ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ НАУЧНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ «НАУЧНО-ИССЛЕДОВАТЕЛЬСКИЙ ИНСТИТУТ ФИЗИОЛОГИИ И ФУНДАМЕНТАЛЬНОЙ МЕДИЦИНЫ»

На правах рукописи

РУДЕНКО НАТАЛЬЯ СЕРГЕЕВНА

РЕГУЛЯЦИЯ ПЕПТИДНЫМИ ГОРМОНАМИ СЕРДЦА ГЕМОДИНАМИЧЕСКОЙ СТРЕСС-РЕАКЦИИ У НОРМОТЕНЗИВНЫХ КРЫС И КРЫС С НАСЛЕДСТВЕННОЙ ИНДУЦИРОВАННОЙ СТРЕССОМ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИЕЙ (НИСАГ)

03.03.01 – физиология

Диссертация на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор медицинских наук
В.Ф. Максимов

Новосибирск, 2020

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ 4

ГЛАВА 1. СЕРДЕЧНЫЕ НАТРИЙУРЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ РЕГУЛЯЦИИ ГЕМОДИНАМИКИ

1.1 Общие сведения 12

1.1.1 История открытия гормона 12

1.1.2 ANP в филогенезе и онтогенезе гормональной системы сердца 13

1.1.3 Физиологические эффекты сердечных натрийуретических пептидов ... 13

1.1.4 Рецепторы к ANP. 19

1.1.5 Факторы, влияющие на синтез и секрецию натрийуретических пептидов 21

1.1.6 Строение ANP. Внутриклеточные механизмы синтеза и выделения пептидов 22

1.1.7 Концентрация натрийуретических пептидов в крови 30

1.1.8 Заключение 32

1.2. Основные нейрогуморальные механизмы реализации стресс-реакций 33

1.3. Крысы линии НИСАГ – модель стресс-индуцированной гипертонии 40

1.4. Функциональная морфология миоэндокринных клеток правого предсердия 45

1.5. Заключение 52

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 54

2.1 Экспериментальные животные 54

2.2 Стрессирующее воздействие 54

2.3 Измерение физиологических показателей 54

2.4 Проведение иммуноферментного анализа 55

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ 58

3.1. Сравнение изученных показателей у крыс линии WAG интактных и в эксперименте. 58

3.2. Сравнение изученных показателей интактных (контрольных) крыс линии WAG и интактных крыс линии НИСАГ. 666

3.3. Сравнение изученных показателей интактных крыс линии НИСАГ и в эксперименте. 70

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ ..**Ошибка! Закладка не определена.**

ВЫВОДЫ 8585

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ..... 8686

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ..... 8787

ВВЕДЕНИЕ

Актуальность темы исследования. Современная жизнь с ее чрезмерными эмоциональными нагрузками, недостаточными физическими и высокой плотностью потока информации оказывает на организм человека избыточное стрессирующее воздействие, что может стать патогенетической основой различных заболеваний (психических, эндокринных, сердечно-сосудистых и др.). Метаболический синдром, в состав которого помимо ожирения, сахарного диабета и ишемической болезни сердца, была включена и эссенциальная гипертензия, в настоящее время принимает форму «неинфекционной пандемии». Современная медицина не может пока ещё решить проблему профилактики и лечения гипертензии и ее осложнений – инфарктов, инсультов и других сердечно-сосудистых катастроф, которые пока держат первое место в статистике причин смертности.

Из теории Г. Селье (1982) известно, что реакции организма, вызванные стрессом, являются эволюционно закрепленной защитой при сильном или длительном воздействии внешнего фактора (Меерсон, 1981). Нарушения в работе классических нейрогуморальных систем стресса (РААС, САС, ГГАС, сдвиги липидного обмена, свободно-радикальное окисление и др.) физиологически проявляются усилением сосудистого тонуса и сдвигом водно-электролитного баланса, что приводит к повышению артериального давления (АД).

В начале 80-х годов прошлого столетия были открыты пептиды синтезируемые и выделяемые кардиомиоцитами правого предсердия. В настоящий момент известно, что эти соединения обладают выраженным натрийуретическим и диуретическим эффектом, расслабляют гладкую мускулатуру сосудов и оказывают защитное (антигипертрофическое и антисклеротическое) действие на само сердце (Potter, 2006; Gardner, 2007). Пептиды сердца способны из состояния повышенного напряжения приводить к норме проявления ответных реакций, восстанавливающих гомеостаз организма после неспецифических адаптационных реакций при воздействии

неблагоприятных факторов (физических или психологических). Получив ответы на вопросы о механизмах синтеза, выделения и биологической активности предсердного пептида, можно доказать или опровергнуть отношение его к какой-либо стресс-лимитирующей гипотензивной системе.

Системы контролирующие стресс-реализующие реакции изучены значительно более полно, чем стресс-лимитирующие, однако от баланса в их взаимодействии зависит, к чему приведёт неспецифическое воздействие - к адаптации ответных реакций организма или к началу патогенеза.

Степень разработанности темы.

В миокарде всех позвоночных животных обнаружены клетки способные к секреции натрийуретических пептидных гормонов. Считается, что они являются филогенетически древней регуляторной системой (Inoue, 2006; Trajanovska, 2007; Trajanovska, 2008; Takei, 2011). У рыб, например, угрей они регулируют потребление и выведение соли и воды при переходе из пресных водоемов в соленую морскую среду, а у наземных животных – чувство жажды (Wu, 2009). Исследователи признают, что у млекопитающих гормональная система сердца начинает функционировать с середины эмбриогенеза и активно участвует в регуляции артериального давления и водно-электролитного баланса у эмбрионов так же, как и у взрослых особей.

В течение первых нескольких лет изучения ANP стремительно накапливались данные об их строении и молекулярных формах, источниках и органах-мишенях, путях биосинтеза и специфических рецепторах, физиологических эффектах у разных классов животных в онтогенезе и в экспериментальных условиях (Bonow, 1996; de Bold, 1996; Maack, 2003). Были разработаны методы и определены концентрации гормона в крови у человека в норме и при сердечно-сосудистых заболеваниях (Clerico, 2000; Emdin M., 2004). Оказалось, что это пептиды из 28-32 аминокислотных остатков, которые вырабатываются в миоэндокринных клетках предсердий и выделяются в кровь при растяжении миокарда. Обнаруженные антагонистические отношения ANP с вазопрессорными регуляторными гормональными системами (РААС, САС) и позитивное влияние на гемодинамику

и сердечно-сосудистую систему ANP дали основание надеяться на их клиническое использование. К сожалению, фармакологический подход (применение нативных, синтетических, модифицированных и химерных пептидов) пока не дал приемлемых результатов (Mohammed, 2006; Von Lueder, 2013). Возможность внешнего влияния на эндогенный уровень и биоактивность ANP требует понимания механизмов их синтеза, выделения, синергические и антагонистические взаимодействия с другими регуляторными системами. Несмотря на все достижения, до настоящего времени основные вопросы физиологии этой гормональной системы остаются неясными. Сейчас окончательно не выяснено, каким образом происходит регуляция активности, стимуляция и подавление синтеза, внутриклеточное преобразование и выделение натрийуретических пептидов. Непонятны принципы регуляции уровня гормонов в крови и их функциональные взаимоотношения с другими регуляторными системами. Морфологические исследования, которые дают привязки к определенным структурам, к сожалению, немногочисленны и фрагментарны. Неясно, участвуют ли эти гормоны на разных стадиях реализации неспецифического адаптационного синдрома, который, наряду с генетической предрасположенностью, признается основой патогенеза многих неинфекционных заболеваний.

Цель работы – изучить функциональную активность миоэндокринных клеток, синтезирующих атриальный натрийуретический пептид в правом предсердии, и оценить их участие в гемодинамической реакции на субхронический иммобилизационный стресс у крыс с различающейся стрессовой реактивностью – нормотензивной и гипертензивной линий.

Задачи исследования:

1. Определить биохимические показатели, гемодинамические характеристики и оценить эндокринную функцию кардиомиоцитов на микроскопическом и ультратруктурном уровнях в двух состояниях животных – интактном и при субхроническом действии иммобилизационного стресса –

а) у нормотензивных крыс линии WAG,

б) у гипертензивных крыс НИСАГ,

2. Провести сравнительный анализ линий по фоновой секреторной активности миоэндокринных клеток предсердия и по физиологической реакции на стресс.

Научная новизна

- Впервые методами электронной микроскопии и стереоморфометрии было показано, что проявление стресс-реакций сопровождается изменением функциональной активности миоэндокринных клеток правого предсердия крыс у обеих изученных линий. В условиях иммобилизационного стресса резко тормозится выделение гормона при сохранении его синтеза, что приводит к накоплению большого числа специфических секреторных гранул и их активной внутриклеточной деградации в цитоплазме миоэндокринных клеток.
- Впервые в ходе исследования было продемонстрировано, что у крыс линии НИСАГ генетически обусловленная высокая стресс-чувствительность, ассоциированная со стойкой артериальной гипертензией, сопровождается накоплением в цитоплазме миоэндокринных клеток предсердий значительно большего количества секреторного продукта, чем у крыс контрольной линии WAG.
- Впервые показано, что в условиях субхронического иммобилизационного стресса при однонаправленных изменениях всех изученных параметров межлинейные различия секреторной активности миоэндокринных клеток сохраняются.
- Впервыеустановлено что у крыс НИСАГ на фоне более высокой концентрации ANP в крови и прогормона в миоэндокринных клетках лабильность этой системы слабее и адаптация к стрессу менее эффективна, чем у нормотензивных животных.
- На основании полученных данных о функциональной активности системы ANP впервые обосновано участие этой системы в реализации стресс-реакций разного характера и разной продолжительности.

Теоретическая и практическая значимость. Семейство сердечных натрийуретических пептидов изучено недостаточно. Экспериментально обоснованное новое знание, которое дополняет представление о физиологии этой системы, ее взаимодействия с другими регуляторными системами и ее участие в основных реакциях организма и поддержании гомеостаза, имеет фундаментальное значение. Методики, использованные в работе, доказали участие ANP в реализации стресс-реакций разного характера.

В ходе реализации у разных линий крыс кратковременной стресс-реакции, сопровождающейся повышением АД, секреция ANP резко сокращается. Это позволяет понять взаимодействие гипо- и гипертензивных гуморальных систем в норме и при стойкой гипертензии. В перспективе полученные данные можно будет использовать для разработки принципиально новых подходов к коррекции гемодинамических гипо- и гипертонических нарушений. Знания о регуляции выделения ANP с помощью стимуляции или ингибирования собственных эндогенных биоактивных веществ помогут в создании фармакологических препаратов принципиально нового механизма действия.

Полученные данные о секреции ANP дают основание считать одной из важных функций пептида гипотензивную и антистрессовую, объясняют механизмы действия ANP и обосновывают применение его синтетических аналогов в клинической практике. Он нашел применение как антагонист альдостерона и вазопрессина, превышая по эффективности использование для этой цели других препаратов. В настоящее время препараты с ANP используются в качестве мочегонного, натрийвыводящего средства, а также расширяющего почечные сосуды и расслабляющего гладкую мускулатуру.

Методология и методы исследования

Для решения поставленных задач использовались крысы с повышенной эмоциональной чувствительностью, которая закреплялась генетически и вошла в основу для создания новой линии. В Институте цитологии и генетики СО РАН на основе аутбредной линии Вистар была получены крысы с наследственной

индуцированной стрессом артериальной гипертензией, сокращённо - НИСАГ (Маркель, 1985). Отбор происходил по высокой инивидуальной чувствительности животных к стрессу.

Взрослые крыс линии НИСАГ отличаются более выраженными реакциями стресс-реализующих гормонов (АКТГ, кортикостерон, адреналин), в том числе альдостерона, на разные виды стресса (иммобилизационный, социальный, гиповолемический и другие). У этих животных выявлены изменения основных звеньев регуляции гемодинамики - гипофизарно-надпочечниковой, ренин-ангиотензин-альдостероновой и инсулин-адреналовой систем. В сердце обнаружены все морфологические изменения, характерные для гипертензивного статуса: большая относительная масса, умеренный кардиосклероз, гипертрофия желудочковых кардиомиоцитов, утолщение стенки и уменьшение просветов коронарных артерий. Для них характерно повышенное артериальное давление.

В отличие от гипертензивных крыс других известных линий, включая SHR, у крыс линии НИСАГ одним из основных факторов, приводящих к развитию артериальной гипертензии, является повышенное психоэмоциональное напряжение в стрессовой ситуации, это свойство делает крыс признаной моделью эссенциальной гипертонической болезни.

Методики применяемые для данного исследования, позволили традиционные физиологические подходы (эксперимент с рестрикционным стрессом, мониторинг артериального давления) дополнить клиническими анализами крови с определением содержания электролитов. Для оценки концентрации натрийуретических пептидов в плазме крови и в миокарде предсердий были использованы наборы для иммуноферментного определения ANP. Причины изменения содержания пептида в крови у разных линий крыс в покое и при стрессе выяснялись с помощью методов гистологического исследования функционального состояния и светооптической морфометрии тканевых и клеточных структур (кардиомиоцитов, стромы, кровеносного русла) миокарда правого предсердия.

Источниками синтеза ANP являются кардиомиоциты предсердий. В

цитоплазме клеток обнаружены гранулы, которые содержат атриальный пептид. Электронно-микроскопические методы позволили подробно изучить активность клеток, характерное состояние секреторного аппарата и его реакцию на изменения внутренней среды организма, вызванное стрессирующим воздействием (Коростышевская, 2013).

Положения, выносимые на защиту:

1. АНП являются гормонами с антиалярмным действием, препятствуя эффектам стрессовых гормонов на гемодинамику. При выбранном варианте стресса ANP задерживаются в миоэндокринных клетках, и их секреция в кровь затормаживается, что способствует полноценному проявлению начальных стадий стресса как адаптивной реакции на воздействие.
2. Гипертрофия и секреторная гиперактивность миоэндокринных клеток предсердий у крыс НИСАГ является генетически закрепленным структурным следом искусственного отбора, проведенного по признаку повышенной стрессовой реактивности.

Апробация результатов. Полученные результаты были представлены на IV-й Конференции молодых ученых и студентов «Экспериментальная и прикладная физиология» (Москва, 2013); X-м Всероссийском конгрессе «Артериальная гипертензия как фактор риска сердечно-сосудистых заболеваний» (Москва, 2014); на международной научно-практической конференции «Основные проблемы в современной медицине» (Волгоград, 2014); II-м международном образовательном форуме «Российские дни сердца» (Санкт-Петербург, 2014); V-м международном форуме кардиологов и терапевтов (Москва, 2016).

Публикации. По теме диссертации опубликованы 4 статьи в рецензируемых отечественных журналах, 5 тезисов в сборниках материалов и конференций.

Структура и объем работы. Диссертация включает введение, обзор литературы, описание материалов и методов исследования, результатов, их обсуждения, выводы. Работа изложена на 103 страницах, содержит 27 рисунков и 4 таблицы. Список литературы включает 154 источника, из них 100 иностранных.

Соавторство и благодарности. Автор выражает глубокую благодарность научному руководителю д.м.н. В.Ф. Максимову; к.б.н. И.М. Коростышевской за совместную работу и помощь в проведении гистологических методик; С.Я. Жанаевой за освоение метода подсчета белка; Е. Антонову за проведение количественного анализа; А.Л. Маркелю и Т.А. Моревой за помощь в проведении физиологических экспериментов; М.М. Геворгян за помощь в определении биохимических показателей крови.

ГЛАВА 1. СЕРДЕЧНЫЕ НАТРИЙУРЕТИЧЕСКИЕ ПЕПТИДЫ. ОСНОВНЫЕ ПРИНЦИПЫ РЕГУЛЯЦИИ ГЕМОДИНАМИКИ

1.1 Общие сведения

1.1.1 История открытия гормона

В середине прошлого столетия A. Dirks и соавт. (Елисеев, 2003) в при микропункционных исследованиях обнаружили некий «третий фактор», который добавлялся к альдостерону и АДГ для регуляции водно-электролитного обмена и уменьшает процентную величину реабсорбции натрия в канальцах. Вскоре Bricker в экспериментах с перекрестным кровообращением и на денервированной почке показал, что «третий фактор» является гуморальным агентом — гормоном (Елисеев, 2003).

Эндокринная функция сердца была открыта в 1981 году, когда deBold (de Bold, 1996) с коллегами показал, что введение экстракта из предсердной ткани вызывает у крыс резкое усиление натрийуреза. Три года спустя предсердный гормон был выделен, очищен, полностью расшифрована его аминокислотная последовательность (Kangawa K., 1984), после чего он получил название атриальный (предсердный) натрийуретический пептид (atrial natriuretic peptide — ANP) или фактор (ANP или ПНФ в русской транскрипции).

Позднее выяснилось, что кардиомиоциты сердца секретирует целое семейство пептидов. Схожий по строению с ANP пептид сначала был выделен из мозга свиньи, поэтому получил название мозговой натрийуретический пептид (BNP). Однако вскоре оказалось, что его содержание больше всего обнаруживается в миокарде желудочков сердца, поэтому пептиду было присвоено название «натрийуретический пептидом B-типа», по алфавитному порядку. Третий натрийуретический пептид получил название C-типа (CNP), он выделяется преимущественно в мозге, гипофизе, эндотелии сосудов, в почках и женских половых органах, его очень мало в сердце (Stepan H., 2000), поэтому к сердечным пептидам его не относят.

1.1.2 ANP в филогенезе и онтогенезе гормональной системы сердца

Натрийуретические пептиды обнаружены в сердце у всех позвоночных животных. У рыб (например, угрей) они регулируют потребление и выведение соли и воды при переходе из пресных водоемов в соленую морскую среду, а у наземных животных – чувство жажды (Wu, 2009).

Исследователи признают, что у млекопитающих гормональная система сердца начинает функционировать с середины эмбриогенеза и активно участвует в регуляции артериального давления и водно-электролитного баланса у эмбрионов так же, как и у взрослых особей.

У взрослых основным местом синтеза ANP являются предсердия, в левом желудочке его всего 0.5–3%. В эмбриогенезе вклад желудочков в общую секрецию сердечных пептидов много существенней, чем у взрослых особей, а у отдельных видов – основной.

1.1.3 Физиологические эффекты сердечных натрийуретических пептидов

Основным физиологическим эффектом ANP является антагонизм с ренин-ангиотензин-альдостероновой системой, поддержание водно-электролитного гомеостаза и регуляция кровяного давления путем стимуляции натрийуреза, диуреза и снижения периферического сопротивления (Рис. 1.1). На уровне организма введение ANP вызывает снижение системного АД, транзиторное увеличение кровотока в почках, легких и миокарде. ANP ослабляет легочную вазоконстрикцию, вызванную гипоксией, и может действовать как бронходилататор. Для ANP характерно участие в регуляции объема жидкости в малых и больших полостях организма, - это полости желудочков сердца или головного мозга, желудок, полость фолликула яичников или просвет семенных канальцев и т.п. Те же эффекты определяют участие ANP в регуляции объема клеток: гормон уменьшает их объем путем подавления входа воды или увеличением ее выхода из клетки через регуляцию активности Na^+/H^+-обменника, калий и хлор ионных каналов.

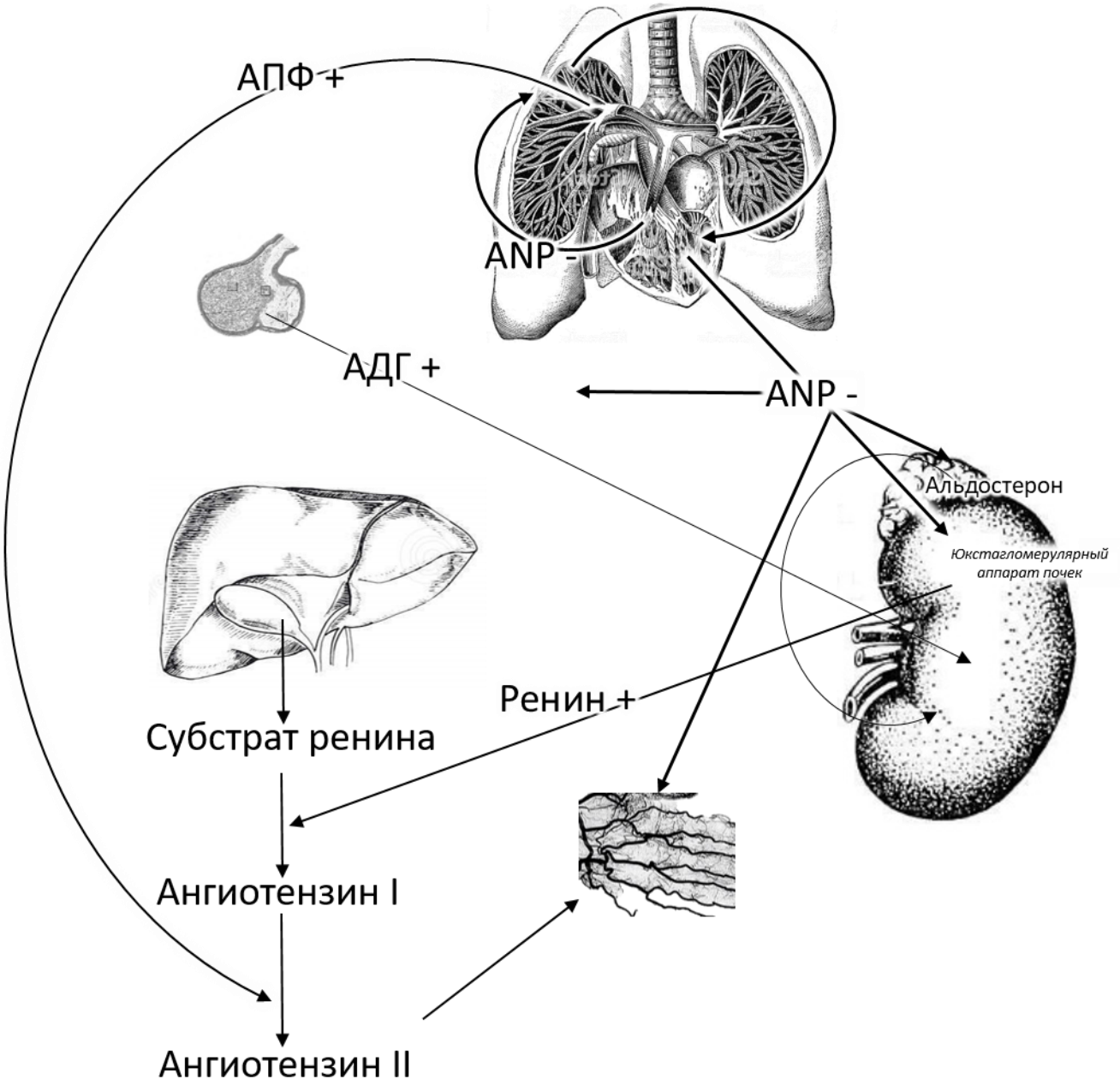
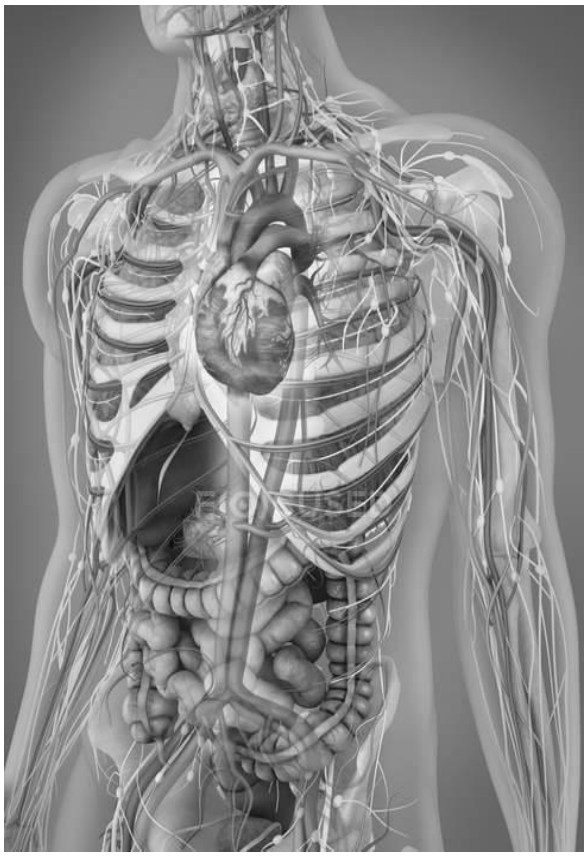


Рисунок 1.1. Взаимодействие атриального натрийуретического пептида с ренин-ангиотензин-альдостероновой системой и АДГ.

Экспрессия гена ANP обнаружена главным образом в предсердиях. Кроме того, получены данные в пользу синтеза натрийуретических пептидов и в других органах: в лёгких, почках, желудочно-кишечном тракте, вилочковой железе (Максимов, 2011). В некоторых областях мозга, особенно в гипоталамусе, передней доле гипофиза, стволе и лимбических структурах обнаружены нейроны, содержащие ANP. Это дало основание предположить, что в центральной нервной системе этот пептид может действовать в качестве нейромедиатора (Yandle, 1994; Medvedev, 2005). Однако следует отметить, что содержание ANP в перечисленных тканях намного меньше, чем в предсердиях.

Органами-мишенями гормона являются почки, кора надпочечников, гладкомышечные клетки сосудов, ЦНС, гипофиз, печень, цилиарное тело глаза, щитовидная железа, легкие и само сердце (Cameron, 2003; Максимов, 2011) (рис. 1.2). Взаимодействие гормона с органами-мишенями происходит благодаря специфическим рецепторам (Козлов, 2009).



- Подавление жажды и симпатической активности
- Расслабление гладкой мускулатуры сосудов
- Усиление проницаемости капилляров
- Подавление гипертрофии и фиброза миокарда
- Расслабление гладкой мускулатуры легких
- Подавление ренин-альдостероновой системы
- Диурез / натрийурез
- Липолиз

Рисунок 1.2. Физиологические эффекты ANP.

В легких. В бронхиальных сосудах легких обнаруживается наибольшее количество рецепторов специфичных для натрийуретических гормонов (Farrell, 2000). Влияние натрийуретических пептидов на процессы фильтрации и реабсорбции воды специфическим образом реализуются на уровне микроциркуляторного русла легких, где они оказывают противоотечный эффект. Это связано со специфическим действием на гидравлическую проницаемость легочных капилляров низкого давления, в которых реабсорбция преобладает над фильтрацией (Maack, 2006). Поступление ANP в легкие способствует поддержанию оптимального количества серозной жидкости в плевральной полости необходимого для осуществления акта дыхания.

В сердце. Аутокринные и паракринные функции ANP осуществляются через регуляцию роста кардиомиоцитов, увеличение их сократительной способности, подавление синтеза коллагена фибробластами и отложение внеклеточного матрикса. Пептиды влияют на деление эндотелиоцитов и гладкомышечных клеток в коронарных сосудах (D'Souza, 2004; Cameron, 2003; Goetze, 2009).

Было показано, что гены всех рецепторов к натрийуретическим пептидам экспрессируются в мышечных клетках сердца и фибробластах. В ряде исследований с генетически измененными экспериментальными животными показано, что отсутствие в организме ANP-рецепторов типа-А сопровождается развитием выраженной гипертрофии миокарда (Holtwick, 2003; Oliver, 1997). При полном отсутствии в организме ANP-рецепторов типа-А гипертрофия миокарда сочетается с артериальной гипертензией (Oliver, 1997).

В сосудах. Под действием ANP происходит перераспределение жидкости из сосудистого русла во внеклеточную среду (Maack, 2006). В основе этого процесса лежит прямое обратимое действие натрийуретических пептидов на проницаемость капиллярной стенки для воды (Huxley, 1987; Melo, 2000; Maack, 2006). Параллельно с перераспределением жидкости, ANP повышает венозную ёмкость (венодилатация) (Hunt, 1997; Valli, 1999) и стимулируют натрийурез. Кроме того, предполагают, что перераспределение жидкости может быть частично связано с повышением дренажной функции лимфатических сосудов

(Atchison, 1996).

Через цГМФ-зависимый механизм внутриклеточного действия, АНП усиливает поступление в клетки гладкой мускулатуры сосудов ионов Na+, K+ и Cl- и способствует снижению концентрации Ca2+. Это приводит к расслаблению гладкомышечных клеток.

К сосудистым эффектам натрийуретических пептидов также относят их влияние на трофические процессы в сосудистой стенке. Все они обладают антимитогенной активностью (Levin, 1998). Натрийуретические пептиды способны стимулировать синтез оксида азота (NO) в гладкомышечных клетках сосудов (Hunt, 1997).

Наиболее выраженый эффект ANP это влияние на сосудистый тонус через угнетение ренин-ангиотензин-альдостероновой системы. Поскольку последний повышает чувствительность гладкомышечных клеток сосудов к различным вазоконстрикторам, снижение его базальной секреции способствует вазодилатации.

Высказывалось мнение, что пептиды следует считать не вазодилататорами, а физиологическими антагонистами вазконстрикторов (Maack, 2006).

В почках натрийуретические пептиды вызывают гемодинамические изменения и оказывают прямое действие на канальцы, причем эти два эффекта не взаимосвязаны. Увеличение почечного кровотока, обеспечиваемое ANP, менее продолжительно, чем усиление натрийуреза (Levin, 1998). На функциональную способность почек эти пептиды оказывает следующие влияния:

- увеличивают скорость клубочковой фильтрации, вызывая расширение афферентных и сужение эфферентных артериол;
- повышают содержание цГМФ в мезангиальных клетках (клетки, расположенные между капиллярами клубочков), что приводит к их расслаблению и увеличению поверхности для эффективной фильтрации (Fried, 1986; Stockand, 1997; Vanderheyden, 2004; Marin, 1986; Weidman, 1986);
- ингибирует синтез и секрецию ренина в юкстагломерулярном аппарате;

- подавляет реабсорбцию натрия и воды в канальцах нефронов, за счет чего увеличивается объем первичной мочи. Это вызывает натрийурез и диурез в почках (Cao, 2008; Goetze, 2009; Максимов, 2011);
- В извитых канальцах АНП ингибирует ангиотензин II-зависимый транспорт воды и натрия, а на уровне коркового слоя - АДГ-регулируемый транспорт воды (Harris, 1987);
- НУП подавляют синтез альдостерона на уровне клубочковой зоны коры надпочечников.

В настоящее время общепринята точка зрения, что почечные эффекты НУП играют важную роль в водно-электролитных нарушениях при хронической недостаточности кровообращения (Levin, 1998; Vanderheyden, 2004);

В ЦНС. Циркулирующие в крови пептиды не проникают через гематоэнцефалический барьер и действуют на структуры головного мозга, расположенные с его внешней стороны. Однако, ANP, синтезируются в различных отделах ЦНС (Levin, 1998). Эффекты НУП в ЦНС связаны с расположением отдельных рецептурных структур в различных отделах головного мозга (Levin, 1998).

В опытах с культурами гипоталамических нейронов было показано, что прессорные гормоны и биологически активные вещества (эндотелин, вазопрессин, норадреналин) стимулируют освобождение АНП из культуральных клеток (Levin, 1998). В **центрах гипоталамуса** натрийуретические пептиды как медиаторы или гормоны подавляют возбудимость центра жажды и снижают солевое предпочтение и жажду. Это согласуется с общей направленностью эффектов гормонов этого семейства на уменьшение объема жидкости в организме. Получены данные, что ANP ингибирует секрецию антидиуретического (АДГ) и адренокортикотропного гормонов (АКТГ).

Кроме того, установлено влияние ANP на синтез гормонов в аденогипофизе. Происходи это либо через контроль микроциркуляции в медиальном возвышении, где оканчиваются содержащие ANP аксоны либо в капиллярном сплетении аденогипофиза (портальный кровоток).

Натрийуретические пептиды снижают симпатический тонус сосудов за счет подавления активности барорецепторов в головном мозге (Yang, 1992), уменьшения освобождения катехоламинов из периферических нервных окончаний, а также за счет депрессии высших отделов симпатической вегетативной регуляции (Levin, 1998; Yang, 1992). Натрийуретические пептиды также способствуют активации парасимпатического отдела **вегетативной нервной системы**. Это препятствует реализации рефлекторного ответа симпатической нервной системы (тахикардия, вазоконстрикция) на уменьшение ударного объема и артериального давления (Levin, 1998).

Все натрийуретические пептиды влияют на поведенческие реакции: они снижают реакцию тревоги и страха (анксиолитический эффект), улучшают обучаемость животных в эксперименте и процессы памяти (Clerico, 2000).

1.1.4 Рецепторы к ANP.

В настоящее время установлено, что эффекты ANP в органах-мишенях реализуются через рецепторные комплексы с циклическим гуанозинмонофосфатом (цГМФ) (Maack, 2006). К этим комплексам относятся рецепторы А-типа и С-типа (Nakao, 1992; Cameron 2003; Peeters, B.W., 2004; Maack, 2006). Количественное соотношение рецепторов к натрийуретическим гормонам в различных органах и тканях варьирует (Koller, 1992; Kone, 2001).

Рецептор А-типа это трансмембранный рецептор с молекулярной массой около 120 кД. Внеклеточный домен связывается с гормонами, внутриклеточный содержит киназную и гуанилатциклазную части.

Согласно современным представлениям, после присоединения гормона к рецептору А-типа, сигнал поступает в киназный домен, который содержит богатый глицином, АТФ-связывающий участок (Cao, 2008). Связывание АТФ с этим фрагментом активирует гуанилатциклазу и продукцию цГМФ. цГМФ, выполняя функцию «вторичного мессенджера», при помощи внутриклеточных ферментов, осуществляет эффекты ANP. В гломерулярных клетках надпочечников цГМФ ингибирует синтез альдостерона и его секрецию в кровь. В

клетках-мишенях почек и сосудов активация цГМФ ведёт к фосфорилированию внутриклеточных белков, которые опосредуют биологические эффекты ANP в этих тканях. До сих пор неизвестно, какие соединения принимают участие в фосфорилировании и дефосфорилировании рецептора.

Активность гуанилатциклазы рецептора уменьшается при длительном взаимодействии со специфическим лигандом. Эффект десенситизации (снижения чувствительности) рецепторов играет важную роль в физиологических эффектах ANP.

Рецепторы типа С имеют чувствительность ко всем натрийуретическим пептидам (Vanderheyden, 2004), но в основном, участвуют в их биодеградации (Porter, 2006; Koller, 1992). Рецепторы С-типа – клиренсные, состоят из лиганд-связывающего домена и короткого цитоплазматического хвоста из 37 аминокислотных остатков. Структура рецептора очень консервативна среди млекопитающих, может существовать как мономер (66 кД) или как димер (130 кД). (Woodard, 2007) (рис. 1.3).

С-рецепторы не имеют собственной цГМФ-регулирующей активности (Kone, 2001), их функция ассоциирована с белком G, который связывает гуанозиновые нуклеотиды. Наибольшая концентрация обнаружена в головном мозге, сосудистом эндотелии, гладкой мускулатуре, эндокарде, лёгких надпочечниках и почках (Maack, 2006). Эти рецепторы удаляют из крови около половины циркулирующих натрийуретических пептидов путем рецепторопосредованной интернализации. Остальное метаболизируется в крови нейтральной эндопептидазой EC 3.4.24.11 (McFarlane, 2003). Время полужизни для АНП приблизительно 3–5 мин, (Potter, 2006).

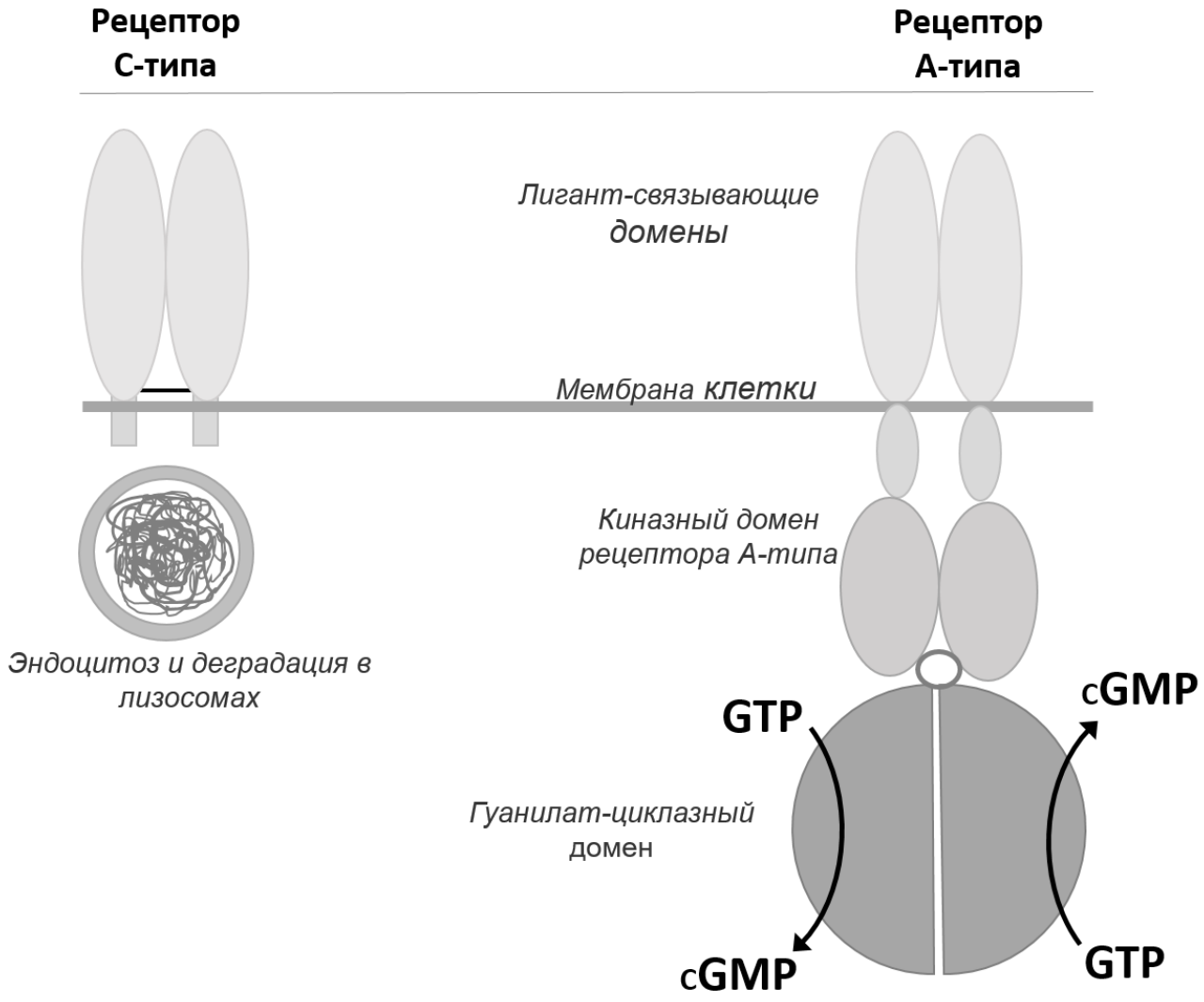


Рисунок 1.3. Схема строения рецепторов сердечных натрийуретических пептидов. По Potter et al., 2006.

1.1.5 Факторы, влияющие на синтез и секрецию натрийуретических пептидов

Пептиды синтезируются в предсердных кардиомиоцитах. Изменение объема циркулирующей крови и содержание Na+ в плазме являются сильнейшими стимулами для экспрессии генов натрийуретических пептидов и секрецию их в кровь (Silberbach, 2001; Pandey, 2005). Это приводит к значительному увеличению экскреции натрия и воды с мочой.

Процессы секреции и синтеза гормонов в норме тесно взаимосвязаны.

Стимулами для секреции ANP также может быть влияние других гормонов (Levin, 1998). Катехоламины, и синтетические агонисты α_1-адренорецепторов (фенилэфрин) могут прямо действовать на α_1-адренорецепторы предсердий и стимулировать секрецию ANP.

В регуляции обмена натрия важную роль играет вентральная область третьего желудочка мозга, в которой обнаружены ANP-содержащие нейроны. При ее стимуляции агонистом M_1-холинергических рецепторов происходит 15-кратное увеличение ANP в плазме крови. Разрушение этой области у экспериментальных животных приводит к значительному снижению ANP в плазме и значительно меньшей секреции ANP в кровь в ответ на увеличение водно-электролитной нагрузки организма (Medvedev, 2005).

Другие стимулы секреции ANP:

- увеличение осмолярности плазмы
- повышение частоты сердечных сокращений
- повышенный уровень глюкокортикоидов в крови
- внутривенное введение солевых растворов и воды
- повышенное потребление поваренной соли
- переход тела из вертикального положения в горизонтальное
- погружении тела в воду
- резком повышении кровяного давления вследствие выброса сосудосуживающих гормонов
- назначении адреналина, солодки, высоких доз минералокортикоидов и глюкокортикоидов
- при электрокардиостимуляции предсердий, ишемии миокарда (Сытый, 2008).

1.1.6 Строение ANP. Внутриклеточные механизмы синтеза и выделения пептидов

ANP состоит из 28 аминокислотных остатков и имеет кольцевую структуру (рис.1.4), образованную дисульфидными мостиками между цистеиновыми

остатками. Это кольцо определяет биологическую активность и взаимодействие с рецептором.

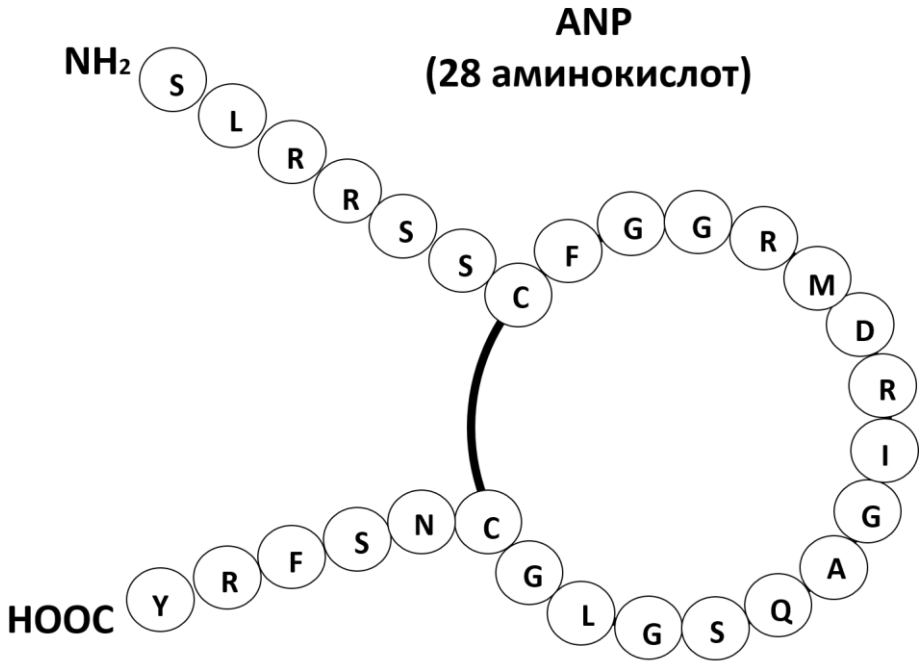


Рисунок 1.4. Схема строения молекулы предсердного натрийуретического пептида. По Gardner D.G et al., 2007.

Синтез.

Пептидные гормоны синтезируются на рибосомах, связанных с эндоплазматическим ретикулумом, и упаковываются в секреторные гранулы в аппарате Гольджи. В настоящее время считают, что во всех случаях с поступающей к рибасомам мРНК транслируется пептид, размеры которого превышают размеры собственно гормона. Продуктом трансляции на этой стадии является *пре-про*-гормон. *Пре*-последовательность включает гидрофобные аминокислоты; по-видимому, она облегчает прохождение белка чнрез зону липидов эндоплазматического ретикулумав его просвет. После этого *пре*-последовательность отщепляется от первичного продукта трансляции (Хочачка, 1989).

Внутриклеточные пути синтеза, накопления и выведения натрийуретических пептидов в кардиомиоцитах изучены недостаточно. Благодаря развитию

молекулярно-генетических технологий стали доступны для понимания отдельные этапы процессов синтеза.

ANP у человека закодированы небольшими генами в 1-й хромосоме, у мыши – в 4-й, у крысы – в 5-й. Структура гена проста и схожа с таковой других пептидных гормонов по размеру и составу (Lanfear, 2010). Ген, кодирующий пре-прогормон ANP (152 аминокислоты), состоит из трех экзонов (кодирующих последовательностей) и разделяющих их двух интронов (рис. 1.5).

Экзон 1 кодирует сигнальный пептид из 26 аминокислотных остатков, который отщепляется от пре-прогормона в эндоплазматической сети - образуется прогормон ANP (126). Экзон 1 также кодирует первые 16 аминокислот прогормона. Экзон 2 кодирует основную часть прогормона (17-125 у людей). Экзон 3 кодирует последний тирозин (т.е. 126-ю аминокислоту прогормона) у людей и три последние аминокислоты (тир-арг-арг) у мышей, крыс, кроликов и коров (Vesely, 2001). Прогормон – основная форма хранения и накопления ANP в кардиомиоцитах. Это простая молекула, которая распадается при выделении из клеток на два основных фрагмента – N- и C-терминальные пептиды. Последний (99-128) является активной формой гормона ANP. Он состоит из 28 аминокислотных остатков с кольцевой структурой, образованной дисульфидными мостиками между цистеиновыми остатками (рис. 1.4). Именно кольцо определяет биологическую активность и взаимодействие с рецепторами клеток-мишеней. N-терминальный фрагмент прогормона (1-98) не обладает биологической активностью, но в крови он распадается на несколько полипептидов с гипотензивным, натрийуретическим, диуретическим и калийуретическим действием. Первые 30 аминокислот составляют долгоживущий ANP, с 31 по 67 – сосудистый дилататор, 79-98 – калийуретический пептид (рис. 1.5).

В отличие от натрийуретических эффектов других известных пептидов (BNP и CNP), натрийуретический эффект ANP не подавляет почечную Na^+-K^+-АТФазу вторично через усиление синтеза простагландина E_2. Пост-трансляционные превращения ANP происходят в клетках по общей схеме: пре-прогормон ANP (152) → отщепление сигнального пептида с образованием прогормона ANP (126) → специфическая протеаза разделяет его на N-терминальный фрагмент прогормона (1-98) и активный гормон BNP (99-126). Оба фрагмента в эквимолярных концентрациях выделяются в кровь (Goetze, 2009).

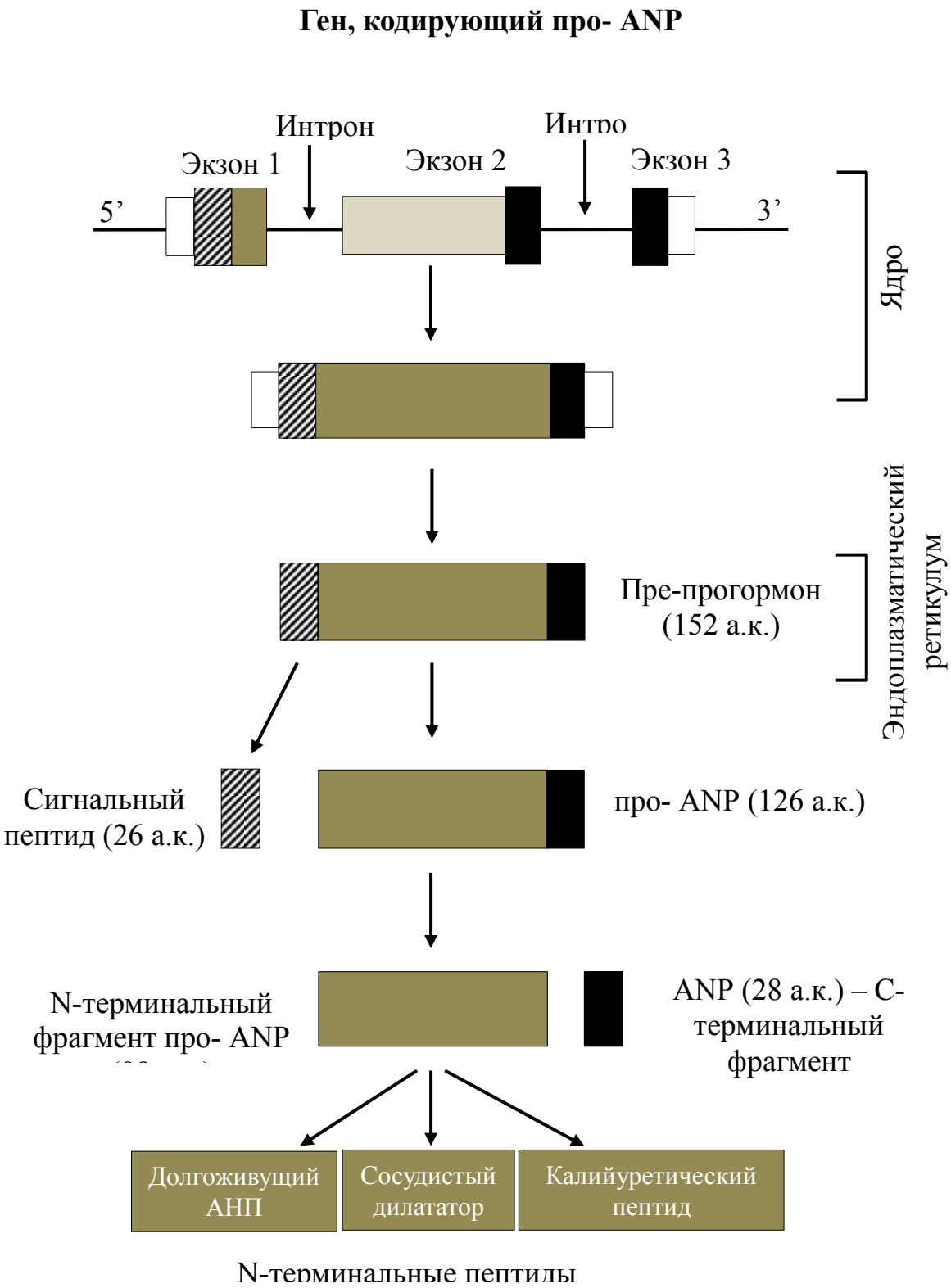


Рисунок 1.5. Схема синтеза и процессинга молекулы атриального натрийуретического пептида (ANP) в кардиомиоцитах предсердий. По Vesely, 2006.

Вазоактивные вещества (катехоламины, ангиотензин-II) усиливают транскрипцию натрийуретических генов через p38 МАРК протеинкиназу. Растяжение миоцитов повышает уровень внутриклеточного кальция, изменяет кальций-связывающие белки, что усиливает экспрессию натрийуретических генов (Kudoh, 2003). Эти же гены активируются ишемическим транскрипционным фактором (hypoxia inducible transcription factor 1-alpha), что имеет значение при ишемической болезни сердца (Weidemann, 2008).

Накопление. В секреторных гранулах накапливаются не только прогормон ANP (126). По данным исследователей (Vesely, 2001) в кардиомиоцитах также происходит образование и накопление и прогормона BNP (108) и зрелого конечного продукта BNP (32) вне гранул – в цитоплазме. Большинство исследователей отрицает наличие в гранулах зрелого ANP (28) (Vesely, 2001).

На ультраструктурном уровне секреторные гранулы кардиомиоцитов у разных видов позвоночных животных выглядят одинаково, но различаются по диаметру в пределах клетки (рис. 1.6). Как правило, скопление секреторных гранул обнаруживаются в околоядерной зоне, но при некоторых патологических состояниях (гипертензия, отёк и др.) гранулы заполняют саркоплазму между миофибриллами и скапливаются под сарколеммой.

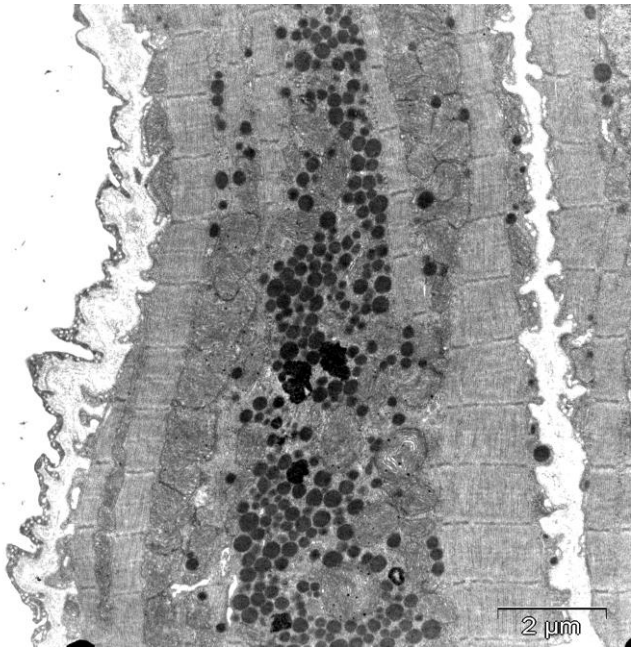


Рисунок 1.6. Эндокринный кардиомиоцит правого предсердия крысы с многочисленными секреторными гранулами. Электронограмма. Масштаб 2 мкм. По Максимов В.Ф., Коростышевская И.М., 2011.

Исследования показали, что у мышей с генетическим отсутствием ANP в клетках предсердий нет секреторных гранул (John, 1995), BNP в предсердиях не определяется, а в желудочках его концентрация минимальная (Tse, 2001). Интересно, что у мышей, нокаутных по гену BNP, гранулы в предсердиях имеются (Tamura, 2000).

Сердечные натрийуретические пептиды имеют принципиально сходное строение, однако транскрипция, постранскрипционные и трансляционные этапы, приводящие к секреции зрелых гормонов, могут значительно различаться как между собой, так и в ответ на различные стимулы, которые действуют на кардиомиоциты (O`Donnell, 2003). Внутриклеточные этапы «созревания» гормона: гликозилирование, эндопротеолиз – изучены плохо; неизвестно, где это происходит и какие ферментные системы задействованы, одинаковы ли эти процессы в предсердиях и желудочках (Vesely, 2001).

Анализ белкового состава секреторных гранул из кардиомиоцитов предсердий крыс выявил наличие в них около 100 разных белков. Из них 61 белок хорошо изучен и точно определен. Белки можно подразделить на 7 функциональных категорий (Muth, 2004), отвечающих за:

1. транспорт гранул и слияние с мембраной;
2. передачу сигналов;
3. связывание кальция;
4. клеточную архитектонику и формообразование;
5. процессинг пептидов/белков;
6. синтез гормона;
7. протонный транспорт;

Большая часть этих белков связаны с мембраной гранул и двумя мажорными (95%) белками – peptidylglycine-alpha-amidating monooxygenase (пептидилглицин альфа-амидированная монооксигеназа – ПАМ) и прогормоном ANP (1-126).

Прогормон ANP обнаруживается в растворимой сердцевине гранул, но большое его количество остается тесно связанным с мембранами даже после тщательного отмывания. В мембранной фракции молярное соотношение прогормона ANP и

ПАМ приблизительно 30:1. ПАМ – бифункциональный фермент, известный как каталитический пост-трансляционный биоактиватор сигнальных пептидов. Однако здесь основная функция ПАМ не ферментативная, а структурная. По-видимому, фермент участвует в упаковке прогормона ANP внутри секреторных гранул и, возможно, подготавливает прогормон к протеолитическому процессингу (O'Donnell, 2003).

Конденсация про-ANP является кальций-зависимым процессом. Поверхностные участки агрегатов про-ANP обогащаются липидами и белками внутри мембран транс-зоны аппарата Гольджи, обволакивая агрегаты и уменьшая энергию для замыкания секреторного пузырька и отпочкования его от цистерн Гольджи (Baertschi, 2001). В процессе формирования гранул принимают участие хромогранины, но их роль в сердце точно не установлена (Крылова, 2007).

По гипотезе Баерши с коллегами (Baertschi, 2001) само содержимое определяет размер и, возможно, форму секреторных гранул. В нормальных предсердных кардиомиоцитах у новорожденных крысят прогормон ANP выявляется в секреторных гранулах диаметром 120 и 175 нм, которые передвигаются в цитоплазме с максимальной скоростью 0,3 мкм/с. Удаление N-терминального фрагмента прогормона или точечная мутация в этой области вызывает изменение формы, размера, но не скорости перемещения в саркоплазме секреторных гранул.

На ультрамикроскопическом уровне более крупные гранулы приобретают неправильные «мягкие» очертания, имеют плотную сердцевину, окруженную бледным содержимым неравномерной ширины. Такие гранулы не могут сливаться с мембраной клетки из-за отсутствия поверхностных конденсированных структур и недостаточной плотности или неправильного расположения рецепторов связывания. Кальций-связывающий N-терминальный фрагмент прогормона отвечает за агрегацию белка в транс-зоне Гольджи в присутствии высоких концентраций кальция. Удаление С-терминального фрагмента молекулы прогормона ANP, где содержится сам гормон и его дисульфидный мостик, не влияет на форму, размеры, способность к слиянию и

скорость перемещения секреторных гранул (Baertschi, 2001).

Секреция. Различают два основных механизма секреции гормонов. Базальный уровень секреции происходит вне стимуляции и обеспечивается выделением синтезированного продукта пассивным пузырьковым транспортом. При регулируемом типе секреции гормоны выделяются под действием стимулов путем энергозависимого экзоцитоза гранул, в плотной сердцевине которых содержится гормон. Сортировка секреторного продукта на тот или другой тип выделения происходит в транс-зоне комплекса Гольджи (Ogawa, 1999). Iida и Shibata (1994) на культуре предсердных миоцитов крыс показали, что вне стимуляции около 40% вновь синтезированного ANP секретируется, а остальное направляется на запас или для более позднего выделения.

Долгое время механизм превращения прогормона ANP (в гранулах клеток) в зрелый гормон в плазме крови оставался загадкой. Недавно в миокарде была открыта новая мембранная трипсиноподобная сериновая протеаза, получившая название корин (corin). Именно этот фермент разделяет молекулу прогормона по аргинину в 98-й позиции в момент выделения его из клеток. Это крупная протеаза, состоящая из 1042 аминокислотных остатков с молекулярной массой 150-200 кД и относящийся ко II типу семейства трансмембранных мультидоменных протеаз. У человека ее ген с 22 экзонами находится в хромосоме 4p12-13. У нокаутных по гену корина мышей прогормон в сердце есть, а зрелого гормона нет, и как следствие, у них развивается тяжелая гипертензия (Wu, 2009). Его основная биологическая функция — активация натрийуретических пптидов.

Корин состоит из трансмембранного, внеклеточного домена и короткого N-концевого цитоплазматического домена. Выделившийся при растяжении кардиомиоцитов про-ANP расщепляется протеазным доменом корина и превращается в активный пептид ANP.

Визуализировать процессы выделения секрета из миоэндокринных клеток методически очень трудно. Растворяющиеся формы гранул (с частично или полностью разрушенной оболочкой и зернистым содержимым пониженной плотности), скопление гранул в непосредственной близости от сарколеммы –

лишь косвенные показатели интенсивности процесса. Для фиксации экзоцитоза секреторного продукта применяются специальные методики (быстрое замораживание, обработка таниновой кислотой). На рутинных электронограммах экзоцитоз обнаруживается, как правило, при стимуляции секреторной активности.

Секреция ANP напрямую регулируется механическим растяжением стенки предсердия, а частота сокращения менее важна как физиологический стимул для секреции. Сопряжение «растяжение-секреция» обусловлено входом ионов кальция через потенциал-зависимые каналы. Предполагается, что выделение Ca^{2+} из саркоплазматической сети, которое вызывает активацию кальций-кальмодулин киназы, тоже принимает участие во внутриклеточных процессах выделения ANP при механическом растяжении (O`Donnell, 2003).

Острая (в течение минут) реакция на растяжение приводит к усиленному выделению накопленного в предсердиях ANP, достаточного для повышения уровня гормона в крови. Стимулированная секреция, в основном, использует ранее синтезированный и накопленный гормон, а вновь синтезированный – в значительно меньшей степени. Усиление продукции пептидов характерно для более длительных воздействий, например, при изменении гормонального фона (избытке эндотелина-I, ангиотензина-II, адренергических агонистов, глюкокортикоидов, тиреоидных гормонов, простагландинов, вазопрессина и др.). Стимуляция транскрипции генов ANP происходит вторично к повышению объема жидкости, в плазме заметно повышается концентрация ANP (de Bold, 1996).

1.1.7 Концентрация натрийуретических пептидов в крови

Большинство наших знаний о клеточных синтезах пептидов в сердце основано на изучении их концентрации в плазме крови, что представляет собой баланс секреции и метаболического распада. Разработка точного, чувствительного способа определения натрийуретических пептидов была затруднена из-за низкой концентрации у здоровых людей (в среднем, 3-6 пмоль/л) и из-за структурных, метаболических и физиологических особенностей пептидов.

Уже на этапе внутриклеточного биосинтеза натрийуретических пептидов

выявлен целый ряд пост-трансляционных этапов созревания, что дает целый спектр пептидов, предназначенных для секреции. Некоторые изменения происходят в секреторном аппарате мышечных клеток, а при выделении из клеток прогормона ANP (1-126) он расщепляется на N-терминальный фрагмент, состоящий из 98 аминокислот и собственно гормон ANP (28), время полувыведения которого всего 2,5 мин. Поскольку N-терминальный про-ANP (1-98) имеет более медленный клиренс, чем биологически активный пептид, его концентрация в плазме выше (в 10-50 раз) (Bonow, 1996). Сам N-терминальный про-ANP биологически неактивен, но при расщеплении этого пептида in vivo образуется несколько биологически активных пептидных фрагментов (Overton, 1996). Если начать нумерацию аминокислот прогормона с N конца, то первые 30 аминокислот составляют долгоживущий ANP, с 31 по 67 – сосудистый дилататор, 79-98 – калийуретический пептид. Эти пептиды обладают (по крайней мере, частично) иными, чем собственно ANP биологическими свойствами, и они связываются с другими рецепторами (Vesely, 2001, 2006, 2007).

Активные пептиды циркулируют в крови, не связываясь с белками плазмы (Hawkridge, 2008). Около половины циркулирующих натрийуретических пептидов удаляются из крови путем рецептор-опосредованной интернализации рецепторами С-типа, которые располагаются в почках, в сосудистом эндотелии, сердце, легких и других органах. Остальное метаболизируется в крови эндопептидазой ЕС 3.4.24.11 с распадом кольцевой структуры и потерей нейтральной биоактивности (McFarlane, 2003). Иммунореактивный гормон экскретируется почками, и в меньшей степени, печенью.

До сих пор нет надежных методов определения концентрации сердечных натрийуретических пептидов и нет единого мнения по этому поводу (Clerico, 2000). Так как при проведении иммуноферментного анализа возможна перекрестная реакция с несколькими родственными пептидами, результаты могут оказаться завышены. С другой стороны, слишком специфический анализ определенного пептида может привести к недооценке состояния, поскольку видоизменения пептида могут происходить в циркулирующей крови, при заборе

крови или при ее хранении. Для минимизации погрешностей измерения было предложено калибровать общее содержание гормона в крови по какой-то его отдельной точно определяемой разновидности, а затем пересчитывать, исходя из стехиометрических пропорций. Ограничения этого подхода связаны с недостаточностью данных по процессингу гормонов и с их изменениями при разной патологии (Goetze, 2009).

Большое количество исследований было посвящено значению концентрации сердечных пептидов для классификации и/или прогнозирования смертности и/или выживаемости у больных с сердечными заболеваниями. Так, было показано, что по показателям BNP в крови можно оценивать прогноз инфаркта миокарда, поскольку в первые часы после инфаркта концентрация BNP превышает норму в 60 раз (Bonow, 1996).

Введение синтетического аналога ANP больным с сердечной недостаточностью вызывало уменьшение системного сосудистого сопротивления, увеличение ударного объема, усиление натрийуреза и диуреза, подавление ренин-ангиотензиновой и симпатической нервной системы. Накопленный опыт показал, что больные с сердечной недостаточностью хорошо откликаются на внутривенное введение синтетических гормонов, поэтому был разработан препарат Nesiritide / Natrecor; (SCIOS, Sunnyvale, CA, USA). К сожалению, этот синтетический аналог ANP имеет побочные эффекты. В настоящее время исследователи пытаются создать сборные (химерные) молекулы, фармакологические свойства которых превышают таковые нативного пептида, а побочные действия минимизированы (Von Lueder, 2013).

1.1.8 Заключение

За первое десятилетие исследований было накоплено большое количество различных фактов, полученных существующими тогда методами. Однако, единой системы знаний или уверенной концепции функционирования гормонов сердца во взаимосвязи с другими регуляторными системами так и не появилось. Исследователи столкнулись с множеством методических трудностей при

изучении механизмов синтеза, накопления, выделения пептидов, их взаимодействия с органами-мишенями. По этой причине, в конце прошлого века, первый интерес к изучению сердечных пептидов несколько снизился.

В настоящее время появились новые, в том числе, молекулярно-генетические, подходы к изучению этой системы. Постепенно было выявлено целое семейство натрийуретических пептидов, основным физиологическим действием которых является регуляция кровяного давления и поддержание водно-электролитного гомеостаза путем стимуляции натрийуреза, диуреза и снижения периферического сопротивления. Участие пептидов в реализации стресс-реакций не изучено и в литературе не отражено.

Для широкого распространения исследования сердечных гормонов в эксперименте и клинике необходимо повысить аналитическую чувствительность и специфичность (точность) методов, особенно для пептидов семейства про-ANP и про-BNP; а также разработать такие иммунологические методы нового поколения, которые позволяют проводить исследование за несколько часов или даже минут, а не за 12-36 часов как сейчас.

1.2. Основные нейрогуморальные механизмы реализации стресс-реакций

Стресс – неспецифическая реакция организма, возникающая при действии различных экстремальных факторов, угрожающих нарушением гомеостаза, и характеризующаяся стереотипными изменениями функции нервной и эндокринной системы. Эта современная формулировка – результат многолетних и разносторонних исследований зарубежных и отечественных физиологов и патофизиологов, которые развивали идеи Г. Селье об общем адаптационном синдроме (Меерсон, 1981; Физиология адаптационных процессов, 1986; Соколов, 1991; Якобсон, 2000).

По своей биологической природе стресс – адаптивная реакция, возникающая под влиянием чрезвычайных или экстремальных воздействий на организм, способствующая приспособлению организма к новым условиям. Стресс сопровождает любое напряжение организма и представляет собой универсальный

комплекс изменений, который включает в себя реакции на всех регуляторных уровнях: поведенческом, вегетативном, гуморальном, биохимическом, а также на психическом. Угрожающие воздействия настолько разнообразны, что в процессе эволюции выработался единый механизм, который не адаптирует сам, но создает метаболическую и структурную основу для самых разнообразных адаптаций. Физиологические стрессоры - это изменения, которые нарушают постоянство параметров внутренней среды организма (боль, гипоксия, изменение температуры, чрезмерная физическая нагрузка, давление, длительное голодание и др.). Психологические стрессоры – это стимулы, которые сигнализируют о биологической или социальной значимости событий (сигналы угрозы, опасности, переживания, обиды и др.) (Китаев-Смык, 1983). Воздействие должно быть достаточно сильным, чтобы включить механизмы центральной регуляции, и продолжительным, чтобы организм мог использовать все готовые, генетически определенные программы реагирования. При чрезвычайно сильном и длительном воздействии на организм неблагоприятного фактора, если реакция слишком выражена или протекает долго, может наступить срыв приспособительных (компенсаторных) реакций и нарушение гомеостаза. Развивающееся состояние дисстресса способствует переходу из средства адаптации в основу патогенеза большого класса заболеваний. Считается, что около двух третей заболеваний либо являются стресс-индуцированными, либо связаны со стрессом (Sabban, 2007). Согласно Г. Селье, стресс сопровождается классической триадой признаков: гипертрофия коры надпочечников, атрофия тимико - лимфоидной системы и язвы желудка и кишечника. Несмотря на все усилия современных наук, доскональные механизмы этих повреждений пока не установлены (Панин, 1991).

В реализации стресса принято выделять три стадии в соответствии с изменением резистентности организма (Меерсон, 1988). При этом следует иметь в виду, что неспецифическую резистентность невозможно измерить, поэтому вслед за Г. Селье, ее понимают, как способность организма сопротивляться любым повреждающим факторам.

Стадия тревоги с активной мобилизацией энергетических и структурных

резервов организма - резистентность организма быстро возрастает.

Стадия сопротивляемости (резистентности) – устанавливается повышенная сопротивляемость к стрессирующему воздействию.

Стадия истощения - резистентность снижается как к данному неблагоприятному фактору, так и к другим видам неблагоприятных воздействий.

Реакция на стресс опосредована взаимодействием между катехоламинами, АКТГ и глюкокортикоидами надпочечников, системой ренин-ангиотензин-альдостерон и АДГ. Катехоламины – норадреналин и адреналин – можно рассматривать как первую линию защиты. Остальные перечисленные факторы обеспечивают бОльшую длительность защиты.

Гормональные системы, принимающие участие в реализации стресса получили название стресс-реализующих систем. С первых же минут реализация стресс-реакций обеспечивается совместным взаимодополняющим и взаимопотенциирующим действием симпато-адреналовой (САС) и гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковой системами (ГГНС) (рис. 1.7). Первыми реагирует мозговое вещество надпочечников - на долю адреналина приходится около 80%, на долю норадреналина - около 20 % гормональной секреции. Физиологические эффекты адреналина и норадреналина аналогичны активации симпатической нервной системы, но гормональный эффект является более длительным. Очень схематично эффекты адреналина, можно суммировать следующим образом:

Нервная система - повышение возбудимости нейронов ЦНС, ускорение ответных реакций, стимуляция выделения кортиколиберина;

Сердечно-сосудистая и дыхательная системы - расширение коронарных сосудов, увеличение силы и частоты сердечных сокращений, перераспределение кровотока – сужение сосудов кожи, почек, кишечника ($\alpha 1$ эффекты) на фоне расширения сосудов сердца и скелетных мышц ($\beta 1$ и $\beta 2$ - эффекты), повышение системного АД, расширение бронхов и усиление вентиляции легких;

Метаболизм - активация гликогенолиза в печени (гипергликемия), активация липолиза (повышение концентрации свободных жирных кислот), повышение интенсивности тканевого дыхания и температуры тела, повышение утилизации

глюкозы и работоспособности скелетной мускулатуры, активация секреции глюкагона, подавление секреции инсулина (Теппермен, 1989).

Высокие концентрации адреналина и интенсивное выделение норадреналина симпатическими волокнами увеличивают частоту и силу сердечных сокращений, оказывают сосудосуживающее действие, что приводит к повышению артериального давления. Происходит перераспределение кровоснабжения в пользу сердца, мозга, скелетных мышц с обеднением внутренних органов, что является общим, далеко не единственным механизмом образования язв кишечника. Накопление ионов кальция в кардиомиоцитах и гладких мышцах сосудов повышает реактивность этих структур и по отношению к адреналину.

Повышение возбудимости миокарда может лежать в основе возникновения экстрасистол и аритмий. Все это свидетельствует о том, что чрезмерное повышение активности САС может быть пусковым механизмом развития Функциональную организацию другой стресс-реализующей системы – ГГНС очень схематично можно представить в виде каскада: гипоталамический кортиколиберин стимулирует секрецию АКТГ гипофизом, который стимулирует секрецию глюкокортикоидов в коре надпочечников (рис. 1.7).

Основным эффекторным гормоном ГГНС является кортизол – гормон пучковой зоны коры надпочечников. Кортизол вызывает лизис тимико-лимфоидной ткани и быстрый выброс в кровь антител из разрушающихся лимфоидных клеток. Эффекты кортизола в ЦНС и сердечно- сосудистой системе в большой степени являются пермиссивными – кортизол повышает возбудимость нейронов, гладких и сердечной мышцы, потому что способствует накоплению ионов кальция в клетках. Следовательно, эти структуры становятся более возбудимыми и легче отвечают на воздействие, например, адреналина. Эффекты длительного и значительного избытка глюкокортикоидов в крови очень разнообразны, часть из которых перечислены ниже (Ефимов, 1983; Балаболкин, 1989; Розен, 1994):

Рисунок 1.7. Схема нейрогуморальных звеньев формирования стресс-реакции и адаптации артериальной гипертензии, ИБС и других сердечно-сосудистых заболеваний (Якобсон и др., 1996).

- Уменьшение размеров лимфатических узлов, тимуса, селезенки. Снижение синтеза иммунореактивных белков, уменьшение продукции антител. Формирование иммунодефицитных состояний;
- Провоспалительный эффект;
- Активация и липогенеза и мобилизации жира. Повышение содержания глицерина, свободных жирных кислот, других липидов и холестерина в крови. Увеличение концентрации атерогенных фракций - липопротеинов низкой плотности;
- Накопление кальция в кардиомиоцитах приводит к повышению, возбудимости, сократимости сердечной мышцы и возникновению экстрасистол. С этими нарушениями может быть связан «синдром внезапной смерти», который встречается у хорошо тренированных молодых спортсменов;
- Накопление кальция в гладкомышечных клетках, умеренная задержка натрия, приводящая к набуханию сосудистой стенки, увеличивают прессорный ответ;
- Увеличивается количество клеток желез желудка и повышается их реактивность к гастрину и гистамину, что является одним из факторов образования кровоточащих язв желудка и двенадцатиперстной кишки.

Непосредственно повреждающие клеточные механизмы стресса традиционно объединяют в два комплекса: кальциевую и липидную триады. Кальциевая триада в миокарде проявляется в контрактуре миофибрилл, повреждении митохондрий, активации миофибриллярных протеаз. Липидная триада включает активацию липаз и фосфолипаз, детергентное действие высоких концентраций свободных жирных кислот и активацию перекисного окисления липидов. В последнее время все более укрепляется мнение о том, что устойчивость к стрессирующему воздействию является в конечном итоге устойчивостью клеточных мембран к повреждению (Соколов, 1991).

В организме существуют стресс-лимитирующие системы, которые ограничивают повреждающие последствия стресса. Они активируются параллельно с активацией стресс-реализующих систем и находятся от них в

прямой зависимости.

Известно, что АКТГ в гипофизе образуется из большой молекулы проопиомеланокортина, поэтому одновременно с АКТГ в крови и структурах ЦНС появляются вещества с высокой биологической активностью (рис. 1.8).

Рисунок 1.8. Схема метаболических превращений в ходе синтеза АКТГ. МСГ – меланоцитстимулирующий гормон. Цифры – количество аминокислот.

β-липотропин обладает собственными эффектами и одновременно является и прогормоном, из него образуются эндогенные опиоиды энкефалин и β-эндорфин. Они способны регулировать функции мозга и обладают обезболивающими эффектами. Оказалось, что накопление опиатов в головном мозге ограничивает возбуждение симпато-адреналовой системы, ингибирует синаптическую передачу. Например, внутривенное введение этих веществ ограничивает повреждающее действие катехоламинов, снижает их липотропный эффект, уменьшает гиперкальциевые контрактуры в миокарде. При стрессе возрастает активность ферментов биосинтеза еще одного стресс-лимитирующего фактора головного мозга - γ-аминомасляной кислоты. Этот медиатор ограничивает интенсивность стресса, обладает обезболивающим эффектом и уменьшает длительность стресс-реакции. Существенное значение в защите клеток от повреждающего действия свободнорадикальных продуктов перекисного окисления липидов играет система эндогенных антиоксидантов. К таким антиокислителям относятся стероидные гормоны, токоферолы, флавоноиды, фосфолипиды, лецитин, простагландины, кефалин (Панин, 1983; Физиология

адаптационных процессов, 1986).

Таким образом, в реализации стресса параллельно протекают две цепи событий: первая – это мобилизация системы, которая доминирует при адаптации к конкретному повреждающему фактору, и вторая, совершенно не специфическая, которая активируется при действии любого сильного или нового раздражителя. Стресс в качестве неспецифического звена адаптации выполняет три важнейшие и необходимые функции:

1. Мобилизация энергетических и структурных ресурсов организма, которая проявляется в повышении уровней глюкозы, аминокислот и жирных кислот в крови и их доступности для тканей.

2. Перераспределение ресурсов и направление их в доминирующую систему в результате избирательного расширения сосудов активно работающих органов. Такое расширение сосудов обеспечивается не только гормональными влияниями, но и местными механизмами (повышенной концентрацией углекислоты, молочной кислоты, АДФ, оксида азота).

3. Активация совместно с метаболитами-регуляторами процессов синтеза нуклеиновых кислот и белка в системе, ответственной за адаптацию, приводит к формированию системного структурного следа и повышению мощности и эффективности в доминирующей системе. Здесь ведущая роль принадлежит соматотропному гормону гипофиза. Под действием этого гормона происходит включение аминокислот в клетки, синтез в них белков, пролиферация клеток и увеличение мощности системы, ответственной за адаптацию.

1.3. Крысы линии НИСАГ – модель стресс-индуцированной гипертонии

Известно, что важнейшим средовым фактором в развитии эссенциальной артериальной гипертонии является эмоциональный стресс, особенно в тех случаях, когда существует генетическая предрасположенность. В лаборатории экспериментальных животных Института цитологии и генетики СО РАН была проведена селекция на основе аутбредных линий крыс Вистар и получена линия

крыс НИСАГ с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией (Маркель, 1985). В англоязычной литературе эта линия известна как ISIAH (inherited stress-induced arterial hypertension) и зафиксирована в базе RGD, ID 2292168 (Markel, 1992; Markel, 1999). В настоящее время линия крыс НИСАГ получила SPF-статус и содержится в SPF-виварии Института Цитологии и Генетики РАН.

Средние величины АД, измеренные у крыс НИСАГ за три года, составили 165–175 мм рт. ст. в покое (базальное АД) и 190–200 мм рт. ст. при действии стресса (Антонов, 2015). Модель позволяет исследовать механизмы возникновения и развития стресс-чувствительной формы артериальной гипертонии.

Крысы линии НИСАГ изучены в схемах различных экспериментов с применением широкого спектра современных методик. Особенно тщательно исследовали те регуляторные системы и органы мишени, которые принимают участие и в реализации стресс-реакций, и в регуляции гемодинамики. Исследователи исходили из положения, что генетическая предрасположенность к артериальной гипертензии, возникающей при эмоциональном стрессе, связана с особенностями функционирования нейроэндокринных систем (Антонов, 2011). К таковым относятся, в первую очередь, симпато-адреналовая (САС), гипоталамо-гипофизарно-адренокортикальная (ГГАС) и ренин-ангиотензин-альдостероновая системы (РААС) (Маслова, 1996).

Анализ поведения в тесте открытого поля показал, что крысы НИСАГ характеризуются повышенной поведенческой реактивностью (отношение общей двигательной активности в первом тесте к активности в последнем - 4,76, у крыс Вистар – 1,72), что связано с вызванной новизной исследовательской активностью. (Мешков, 2012). Особенности поведения крыс НИСАГ ассоциированы с изменениями нейромедиаторных систем регуляции. Отмечены изменения в концентрации и скорости обмена норадреналина, дофамина (Маркель, 2006) и серотонина в отделах мозга, участвующих в регуляции АД и стресс-реактивности (Маркель, 2002). Было показано, что в продолговатом мозге

и гипоталамусе взрослых крыс линии НИСАГ наблюдается дефицит норадреналина (Маслова, 1996). Также была обнаружена корреляция между уровнем альфа-1-адренорецепторов в стволе мозга и величиной АД у крыс, полученных при скрещивании крыс НИСАГ и WAG (Wistar albino Glaxo) (Маркель, 1992). Эти данные отражают важность центральных регуляторных звеньев как в определении уровня стресс-реактивности, так и в создании предпосылок для развития гипертонии.

У крыс НИСАГ отмечено повышение стресс-реактивности основных гормонов ГГАС при разных видах стресса (рестрикция разной продолжительности, обезвоживание, введение адреналина, в том числе социальном): усилены экспрессия мРНК кортикотропин рилизинг гормона (CRH) в гипоталамусе, экспрессия мРНК проопиомеланокортина в гипофизе, секреция АКТГ гипофизом и кортикостерона корой надпочечника (Markel, 2007). Другими словами, изменения затрагивают и центральные (гипоталамус, гипофиз), и периферические (кора надпочечника) звенья регуляторной системы. Особенно бурно реагируют глюко- и минералокортикоидная гормональные звенья в условиях стресса от кровопотери, которые направлены на задержку натрия и восстановление привычного для мозга и почек повышенного АД.

Все исследователи сходятся во мнении, что развитие гипертонической болезни, независимо от исходной причины, непременно затрагивает механизмы водно-электролитного обмена, а значит, и гуморальную систему, непосредственно с ним связанную – РААС. Оказалось, что крысы линии НИСАГ относится к разряду низкорениновых (Федосеева, 2009). Данные по альдостерону у разных исследователей разнятся: одни находят его концентрацию в крови у крыс НИСАГ несколько сниженной (Amstislavsky, 2006; Федосеева, 2009), в других работах утверждается, что она повышена как в покое (Антонов, 1997), так и в условиях эмоционального стресса (Антонов, 2011). Авторы считают, что кора надпочечников крыс линии НИСАГ значительно более чувствительна, чем у контрольных животных, к действию, выделяющемуся при стрессе АКТГ (Markel, 2007). При этом значительно усиливается синтез и выделение

минералокортикоидов из клубочковой зоны. Морфологические исследования показали, что надпочечники у крыс НИСАГ почти в полтора раза тяжелее, объем коры – в 1,3 раза больше, особенно увеличена клубочковая зона, адренокортикоциты крупнее и их ультраструктурные особенности отражают повышенную активность стероидогенеза по сравнению с нормотензивным контролем (Якобсон, 2000).

По данным А.Р. Антонова с соавт. (1997) (таб.1.1), у крыс линии НИСАГ уровень натрия в плазме крови достоверно в полтора раза выше, а калия несколько снижен по сравнению с нормотензивным контролем. Было показано, что генных производных, связанных с транспортом натрия в почечных канальцах у крыс НИСАГ больше, и, соответственно, концентрационная функция почек усилена (Amstislavsky, 2006). Гипернатриемия коррелирует с высокой концентрацией альдостерона в плазме крови и способствует повышению чувствительности сосудов к прессорным агентам. Повышенная реактивность артерий мышечного типа гипертензивных крыс НИСАГ по сравнению с нормотензивным контролем (в частности к норадреналину в 1,5 раза) была подтверждена в прямых экспериментах (Балакирева, 1998).

Для крыс НИСАГ характерна высокая активность симпато-адреналовой системы в условиях «повседневной жизни» - содержание адреналина в надпочечниках и активность основных ферментов его синтеза в покое повышены (Маркель, 2002). При стрессе резко возрастают концентрации адреналина и норадреналина в периферической крови (Антонов, 2010). Эти данные

Таблица 1.1

Показатели плазмы крови взрослых крыс Вистар (нормотензивный контроль) и крыс НИСАГ

Показатель	Вистар	НИСАГ
Альдостерон, нмоль/л	1,0±0,1	1,5±0,02*
Натрий, ммоль/л	140,2±1,2	190,0±1,3*
Калий, ммоль/л	5,9±0,2	5,1±0,2

Р.А. Антонов с соавт., 1997

подтверждаются морфологическими исследованиями, согласно которым у взрослых самцов линии НИСАГ объем мозгового вещества надпочечников превышает контрольные значения в 3,5 раза, а численная плотность хромаффиноцитов - почти в 4,5 раза (Бузуева, 2006).

Со стороны сердечно-сосудистой системы у крыс НИСАГ были отмечены типичные для гипертонической болезни изменения: увеличение абсолютной и относительной массы сердца, гипертрофия миокарда левого желудочка и кардиосклероз, увеличение диаметра кардиомиоцитов левого желудочка в 1,5 раза и их ультраструктурная перестройка, утолщение стенок коронарных артерий (Шмерлинг, 1996). Нарушения функции сердца были зафиксированы с помощью ЭКГ (Маханова, 1997). Крысы линии НИСАГ склонны к возникновению инфарктов миокарда, которые легко могут быть спровоцированы инъекцией адреналина (Максимов, 1997; Антонов, 1999; Якобсон, 2003).

Таким образом, крысы линии НИСАГ, изначально селекционированные по степени стресс-чувствительности, которую оценивали по транзиторному повышению АД в ответ на рестрикцию, в результате получили в качестве генетически закрепленного линейного признака стойкое повышение базального АД. Разностороннее изучение поведенческих, генетических, биохимических и морфологических особенностей систем и органов, задействованных в реализации стресс-реакций и регуляции водно-электролитного баланса и гемодинамики показало, что крыс этой линии можно считать адекватной моделью эссенциальной гипертонической болезни. В них сочетается генетическая предрасположенность к изменению регуляции АД по гипертоническому типу с повышенной психосоматической реакцией на внешние раздражения. К сожалению, пока ключевые звенья, сопрягающие стресс-реакции и стойкую гипертензию, остаются до конца невыясненными.

1.4. Функциональная морфология миоэндокринных клеток правого предсердия

Миоэндокринные клетки – термин, не входящий в гистологическую номенклатуру (Семченко и др., 1999), но употребляемый в мировой специальной литературе для обозначения кардиомиоцитов, сочетающих сократительную активность с эндокринной секрецией. Основным морфологическим признаком этих клеток является наличие в саркоплазме специфических секреторных гранул (рис. 1.9).

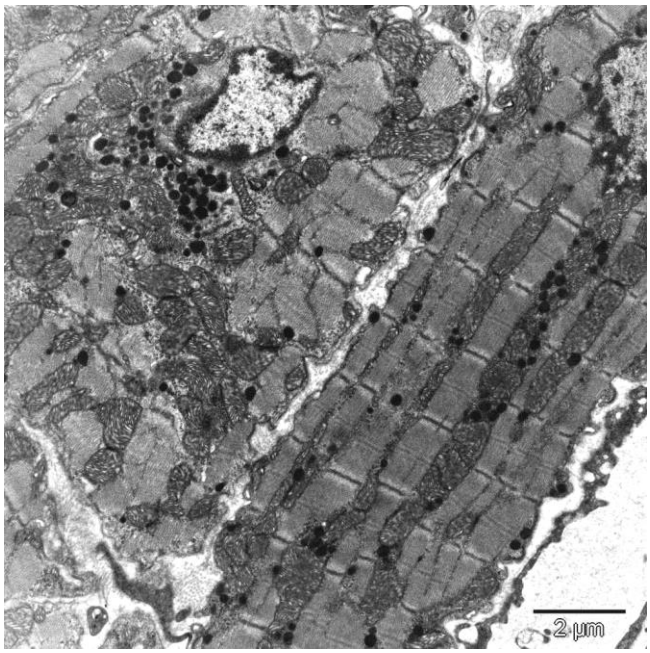


Рисунок 1.9. Эндокринные кардиомиоциты правого предсердия крысы с секреторными гранулами. Электронограмма. Масштаб 2 мкм.
По Коростышевская И.М. и др. 2013.

Миоциты способные синтезировать пептиды найдены в миокарде всех позвоночных животных, это показывает, что натрийуретические гормоны в филогенезе появились очень давно и их физиологические эффекты являются важной составляющей в гомеостазе организма (Inoue, 2006; Trajanovska, 2007; Trajanovska, 2008; Takei, 2011).

Наибольшая плотность клеток, продуцирующих натрийуретические пептиды, находятся в миокарде. В желудочках сердца выявлен преимущественно

натрийуретический пептид B-типа (BNP), а в предсердиях - пептид A-типа (ANP).

Наибольшее скопление секреторных гранул, содержащих незрелый атриальный натрийуретический пептид обнаружено в ушке правого предсердия, отсюда пошло название «предсердный» / «атриальный». Именно здесь находятся рецепторы давления воспринимающие сигналы, от механического растяжения стенки предсердия при повышенным объеме венозного возврата крови. Для работы сердца важна сила сопротивления, с которой сталкиваются кардиомиоциты при каждом сокращении, таким образом регуляция объема венозного возврата начинается именно с правого предсердия.

Известно, что пептиды в форме прогормона накапливаются в секреторных гранулах миоэндокринных клеток диаметром до 500 нм, поэтому для оценки состояния клеток и их секреторной активности необходимо использовать методы электронной микроскопии. Гранулы клеток предсердий по ультраструктуре очень схожи с таковыми других пептид-продуцирующих эндокринных клеток – передней доли гипофиза, островков поджелудочной железы, APUD системы кишечника и др. На ультратонких срезах - это, как правило, тельца строго округлой формы, электронноплотная гомогенная или тонкозернистая сердцевина которых, окружена одноконтурной мембраной (рис. 1.10). Под мембраной иногда просматривается тонкий светлый ободок – хало.

Для оценки эндокринной активности клеток исследователи разработали методики при которых изучаются морфологические и морфометрические показатели гранул (Gall, 1990; Avramovitch, 1995; Azizov, 2003; Gama, 2007; Tylkova, 2008).

Однако критерии принятые разными авторами сильно рознятся. Общепризнанных и однозначных показателей нет, как и четкого понимания особенностей внутриклеточных молекулярных процессов, приводящих к синтезу, накоплению и выделению натрийуретических пептидов. В связи с этим очень важно соблюдать алгоритм забора материала из топографически одинаковых участков миокарда предсердия, что позволяет максимально объективизировать данные о морфофункциональном состоянии миоэндокринных клеток.

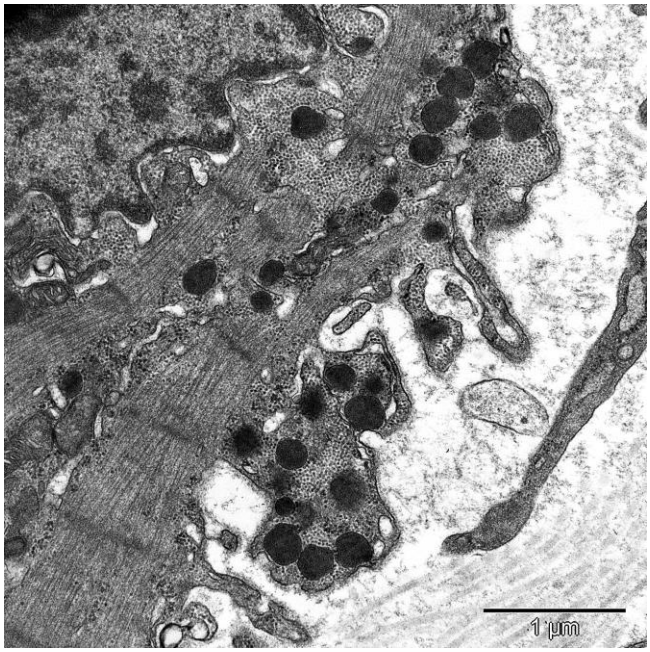


Рисунок 1.10. Зрелые секреторные гранулы в саркоплазме миоэндокринной клетки правого предсердия у крысы НИСАГ. Из архива автора.

Необходимо придерживаться строгой ориентации срезов для качественного и количественного исследования и других важных принципов стереоморфометрии (Непомнящих, 1986; Автандилов, 1990).

Опыт изучения миоэндокринных клеток предсердий в течении многих лет у животных разных классов (Максимов, 2012), а также у человека при различных видах патологии (Коростышевская, 1989), позволил подобрать наиболее информативные качественные и количественные морфометрические показатели. Совокупность получаемой информации достаточно объективно рассказывает о секреторной активности кардиомиоцитов и позволяет сопоставить результаты с другими процессами, происходящими во время исследования. Разработан алгоритм, позволяющий последовательно отображать видимую информацию при переводе ее в цифровые показатели. Этот алгоритм подробно будет описан в главе 2. При помощи методики определяются абсолютные размеры клеток, что дает представление о гипертрофии миокарда в целом. Изучение относительных объёмов основных органоидов саркоплазмы позволяет сделать выводы о функциональном состоянии клетки. Доля органоидов секреторного аппарата

(суммарный объем пластинчатых комплексов) и секреторных гранул в кардиомиоците, показывает эндокринную активность каждой клетки и позволяет сделать выводы о секреторной активности миокарда в целом. Развитие комплексов Гольджи – отражает активность синтеза продукта, а содержание секреторных гранул – баланс синтеза и выделения (рис. 1.11).

Гранулы, попадающие в поле зрения электронного микроскопа хорошо просматриваются, что дает возможность разделить их как минимум на три группы, условно соотносящиеся со стадиями секреторного процесса: формирующиеся, зрелые и растворяющиеся формы (рис. 1.12).

Формирующимися обозначили гранулы сравнительно небольших размеров, которые располагаются в основном в зоне комплекса Гольджи. Их сердцевина имеет тонкозернистую структуру, а под мембраной различим тонкий светлый ободок.

Зрелые гранулы самые крупные, их можно обнаружить в любом месте цитоплазме. Сердцевина этих гранул электронноплотная, гомогенная, ограничительная мембрана имеет четкие очертания и зрительно придает грануле ощущение упругого шарика.

Растворяющиеся гранулы в большинстве своем обнаружены на периферии клетки, их часто можно увидеть около мембраны (рис. 1.10), а иногда даже в процессе слияния двух мембран - гранулярной и клеточной (рис. 1.13). Края таких гранул выглядят размытыми, сердцевина более светлой, она может быть неровной плотности или зернистой. Иногда эти гранулы теряют свое содержимое только с одного края, поэтому приобретают неправильные «изъеденные» или серповидные очертания.

При изучении большого количества электронных фотографий можно детально восстановить процесс формирования гранул в комплексе Гольджи. На удачно прошедших срезах, при большом увеличении (0,5 мкм) в просветах диктиосом Гольджи обнаруживается скопление рыхлого зернистого вещества, не прилегающего к мембране. Иногда удается зафиксировать картину каплеобразного расширения на конце цистерны, в просвете которого

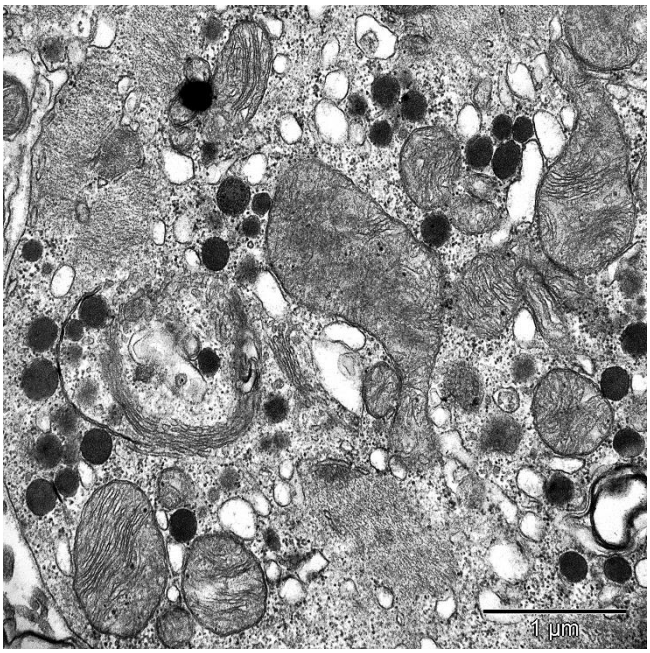


Рисунок 1.11. Аппарат Гольджи и разнообразие форм гранул в саркоплазме миоэндокринных клеток правого предсердия крысы.

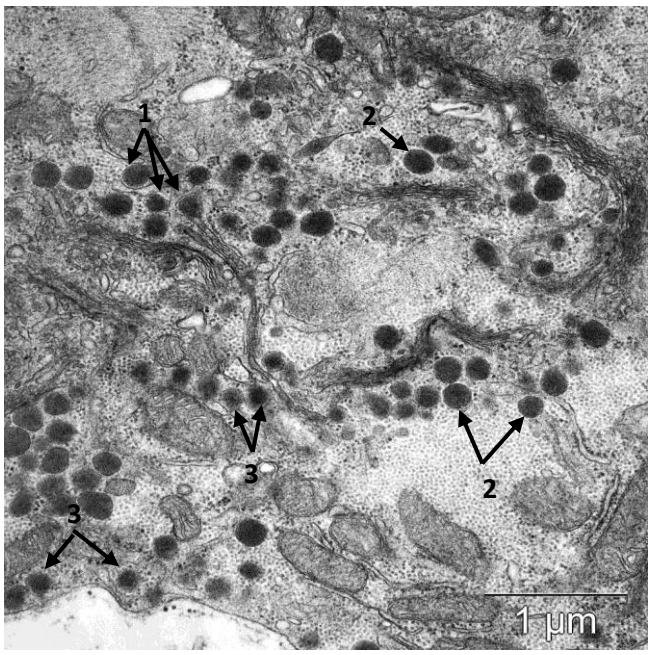


Рисунок 1.12. Секреторные гранулы в миоэндокринных клетках правого предсердия крысы. 1 – формирующиеся, 2 – зрелые, 3 - растворяющиеся.
По Коростышевская И.М.и др. 2013

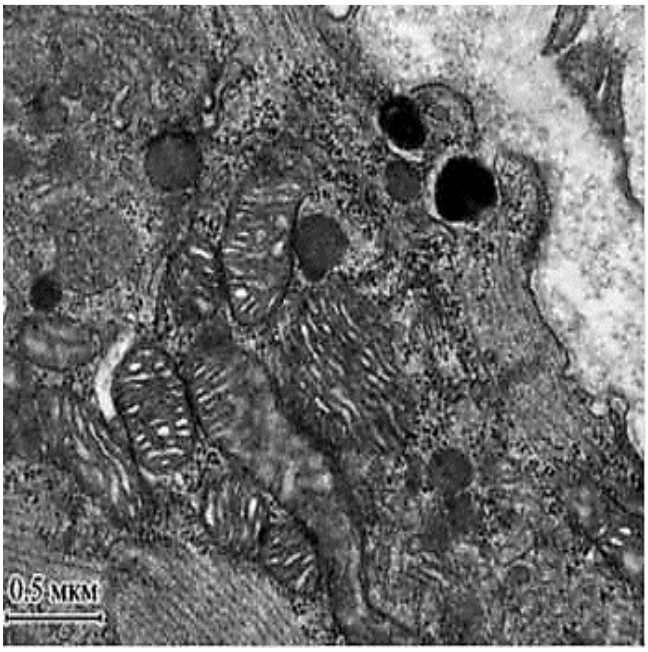


Рисунок 1.13. Процесс слияния гранулы с мембраной клетки.
Из архива автора.

располагается округлое тонкозернистое вещество умеренной электронной плотности.

Учитывали также разные формы внутриклеточной деградации гранул (остаточные и рудиментарные тельца) (рис. 1.14).

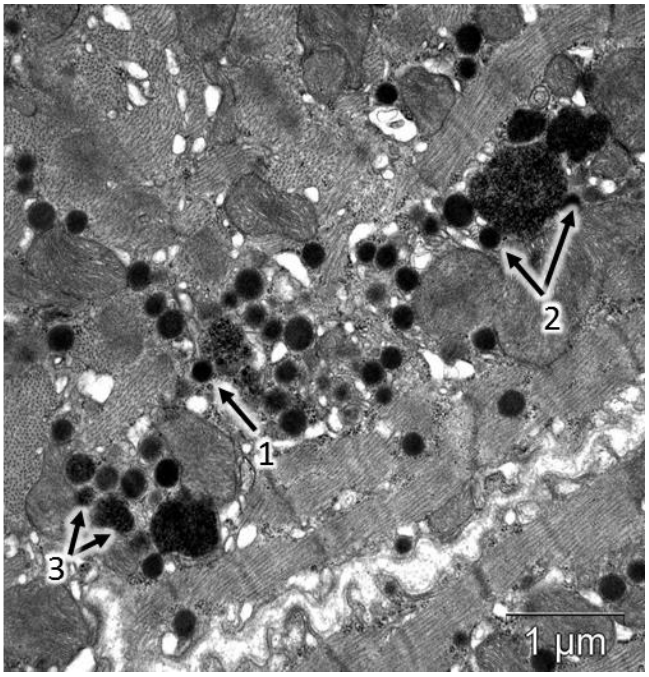


Рисунок 1.14. Внутриклеточная утилизация секреторного продукта по типу кринофагии в миоэндокринных клетках правого предсердия у старых крыс-гипертоников линии НИСАГ. 1 – зернистое перерождение сердцевины гранул, 2 – слияние гранул, 3 – остаточные тельца. Масштаб 1 мкм.

По Коростышевская И.М. и др., 2013.

Электронные микрофотографии, с запечатлёнными на них срезами клеток, в которых хорошо просматривались ядра и скопления секреторных гранул в околоядерном пространстве, позволили отнести разнообразные формы гранул к той или иной категории зрелости, описанной выше. Производили количественный и качественный учет каждой структуры, определяли диаметр гранул и процентное соотношение выявленных групп гранул ко всему количеству попавших в срез. Это позволило рассчитать общие показатели для групп гранул во всех клетках и для каждого подтипа, а именно средний диаметр и количество на единицу площади цитоплазмы клеток. Такая методика достаточно информативна и

позволяет оценивать состояние секреторного аппарата мышечных клеток предсердий (Коростышевская, 2013).

Деление гранул на три типа по степени зрелости оказалось достаточно удобным подходом к изучению эндокринной активности клеток не только в миокарде, но и в тканях других органов. Такой способ с некоторыми его модификациями использовали многие исследователи при работе с разными видами животных (Mifune, 1991; Azizov, 2003; Крылова, 2007; Рахчеева, Бугрова, 2010). Не смотря на корректировку результатов связанную с наличием переходных или атипичных форм гранул при строгом соблюдении алгоритма, результат получается весьма достоверным и информативным.

Например, электронноскопическим методом было выяснено, что у эмбрионов разных линий крыс при одинаковом диаметре миоэндокринных клеток и содержании в них миофибрилл (36-37 %), гликогена (22-23 %) и секреторных гранул (около 2 %), относительные объемы пластинчатых комплексов различаются вдвое (у линии WAG – 2.9±0.21 %, у НИСАГ – 6.0±0.31 %, соответственно). Оказалось, что уже на стадии эмбрионального развития крыс НИСАГ гранул в клетках миокарда в полтора раза больше, чем в контроле и они значительно мельче (143±1.9 и 180±2.3 нм в диаметре, соответственно). При этом, около половины составляют *формирующиеся* формы. Таким образом сделан вывод, что ещё до появления малышей на свет, на 18-е сутки развития, у эмбрионов линии НИСАГ имеется повышенная потребность в натрийуретических пептидах, которые активно синтезируются и сразу выделяются из клеток, не накапливаясь в гранулярном депо (Коростышевская, 2013).

Получаемые абсолютные параметры (диаметры клеток и гранул, численная плотность профилей гранул на единице площади цитоплазмы) позволяют сравнивать показатели у разных видов животных, в норме и при патологии.

При сравнении показателей у эмбрионов разных классов позвоночных (крыс и цыплят) на идентичном этапе развития (0,8 эмбриогенеза) было показано, что степень развития секреторного аппарата в миоэндокринных клетках правого предсердия резко различается: у крыс гранул на порядок больше, чем у кур (в

среднем 349±22 и 21.2±2.38 на 1000 мкм2) и они в полтора раза крупнее (180±2.3 и 111±2.3 нм в диаметре, соответственно) (Максимов, 2012; Коростышевская, 2013).

1.5. Заключение

Более ста лет физиологи, патофизиологи и клиницисты активно исследуют механизмы стойкого повышения АД, которое является составной частью метаболического синдрома (гипертония, ожирение, диабет). Хорошо изученные патогенетические механизмы стресса и гипертонии позволили создать эффективные лекарства разного механизма действия: сартаны – блокаторы ангиотензиновых рецепторов, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, блокаторы кальцевых каналов и т.д. Однако мало кто из исследователей берется за работу естественных эндогенных гуморальных систем, которые антогонистичны прессорным системам (РААС, САС, ГГНС). По определению, стресс-лимитирующие и гипотензивные регуляторы должны принимать участие в регуляции водно-электролитного баланса, гемодинамики в норме и при формировании патологии, но изучены они настолько мало, что никто не решается включать их в свои схемы патогенеза. Ярким примером является семейство сердечных натрийуретических пептидов, о которых сейчас известно ненамного больше, чем 35 лет назад, когда они были обнаружены группой DeBold в ходе классического эксперимента с перекрестным кровообращением. Являются ли ее изменения при гипертензии ответными, адаптационными, или первичные (возможно, генетические) изменения в системе – патогенетическая основа болезни. Почему в гипертензивных моделях и у больных с гипертонией и сердечно-сосудистыми заболеваниями уровень этих гормонов в крови повышен – «гормональный парадокс» - остается неразрешенным. Всегда ли при повышении АД усиливается секреция гормонов, зависит ли это от длительности, силы или природы неблагоприятного фактора. Являются ли сердечные гормоны истинными стресс-лимитирующими факторами. Эти, и еще многие вопросы взаимодействия

прессорных (стресс-реализующих) и депрессорных (стресс-лимитирующих) остаются пока вопросами, далекими от разрешения, хотя прояснение этих проблем могло бы дать исследователям материал для создания совершенно новых классов лекарственных средств, основанных на стимуляции эндогенных антигипертензивных систем.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1 Экспериментальные животные

В работе использовались 48 крыс (самцы в возрасте 6 мес.) нормотензивной линии WAG (Wistar Albino Glaxo) и линии с наследственно индуцированной стрессом артериальной гипертензией (НИСАГ) - животные с выраженными физиологическими показателями как при эмоциональном стрессе (Маркель, 1985; Markel, 1992).

Среднее систолическое давление у крыс линии НИСАГ составляло 161,0 ± 0,8 мм рт. ст., у нормотензивной линии 114 ± 2,7 мм рт. ст.

Животные содержались в стандартных условиях вивария, в индивидуальных клетках, со свободным доступом к воде и корму.

2.2 Стрессирующее воздействие

Половина животных оставалась интактными, а половина - подвергалась иммобилизационному стрессу - в течение 4-х дней крыс помещали в тесные клетки-сетки на 20 минут (по методу Кветнянского). До начала эксперимента и в конце его (на 4-е сутки) животных взвешивали и измеряли АД сфигмографическим методом на хвосте (tail-cuff method) на фоне кратковременного эфирного рауш-наркоза, что позволило избежать влияния стресса, связанного с процедурой измерения. На 5-е сутки крыс выводили из эксперимента гильотинированием под эфирным наркозом согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных» и директиве Европейского Сообщества (86/609/ЕС).

2.3 Измерение физиологических показателей

Измеряли массу тела и сердца, собирали кровь для общего анализа и

приготовления сыворотки. Правое предсердие иссекали на льду, часть фиксировали иммерсионным способом для морфологического исследования, часть быстро замораживали для иммуноферментного анализа.

Общий анализ крови проводили с помощью гематологического автоматического анализатора SYSMEX RX21N (Roche Diagnostics, Швейцария), содержание электролитов (K^+ и Na^+) в сыворотке крови определяли в автоматическом биохимическом анализаторе BECKMAN COULTER AU480 (США).

2.4 Проведение иммуноферментного анализа

Концентрацию ANP в сыворотке крови определяли иммуно-ферментным способом набором AB 108797 – ANP (NPPA) Rat ELISA Kit (Великобритания) с помощью микропланшетного фотометра MULTISKAN EX (Thermo Labsystems, Китай). Согласно инструкции к набору:

1. Приготовить по инструкции все реагенты, рабочие стандарты и образцы. Исследование проводить при комнатной температуре.
2. Добавить по 50 мкл Стандарта ANP или образца в каждую лунку. Закрыть лунки герметичной пленкой и инкубировать 2 часа. Время отсчета от добавления последнего образца.
3. Промыть вручную 5 раз по 200 мкл 1X Промывочным буфером (Wash Buffer). Каждый раз переворачивать панель и отделять содержимое, промокть 4-5 раз фильтровальной бумагой, чтобы полностью убрать всю жидкость.
4. Добавить по 50 мкл раствора 1X Biotinylated ANP Antibody в каждую лунку и инкубировать 2 часа.
5. Промыть панель, как сказано выше.
6. Добавлить по 50 мкл раствора 1X SP Conjugate (коньюгата) в каждую лунку и инкубировать 30 мин. Включить счетчик и настраить программу считывания.
7. Промыть панель, как сказано выше.

8. Добавить по 50 мкл раствора Chromogen Substrate в каждую лунку и инкубировать около 10 мин или до появления четкого голубого цвета. Аккуратно открыть панель, удалить пузырьки в лунках наконечником пипетки.

9. Добавить по 50 мкл Стоп Раствора в каждую лунку. Цвет изменяется с голубого на желтый.

10. Немедленно определить оптическую плотность на счетчике при длине волны 450 нм.

Чувствительность: минимальная определяемая доза ANP – 0,2 нг/мл.

Концентрацию ANP в миокарде предсердий определяли иммуноферментным способом при помощи тех же наборов. Для этого образцы быстро замораживали и хранили при температуре -70˚С. Перед исследованием навеску ткани экстрагировали в 0,1 М фосфатном буфере (pH 7.4), содержащем 1% Тритон X-100, и центрифугировали при 14 000 g 20 мин. Собирали супернатант и определяли концентрацию белка.

Концентрацию гормона выражали в нанограммах на миллиграмм белка.

Для проведения морфологического исследования отбирали ткань ушка правого предсердия. Фиксация проходила в растворе 2,5 %-ного глутарового альдегида и 2 %-ного параформа, затем в 1%-ном растворе OsO_4 и наконец образец заливали в смесь эпона с аралдитом. Полутонкие поперечные срезы (около 1 мкм), с правильной ориентацией кусочка ткани миокарда (для получения поперечных срезов клеток) окрашивали толуидиновым синим. Просматривали в микроскопе Axiostar plus (Carl Zeiss, Германия) при увеличении объектива ×40 и фотографировали камерой AxioCam ICc 3 (Carl Zeiss, Германия). Ультратонкие продольные срезы миокарда (около 50 нм) контрастировали уранилацетатом и цитратом свинца, просматривали в электронном микроскопе JEM-1400 (Jeol, Япония), фотографировали камерой Veleta 4 Mpxl (Olympus, Япония). Стереоморфометрию проводили в пакете iTEM 5.1 (Olympus, Япония).

На светооптическом уровне, с помощью открытой квадратной тестовой решетки с шагом 10 мкм определяли относительные объемы кардиомиоцитов, соединительной ткани и отдельно просветов капилляров в миокарде,

подсчитывали численную плотность капилляров на единицу площади среза и вычисляли паренхиматозно-стромальное соотношение.

Алгоритм ультраструктурного исследования продольных срезов миоэндокринных клеток следующий:

1. *Определение абсолютных размеров клеток*. На продольных срезах в зоне ядра измерить поперечные размеры миоцитов;
2. *Определение относительных долей основных органоидов.* Не менее чем на 15 случайных полях зрения каждого образца при увеличении 10000× с помощью квадратной тестовой решетки с шагом 1 мкм определить относительные объемы органоидов в цитоплазме кардиомиоцитов;
3. *Определение суммарного объема пластинчатых комплексов клетки.*
4. *Изучение качественного состава гранул с выделением зрелых, формирующихся, растворяющихся и атипичных форм.* На электронных микрофотографиях каждую гранулу относили к какой-либо из описанных категорий, определяли ее диаметр и подсчитывали общее количество гранул на той площади цитоплазмы миоэндокринной клетки, которая попала в срез. Это позволило определить не только процентный состав гранулярного пула в выборке, но и рассчитать показатели для каждого подтипа гранул – средний диаметр и количество на единицу площади цитоплазмы клеток.
5. *Статистическая обработка вариационных рядов.* Статистическую обработку вариационных рядов и проверку их на нормальность распределения проводили в пакете Statistica 6.0. Результаты представлены в виде средних значений и их ошибки M±m (для нормальных выборок) или в виде медианы, минимальных и максимальных значений Me, min-max (для ненормальных выборок). Достоверность различий с контролем определяли с помощью t -критерия Стьюдента и непараметрическим критерием знаков для $P < 0,05$.

ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

3.1. Сравнение изученных показателей у крыс линии WAG интактных и в эксперименте.

После 4-хдневного иммоилизационного стресса, когда животных ежедневно помещали в тесные клетки-пеналы на 20-25 мин, у нормотензивных крыс-самцов линии WAG зафиксировано непрямым способом на хвосте достоверное повышение АД в среднем по группе 22 мм рт. ст. или на 18 %. При этом масса тела за время эксперимента не изменилась. Между интактными крысами и однолинейными животными, подвергнутыми стрессу, разницы по абсолютной и относительной массе сердца (масса сердца / масса тела) не обнаружено.

За 4 дня эксперимента не выявлено сдвигов в изученных показателях крови: электролитном составе сыворотки (увеличение концентрации натрия и уменьшение калия не достигают порога достоверности в среднем по группе), содержание клеток белой и красной крови и тромбоцитов, концентрация гемоглобина и, соответственно, все расчетные показатели. Единственный показатель, который достоверно уменьшился за время эксперимента на 9%, гематокрит, что говорит о накоплении жидкости в сосудистом русле и увеличении объема циркулирующей крови.

На этом фоне особенно убедительно выглядит шестикратное уменьшение концентрации ANP в плазме крови после стресса. Этот показатель очень различался у отдельных животных и в интактной и в экспериментальной группе. Изменения биохимических показателей у всех животных в ходе эксперимента явно выражены, однонаправлены, и подтверждаются статистически (табл. 3.1, 3.2).

В рамках выбранного метода и поставленных задач, в миокарде предсердия определялась концентрация пептида, после его секреции из клетки, то есть находящегося в интерстиции и в крови капилляров. Как известно, в момент выхода про-гормона в интерстициальное пространство, при помощи соединения

Таблица 3.1.

Физиологические параметры у крыс линий WAG и НИСАГ, M±m

Параметр	WAG – интактные	WAG –стресс	НИСАГ-интактные	НИСАГ – стресс
Артериальное давление, мм рт. ст.	114±2,7	144±3,5#	161±0,8*	200±7,1#+
Масса тела, г	334±22	392±8,5	295±9,5	382±9,5#
Масса сердца, мг	974±61	1110±24	1025±47	1333±74#+
Масса сердца/масса тела, мг/г	2,93±0,10	2,83±0,02	3,47±0,07*	3,5±0,21+

различия значимы при $p \leq 0,05$: * - с WAG интактными (межлинейные различия); # - по сравнению с однолинейными интактными (внутрилинейная реакция на стресс); + - значимость различий с группой WAG-стресс.

Таблица 3.2.

Показатели крови у крыс линий WAG и НИСАГ, Me (min – max)

Параметр	WAG- интактные	WAG – стресс	НИСАГ-интактные	НИСАГ – стресс
Na, моль/л	140,8 (138,9 – 142,1)	142,6 (141,8 – 143,1)	141,5 (137,8 - 142,2)	145,0 (143,4 – 149,0) #
K, моль/л	5,95 (5,58 – 13,3)	5,7 (5,29 – 5,98)	6,95 (6,7 – 7,9)	5,07 (4,79 – 5,59) #
Лейкоциты, 10^3/мкл	3,45 (2,1 – 6,3)	5,65 (2,3 – 6,7)	4,7 (3,1 – 5,8)	3,7 (3,0 – 6,2) #
Эритроциты, 10^6/мкл	8,0 (7,4 – 9,1)	7,6 (6,9 – 7,9)	8,1 (7,1 – 8,4)	7,2 (6,8 – 7,8) #
Гемоглобин, г/100мл	13,9 (13,0 – 16,0)	13,7 (12,4 – 14,4)	14,1 (12,6 – 14,9)	13,1 (12,1 – 13,9)
Гематокрит, %	41,8 (38,5 – 49,3)	38,0 (35,6 – 40,5) #	42,6 (38,4 – 43,8)	39,4 (37,2 – 41,7)
Тромбоциты, 10^3/мкл	751 (336 – 935)	630 (591 – 677)	693 (414 – 825)	770 (568 – 876)
Концентрация ANP, нг/мл	1,53 (0,34 – 2,60)	0,24 (0,10 – 2,15)#	2,55 (1,11 – 4,30)*	0,42 (0,16 – 0,84)#

в скобках – число измерений, различия значимы при $p \leq 0,05$: * - с WAG интактными (межлинейные различия); # - по сравнению с однолинейными интактными (внутрилинейная реакция на стресс)

Таблица 3.3

Параметры миокарда правого предсердия у крыс линий WAG и НИСАГ, M±m

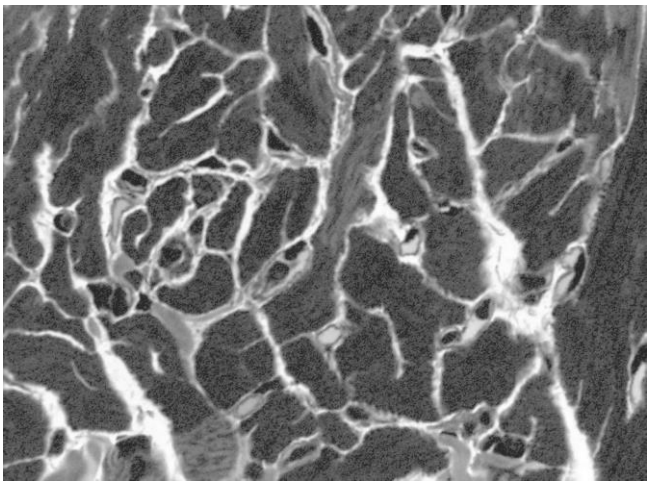
Параметр	WAG-интактные	WAG – стресс	НИСАГ-интактные	НИСАГ – стресс
Диаметр кардиомиоцитов, мкм	8,9±0,20 (100)	8,4±0,21 (100)	10,7±0,26* (100)	11,0±0,30 (100)
Относительный объем, %:	(60)	(60)	(60)	(60)
кардиомиоциты	82,2±0,55	68,7±0,77#	71,1±0,45*	65,3±0.58#
строма	17,8±0,55	31,3±0,77#	28,9±0,45*	34,7±0.58#
Суммарный просвет капилляров	5,1±0,19	6,9±0,20#	6,9±0,20*	6,0±0,18
Паренхима/строма	5,0±0,22	2,3±0,07#	2,5±0,05*	1,9±0,05#
Количество капилляров/0,1 мм^2	189±12,3	163±4,26	203±10,4	149±7,78#
Относительный объем органелл, %:	(60)	(60)	(59)	(60)
миофибриллы	54,7±0,47	50,4±0,44#	51,5±0,5*	49,2±0,47#
митохондрии	33,8±0,56	36,0±0,54#	34,4±0,42	32,8±0,60# +
гликоген	2,15±0,12	1,43±0,14#	1,17±0,12*	1,53±0,13#
комплекс Гольджи	0,82±0,10	1,22±0,15#	1,44±0,15*	1,48±0,12
секреторные гранулы	2,00±0,16	4,17±0,32#	5,95±0,49*	9,30±0,72#+
остаточные тельца	0,08±0,04	0,48±0,09#	0,22±0,06	0,82±0,12#+
другие органоиды	6,28±0,23	6,37±0,22	5,34±0,17*	4,8±0,17#+
Диаметр гранул всех типов, нм:	249±3,9 (333)	324±5,1# (291)	292±4,8* (341)	386±6,6# + (290)
зрелые	291±4,8 (160)	374±4,0# (181)	364±4,2* (161)	446±4,7 # + (196)
растворяющиеся	228±5,3 (110)	281±5,8# (66)	250±4,3* (129)	308±11,2# + (52)
формирующиеся	178±4,1 (63)	181±5,0 (44)	170±3,6 (51)	204±5,8# + (42)
Количество гранул на 1000 мкм^2	183±11 (60)	348±17# (60)	402±25* (59)	494±35# + (60)
Концентрация ANP, нг/мг (Me, min – max)	1062 (793 – 1493)	510 (272 – 942)#	940 (766 – 1273)	588 (529 – 645)#

в скобках – число морфометирческих измерений; различия значимы при $p \leq 0,05$: * - сравнение с интактнымикрысами WAG (межлинейные различия); # - по сравнению с однолинейными интактными (внутрилинейная реакция на стресс); + - значимость различий с группой WAG-стресс.

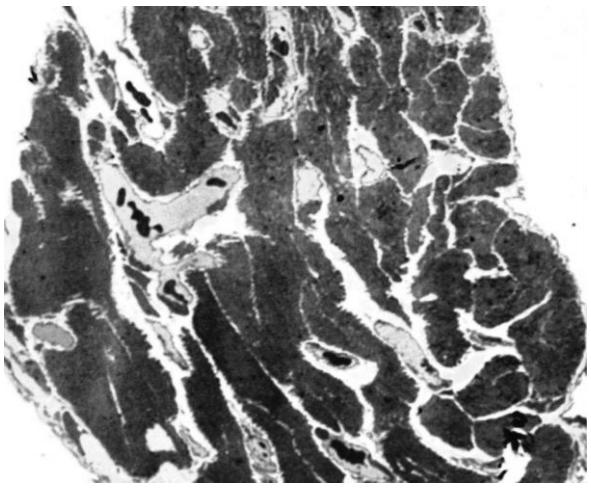
«Корин» (см. главу 1), происходит отщепление N-терминального конца молекулы и пептид «дозревает» до собственно ANP.

Определение концентрации уже зрелого пептида в миокарде предсердия показало двукратное её уменьшение. Следовательно, снижение пептидов в периферической крови при стрессе отражает уменьшение его выделения из миокарда, а не усиленную деградацию и элиминацию.

Для оценки функционального состояния и секреторной активности миоэндокринных клеток было проведено морфологическое исследование миокарда. Как показали морфометрические измерения, проведенные на светооптическом уровне на поперечных полутонких срезах миокарда ушка правого предсердия (см. главу 2), в условиях стресса изученные тканевые структуры претерпевали значительные изменения, отражающие нарушения водно-электролитного баланса с выраженным интерстициальным отеком (рис. 3.1).



А



Б

Рисунок 3.1. Миокард правого предсердия у крыс линии WAG. А – интактные, Б - полнокровие сосудов и отек интерстиция в условиях стресса.
Полутонкие срезы, толуидиновый синий. Микрофотография. Ув. ×40.

Как следует из табл. 3.3, относительный объем кардиомиоцитов уменьшался к концу эксперимента на 18 % за счет резкого расширения соединительнотканного межуточного пространства, что приводит к уменьшению

паренхиматозно-стромального соотношения в миокарде почти вдвое. Отек интерстиция способствует расхождению капилляров, к тому же просветы их максимально расширены и зияют. Плотность капилляров снизилась всего на 14 %, при этом объемная доля их просветов увеличилась существенно больше – на 35 %. Удельная площадь просвета единичного капилляра (0,042 %) оказалась на 60 % больше, чем у нестрессированных крыс. При этом средний размер мышечных клеток в ходе эксперимента не менялся, что говорит об отсутствии внутриклеточного отека.

Миоэндокринные клетки предсердий (рис. 3.2) – это типичные вытянутые кардиомиоциты с центрально расположенным овальным ядром и хорошо развитыми межклеточными контактами, как боковыми, так и вставочными дисками. У крыс линии WAG их поперечный диаметр, измеренный в зоне ядра, составляет в среднем около 9 мкм, что принципиально меньше. Пучки миофибрилл, которые занимают около половины объема саркоплазмы, располагаются вдоль длинной оси клетки под сарколеммой, оставляя около полюсов ядра достаточно обширное пространство, заполненное крупными митохондриями, пластинчатыми комплексами, секреторными гранулами, между которыми встречаются мембранные структуры, лизосомы, рибосомы, гликоген и редко – центриоли. Суммарный объем пластинчатых комплексов и секреторных гранул в кардиомиоците – важная характеристика эндокринной активности. Степень развития пластинчатого комплекса и количество секреторных гранул очень варьируют даже в соседних клетках одного образца.

Под действием стресса у крыс линии WAG наблюдались значительные изменения в морфологии органелл миоэндокринных клеток (рис. 3.3). Объемное отношение митохондрий к миофибриллам в условиях стресса увеличивалось с 0,62 до 0,71, однако, это не свидетельствует об улучшении энергообеспеченности сократительных структур. Как показывают наблюдения, митохондрии в условиях эксперимента набухали, матрикс их просветлялся, в нем повсеместно обнаруживались электронно-плотные отложения фосфатов кальция. Это

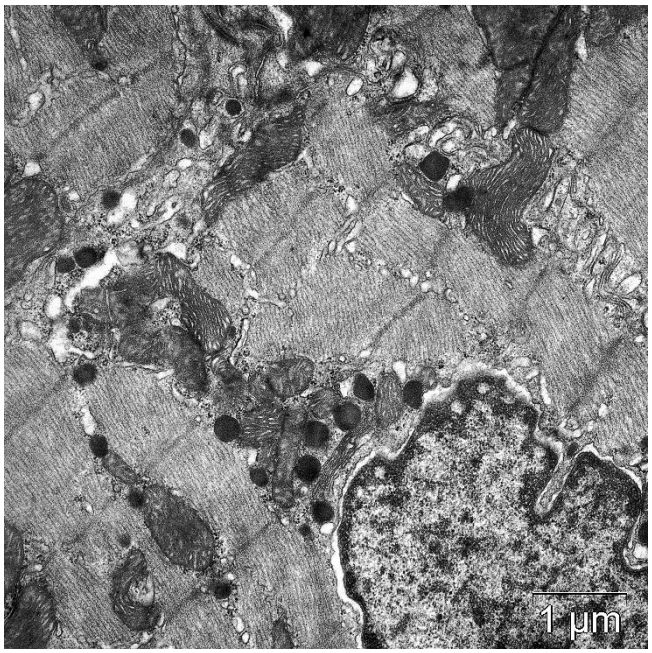


Рисунок 3.2. Ультраструктура миоэндокринной клетки правого предсердия у интактной крысы WAG. Электронограмма.

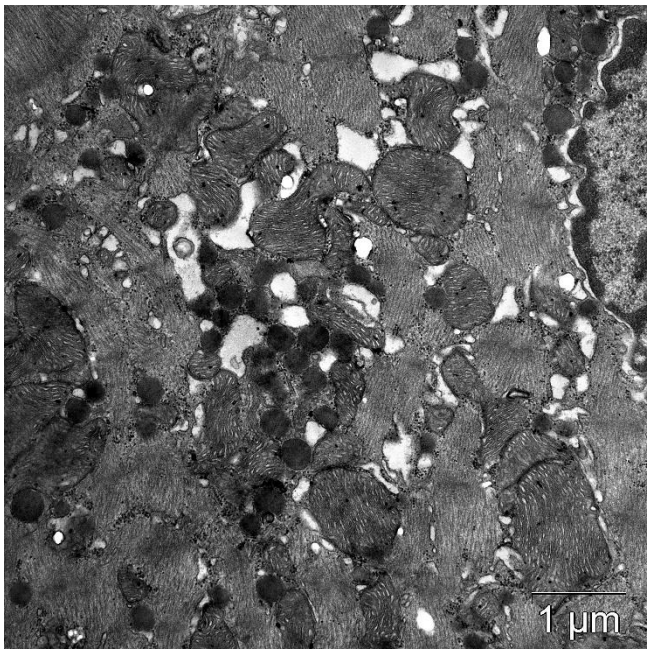


Рисунок 3.3. Накопление секреторных гранул, расширение саркоплазматической сети в околоядерном пространстве миоэндокринной клетки правого предсердия у крысы WAG при стрессе. Электронограмма.

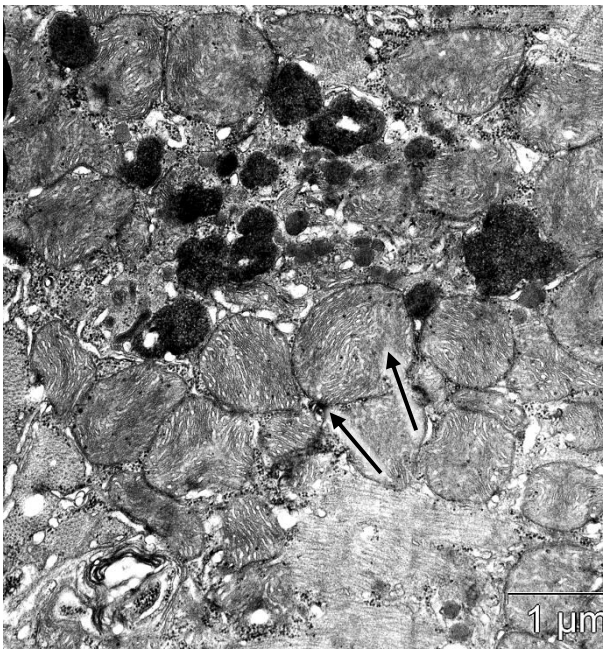


Рисунок 3.4. Внутриклеточная утилизация секреторных гранул по типу кринофагии и отложения фосфатов кальция в митохондриях (стрелки) миоэндокринных клеток правого предсердия у крыс WAG при стрессе. Электронограмма.

классический признак кальциевой перегрузки органоидов и нарушения его обмена в клетках. Об этом свидетельствует и расширение просветов саркоплазматической сети, которые при стереоморфометрии подсчитывались в категории «другие органоиды». Секреторные структуры миоэндокринных клеток при стрессе у крыс WAG претерпевали выраженные изменения, заметные даже при поверхностном взгляде на электронные фотографии. Здесь наблюдалось значительное накопление секреторных гранул в саркоплазме. Подсчеты показали: более чем двукратное увеличение относительного объема секреторных гранул объясняется почти двукратным увеличением их численной плотности при увеличении среднего диаметра каждой гранулы почти на треть. Если у интактных животных WAG фагосомы не занимают в саркоплазме и десятой доли процента, то после стресса число и размеры деградирующих гранул увеличиваются многократно (объемная доля - до половины процента) (рис. 3.4, табл. 3.3).

Количественный анализ пула секреторных гранул в миоэндокринных клетках у крыс WAG интактной и экспериментальной группы показал преобладание *зрелых* форм: 48% от всего пула у интактных животных и 60% у животных со стрессом. 33% составляли *растворяющиеся* формы гранул у интактных и 26% - у стрессированных. Меньше всего было *формирующихся* разновидностей: 19% и 14%. (таб. 3.3). Сравнивая эти показатели нельзя было не отметить, как менялся качественный состав гранул. После стресса снизились показатели растворяющихся и формирующихся форм и повысилось число зрелых. Диаметр гранул на фоне стресса увеличился во всех разновидностях: зрелые на 22%, растворяющиеся на 19%, формирующиеся на 2% (табл. 3.3).

В условиях субхронического иммобилизационного стресса выделение ANP из миоэндокринных клеток предсердий в кровоток тормозится в большей степени, чем их синтез. В этих условиях пептиды накапливаются в саркоплазме кардиомиоцитов внутри многочисленных крупных секреторных гранул.

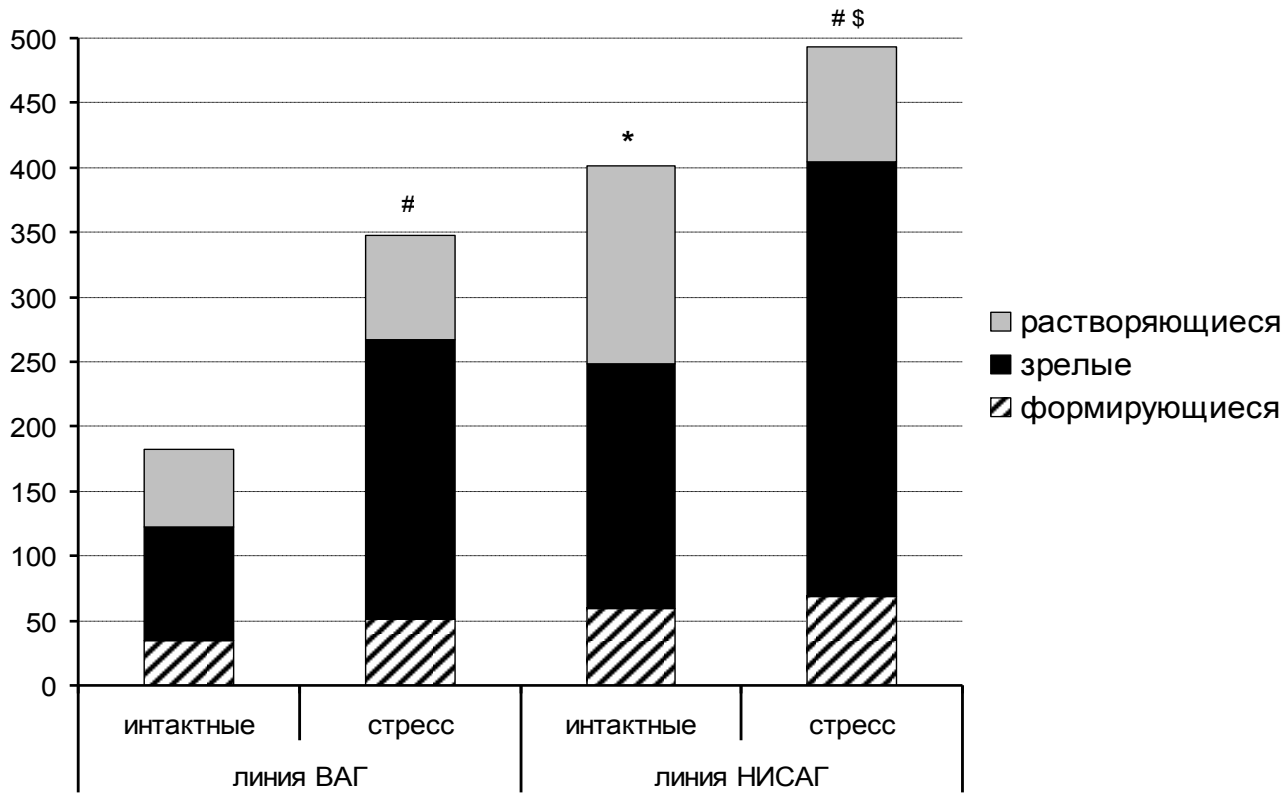


Рисунок 3.5. Численная плотность (на 1000 мкм^2) и состав секреторных гранул в миоэндокринных клетках правого предсердия у крыс линий WAG и НИСАГ в эксперименте. Различия значимы при $p \leq 0,05$: * - с WAG интактными (межлинейные различия); # - по сравнению с однолинейными интактными (внутрилинейная реакция на стресс); + - значимость различий с группой WAG-стресс.

3.2. Сравнение изученных показателей интактных (контрольных) крыс линии WAG и интактных крыс линии НИСАГ.

При анализе показателей крови (табл. 3.2) выяснилось, что у интактных животных межлинейные различия в биохимических показателях отсутствовали почти по всем изученным параметрам.

Однако концентрация ANP в периферической крови, у крыс НИСАГ оказалась на 70% больше, чем у нормотензивного контроля (табл. 3.2). Не выявлено различий и в уровне гормона в ткани миокарда обеих линий (табл. 3.3).

Полученные данные нашли свое объяснение в результатах гистологического и ультраструктурного исследования миокарда правого предсердия.

Морфометрическое исследование полутонких срезов ушка правого предсердия выявило особенности строения миокарда у крыс НИСАГ (рис. 3.6). Измерение диаметра миоэндокринных клеток показало, что у интактных гипертензивных крыс клетки достоверно крупнее: их средний диаметр в зоне ядра увеличен на 20 % по сравнению с нормотензивным контролем.

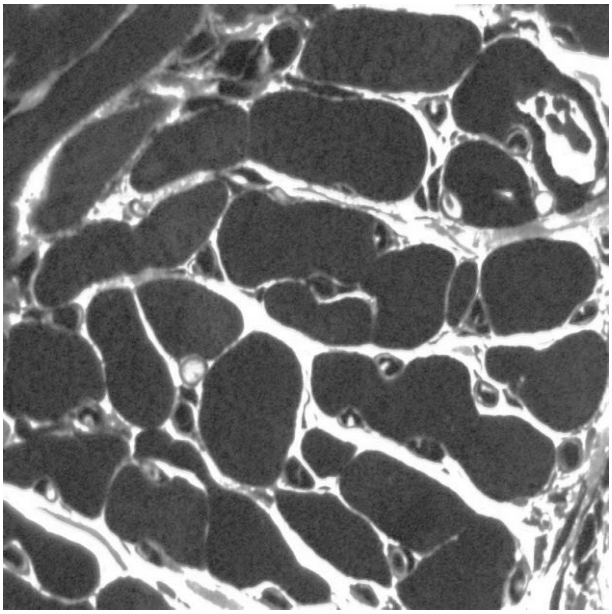


Рисунок 3.6 Миокард правого предсердия у крыс линии НИСАГ. Гипертрофия миоцитов, кардиосклероз у интактных крыс. Полутонкие срезы, толуидиновый синий. Микрофотография. Ув. × 40.

Строма миокарда у крыс НИСАГ была отечной, и морфометрия показала, что паренхиматозно-стромальные отношения уменьшились вдвое по сравнению с аналогичным показателем у крыс линии WAG (табл. 3.3). На фоне выраженного отёка относительный объем кардиомиоцитов к интерстицию в ткани правого предсердия уменьшен на 15,5 % и плотность капилляров на единицу площади ткани снижена на 16 % за счет разрастания соединительнотканных структур. При этом число капилляров, приходящихся на единицу объема мышечных клеток в правом предсердии обеих линий одинаковое.

В этих условиях кровоснабжение гипертрофированных миоэндокринных клеток у крыс НИСАГ обеспечено компенсаторным расширением капиллярного русла. Расчеты показывают, что относительная площадь просвета единичного капилляра у интактных крыс НИСАГ в 1,6 раза больше, чем у интактных крыс WAG (0,042% и 0,026%, соответственно). Их профили на поперечных срезах округлены и расширены, эндотелий и его базальная мембрана утолщены, контуры эндотелиоцитов в просветах сглажены. У крыс линии WAG поперечные профили капилляров и очертания эндотелиоцитов в них были более разнообразными. Можно заключить, что у крыс НИСАГ в миокарде правого предсердия имеется целый комплекс структурных изменений, который отражает длительную адаптацию к генетически запрограммированным изменениям гемодинамики и к повышенной стресс-чувствительности - структурный след адаптации.

Исследование на ультраструктурном уровне показало, что у интактных крыс обоих линий объемные соотношения основных структур - миофибрилл и митохондрий - практически не различаются, но митохондрии у гипертензивных животных крупнее и содержат больше крист (табл. 3.3).

У интактных крыс НИСАГ секреторные органеллы занимали в саркоплазме миоэндокринных клеток достоверно большие относительные объемы, (рис. 3.5): комплексы Гольджи – в 1,75 раза, гранулы и фагосомы – почти в 3 раза, их средний диаметр увеличился на 20%, то есть эти структуры были значительно крупнее, чем у интактных крыс WAG (табл. 3.3, рис.3.7).

Следует отметить, что у крыс НИСАГ электронно-микроскопическая

морфология гранул более разнообразная, чем у контрольных животных (рис. 3.8). Чаще встречаются различные атипичные их разновидности, отражающие разные пути и/или стадии внутриклеточной деградации накопленного секреторного продукта. В некоторых клетках преобладают гранулы с фрагментарным растворением (исчезновением) элетронно-плотной сердцевины, что придает гранулам неправильные и причудливые очертания. В части клеток наблюдается равномерное снижение электронной плотности сердцевины гранул с исчезновением подмембранного ободка при сохранении целостности

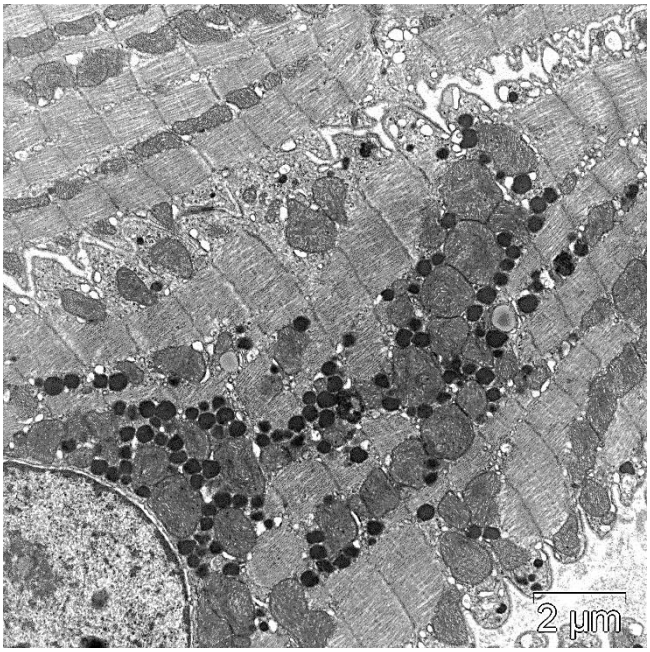


Рисунок 3.7. Гипертрофированная миоэндокринная клетка правого предсердия крысы НИСАГ с многочисленные секреторными гранулами. Электронограмма.

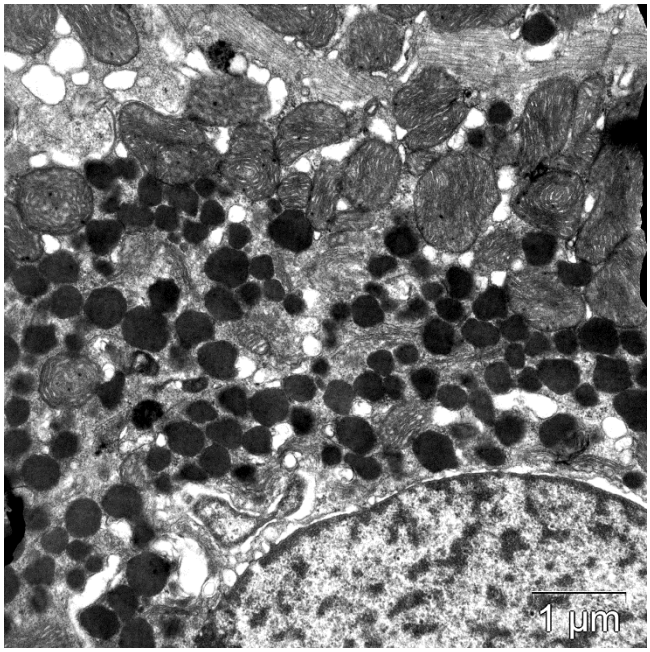


Рисунок 3.8. Многочисленные секреторные гранулы разнообразной формы и крупные митохондрии с кольцеобразными кристами в околоядерном пространстве миоэндокринной клетки правого предсердия у интактной крысы НИСАГ.

окружающей мембраны. Около 2,5 % составляют структуры, условно названные «рудиментарными». Это мелкие (менее 200 нм в диаметре) тельца без ограничительной мембраны с очень уплотненным негомогенным содержимым неопределенной формы, напоминающие по ультраструктуре миелиноподобные

тельца. Особенно много миелиноподобных телец в цитоплазме кардиомиоцитов обнаружено около или в составе крупных гранулярных скоплений. Среди гранул встречаются крупные (около и более 500 нм в диаметре) «остаточные тельца», напоминающие фагосомы. По электронным микрофотографиям можно воссоздать этапы кринофагии: сердцевина гранул претерпевает мелкозернистое перерождение, они сливаются в конгломераты, содержимое которых в центре постепенно уплотняется и гомогенизируется, а по периферии различаются контуры слившихся гранул (рис. 3.9).

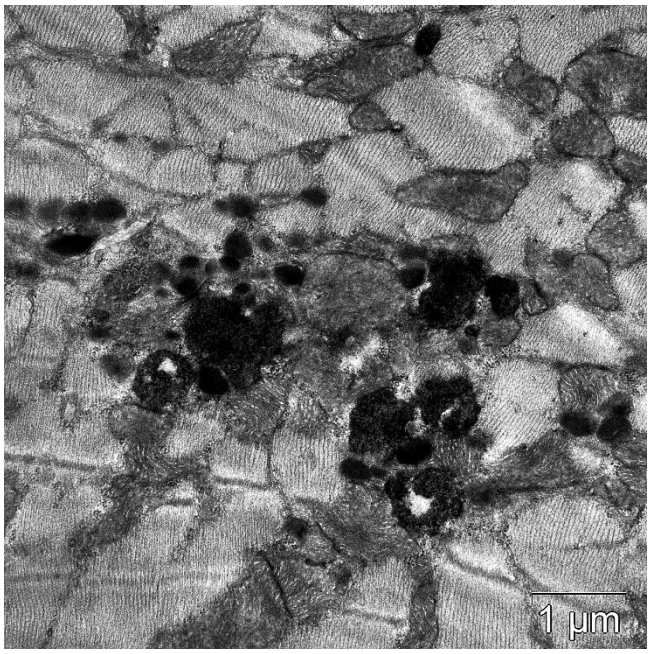


Рисунок 3.9. Активная кринофагия и накопление остаточных телец в саркоплазме миоэндокринной клетки правого предсердия у крысы НИСАГ.

Несмотря на то, что численная плотность секреторных гранул в кардиомиоцитах правого предсердия в покое у крыс НИСАГ в два раза больше, чем у крыс WAG, состав гранул по соотношению разных типов оказался вполне сопоставимым. У животных обеих изученных линий в клетках преобладали зрелые формы (47-48 %), более трети (33-38 %) составляли растворяющиеся и меньше всего (15-19 %) было формирующихся разновидностей (рис. 3.5).

Таким образом, у крыс линии НИСАГ с наследственной гиперчувствительностью к стрессу и стойкой гипертензией в

гипертрофированных миоэндокринных клетках предсердия в покое синтез, накопление и секреция гормонов пропорционально усилены, что обеспечивает повышенное содержание гормона в периферической крови по сравнению с контрольными крысами линии WAG.

3.3. Сравнение изученных показателей интактных крыс линии НИСАГ и в эксперименте.

После 4-дневного иммобилизационного стресса, у крыс НИСАГ в эксперименте зафиксировано достоверное повышение АД по сравнению с интактными. Средний показатель по группе поднялся до 200 мм рт. ст., а у отдельных особей - до 210 и даже 220 мм рт. ст. (табл. 3.1). Разница с интактными составила 24%. Показатели массы тела и сердца достоверно увеличились на 30%, но относительная масса сердца не изменилась, и межлинейные различия сохранились (табл. 3.1, рис. 3.10).

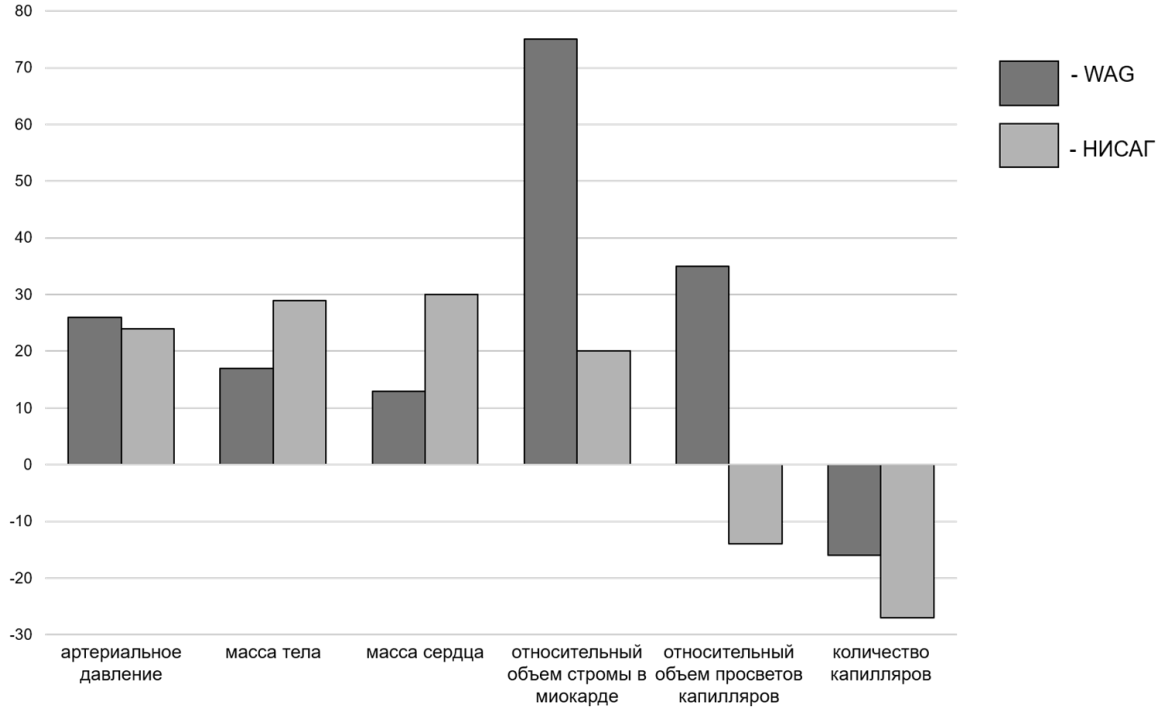


Рисунок 3.10. Изменения параметров (%) миокарда у крыс линий WAG и НИСАГ при стрессе (0 – базовый дострессовый уровень).

У крыс НИСАГ в эксперименте достоверно повышалась концентрация ионов натрия и значительно (на 21%) уменьшалась концентрация калия в сыворотке

крови, на 11 и 12% уменьшалось содержание клеток красной и белой крови (табл. 3.2).

Содержание ANP в плазме крови в условиях стресса изменялось одинаково у обеих изученных линий крыс – оно снижалось приблизительно в 6 раз. Параллельно почти на 40% снижалась концентрация пептида в миокарде (табл. 3.1, 3.2).

Гистологическое исследование миокарда ушка правого предсердия (табл.3.3, рис. 3.11) показало однонаправленные изменения тканевой структуры при стрессе у обеих линий крыс. Умеренный иммобилизационный стресс в течение четырех дней не оказал влияния на размеры клеток, но паренхиматозноо-стромальные соотношения резко уменьшились за счет отека стромы. Удельный объем стромы увеличивался на 17 %, а паренхиматозно-стромальное соотношение снижалось на 31 %.

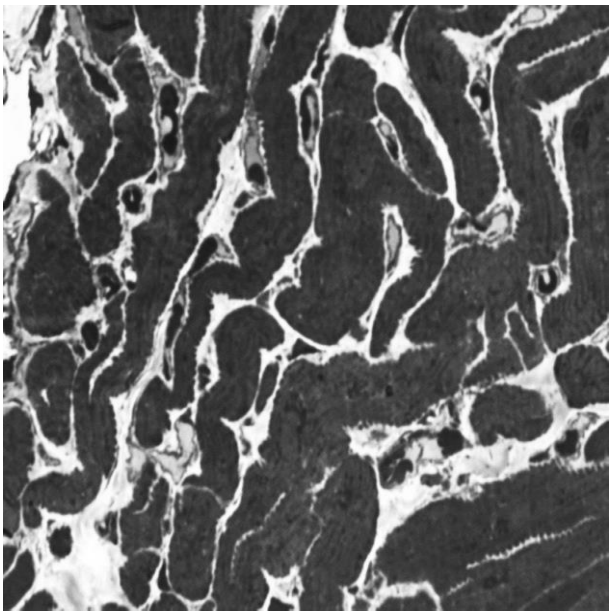


Рисунок 3.11 Миокард правого предсердия у крыс линии НИСАГ. Умеренное полнокровие сосудов и отек интерстиция в условиях стресса. Полутонкие срезы, толуидиновый синий. Микрофотография. Ув. × 40.

У крыс НИСАГ после стресса плотность капилляров в ткани уменьшилась на треть (36%), а суммарный относительный объем их просветов и удельная площадь

просвета единичного капилляра (0,040 %) при этом не изменились.

У крыс НИСАГ на фоне хронических структурных изменений, связанных с наследственной повышенной стресс-чувствительностью и гипертензией, реакция на субхронический иммобилизационный стресс со стороны основных клеточных органоидов была выражена значительно слабее, чем у нормотензивных животных. Соотношение митохондрий и миофибрилл не изменялось, количество гликогена не уменьшалось, митохондрии не набухали, отложения фосфатов кальция в их матриксе практически отсутствовали (рис. 3.12, 3.13). Структуры, задействованные в секреторном процессе, тоже затрагивались при стрессе слабее, чем у крыс WAG: объем комплексов Гольджи не менялся, численная плотность гранул возрастала всего на четверть при увеличении их среднего диаметра на треть (табл. 3.3).

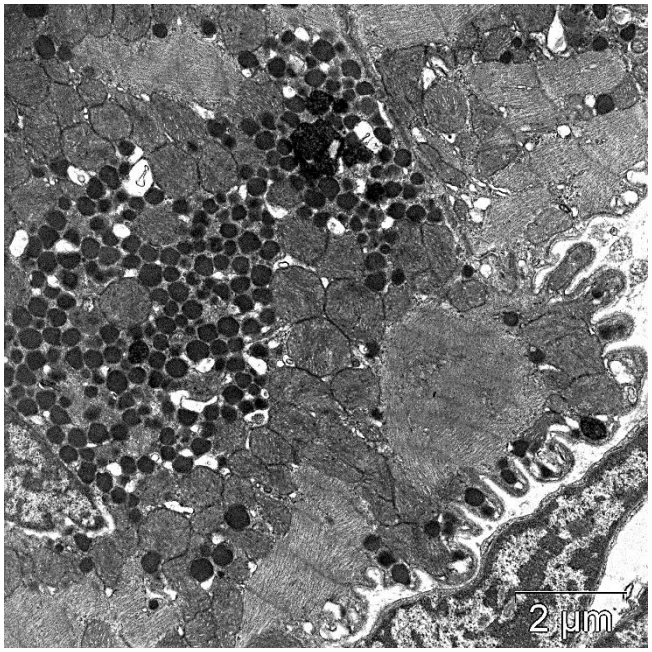


Рисунок 3.12. Накопление многочисленных крупных секреторных гранул в миоэндокринной клетке правого предсердия у крысы НИСАГ при стрессе. Электронограмма.

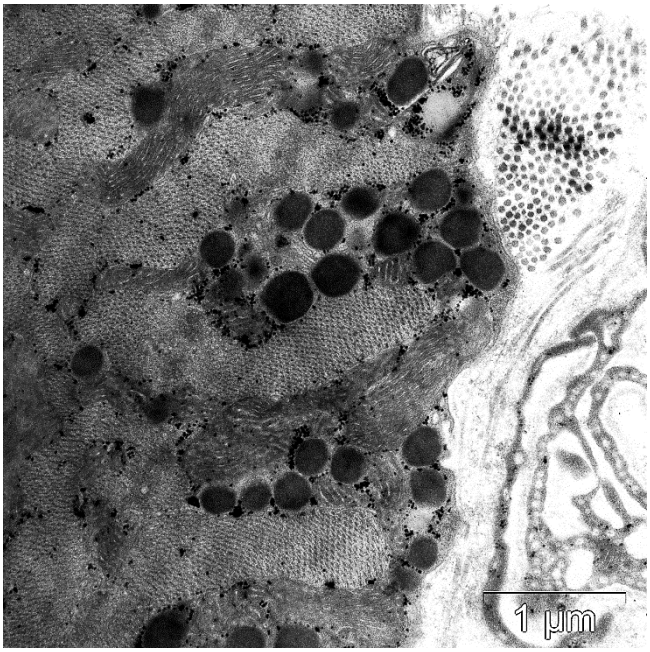


Рисунок 3.13. Скопление зрелых секреторных гранул на периферии миоэндокринной клетки правого предсердия у крысы НИСАГ при стрессе.

Реакция на стресс со стороны секреторного пула показала, что на фоне накопления гранул в саркоплазме и увеличения их размеров происходило перераспределение качественного состава в пользу зрелых форм за счет уменьшения растворяющихся форм на 20 %. В условиях стресса зрелые формы гранул составляли почти 70 % всего гранулярного пула (рис.3.5).

Таким образом, у гипертензивных крыс линии НИСАГ при стрессе на фоне более высокой концентрации ANP в крови и в миоэндокринных клетках реактивность этой системы (торможение выделения секрета и накопления гранул в саркоплазме) выражена слабее, чем у нормотензивных животных. Можно заключить, что при однонаправленной реакции степень изменения гормональной активности клеток при стрессе определяется их исходным структурным и функциональным состоянием.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИ ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ

Натрийуретические пептиды филогенетически появились очень давно. О существовании их в организме ученые стали догадываться только в середине прошлого столетия. На 80е годы приходится период активного изучения и накопление базовых знаний об этих соединениях.

Оказалось, что пептиды данного класса обнаружены у всех видов млекопитающих и большинства позвоночных. Особенно выражены у проходных рыб, совершающих миграции из пресных водоемов в соленые и наоборот. В онтогенезе натрийуретические пептиды появляются очень рано и начинают полноценное функционирование еще задолго до рождения.

В настоящий момент науке известно целое семейство натрийуретических пептидов физиологические эффекты, которых точно определены в их названии. Активно изучаются следующие типы пептидов: два обнаруженные в миокарде (ANP и BNP), один в ткани мозга (CNP), один тип в канальцах почек (уродилатин).

Натрийуретические пептиды вырабатываются локально в определенных органах и тканях, однако они способны обеспечивать регуляцию отдалённых органов и организма в целом, поэтому их можно назвать гормонами.

Секреция натрийуретических пептидов осуществляется в клетках тканей многих органов. Рецепторы к ним обнаружены почти во всех тканях. Особенно много рецепторов в лёгких и почках, т.е. органах которые способствуют наиболее интенсивному выведению излишков воды из организма. В кровеносном русле рецепторы обнаружены в эндотелии сосудов, здесь пептиды способствуют расслаблению гладкой мускулатуры, что приводит к понижению системного артериального давления.

Наибольший интерес в медицинской практике возникает при изучении *сердечных* натрийуретических пептидов, так как по своему воздействию соединения этого класса являются в тысячу раз более эффективными при лечении гипертонической болезни и отёков тканей по сравнению с известными аналогами

синтетических и натуральных препаратов. Однако недостаточность знаний и опыта заставляет применять известные препараты с большой осторожностью, так как возникают нежелательные побочные эффекты в виде развития почечной недостаточности и др. В настоящий момент медицина наиболее часто использует натрийуретический пептид В-типа, но только в прогностических целях. Его концентрация в периферической крови значительно повышается при тяжёлой сердечной недостаточности.

Изучение сердечных натрийуретических пептидов сталкивается с некоторыми трудностями. Во-первых, период продолжительности жизни у них очень разный – от 2,5 мин у ANP до получаса у BNP. Во-вторых, концентрация ANP в крови в норме очень мала - 3-6 пмоль/л (Максимов, 2006) и 1,4-14,5 пмоль/л (Rademaker, 2005). Столь неоднозначные показания разных авторов о концентрации гормона в крови существуют, в том числе, и из-за сложных путей их метаболического распада (Clerico, 2000).

Науке известно, что в секреторных гранулах предсердных кардиомиоцитов, хранится про-атриальный натрийуретический пептид и становится он зрелым только при выходе из клеток предсердия, каким образом это происходит известно лишь теоретически. На ультраструктурном уровне, при помощи электронного микроскопа, путём просмотра множества удачных снимков, частично можно визуализировать этот процесс, такой способ достаточно трудоемкий, хотя и наиболее информативный. Биохимические, гистохимические и иммуноферментные методы являются дорогостоящими.

Данная работа посвящена изучению физиологических свойств *атриального* натрийуретического пептида, его основное место синтеза и секреции отражается в названии – это ушко правого предсердия (atrium). Методы, которыми представляется возможность изучать воздействие ANP на живой организм весьма ограничены. Мы не можем взять у живого человека кусочек ткани миокарда и проводить необходимые манипуляции на ультраструктурном уровне или при помощи биохимических методик. Иммуноферментные способы недостаточно информативны с связи с непродолжительным периодом полураспада зрелого

пептида. Подсчеты концентрации в крови исходя из стехиометрических пропорций с какой-то более долгоживущей его частью сильно разнятся в показаниях и поэтому их сложно назвать достоверно информативными.

Остаются только животные. Наиболее доступными и удобными являются грызуны – мыши, крысы, кролики. К тому же существуют линии крыс специально селектированные по гипертоническому признаку, например, такие как НИСАГ.

Наиболее частый вопрос, который возникал, когда речь шла о локализации участков эндокринных клеток, синтезирующих атриальный натирйуретический пептид – «почему именно здесь?». Каким образом сердце связано с натрийурезом? Вероятно, отвечая на этот вопрос, можно будет на гипотетическом уровне обнаружить еще один физиологический эффект в этом семействе пептидов, наиболее важный, чем те что отражены в их названии – это антигиперволемия.

Правое предсердие – это то место в организме, которое воспринимает весь объем крови, поступающей из нижней и верхней полой вене. Здесь же, в клетках миокарда располагаются механические барорецепторы, улавливающие изменение в давлении и, следовательно, силе растяжения кардиомиоцитов. Причины повышенного потока крови к правому предсердию следующие: гиперволемия, сердечная недостаточность, аритмия, легочная гипертензия, инфаркт миокарда, нарушение деятельности правого желудочка.

Механизм, объясняющий каким образом сигнал поступает в клетку и как начинается секреция пептида в ответ на него, до конца не изучен. В природе нет ничего лишнего или случайного. Из правого предсердия кровь с секретируемым и дозревшим гормоном попадает в круг малого кровообращения. Известно, что лёгкие, после почек, это одни из тех органов, через которые происходит выделение воды из организма.

Многие авторы указывают, что ANP значительно сильнее подавляет секрецию альдостерона (). Это происходит через угнетение АПФ который способствует превращению ангиотензина I в ангиотензин II. АПФ в норме синтезируется только тканью лёгких. Такое обстоятельство хорошо объясняет

почему клетки, вырабатывающие ANP распологаются в правом предсердии.

Так же показано, что BNP в значительно большей степени, чем ANP, стимулирует клубочковую фильтрацию и секрецию натрия при сердечной недостаточности (). ANP, чтобы достичь почек необходимо проделать более длинный путь - от правого предсердия через лёгкие в почки. как указывалось выше период полураспада у него, хоть и достаточный, однако на много короче, чем у BNP.

В работе крысы НИСАГ рассматривались как модель поведения при эмоциональном стрессе в стадии резистентности. Во взрослом состоянии у них отмечается усиленная активность регуляторных гуморальных систем (адренокортикальной и симпатоадреналовой) отсюда повышенный уровень гормонов АКТГ и альдостерона, а на ультраструктурном уровне гипертрофия слоев надпочечников, повышение секреторной активности и гиперплазия клеток гипофиза (Якобсон, 2000; Шмерлинг, 2005; Бузуева, 2011).

В крови базальный уровень атриального натрийуретического пептида в условиях покоя у крыс НИСАГ значительно отличается от такового у крыс WAG (таб. 3.3). Стрессирующие воздействия во много раз понижают концентрацию в сравнении с интактными животными обеих линий. В этом показателе сопоставлять межлинейные различия в условиях стресса было бы не корректно, т.к. не известны механизмы влияния гормона на организм в покое. Особенно это касается гипертензивных крыс, у которых повышенный уровень пептида не способствует снижению АД. К тому же в покое измерения концентрации активной формы пептида в миокарде предсердий не выявили межлинейных различий. Замечено, что прирост концентрации в крови одного из пептидов приводит к приросту концентрации другого вследствие пресыщения общего клиренс-рецепторного механизма (Hunt, 1996). Вероятно, базальный уровень концентрации ANP у крыс НИСАГ связан с присутствием в крови и перенасыщением рецепторного комплекса другим натрийуретическим пептидом – BNP, который в данной работе не изучался.

Интересными оказались результаты гистологического и ультраструктурного

исследования кардиомиоцитов у крыс как в норме при межлинейном сравнении, так при стрессе по сравнению с базальным уровнем одной линии.

Кардиомиоциты у гипертензивных крыс значительно крупнее чем у нормотензивных, это ответная реакция на постоянно увеличенную нагрузку. К тому же строма миокарда отёчна, клетки расположены более рыхло, а просвет капилляров увеличен. После стресса резко уменьшаются паренхиматозно-стромальные соотношения и, при увеличении массы сердца у крыс обеих линий, относительная масса сердца к массе тела остается без значительных изменений.

Ультраструктурные наблюдения подтвердили увеличенную нагрузку на миокард. В отдельных клетках обнаружены зоны пересокращения миофибрилл. В ядре меньше гетерохроматина, ядрышки крупнее, а пор в оболочке больше, чем у нормотензивного контроля (Максимов, 2004). В большинстве миоцитов выявлено расширение цистерн саркоплазматического ретикулума. Комплекс Гольджи хорошо развит. Выражена гиперплазия и гипертрофия его компонентов, которые располагались не только около ядра, но и на периферии клеток. Наблюдается расхождение вставочных дисков.

Секреторная активность миоэндокринных клеток предсердий гипертензивных крыс отражает результат повышенного содержания гормона в крови по сравнению с нормотензивными животными. В клетках обнаружено больше специфических гранул количество и размеры диаметра, которых увеличены. Соотношение разных типов гранул свидетельствует о достаточно сбалансированном процессе синтеза, накопления и выделения пептидов.

Используя комплексный подход для изучения эндокринной функции сердца, в разные годы было показано (Коростышевская, 2013; Максимов, 2013, 2014), что ультраструктурные особенности миоэндокринных клеток предсердия у крыс линий WAG и НИСАГ и их секреторного аппарата адекватно отражают эндокринную активность сердца при разных функциональных состояниях организма:

- на всех этапах онтогенеза у гипертензивных крыс НИСАГ в миоэндокринных клетках численная плотность гранул выше и качественный

состав их более разнообразный, чем у нормотензивного контроля;

- начиная с 18 суток у эмбрионов на фоне незавершенного морфогенеза предсердий в миоэндокринных клетках активно формируются, накапливаются и растворяются секреторные гранулы, содержащие натрийуретические пептиды;
- морфологические признаки гиперсекреции натрийуретических пептидов, выявленные у 12- и 21-дневных крысят линии НИСАГ, предшествуют генетически запрограммированному повышению артериального давления, которое регистрируется на 2-м месяце жизни;
- у взрослых 6-месячных и старых крыс НИСАГ на фоне высокого артериального давления гипертрофические и дегенеративные изменения миоцитов сопровождаются избыточным накоплением крупных секреторных гранул, часть которых подвергается внутриклеточной деградации;
- стабильное медикаментозное снижение АД у взрослых гипертензивных крыс НИСАГ сопровождается торможением синтеза и усилением внутриклеточного разрушения запасов секреторного продукта в миоэндокринных клетках;

Секреторная гиперактивность сердца у взрослых крыс линии НИСАГ может рассматриваться как пример долговременной адаптации и формирования системного структурного следа, обеспечивающего увеличение секреторной активности клеток. Стимулом к этим перестройкам является, в первую очередь, генетически закрепленная гиперчувствительность к стрессу. Было показано, что наибольшая разница структурных показателей предсердных миоцитов крыс линии НИСАГ с контролем наблюдается на самых ранних этапах онтогенеза (у эмбрионов и крысят первого месяца жизни), когда гипертензия еще не проявляется. В противоположность этому, повышенная стресс-чувствительность опосредуется не только генетически закрепленными механизмами, но и влиянием гормонального фона беременных и кормящих самок на физиологический статус потомства. Это принципиально отличает миоэндокринные клетки предсердий от сократительного миокарда левого желудочка, признаки гипертрофии и все остальные изменения в котором появляются только на втором месяце жизни,

когда генетически закрепленная гиперчувствительность к стрессу проявляется в стойком повышении давления. В более раннем возрасте (на 21-й день жизни) при еще нормальном давлении большинство показателей или не отличаются, или отстают от одновозрастного контроля (Шмерлинг, 1997). Это говорит о том, что структурные изменения миокарда левого желудочка у взрослых крыс являются ответной компенсаторной реакцией на гемодинамические нарушения, вызванные повышением периферического сопротивления, а изменения миоцитов предсердий – предшествуют им и принимают участие в их реализации.

В предварительных опытах (Максимов, 2014), в которых у крыс НИСАГ длительное стабильное снижение АД после введения фармпрепарата группы сартанов (блокатор ангиотензиновых рецепторов лозартан) сопровождалось резким торможением секреторной активности миоэндокринных клеток предсердий: в них было мало гранул, они были мелкие, формирующиеся гранулы отсутствовали, а зрелые подвергались внутриклеточной деструкции, т.е. тормозились все этапы процесса: синтез, накопление и секрецмя продукта. Соответственно, в условиях рестрикционного стресса, который сопровождается повышением АД как у нормотензивных, так и у гипертензивных животных, мы надеялись получить активацию системы натрийуретических пептидов сердца. Однако результат оказался неожиданным – противоположным ожидаемому – концентрация ANP в периферической крови снижалась в 6 раз у обеих исследованных линий крыс. Выяснение роли гипотензивных натрийуретических пептидов сердца в гормональном ансамбле, реализующем стресс-реакции, является ключевой идеей настоящего исследования.

В эксперименте крыс подвергали умеренному стрессовому воздействию для попадания в фазу тревоги, которая обеспечивает срочный этап адаптации на основе готовых, ранее сформировавшихся физиологических механизмов. Она развивается до формирования системного следа в виде структурных перестроек, обеспечивающих долговременную адаптацию (Меерсон, 1988).

У нормо- и гипертензивных крыс реакции на неблагоприятное воздействие со стороны гемодинамики и водно-солевого баланса оказались

однонаправленными – масса тела увеличивалась, АД возрастало, концентрация ионов натрия в крови увеличивалась, а калия – уменьшалась, снижались показатели красной крови, в миокарде правого предсердия наблюдалось расширение капилляров на фоне отека интерстиция, а в клетках появлялись признаки нарушения обмена кальция. Описанные изменения хорошо укладываются в классические представления о реализации стресс-реакции при участии РААС, САС и других нейрогуморальных систем (Соколов, 1991).

Однако выраженность сдвига каждого параметра у изученных линий крыс различалась и определялась их стресс-чувствительностью и состоянием регуляторных систем в покое. У крыс линии НИСАГ сильнее выражены изменения водно-солевого гомеостаза (показатели крови, прибавка массы тела из-за задержки жидкости), зато слабее – тканевые и клеточные изменения в миокарде. Функциональные и регуляторные сдвиги, поддерживающие высокое АД, сопровождаются гипертрофией сердца, кардиосклерозом и расширением микроциркуляторного русла (табл. 3.3). Перечисленные особенности, характерные для крыс линии НИСАГ в покое, можно рассматривать как структурный «след» долговременной адаптации к длительной гипертензии. В этих условиях системы, обеспечивающие физиологические функции животных, работают на пределе своих функциональных возможностей (Меерсон, 1988). Все эти соображения в полной мере относятся и к эндокринной функции предсердий – гипотензивному звену регуляции артериального давления и водного гомеостаза.

Как показали ультраструктурные исследования и морфометрические подсчеты в условиях проведенного эксперимента изменения миоэндокринных клеток у обеих изученных линий крыс однонаправленные – запас секреторного продукта в клетках возрастает за счет увеличения количества гранул и их размеров, т.е. резко тормозится выделение секрета из клеток в кровь. Это объясняет результаты иммуноферментного определения концентрации ANP в крови (табл. 3.2). Снижение концентрации ANP в миокарде предсердий вне миоэндокринных клеток (в интерстиции и в крови сосудов) подтвердило заключение об истинном торможении выделения секрета, а не ускоренном его

метаболизме плазменными пептидазами и/или элиминации рецепторами С-типа.

Процессы выделения натрийуретических пептидов из миоэндокринных клеток изучены недостаточно и с физиологической (специфическая регуляция и стимулы), и с молекулярно-биохимической (процессинг из прогормонов в гормоны и другие производные), и с морфологической (везикулярный транспорт, внутриклеточное растворение гранул, экзоцитоз) точки зрения (Suzuki, 1992; De Bold, 1996; Ogawa, 1999; Baertschi, 2001; Zhang, 2007; Goetze, 2010).

Дисбаланс гормонов в условиях стресса вызывает нарушение водно-солевого гомеостаза, что и было отмечено в исследовании – прибавка массы тела за счет задержки воды, сдвиг электролитного баланса и других показателей в крови, отек стромы миокарда. Труднее объяснить причинно-следственные связи между торможением секреции гормонов и кальциевой перегрузкой клеток, т.к. регуляторные механизмы внутриклеточного процессинга, накопления и выделения натрийуретических пептидов в миоэндокриных клетках изучены плохо и остаются спорными (Woodard, 2007; Goetze, 2010). Нельзя исключить возможности, что при прекращении действия умеренного и кратковременного стресса, накопленные запасы пептидных гормонов будут быстро выделены в кровь и, являясь контрагентами прессорных систем, будут способствовать восстановлению исходного статуса системы без включения генома клеток и формирования долговременных структурных перестроек.

Согласно полученным результатам можно предположить, что большой разброс показателей концентрации сердечных пептидов в периферической крови в разных исследованиях связан не только с методологическими трудностями их определения (Clerico, 2004), но и с эмоциональной обстановкой исследования, и со стресс-чувствительностью животных. У стресс-устойчивых к процедуре лечения и обследования при стойкой высокой гипертензии уровень гормонов будет высоким (аналогично исследованным интактным крысам линии НИСАГ), а у стресс-лабильных особей эта же процедура вызовет резкое снижение секреции гормонов (аналогично с рестрикционным стрессом у крыс линии НИСАГ). Такое транзиторное снижение концентрации в периферической крови на фоне стресс-

реакции не будет отражать истинное состояние этой регуляторной системы. Полученные данные позволяют в некоторой степени понять неоднозначные результаты по динамике концентрации натрийуретических пептидов в крови у больных в ходе лечения. Большинство авторов указывают, что у больных с гипертонией и у крыс при экспериментальных гипертензиях после лечения лозартаном и нормализации АД концентрация натрийуретических пептидов в крови снижается (Soualmia, 1996; Koprdova, 2009; Shiga, 2012; Araujo, 2013), другие исследователи подобного эффекта не обнаруживают (Chistoffersen, 2006; Oh, 2011).

Анализируя полученные результаты, следует отметить неоднозначные, на первый взгляд, межлинейные различия в реактивности миоэндокринных клеток на стрессирующее воздействие. Крысы линии НИСАГ были изначально селекционированы по высокой чувствительности к стрессу, у них отмечены более выраженные реакции стресс-реализующих систем (АКТГ, альдострон, кортизон, адреналин и др.) на разные виды стресса (иммобилизационный, социальный, гиповолемический и т.д.). (Markel, 2007). Однако реакция на стресс миоэндокринных клеток – степень торможения эндокринной секреции и накопления секрета в клетках относительно исходного уровня – у гипертензивных животных меньше, чем у нормотензивных крыс. Можно предположить, что у крыс НИСАГ в безуспешной попытке сдерживать высокое артериальное давление в состоянии покоя, миоэндокринные клетки настолько исчерпывают структурные и функциональные резервы, что просто оказываются не способными, по крайней мере, в условиях проведенного эксперимента адекватно реагировать на неблагоприятное воздействие. На фоне высокой чувствительности у крыс НИСАГ адаптация к иммобилизационному стрессу оказывается менее совершенной, чем у крыс WAG. Этим можно объяснить выраженную задержку воды в организме животных (увеличение средней массы тела за 4 дня эксперимента почти на 100 г) и соответствующие изменения показателей крови. Сравнение абсолютных запасов прогормонов в клетках в любой ситуации остается в пользу крыс НИСАГ (рис. 3.5). Определение концентрации ANP в крови при стрессе тоже выявило

двукратные межлинейные различия (табл. 3.2).

Торможение активности гипотензивной системы целесообразно для реализации и поддержания стресс-реакций через активацию вазопрессорных регуляторных систем, поскольку согласно Wiedemann с соавт. (2000), ANP напрямую подавляет их активность. Однако, сердечные натрийуретические пептиды вряд ли можно отнести к классическим стресс-лимитирующим системам. Скорее, они являются физиологическими антагонистами со стресс-регуляторными (РААС и САС). Как показали проведенные исследования, хотя у крыс НИСАГ ее гиперактивность регистрируется уже на очень ранних этапах онтогенеза (у 18-суточных эмбрионов), она не может эффективно нейтрализовать действие стресс-реализующих систем, что фенотипически выражается в формировании, стойкой артериальной гипертензии начиная со второго месяца жизни, со всеми соответствующими гемодинамическими, биохимическими и морфологическими последствиями. В опытах с субхроническим рестрикционным стрессом выделение пептидов резко тормозится, что способствует, а не противодействует реализации стресс-реакции. Другими словами, эта филогенетически древняя регуляторная система, антогонистичная, по физиологическим эффектам, стресс-реализующим прессорным системам, способствует восстановлению организма, его возврату к исходному состоянию после реакции на неспецифическое воздействие.

ВЫВОДЫ

1. Непродолжительный иммобилизационный стресс у крыс нормотензивной линии WAG при повышении АД вызывает в миоэндокринных клетках двукратное повышение численности секреторных гранул при увеличении их среднего диаметра почти на треть, значительная часть гранул подвергается внутриклеточной деградации. Изменение качественного и количественного состава секреторных гранул свидетельствует о торможении выделения и сохранении синтеза ANP при стрессе, что подтверждается снижением концентрация ANP в крови в 6 раз.

2. Интактные крысы линии НИСАГ характеризуются стойкой гипертензией, достоверно большей средней относительной массой сердца (на 18%) и гипертрофией предсердных миоцитов (диаметр увеличен на 20%). В миоэндокринных клетках наряду с увеличением синтеза, также усилена и секреция ANP, на что указывают увеличение: плотности и размера секреторных гранул, число растворяющихся гранул, а также повышенная концентрация ANP в сыворотке.

3. В условиях стресса у крыс обеих линий изученные параметры претерпевали однонаправленные изменения: повышалось АД, увеличивалась масса тела из-за гиперволемии и относительная масса сердца за счет повышенной обводненности миокарда, накопливались крупные зрелые секреторные гранулы в саркоплазме миоэндокринных клеток, наблюдались отёк интерстиция в миокарде и однотипные сдвиги показателей периферической крови.

4. У крыс НИСАГ на фоне свойственных данной линии структурных изменений в сердце реакция на стресс со стороны изученных параметров выражена слабее, чем у нормотензивных животных. При более высокой концентрации ANP в крови и в миоэндокринных клетках предсердия лабильность этой системы была слабее, чем у нормотензивных животных.

5. ANP как молекулы, которые традиционно считаются регуляторами водно-солевого обмена, также участвуют в развитии стрессзависимой наследственной гипертензии и реализации стресс-реакций, сопровождающихся подъемом артериального давления.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

АД – артериальное давление

ANP – атриальный натрийуретический пептид

WAG – Wistar Aldino Glaxo

НИСАГ – наследственная индуцированная стрессом артериальная гипертензия

ВОЗ – Всемирная Организация Здравоохранения

BNP - натрийуретический пептид В-типа

РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система

САС – симпато-адреналовая система

ГГАС – гипоталямо-гипофизарно-адреналовая система

ц-ГМФ – циклический гуанозинмонофосфат

ЦНС – центральная нервная система

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Автандилов, Г.Г. Медицинская морфометрия / Г.Г. Автандилов // М.: Медицина. - 1990. – С. 384.
2. Антонов, А.Р. Гормональные и морфофункциональные особенности течения экспериментального инфаркта миокарда у крыс с наследственной артериальной гипертензией / А.Р. Антонов, И.И. Бузуева, И.М. Коростышевская, В.Ф. Максимов, А.Л. Маркель, Н.А. Маханова, Е.Е. Филюшина, М.Д. Шмерлинг, Г.С. Якобсон, М.Г. Якобсон // Бюллетень СО РАМН. – 1999. - № 3-4. - С.71 – 74.
3. Антонов, А.Р. Особенности электролитного обмена и эндокринных показателей в плазме крови и лимфе крыс с наследственной артериальной гипертензией / А.Р. Антонов, Ф.В. Ефремов, В.В. Летягина, Ю.В. Начаров, А.Л. Маркель, Г.С. Якобсон // Бюлл. эксперим. биол. мед. – 1997. – Т. 124. - № 7. – С. 36-38.
4. Антонов, Е.В. Альдостерон и стресс-зависимая артериальная гипертензия / Е.В. Антонов, А.Л. Маркель, Г.С. Якобсон // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2011. – Т. 152(8). – С. 148 - 151.
5. Антонов, Е.В. Изучение секреторной активности коры надпочечника у гипертензивных крыс линии НИСАГ / Е.В. Антонов, Т.А. Морева, О.П. Черкасова, М.А. Гилинский, А.Л. Маркель, Г.С. Якобсон // Бюл. СО РАМН. – 2010. – Т. 30(4). – С. 68-75.
6. Антонов, Е.В. Стресс и артериальная гипертония: крысы линии НИСАГ (ISIAH) / Е.В. Антонов, Ю.В. Александрович, А.А. Серяпина, Л.О. Климов, А.Л. Маркель // Вавиловский журнал генетики и селекции. – 2015. – Т. 19(4). – С. 455-459.
7. Балаболкин, М.И. Эндокринология / М.И. Балаболкин // М.: Медицина. - 1989. – С. 416.
8. Балакирева, Л.А. Характеристика сосудистой реактивности гипертензивных крыс линии НИСАГ / Л.А. Балакирева, Н.А. Маханова, М.Н. Носова, Г.М.

Дымшиц, А.Л. Маркель, Г.С. Якобсон // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1998. – Т. 126. – № 8. – С. 136–138.

9. Бузуева, И.И. Возрастные особенности структурной организации мозгового вещества надпочечника у крыс гипертензивной линии НИСАГ / И.И. Бузуева, Е.Е. Филюшина, М.Д. Шмерлинг, А.Л. Маркель, Г.С. Якобсон // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2006. – Т. 142. – № 12. – С. 604–606.
10. Бузуева, И.И. Структурные особенности аденогипофиза у крыс у гипертензивной линии НИСАГ в раннем периоде постнатального онтогенеза / И.И. Бузуева, Е.Е. Филюшина, М.Д. Шмерлинг, А.Л. Маркель, Г.С. Якобсон // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2011. - № 9. - С.244-248.
11. Волкова, Н.Н. Ультраструктурные и функциональные особенности кардиомиоцитов предсердий и желудочков / Н.Н. Волкова, О.М. Драпкина, В.Т. Ивашкин // Клиническая медицина. - 2006. - №11 – С. 11-16.
12. Елисеев, О.М. Натрийуретические пептиды. Эволюция знаний / О.М. Елисеев // Тер. арх. – 2003. – Т. 75. - No 9. – С. 40–45.
13. Ефимов, А.С. Эндокринология / А.С. Ефимов, П.Н. Боднар, В.А. Зелинский / Киев.: Вища школа. - 1983. – С. 326.
14. Китаев-Смык, Л.А. Психология стресса / Л.А. Китаев-Смык // М.: Наука. - 1983. – С. 367.
15. Козлов, И.Г. Иммунотерапия: вчера, сегодня, завтра / И.Г. Козлов, М.А. Тимаков // Педиатрия. – 2009. – Т. 87. - № 4. – С. 140-149
16. Коростышевская, И.М. Возможности ультраструктурной оценки секреторной активности миоэндокринных клеток сердца / И.М. Коростышевская, В.Ф. Максимов, С.А. Курганов // Цитология. - 2013. - №55(8). – С. 539-547.
17. Коростышевская, И.М. Возрастные особенности миоэндокринных клеток сердца у крыс в норме и при наследственной гипертензии / И.М. Коростышевская, В.Ф. Максимов // Онтогенез. – 2013 - №44 (2). – С. 1-13.

18. Коростышевская, И.М. Где и когда в сердце секретируются натрийуретические пептиды / И.М. Коростышевская, В.Ф. Максимов // Онтогенез. – 2012. – Т. 43. - №3. - С. 1-12.
19. Коростышевская, И.М. Ультраструктурные особенности гормон-продуцирующих кардиомиоцитов в некоторых экспериментальных и клинических условиях / И.М. Коростышевская, В.Ф. Максимов // Архив АГЭ. - 1989. - № 2. - С. 42–49.
20. Крылова, М.И. Хемогранин А: иммуноцитохимическая локализация в секреторных гранулах кардиомиоцитов предсердия лягушки / М.И. Крылова // Цитология. - 2007. - Т. 49. - № 7. - С. 538–543.
21. Кушаковский, М.С. Гипертоническая болезнь. / М.С. Кушаковский // М.: Медицина. - 1977. – С. 215.
22. Максимов, В.Ф. Гормональная система сердца как звено регуляции гемодинамики и водно-солевого гомеостаза / В.Ф. Максимов, И.М. Коростышевская // Российский физиологический журнал им. И.М.Сеченова. - 2011. - Т. 97. - №3. - С. 263 – 275.
23. Максимов, В.Ф. Изменение миокарда нормо– и гипертензивных крыс после острого адреналинового воздействия // В.Ф. Максимов, И.М. Коростышевская, М.Д. Шмерлинг, А.Р. Антонов, А.Л. Маркель, Г.С. Якобсон // Бюлл. СО РАМН. – 1997. - №3. - С. 80 – 85.
24. Максимов, В.Ф. Изменения миоэндокринных клеток правого предсердия при гипертензии и после снижения артериального давления в эксперименте / В.Ф. Максимов, И.М. Коростышевская, С.А. Курганов, А.Л. Маркель, Н.С. Руденко, Г.С. Якобсон // Цитология. - 2014. - №56(10). – С. 725 – 734.
25. Максимов, В.Ф. Морфогенез и реакция на гипоксию миоэндокринных клеток предсердия у куриных эмбрионов (Gallus gallus) / В.Ф. Максимов, И.М. Коростышевская // Журнал эволюционной биохимии и физиологии. - 2012. - №48 (5). – С. 502-508.
26. Максимов, В.Ф. Натрийуретические пептиды и артериальная гипертензия: экспериментальное исследование / В.Ф. Максимов, И.М. Коростышевская,

А.Л. Маркель, И.И. Бузуева, Е.Е. Филюшина, Г.С. Якобсон // Вестник РАМН. – 2013. - №1. – С. 4-9.

27. Максимов, В.Ф. Структурные особенности кардиомиоцитов правого предсердия у крыс гипертензивной линии НИСАГ / В.Ф. Максимов, И.М. Коростышевская, А.Л. Маркель, М.Д. Шмерлинг, Г.С. Якобсон // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2004. - №138 (7). – С. 4-8.
28. Максимов, В.Ф. Угнетение секреторной активности предсердных миоцитов после лечения лозартаном гипертензивных крыс / В.Ф. Максимов, И.М. Коростышевская, А.Л. Маркель, Г.С. Якобсон, Н.С. Руденко // Бюл. экспер. биол. мед. – 2014 а. – Т. 158. - № 9. – С. 279 – 281.
29. Маркель, А.Л. Генетика артериальной гипертонии / А.Л. Маркель // Вестник РАН. – 2008. – Т. 78. - № 3. – С. 235 - 246.
30. Маркель, А.Л. Генетическая корреляция реакции артериального давления при эмоциональном стрессе с концентрацией α1-адренорецепторов в отделах мозга / А.Л. Маркель, Г.Т. Шишкина // Генетика. – 1992. - №28(11). – С. 130-133.
31. Маркель, А.Л. Генетическая модель индуцированной стрессом артериальной гипертензии / А.Л. Маркель // Изв. АН СССР. Сер. биол. – 1985. № 3. – С. 466-469.
32. Маркель, А.Л. Характеристика функций гипоталямо-гипофизарно-адренокортикальной системы у гипертензивных крыс линии НИСАГ / А.Л. Маркель, Г.В. Петрова, М.Л. Филипенко, Г.М. Дымшиц, С.Г. Шихевич, С.В. Горякин, О.Е. Редина, Ю.В. Хворостова // Российский физиологический журнал. - 2002. - №11. - С. 1423-1432.
33. Маркель, А.Л. Характеристика функциональной активности симпатоадреналовой системы у гипертензивных крыс линии НИСАГ / А.Л. Маркель, Е.В. Калашникова, С.В. Горякин, Д.Г. Сахаров, Т.А. Морева, Г.М. Дымшиц, М.А. Гилинский, Г.С. Якобсон // Бюлл. эксперим. биол. мед. – 2006. - Т.141. - №3. – С. 244-247.
34. Маслова, Л.Н. Катехоламины мозга и гипоталамо-гипофизарно-

адренокортикальная система при наследственной артериальной гипертензии / Л.Н. Маслова, Г.Т. Шишкина, В.В. Булыгина, А.Л. Маркель, Е.В. Науменко // Физиол. журн. им. И.М. Сеченова. – 1996. - №82(4). – С. 30-37.

35. Маханова, Н.А. Онтогенетическая динамика артериального давления и характеристик ЭКГ у крыс линии НИСАГ с наследственной артериальной гипертензией / Н.А. Маханова, А.Р. Антонов, А.Л, Маркель, Г.С. Якобсон // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1997. - Т.123. - №6. – С. 709-713.

36. Меерсон, Ф.З. Адаптация к неблагоприятныйным ситуациям и физическим нагрузкам / Ф.З. Меерсон, М.Г. Пшенникова // М. Медицина. - 1988. – С. 210.

37. Меерсон, Ф.З. Адаптация, стресс, профилактика / Ф.З. Меерсон // М.: Наука. - 1981. – С. 278.

38. Мешков, И.О. Характеристика поведения гипертензивных крыс линии НИСАГ / И.О. Мешков, Т.А. Алехина, Т.А. Морева, А.Л. Маркель // Журн. высш. нервн. деят-сти им. И.П. Павлова. – 2012. - №62(2). – С. 233-242.

39. Непомнящих, Л.М. Морфометрия и стереометрия гипертрофии сердца / Л.М. Непомнящих, Е.Л. Лушникова, Г.И. Непомнящих // Новосибирск: Наука. - 1986. – С. 304.

40. Панин, Л.Е. Биохимические механизмы стресса / Л.Е. Панин – Новосибирск: Наука - 1983. – С. 231.

41. Рахчеева, М.В. Изменение соотношения гранул А- и В-типов, содержащих предсердный и мозговой натрийуретические пептиды, в предсердных миоцитах крыс в условиях вазоренальной гипертензии / М.В. Рахчеева, М.Л. Бугрова // Цитология. - 2010. - №52(8). – С. 629-633.

42. Рахчеева, М.Л. Роль предсердного натрийуретического пептида в регуляции артериального давления при односторонней ишемии почки у крыс / М.Л. Рахчеева, М.Л. Бугрова, И.В. Мухина, А.С. Жаберева // Вестник Нижегородского университета им. Н.И. Лобачевского. - 2009. - №6(1). - С. 132–136.

43. Розен, В.Б. Основы эндокринологии / В.Б. Розен. // Издательство Московского университета. - 1994. – С. 384.
44. Румянцев, П.П. Кардиомиоциты в процессах репродукции, дифференцировки и регенерации / П.П. Румянцев // Л. Наука. - 1982. – С. 288.
45. Соколов, Е.И. Эмоции, гормоны и атеросклероз / Е.И. Соколов // М. Наука. - 1991. – С. 294.
46. Сытый, В.П. Гормональная функция сердца в норме и при патологических состояниях / В.П. Сытый, А.Г. Мрочек // Журнал «Медицинские новости». – 1995. - №4
47. Теппермен, Дж. Физиология обмена веществ и эндокринной системы / Дж. Теппермен, Х. М. Теппермент // Мир. - 1989. – С. 652.
48. Федосеева, Л.А., Характеристика рениновой системы почки у крыс линии НИСАГ со стрессчувствительной артериальной гипертензией / Л.А. Федосеева, Г.М. Дымщиц, А.Л. Маркель, Г.С. Якобсон // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. - 2009. - № 2. - С.134-138.
49. Физиология адаптационных процессов / Серия «Руководство по физиологии». // М. Наука. - 1986. – С.387.
50. Шмерлинг, М.Д. Гисто– и ультраструктурная характеристика миокарда крыс новой гипертензивной линии (НИСАГ) в раннем периоде онтогенеза / М.Д. Шмерлинг, Е.Е. Филюшина, И.М. Коростышевская, И.И. Бузуева, А.Л. Маркель, Г.С. Якобсон // Бюлл. СО РАМН. – 1997. - №2. - С. 91 – 94.
51. Шмерлинг, М.Д. Состояние миокарда у крыс новой гипертензивной линии / М.Д. Шмерлинг, А.Р. Антонов, Е.Е. Филюшина, И.М. Коростышевская, А.Л. Маркель, Г.С. Якобсон //Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 1996. - №9. - С. 271 – 273.
52. Шмерлинг, М.Д. Стереоморфометрическое исследование органов-мишеней у крыс с наследственной артериальной гипертензией в разные периоды постнатального онтогенеза при изменении условий вскармливания / М.Д. Шмерлинг, И.И. Бузуева, И.М. Коростышевская, В.А. Лазарев, В.Ф.

Максимов, Е.Е. Филюшина, А.Л. Маркель, Г.С. Якобсон // Морфология. - 2005. - Т. 128. - № 4. - С. 85-90.

53. Якобсон, Г.С. Патофизиологические аспекты инфаркта миокарда на фоне артериальной гипертензии в эксперименте / Г.С. Якобсон, А.Р. Антонов, А.В. Ефремов, Н.А. Маханова, М.Д. Шмерлинг, В.Ф. Максимов, И.М. Коростышевская, М.Г. Якобсон // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2003. - Т. 136. - № 11. - С. 500-504.

54. Якобсон, Г.С. Структурная характеристика коры надпочечника крыс с наследственной индуцированной стрессом артериальной гипертензией в позднем периоде постнатального онтогенеза / Г.С. Якобсон, А.Л. Маркель, И.И. Бузуева, Е.Е. Филюшина, М.Д. Шмерлинг // Морфология. - 2000. - № 6. - С.61-65.

55. Amstislavsky, S. Renal and endocrine changes in rats with inherited stress-induced arterial hypertension (ISIAH) / S. Amstislavsky, P. Welker, J.H. Fruhauf, L. Maslova, L. Ivanova, B. Jensen, A. Markel, S. Bachmann // Histochem. Cell Biol. – 2006. – V. 125. - № 6. – P. 651 – 659.

56. Araujo, I.G. Effects of acute and subchronic AT1 receptor blockade on cardiovascular, hydromineral and neuroendocrine responses in female rats / I.G. Araujo, L.L. Elias, J. Antunes-Rodrigues, L.C. Reis, A.S. Mecawi // Physiol Behav. - 2013. - V. 122. – P.104-112.

57. Atchison, D.J. Atrial natriuretic peptide attenuates flow in an isolated lymph duct preparation. / D.J. Atchison, M.G. Johnston // Pflugers Arch. – 1996. - V. 431. - № 4. – P. 618-24.

58. Avramovitch, N. Morphometric analysis of atrial natriuretic peptide-containing granules in atriocytes of rats with experimental congestive heart failure / N. Avramovitch, A. Hoffman, J. Winaver, A. Haramati, D. Lewinson // Cell. Tissue. Res. – 1995. - V. 279 (3). P. 575-583.

59. Azizov, V.A. Immunohistochemical and electron-microscopic characterization of secretory cardiomyocytes in experimental myocardial infarction / V.A. Azizov, S.R. Muradova // Anadolu Kardiol. Derg. - 2003. - № 4. – P. 299-302.

60. Baertschi, A.J. Acid prohormone sequence determines size, shape, and docking of secretory vesicles in atrial myocytes / A.J. Baertschi, D. Monnier, U. Schmidt, U. Schmidt, U. Schmidt, E.S. Levitan, S. Fakan, A. Roatti // Circ. Res. – 2001. – V. 89. – P. E23–E29.
61. Bonow, R.O. New insights into the cardiac natriuretic peptides / R.O. Bonow // Circulation. – 1996. – V. 93. – P. 1946–1950.
62. Cameron, V.A. Minireview: Natriuretic peptides during development of the fetal heart and circulation / V.A. Cameron, L.J. Ellmers // Endocrinology. - 2003. - V. 144. - № 6. - P. 2191–2194.
63. Cantin, M. The heart as an endocrine gland / M. Cantin, J. Genest // Clin. Invest. Med. – 1986. - V. 9(4). – P.319-327.
64. Cao, L. Addiction to elevated insulin-like growth factor I receptor and initial modulation of the AKT pathway define the responsiveness of rhabdomyosarcoma to the targeting antibody. / L. Cao, Y. Yu, I. Darko, D. Currier, L.H. Mayeenuddin, X. Wan, C. Khanna, L.J. Helman. // Cancer Res. – 2008. - V. 68. - № 19. – P. 8039-48.
65. Christoffersen, C. Chamber-dependent expression of brain natriuretic peptide and its mrna in normal and diabetic pig heart / C. Christoffersen, J.P. Goetze, E.D. Bartels, M.O. Larsen, U. Ribel, J.F. Rehfeld, B. Rolin, L.B. Nielsen // Hypertension. - 2002. - V. 40. - P. 54–60.
66. Christoffersen, T.E. Increased natriuretic peptide receptor A and C gene expression in rats with pressure-overload cardiac hypertrophy / T.E. Christoffersen, M. Aplin, C.C. Strom, S.P. Sheikh, O. Skott, P.K. Busk, S. Haunso, L.B. Nielsen // Am J Physiol.Heart Circ Physiol. - 2006. - № 290(4). – P. H1635-H1641.
67. Clerico, A. Diagnostic accuracy and prognostic relevance of the measurement of cardiac natriuretic peptides: a review / A. Clerico, M. Emdin // Clin. Chem. – 2004. – V. 50. – P. 33–50.
68. Clerico, A. Measurement of cardiac natriuretic hormones (atrial natriuretic peptide, brain natriuretic peptide, and related peptides) in clinical practice: the

need for a new generation of immunoassay methods / A. Clerico, S.D. Ry, D. Giannessi // Clinical. Chemistry. – 2000. – V. 46. – P. 1529–1534.

69. D`Souza, S.P. Autocrine and paracrine actions of natriuretic peptides in the heart / S.P. D`Souza, M. Davis, G.F. Baxter // Pharmacol. Ther. - 2004. - V. 101. - № 2. - P. 113– 129.

70. de Bold, A.J. A rapid and potent natriuretic response to intravenous injection of atrial myocardial extract in rats / A.J. de Bold, H.B. Borenstein, A.T. Veress, H. Sonnenberg // Life. Sci. - 1981. – №28. – P. 89 – 94.

71. de Bold, A.J. Cardionatrin I — a novel heart peptide with potent diuretic and natriuretic properties / A.J. de Bold, T.G. Flynn // Life Sci. – 1983. - V. 33. - № 3. – P.297-302.

72. de Bold, A.J. Mechanical and neuroendocrine regulation of the endocrine heart / A.J. de Bold, B.G. Bruneau, M.L. de Bold // Cardiovasc. Res. – 1996. – V.31. – P. 7–18.

73. Farrell, A.P. Cardiac Natriuretic Peptides: A Physiological Lineage of Cardioprotective Hormones? / A.P. Farrell, K.R. Olson // Physiological and Biochemical Zoology. – 2000. - V. 73. - № 1. – P. 1-11.

74. Gall, J.A. Qualitative and quantitative analysis of granules in atrial appendage cardiocytes in different physiological states / J.A Gall., D. Alcorn, R Fernley., J.P. Coghlan, G.B. Ryan // Cell. Tissue Res. - 1990. - V. 259 (3). - P.529-534.

75. Gama, E.F. Effects of pre- and postnatal protein deprivation on atrial natriuretic peptide- (ANP) granules of the right auricular cardiocytes. An ultrastructural morphometric study / E.F. Gama, E.A. Liberti, R.R. de Souza // Eur. J. Nutr. - 2007. – V. 46 (5). – P.245-250.

76. Gardner, D.G. Molecular biology of the natriuretic peptide system. Implications for physiology and hypertension / D.G. Gardner, S. Chen, D.J. Glenn, C.L. Grigsby // Hypertension. - 2007. - V. 49. - P. 419-426.

77. Goetze, J.P. Biosynthesis of cardiac natriuretic peptides / J.P. Goetze // Results Probl. Cell Differ. – 2009. - V. 50. – P. 97 - 120.

78. Goetze, J.P. The paradox of increased natriuretic hormones in congestive heart

failure patients: does the endocrine heart also fail in heart failure? / J.P. Goetze, J. Kastrup, J.F. Rehfeld // Eur. Heart. J. - 2003. - V. 24. – P. 1471 - 1472.

79. Hall, C. Essential biochemistry and physiology of NT pro-BNP / C. Hall // Eur. J. Heart Failure. – 2004. - V. 6 (3). - P. 257-260.

80. Hawkridge, A.M. Effect of plasma protein depletion on BNP-32 recovery / A.M. Hawkridge, D.C. Muddiman, D.M. Hebulein et al. // Clin. Chem. – 2008. – V. 54. – P. 933–934.

81. Harris, P.J. Atrial natriuretic peptide inhibits angiotensin"stimulated proximal tubular sodium and water reabsorp" tion / P.J. Harris, D. Thomas, T.O. Morgan // Nature. – 1987. - V. 326. - №6114. – P. 697—698.

82. Henry, J. P. Evidence of the Atrial Location of Receptors Influencing Urine Flow / J.P. Henry, O.H. Gauer, J.L. Reeves// Circulat. Res. – 1956. – V. 4(1). - P.85-90.

83. Holtwick, R. Pressure-independent cardiac hypertrophy in mice with cardiomyocyte-restricted inactivation of the atrial natriuretic peptide receptor guanylyl cyclase-A / R. Holtwick, M. van Eickels, B.V. Skryabin, H.A. Baba, A. Bubikat, F. Begrow, M.D. Schneider, D.L. Garbers, M. Kuhn // The Journal of Clinical Investigation. – 2003. – V. 111. - № 9. – P. 1399-1407

84. Hunt, P.J. Differing biological effects of equimolar atrial and brain natriuretic peptide infusions in normal man / P.J. Hunt, E.A. Espiner, Nicholls M.G., A.M. Richards, T.G. Yandle // J Clin Endocrinol Metab. – 1996. – V. 81. – № 11. – P. 3871-3876

85. Hunt, P.J. Immunoreactive amino-terminal pro-brain natriuretic peptide (NT-PROBNP): a new marker of cardiac impairment / P.J. Hunt, A.M. Richards, M.G. Nicholls et al. // Clin. Endocrinol. – 1997. – V. 47. – P. 287–296.

86. Huxley, V.H. Increased Capillary Hydraulic Conductivity Induced by Atrial Natriuretic Peptide / V.H. Huxley, V.L. Tucker, K.M. Verburg, R.H. Freeman // Circulation Research. – 1987. - V. 60. - № 2. – P. 304-307

87. Iida, H. Phasic secretion of newly synthesized atrial natriuretic factor from unstimulated atrial myocytes in culture / H. Iida, Y. Shibata // Circ. Res. – 1994.

– V.74. – P. 659–668.

88. Inoue, K. Molecular evolution of the natruretic peptide system as revealed by comparative genomic / K. Inoue, Y. Takei // Comp. Biochem. Physiol. – 2006. - V. 1(1). - P. 69-76.

89. John, S.W. Genetic decreases in atrial natriuretic peptide and salt-sensitive hypertension / S.W. John, J.H. Krege, P.M. Oliver et al. // Science. – 1995. – V. 267. – P. 679–681.

90. Kangava, K. Human atrial natriuretic polypeptides (HANP): purification, structure synthesis and biological activity / K. Kangava, A. Fukuda, I. Kubota et al. // J. Hypertens Suppl. – 1984. - V. 2 (3). – P. 321-23.

91. Kangawa, K. Purification and complete amino acid sequence of α-human atrial natriuretic polypeptide (α-hANP) / K. Kangawa, H. Matsuo // Biochem. Biophys. Res. Commun. – 1984. – V. 118. – P. 131–39.

92. Kawakami, H. Alteration of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide gene expression associated with progression and regression of cardiac hypertrophy in renovascular hypertensive rats / H. Kawakami, H. Okayama, M. Hamada et al. // Clin. Sci. - 1996. - V.90. - P. 197–204.

93. Koller, K.J. Molecular biology of the natriuretic peptides and their receptors. / K.J. Koller , D.V. Goeddel // Circulation. – 1992. - V. 86. - № 4. – P. 1081-8.

94. Kone, B.C. Molecular biology of natriuretic peptides and nitric oxide synthases. / B.C. Kone // Cardiovasc Res. – 2001. - V. 51. - № 3. – P. 429-41.

95. Koprdova, R. Long-term effect of losartan administration on blood pressure, heart and structure of coronary artery of young spontaneously hypertensive rats / R. Koprdova, M. Cebova, F. Kristek // Physiol Res. - 2009. - V. 58(3). P. 327-335.

96. Kudoh, S. Stretch-modulation of second messengers: effects on cardiomyocyte ion transport / S. Kudoh, H. Akazawa, H. Takano et al // Prog. Biophys. Mol. Biol. - 2003. - V. 82. - P. 57–66.

97. Lanfear, D.E. Genetic variation in the natriuretic peptide system and heart failure / D.E. Lanfear // Heart Fail. Rev. - 2010. - V. 15. - № 3. – P. 219–228.

98. Langenickel, T. Differential regulation of cardiac ANP and BNP mrna in different stages of experimental heart failure / T. Langenickel, I. Pagel, K. Hohnel, R. Dietz, R. Willenbrock // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 2000. - V. 278. – P. H1500 - H1506.

99. Levin, E. Natriuretic peptides / D. Gardner, W. Samson // N. Engl. J. Med. – 1998. - V. 339. - № 5. – P. 321-328.

100. Levy, D. Genome-wide association study of blood pressure and hypertension / D. Levy, G.B. Ehret, K. Rice et al. (44 authors) // Nat. Genet. - 2009. - V.41. - P.677 – 687.

101. Maack, T. The broad homeostatic role of natriuretic peptides / T. Maack // Arq. Bras. Endocrinol. Metab. - 2006. - V. 50. - № 2. - P. 198–207.

102. Marei, H.E. Fine structural and immunohistochemical localization of cardiac hormones (ANP) in right atrium and hypothalamus of the white rat / H.E. Marei // Eur. J. Morphol. – 2002. – V. 40(1). – P. 37-41.

103. Markel, A.L. Development of a new strain of rats with inherited stress-induced arterial hypertension / A.L. Markel // Genetic Hypertension. Ed. J. Sassard. Colloque INSERM, John Libbey Eurotext Ltd. – 1992. - V. 218. – P. 405-407.

104. Markel, A.L. Developmental Influences on Blood Pressure Regulation in ISIAH Rats / A.L. Markel, L.N. Maslova, G.T. Shishkina, N.A. Mahanova, G.S. Jacobson // Eds R. McCarty, D.A. Blizard, R.L. Chevalier. Development of the Hypertensive Phenotype: Basic and Clinical Studies. Amsterdam, Elsevier. - 1999.

105. Markel, A.L. Neuroendocrine profiling in inherited stress-induced arterial hypertension rat strain with stress-sensitive arterial hypertension / A.L. Markel, O.E. Redina, M.A. Gilinsky, G.M. Dymshits, E.V. Kalashnikova, Y.V. Khvorostova, L.A. Fedoseeva, G.S. Jacobson // J Endocrinol. - 2007. - V. 195(3). –P. 439 - 450.

106. McFarlane, S.I. Role of the natriuretic peptide system in cardiorenal protection / S.I. McFarlane, N. Winer, J.R. Sowers // Arch. Intern. Med. - 2003. -

V. 163. - P. 2696–2704.

107. Medvedev, S.B. Weak turbulence of short equatorial waves. / S.B. Medvedev, V. Zeitlin // Physics Letters A. – 2005. - V. 342(3). – P. 217-227.

108. Melo, L.G. Atrial Natriuretic Peptide: Regulator of Chronic Arterial Blood Pressure. / L.G. Melo, S.C. Pang, U. Ackermann // News Physiol Sci. – 2000. – V.15. – P. 143-149.

109. Mifune, H. Fine structure of atrial natriuretic peptide (ANP)-granules in the atrial cardiocytes of the mouse, rat and Mongolian gerbil / H. Mifune, S. Suzuki, Y. Noda, S. Mohri, K. Mochizuki // Jikken Dobutsu. – 1991. - V. 40 (2). – P. 183-193.

110. Mohammed, S.F. Nesiritide in acute decompensated heart failure: current status and future perspectives / S.F. Mohammed, J. Korinek, H.H. Chen, J.C. Burnett, M.M. Redfield // Rev. Cardiovasc. Med. - 2008. - V. 9. – P. 151 – 158.

111. Muth, E. Proteomic analysis of rat atrial secretory granules: a platform for testable hypotheses / E. Muth, W.J. Driscoll, A. Smalstig et al. // Biochim. Biophys. Acta. – 2004. – V. 1699. - №1-2. – P. 263– 275.

112. Nakao, K. Molecular biology and biochemistry of the natriuretic peptide system. II: Natriuretic peptide receptors / K. Nakao, Y. Ogawa, S. Suga, H. Imura // J. Hypertens. – 1992. - V. 10 (10). - P. 1111-1114.

113. Navaratnam, V. Specific heart granules and natriuretic peptide in the developing myocardium of fetal and neonatal rats and hamsters / V. Navaratnam, J.M. Woodward, J.N. Skepper // J. Anat. - 1989. - V.163. – P. 261-273.

114. O`Donnell, P.J. Peptidylglycine-alpha-amidating monooxygenase and pro-atrial natriuretic peptide constitute the major membrane-associated proteins of rat atrial secretory granules / P.J. O`Donnell, W.J. Driscoll, N. Back et al. // J. Mol. Cell. Cardiol. – 2003. – V. 35. - №8. – P. 915–922.

115. Ogawa, T. Characterization of natriuretic peptide production by adult heart atria / T. Ogawa, M. Vatta, B.G. Bruneau et al. // Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol. – 1999. – V. 276. - № 6. – P. H1977–H1986.

116. Ogawa, Y. Molecular biology and biochemistry of natriuretic peptide

family / Y. Ogawa, H. Itoh, K. Nakao // Clin. Exp. Pharmacol. Physiol. – 1995. - V. 22 (1). – P. 49-53.

117. Oh, Y.B. Endogenous angiotensin II suppresses stretch-induced ANP secretion via AT1 receptor pathway / Y.B. Oh, S. Gao, A. Shah, J.H. Kim, W.H. Park, S.H. Kim // Peptides. – 2011. - V. 32(2). – P. 374-381.

118. Oliver, P.M. Hypertension, cardiac hypertrophy, and sudden death in mice lacking natriuretic peptide receptor A / P.M. Oliver, J.E. Fox, R. Kim, H.A. Rockman, H. Kim, R.L. Reddick, K.N. Pandey, S.L. Milgram, O. Smithies // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 1997. - V. 94. - P. 14730 –14735

119. Overton, R.M. Processing of kaliuretic peptide in human plasma and serum / R.M. Overton, D.L. Vesely // Peptides. – 1996a. – V. 17. – P. 1041–1046.

120. Overton, R.M. Processing of long-acting natriuretic peptide and vessel dilator in human plasma and serum / R.M. Overton, D.L. Vesely // Peptides. – 1996б. – V. 17. – P. 1155–1156.

121. Pandey, K.N. Natriuretic peptides and their receptors. / K.N. Pandey // Peptides. – 2005. - V. 26(6). – P. 99-900.

122. Peeters, B.W. Glucocorticoid receptor antagonists: new tools to investigate disorders characterized by cortisol hypersecretion. / B.W. Peeters, J.A. Tonnaer, M.B. Groen, C.L. Broekkamp, H.A. van der Voort, W.G. Schoonen, R.J. Smets, P.M. Vanderheyden , R. Gebhard, G.S. Ruigt // Stress. – 2004. – V. 7. - № 4. – P. 233-41.

123. Pemberton, C.J. Deconvolution analysis of cardiac natriuretic peptides during acute volume overload / C.J. Pemberton, M.L. Johnson, T.G. Yandie et al. // Hypertension. - 2000. - V. 36. - P. 355-359.

124. Potter, L.R. Natriuretic peptides, their receptors, and cyclic guanosine monophosphate-dependent signaling functions / L.R. Potter, S. Abbey-Hosch, D.M. Dickey // Endocrine Rev. - 2006. - V. 22. - № 1. - P. 47–72.

125. Rademaker, M.T. Cardiac natriuretic peptides for cardiac health / M.T. Rademaker, A. M. Richards // Clin Sci. – 2005. – V. 108. – № 1. – P. 23-26

126. Sabban, E.L. Catecholamines in stress: molecular mechanisms of gene

expression / E.L. Sabban // Endocr. Regul. - 2007. – V. 41. - № 2-3. - P. 61-73.

127. Shiga, Y. Effect of fixed-dose losartan/hydrochlorothiazide on brain natriuretic peptide in patients with hypertension / Y. Shiga, S. Miura, R. Mitsutake, Y. Uehara, A. Inoue, K. Saku // J Renin Angiotensin Aldosterone Syst. - 2012. - V. 13(1). - P. 107-112.

128. Silberbach, M. Natriuretic peptide signalling: molecular and cellular pathways to growth regulation. / M. Silberbach, C.T. Roberts // Cell Signal. – 2001. - V. 13(4). – P. 221-31.

129. Smith, M.W. Delayed metabolism of human brain natriuretic peptide reflects resistance to neutral endopeptidase. / M.W. Smith, E.A. Espiner, T.G. Yandle, C.J. Charles, A.M. Richards // J Endocrinol. – 2000. - 167(2). – P. 239-46.

130. Soualmia, H. Atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide release in human essential hypertension / H. Soualmia, I. Ayadi, S. Omar, M. Feki, H. Drissa, A. Mebazaa, N. Kaabachi // Clin Lab. - 2009. - V. 55 (3-4). - P.120 - 127.

131. Soualmia, H. Cellular mechanism of angiotensin II-induced atrial natriuretic peptide release in rat right atrial tissue / H. Soualmia, F. Masson, C. Barthélemy, G. Maistre, A. Carayon // Life Sci. -1996. - V. 58 (19). - P. 1621-1629.

132. Stepan, H. Organ-specific mRNA distribution of c-type natriuretic peptide in neonatal and adult mice / H. Stepan, E. Leitner, M. Bager et al. // Regul. Pept. - 2000. – V. 95. – P. 81–85.

133. Stephenson, T.J. Atrial natriuretic factor: the Heart as an endocrine organ / T.J. Stephenson, F.B. Pipkin // Arch. Dis. Child. - 1990. - V. 65. - P. 1293–1294.

134. Sudoh, T. A new natriuretic peptide in porcine brain / T. Sudoh, K. Kangava, N. Minamino, H. Matsuo // Nature. – 1988. - V. 332 (6159). – P. 78-81.

135. Suzuki, E. Cellular mechanisms for synthesis and secretion of atrial natriuretic peptide and brain natriuretic peptide in cultured rat atrial cells / E. Suzuki, Y. Hirata, O. Kohmoto et al. // Circ. Res. – 1992. – V. 71. - № 5. – P. 1039–1048.

136. Takei, Y. B-type natriuretic peptide (BNP), not ANP, is the principal cardiac natriuretic peptide in vertebrates as revealed by comparative studies / Y. Takei, K. Inoue, S. Trajanovska, J. Donald // General and Comparative Endocrinology. - 2011. - V. 171. - № 3. – P. 258-266.

137. Tamura, N. Cardiac fibrosis in mice lacking brain natriuretic peptide / N. Tamura, Y. Ogawa, H. Chusho et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. – 2000. – V. 97. – P. 4239–4244.

138. Thibault, G. Binding and aggregation of pro-atrial natriuretic factor by calcium. / G. Thibault, A.F. Doubell // Am. J. Physiol. - 1992. - V. 262. – P. C907.-.C915.

139. Trajanovska, S. Genomic analyses and cloning of novel chicken natriuretic peptide genes reveal new insights into natriuretic peptide evolution. / S. Trajanovska, K. Inoue, Y. Takei, J. Donald A. // Peptides. - 2007. - V. 28. - №11. – P. 2155-2163.

140. Trajanovska, S. Molecular cloning of natriuretic peptides from the heart of reptiles: loss of ANP in diapsid reptiles and birds / S. Trajanovska, J. A. Donald // Gen. Comp. Endocrinol. - 2008. - V.156 (2) . – P. 339-346.

141. Tse, M.Y. Expression of B-type natriuretic peptide in atrial natriuretic peptide gene disrupted mice / M.Y. Tse, J.D. Watson, I.R. Sarda et al. // Mol. Cell. Biochem. – 2001. – V. 219. – P.99–105.

142. Tylkova, L. Evaluation of changes in secretory granules of atrial myocytes: a morphometric approach / L. Tylkova, M. Novotova, I. Zahradnik, A. Kiss // Anal. Quant. Cytol. Histol. - 2008. - V. 30 (1). – P. 53-59.

143. Valli, N. Review of 10 years of the clinical use of brain natriuretic peptide in cardiology. / N. Valli, A. Gobinet, L. Bordenave // J Lab Clin Med. – 1999. - V. 134(5). – P. 437-44.

144. Vanderheyden, M. Wall stress modulates brain natriuretic peptide production in pressure overload cardiomyopathy. / M. Vanderheyden, M. Goethals, S. Verstreken, B. De Bruyne, K. Muller, E. Van Schuerbeeck, J. Bartunek. // J Am Coll Cardiol. – 2004. - V.44. - № 12. – P. 2349-54.

145. Vesely, D.L. Atrial natriuretic peptides in pathophysiological diseases. / D.L. Vesely // Cardiovascular Research. - 2001. - V. 51. – P. 647 - 658.

146. Vesely, D.L. Discovery of new cardiovascular hormones for the treatment of congestive heart failure / D.L. Vesely // Cardiovasc. Hematol. Disord. Targets. – 2007. – V. 7(1). – P. 47-62.

147. Vesely, D.L. Which of the cardiac natriuretic peptides is most effective for the treatment of congestive heart failure, renal failure and cancer? / D.L. Vesely // Clin. Exper. Pharm. Physiol. - 2006. - V. 33. - № 3. - P. 169–176.

148. Von Lueder, T.G. Renin-angiotensin blockage combined with natriuretic peptide system augmentation: novel therapeutic concepts to combat heart failure. / T.G. Von Lueder, S.J. Sangaralingham, B.H. Wang, A.R. Kompa, D. Atar, J.C. Burnett, H. Krum // Circ. Heart Fail. - 2013. - V.6. – P. 594 – 605.

149. Weidemann, A. Hypoxia, via stabilization of the hypoxia-inducible factor HIF-1alpha, is a direct and sufficient stimulus for brain-type natriuretic peptide induction / A. Weidemann, B. Klanke, M. Wagner et al. // Biochem. J. - 2008. - V. 409. - P. 233–242.

150. Wiedemann, K. Effects of natriuretic peptides upon hypothalamo-pituitary-adrenocortical system activity and anxiety behavior. / K. Wiedemann, H. Jahn, M. Kellner // Exp. Clin. Endocrinol. Diabetes. - 2000. - V. 108(1). - P. 5 – 13.

151. Woodard, G.E. Recent advances in natriuretic peptide research. / G.E. Woodard, J.A. Rosado // J. Cell. Mol. Med. - 2007. - V.11. - P. 1263 - 1271.

152. Wu, Q. Corin: New insights into the natriuretic peptide system / Q. Wu, O. Cai, S. Chen et al. // Kidney Int. - 2009. - V. 75. - № 2. - P. 142–146.

153. Yandle, T.G. Biochemistry of natriuretic peptides. / T.G. Yandle // J Intern Med. – 1994. - V. 235(6). - P. 561-76.

154. Zhang, F. Ultrastructural and immunocharacterization of undifferentiated myocardial cells in the developing mouse heart / F. Zhang, K.B. Pasumarthi // J. Cell. Mol. Med. – 2007. – V. 11. - №3. – P. 552–560.