че в модела на SHR, оксидативният стрес е както причина за, така и последствие от развитието на хипертрофия (Alvarez и съавт. 2008).

Съществуват данни за повишаване на нивата и активността на nNOS в миокарда на лява камера при хронично хипертензивни животни и при човешки сърца със сърдечна хипертонична болест (Dawson и съавт. 2005), което показва ролята на nNOS в миокардния отговор на стрес. Освен това, при тези условия, се наблюдава преференциална локализация на nNOS върху сарколемата (вместо по мембраните на саркоплазмения ретикулум), където тя се ко-локализира с кавеолин-3. От тези открития е трудно да се предвиди дали индуцираното повишаване и преференциалната локализация на nNOS по сарколемата при хипертрофия представлява ефект на адаптация, насочен към предпазване на увредения миокард или механизъм на патологична адаптация. Различни проучвания сравняват размера на лява камера при мишки с липса на nNOS и контролни животни и откриват, че намалената експресия на nNOS усилва патологичното ремоделиране на лявата камера при хипертрофия (Dawson и съавт. 2005; Saraiva и съавт. 2005). Проучвания върху размера на лява камера водят до заключението, че NO, синтезиран от nNOS, може да отложи развитието на съдечна недостатъчност при хипертонична болест на сърцето. В допълнение, Dawson и съавтори (2005) установяват, че при възрастни SHR плъхове с липса на nNOS, се наблюдава по-бързо развитие на по-тежка хипертрофия и по-бързо настъпване на некроза и апоптоза на кардиомиоцитите. Все пак, предстои да се установи дали всички аспекти при възрастни SHR плъхове с липса на nNOS могат да се обяснят с несъществуващата продукция на NO от съответната изоформа на NOS.

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.

#### **4. Роля на невроналната азотен оксид-синтаза (nNOS) в процеса на стареене на миокарда и в модели на сърдечни заболявания**

Стареенето на миокарда е свързано както с промени в морфометричните показатели, така и в нивата и локализацията на експресията на nNOS. Резултатите от проучването на Damy и съавтори (2000) показват, че стареенето на миокарда вероятно повишава активността на nNOS в кардиомиоцити от лява камера при нормотензивни плъхове, което не се наблюдава при SHR. Тези данни се потвърждават и от изследвания на други автори (Zieman и съавт. 2001; Llorens и съавт. 2005), които съобщават, че в хода на процеса на стареене се усилва цГМФ-зависимият механизъм, което се асоциира с индуцирано повишаване на нивата на сърдечната nNOS. Данните на Li и съавтори (2006) показват, че експресията на nNOS при възрастни мъжки нормотензивни плъхове е повече от два пъти по-висока от тази при младите животни. Резултатите от нашите изследвания показват повишени нива на експресия на nNOS при възрастните групи нормотензивни Wistar плъхове и SHR.

Повишаването на нивата на сърдечната nNOS (Damy и съавт. 2003; Piech и съавт. 2003), eNOS (Khadour и съавт. 1997; Fukuchi и съавт. 1998) и iNOS (Balligand и съавт. 1994; Haywood и съавт. 1996; Lewis и съавт. 1996) се асоциира с набор от сърдечни патологични състояния. Все по-голямо внимание се обръща на възможността за фармакологично повлияване на нивата на NO с цел клинично приложение (Vallance и Leiper 2002), като се счита, че NO проявява както протективен, така и патологичен ефект върху увредения миокард. Например, неспецифичното инхибиране на NOS проявява протективен ефект в условия на миокардна хипертрофия, исхемия и реперфузия (Patel и съавт. 1993; Schulz и Wambolt 1995). Същият ефект се наблюдава при внасяне на екзогенен азотен оксид (Bell и съавт. 2003).

На базата на изследвания със здрави нормотензивни WKY плъхове, може да се заключи, че индуцираното повишаване на nNOS в сърцето при патологични състояния вероятно предпазва миокарда (Ashley и съавт. 2002; Sears и съавт. 2003б) и води до постигането на благоприятен баланс между симпатикус и парасимпатикус (Mohan и съавт. 2002). Към момента проучванията върху ролята на nNOS в модели на различни заболявания са ограничени. Имайки предвид инхибиторния ефект на NO, синтезиран от nNOS, върху разнообразни миокардни функции и дисфункции (Sears и съавт. 2003а; Zhang и съавт. 2003; Hasenfuss и Pieske 2002), допълнителни проучвания за ролята на nNOS при патологични състояния на миокарда могат да хвърлят светлина върху нови интересни открития.

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. Няколко проучвания показват, че миокардната експресия на изоформа, подобна на nNOS, може би играе ключова роля в регулацията на левокамерната функция, както посредством NO, така и индиректно, посредством инхибиране на продукцията и бионаличността на кислородни радикали в миокарда (Casadei 2006). Възможно е индуцираното повишаване на nNOS при патологични условия допълнително да намалява адренергичния отговор и систолната функция. Освен това, в условия на намалена бионаличност на субстрати и ко-фактори, nNOS се декуптира и продуцира супероксид, което на свой ред

води до намалена бионаличност на NO и формиране на други мощни радикали, например пероксинитрит, което е предимно възрастово обусловен процес или се наблюдава при различни патологични състояния на миокарда (Casadei 2006). Сега е известно, че кислородните радикали и NO си взаимодействат, за да промотират благоприятен или патологичен ефект. Какъв ще бъде този ефект се определя от различни фактори като количество освободен азотен оксид, клетъчен тип, изоформа на NOS, състояние на миокарда (норма, исхемия или хипертрофия) и други (Rastaldo и съавт. 2007).

В литературата съществуват данни за повишаването на нивата на nNOS в миокарда след миокарден инфаркт в SHR (Takimoto и съавт. 2000; Dany и съавт. 2003; Piech и съавт. 2003). Освен това, повишена експресия на nNOS се наблюдава съвместно с индуцирано повишаване на HSP90 и индуцирано понижаване на кавеолин 1 и 3 (Piech и съавт. 2003). Подобни промени би трябвало да доведат до повишена активност на NOS (Venema и съавт. 1997; Garcia-Cardena и съавт. 1998; Bender и съавт. 1999). По тази причина, повишената експресия на NOS, заедно с тези промени, обуславя компенсаторен механизъм, който поддържа бионаличността на NO при наличие на оксидативен стрес, който се наблюдава с напредване на възрастта и при хипертрофия на лявата камера. Тези данни са резултат от експериментите на Piech и съавтори (2003) със спонтанно хипертензивни плъхове, както и на Bryant и съавтори (2002) с модел на хипертрофия при мишки. Трябва да се има предвид, че повишената експресия на NOS не корелира непременно с повишена продукция на NO, тъй като последните проучвания показват, че декуплирането на активността на NOS при патологични състояния може да доведе до синтез на кислородни радикали от страна на NOS (Kojda и Harrison 1999).

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; Dany 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. Например, потискането на лявата камера в изолирани сърца води до повишаване на налягането в рамките на 40-минутно въздействие на исхемия. Това налягане е по-голямо при мишки с липса на nNOS, отколкото при наличие на nNOS (Song и съавт. 2001б). Освен това, липсата на nNOS корелира с по-големи размери на инфаркта и повишена експресия на тумор-некротизиращия фактор  $\alpha$  (Song и съавт. 2001б). Според друго проучване при мишки с липса и наличие на nNOS, подложени на 20-минутна оклузия на коронарна артерия и 120-минутна реперфузия, не се наблюдава разлика в размера на инфаркта между двете групи, въпреки че сърцата от мишки с липса на nNOS показват по-силно изразена инфилтрация от полиморфонуклеарни левкоцити (Jones и съавт. 2000).

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.

## ***VII. 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 постнаталния 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 постнаталния 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 показва 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.

## ***VIII. Приноси***

### **VIII.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.

### **VIII.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.

## ***IX. Публикации по дисертационния труд***

1. **Илев А**, Jeleв L, Landzhov B, Kotov G, Hinova-Palova D, Ovtsharoff 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)

## ***X. Библиография***

- Овчаров В, Такева Ц (2008) Цитология, обща хистология, обща ембриология. 5-то издание, Арсо. стр. 127-128.
- Abu-Soud HM, Stuehr DJ (1993) Nitric oxide synthases reveal a role for calmodulin in controlling electron transfer. *Proc. Natl Acad. Sci.* 90:10 769–10 772.
- Abu-Soud HM, Yoho LL, Stuehr DJ (1994) Calmodulin controls neuronal nitric oxide synthase by a dual mechanism. Activation of intra- and interdomain electron transfer. *J. Biol. Chem.* 269:32 047–32 050.
- Aherne W (1968) A method of determining the cross-sectional area of muscle fibers. *J Neurol Sci.* 7:509-528.
- Aiello EA, Villa-Abrille MC, Escudero EM, Portiansky EL, Pérez NG, de Hurtado MC, Cingolani HE (2004) Myocardial hypertrophy of normotensive Wistar-Kyoto rats. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 286:H1229-H1235.
- Alvarez MC, Caldiz C, Fantinelli JC, Garciarena CD, Console GM, Chiappe de Cingolani GE, Mosca SM (2008) Is cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats the cause or the consequence of oxidative stress? *Hypertens Res.* 31:1465-1476.
- Anderson KR, Sutton MG, Lie JT (1979) Histopathological types of cardiac fibrosis in myocardial disease. *J Pathol.* 128:79-85.
- Anderson NH, Devil AM, Graham D, Morton D, Hamilton CA, Redil JL, Schork NJ, Dominiczak AF (1999) Telemetry for cardiovascular monitoring in a pharmacological study: new approaches to data analysis. *Hypertension.* 33:248-255.
- Anderson PAW (2000) Developmental cardiac physiology and myocardial function, In *Pediatric Cardiovascular Medicine* (Moller, J.H. and Hoffman, J.I.E., eds.), Churchill Livingstone, New York, NY, pp. 35–57.
- Anversa P, Beghi C, Kikkawa Y, Olivetti G (1986) Myocardial infarction in rats: Infarct size, myocyte hypertrophy and capillary growth. *Circ Res.* 58:26-37.
- Anversa P, Hiler B, Ricci R, Guideri G, Olivetti G (1986) Myocyte cell loss and myocyte hypertrophy in the aging rat heart. *J Am Coll Cardiol.* 8:1441–1448.
- Anversa P, Loud AV, Giacomelli F, Wiener J (1978) Absolute morphometric study of myocardial hypertrophy in experimental hypertension. II. Ultrastructure of myocytes and interstitium. *Lab Invest.* 38:597-609.

- Anversa P, Melissari M, Beghi C, Olivetti G (1984) Structural compensatory mechanisms in rat heart in early spontaneous hypertension. *Am J Physiol.* 246:H739-H746.
- Anversa P, Nadal-Ginard B (2002) Myocyte renewal and ventricular remodelling. *Nature.* 415:240–243.
- Anversa P, Olivetti G, Loud AV (1980) Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. *Circ Res.* 46:495–502.
- Anversa P, Olivetti G, Melissari M, Loud AV (1979) Morphometric study of myocardial hypertrophy induced by abdominal aortic stenosis. *Lab Invest.* 40:341-349.
- Anversa P, Olivetti M, Mellisari M, Loud AV (1980) Stereological measurement of cellular and subcellular hypertrophy and hyperplasia in the papillary muscle of adult rat. *J Mol Cell Cardiol.* 12:781-795.
- Anversa P, Palackal T, Sonnenblick EH, Olivetti G, Capasso JM (1990) Hypertensive cardiomyopathy: Myocyte nuclei hyperplasia in the mammalian heart. *J Clin Invest.* 85:994-997.
- Anversa P, Palackal T, Sonnenblick EH, Olivetti G, Meggs LG, Capasso JM (1990) Myocyte cell loss and myocyte cellular hyperplasia in the hypertrophied aging rat heart. *Circ Res.* 67:871-885.
- Arnal JF, Warin L, Michel JB (1992) Determination of aortic cyclic guanosine monophosphate in hypertension induced by chronic inhibition of nitric oxide synthase. *J Clin Invest.* 90:647-652.
- Arstall MA, Sawyer DB, Fukazawa R, Kelly RA (1999) Cytokine-mediated apoptosis in cardiac myocytes: the role of inducible nitric oxide synthase induction and peroxynitrite generation. *Circulation Research.* 85:829-840.
- Ashley EA, Sears CE, Bryant SM, Watkins HC, Casadei B (2002) Cardiac nitric oxide synthase 1 regulates basal and betaadrenergic contractility in murine ventricular myocytes. *Circulation.* 105:3011 –3016.
- Ashley LM (1945) A determination of the diameters of myocardial fibers in man and other animals. *J Anat.* 77:325-347.
- Balligand J, Kelly RA, Marsden PA, Smith TW, Michel T (1993) Control of cardiac muscle cell function by an endogenous nitric oxide signalling system. *Proc Natl Acad Sci. USA* 90:347–351.
- Balligand JL, Kobzik L, Han X, Kaye DM, Belhassen L, O’Hara DS, Kelly RA, Smith TW, Michel T (1995) Nitric oxidedependent parasympathetic signaling is due to activation of constitutive endothelial (type III) nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *J Biol Chem.* 270:14582–14586.

- Balligand JL, Ungureanu-Longrois D, Simmons WW, Pimental D, Malinski TA, Kapturczak M, Taha Z, Lowenstein CJ, Davidoff AJ, Kelly RA (1994) Cytokine- inducible nitric oxide synthase (iNOS) expression in cardiac myocytes. Characterization and regulation of iNOS expression and detection of iNOS activity in single cardiac myocytes in vitro. *J. Biol. Chem.* 269:27 580–27 588.
- Banting JD, Thompson KE, Friberg P, Adams MA (1997) Blunted cardiovascular growth induction during prolonged nitric oxide synthase blockade. *Hypertension.* 30:416-421.
- Barouch LA, Harrison RW, Skaf MW, Rosas GO, Cappola TP, Kobeissi ZA, Hobai IA, Lemmon CA, Burnett AL, O'Rourke B, Rodriguez ER, Huang PL, Lima JA, Berkowitz DE, Hare JM (2002) Nitric oxide regulates the heart by spatial confinement of nitric oxide synthase isoforms. *Nature.* 416:337-339.
- Baylis CH, Mitruka B, Deng A (1992) Chronic blockade of nitric oxide synthesis in the rat produces systemic hypertension and glomerular damage. *J Clin Invest.* 90:278-281.
- Bayraktutan U, Yang ZK, Shah AM (1998) Selective dysregulation of nitric oxide synthase type 3 in cardiac myocytes but not coronary microvascular endothelial cells of spontaneously hypertensive rat. *Cardiovasc Res.* 38:719–726.
- Bell RM, Maddock HL, Yellon, DM (2003) The cardioprotective and mitochondrial depolarising properties of exogenous nitric oxide in mouse heart. *Cardiovasc. Res.* 57:405–415.
- Beltrami AP, Urbanek K, Kajstura J (2001) Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction. *N Engl J Med.* 344:1750 –1757.
- Bendall JK, Damy T, Ratajczak P, Loyer X, Monceau V, Marty I, Milliez P, Robidel E, Marotte F, Samuel JL, Heymes C (2004) Role of myocardial neuronal nitric oxide synthase-derived nitric oxide in  $\beta$ -adrenergic hyporesponsiveness after myocardial infarction-induced heart failure in rat. *Circulation.* 110:2368–2375.
- Bender AT, Silverstein AM, Demady DR, Kanelakis KC, Noguchi S, Pratt WB, Osawa Y (1999) Neuronal nitric oxide synthase is regulated by the Hsp90-based chaperone system in vivo. *J. Biol. Chem.* 274:1472–1478.
- Berger JM, Rona G (1971) Fine structure of extranodal transitional cardiocytes in rat left atrium. *J Molec Cell Cardiol* 2:181.
- Bernatova I, Pechanova O, Simko F (1996) Captopril prevents NO-deficient hypertension and left ventricular hypertrophy without affecting nitric oxide synthase activity in rats. *Physiol Res.* 45:311-316.
- Bernhard D, Laufer G (2008) The aging cardiomyocyte: a mini-review. *Gerontology.* 54:24-31.

- Besse S, Robert V, Assayag P, Delcayre C, Swynghedauw B (1994) Nonsynchronous changes in myocardial collagen mRNA and protein during aging: effect of DOCA-salt hypertension. *Am J Physiol.* 267:H2237-H2244.
- Biernacka A, Frangogiannis NG (2011) Aging and Cardiac Fibrosis. *Aging Dis.* 2:158-173.
- Bishop SP, Oparil S, Reynolds RH, Drummond JL (1979) Regional myocyte size in normotensive and spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 1:378-383.
- Bloch RJ, Gonzalez-Serratos H (2003) Lateral force transmission across costameres in skeletal muscle. *Exerc Sport Sci Rev.* 31:73-78.
- Bocheva G, Landzhov B, Bozhilova-Pastirova A NOS activity in hypothyroid rat skin. *Compt Rend Acad Bulg Sci.* 65:1003-1008.
- Borg TK, Goldsmith EC, Price R, Carver W, Terracio L, Samarel AM (2000) Specialization at the Z line of cardiac myocytes. *Cardiovasc Res.* 46:277-285.
- Borg TK, Johnson LD, Lill PH (1983) Specific attachment of collagen to cardiac myocytes: in vivo and in vitro. *Dev Biol.* 97:417-423.
- Borutaite V, Brown GC (1996) Rapid reduction of nitric oxide by mitochondria, and reversible inhibition of mitochondrial respiration by nitric oxide. *Biochem. J.* 315:295–299.
- Brahmajothi MV, Campbell DL (1999) Heterogeneous basal expression of nitric oxide synthase and superoxide dismutase isoforms in mammalian heart: implications for mechanisms governing indirect and direct nitric oxide-related effects. *Circulation Research.* 85:575-587.
- Bredt DS (2003) Nitric oxide signaling specificity – the heart of the problem. *J Cell Sci.* 116:9–15.
- Bredt DS, Snyder SH (1990) Isolation of nitric oxide synthetase, a calmodulin requiring enzyme. *Proc. Natl Acad. Sci.* 87:682–685.
- Breisch EA, White FC, Bloor CM (1985) Myocardial characteristics of pressure overload hypertrophy. A structural and functional study. *Lab Invest.* 51:333-342.
- Brenman JE, Xia H, Chao DS, Black SM, Bredt DS (1997) Regulation of neuronal nitric oxide synthase through alternative transcripts. *Dev. Neurosci.* 19:224–231.
- Brown GC, McBride AG, Fox EJ, McNaught KS, Borutaite V (1997) Nitric oxide and oxygen metabolism. *Biochem. Soc. Trans.* 25:901–904.
- Brüel A, Oxlund H, Nyengaard JR (2002a) Growth hormone increases the total number of myocyte nuclei in the left ventricle from adult rats. *Growth Horm IGF Res.* 12:106–115.

- Brüel A, Oxlund H, Nyengaard JR (2002) Growth hormone increases the total number of cardiac myocyte nuclei in young rats but not in old rats. *Mech Aging Dev.* 123:1353–1362.
- Brune B, Lapetina EG (1995) Protein thiol modification of glyceraldehyde-3-phosphate dehydrogenase as a target for nitric oxide signaling. *Gen Eng.* 17:148–164.
- Bryant SM, Sears CE, Kim YM, Channon KM, Casadei B (2002) Superoxide production by left ventricular myocytes in control and hypertrophied hearts. *Eur. Heart J.* 23:277.
- Burkauskiene A, Mackiewicz Z, Virtanen I, Kontinen YT (2006) Age-related changes in myocardial nerve and collagen networks of the auricle of the right atrium. *Acta Cardiol.* 61:513-518.
- Burlew BS (2004) Diastolic dysfunction in the elderly--the interstitial issue. *Am J Geriatr Cardiol.* 13:29-38.
- Büttner D, Hackbarth H, Wollnik F, Borggreve H (1984) Blood pressure in rats: a comparison of a multifactorial experimental design to measurements in an outbred stock. *Lab Anim.* 18:110-114.
- Capetanaki Y (2002) Desmin cytoskeleton: a potential regulator of muscle mitochondrial behavior and function. *Trends Cardiovasc Med.* 12:339-348.
- Casadei B (2006) The emerging role of neuronal nitric oxide synthase in the regulation of myocardial function. *Exp. Physiol.* 91:943-955.
- Casadei B, Sears CE (2003) Nitric-oxide-mediated regulation of cardiac contractility and stretch responses. *Prog Biophys Mol Biol.* 82:67–80.
- Caulfield JB (1983) Alterations in cardiac collagen with hypertrophy, in Tarazi RC, Dunbar JB (eds): *Perspectives in Cardiovascular Research*. New York, Raven Press, vol 8, pp. 49-57.
- Cernadas MR, de Miguel LS, García-Durán M, González-Fernández F, Millás I, Montón M, Rodrigo J, Rico L, Fernández P, de Frutos T, Rodríguez-Feo JA, Guerra J, Caramelo C, Casado S, López-Farré A (1998) Expression of constitutive and inducible nitric oxide synthases in the vascular wall of young and aging rats. *Circ Res.* 83:279–286.
- Chen J, Petranka J, Yamamura K, London RE, Steenbergen C, Murphy E (2003) Gender differences in sarcoplasmic reticulum calcium loading after isoproterenol. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 285:H2657–H2662.
- Chimenti C, Kajstura J, Torella D, Urbanek K, Heliński H, Colussi C, Di MF, Nadal-Ginard B, Frustaci A, Leri A, Maseri A, Anversa P (2003) Senescence and death of primitive cells and myocytes lead to premature cardiac aging and heart failure. *Circ Res* 2003. 93:604–613.

- Choate JK, Danson EJ, Morris JF, Paterson DJ (2001) Peripheral vagal control of heart rate is impaired in neuronal NOS knockout mice. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 281:H2310–H2317.
- Crabos M, Coste P, Paccalin M, Tariosse L, Daret D, Besse P, Bonoron-Adele S (1997) Reduced basal NO-mediated dilation and decreased endothelial NO-synthase expression in coronary vessels of spontaneously hypertensive rats. *J Mol Cell Cardiol.* 29:55-65.
- Cross HR, Murphy E, Steenbergen C (2002) Ca(2+) loading and adrenergic stimulation reveal male/ female differences in susceptibility to ischemia-reperfusion injury. *Am J Physiol Heart Circ Physiol.* 283:H481–H489.
- Damy T, Ratajczak P, Robidel E, Bendall JK, Olivero P, Boczkowski J, Ebrahimian T, Marotte F, Samuel JL, Heymes C (2003) Up-regulation of cardiac nitric oxide synthase 1-derived nitric oxide after myocardial infarction in senescent rats. *FASEB J.* 17:1934–1936.
- Damy T, Ratajczak P, Shah AM, Camors E, Marty I, Hasenfuss G, Marotte F, Samuel JL, Heymes C (2004) Increased neuronal nitric oxide synthase-derived NO production in the failing human heart. *Lancet.* 363:1365–1367.
- Danson EJ, Paterson DJ (2003) Enhanced neuronal nitric oxide synthase expression is central to cardiac vagal phenotype in exercisetrained mice. *J Physiol.* 546:225–232.
- Dawson D, Lygate CA, Zhang MH, Hulbert K, Neubauer S, Casadei B (2005) nNOS gene deletion exacerbates pathological left ventricular remodeling and functional deterioration after myocardial infarction. *Circulation.* 112:3729–3737.
- De Jong JW, Van der Meer P, Nieukoop AS, Huizer T, Stroeve RJ, Bos E (1990) Xanthine oxidoreductase activity in perfused hearts of various species, including humans. *Circ Res.* 67:770–773.
- Dees E, Baldwin HS (2002) New frontiers in molecular pediatric cardiology. *Curr Opin Pediatr.* 14:627–633.
- DeHaan RL (1963) Organization of the cardiogenic plate in the early chick embryo. *Acta Embryol Morphol Exp.* 6:26–38.
- Deng AY, Rapp JP, Kato H, Bihoreau MT (1995) Linkage mapping of the neuronal nitric oxide synthase gene (Nos1) to rat chromosome 12. *Mamm Genome.* 6:824.
- Devlin AM, Brosnan MJ, Graham D, Morton JJ, McPhaden AR, McIntype M, Hamilton CA, Reid JL, Dominiczak AF (1998) Vascular smooth muscle cell polyploidy and cardiomyocyte hypertrophy due to chronic NOS inhibition in vivo. *Am J Physiol.* 274:H52-H59.

- Dinerman JL, Steiner JP, Dawson TM, Dawson V, Snyder SH (1994) Cyclic nucleotide dependent phosphorylation of neuronal nitric oxide synthase inhibits catalytic activity. *Neuropharmacology*. 33:1245–1251.
- Dobrian AD, Schriver SD, Lynch T, Prewitt RL (2003) Effect of salt on hypertension and oxidative stress in a rat model of diet-induced obesity. *Am J Physiol Renal Physiol*. 285:F619–F628.
- Dowell RT, McManus RE (1978) Pressure-induced cardiac enlargement in neonatal and adult rats. Left ventricular functional characteristics and evidence of cardiac muscle cell proliferation in the neonate. *Circ Res*. 42:303–310.
- Dzambazova E, Landzhov B, Bocheva A, Bozhilova-Pastirova (2011a) A effects of D-kyotorphin on nociception and NADPH-d neurons in rat's periaqueductal gray after immobilization stress. *Amino Acids*. 41:937-944.
- Dzambazova E, Landzhov B, Bocheva A, Bozhilova-Pastirova (2011b) A effects of kyotorphin on NADPH-d reactive neurons in rat's cerebral cortex after acute immobilization stress. *Compt Rend Acad Bulg Sci*. 64:1779-1784.
- Eddy LJ, Stewart JR, Jones HP, Engerson TD, McCord JM, Downey JM (1987) Free radical-producing enzyme, xanthine oxidase, is undetectable in human hearts. *Am J. Physiol. Heart Circ Physiol*. 253:H709–H711.
- Eghbali M, Robinson TF, Seifter S, Blumenfeld OO (1989) Collagen accumulation in heart ventricles as a function of growth and aging. *Cardiovasc Res*. 23:723-729.
- Ehrman LA, Yutzey KE (1999) Lack of regulation in the heart forming region of avian embryos. *Dev Biol*. 207:163–175.
- Elfering SL, Sarkela TM, Giulivi C (2002) Biochemistry of mitochondrial nitric oxide synthase. *J. Biol. Chem*. 277:38 079–38 086.
- Engelmann G, John C, Ross G (1987) Morphometric analysis of cardiac hypertrophy during development, maturation and senescence in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res*. 60:487–94.
- Factor SM, Bhan R, Minase T, Wolinsky H, Sonnenblick EH (1981) Hypertensive-diabetic cardiomyopathy in the rat: An experimental model of human disease. *Am J Pathol*. 102:219-228.
- Factor SM, Minase T, Cho S, Dornitz R, Sonnenblick EH (1982) Microvascular spasm in the cardiomyopathic Syrian hamster: A preventable cause of focal myocardial necrosis. *Circulation*. 66:342-354.
- Fantinelli J, Caldiz C, Alvarez MC, Garciaarena CD, Chiappe de Cingalani GE, Mosca SM (2012) Oxidative damage in cardiac tissue from normotensive and spontaneously

- hypertensive rats: effect of ageing. *Oxidative Stress and Diseases*, Dr. Volodymyr Lushchak, pp.141-156.
- Fatkin D, Graham RM (2002) Molecular mechanisms of inherited cardiomyopathies. *Physiol Rev.* 82:945–980.
- Fernandez AP, Serrano J, Castro S, Salazar FJ, Lopez JC, Rodrigo J, Nava E (2003) Distribution of nitric oxide synthases and nitrotyrosine in the kidney of spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens.* 21:2375–2388.
- Feron O, Belhassen L, Kobzik L, Smith TW, Kelly RA, Michel T (1996) Endothelial nitric oxide synthase targeting to caveolae. Specific interactions with caveolin isoforms in cardiac myocytes and endothelial cells. *The Journal of Biological Chemistry.* 271:22810–22814.
- Ferrari R, Agnoletti L, Comini L, Gaia G, Bachetti T, Cargnoni A (1998) Oxidative stress during myocardial ischaemia and heart failure. *Eur Heart J.* 19:B2–B11.
- Fischmann TO, Hruza A, Niu XD, Fossetta JD, Lunn CA, Dolphin E, Prongay AJ, Reichert P, Lundell DJ, Narula SK, Weber PC (1999) Structural characterization of nitric oxide synthase isoforms reveals striking active-site conservation. *Nat Struct Biol.* 6:233-242.
- Fleming I, Busse R (2003) Molecular mechanisms involved in the regulation of the endothelial nitric oxide synthase. *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.* 284:R1–R12.
- Folkow B, Svanborg A (1993) Physiology of cardiovascular aging. *Physiol Rev.* 73, 725–764.
- Forstermann U, Boissel JP, Kleinert H (1998) Expressional control of the constitutive isoforms of nitric oxide synthase (NOS I and NOS III). *FASEB J.* 12:773–790.
- Fozzard HA (1965) Membrane capacity of the cardiac Purkinje fiber. *J Physiol.* 182:255.
- French S, Giulivi C, Balaban RS (2001) Nitric oxide synthase in porcine heart mitochondria: evidence for low physiological activity. *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 280:H2863–H2867.
- Frenzel H, Feimann J (1984) Age-dependent changes in the myocardium of rats. A quantitative light- and electron-microscopic study on the right and left chamber wall. *Mech Aging Dev.* 27:29–41.
- Frohlich ED, Tarazi RC (1979) Is arterial pressure the sole factor responsible for hypertensive cardiac hypertrophy? *Am J Cardiol.* 44:959–963.
- Fujita H, Takeda K, Nakamura K, Uchida A, Takenaka K, Itoh H, Nakata T, Sasaki S, Nakagawa M (1995) Role of nitric oxide in impaired coronary circulation and improvement by angiotensin II receptor antagonist in spontaneously hypertensive rats. *Clin Exp Pharmacol Physiol.* 22:148–150.

- Fujita T, Toya Y, Iwatsubo K, Onda T, Kimura K, Umemura S, Ishikawa Y (2001) Accumulation of molecules involved in alpha1-adrenergic signal within caveolae: caveolin expression and the development of cardiac hypertrophy. *Cardiovasc Res.* 51:709–716.
- Fukagawa NK (1999) Aging: is oxidative stress a marker or is it causal? *Proc Soc Exp Biol Med.* 222:293–298.
- Fukuchi M, Hussain SN, Giaid A (1998) Heterogeneous expression and activity of endothelial and inducible nitric oxide synthases in end-stage human heart failure. *Circulation.* 98:132–139.
- Gallo MP, Ghigo D, Bosia A, Alloatti G, Costamagna C, Penna C, Levi RC (1998) Modulation of guinea-pig cardiac L-type calcium current by nitric oxide synthase inhibitors. *J Physiol.* 506:639–651.
- Gallo MP, Malan D, Bedendi I, Biasin C, Alloatti G, Levi RC (2001) Regulation of cardiac calcium current by NO and cGMP-modulating agents. *Pflugers Arch.* 441:621–628.
- Ganong WF (2005) *Review of Medical Physiology*, 23rd edition. McGraw-Hill Medical. pp. 489–521.
- Garcia-Cardena G, Fan R, Shah V, Sorrentino R, Cirino G, Papapetropoulos A, Sessa WC (1998) Dynamic activation of endothelial nitric oxide synthase by Hsp90. *Nature.* 392:821–824.
- Garcia-Martinez V, Schoenwolf GC (1993) Primitive-streak origin of the cardiovascular system in avian embryos. *Dev Biol.* 159:706–719.
- Georgiev GP (2015) Age-related changes in human intervertebral discs. A comparative light-microscopic, electron-microscopic and histochemical study. *IJTRA.* 3:89-93.
- Gerdes AM, Moore JA, Hines JM, Kirkland PA, Bishop SP (1986) Regional differences in myocyte size in normal rat heart. *Anat Rec.* 215:420–426.
- Gilligan JP, Spector S (1984) Synthesis of collagen in cardiac and vascular walls. *Hypertension*, 6:44–49.
- Gonzalez DR, Beigi F, Treuer AV, Hare JM (2007) Deficient ryanodine receptor S-nitrosylation increases sarcoplasmic reticulum calcium leak and arrhythmogenesis in cardiomyocytes. *Proc Natl Acad Sci.* 104:20612–20617.
- Gosse P (2005) Left ventricular hypertrophy as a predictor of cardiovascular risk. *J Hypertens Suppl.* 23:S27–S33.
- Gregorio CC, Antin PB (2000) To the heart of myofibril assembly. *Trends Cell Biol.* 10:355–362

- Gregorio CC, Granzier H, Sorimachi H, Labeit S (1999) Muscle assembly: a titanic achievement? *Curr Opin Cell Biol.* 11:18–25.
- Grossman W, Jones D, McLaurin LP (1975) Wall stress and patterns of hypertrophy in the human left ventricle. *J Clin Invest.* 56:56-64.
- Guo Y, Ward ME, Beasjourns S, Mori M, Hussain SN (1997) Regulation of cerebellar nitric oxide production in response to prolonged in vivo hypoxia. *J Neurosci Res.* 49:89–97.
- Gupta M, Gupta MP (1997) Cardiac hypertrophy: old concepts, new perspectives. *Mol Cell Biochem.* 176:273–279.
- Hachamovitch R, Wicker P, Capasso JM, Anversa P (1989) Alterations of coronary blood flow and reserve with aging in Fischer 344 rats. *Am J Physiol.* 256:H66-H73.
- Hare JM, Lofthouse RA, Juang GJ, Colman L, Ricker KM, Kim B (2000) Contribution of caveolin protein abundance to augmented nitric oxide signaling in conscious dogs with pacing-induced heart failure. *Circ Res.* 86:1085–1092.
- Hare JM, Stamler JS (2005) NO/redox disequilibrium in the failing heart and cardiovascular system. *J Clin Invest.* 115:509–517.
- Harrison DG, Barnes DH, Hiratzka LF, Eastham CL, Kerber RE, Marcus ML (1985) The effect of cardiac hypertrophy on the coronary collateral circulation. *Circulation.* 71:1135–1145.
- Harvey RP, Rosenthal N (1998) *Heart Development.* Academic Press, New York, NY, pp. 227–242.
- Harvey RP, Rosenthal N (1999) *Heart Development,* Academic Press, San Diego, CA, pp. 51–62.
- Hasegawa T, Takagi S, Nishimaki K, Morita K, Nakajima S (1992) Impairment of L-arginine metabolism in spontaneously hypertensive rats. *Biochem Int.* 26:653–658.
- Hasenfuss G, Pieske B (2002) Calcium cycling in congestive heart failure. *J. Mol. Cell Cardiol.* 34:951–969.
- Hatada Y, Stern CD (1994) A fate map of the epiblast of the early chick embryo. *Development.* 120:2879–2889.
- Hayakawa H, Rajj L (1997) The link among nitric oxide synthase activity, endothelial function, and aortic and ventricular hypertrophy in hypertension. *Hypertension,* 29:235–241.
- Hayashi Y, Nishio M, Naito Y, Yokokura H, Nimura Y, Hidaka H (1999) Regulation of neuronal nitric-oxide synthase by calmodulin kinases. *J Biol Chem.* 274:20597–20602.
- Haywood GA (and 12 others) (1996) Expression of inducible nitric oxide synthase in human heart failure. *Circulation.* 93:1087–1094.

- Hein S, Kostin S, Heling A, Maeno Y, Schaper J (2000) The role of the cytoskeleton in heart failure. *Cardiovasc Res.* 45:273–278.
- Henquell L, Honig CR (1976) Intercapillary distances and capillary reserve in right and left ventricles: Significance for control of tissue Po<sub>2</sub>. *Microvasc Res.* 12:35–41.
- Henquell L, Odoroff CL, Honig CR (1977) Intercapillary distance and capillary reserve in hypertrophied rat heart beating in situ. *Circ Res.* 41:400–408.
- Herring N, Golding S, Paterson DJ (2000) Pre-synaptic NO-cGMP pathway modulates vagal control of heart rate in isolated adult guinea pig atria. *J Mol Cell Cardiol.* 32:1795–1804.
- Hinova-Palova DV, Edelstein L, Landzhov B, Minkov M, Malinova L, Hristov S, Denaro FJ, Alexandrov A, Kiriakova T, Brainova I, Paloff A, Ovtsharoff W (2014) Topographical distribution and morphology of NADPH-diaphorase-stained neurons in the human claustrum. *Front Syst Neurosci.* 27:8-96.
- Hobbs AJ, Fukuto JM, Ignarro LJ (1994) Formation of free nitric oxide from L-arginine by nitric oxide synthase: Direct enhancement of generation by superoxide dismutase. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 91:10992–10996.
- Hoffman JIE (1981) Why is myocardial ischemia so common subendocardi- dial? *Clin Sci.* 61:657–662.
- Hollenberg M, Honbo N, Samorodin AJ (1977) Cardiac cellular responses to altered nutrition in the neonatal rat. *Am J Physiol.* 233:H356-H360.
- Hopkins SF, McCutcheon EP, Wekstein DR (1973) Postnatal changes in rat ventricular function. *Circ Res.* 32:685–691.
- Huttenbach Y, Ostrowski ML, Thaller D, Kim HS (2001) Cell proliferation in the growing human heart: MIB-1 immunostaining in preterm and term infants at autopsy. *Cardiovasc Pathol.* 10:119–123.
- Imamura K (1978) Ultrastructural aspect of left ventricular hypertrophy in spontaneously hypertensive rats: A qualitative and quantitative study. *Jpn Circ J.* 49:979–1002.
- Ing wall JS, Fossel ET (1983) Changes in the creatine kinase system in the hypertrophied myocardium of the dog and rat, in Tarazi RC, Dunbar JB (eds): *Perspectives in Cardiovascular Research.* New York, Raven Press, vol 8, pp. 601–617.
- Isoyama S, Nitta-Komatsubara Y (2002) Acute and chronic adaptation to hemodynamic overload and ischemia in the aged heart. *Heart Fail Rev.* 7:63-69.
- Jaffrey SR, Snyder SH (1996) PIN: an associated protein inhibitor of neuronal nitric oxide synthase. *Science.* 274:774– 777.
- James TN (1964) Anatomy of the AV node of the dog. *Anat Rec.* 148:15.

- James TN, Sherf L, Fine G, Morales AR (1966) Comparative ultrastructure of the sinus node in man and dog. *Circulation*. 34:139.
- Janssen M, van der Meer P, De Jong JW (1993) Antioxidant defence in rat, pig, guinea pig, and human hearts: comparison with xanthine oxidoreductase activity. *Cardiovasc. Res.* 27:2052–2057.
- Jones SP, Girod WG, Huang PL, Lefer DJ (2000) Myocardial reperfusion injury in neuronal nitric oxide synthase deficient mice. *Coron. Artery Dis.* 11:593–597.
- Junqueira LCUa, Carneiro J, Kelley RO (2013) *Basic histology*. 13th ed. Norwalk: Appleton & Lange, pp. 205–207.
- Kajstura J, Cheng W, Sarangarajan R, Li P, Li B, Nitahara JA, Chapnick S, Reiss K, Olivetti G, Anversa P (1996) Necrotic and apoptotic myocyte cell death in the aging heart of Fischer 344 rats. *Am J Physiol.* 271:H1215-H1228.
- Kalishnik M, Porenta OV, Mattfeldt T (1998) Stereological and morphometric studies of mammalian myocardium: a review. *Acta Stereol.* 17:389–401.
- Kanai AJ, Mesaros S, Finkel MS, Oddis CV, Birder LA, Malinski T (1997)  $\beta$ -Adrenergic regulation of constitutive nitric oxide synthase in cardiac myocytes. *Am J Physiol Cell Physiol.* 273:C1371–C1377.
- Kanai AJ, Pearce LL, Clemens PR, Birder LA, VanBibber MM, Choi SY, de Groat WC, Peterson J (2001) Identification of a neuronal nitric oxide synthase in isolated cardiac mitochondria using electrochemical detection. *Proc. Natl Acad. Sci.* 98:14 126–14 131.
- Katori T, Donzelli S, Tocchetti CG, Miranda KM, Cormaci G, Thomas DD (2006) Peroxynitrite and myocardial contractility: in vivo versus in vitro effects. *Free Radic Biol Med.* 41:1606–1618.
- Katzberg AA, Fanner BB, Harris RA (1977) The predominance of binucleation in isolated rat heart myocytes. *Am J Anat.* 149:489–500.
- Kawamura K, Kashii C, Imamura K (1976) Ultrastructural changes in hypertrophied myocardium of spontaneously hypertensive rats. *Jpn Circ J.* 40:1119–1145.
- Kelly RG, Brown NA, Buckingham ME (2001) The arterial pole of the mouse heart forms from Fgf10-expressing cells in pharyngeal mesoderm. *Dev Cell.* 1:435–440.
- Kern FH, Bengur AR, Bello EA (1996) Developmental cardiac physiology, In *Textbook of Pediatric Intensive Care*, 3rd Ed. pp. 397–423.
- Khadour FH, Kao RH, Park S, Armstrong PW, Holycross BJ, Schulz R (1997) Age-dependent augmentation of cardiac endothelial NOS in a genetic rat model of heart failure. *Am. J. Physiol.* 273:H1223–H1230.

- Khan SA, Lee K, Minhas KM, Gonzalez DR, Raju SVY, Tejani AD, Li D, Berkowitz DE, Hare JM (2004) Neuronal nitric oxide synthase negatively regulates xanthine oxidoreductase inhibition of cardiac excitation-contraction coupling. *Proc. Natl. Acad. Sci.* 101:5944–15948.
- Khan SA, Skaf MW, Harrison RW, Lee K, Minhas KM, Kumar A, Fradley M, Shoukas AA, Berkowitz DE, Hare JM (2003) Nitric oxide regulation of myocardial contractility and calcium cycling: independent impact of neuronal and endothelial nitric oxide synthases. *Circ Res.* 92:1322–1329.
- Kim HD, Kim DJ, Lee IJ, Rah BJ, Sawa Y, Schaper J (1992) Human fetal heart development after mid-term: morphometry and ultrastructural study. *J Mol Cell Cardiol.* 24:949–965.
- Kinugawa S, Huang H, Wang Z, Kaminski PM, Wolin MS, Hintze TH (2005) A defect of neuronal nitric oxide synthase increases xanthine oxidase-derived superoxide anion and attenuates the control of myocardial oxygen consumption by nitric oxide derived from endothelial nitric oxide synthase. *Circ. Res.* 96:355–362.
- Kirby ML (2002) Molecular embryogenesis of the heart. *Pediatr Dev Pathol.* 5:516–543.
- Kishimoto J, Spurr N, Liao M, Lizhi L, Emson P, Xu W (1992) Localization of brain nitric oxide synthase (NOS) to human chromosome 12. *Genomics.* 14:802–804.
- Kitzman DW, Gardin JM, Gottdiener JS, Arnold A, Boineau R, Aurigemma G, Marino EK, Lyles M, Cushman M, Enright PL (2001) Importance of heart failure with preserved systolic function in patients  $>$  or  $=$  65 years of age. CHS Research Group. Cardiovascular Health Study. *Am J Cardiol.* 87:413-419.
- Klatt P, Pfeiffer S, List BM, Lehner D, Glatter O, Bachinger HP (1996) Characterisation of heme-deficient neuronal nitric oxide synthase reveals a role for heme in subunit dimerisation and binding of the amino acid substrate and tetrahydrobiopterin. *J Biol Chem.* 271:7336–7342.
- Klima M, Burns TR, Chopra A (1990) Myocardial fibrosis in the elderly. *Arch Pathol Lab Med.* 114:938-942.
- Klimaschewski L, Kummer W, Mayer B, Couraud JY, Preissler U, Philippin B (1992) Nitric oxide synthase in cardiac nerve fibers and neurons of rat and guinea pig heart. *Circ Res.* 71:1533–1537.
- Knoll R, Iaccarino G, Tarone G, Hilfiker-Kleiner D, Bauersachs J, Leite-Moreira AF (2011) Towards a re-definition of ‘cardiac hypertrophy’ through a rational characterization of left ventricular phenotypes: a position paper of the Working Group ‘Myocardial Function’ of the ESC. *Eur J Heart Fail.* 13:811–819.

- Kohr MJ, Wang H, Wheeler DG, Velayutham M, Zweier JL, Ziolo MT (2008a) Targeting of phospholamban by peroxynitrite decreases  $\beta$ -adrenergic stimulation in cardiomyocytes. *Cardiovasc Res.* 77:353–361.
- Kohr MJ, Wang H, Wheeler DG, Velayutham M, Zweier JL, Ziolo MT (2008b) Biphasic effect of SIN-1 is reliant upon cardiomyocyte contractile state. *Free Radic Biol Med.* 45:73–80.
- Kojda G, Harrison D (1999) Interactions between NO and reactive oxygen species: pathophysiological importance in atherosclerosis, hypertension, diabetes and heart failure. *Cardiovasc. Res.* 43:562–571.
- Kojda G, Kottenberg K, Nix P, Schluter KD, Piper HM, Noack E (1996) Low increase in cGMP induced by organic nitrates and nitrovasodilators improves contractile response of rat ventricular myocytes. *Circ Res.* 78:91–101.
- Korecky B, Rakusan K (1978) Normal and hypertrophic growth of the rat heart: Changes in cell dimensions and number. *Am J Physiol.* 234:H123-H128.
- Kostin S, Scholz D, Shimada T (1998) The internal and external protein scaffold of the T-tubular system in cardiomyocytes. *Cell Tissue Res.* 294:449–460.
- Kotsonis P, Frey A, Frohlich LG, Hofmann H, Reif A, Wink DA (1999) Autoinhibition of neuronal nitric oxide synthase: Distinct effects of reactive nitrogen and oxygen species on enzyme activity. *Biochem J.* 340:745–752.
- Kumarapeli AR, Wang X (2004) Genetic modification of the heart: chaperones and the cytoskeleton. *J Mol Cell Cardiol.* 37:1097–1109.
- Kurtz TW, Morris RC Jr (1987) Biological variability in Wistar-Kyoto rats. Implications for research with the spontaneously hypertensive rat. *Hypertension.* 10:127-131.
- Kvietikova I, Wenger RH, Marti HH, Gassmann M (1995) The transcription factors ATF-1 and CREB-1 bind constitutively to the hypoxia-inducible factor-1 (HIF-1) DNA recognition site. *Nucleic Acids Res.* 23:4542–4550.
- Lakatta EG, Levy D (2003) Arterial and cardiac aging: major shareholders in cardiovascular disease enterprises: Part II: the aging heart in health: links to heart disease. *Circulation.* 107:346-354.
- Landzhov B, Malinova L, Ovtsharoff W (2012) Histochemical and magnetic resonance imaging study of degenerative diseases in human intervertebral discs. *Compt Rend Acad Bulg Sci.* 65:389-392.
- Lee CG, Gregg AR, O'Brien WE (1995) Localization of the neuronal form of nitric oxide synthase to mouse chromosome 5. *Mamm Genome.* 6:56–57.

- Legato MJ (1973) Ultrastructure of the Atrial, Ventricular, and Purkinje Cell with Special Reference to the Genesis of Arrhythmias. *Circulation* 47:178–189.
- Lewis NP (and 12 others) (1996) Induction of nitric oxide synthase in the human cardiac allograft is associated with contractile dysfunction of the left ventricle. *Circulation*. 93:720–729.
- Li D, Qu Y, Tao L, Liu H, Hu A, Gao F, Sharifi-Azad S, Grunwald Z, Ma XL, Sun JZ (2006) Inhibition of iNOS protects the aging heart against beta-adrenergic receptor stimulation induced cardiac dysfunction and myocardial ischemic injury. *J Surg Res*. 131:64-72.
- Li F, Wang X, Capasso J, Gerdes AM (1996) Rapid transition of cardiac myocytes from hyperplasia to hypertrophy during postnatal development. *J Mol Cell Cardiol*. 28:1737–1746.
- Lin CS, Lau A, Bakircioglu E, Tu R, Wu F, Week S, Nunes L, Lue TF (1998) Analysis of neuronal nitric oxide synthase isoform expression and identification of human nNOS-mu. *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 253:388–394.
- Linzbach AJ (1950) Die Muskelfaserkonstante und das Wachstumsgesetz der menschlichen Herzkammer. *Virchows Arch [Pathol Anat]*. 318:575–618.
- Llorens S, Salazar FJ, Nava E (2005) Assessment of the nitric oxide system in the heart, aorta and kidney of aged Wistar-Kyoto and spontaneously hypertensive rats. *J Hypertens*. 23:1507–1514.
- Lohr JL, Yost JH (2000) Vertebrate model systems in the study of early heart development: xenopus and zebrafish. *Am J Med Genet*. 97:248–257.
- Loud AV, Anversa P, Giacomelli F, Wiener J (1978) Absolute morphometric study of myocardial hypertrophy in experimental hypertension. I. Determination of myocyte size. *Lab Invest*. 38:586–596.
- Lund DD, Tomanek RJ (1978) Myocardial morphology in spontaneously hypertensive and aortic constricted rats. *Am J Anat*. 152:141–152.
- Lund S, Holman GD, Schmitz O, Pedersen O (1995) Contraction stimulates translocation of glucose transporter GLUT4 in skeletal muscle through a mechanism distinct from that of insulin PNAS. 92:5817–5821.
- Luo W, Grupp IL, Harrer J, Ponniah S, Grupp G, Duffy JJ, Doetschman T, Kranias EG (1994) Targeted ablation of the phospholamban gene is associated with markedly enhanced myocardial contractility and loss of  $\beta$ -agonist stimulation. *Circ Res*. 75:401–409.
- Lüscher TF (1990) The endothelium. Target and promoter of hypertension? *Hypertension*. 15:482–485.

- Lüscher TF, Tanner FC, Dohi Y (1992) Age, hypertension and hypercholesterolemia alter endothelium-dependent vascular regulation. *Pharmacol Toxicol.* 70:S32–S39.
- Madarim-de-Lacerda CA, Pereira LMM (1997) Stereology of the myocardium in hypertensive rats under chronic inhibition of nitric oxide synthesis. *Biomed Res.* 8:153–160.
- Maffei A, Poulet R, Vecchione C, Colella S, Fratta L, Frati G, Trimarco V, Trimarco B, Lembo G (2002) Increased basal nitric oxide release despite enhanced free radical production in hypertension. *J Hypertens.* 20:1135–1142.
- Manoury B, Montiel V, Balligand JL (2012) Nitric oxide synthase in post-ischaemic remodelling: new pathways and mechanisms. *Cardiovasc Res.* 94:304–315.
- Marian AJ, Roberts R (2001) The molecular genetic basis for hypertrophic cardiomyopathy. *J Mol Cell Cardiol.* 33:655–670.
- Massion PB, Balligand JL (2003) Modulation of cardiac contraction, relaxation and rate by the endothelial nitric oxide synthase (eNOS): lessons from genetically modified mice. *J Physiol.* 546:63–75.
- Massion PB, Feron O, Dessy C (2003) Nitric oxide and cardiac function: ten years after, and continuing. *Circ Res.* 93:388–398.
- Matsuda H, Iyanagi T (1999) Calmodulin activates intramolecular electron transfer between the two flavins of neuronal nitric oxide synthase flavin domain. *Biochimica Et Biophysica Acta.* 1473:345–355.
- Matsuoka H, Nakata M, Kohno K, Koga Y, Nomura G, Toshima H, Imaizumi T (1996) Chronic L arginine administration attenuates cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Hypertension.* 27:14–18.
- Mawe GM, Talmage EK, Lee KP, Parsons RL (1996) Expression of choline acetyltransferase immunoreactivity in guinea pig cardiac ganglia. *Cell Tissue Res.* 285:281–286.
- Mayhew TM, Pharaoh A, Austin A, Fagan DG (1997) Stereological estimates of nuclear number in human ventricular cardiomyocytes before and after birth obtained using physical disectors. *J Anat.* 191:107–115.
- Mays PK, Bishop JE, Laurent GJ (1988) Age-related changes in the proportion of types I and III collagen. *Mech Ageing Dev.* 45:203–212.
- Mays PK, McAnulty RJ, Campa JS, Laurent GJ (1991) Age-related changes in collagen synthesis and degradation in rat tissues. Importance of degradation of newly synthesized collagen in regulating collagen production. *Biochem J.* 276:307–313.
- McElroy CL, Gissen SA, Fishbein MC (1978) Exercise induced reduction in myocardial infarct size after coronary artery occlusion in the rat. *Circulation.* 57:958–962.

- McFadden DG, Olson EN (2002) Heart development: learning from mistakes. *Curr Opin Genet Dev.* 12:328–335.
- Michel JB, Xu Y, Blot S, Philippe M, Chatellier G (1996) Improved survival in rats administered N-nitro L-arginine methyl ester due to converting enzyme inhibition. *J Cardiovasc Pharmacol.* 28:142–148.
- Miethke A, Feussner M, Planitzer G, Richter H, Gutschmann M, Gossrau R (2003) Localization of NOS-1 in the sarcolemma region of a subpopulation of atrial cardiomyocytes including myoendocrine cells and NOS-3 in vascular and endocardial endothelial cells of the rat heart. *Acta Histochem.* 105:43–55.
- Miller MK, Granzier H, Ehler E, Gregorio CC (2004) The sensitive giant: the role of titin-based stretch sensing complexes in the heart. *Trends Cell Biol.* 14:119–126.
- Miller MR, Megson IL (2007) Recent developments in nitric oxide donor drugs. *British Journal of Pharmacology.* 151:305–321.
- Mjaatvedt CH, Nakaoka T, Moreno-Rodriguez R (2001) The outflow tract of the heart is recruited from a novel heart-forming field. *Dev Biol.* 238:97–109.
- Mohan RM, Golding S, Paterson DJ (2001) Intermittent hypoxia improves atrial tolerance to subsequent anoxia and reduces stress protein expression. *Acta Physiol Scand.* 172:89–95.
- Mohan RM, Heaton DA, Danson EJ, Krishnan SP, Cai S, Channon KM, Paterson DJ (2002) Neuronal nitric oxide synthase gene transfer promotes cardiac vagal gain of function. *Circ. Res.* 91:1089–1091.
- Mukherjee D, Sen S (1990) Collagen phenotypes during development and regression of myocardial hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Circ Res.* 67:1474-1480.
- Munzel T, Daiber A, Ullrich V, Mulsch A (2005) Vascular consequences of endothelial nitric oxide synthase uncoupling for the activity and expression of the soluble guanylyl cyclase and the cGMP-dependent protein kinase. *Arteriosclerosis, Thrombosis, and Vascular Biology.* 25:1551–1557.
- Murakam T (1974) Histometrical and histological changes of the skeletal muscle in neuromuscular disorders —an autopsy study. *Acta Pathol Jap.* 24:761–772.
- Nadal-Ginard B, Kajstura J, Leri A, Anversa P (2003) Myocyte death, growth, and regeneration in cardiac hypertrophy and failure. *Circ Res.* 92:139–150.
- Nathan C, Xie QW (1994) Regulation of biosynthesis of nitric oxide. *Journal of Biological Chemistry.* 269:13725–13728.

- Nava E, Farre AL, Moreno C, Casado S, Moreau P, Cosentino F, Lüscher TF (1998) Alterations to the nitric oxide pathway in the spontaneously hypertensive rat. *J Hypertens.* 16:609–615.
- Nava E, Noll G, Lüscher TF (1995) Increased activity of calcium-dependent NOS nitric oxide synthase in cardiac endothelium in spontaneous hypertension. *Circulation.* 91:2310–2313.
- Newton DC, Bevan SC, Choi S, Robb GB, Millar A, Wang Y, Marsden PA (2003) Translational Regulation of Human Neuronal Nitricoxide Synthase by an Alternatively Spliced 5'-Untranslated Region Leader Exon. *Journal of Biological Chemistry.* 278:636–644.
- Nishida CR, Ortiz de Montellano PR (1998) Electron transfer and catalytic activity of nitric oxide synthases. Chimeric constructs of the neuronal, inducible, and endothelial isoforms. *J Biol Chem.* 273:5566–5571.
- O'Donnell VB, Eiserich JP, Chumley PH, Jablonsky MJ, Krishna NR, Barnes KM (1999) Nitration of unsaturated fatty acids by nitric oxide-derived reactive nitrogen species peroxynitrite, nitrous acid, nitrogen dioxide, and nitronium ion. *Chem Res Toxicol.* 12:83–92.
- Oberpriller JW, Ferrans VJ, Carroll RJ (1983) Changes in DNA content, number of nuclei and cellular dimensions of young rat atrial myocytes in response to left coronary artery ligation. *J Mol Cell Cardiol.* 15:31-42.
- Olivetti G, Anversa P, Melissari M, Loud AV (1980) Morphometric study of early postnatal development of the thoracic aorta in the rat. *Circ Res.* 47:417–424.
- Olivetti G, Hiler B, Ricci R, Guideri G, Anversa P (1986) Myocyte cell loss and myocyte hypertrophy in the aging rat heart (abstract). *Circulation,* 74:111-175.
- Olivetti G, Melissari M, Capasso JM, Anversa P (1991) Cardiomyopathy of the aging human heart. Myocyte loss and reactive cellular hypertrophy. *Circ Res.* 68:1560-1568.
- Olivetti G, Ricci R, Lagrasta C, Maniga E, Sonnenblick EH, Anversa P (1988) Cellular basis of wall remodeling in long-term pressure overload-induced right ventricular hypertrophy in rats. *Circ Res.* 63:648-657.
- Olivetti R, Ricci R, Anversa P (1987) Hyperplasia of myocyte nuclei in long-term cardiac hypertrophy in rats. *J Clin Invest.* 80:1818-1822.
- Page E, Earley J, Power B (1974) Normal growth of ultrastructures in rat left ventricular myocardial cells. *Circ Res* 35 (suppl II):12-16.

- Page E, McCallister LP (1973) Quantitative electron microscopic description of heart muscle cells. Application to normal, hypertrophied and thyroxin-stimulated hearts. *Am J Cardiol.* 31:172-181.
- Pass D, Freeth G (1993) The rat. *ANZCCART News* 6:1-4.
- Patel VC, Yellon DM, Singh KJ, Neild GH, Woolfson RG (1993) Inhibition of nitric oxide limits infarct size in the *in situ* rabbit heart. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 194:234–238.
- Paton JFR, Kasparov S, Paterson DJ (2002) Nitric oxide and autonomic control of heart rate: a question of specificity. *Trends Neurosci.* 25:626–631.
- Pechanova O, Bernatova I (1996) Effect of long-term NO synthase inhibition on cyclic nucleotide content in rat tissues. *Physiol Res.* 45:305–309.
- Pechanova O, Bernatova I (2000) Effect of captopril on cyclic nucleotide concentrations during long-term NO synthase inhibition. *Physiol Res.* 45:147–151.
- Pereira LMM, Vianna GMM, Madarim-de-Lacerda CA (1998) Stereology of the myocardium in hypertensive rats. Differences in relation to the time inhibition of nitric oxide synthesis. *Virchows Arch* 443:369–373.
- Perriard JC, Hirschy A, Ehler E (2003) Dilated cardiomyopathy: a disease of the intercalated disc? *Trends Cardiovasc Med.* 13:30–38.
- Pessanha MG, Madarim-de-Lacerda CA, Dumas Hahn M (1999) Stereology and immunohistochemistry of the myocardium in experimental hypertension: long-term and low-dosage administration of inhibitor of the nitric oxide synthesis. *Pathobiology.* 67:26–33.
- Pfeffer JM, Pfeffer MA, Fishbein MC, Frolich ED (1979) Cardiac function and morphology with aging in the spontaneously hypertensive rat. *Am J Physiol.* 237:H461-H468.
- Piech A, Dessy C, Havaux X, Feron O, Balligand JL (2003) Differential regulation of nitric oxide synthases and their allosteric regulators in heart and vessels of hypertensive rats. *Cardiovasc Res.* 57:456–467.
- Planitzer G, Richter H, Gossrau R (2002) The nitric oxide synthase-1 and nitric oxide synthase-3/nitric oxide signaling systems in the heart of wild-type mice and mouse mutants. *Histochem. J.* 34:345–355.
- Pollock DM, Polakowski JS, Divish BJ, Opgenorth TJ (1993) Angiotensin blockade reverses hypertension during long-term nitric oxide synthase inhibition. *Hypertension.* 21:660–666.
- Psychoyos D, Stern CD (1996) Fates and migratory routes of primitive streak cells in the chick embryo. *Development.* 122:1523–1534.

- Pyle WG, Solaro RJ (2004) At the crossroads of myocardial signaling: the role of Z-discs in intracellular signaling and cardiac function. *Circ Res.* 94:296–305.
- Rakusan K (1984) Assessment of cardiac growth, in Zak R (ed): *Growth of the Heart in Health and Disease*. New York, Raven Press, pp. 25–40.
- Rakusan K, DuMesnilde-Rochemont W, Braasch W, Tschopp H, Bing RJ (1967) Capacity of the terminal vascular bed during normal growth, in cardiomegaly, and in cardiac hypertrophy. *Circ Res.* 21:209–215.
- Rakusan K, Hrdina PW, Turek Z, Lakatta EG, Spurgeon HA, Wolford GD (1984) Cell size and cardiac supply of the hypertensive rat heart: quantitative study. *Basic Res Cardiol.* 79:389–395.
- Rakusan K, Jelinek J, Korecky B, Soukupova M, Poupa O (1965) Postnatal development of muscle fibers and capillaries in the rat heart. *Physiol Bohemoslov.* 14:32–37.
- Rakusan K, Poupa O (1963) Changes in the diffusion distance in the rat heart muscle during development. *Physiol Bohemoslov.* 12:220–227.
- Rakusan K, Poupa O (1964) Capillaries and muscle fibers in the heart of old rats. *Gerontologia.* 9:107-112.
- Rakusan K, Raman S, Layberry R, Korecky B (1978) The influence of aging and growth on the postnatal development of cardiac muscle in rats. *Circ Res.* 42:212–218.
- Rameau GA, Chiu LY, Ziff EB (2004) Bidirectional regulation of neuronal nitric-oxide synthase phosphorylation at serine 847 by the N-methyl-D-aspartate receptor. *The Journal of Biological Chemistry.* 279:14307–14314.
- Rastaldo R, Pagliaro P, Cappello S, Penna C, Mancardi D, Westerhof N, Losano G (2007) Nitric oxide and cardiac function. *Life Sci.* 81:779–793.
- Razeghi P, Taegtmeyer H (2006) Hypertrophy and atrophy of the heart. *Ann Nw Y Acad Sci.* 1080:110–119.
- Redkar A, Montgomery M, Litvin J (2001) Fate map of early avian cardiac progenitor cells. *Development,* 128:2269–2279.
- Ribeiro MO, Antunes E, De Nucci G, Lovisollo SM, Zatz R (1992) Chronic inhibition of nitric oxide synthesis: a new model of arterial hypertension. *Hypertension.* 23:865–868.
- Richter GW (1974) Ultrastructure of hypertrophied heart muscle in relation to adaptive tissue growth. *Circ Res.* 35 (suppl II):27-32.
- Robert V, Besse S, Sabri A, Silvestre JS, Assayag P, Nguyen VT, Swynghedauw B, Delcayre C (1997) Differential regulation of matrix metalloproteinases associated with aging and hypertension in the rat heart. *Lab Invest.* 76:729-738.

- Roberts JR, Wearn JI (1941) Quantitative changes in the capillary-muscle relationship in human hearts during normal growth and hypertrophy. *Am Heart J.* 21:617–633.
- Rumyantsev PP (1977) Interrelations of the proliferation and differentiation processes during cardiac myogenesis and regeneration. *Int Rev Cytol.* 51:187–273.
- Russell B, Motlagh D, Ashley WW (2000) Form follows function: how muscle shape is regulated by work. *J Appl Physiol.* 88:1127–1132.
- Sachs HG, Colgan JA, Lazarus ML (1977) Ultrastructure of the aging myocardium: A morphometric approach. *Am J Anat.* 150:63–72.
- Salo DC, Donovan CM, Davies KJ (1991) HSP70 and other possible heat shock or oxidative stress proteins are induced in skeletal muscle, heart, and liver during exercise. *Free Radic Biol Med.* 11:239–246.
- Saraiva RM, Minhas KM, Raju SVY, Barouch LA, Pitz E, Schuleri KH, Vandegaer K, Li D, Hare JM (2005) Deficiency of neuronal nitric oxide synthase increases mortality and cardiac remodeling after myocardial infarction: role of nitroso-redox equilibrium. *Circulation.* 112:3415–3422.
- Sasaki M, Gonzalez-Zulueta M, Huang H, Herring WJ, Ahn S, Ginty DD, Dawson VL, Dawson TM (2000) Dynamic regulation of neuronal NO synthase transcription by calcium influx through a CREB family transcription factor-dependent mechanism. *Proc Natl Acad. Sci.* 97:8617–8622.
- Schmidt HH, Hofmann H, Schindler U, Shutenko ZS, Cunningham DD, Feelisch M (1996) No. NO from NO synthase. *Proc Natl Acad Sci. U S A* 93:14492–14497.
- Schmidt HH, Pollock JS, Nakane M, Gorsky LD, Forstermann U, Murad F (1991) Purification of a soluble isoform of guanylyl cyclase-activating-factor synthase. *Proc Natl Acad. Sci.* 88:365–369.
- Schmucker DL, Sachs HG (1985) Age-dependent alterations in rat ventricular myocardium: A quantitative analysis. *Mech Aging Dev.* 31:89–101.
- Schultheiss TM, Lassar AB (1999) Vertebrate heart induction 342:54–56.
- Schulz R, Wambolt R (1995) Inhibition of nitric oxide synthesis protects the isolated working rabbit heart from ischaemia-reperfusion injury. *Cardiovasc. Res.* 30:432–439.
- Schweitzer SC, Klymkowsky MW, Bellin RM, Robson RM, Capetanaki Y, Evans RM (2001) Paranemin and the organization of desmin filament networks. *J Cell Sci.* 114:1079–1089.
- Sears CE, Ashley EA, Casadei B (2004) Nitric oxide control of cardiac function: is neuronal nitric oxide synthase a key component? *Philos Trans R Soc Lond B Biol Sci.* 359:1021–1044.

- Sears CE, Bryant SM, Ashley EA, Lygate CA, Rakovic S, Wallis HL, Neubauer S, Terrar DA, Casadei B (2003a) Cardiac neuronal nitric oxide synthase isoform regulates myocardial contraction and calcium handling. *Circ Res.* 92:e52–e59.
- Sears CE, Zhang Y-H, Ashley EA, Lygate CA, Kim YM, Neubauer S, Casadei B (2003) Myocardial NOS1 controls the lusitropic response to beta-adrenergic stimulation in vivo and in vitro. *Circulation.* 108:1173.
- Sen S (1983) Regression of cardiac hypertrophy. Experimental animal model. *Am J Med.* 75:87–93.
- Shah AM, MacCarthy PA (2000) Paracrine and autocrine effects of nitric oxide on myocardial function. *Pharmacol Ther.* 86:49–86.
- Sharp PE, La Regina MC (1998) *The laboratory rat.* CRC Press, Boca Raton.
- Sherman LS, Potter SS, Scott WJ (2001) *Human Embryology,* 3rd Ed. Churchill Livingstone, New York, NY.
- Shih H, Lee B, Lee RJ, Boyle AJ (2011) The aging heart and post-infarction left ventricular remodeling. *J Am Coll Cardiol.* 57:9-17.
- Silvagno F, Xia H, Bredt DS (1996) Neuronal nitric oxide synthase-mu, an alternatively spliced isoform expressed in differentiated skeletal muscle. *J. Biol. Chem.* 271:11 204–11 208.
- Solaro RJ (2005) Remote control of A-band cardiac thin filaments by the I-Z-I protein network of cardiac sarcomeres. *Trends Cardiovasc Med.* 15:148–152.
- Solaro RJ, Van Eyk J (1996) Altered interactions among thin filament proteins modulate cardiac function. *J Mol Cell Cardiol.* 28:217–230.
- Sommer JR, Johnson EA (1968) Cardiac muscle: A comparative study of Purkinje fibers and ventricular fibers. *J Cell Biol.* 36:497.
- Song T, Hatano N, Horii M, Tokumitsu H, Yamaguchi F, Tokuda M, Watanabe Y (2004) Calcium/calmodulin-dependent protein kinase I inhibits neuronal nitric-oxide synthase activity through serine 741 phosphorylation. *FEBS Letters.* 570:133–137.
- Song X, Vaage J, Valen G (20016) The role of neuronal nitric oxide synthase in ischaemia-reperfusion injury of the isolated mouse heart. *Acta Physiol. Scand.* 172:291–295.
- Song Y, Cardounel AJ, Zweier JL, Xia Y (2002) Inhibition of superoxide generation from neuronal nitric oxide synthase by heat shock protein 90: Implications in NOS regulation. *Biochemistry.* 41:10616–10622.
- Song Y, Yao Q, Zhu J, Luo B, Liang S (1999) Age-related variation in the interstitial tissues of the cardiac conduction system; and autopsy study of 230 Han Chinese. *Forensic Sci Int.* 104:133-142.

- Song Y, Zweier JL, Xia Y (2001a) Heat-shock protein 90 augments neuronal nitric oxide synthase activity by enhancing Ca<sup>2+</sup>/calmodulin binding. *Biochem J.* 355:357–360.
- Srivastava D, Olson EN (2000) A genetic blueprint for cardiac development. *Nature.* 407:221–226.
- Stamler JS, Lamas S, Fang FC (2001) Nitrosylation. The prototypic redox-based signaling mechanism. *Cell.*106:675–683.
- Stamler JS, Meissner G (2001) Physiology of Nitric Oxide in Skeletal Muscle. *Physiol. Rev.* 81:209–237.
- Stein B, Eschenhagen T, Rüdiger J, Scholz H, Försterman U, Gath I (1998) Increased expression of constitutive nitric oxide synthase III, but not inducible nitric oxide synthase II, in human heart failure. *J. Am. Coll. Cardiol.* 32:1179–1186.
- Stoyanovsky D, Murphy T, Anno PR, Kim YM, Salama G (1997) Nitric oxide activates skeletal and cardiac ryanodine receptors. *Cell Calcium.* 21:19–29.
- Strijdom H, Chamane N, Lochner A (2009) Nitric oxide in the cardiovascular system: a simple molecule with complex actions. *Cardiovascular Journal of Africa.* 20:303–310.
- Sun J, Picht E, Ginsburg KS, Bers DM, Steenbergen C, Murphy E (2006) Hypercontractile female hearts exhibit increased S-nitrosylation of the L-type Ca<sup>2+</sup> channel alpha subunit and reduced ischemia/reperfusion injury. *Circ Res.* 98:403–411.
- Susic D, Nunez E, Hosoya K, Frohlich ED (1998) Coronary hemodynamics in aging spontaneously hypertensive and normotensive Wistar–Kyoto rats. *J Hypertens.* 16:231–237.
- Swei A, Lacy F, DeLano FA, Schmid-Schonbein GW (1997) Oxidative stress in the Dahl hypertensive rat. *Hypertension.* 30:1628–1633.
- Takada F, Vander Woude DL, Tong HQ (2001) Myozenin: an alpha-actinin- and gamma-filamin-binding protein of skeletal muscle Z lines. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 98:1595–1600.
- Takatzu T, Kashii C (1972) Spontaneous hypertension its pathogenesis and complications. Japan, pp. 166-172.
- Takimoto Y, Aoyama T, Keyamura R, Shinoda E, Hattori R, Yui Y, Sasayama S (2000) Differential expression of three types of nitric oxide synthase in both infarcted and non-infarcted left ventricles after myocardial infarction in the rat. *Int. J. Cardiol.* 76:135–145.
- Tamargo J, Caballero R, Gomez R, Delpon E (2010) Cardiac electrophysiological effects of nitric oxide. *Cardiovascular Research.* 87:593–600.

- Tanijivi H (1975) Cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats. *Jpn Heart J.* 16:174-188.
- Tocchetti CG, Wang W, Froehlich JP, Huke S, Aon MA, Wilson GM (2007) Nitroxyl improves cellular heart function by directly enhancing cardiac sarcoplasmic reticulum Ca<sup>2+</sup> cycling. *Circ Res.* 100:96–104.
- Tomanek RJ (1970) Effects of age and exercise on the extent of the myocardial capillary bed. *Anat Rec.* 167:55-62.
- Tomanek RJ, Davis JW, Anderson SC (1979) The effects of alpha-methyldopa on cardiac hypertrophy in spontaneously hypertensive rats: ultrastructural, stereological and morphometric analysis. *Cardiovasc Res.* 13:173-182.
- Tomanek RJ, Hovanec JM (1981) The effects of long-term pressure overload and aging on the myocardium. *J Mol Cell Cardiol.* 13:471–488.
- Tomanek RJ, Searls JC, Lachenbruch PA (1982) Quantitative changes in the capillary bed during development, peak, and stabilized cardiac hypertrophy in the spontaneously hypertensive rat. *Circ Res.* 51:295–304.
- Uhlenius N, Tikkanen T, Miettinen A, Holthofer H, Tornroth T, Eriksson A, Fyhrquist F, Tikkanen I (1999) Renoprotective effects of captopril in hypertension induced by nitric oxide synthase inhibition in experimental nephritis. *Nephron.* 81:221–229.
- Umar S, van der Laarse A (2010) Nitric oxide and nitric oxide synthase isoforms in the normal, hypertrophic, and failing heart. *Mol Cell Biochem.* 333:191-201.
- Unverferth DV, Baker PB, Swift SE, Chaffee R, Fetters JK, Uretsky BF, Thompson ME, Leier CV (1986) Extent of myocardial fibrosis and cellular hypertrophy in dilated cardiomyopathy. *Am J Cardiol.* 57:816-820.
- Urbanek K, Quaini F, Tasca G, Torella D, Castaldo C, Nadal-Ginard B, Leri A, Kajstura J, Quaini E, Anversa P (2003) Intense myocyte formation from cardiac stem cells in human cardiac hypertrophy. *Proc Natl Acad Sci USA.* 100:10440–10445.
- Vahouny GV, Tamboli A, Vander Maten M, Albert EN (1979) Morphological and metabolic studies on adult cardiac myocytes. *Scan Electron Microsc.* 3:375–388.
- Vallance P, Leiper J (2002) Blocking NO synthesis: how, where and why? *Nature Rev. Drug Discov.* 1:939–950.
- Vaziri ND, Sica DA (2004) Lead-induced hypertension: role of oxidative stress. *Curr Hypertens Rep.* 6:314–320.
- Venema VJ, Ju H, Zou R, Venema RC (1997) Interaction of neuronal nitric oxide synthase with caveolin-3 in skeletal muscle. Identification of a novel caveolin scaffolding/inhibitory domain. *J. Biol. Chem.* 272:28 187–28 190.

- Waldo KL, Kumiski DH, Wallis KT (2001) Conotruncal myocardium arises from a secondary heart field. *Development*. 128:3179–3188.
- Wallenstein S, Zucker CL, Fleiss JL (1980) Some statistical methods useful in circulation research. *Circ Res*. 47:1-9.
- Walsh EK, Huang H, Wang Z, Williams J, de Crom R, van Haperen R (2004) Control of myocardial oxygen consumption in transgenic mice overexpressing vascular eNOS. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 287:H2115–H2121.
- Wang H, Kohr MJ, Traynham CJ, Wheeler DG, Janssen PM, Ziolo MT (2008) Neuronal Nitric Oxide Synthase Signaling within Cardiac Myocytes Targets Phospholamban. *Am J Physiol Cell Physiol*. 294:C1566–C1575.
- Wang Y, Marsden PA (1995) Nitric oxide synthases: gene structure and regulation. *Adv Pharmacol*. 34:71–90.
- Wang Y, Newton DC, Robb GB, Kau CL, Miller TL, Cheung AH, Hall AV, VanDamme S, Wilcox JN, Marsden PA (1999) RNA diversity has profound effects on the translation of neuronal nitric oxide synthase. *Proc. Natl Acad. Sci*. 96:12 150–12 155.
- Ward J (2001) Cardiac muscle. In C. Blakemore, and S. Jennett, *The Oxford Companion to the Body*. New York: Oxford University Press. pp. 136-137, 481.
- Wearn JT (1941) Alterations in the heart accompanying growth and hypertrophy. *Bull Johns Hopkins Hosp*. 68:363–374.
- Weber KT (1989) Cardiac interstitium in health and disease: the fibrillar collagen network. *J Am Coll Cardiol*. 13:1637-1652.
- Weidman S (1970) Electrical constants of trabecular muscle from mammalian heart. *J Physiol*. (London) 210:1041.
- Weiner CP, Lizasoain I, Baylis SA, Knowles RG, Charles IG, Moncada S (1994) Induction of calciumdependent nitric oxide synthases by sex hormones. *Proc Natl Acad Sci*. 91:5212–5216.
- Weissman BA, Jones CL, Liu Q, Gross SS (2002) Activation and inactivation of neuronal nitric oxide synthase: characterization of Ca<sup>2+</sup>-dependent [125I] calmodulin binding. *Eur. J. Pharmacol*. 435:9–18.
- Wickman A, Isgaard J, Adams MA, Friberg P (1997) Inhibition of nitric oxide synthase in rats. Regulation of cardiovascular structure and expression of insulin-like growth factor I and its receptor messenger RNA. *J Hypertens*. 15:751–759.
- Wolinsky H, Glagov S (1967) Nature of species differences in the medial distribution of aortic vasa vasorum in mammals. *Circ Res*. 20:409–421.

- Wulfsohn D, Nyengaard JR, Tang Y (2004) Postnatal growth of cardiomyocytes in the left ventricle of the rat. *Anat Rec A Discov Mol Cell Evol Biol.* 277:236–247.
- Wydra O (1972) Influence of an anabolic steroid and muscular training on skeletal muscle of the mouse. *Z Anat Entwicklungsgesch.* 163:73–82.
- Xu KY, Huso DL, Dawson TM, Brecht DS, Becker LC (1999) Nitric oxide synthase in cardiac sarcoplasmic reticulum. *Proc Natl Acad Sci.* 96:657–662.
- Xu KY, Kuppusamy SP, Wang J Q, Li H, Cui H, Dawson TM, Huang PL, Burnett AL, Kuppusamy P, Becker LC (2003) Nitric oxide protects cardiac sarcolemmal membrane enzyme function and ion active transport against ischemia induced inactivation. *J Biol Chem.* 278:41 798–41 803.
- Xu L, Eu JP, Meissner G, Stamler JS (1998) Activation of the cardiac calcium release channel (ryanodine receptor) by poly-S-nitrosylation. *Science.* 279:234–237.
- Yermilov V, Rubio J, Becchi M, Friesen MD, Pignatelli B, Ohshima H. (1995) Formation of 8-nitroguanine by the reaction of guanine with peroxy nitrite in vitro. *Carcinogenesis.* 16:2045–2050.
- Yin FCP, Spurgeon HA, Rakusan K, Weisfeldt ML, Lakatta EG (1982) Use of tibial length to quantify cardiac hypertrophy: Application in the aging rat. *Am J Physiol.* 243:H941-H947.
- Yuan SH, Heymann MA, Rudolph AM (1966) Relationship between ventricular weight, pressure and myocardial blood flow in the newborn piglet (abstr). *Circulation.* 34 (suppl III):243.
- Yuan SH, Heymann MA, Rudolph AM (1966) Relationship between ventricular weight, pressure and myocardial blood flow in the newborn piglet (abstr). *Circulation.* 34(suppl III):243.
- Yutzey KE, Kirby ML (2002) Wherefore heart thou? Embryonic origins of cardiogenic mesoderm. *Dev Dyn.* 223:307–320.
- Zahradnikova A, Minarovic I, Venema RC, Meszaros LG (1997) Inactivation of the cardiac ryanodine receptor calcium release channel by nitric oxide. *Cell Calcium.* 22:447–454.
- Zalba G, San José G, Moreno MU (2001) Oxidative stress in arterial hypertension. Role of NAD(P)H oxidase, *Hypertension.* 38:1395–1399.
- Zhang YH, Jin CZ, Jang JH, Wang Y (2014) Molecular mechanisms of neuronal nitric oxide synthase in cardiac function and pathophysiology. *The Journal of Physiology.* 592:3189–3200.

- Zhang YH, Sears CE, Ashley EA, Kim YM, Casadei B (2003) Neuronal nitric oxide synthase (NOS1) regulates beta-adrenergic contraction and calcium handling in isolated murine ventricular myocytes. *Circulation*. 108:1169.
- Zhang YH, Zhang MH, Sears CE, Emanuel K, Redwood C, El-Armouche A (2008) Reduced phospholamban phosphorylation is associated with impaired relaxation in left ventricular myocytes from neuronal NO synthase-deficient mice. *Circ Res*. 102:242–249.
- Zhou L, Zhu DY (2009) Neuronal nitric oxide synthase: structure, subcellular localization, regulation, and clinical implications. *Nitric Oxide : Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide Society*. 20:223–230.
- Zieman SJ, Gerstenblith G, Lakatta EG, Rosas GO, Vandegaer K, Ricker KM, Hare JM (2001) Upregulation of the nitric oxide-cGMP pathway in aged myocardium: physiological response to l-arginine. *Circ Res*. 88:97–102.
- Ziolo MT (2008) The fork in the nitric oxide road: cyclic GMP or nitrosylation? *Nitric Oxide Biology and Chemistry / Official Journal of the Nitric Oxide Society*. 18:153–156.
- Ziolo MT, Bers DM (2003) The real estate of NOS signaling: location, location, location. *Circ Res*. 92:1279–1281.
- Ziolo MT, Katoh H, Bers DM (2001) Positive and negative effects of nitric oxide on Ca(2+) sparks: influence of beta-adrenergic stimulation. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. 281:H2295–H2303.
- Ziolo MT, Kohr MJ, Wang H (2008) Nitric oxide signaling and the regulation of myocardial function. *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*. 45:625–632.
- Zou MH, Shi C, Cohen RA (2002) Oxidation of the zinc-thiolate complex and uncoupling of endothelial nitric oxide synthase by peroxynitrite. *The Journal of Clinical Investigation*. 109:817–826.