

УДК 616-092.9:616-092.12:616.127:616-008:612.7

СООТНОШЕНИЕ ФИЗИЧЕСКОЙ УСТАЛОСТИ И МОРФОФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ МИОКАРДА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ ХРОНИЧЕСКОМ СТРЕССЕ

М. В. Кондашевская^{1,*}, В. Э. Цейликман², М. В. Комелькова², М. С. Лапшин²,
А. П. Сарапульцев^{3,4}, С. С. Лазуко⁵, О. П. Кужель⁵, Е. Б. Манухина^{2,6,7},
Г. Ф. Дауни (Н. F. Downey)^{2,7}, М. В. Черешнева³, академик РАН В. А. Черешнев^{3,4}

Поступило 14.11.2018 г.

Впервые проведён анализ соотношения между развитием специфической разновидности скелетно-мышечной усталости у крыс-самцов Wistar и морфофункциональными изменениями в миокарде при моделировании посттравматического стрессового расстройства (ПТСР). Обнаруженное при ПТСР усиление окислительного стресса в кардиомиоцитах, обусловившее трансформацию их структурных компонентов и элиминацию энергетических ресурсов, определено как одна из основных причин ускорения развития скелетно-мышечной усталости.

Ключевые слова: миокард, окислительный стресс, посттравматическое стрессовое расстройство, ПТСР, сердце, скелетно-мышечная усталость.

DOI: <https://doi.org/10.31857/S0869-56524852247-250>

Частота посттравматического стрессового расстройства (ПТСР), развивающегося после перенесённых тяжёлых переживаний и травм, составляет 7–8% в общей популяции, достигая 20% в отдельных группах населения с высокой психофизиологической нагрузкой (военные, спасатели) [1]. При этом ПТСР ассоциируется с повышенным на 53% риском развития различных заболеваний сердечно-сосудистой системы (ССС) [1, 2]. Однако вариабельность ответа ССС в условиях ПТСР очень высока и может проявляться как повышением, так и понижением артериального давления [3–5].

В настоящее время используются экспериментальные модели ПТСР, воспроизводящие комплекс нарушений деятельности ССС, включающий в себя повышенное системное артериальное давление,

высокий тонус коронарных сосудов и замедление коронарного кровотока на фоне повышенного уровня глюкокортикоидов [6]. При этом в когорте больных ПТСР широко распространены случаи пониженного артериального давления в сочетании со сниженным содержанием циркулирующих глюкокортикоидов, что не отражено в экспериментальных моделях [7]. Вследствие этого в 2018 г. нами была предложена модель ПТСР, позволяющая воспроизвести подобный ответ со стороны ССС [8].

Учитывая, что стойкие изменения ССС влияют на уровень физической выносливости, которая в значительной степени зависит от состояния миокарда, в настоящей работе поставлена цель — исследовать взаимосвязь между скоростью развития скелетно-мышечной усталости и морфофункциональными изменениями миокарда в условиях модели ПТСР с пониженным артериальным давлением и уровнем кортикостерона у крыс Wistar.

В экспериментах использовали половозрелых крыс-самцов популяции Wistar с массой тела 210–230 г. Крыс содержали в стандартных условиях при 12-часовом световом периоде. Все экспериментальные процедуры были одобрены Локальным этическим комитетом и проведены в соответствии с регламентом декларации ЕС от 2010 г. об использовании лабораторных животных. Крыс случайно разделили на две группы по 20 голов в каждой: контрольная группа (интактные животные) и опытная группа с ПТСР. Моделировали ПТСР, используя

¹ Научно-исследовательский институт морфологии человека, Москва

² Южно-Уральский государственный университет, Челябинск

³ Институт иммунологии и физиологии Уральского отделения Российской Академии наук, Екатеринбург

⁴ Уральский федеральный университет им. Б.Н. Ельцина, Екатеринбург

⁵ Витебский государственный медицинский университет, Республика Беларусь

⁶ Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии, Москва

⁷ University of North Texas Health Science Center, USA

*E-mail: marivladiko@mail.ru

предаторный стресс — 10-минутная экспозиция ежедневно в течение 10 сут в клетке с крысами материала, пропитанного кошачьей мочой, и последующее содержание в течение 14 сут в обычных условиях [8]. Оценку влияния ПТСП на скорость развития скелетно-мышечной усталости осуществляли с помощью ротарода Panlab LE8500 (скорость 30 об./мин, “Panlab, S.L.U.”, Испания).

Животных выводили из опыта передозировкой диэтилового эфира, после чего осуществляли забор органов для гистоморфологического исследования с помощью микроскопа Axioplan 2 imaging и программ AxiVision (“Carl Zeiss”, Германия) и ImageJ (NIH, США). Гистологические срезы толщиной 5–7 мкм готовили по стандартной методике с последующей окраской гематоксилином и эозином. Содержание гликогена определяли по методу А.Л. Шабадша [9]. Общий белок определяли методом окрашивания бромфеноловым синим [9]. В гомогенатах сердца определяли уровень перекисного окисления липидов (ПОЛ) по методике И.А. Волчегорского с соавт. [10], содержание карбонилированных белков на базальном уровне и в присутствии индуктора свободнорадикального окисления Fe^{+2}/H_2O_2 — по методике Е.Е. Дубининой и соавт. [11].

Статистический анализ осуществляли, используя пакет прикладных программ STATISTICA 8.0, непараметрический критерий *U* Вилкоксона–Манна–Уитни и регрессионный анализ. Результаты выражали как $Me (Q_n; Q_v)$ — медиана, нижний и верхний квартили. Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0,05$.

Мы установили, что развитие ПТСП привело к достоверному снижению ($p = 0,025$) скелетно-мы-

шечной выносливости крыс: контроль 49,5 (28; 54) с, $n = 10$; опыт 9,0 (7,3; 9,0) с, $n = 10$. У 80% животных это сопровождалось формированием характерного комплекса гистоморфологических изменений в миокарде: нарушение поперечной исчерченности мышечных волокон и гомогенизация хроматина в ядрах на фоне интерстициального отёка (рис. 1). При этом мы зарегистрировали падение содержания гликогена в мышечных волокнах на 33,3% по сравнению с контролем (табл. 1), которое и явилась одной из основных причин снижения выносливости и было связано с нарушением баланса между гликогенолизом и гликогеногенезом [12].

В процессе биохимического исследования у животных с ПТСП мы выявили увеличение на 18,9% содержания растворимых в изопропанолe кетодиенов и сопряжённых триенов (табл. 1), что свидетельствовало об интенсификации процессов ПОЛ. Повышение содержания карбонилированных белков после их инкубации в системе Fe^{2+}/H_2O_2 (табл. 1) — признак повышенной чувствительности белков миокарда к индукторам окислительного стресса. Увеличение на 38% содержания алифатических кетон-динитрофенилгидразонов нейтрального характера (регистрация при $\lambda = 370$ нм) и на 59,5% — алифатических кетон-динитрофенилгидразонов основного характера ($\lambda = 430$ нм) свидетельствовало о деградации белков кардиомиоцитов при ПТСП. Также мы обнаружили увеличение на 23% оптической плотности окраски на общие белки, что свидетельствовало об увеличении структур с большим количеством активных SH-групп (табл. 1) и явилось дополнительным признаком нарушений белковой структуры. Линейная зависимость между этим гистохимическим показателем (y) и содержанием ин-

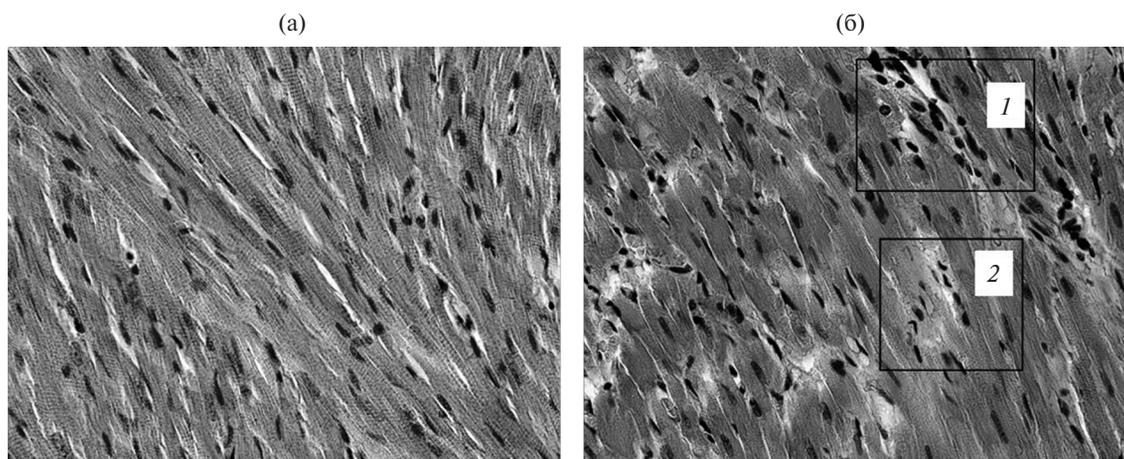


Рис. 1. Миокард интактных животных без структурных изменений (а). (б) — миокард животных с ПТСП: слабовыраженный отёк интерстиция — 1, очаговая миомалация кардиомиоцитов с фокусами кариопикноза — 2. Окраска гематоксилином и эозином, ув. $\times 400$.

Таблица 1. Показатели морфофункционального состояния миокарда при посттравматическом стрессовом расстройстве

Показатель	Контроль	Опыт (ПТСР)
Оптическая плотность срезов миокарда при окраске на гликоген, усл. ед.	279,8 (241,4; 298,9)	209,98* (208,6; 216,7)
Оптическая плотность срезов миокарда при окраске бромфеноловым синим (окраска на общие белки), усл. ед.	175,7 (170,4; 180,9)	216,2* (207,9; 221,8)
Кетодиены и сопряжённые триены (изопропанольная фаза), е.о.и.	0,422 (0,393; 0,454)	0,502* (0,494; 0,576)
аКДФГ _н , мкмоль/г белка (индукция Fe ²⁺ /H ₂ O ₂)	27,40 (19,93; 32,48)	37,828* (28,05; 43,64)
аКДФГ _{осн} , мкмоль/г белка (индукция Fe ²⁺ /H ₂ O ₂)	19,04 (10,36; 22,79)	30,37* (21,61; 34,62)

Примечание. аКДФГ_н — алифатические кетон-динитрофенилгидразоны нейтрального характера (λ = 370 нм); аКДФГ_{осн} — алифатические кетон-динитрофенилгидразоны основного характера (λ = 430 нм), е.о.и. — единицы окислительного индекса. Me (Q_н; Q_в), n = 10 для каждой группы, *p < 0,05 при сравнении с контролем.

дуцированных карбонилированных белков выражается уравнением регрессии $y = 194,428 + 0,633x$, где x — содержание белков, карбонилированных в системе Fe²⁺/H₂O₂.

Зависимость между содержанием гликогена (y) и показателями окислительного стресса в миокарде животных с ПТСР выражается уравнением множественной линейной регрессии

$$y = 279,491 - 65,951 \cdot x_1 - 0,172 \cdot x_2 - 0,939 \cdot x_3,$$

где x₁ — содержание растворимых в изопропанол кетодиенов и сопряжённых триенов, x₂ — содержание карбонилированных белков, x₃ — содержание индуцированных карбонилированных белков.

В проведённом нами исследовании мы впервые установили, что при ПТСР наблюдается ускорение развития специфической разновидности скелетно-мышечной усталости, развивающейся на фоне истощения энергетических резервов гликогена в миокарде. В условиях физической нагрузки недостаточное обеспечение органа энергетическими ресурсами индуцирует снижение его работоспособности. Ранее выявленное [8] в условиях данной модели ПТСР снижение уровня циркулирующего кортикостерона, сопровождающееся дисфункцией надпочечников, позволило провести аналогию между гипокортикоидными особенностями ПТСР и аддисонизмом, при котором также наблюдалась повышенная скелетно-мышечная утомляемость.

Полученные результаты впервые показали наличие зависимости морфологических изменений миокарда от уровня окислительного стресса в органе в условиях ПТСР. Важно отметить, что у экспериментальных животных было повышено содержание кетодиенов и сопряжённых триенов, считающихся наиболее токсичными среди продуктов ПОЛ. Примечательно, что повышенный уровень этих продуктов ПОЛ был обнаружен в изопропанольной фазе, в которой при экстракции аккумулируются фосфолипиды клеточных мембран [10], что приводит к окислительной деструкции мембранных белков.

Дальнейшее исследование роли ПОЛ в формировании морфофункциональных расстройств миокарда при гипокортикоидных состояниях имеет крайне высокую значимость, так как открывает новые перспективы для разработки патогенетически обоснованной терапии коррекции нарушений ССС при ПТСР.

Источники финансирования. Исследование выполнено в рамках базовой части Государственного задания Минобрнауки России № 17.7255.2017/8.9 и Государственного задания ИИФ УрО РАН (тема № АААА-А18-118020590108-7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. *Edmondson D., von Känel R.* Post-Traumatic Stress Disorder and Cardiovascular Disease // *Lancet Psych.* 2017. V. 4. P. 320–329.
2. *Pitman R.K., Rasmusson A.M., Koenen K.C., et al.* Biological Studies of Post-Traumatic Stress Disorder // *Nat. Rev. Neurosci.* 2012. V. 13. P. 769–787.
3. *Koenen K.C., Sumner J.A., Gilsanz P., et al.* Post-Traumatic Stress Disorder and Cardiometabolic Disease: Improving Causal Inference to Inform Practice // *Psychol. Med.* 2017. V. 47. P. 209–225.
4. *Oddone A.E., Dennis P.A., Calhoun P.S., et al.* Orthostatic Hypotension in Young Adults with and without Posttraumatic Stress Disorder // *Psychol. Trauma.* 2015. V. 7. P. 229–233.
5. *Ebner K., Singewald N.* Individual Differences in Stress Susceptibility and Stress Inhibitory Mechanisms // *Curr. Opin. Behav. Sci.* 2017. V. 14. P. 54–64.
6. *Zoladz P.R., Park C.R., Fleshner M., et al.* Psychosocial Predator-Based Animal Model of PTSD Produces Physiological and Behavioral Sequelae and a Traumatic Memory Four Months Following Stress Onset // *Physiol. Behav.* 2015. V. 147. P. 183–192.
7. *Sapolsky R.M., Romero L.M., Munck A.U.* How Do Glucocorticoids Influence Stress Responses? Integrating Permissive, Suppressive, Stimulatory, and Preparative Actions // *Endocr. Rev.* 2000. V. 21. P. 55–89.

8. *Lazuko S.S., Kuzhel O.P., Belyaeva L.E., Manukhina E.B., Fred Downey H., Tseylikman O.B., Komelkova M.V., Tseylikman V.E.* Posttraumatic Stress Disorder Disturbs Coronary Tone and Its Regulatory Mechanisms // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2018. V. 38. P. 209–217.
9. Клиническая лабораторная аналитика. Т. II. Частные аналитические технологии в клинической лаборатории / Под ред. В.В. Меньшикова. М.: Лабинформ-РАМЛД, 1999. 352 с.
10. *Волчегорский И.А., Долгушин И.И., Колесников О.Л., Цейликман В.Э.* Экспериментальное моделирование и лабораторная оценка адаптационных реакций организма. Челябинск: Изд-во Челяб. гос. пед. ун-та, 2000. 167 с.
11. *Дубинина Е.Е., Бурмистров С.О., Ходов Д.А., Порохов И.Г.* Окислительная модификация белков сыворотки крови человека, метод ее определения // *Вопр. мед. химии.* 1995. Т. 41. № 1. С. 24–26.
12. *Chandramouli C., Varma U., Stevens E.M., et al.* Myocardial Glycogen Dynamics: New Perspectives on Disease Mechanisms // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2015. V. 42. P. 415–425.

PHYSICAL FATIGUE AND THE MORFOFUNCTIONAL STATE OF MYOCARDIUM IN EXPERIMENTAL CHRONIC STRESS

M. V. Kondashevskaya, V. E. Tseylikman, M. V. Komelkova, M. S. Lapshin, A. P. Sarapultsev, S. S. Lazuko, O. P. Kuzhel, E. B. Manukhina, H. F. Downey, M. V. Chereshneva, Academician of the RAS V. A. Chereshnev

Received November 14, 2018

The relationship between skeletal muscle fatigue and morpho-functional alterations in the myocardium was analyzed for the first time in Wistar male rats exposed to chronic stress. Post traumatic stress disorder (PTSD) was associated with signs of increased oxidative stress, which apparently induced the changes in cardiomyocyte structural components and the acceleration of skeletal and muscular fatigue.

Keywords: myocardium, oxidative stress, post-traumatic stress disorder, PTSD, heart, musculoskeletal fatigue.