

**В.Д.Мішалов**

Національна медична академія післядипломної освіти ім. П.Л.Шупика

УДК 611.127:576.31].013

## **СТАН СЕКРЕТОРНОГО АПАРАТУ ПЕРЕДСЕРДНИХ КАРДІОМІОЦИТІВ ЩУРА У РІЗНИХ ДІЛЯНКАХ ПЕРЕДСЕРДЬ**

**Ключові слова:** кардіоміоцит, міокард, серце щура, секреторний апарат

*Надійшла: 11.10.2006*

*Прийнята: 06.11.2006*

**Резюме.** Метою роботи є визначення основних морфологічних ознак секреторного апарату передсердних кардіоміоцитів щура з кількісною оцінкою стану спеціалізованих секреторних клітин у різних ділянках передсердь. У дослідженні використано ультраструктурне й гістохімічне вивчення міокарда правого і лівого передсердь, правого і лівого вушок серця, а також міжпередсердної перегородки 28 сердець щурів. Доведено, що формування секреторних гранул та їх переміщення від внутрішніх клітинних ділянок до субсарколемальної зони здійснюється дискретно, певними порціями по 10-25 гранул у кожній. Дегрануляція вмісту гранул відбувається не лише в зоні, що прилягає до клітинної мембрани, але й у глибоких ділянках саркоплазми кардіоміоцитів. Передсердний міокард представлений двома субпопуляціями (типами) скорочувальних клітин, що розрізняються за морфологічними характеристиками. Найвища секреторна активність характеризує міокард правого вушка; у лівому вушку і вільній стінці правого передсердя значення чисельної щільності специфічних гранул у середньому в 1,5 рази поступаються значенням правого вушка; щільність гранул у міокарді лівого передсердя і міжпередсердної перегородки більш ніж 4-разово знижена у порівнянні з відповідним значенням у правому вушку.

**Mishalov V.D. Condition of the secretory apparatus of the atrial cardiomyocytes in different regions of the atrium of the rats.**

**Summary.** The purpose of work - definite of the basic morphological attributes of the secretory apparatus of the atrial cardiomyocytes with a quantitative analysis of a condition of the specialized secretory cells in different regions of the atrium of the rats. The ultrastructural and histochemical methods were used in research for studying the right and left atriums, right and left auricles of hearts, and also interatrial septa of 28 hearts of rats. It has been shown formation secretory granules and their moving from an internal cellular sites to a subsarcolemal zone was realized discretely, the certain portions in groups of 10-25 granules in everyone. Degranulation contents of granules occurs not only in a zone, which lying to a cellular membrane, but also in deep regions of sarcoplasm of cardiomyocytes. The atrium myocardium consists of two subpopulations (types) contractive cells which differ under morphological characteristics. The highest secretory activity characterizes the myocardium of the right auricle; the numerical density of specific granules in the left auricle and a free wall of the right auricle was been smaller on average in 1,5 times than in the right auricle; the density of granules in the myocardium of the left atrium and interatrium septa was been smaller in 4 times than in the right auricle.

**Key words:** cardiomyocyte, myocardium, rat heart, secretory apparatus.

### **Вступ**

Значну увагу дослідників до вивчення передсердного міокарда викликала наявність специфічних передсердних (секреторних) гранул, що вперше були описані 50 років тому в публікації Kisch (Kisch, 1956). Активне накопичення відомостей про локалізацію, природу й біологічну роль специфічних гранул (Румянцев П.П., 1972; Павлович Е.Р., 1989; Voari et al., 2005; Tsujino et al., 2005; Mukaddam-Daher, 2006) призвело до того, що всі співставні за структурою саркоплазматичні утворення стали розділяти на 4 основні типи – А, В, С і D. Було показано, зокрема, що С-гранули за своїми ультраструктурними і гістохімічними характеристиками відповідають лізосомам; власне специфічні передсердні гранули представлені типами А, В і D (Cantin et al., 1979).

У сучасній науковій літературі досить широко висвітлені відомості про типові ендокринні ефекти передсердного натрійуретичного пептиду, що полягають у регулюванні гомеостазу серцево-судинної системи через підвищення натрійурезу, діурезу та тормозному впливі на ренін-ангіотензин-альдостеронову систему (Hogehuis et

al., 2005; Nishikimi et al., 2005). В останні роки вони доповнилися новими даними щодо важливої ролі даного гормону в регуляції аутокринної і паракринної функцій відносно коронарного кровообігу серця (Dahlstrom et al., 2006). Це реалізується шляхом регуляції росту міоцитів, пригнічення проліферації фібробластів, цитопротективної антиішемічної функції, а також за рахунок впливу на ендотелій коронарних судин та на проліферацію і скоротливість гладких міоцитів у стінці коронарних судин (Mukaddam-Daher, 2006).

Дані літератури щодо механізмів секреції натрійуретичного пептиду з гранул передсердних кардіоміоцитів залишаються малочисельними та суперечливими (Nishikimi et al., 2005; Abdelalim et al., 2006). Питання щодо обов'язкового злиття специфічної мембрани везикул з сарколемою секреторних кардіоміоцитів є дискусійним (Vesely, 2006).

Виходячи з аналізу наведених даних постає необхідність вирішення низки питань, пов'язаних зі станом секреторного апарату передсердних кардіоміоцитів. Не дивлячись на значну кількість відомостей щодо численних морфо-функціональ-

них характеристик специфічних передсердних гранул, сьогодні ми ще не можемо скласти цілісне уявлення про співвідношення між типами гранул і про їх характерні властивості в залежності від топологічних особливостей в різних ділянках передсердь.

#### Мета

Метою роботи є визначення основних морфологічних ознак секреторного апарату передсердних кардіоміоцитів щура з кількісною оцінкою стану спеціалізованих секреторних клітин у різних ділянках передсердь.

#### Матеріали та методи

Для ультраструктурного й гістохімічного вивчення міокарда правого і лівого передсердь, правого і лівого вушок серця, а також міжпередсердної перегородки використали 28 сердець білих статевозрілих безпородних щурів.

Електронно-мікроскопічне дослідження проводили за схемою, запропонованою В.Я.Карупу (1984). Проведення гістоензимологічного дослідження ґрунтували на загальних принципах гістохімічного аналізу (Ноговін, 1989). Гістохімічну реакцію на кислу фосфатазу, що є маркерним ферментом лізосом, здійснювали за азоіндоксильним методом Gossrau (1978) на криостатних зрізах завтовшки 7 мкм. Для кількісної морфологічної характеристики секреторного апарату у складі 5 означених ділянок передсердь визначали діаметр мембранних і безмембранних специфічних гранул (за формулою De Hoff, Rhines (1968) для випадково розподілених структур), чисельну щільність обох типів специфічних гранул і лізосом, відносний об'єм обох типів специфічних гранул (методом крапкового рахунку (Автанділов Г.Г., 1990).

Морфометричні дані зазнавали статистичної обробки за технікою, викладеною І.В.Твердохлібом з співавторами (1996).

#### Результати та їх обговорення

При ультраструктурному дослідженні міокарда передсердь щурів стабільно виявлялися специфічні секреторні гранули, що містять натрійуретичний пептид. На електроннограмах на тлі слабо орієнтованих міофібрил спостерігалися різні конфігурації специфічних гранул, які істотно варіювали за розмірами та електронною щільністю (рис.1). У відповідності до розповсюдженої класифікації передсердних гранул на А-, В- і D-типи, відмінності в їх вигляді становлять характерну особливість секреторного апарату передсердних кардіоміоцитів. Враховуючи, що натрійуретичний фактор є головним компонентом специфічних гранул, логічно уявити наявність ультраструктурних відмінностей між ними як результат певної зміни фаз поведінки гранул у саркоплазмі, але не як фіксований гетерогенітет за хімічним складом. На ґрунті даних ультраструктурного дослідження серійних зрізів нам не вдалося виявити існування певних чітко розмежованих типів секреторних гранул за їх діаметром або електронною щільністю: широке варіювання означених характеристик на мало дискретного характеру. Поряд з

цим, ми спостерігали важливу якісну ознаку, яка дозволила розділити всі специфічні гранули на дві субпопуляції. Ця ознака полягала в тому, що певна кількість передсердних гранул мала чітке мембранне оточення; інші гранули були вільними від мембран і мали „розміту” периферію; перехідні форми з частково збереженими мембранами виявлялися вкрай рідко.

Вміст мембранних гранул являв собою мало структуровану осміофільну речовину, що рівномірно розподілялося в обмеженому мембраною просторі гранул або, рідше, мало незначні ущільнення. Діаметр означених гранул варіював від 120 нм до 250 нм.

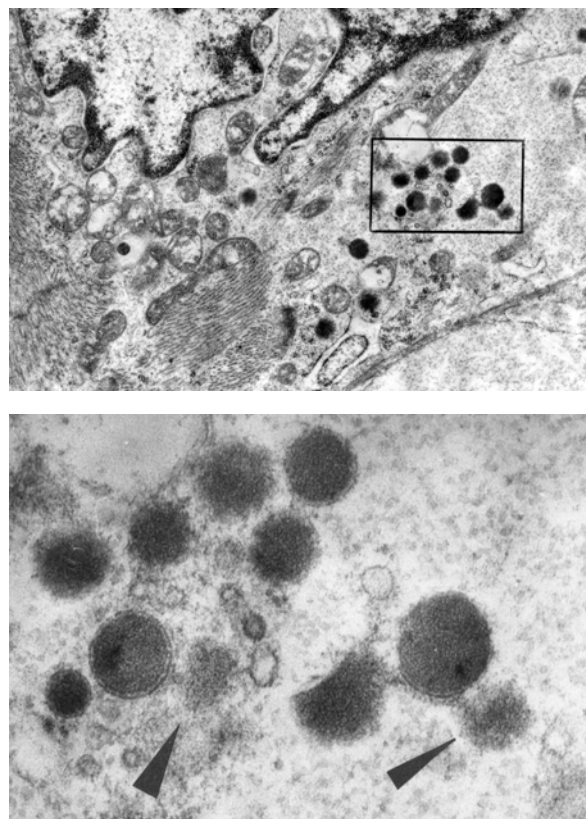


Рис.1. А - ділянка скоротливого кардіоміоцита в міокарді правого передсердя серця щура.  $\times 6000$ . Б - ділянка саркоплазми, що позначена рамкою на рисунку 3.1-А.  $\times 28000$ . Стрілками позначені „тіні” безмембранних гранул.

Безмембранні специфічні гранули в ще більшому ступені, ніж мембранні, коливалися за електронною щільністю та своїми розмірами – від 60 нм до 240 нм; в окремих спостереженнях у саркоплазмі кардіоміоцитів спостерігалися лише „тіні” безмембранних гранул.

Аналіз серійних ультратонких зрізів показав, що розташування мембранних і безмембранних гранул у саркоплазмі кардіоміоцитів не визначає певного переважання їх типів у парануклеарній або субсарколемальній локалізаціях. Обидва типи гранул зустрічалися у різних ділянках саркоплазми, причому у більшості випадків вони об'єднувалися у чітко угруповані кластери, по-

різному віддалені від комплексу Гольджі (рис.2). Кількість гранул у безпосередній близькості від комплексу Гольджі суттєво переважала над їх чисельністю в периферичних групах специфічних гранул. Досить часто в групах гранул спостерігалися мітохондрії з ультраструктурними ознаками помірної функціональної активності.

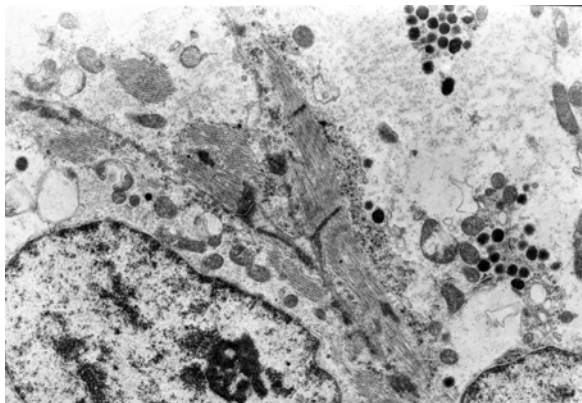


Рис.2. Групи секреторних гранул у саркоплазмі скоротливої клітини міокарда лівого передсердя щура.  $\times 5000$ . Стрілками позначені групи специфічних передсердних гранул.

Існування означених розмежованих груп, що містять мембранні та безмембранні гранули, вказує на дві важливі особливості функціонування секреторного апарату передсердних кардіоміоцитів. По-перше, формування гранул та їх переміщення від внутрішніх клітинних ділянок до субсарколемальної зони здійснюється дискретно, певними порціями по 10-25 гранул у кожній. По-друге, дегрануляція вмісту секреторних гранул відбувається не лише в зоні, що прилягає до клітинної мембрани, але й у глибоких ділянках саркоплазми кардіоміоцитів.

Поряд із специфічним секреторними гранулами в саркоплазмі передсердних кардіоміоцитів спостерігалися лізосоми, які до нещодавнього часу визначались у науковій літературі як С-тип секреторних гранул. При проведенні гістохімічного аналізу активності кислотної фосфатази, що є маркерним ферментом лізосом, виявилася виразна гетероморфність різних ділянок передсердного міокарда за рівнем накопичення гістохімічної мітки. Зокрема, найбільша активність кислотної фосфатази була характерною для клітин правого вухка; в міокарді лівого вухка і вільних стінок обох передсердь інтенсивність фосфатазної реакції була високою, але все ж поступалася значенням у правому вухку. Найнижча активність кислотної фосфатази визначалася у складі міжпередсердної перегородки.

Характерною особливістю розподілення гістохімічної мітки активності кислотної фосфатази у передсердному міокарді було те, що окремі кардіоміоцити виявляли різну здатність до гістохімічного забарвлення. Зокрема, в міокарді правого передсердя і обох вухок серця мозаїчність забар-

влених тканинних зрізів обумовлювалась переважанням темних клітин, між якими виявлялися поодинокі світлі кардіоміоцити (рис.3). Навпроти, у вільній стінці лівого передсердя, а також у складі міжпередсердної перегородки переважали клітини з низькою ферментативною активністю, між якими зустрічалися міоцити з інтенсивно забарвленою цитоплазмою (рис.4). Слід зазначити, що в нашому дослідженні не виявлялися перехідні форми скорочувальних клітин (за характером накопичення гістохімічної мітки на кислоту фосфатазу), що свідчить про існування принаймні двох чітко відрізнених популяцій кардіоміоцитів, що в неоднаковому ступені насичені лізосомами.



Рис.3. Ділянка міокарда правого передсердя щура. Світла клітина між інтенсивно забарвленими кардіоміоцитами. Гістохімічна реакція на кислоту фосфатазу за Gossrau.  $\times 1500$ .

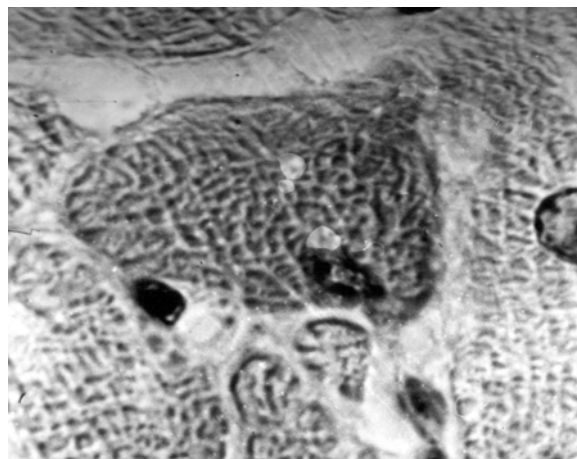


Рис.4. Ділянка міокарда міжпередсердної перегородки щура. Темна клітина між слабо забарвленими кардіоміоцитами. Гістохімічна реакція на кислоту фосфатазу за Gossrau.  $\times 1500$ .

Враховуючи спільне походження та певний функціональний зв'язок лізосом із секреторним апаратом передсердних кардіоміоцитів, а також чітку взаємну відповідність між вивченими гістохімічними й ультраструктурними показниками по різних ділянках передсердного міокарда, постає актуальним питання про те, чи відрізняються окремі клітини або клітинні комплекси за рівнем розвитку секреторного апарату. Для розв'язання



цього питання ми використали аналіз серійних ультратонких зрізів з визначенням кількості специфічних гранул у саркоплазмі одного кардіоміоцита, визначенням діаметра мембранних та безмембранних гранул і їх відносного об'єму.

Результати ультраструктурного дослідження показали, що передсердний міокард представлений двома субпопуляціями (типами) скорочувальних клітин, що розрізняються за означеними характеристиками.

Кардіоміоцити 1 типу були більш ніж на порядок щільніше насичені секреторними гранулами (у порівнянні з клітинами 2 типу) і 30-разово перевищували останні за відносним об'ємом гранул (табл. 1). Величина діаметру мембранних і безмембранних передсердних гранул не розрізнялася суттєво в кардіоміоцитах обох типів. Крім того, кількісне співвідношення мембранних і безмембранних гранул у саркоплазмі клітин 1 типу (високий рівень дегрануляції) істотно відрізнялося від цього співвідношення у клітинах 2 типу (низький рівень дегрануляції). Очевидно, що клітини 1 типу є значно більш високо спеціалізованими у відношенні секреції натрійуретичного пептиду у порівнянні з кардіоміоцитами 2 типу. У міокарді передсердь, серцевих вушок і міжпередсердної перегородки нам не вдалося зустріти навіть поодиноких клітин, що зовсім не мають передсердних гранул.

При вивченні взаємного розподілення клітин 1 і 2 типів у складі передсердного міокарда виявилося, що найбільша кількість високо спеціалізованих секреторних кардіоміоцитів міститься у правому вушці – понад 70% від всіх міоцитів (рис.5). У міокарді лівого вушка кількість клітин 1 типу становила близько половини клітинної популяції; у міокарді обох передсердь кількісно переважали клітини 2 типу; міжпередсердна перегородка включала лише 10-13% високо спеціалізованих кардіоміоцитів.

Таблиця 1

Ультраструктурні параметри секреторного апарату передсердних кардіоміоцитів 1 і 2 типів (M±m)

Параметри	1 тип	2 тип
Кількість мембранних гранул	108,4±18,1	6,3±2,0
Кількість безмембранних гранул	68,3±11,6	0,6±0,1
Діаметр мембранних гранул, мкм	174±23	193±21
Діаметр безмембранних гранул, мкм	96±19	104±22
Відносний об'єм мембранних гранул, %	1,96±0,36	0,12±0,04
Відносний об'єм безмембранних гранул, %	1,09±0,24	0,03±0,01
Кількість лізосом	44,3±6,2	14,8±2,1

Наведені дані відображають співвідношення

між 1 і 2 типами кардіоміоцитів у складі вивчених відділів передсердь, проте такі дані не є адекватною характеристикою загальної секреторної функції різних ділянок міокарда (наприклад, у міжпередсердній перегородці більша частина клітинних елементів не належить до скорочувального міокарда). За цих обставин, загальну секреторну активність ділянок передсердного міокарда оцінювали через підрахування середньої кількісної щільності специфічних гранул в одиниці об'єму тканини, але не в саркоплазмі певних кардіоміоцитів.

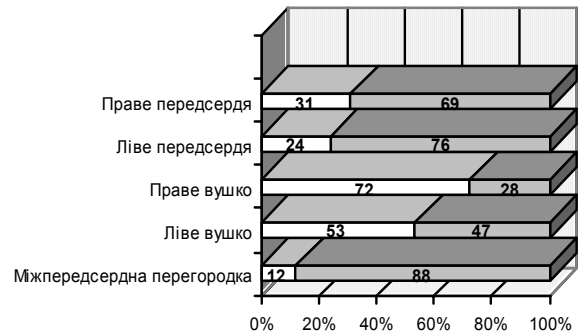


Рис.5. Кількісне співвідношення спеціалізованих секреторних кардіоміоцитів 1 і 2 типів (%) у ділянках передсердного міокарда шура.

Результати показали, що найвища секреторна активність характеризує міокард правого вушка; у лівому вушці і вільній стінці правого передсердя значення чисельної щільності специфічних гранул у середньому в 1,5 рази поступалися значенням правого вушка; щільність гранул у міокарді лівого передсердя і міжпередсердної перегородки була більш ніж 4-разово зниженою у порівнянні з відповідним значенням у правому вушці (табл. 2).

Таблиця 2

Чисельна щільність специфічних передсердних гранул у ділянках міокарда передсердь, мкм<sup>-3</sup> (M±m)

Ділянки	Контроль
Праве передсердя	3,13±0,37
Ліве передсердя	2,30±0,24
Праве вушко	4,83±0,46
Ліве вушко	3,21±0,35
Міжпередсердна перегородка	1,04±0,14

Примітка: \* - середні величини, що достовірно (p<0,05) відрізняються від показників контрольної групи.

Враховуючи дані кількісної та якісної оцінки секреторної активності передсердного міокарда, можна підсумувати, що вона суттєво розрізняється у вивчених ділянках передсердного міокарда і

залежить від співвідношення між двома субпопуляціями секреторних кардіоміоцитів – високо і низько спеціалізованими.

#### **Підсумок**

Формування секреторних гранул та їх переміщення від внутрішніх клітинних ділянок до субсарколемальної зони здійснюється дискретно, певними порціями по 10-25 гранул у кожній. Дегрануляція вмісту гранул відбувається не лише в зоні, що прилягає до клітинної мембрани, але й у глибоких ділянках саркоплазми кардіоміоцитів. Передсердний міокард представлений двома субпопуляціями (типами) скорочувальних клітин, що розрізняються за морфологічними характеристиками.

Найвища секреторна активність характеризує міокард правого вушка; у лівому вушку і вільній стінці правого передсердя значення чисельної щільності специфічних гранул у середньому в 1,5 рази поступаються значенням правого вушка; щільність гранул у міокарді лівого передсердя і міжпередсердної перегородки більш ніж 4-разово знижена у порівнянні з відповідним значенням у правому вушку.

#### **Перспективи подальших розробок**

Доцільним є залучення імуногістохімічних методів дослідження до вивчення властивостей секреторного апарату передсердних кардіоміоцитів.

### **Літературні джерела**

Boari B., Manfredini R., Fellin R. Atrial natriuretic peptides: a new diagnostic tool for the internist // *Recenti Prog. Med.*- 2005.- Vol.96, №6.-P.300-310.

Dahlstrom U., Alehagen U. Pro: Natriuretic peptides as diagnostic tool. The analysis should be a routine in heart failure diagnosis // *Lakartidningen.*- 2006.- Vol.103, №12.- P.927-929.

Gossrau R. Tetrazoliummethoden zum histochemischen Hydrolasennachweis // *Histochemistry.*- 1978.- Vol.58.- P.203-218.

Hoff de R.T., Rhines F.N. Quantative microscopy.- N.Y.: McGraw-Hill.- 1968.- 422 p.

Horobin R.W. Histochemistry and the light microscope // *Light microscopy in biology. A practical approach.*/ Ed. by A.J.Lacey.- Oxford: IRL Press at Oxford University.- 1989.- P.137-162.

In vitro expression of natriuretic peptides in cardiomyocytes differentiated from monkey embryonic stem cells / E.Abdelalim, T.Takada, F.Toyoda et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.*- 2006.- Vol.10, №2.- P.689-695.

Increased susceptibility to heart failure in response to volume overload in mice lacking natriuretic peptide receptor-A gene / T.Nishikimi, J.Hagaman, N.Takahashi et al. // *Cardiovasc. Res.*- 2005.- Vol.66, №1.- P. 94-103.

Influence of age on natriuretic peptides in patients with chronic heart failure: a comparison between ANP/NT-ANP and BNP/NT-proBNP / J.Hogenhuis, A.Voors, T.Jaarsma et al. // *Eur. J. Heart Fail.*- 2005.- Vol.7, №1.- P.81-86.

Mukaddam-Daher S. Natriuretic peptides as therapeutic targets // *Expert Opin. Ther. Targets.*- 2006.- Vol.10, №2.-P.239-252.

On the nature of atrial specific granules in rat and man / Cantin M., Pelletier N., Tautu C. et al. // *J. Moll. Cell. Cardiol.*- 1979.- Vol.11.- P.13-18.

Tsujino M., Hirata Y. Atrial natriuretic peptide (ANP), brain natriuretic peptide (BNP), C-type natriuretic peptide (CNP) // *Nippon Rinsho.*- 2005.- Vol.63, №8.- P.577-580.

Vesely D.L. Which of the cardiac natriuretic peptides is most effective for the treatment of congestive heart failure, renal failure and cancer? // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.*- 2006.- Vol.33, №3.- P.169-176.

Автандилов Г.Г. Медицинская морфометрия. Руководство.- М.: Медицина, 1990.- 384 с.

Карупу В.Я. Электронная микроскопия.- К.: Вища школа, 1984.- 162 с.

Павлович Е.Р. Количественное электронно-микроскопическое исследование строения миоцитов атриовентрикулярного узла и околоузлового миокарда межпредсердной перегородки сердца крысы // *Цитология.*- 1989.- Т. 31, №8.- С.914-921.

Румянцев П.П. Электронномикроскопический анализ "дедифференцировки" и митотического деления миоцитов предсердия при массивном инфаркте миокарда левого желудочка // *Арх. АГЭ.*- 1972.- №6.- С.115-121.

Твердохлеб И.В., Шпонька И.С., Машталир М.А. Прикладная биометрия для морфолога.- Днепропетровск, 1996. - 226 с.

#### **Мишалов В.Д. Состояние секреторного аппарата предсердных кардиомиоцитов крысы в разных участках предсердий.**

**Резюме.** Цель работы – определение основных морфологических признаков секреторного аппарата предсердных кардиомиоцитов крысы с количественной оценкой состояния специализированных секреторных клеток в разных участках предсердий. В исследовании использованы ультраструктурное и гистохимическое изучение миокарда правого и левого предсердий, правого и левого ушек сердца, а также межпредсердной перегородки 28 сердец шуров. Доказано, что формирование секреторных гранул и их перемещения от внутренних клеточных участков к субсарколемальной зоне осуществляется дискретно, определенными порциями по 10-25 гранул в каждой. Дегрануляция содержимого гранул происходит не только в зоне, которая прилежит к клеточной мембране, но и в глубоких участках саркоплазмы кардиомиоцитов. Предсердный миокард представлен двумя субпопуляциями (типами) сократительных клеток, которые различаются по морфологическим характеристикам. Высочайшая секреторная активность характеризует

миокард правого ушка; в левом ушке и свободной стенке правого предсердия значения численной плотности специфических гранул в среднем в 1,5 раза уступают значениям правого ушка; плотность гранул в миокарде левого предсердия и межпредсердной перегородки более чем в 4 раза снижена в сравнении с соответствующим значением в правом ушке.

**Ключевые слова:** кардиомиоцит, миокард, сердце крысы, секреторный аппарат.