

# АУТОФАГИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИОКАРДА ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА ПРИ ОСТРОЙ ОЧАГОВОЙ ИШЕМИИ

М.Л.Благоднравов, А.Ю.Коршунова, М.М.Азова\*, С.А.Бондарь, В.А.Фролов

*Кафедра общей патологии и патологической физиологии, \*кафедра биологии и общей генетики медицинского института ФГАОУ ВО РУДН, Москва, РФ*

В эксперименте на кроликах исследована активность аутофагии кардиомиоцитов по содержанию белка беклин-1, а также морфологическое состояние миокарда левого желудочка на 1, 3 и 5-е сутки от начала возникновения очаговой ишемии, вызванной перевязкой нисходящей ветви левой коронарной артерии. Показано, что морфологические изменения в миокарде левого желудочка сопровождаются увеличением интенсивности аутофагии кардиомиоцитов, максимально выраженным на 1-е сутки от начала нарушения кровообращения.

**Ключевые слова:** аутофагия, беклин-1, кардиомиоцит, миокард, очаговая ишемия

Большое внимание в исследовании патогенеза ИБС уделяется возможности управления программной клеточной гибелью с использованием различных средств фармакотерапии. Известно, что в комплексе дегенеративных изменений миокарда, возникающих в результате ишемии, значительную роль играет активация апоптоза кардиомиоцитов [2]. Одним из альтернативных механизмов, способствующих деградации и потере клеток под влиянием ряда неблагоприятных факторов, является аутофагия, при которой посредством аутофагосом, окруженных двойной мембраной, осуществляется захват отдельных органелл и фрагментов цитоплазмы с последующим разрушением гидролазами [4]. Инициация программы аутофагии связана с воздействием различных индукторов клеточного стресса, таких как дефицит питательных веществ, гипоксия, АФК, повреждение ДНК, повреждение органелл [7].

Необходимо отметить, что аутофагия в одних случаях может выступать как механизм, сопровождающий программную клеточную гибель, а в других — как репаративное явление,

обеспечивающее выживание клетки за счет мобилизации ее ресурсов [8]. В связи с этим появилось понятие об оптимуме активности данного процесса: при недостаточности аутофагии ускоряется старение клетки, а при ее усилении следует гибель [1].

В ряде работ выдвигается гипотеза, согласно которой усиление аутофагии представляет собой ключевой механизм, защищающий миокард от последствий повреждения, вызванного ишемией [9,10]. При этом отсутствуют данные об активности процессов, опосредующих аутофагию кардиомиоцитов, в динамике структурных изменений, вызванных острой очаговой ишемией миокарда. Изучению данного вопроса и посвящено наше исследование.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент выполнен на кроликах-самцах породы шиншилла массой 3-3.5 кг. Содержание животных и работа с ними проводились в соответствии с приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г. и Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.).

*Адрес для корреспонденции:* blagdnravovm@mail.ru. Благоднравов М.Л.

Животные были разделены на 4 группы по 4 особи: контрольную (интактные кролики и 3 опытные — кролики с острой очаговой ишемией левого желудочка (ЛЖ) на 1, 3 и 5-е сутки после воздействия соответственно. Очаговую ишемию ЛЖ моделировали путем перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии на границе ее средней и нижней трети под общим обезболиванием.

У кроликов под общим обезболиванием выполняли торакотомию и экстирпацию сердца. Образцы макроскопически жизнеспособного миокарда ЛЖ, граничащего с областью некроза, фиксировали в течение 72 ч в 4% нейтральном параформальдегиде. Затем материал обрабатывали и заливали в парафин по общепринятой методике. Гистологические срезы толщиной 5 мкм готовили на микротоме "Slidt-2003" и наносили на стекла с поли-L-лизинным покрытием (для иммуногистохимического исследования) и на обычные предметные стекла (для морфометрического анализа). Срезы депарафинировали ксилолом и проводили по спиртам нисходящей концентрации.

Активность аутофагии кардиомиоцитов оценивали по содержанию белка беклина-1 методом постановки иммуногистохимической реакции с использованием первичных кроличьих поликлональных антител ("SantaCruzBiotechnology Inc."). Беклин-1 играет центральную роль в процессе аутофагии, обеспечивая секвестрацию удаляемых органелл [3,5]. Результаты реакции визуализировали при помощи набора реагентов "UltraVisionDetectionSystem" ("Thermo Scientific"). Препараты докрашивали гематоксилином Майера. Реакция считалась положительной при появлении коричневой окраски. При 400-кратном увеличении с использованием сетки Автандилова исследовали 30 полей зрения в каждом препарате. При этом определяли отношение количества равноудаленных точек, приходящихся на пози-

тивно окрашенную цитоплазму кардиомиоцитов, к общему количеству точек, занимаемых цитоплазмой кардиомиоцитов (в процентах).

Морфометрический анализ гистологических срезов миокарда проводили при окрашивании гематоксилином и эозином. Методом световой микроскопии при увеличении 400 в 30 полях зрения оценивали содержание (в объемных процентах, об.%) миофибрилл, ядер кардиомиоцитов, участков деструкции и инфильтрации, объем внеклеточного пространства с использованием сетки Автандилова. Также рассчитывали "ядерно-цитоплазматическое отношение": процентное отношение ядер кардиомиоцитов к числу мышечных волокон кардиомиоцитов.

Достоверность полученных данных определяли при помощи *t* критерия Стьюдента (при  $p \leq 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На 1-е сутки от начала очаговой ишемии ЛЖ наблюдалось достоверное ( $p \leq 0.05$ ) увеличение содержания белка беклина-1 в цитоплазме кардиомиоцитов ( $18 \pm 3\%$  по сравнению с  $3 \pm 0.5\%$  в контроле). Затем на 3-и и 5-е сутки содержание беклина-1 постепенно снижалось (до  $14 \pm 3$  и  $8 \pm 2\%$  соответственно), но оставалось статистически значимо ( $p \leq 0.05$ ) выше контрольного уровня. При качественном анализе срезов миокарда отмечался мозаичный, неравномерный характер положительной иммуногистохимической реакции. Наблюдалась тенденция к увеличению количества положительно окрашенных миофибрилл по мере приближения к зоне, непосредственно граничащей с очагом некроза миокарда. В то же время во всех препаратах частота положительной окраски была взаимосвязана с плотностью сосудистой сети: процессы аутофагии были наиболее выражены в слоях миокарда с более развитым кровоснабжением.

Данные морфометрии гистологических срезов миокарда ЛЖ через 1, 3 и 5 сут от возникновения острой очаговой ишемии ( $M \pm m$ )

Структурные элементы	Контроль	Ишемия ЛЖ		
		1-е сутки	3-и сутки	5-е сутки
Мышечные волокна, об.%	88.04±0.37	72.81±2.05*	59.14±3.22**	51.69±3.72*
Ядра, об.%	5.48±0.21	4.16±0.24*	3.17±0.24**	3.17±0.35*
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0.060±0.003	0.060±0.003	0.050±0.004*	0.040±0.004*
Сосуды, об.%	1.01±0.77	0.30±0.13	1.50±0.45+	1.64±0.53
Участки деструкции, об.%	0.29±0.06	6.21±1.24*	21.94±2.98**	29.76±3.80*
Внеклеточное пространство, об.%	6.19±0.32	16.14±1.34*	14.03±1.00*	13.67±1.11*

**Примечание.**  $p \leq 0.05$  по сравнению \* с контролем, \*\* с предыдущим сроком исследования.

Также отмечалась неоднородность иммуногистохимического окрашивания кардиомиоцитов, что, вероятнее всего, связано с разной степенью активности аутофагии.

На 1-е сутки эксперимента отмечались умеренно выраженные структурные изменения в миокарде ЛЖ: гомогенизация поперечной исчерченности кардиомиоцитов, очаговая волнообразная направленность мышечных волокон, а также единичные участки геморрагии с форменными элементами крови. По сравнению с контрольной группой достоверно уменьшалось количество миофибрилл, увеличивалось внеклеточное пространство (таблица), что может быть вызвано как развитием внеклеточного отека, так и уменьшением размера мышечных волокон. Также отмечалось статистически значимое уменьшение количества ядер кардиомиоцитов в ЛЖ. Резко увеличивалась площадь участков деструкции ткани.

На 3-и сутки исследования границы миофибрилл по сравнению с 1-ми сутками были менее четкими, нарушалась направленность миофибрилл, встречались участки пересокращения мышечных волокон, зоны геморрагии становились более широкими. По данным морфометрии, относительно 1-х суток достоверно снижалось содержание миофибрилл и увеличивалось количество участков деструкции. Продолжалось снижение количества ядер кардиомиоцитов. Объем внеклеточного пространства оставался на уровне 1-х суток.

По истечении 5 сут патологические изменения миокарда приобретали еще более выраженный характер. Нарастала гомогенизация миофибрилл, появлялась эозинофильная инфильтрация миокарда, границы многих клеток были нечеткими. Отмечалась тенденция к уменьшению содержания миофибрилл и увеличению участков деструкции по сравнению с 3-ми сутками. Общее количество ядер не изменялось относительно предыдущего срока исследования.

Ядерно-цитоплазматическое отношение было незначительно, но достоверно снижено по сравнению с контролем на 3-и и 5-е сутки исследования, что, по-видимому, можно объяснить довольно выраженной деструкцией ядер на фоне снижения численности жизнеспособных кардиомиоцитов.

Учитывая нарастающий характер структурных изменений миокарда, вызванных его ишемией, можно предположить, что постепенное снижение интенсивности аутофагии кардиомиоцитов относительно пикового уровня 1-х суток связано с уменьшением энергии, расходуемой клетками на адаптационно-приспособительные процессы. Существует мнение, согласно которому аутофагия представляет собой механизм, защищающий кардиомиоциты от гибели и препятствующий расширению зоны некроза при инфаркте миокарда [6].

## ЛИТЕРАТУРА

1. Пуньшев А.Б. // Цитология. 2014. Т. 56, № 3. С. 179-196.
2. Abbate A., Morales C., De Falco M. et al. // Int. J. Cardiol. 2007. Vol. 121, N 1. P. 109-111.
3. Gozuacik D., Kimchi A. // Oncogene. 2004. Vol. 23, N 16. P. 2891-2906.
4. He C., Klionsky D.J. // Annu. Rev. Genet. 2009. Vol. 43. P. 67-93.
5. Meijer A.J., Codogno P. // Int. J. Biochem. Cell Biol. 2004. Vol. 36, N 12. P. 2445-2462.
6. Kanamori H., Takemura G., Goto K. et al. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2011. Vol. 300, N 6. P. H2261-H2271.
7. Kroemer G., Marino G., Levine B. // Mol. Cell. 2010. Vol. 40, N 2. P. 280-293.
8. Ravikumar B., Sarkar S., Davies J.E. et al. // Physiol. Rev. 2010. Vol. 90, N 4. P. 1383-1435.
9. Sabe A.A., Elmadhun N.Y., Dalal R.S. et al. // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 2014. Vol. 147, N 2. P. 792-798.
10. Yan L., Vatner D.E., Kim S.J. et al. // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2005. Vol. 102, N 39. P. 13 807-13 812.

Получено 14.01.15