

В.А. Левицький, І.М. Лучко

Біохімічні та морфологічні прояви ендотеліальної дисфункції ендокарда і судин міокарда при емоційно-больовому стресі у поєднанні з гіперхолестеринемією

В експерименте на белых крысах исследовали влияние эмоционально-болевого стресса в сочетании с алиментарной гиперхолестеринемией на липидный состав мембранных структур эндотелиоцитов эндокарда и микрососудов миокарда, а также их морфологические проявления. Сочетание этих этиологических факторов в большей степени чем отдельно взятый стресс, сопровождается накоплением в клетках неэтерифицированного холестерина и свободных жирных кислот, следствием чего есть повреждение отдельных эндотелиоцитов, крайними проявлениями которого есть образование эндотелиальных телец (цитопластов) с явлениями микроклазматоза и десквамации этих клеток.

ВСТУП

Стресові етіологічні чинники та підвищений вміст у крові холестерину нині вважаються одними із провідних у розвитку дисфункції ендотелію та перебігу ішемічної хвороби серця [1, 2, 11]. Незважаючи на численні експериментальні та клінічні дослідження, деякі питання патогенного впливу стресу та гіперхолестеринемії (ГХЕ) на морфологію і функцію ендотеліальної вистілки серця залишаються невивченими. Зокрема, це стосується ліпідного спектра згаданої структури. Доведено, що пошкоджувальна дія будь-якого стрес-фактора на серце супроводжується активацією ліполізу, підвищенням вмісту вільних жирних кислот (ВЖК), деградацією мембранних фосфоліпідів з нагромадженням їх лізоформ, а також внутрішньоклітинним накопиченням дволанцюгових форм жирних кислот та ацетил-коензиму А [4, 12]. Враховуючи те, що основою всіх біологічних мембран є ліпіди, згадані вище зрушення можуть, вочевидь, призвести до значних морфологічних змін у різних структурах ендотеліоцитів серця та судин ссавців. При ГХЕ

© В.А. Левицький, І.М. Лучко

можливе надлишкове накопичення в мембранах цих клітин холестерину, у результаті чого порушується співвідношення між різними класами ліпідів [3, 7, 13], що значною мірою може змінити реакцію ендотеліоцитів на дію нейрогуморальних факторів при стресі. Водночас дані літератури про вплив стресових чинників на ліпідний спектр і морфологічну перебудову ендотеліальної вистілки серця в умовах ГХЕ є обмеженими.

Метою нашого дослідження було вивчення вмісту деяких нейтральних ліпідів ендотеліоцитів ендокарда та дрібних судин міокарда у взаємозв'язку з ультрамікроскопічними змінами в них при поєднаному впливі емоційно-больового стресу (ЕБС) та аліментарної ГХЕ.

МЕТОДИКА

Дослідження проводили на 22 безпородних білих щурах-самцях масою 180–240 г, які були розподілені на три групи: 1-ша – контрольна група, 2-га – щури, яких

піддавали тригодинній дії ЕБС, 3-тя – тварини, що зазнавали впливу ЕБС на тлі ГХЕ. Для відтворення ЕБС використовували електро-імпульсну методику Desiderato [16] у модифікації Герелюка [5]. Аліментарну ГХЕ моделювали щоденним введенням через зонд у ротову порожнину 250 мг холестерину в 1 мл свинячого сала із обов'язковим додаванням жовчних кислот [17]. Щури знаходилися на атерогенній дієті протягом 60 діб.

При роботі з тваринами дотримувалися положень „Європейської конвенції про захист хребетних тварин, що використовуються для дослідних та наукових цілей” (Страсбург, 1986) і „Загальних етичних принципів експериментів на тваринах”, ухвалених Першим Національним конгресом з біоетики (Київ, 2001). Евтаназію тварин здійснювали під хлороформним наркозом. Екстрагування ліпідів із тканин ендокарда та міокарда проводили сумішшю хлороформ-метанолу у пропорції 2:1. Елюати випарювали в атмосфері азоту та використовували для розділення методом тонкошарової хроматографії на силікагелі (фірма “Woelm”). Як стандарти застосовували вільні жирні кислоти, триацилгліцерини (“Serva”, Німеччина), холестерин (“Reanal”, Угорщина), холестерин олеат (“Amersham”, Англія). Кількісне визначення фракцій проводили за допомогою тест-наборів „Хемапол”. Вміст ВЖК визначали радіохімічним методом. Для визначення вмісту холестерину в плазмі крові використовували якісну реакцію Лібермана–Бурхарда [9].

Для дослідження стану ендотелію ендокарда готували мазки-відбитки з макропрепаратів лівого та правого шлуночків, прикладаючи їх до предметних скелець. Попередньо стінки шлуночків з боку ендокарда висушували потоком повітря. Мікропрепарати фарбували за методом Романовського. Ступінь пошкодження ендотелію ендокарда визначали під світло-

вим мікроскопом (ок x7; об x90) за кількістю злущених клітин на 1 мм² площі відбитка, що відповідає 40 полям зору. Ультраструктурні зміни ендотелію ендокарда та мікроциркуляторного русла міокарда вивчали, використовуючи електронну мікроскопію за загальноприйнятим методом [8].

Одержані результати оброблено статистично за критерієм t Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Нами встановлено, що гострий тригодинний ЕБС супроводжується значними змінами вмісту у ендотелії ендокарда і міокарді різних класів нейтральних ліпідів (табл. 1), що є однією із ознак активації симпато-адреналової системи та збільшення концентрації у крові катехоламінів [5, 12]. Останні, як відомо, в цьому плані відіграють ключову роль, оскільки їм властивий сильний ліпомобілізуєчий ефект, який підсилюється глюкокортикоїдами, адренкортикотропним гормоном і глюкагоном [6, 14]. Крім того, катехоламіни збільшують інтенсивність процесів, що дезінтегрують мембрани та сприяють перекисному окисленню ліпідів [15].

За умов стресу в міокарді щурів, за нашими результатами, на 62,5 % збільшується вміст ВЖК і на 23,0 % зменшується концентрація етерифікованого холестерину. При цьому, якщо у міокарді зміни вмісту вільного (неетерифікованого) холестерину та триацилгліцеринів є незначними і невірогідними, то в ендокарді вони є більш суттєвими. Так, вміст неетерифікованого холестерину та ВЖК збільшується на 13,9 і 36,8 % відповідно, а вміст етерифікованого холестерину та триацилгліцерину зменшується на 17,7 і 11,2 %. Такі зміни пов'язані, очевидно, з посиленням гідролізу ефірів холестерину та триацилгліцерину під впливом холестеринази і триацилгліцеринліпаз, активність яких в умовах стрес-реакції підвищується [5, 12].

Таблиця 1. Вплив гострого емоційно-болювого стресу на вміст ліпідів (мкг/г сухої тканини) у серцевому м'язі та ендотеліоцитах ендокарда щурів за умов гіперхолестеринемії (M±m, n=6–8)

Умови досліджу	Холестерин		Вільні жирні кислоти	Триацилгліцерини
	вільний	етерифікований		
Міокард				
Контроль	41,0±0,75	15,2±0,51	2,4±0,05	14,6±0,51
Тригодинний стрес	42,3±0,82	11,7±0,65	3,9±0,11	14,2±0,52
	P ₁₋₂ <0,5	P ₁₋₂ <0,001	P ₁₋₂ <0,001	P ₁₋₂ <0,5
Тригодинний стрес на тлі гіперхолестеринемії	50,5±1,12	15,8±0,43	5,0±0,22	18±0,57
	P ₁₋₃ <0,001	P ₁₋₃ <0,5	P ₁₋₃ <0,001	P ₁₋₃ <0,001
	P ₂₋₃ <0,001	P ₂₋₃ <0,001	P ₂₋₃ <0,01	P ₂₋₃ <0,001
Ендокард				
Контроль	37,4±0,78	25,4±0,57	1,9±0,13	17,0±0,41
Тригодинний стрес	42,6±0,89	20,9±0,73	2,6±0,08	15,1±0,62
	P ₁₋₂ <0,01	P ₁₋₂ <0,001	P ₁₋₂ <0,001	P ₁₋₂ <0,05
Тригодинний стрес на тлі гіперхолестеринемії	49,5±1,16	33,6±0,82	3,0±0,14	16,4±0,62
	P ₁₋₃ <0,001	P ₁₋₃ <0,001	P ₁₋₃ <0,001	P ₁₋₃ >0,05
	P ₂₋₃ <0,001	P ₂₋₃ <0,001	P ₂₋₃ <0,05	P ₂₋₃ <0,2

Деякі інші результати дослідження показують, що вплив стресу у тварин, які попередньо протягом 2 міс перебували на атерогенній дієті (табл. 1). Слід відмітити, що у цих тварин вміст загального холестерину в плазмі крові збільшується у 1,8 рази відносно контрольної групи (2,78 щодо 1,53 ммоль/л), а вміст холестерину ліпопротеїнів високої щільності при цьому зменшується в середньому на 27,4 %, що є ознакою підвищення атерогенності плазми крові.

За умов поєднаної дії стресу та ГХЕ в обох структурах серця відмічається виражене збільшення вмісту вільного холестерину (у міокарді – на 23,2 %, у ендокарді – на 32,4 %), що значною мірою перевищує аналогічні показники при впливі лише одного ЕБС (3,2 і 13,9 % відповідно). Отже, стрес на тлі атерогенної дієти значно посилює накопичення вільного холестерину в мембранних структурах ендотеліоцитів і кардіоміоцитів щурів. Поряд з цим в ендокарді підвищується на 32,3 % вміст і етерифікованого холестерину. Крім того, у тварин цієї групи спостерігається значне

накопичення в досліджуваних тканинах ВЖК, вміст яких у міокарді збільшується на 104 %, в ендокарді – 57,9 %, тоді як при дії лише ЕБС цей показник у міокарді збільшується на 62,5 %, в ендокарді – на 36,8 %. Ендогенним джерелом ВЖК при цьому, як стверджують окремі автори [3, 12], можуть бути фосfolіпіди, триацилгліцерин та ефіри холестерину.

Узагальнюючи отримані нами результати, можна заключити, що стрес на тлі ГХЕ аліментарного походження є надзвичайно небезпечним, оскільки супроводжується накопиченням у плазматичних мембранах ендотеліальних клітин ендокарда і міокарда вільного холестерину та ВЖК, що є одним із молекулярних механізмів їх ушкодження і проявляється утворенням ендотеліальних тілець (цитопластів) і десквамацією. На ушкодження ендотеліальних клітин, як свідчать деякі літературні джерела [5, 11, 12], впливає і низка інших механізмів: кальцієвих, електrolітно-осмотичних, ацидотичних, які активуються нервово-гуморальним компонентом стресу. Насамкінець, стресові

ситуації можуть спричинювати виникнення ендогенної ГХЕ, яка разом з екзогенною поглиблює пошкоджувальний ефект [10]. Це підтверджується проведеними нами електронно-мікроскопічним дослідженням структурних компонентів стінки гемомікросудин міокарда та аналізом мазків-відбитків з ендокарда шлуночків.

Електронно-мікроскопічно в обох дослідних групах після дії стресора нами виявлено набряк ендотеліоцитів капілярів міокарда щурів, деформацію їх ядер, просвітлення матриксу та руйнування крист мітохондрій, розширення та руйнування цистерн ендоплазматичної гранулярної сітки, зменшення кількості фіксованих і прикріплених рибосом, трансформацію цитоплазматичних мікроевезикул у вакуолі та лакуни. У зв'язку зі зменшенням в'язкості люменальної частини плазматичної мембрани цих клітин утворюються її пальцеподібні випинання. При цьому досить часто мембрана замикається в зоні шийки цих випинань і фрагменти цитоплазми, які облямовуються частиною плазматичної мембрани, відокремлюються у вигляді тілець і вільно знаходяться в просвіті капілярів. Розмір таких ендотеліальних тілець коливається від 0,3 до 0,8

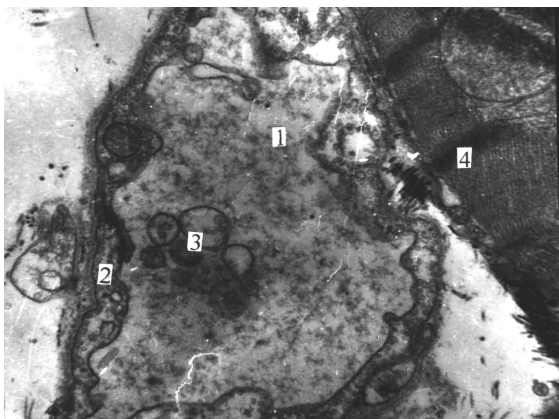


Рис. 1. Ультрамiкроскопiчні ознаки формування ендотеліальних тілець із явищами мікроклазматозу: 1 – просвіт капіляра, 2 – ендотеліоцит, 3 – ендотеліальні тілець, 4 – кардіоміоцит. 36. 8000

мкм. Таке явище називається мікроклазматозом (рис. 1).

Ми встановили, що поряд з пошкодженням ендотеліоцитів капілярів міокарда виникають виражені зміни ультраструктури ендотелію ендокарда лівого шлуночка. Спостерігається локальний набряк і вакуолізація ендотеліоцитів, деформація їх ядер із брилоподібною конденсацією хроматину, руйнування мембранних структур внутрішньоклітинних органел, зникнення мікропіноцитозних везикул, розпушення люменальної частини їх плазматичної мембрани. Окремі ендотеліоцити та їх фрагменти злущуються та циркулюють у крові, перекриваючи в окремих місцях просвіт капілярів (рис. 2). Крім того, оголена поверхня субендотелію є основою для активації клітинної і коагуляційної фаз тромбоутворення. Слід відмітити, що у тварин, які знаходилися на атерогенній дієті, описані ультраструктурні зміни були більш вираженими.

Підсилення десквамації ендотеліоцитів при дії ЕБС в умовах ГХЕ підтверджується аналізом мазків-відбитків з ендокарда шлуночків (табл. 2). Так, якщо після гострого тригодинного стресу кількість злущених ендотеліоцитів у мазках-відбитках з ендокарда правого і лівого шлуночків збільшується у 4,3 раза, то на

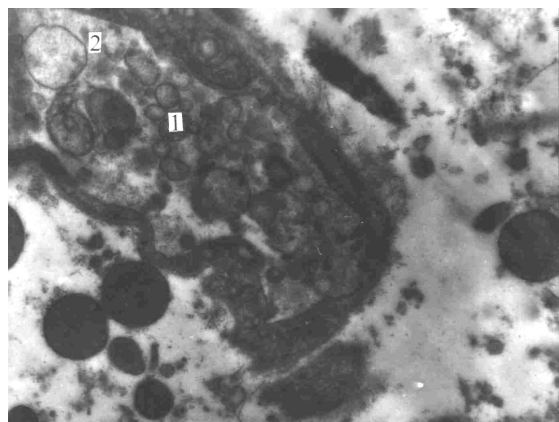


Рис. 2. Накопичення ендотеліальних тілець (1) у просвіті капіляра (2). 36. 10000

Таблиця 2. Кількість десквамованих ендотеліоцитів у мазках-відбитках (кл/мм²) з ендокарда шлуночків серця щурів (M±m, n=6)

Умови досліджу	Ендокард шлуночка	
	правого	лівого
Контроль	22±1,0	24±1,7
Тригодинний стрес	94±3,5 P ₁₋₂ <0,001	102±5,6 P ₁₋₂ <0,001
Тригодинний стрес на тлі гіперхолестеринемії	140±5,8 P ₁₋₃ <0,001 P ₂₋₃ <0,05	156±8,2 P ₁₋₃ <0,001 P ₂₋₃ <0,001

тлі ГХЕ такий чинник призводить до збільшення вказаного показника в 6,4–6,5 раза у порівнянні з контрольною групою тварин. При цьому в полі зору мікроскопа можуть зустрічатися скупчення понад 20 злущених ендотеліоцитів, що вказує на можливе їх відшарування цілими пластами. Отже, ГХЕ аліментарного походження значно потенціює пошкоджувальний вплив стресора на ендотеліальний шар ендокарда шлуночків.

Таким чином, при стресі, ускладненому ГХЕ, поряд зі змінами в ліпідному спектрі мембранних структур ендотеліоцитів ендокарда та мікросудин серця, основним проявом яких є накопичення в клітинах вільного холестерину та збільшення вмісту ВЖК, спостерігається різного роду їх структурна перебудова, результатом якої є мікроклазматоз і десквамація ендотеліоцитів.

V.A. Levytskyi, I.M. Luchko

BIOCHEMICAL AND MORPHOLOGICAL MANIFESTATIONS OF ENDOTHELIAL DYSFUNCTION OF ENDOCARDIUM AND MYOCARDIAL VESSELS AT CONDITIONS OF EMOTIONAL STRESS IN COMBINATION WITH HYPERCHOLESTEROLEMIA

In experiments with white rats the influence of emotional and pain stress in combination with alimentary hypercholesterolemia on lipid content of membrane structures of endothelial cells of endocardium and microvessels of myocardium and their morphological manifestations has been studied. Combination of these etiological factors is followed by accumulation of free cholesterol and free fatty acids within the

cells. This results in damage of single endothelial cells, the most extreme manifestation of which is formation of endothelial bodies (cytoplasts) with development of microclasmatosis and desquamation of these cells.

Ivano-Fankivsk National University

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Братусь В.В., Шумаков В.А., Талаева Т.В. Атеросклероз, ишемическая болезнь сердца, острый коронарный синдром. – К.: Четверта хвиля, 2004. – 575 с.
2. Гавриш А.С., Сергиенко О.В., Лисовец М.А., Лишнева В.Ю. Структурно-метаболические изменения эндотелия сосудов и тромбоцитов при комплексном воздействии хронической гиперхолестеринемии и стресса // Укр. кардіол. журн. – 1999. – № 5. – С. 56–61.
3. Геннис Р. Биомембраны. Молекулярная структура и функция. – М.: Наука, 1997. – 472 с.
4. Герелюк І.П., Лучко І.М. Активация гідролізу нейтральних ліпідів в серцевому м'язі у ранній фазі гострого емоційного стресу // Галицьк. лік. вісн. – 1999. – №4. – С.32-34.
5. Герелюк І.П. О роли нарушений обмена липидов и микроциркуляции в патогенезе нейрогенных повреждений сердца : Автореф. дис. ... д-ра мед. наук. – К., 1982. – 38 с.
6. Данилов Г.Е., Брындина И.Г., Исакова Л.С. и др. Стабильные гомеостатические константы и эндокринный статус при хроническом нейрогенном стрессе и стресс-протекторных воздействиях // Архив клин. и эксперим. медицины. – 2000. – 9, №1. – С.71–74.
7. Какауридзе Н.Г. Морфофункциональные показатели гистогематического барьера при экспериментальной гиперхолестеринемии // Лікар. справа. – 2001. – №2. – С.103–106.
8. Козлов В.И., Мельман Е.П., Нейко Е.М., Шутка Б.В. Гистофизиология капилляров. – СПб.: Наука, 1994. – 234 с.

9. Кучеренко Н.Е., Васильев А.Н. Липиды. – К.: Вища школа, 1985. – 247 с.
10. Ляшенко В.П., Політаєва В.І. Зв'язок між гіперхолестеринемією та морфологічними змінами в аорті та печінці // Фізіол. журн. – 2003. – 49, №6. – С.64–69.
11. Малая Л.Т., Корж А.Н., Балковая Л.Б. Эндотелиальная дисфункция при патологии сердечно-сосудистой системы. – Харьков: Торсинг, 2000. – 432 с.
12. Меерсон Ф.З. Патогенез и предупреждение стрессорных и ишемических повреждений сердца. – М.: Медицина, 1984. – 272 с.
13. Повалий Т.М., Попова Е.Г., Зайцев С.Ю., Гусев С.А. и др. Холестерин в плазмолемме эндотелиоцитов в норме и при гиперхолестеринемии // Арх. анатомии. – 1988. – №11. – С.47–51.
14. Теппермен Дж., Теппермен Х. Физиология обмена веществ и эндокринной системы. – М.: Мир, 1989. – 656 с.
15. Титов В.Н. Атеросклероз – патология полиеновых жирных кислот // Клини. лаб. диагностика. – 2001. – №1. – С.3–9.
16. Desiderato O., Mac Kinnon J.R., Hissom H.J. Development of gastric ulcers in rats following stress termination // J. Comp. Physiol. Psychol. – 1974. – 87. – P.208–214.
17. Peiler F.U., Lonteau M.T., Alonso A. et al. Induction d'une hypercholesterolemie chez le rat Wister male: resultans des bilans biochemiques et copereison over. Les donnes bibliographiques // Med. et Nutr. – 1986. – №3. – P.167–172.

Ів.-Франків. мед.ун-т

Матеріал надійшов до редакції 03.03.2008