ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ИССЛЕДОВАНИЯ

УДК 616. 127 – 002 – 092 : 001 : 851.5

Фефелова Е.В., Цыбиков Н.Н., Терешков П.П., Сепп А.В., Дутов А.А.

МОРФОФЕНОТИПИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИОКАРДА КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГИПЕРГОМОЦИСТЕИНЕМИИ

ГБОУ ВПО Читинская государственная медицинская академия, г. Чита

Резюме. *Выявлены структурные изменения в миокарде, характеризующиеся уменьшением количества кардиомиоцитов, развитием признаков воспаления. Гибель миокардиоцитов развивалась в большей степени путем апоптоза, и в меньшей – некроза. В эндотелиоцитах сосудов миокарда выявлена экспрессия тканевого фактора и параллельно с этим, сокращение активированного частичного тромбопластинового и тромбинового времени, повышение содержания растворимого фибрин - мономерного комплекса, а также резкое увеличение концентрации фактора некроза опухолей.*
Ключевые слова: *экспериментальная гипергомоцистеинемия, миокард, некроз, апоптоз, тканевой фактор.*

E.V. Fefelova, N.N. Tsybikov, P.P. Tereshkov, A.V. Sepp, A.A. Dutov

MYOCARDIUM MORPHOPHENOTYPIC CHANGES IN RATS WITH EXPERIMENTAL HYPERHOMOCYSTEINEMIA

Summary. *Myocardium structural changes associated with the decrease of the number of cardiomyocytes and the symptoms of inflammation have been revealed. The destruction of cardiomyocytes occurred greatly in apoptosis and to less extent it was marked in necrosis. The expression of tissue factor in the endotheliocytes of myocardium vessels, the reduction of activated partial thromboplastic and thrombin time, the increase of the content of the soluble fibrin monomeric complex as well as sharp increase of concentration of tumor necrosis factor were revealed in our study.*
Keywords: *experimental hyperhomocysteinemia, myocardium, necrosis, apoptosis, tissue factor.*

Введение. На протяжении ряда десятилетий гипергомоцистеинемия считается основным фактором риска развития сердечно-сосудистой патологии [8, 15]. Гомоцистеин (ГЦ) может накапливаться в повышенном количестве в результате нарушения синтеза метионина и цистеина, вызванного недостатком фолиевой кислоты и витаминов группы В, или вследствие, генетически обусловленного полиморфизма – точечной мутации, заключающейся в замене цитозина (С) на тимин (Т) в нуклеотиде (С677Т) гена 5’-10’-метилентетрагидрофолат редуктазы [15]. Действие повышенной концентрации гомоцистеина сопровождается не только развитием дисфункции эндотелия, но и активацией системы свертывания крови, повышением митотической активности гладкомышечных клеток сосудов [2, 15, 16, 20]. Кроме этого, описана способность данного аминотиола связываться с группой глутаматных рецепторов, имеющихся на нейронах и ряде других клеток: мегакариоцитах, тромбоцитах, эритроцитах, лимфоцитах, нейтрофилах, миокардиоцитах [3, 4, 23]. В физиологических условиях концентрация гомоцистеина в плазме крови низка, поэтому он не может выступать в качестве конкурента при взаимодействии с лиганд-связывающим участком рецепторов. При высоких концентрациях он конкурирует с глутаматом за связывание с рецепторами, вызывает их гиперактивацию, что влечет за собой сильный окислительный стресс, и как следствие, сильную деполяризацию митохондрий [23], выход кальция и инициацию апоптоза. Наряду с этим было показано, что в одних экспериментальных моделях, например, в эпителиальных клетках, ГЦ вызывал окислительный эффект [20], а в других, таких как нейроны и астроциты, оказывал восстанавливающий эффект [19].

В то же время, Александрова Е.Б. в своем исследовании продемонстрировала, что гипергомоцистеинемия (ГГЦ) играет немаловажную роль в механизмах ремоделирования миокарда с потерей кардиомиоцитов, развитием интерстициального фиброза, сопровождающие гипертрофию миокарда и ИБС, приводящих, в конечном счёте, к диастолической и систоли-

ческой дисфункции миокарда левого желудочка [1]. В связи с этим, вопрос вовлеченности ГЦ в индукцию окислительного стресса и апоптоза пока остается открытым. Исходя из сказанного, нам представилось интересным изучить количественные и качественные изменения в клетках миокарда при экспериментальной гипергомоцистеинемии.

Материалы и методы исследования. В эксперименте использовались 40 белых беспородных крыс-самцов средней массой 150 граммов, одного возраста. Всех животных разделили на 4 группы по 10 в каждой. Крысы содержались в условиях вивария НИИ Молекулярной медицины Читинской государственной медицинской академии в соответствии с «Правилами проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу МЗ СССР №755 от 12.08.77 г.) и «Правилами Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и иных научных целей».

Повышенный уровень гомоцистеина в крови опытных животных создавали путем внутрибрюшинного введения гомоцистеина в дозе 0,1 мкмоль на 1 г веса один раз в день в течение 14 суток, взяв за основу модель гипергомоцистеинемии Иванова А.В. и соавторов [6]. Крысам контрольной группы внутрибрюшинно вводили физиологический раствор в эквивалентном объеме. Из эксперимента животных выводили путем передозировки эфира.

Для количественной оценки общей популяции кардиомиоцитов в сердце применяли метод щелочной диссоциации фиксированных тканей [7]. Для гистологического исследования миокард фиксировали в 10% растворе нейтрального формалина. Серийные парафиновые срезы толщиной 4-5 мкм изготавливали по стандартной методике. Гистологические срезы окрашивали гематоксилин-эозином; для выявления компонентов соединительной ткани – пикрофуксином по Ван Гизону. Мофометрический анализ проводили с помощью микроскопа «Opticam PRO5» с использованием цифровой фотокамеры «Olympus CX-41» и программы анализа изображений «Optika Vision Pro» версии 2.7.

Цитометрический анализ проводили в гомогенате миокарда крыс на проточном цитофлюориметре "Cytomics FC-500" (Beckman Coulter, USA), при этом регистрировали суммарно не менее 10000 событий. В образцах оценивали интенсивность флуоресценции Annexin V и PI.

Концентрацию гомоцистеина в сыворотке крови определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с ультрафиолетовой детекцией при 330 нм (колонка Chromolith 100×4,6 мм, элюент ацетонитрил – 0,05 М/лимонная кислота в соотношении 10/90) [5].

Определение концентрации цитокинов в плазме крови крыс проводили с помощью системы мультиплексного анализа FlowCytomix 5 plex (BMS826FF) в комбинации с Simplex Kit (BMS8635FF) соответствующих аналитов для крыс компании «Bender Medsystems» (Австрия). Полученные пробы анализировали на проточном цитофлуориметре Cytomics FC 500 («Beckman Coulter», США). Обработку цитометрических файлов осуществляли в программном обеспечении FlowCytomixPro3.0 («Bender Medsystems», Австрия).

Коагулогические показатели определяли в крови, взятой из подключичной вены. Кровь стабилизировали 3,8% раствором цитрата натрия в соотношении 9:1. Исследование проводили на программируемом оптико-механическом коагулометре – Минилаб 701 с использованием наборов для определения тромбин-теста (ТВ), активированного частичного тромбопластинового времени (АЧТВ), растворимого фибрин мономерного комплекса (РФМК) (производство НПО РЕНАМ, Россия).

Экспрессию тканевого фактора (TF) оценивали иммуногистохимическим методом. Исследование было выполнено с использованием парафиновых срезов миокарда экспериментальных животных биотин-стрептавидиновым иммунопероксидазным методом с крысиными моноклональными антителами к тканевому фактору производства Santa Cruz biotechnology (USA). Результат оценивали полуколичественно: как отрицательный, если окрашенных клеток определялось менее чем 10%; в остальных случаях, положительный результат оценивался количественно по шкале от 1 до 4 баллов. Шкала была построена следующим образом: 1 балл – 10-25% окрашенных клеток; 2 балла – 25-50% окрашенных клеток; 3 балла – 50-75% окрашенных клеток; 4 балла – более 75% окрашенных клеток, с расчетом критерия χ^2 (Хи-квадрат).

Статистический анализ полученных данных проводили с помощью программы Statistica 6.1 (StatSoft). Данные представлены в виде медианы и межквартильных интервалов (25-го; 75-го перцентилей); сравнение зависимых выборок проводили с помощью критерия Вилкоксона; сравнение независимых выборок проводили с помощью U-критерия Манна-Уитни. Различия считали значимыми при $p \leq 0,05$.

Результаты и обсуждение. Гипергомоцистеинемию диагностируют в том случае, если уровень гомоцистеина в крови превышает 15 мкмоль/л [15]. Содержание гомоцистеина у здоровых животных колеблется в тех же пределах, что и у человека [17]. В нашем исследовании, на 14 сутки эксперимента зарегистрирована умеренная гипергомоцистеинемия: содержание ГЦ составило 7,8 (6,02; 8,96) мкмоль/л в контрольной и 28,6 (20,5; 32,4) мкмоль/л в опытной группах ($p = 0,00001$).

Масса сердца у всех исследуемых животных не изменялась. При этом, снизилось как абсолютное количество кардиомиоцитов (КМЦ) (8, 01 (7,75; 8,3) в опытной группе, против 11,086 (10,54; 12,54) в контрольной ($p=0,036$)), так и их диаметр (8,5 (7,01; 10,01) и 12,25 (11,51; 13,01) соответственно ($p=0,083$)), изменилось соотношение одно- и двуядерных клеток: доля одноядерных уменьшилась (на 44,1%), а двуядерных – увеличивалась ($p=0,046$).

Кроме этого, в миокарде животных опытной группы зафиксированы: межуточный и межклеточный отек, белковая дистрофия основного массива кардиомиоцитов, наряду с неравномерной, диффузно-очаговой гипертрофией части мышечных волокон. Обнаружены клетки с крупными гиперхромными ядрами и линейными размерами, превышающими средние значения контрольных группы в 1,2 и 1,4 раза, диффузный перимускулярный кардиосклероз максимально выраженный в субэндокардиальной зоне. У 30% животных, в межуточной строме отмечалось формирование диффузных лимфогистиоцитарных инфильтратов с примесью плазматических клеток, фибриноидное набухание периваскулярной стромы и признаки васкулитов. При этом, возможно нарушение выработки межклеточных медиаторов, что в свою очередь, приведет к развитию вторичной альтерации [9, 10, 11, 12, 13].

По нашему мнению, снижение абсолютного числа КМЦ может быть обусловлено гибелью клеток миокарда и истощением его регенераторных резервов. Для уточнения механизмов гибели кардиомиоцитов нами с помощью метода проточной цитофлуометрии в гомогенате миокарда определялись маркеры некроза и апоптоза. Известно, что пропидиум иодид (PI) может войти в клетку и связаться с ДНК только при условии нарушения целостности ее мембраны, что возможно лишь при некрозе. Раннюю стадию апоптоза определяют по экспрессии аннексина (AV5), позднюю – по одновременной окраске клеток PI и AV5. Нами получено увеличение количества клеток с маркерами раннего апоптоза в 5 раз, позднего – в 7 раз и некроза – в 2 раза в опытной группе (табл. 1).

Таблица 1

Маркеры клеточной гибели в миокарде крыс с экспериментальной гипергомоцистеинемии (Me (25; 75))

	миокард животных контрольной группы	**миокард животных опытной группы**
PI маркер некроза	668,50 (596,00; 721,00)	1583,00 (1295,00; 1895,00) p=0,002
PI, %	9,46 (7,75; 11,11)	17,09 (14,06; 23,45) p=0,002
AV5 маркер апоптоза	1201,0 (1029,0; 1497,50)	5751,50 (4660; 7212,50) p=0,002
AV5, %	9,52 (7,47; 10,12)	50,05 (48,97; 52,64) p=0,002

PI+AV5 поздняя стадия апоптоза или погибшие клетки	167,50 (158,00; 187,50)	1189,00 (1128,00; 1501,50) p=0,002
PI+AV5, %	5,69 (4,81; 6,74)	10,86 (10,03; 12,81) p=0,002

Примечание: p – уровень различий по сравнению с контрольной группой.

Таким образом, ГГЦ вызывает гибель миокардиоцитов как путем апоптоза, так и некроза, с преобладанием апоптоза.

Некроз, как правило, является результатом несоответствия потребностей кардиомиоцитов в кислороде и его доставкой, что при гипергомоцистеинемии объясняется развитием гиперкоагуляции. Так, в опытной группе нами было зафиксировано резкое увеличение экспрессии тканевого фактора эндотелиоцитами (табл. 2), что, очевидно привело к сокращению АЧТВ (p=0,008), тромбинового времени (ТВ) (p=0,0076) и возрастанию концентрация РФМК (p=0,007).

Таблица 2

Экспрессия тканевого фактора на эндотелиоцитах миокарда крыс при ГГЦ

Показатель	Контрольная группа (N=21)	Опытная группа (N=21)	Значимость различий
Экспрессия TF эндотелиоцитами (M±SD)	0,62±0,67	2,05±0,81	коэффициент Вилкоксона p = 0,00028
менее 10% окрашенных клеток	47,6%	-	Хи-квадрат p=0,009
10 – 25% окрашенных клеток	42,9%	28,6%	Хи-квадрат p=0,0018
25 – до 50% окрашенных клеток	9,5%	38,0%	Хи-квадрат p=0,026
50 – 75% окрашенных клеток	-	33,4%	Хи-квадрат p=0,033

В тоже время, развитие ишемии миокарда на фоне гиперкоагуляции, может запускать и процессы апоптоза. Кроме этого, летальную программу клеток может индуцировать и фактор некроза опухолей [14, 22], и активация NMDA-рецепторов высокой концентрацией гомоцистеина [2], и повышение проницаемости мембран митохондрий [18] и изменения ДНК клетки. Нами получено значительное увеличение концентрации фактора некроза опухолей α – в 14 раз (77,56 (0,00; 150,74) и 1104,01 (860,05; 1350,81) в контрольной и опытной группе соответственно, p=0,003).

Апоптоз, безусловно, является фактором защиты организма, позволяя элиминировать поврежденные или функционально неполноценные клетки и тем самым, с одной стороны, предупредить развитие аутоиммунных процессов, а с другой стороны – оптимально перераспределить нагрузку на функционирующие элементы сердечной мышцы. Но в том случае, если апоптоз по силе будет превосходить репарационный потенциал ткани, то по сути это может привести к гибели органа. В случае миокарда – к развитию хронической сердечной недостаточности.

Исходя из наших данных, определить конкретного индуктора апоптоза на фоне гипергомоцистеинемии не представляется возможным, что требуют дальнейшего изучения.

Выводы.

1. Гипергомоцистеинемия является индуктором как некроза, так и апоптоза кардиомиоцитов, с преобладанием апоптоза.
2. Гипергомоцистеинемия вызывает экспрессию тканевого фактора эндотелиоцитами, что приводит к развитию гиперкоагуляции и активации процесса апоптоза.

Литература

1. Александрова Е.Б. Хроническая сердечная недостаточность у больных гипертонической болезнью и ишемической болезнью сердца: возрастные и гендерные аспекты // Кардиология. – 2013. – № 7. – С. 40-44.
2. Болдырев А.А. Почему токсичен гомоцистеин? / А.А. Болдырев // Природа. – 2009. – №10. – 18-23.
3. Болдырев А.А. NMDA-рецепторы в клетках иммунной системы / А.А. Болдырев, Е.А. Брюшкова, Е.А. Владыченская // Биохимия. – 2012. – Т. 77, №2. – С. 160-168.
4. Влияние гомоцистеина на свойства нейтрофилов, активированных in vivo / Е.А. Брюшкова [и др.] // Биохимия. – 2011. – 76 (4). – С. 573–580.
5. Дутов А.А. Определение гомоцистеина и цистеина в плазме/сыворотке крови ВЭЖХ методом с УФ детекцией и твердофазной экстракцией на полимерном сорбенте / А.А. Дутов, Д.А. Никитин, А.А. Федотова // Биомедицинская химия. – 2010. – Т. 56, вып. 5. – С. 609-615.
6. Иванов А.В. Общие аминотиолы плазмы крови крыс при внутрибрюшинном и подкожном введении гомоцистеина / А.В. Иванов, А.А. Московцев, Е.А. Мартынова // Патологическая физиология и экспериментальная терапия. – 2013. № 4. – С. 41–45.
7. Лушникова Е.Л. Численность кардиомиоцитов в миокарде крыс при воздействии на организм агентов с противоопухолевой активностью – циклофосфана и тритерпеноидов / Е.Л. Лушникова, Т.Г. Толстикова, Л.М. Непомнящих // Бюл. экспер. биол. – 2007. – Т. 144, № 9. – С. 331-337.
8. Скворцов Ю. И. Гомоцистеин как фактор риска развития ИБС (Обзор) / Ю.И. Скворцов, А.С. Корольков // Саратовский научно-медицинский журнал. – 2011. – Т.7, № 3. – С. 619–624.
9. Степанов А.В. Иммуностимулятор из центрального органа гуморального иммунитета – сумки Фабрициуса / А.В. Степанов, В.Л. Цепелев, С.Л. Мельникова // Сибирский медицинский журнал. – 2013. – № 2. – С. 32-34.
10. Степанов А.В. Влияние синтетических пептидов сумки Фабрициуса на функциональную активность макрофагов / А.В. Степанов, В.Л. Цепелев. // Забайкальский медицинский вестник. – 2014. – № 2. – С. 44-47.
11. Степанов А.В. Результаты исследования эффективности синтетического иммуностимулятора нового поколения /А.В. Степанов, В.Л. Цепелев, С.Л Цепелев // Фундаментальные исследования. – 2012. – №12 (1). – С.142-145.
12. Степанов А.В. Механизмы коррегирующего действия полипептидов из лимфоидной ткани при иммунодефицитных состояниях и воспалении : автореф. дис. докт. мед. наук : 14.03.00 / А.В. Степанов. – Иркутск, 1995. – 40 с.
13. Цепелев В.Л. Влияние регуляторных пептидов на продукцию провоспалительных цитокинов / В.Л. Цепелев, А.В. Степанов // Забайкальский медицинский вестник. – 2015. – № 2. – С. 147-150.
14. Хлапов А.П. Роль апоптоза кардиомиоцитов в механизмах ишемического ремоделирования миокарда / А.П. Хлапов, Ю.Ю. Вечерский, Н.В. Рязанцева // Бюллетень сибирской медицины. – 2008 – №3. – С.33-38.
15. Цыбиков Н.Н. Роль гомоцистеина в патологии человека / Н.Н. Цыбиков, Н.М. Цыбикова // Успехи современной биологии. – 2007. – Т. 127, №5. – С. 471-482.
16. Boldyrev A. Molecular mechanisms of homocysteine toxicity and possible protection against hyperhomocysteinemia / A. Boldyrev // Recent Advances on Nutrition and the Prevention of Alzheimer's Disease. – 2010. – P. 127-143.
17. Dayal S. Role of redox reactions in the vascular phenotype of hyperhomocysteinemic animals / S. Dayal, S. Lentz // Antioxid Redox Signal. – 2007 – Vol. 9 (11). – P. 1899-909.
18. Kang P.M. Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases / P.M. Kang, S. Izumo // Trends in molecylar medicine. – 2003. – V.9, №4. – P. 177-182.

19. Homocysteine induces cytoskeletal remodeling and production of reactive oxygen species in cultured cortical astrocytes / Loureiro S. O. [et al.] // Brain Res. – 2010. – № 1355. – P. 151 – 164.
20. Outinen P. A. Characterization of the stress-inducing effects of homocysteine / P. A. Outinen, S. K. Sood, P. C. Y. Liaw // Biochem. J. – 1998. – V. 332. № Pt1. – P. 213 – 221.
21. Poddar R. Novel crosstalk between ERK MAPK and p38 MAPK leads to homocysteine-NMDA receptor-mediated neuronal cell death / R. Poddar, S. Paul / J. Neurochem. – 2013. – V. 124. № 4. – P. 558 – 570.
22. Regula K.M. Apoptosis of ventricular myocytes: a means to an end / K.M. Regula, L.A. Kirshenbaum // J. of Molecular and Cellular Cardiology. – 2005. – V. 38. – P. 3-13.
23. Reyes R. C. Activation of neuronal NMDA receptors induces superoxide-mediated oxidative stress in neighboring neurons and astrocytes / R.C.Reyes, A. M. Brennan, Y. Shen // J. Neurosci. – 2012. – V. 32. № 37. – P. 12973 – 12978.