

© С. А. Новаковская, Е. В. Фёдорова, Л. И. Арчакова, 2017
УДК 616.127-018:599.323.4

С. А. Новаковская, Е. В. Фёдорова, Л. И. Арчакова

УЛЬТРАСТРУКТУРНЫЕ ОСНОВЫ РЕОРГАНИЗАЦИИ МИОКАРДА ПРИ ХРОНИЧЕСКОЙ АНТРАЦИКЛИНОВОЙ КАРДИОМИОПАТИИ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Лаборатория «Центр электронной и световой микроскопии» (зав. — канд. мед. наук С. А. Новаковская), Государственное научное учреждение «Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси», г. Минск

Электронно-микроскопическим методом исследованы механизмы ультраструктурной реорганизации миокарда и сосудов микроциркуляторного русла сердечной мышцы у крыс (n=30) в разные сроки после моделирования хронической формы антрациклиновой кардиомиопатии. Выявлены признаки прогрессирующих деструктивных процессов в миокарде, приводящие к гибели кардиомиоцитов и нарушающие его функциональную активность. Сосуды микроциркуляторного русла миокарда подвергаются необратимым структурным нарушениям и сдавливаются новообразованными коллагеновыми волокнами в интерстиции миокарда. Выключение сосудов сердечной мышцы из кровотока является вероятной причиной развития ишемии миокарда и застойной сердечной недостаточности.

Ключевые слова: миокард, кардиомиоцит, эндотелиоцит, антрациклины, доксорубицин

Доксорубицин — антибиотик антрациклинового ряда, который широко используется в медицинской практике для лечения онкологических заболеваний. Наряду с противоопухолевым эффектом, данный препарат является причиной развития в организме ряда осложнений, одним из которых является дозозависимая кумулятивная кардиотоксичность, ведущая к развитию необратимой дегенеративной кардиомиопатии и застойной сердечной недостаточности в различные периоды после лечения [2, 8, 10, 16].

Кардиотоксическое действие антрациклинов часто является основным фактором, препятствующим проведению полного курса цитостатической терапии и бывает настолько значительно выраженным, что вынуждает прекратить лечение еще до получения противоопухолевого эффекта [9]. Антрациклиновые повреждения сердца отличаются длительным скрытым течением и возможностью возникновения как в период проведения, так и в отдаленные сроки после окончания противоопухолевой терапии [11].

В основе одного из наиболее вероятных механизмов развития антрациклиновой кардиотоксичности лежат процессы свободно-радикального окисления липидов и дестабилизации биологических мембран кардиомиоцитов (КМЦ) с повреждением их митохондрий [14].

Полагают, что кардиотоксическое действие антрациклиновых антибиотиков обусловлено

изменением концентрации сывороточных кардиоспецифических белков, выделяющихся из поврежденных миоцитов. Сердечный тропонин I и тропонин T являются высокочувствительными маркерами повреждения клеток миокарда [5].

Повреждения сердца антрациклиновыми антибиотиками могут развиваться непосредственно после проведения цитостатической терапии, а также спустя месяцы и годы после ее окончания [11]. По мнению некоторых исследователей, одним из механизмов развития повреждений миокарда в отдаленном периоде может явиться спровоцированная антрациклинами экспрессия кардиальных генов [6].

Поздняя хроническая антрациклиновая кардиотоксичность до настоящего времени все еще остается нерешенной проблемой для клиницистов. Развивается она преимущественно у пациентов, у которых ранее диагностировалась острая антрациклиновая кардиотоксичность.

В литературе освещены основные морфологические признаки острого кардиотоксического действия антрациклиновых антибиотиков. Однако исследования клеточных механизмов и закономерностей развития хронических форм антрациклиновой кардиомиопатии, развивающихся после длительного цитостатического действия доксорубина, недостаточны. В связи с этим цель настоящего исследования — изучение механизмов ультраструктурной реорганизации миокар-

Сведения об авторах:

Новаковская Светлана Алексеевна (e-mail: novakovskaya@tut.by), Фёдорова Екатерина Викторовна (e-mail: katerina.minsk@mail.ru), Арчакова Людмила Ивановна (e-mail: biblio@fizio.bas-net.by), лаборатория «Центр электронной и световой микроскопии», Институт физиологии Национальной академии наук Беларуси, 220072, Беларусь, г. Минск, ул. Академическая, 28

да и сосудов его микроциркуляторного русла на модели хронической формы антрациклиновой кардиомиопатии.

Материал и методы. Исследования проведены на 30 половозрелых беспородных крысах-самцах массой 250–300 г с соблюдением правовых и этических норм обращения с животными в соответствии с национальными и международными стандартами качества планирования и проведения исследований на животных [3, 7]. На данное исследование получено разрешение комитета по биоэтике (протокол № 1 от 15.01.2015 г.) Института физиологии НАН Беларуси.

Объектом исследования являлся миокард левого желудочка сердца крыс, у которых, согласно схеме, наиболее распространенной в мировой литературе, путем внутрибрюшинного введения антибиотика доксорубицина в кумулятивной дозе 16 мг/кг в течение 2 мес (еженедельно по 2 мг/кг в течение 8 нед) была получена хроническая форма антрациклиновой кардиомиопатии [17]. В этих целях использовали доксорубин гидрохлорид (РУП Белмедпрепараты, Беларусь). Контролем служили крысы, которым в эквивалентном объеме внутрибрюшинно вводили 0,9% раствор хлорида натрия. Животные находились на стандартном содержании и питании вивария. Из эксперимента их выводили эфиром для наркоза на 4-, 30-е и 60-е сутки после последней инъекции препарата.

Фрагменты миокарда левого желудочка фиксировали в растворе, состоящем из 3% глутаральдегида и 1% параформа, затем измельчали и обрабатывали 2% раствором четырехокси осмия. После промывания 0,1 М фосфатным буфером материал обезвоживали в этаноле возрастающей концентрации и заключали в аралдит по общепринятой методике [1]. Срезы готовили на ультратоме LKB-8800 (LKB Bromma Ultratome Nova, Швеция) и просматривали в электронном микроскопе JEM-100B (Jeol, Япония).

Результаты исследования. В левом желудочке сердца у крыс в разные сроки после действия доксорубицина были выявлены структурные изменения сердечной мышцы и сосудов микроциркуляторного русла.

На 4-е сутки после последней инъекции доксорубицина отмечено развитие в сердечной мышце многочисленных очагов некроза и апоптоза, охватывающих значительную часть КМЦ. В большей части ядер КМЦ, локализующихся в подсарколеммальной области, происходят конденсация гетерохроматина и сегрегация ядрышек. Ядерная оболочка образует множество глубоких инвагинаций. Нуклеоплазма многих КМЦ фрагментируется и образует разобщенные ядерные фрагменты, что свидетельствует о развитии процесса апоптоза в миокарде. В некоторых ядрах отмечаются очаги просветления с мелкодисперсным эухроматином, вкраплениями глыбок гетерохроматина и рибосомальных гранул. Наличие электронно-прозрачных зон ядерного матрикса КМЦ свидетельствует о распаде и последующем лизисе хроматина.

Миофибрилярный аппарат КМЦ представлен разнонаправленными истонченными и разво-

локненными структурами, которые на большем протяжении фрагментированы. Наблюдаются очаговое уплотнение миофибрилл вследствие их пересокращения и появление в сердечных миоцитах контрактурно измененных полос мышечных волокон. Процесс внутриклеточного миоцитолитического приводит к формированию объемных очагов деструкции (рисунки, а). Литические изменения миофибрилл КМЦ проявляются также «дискомплексацией» мышечных волокон, формированием мелких очагов просветления саркоплазмы.

Митохондрии КМЦ характеризуются полиморфизмом, их большая часть имеют вид осмиофильных структур. Некоторые митохондрии характеризуются просветлением матрикса и уменьшением количества крист вследствие их разрушения.

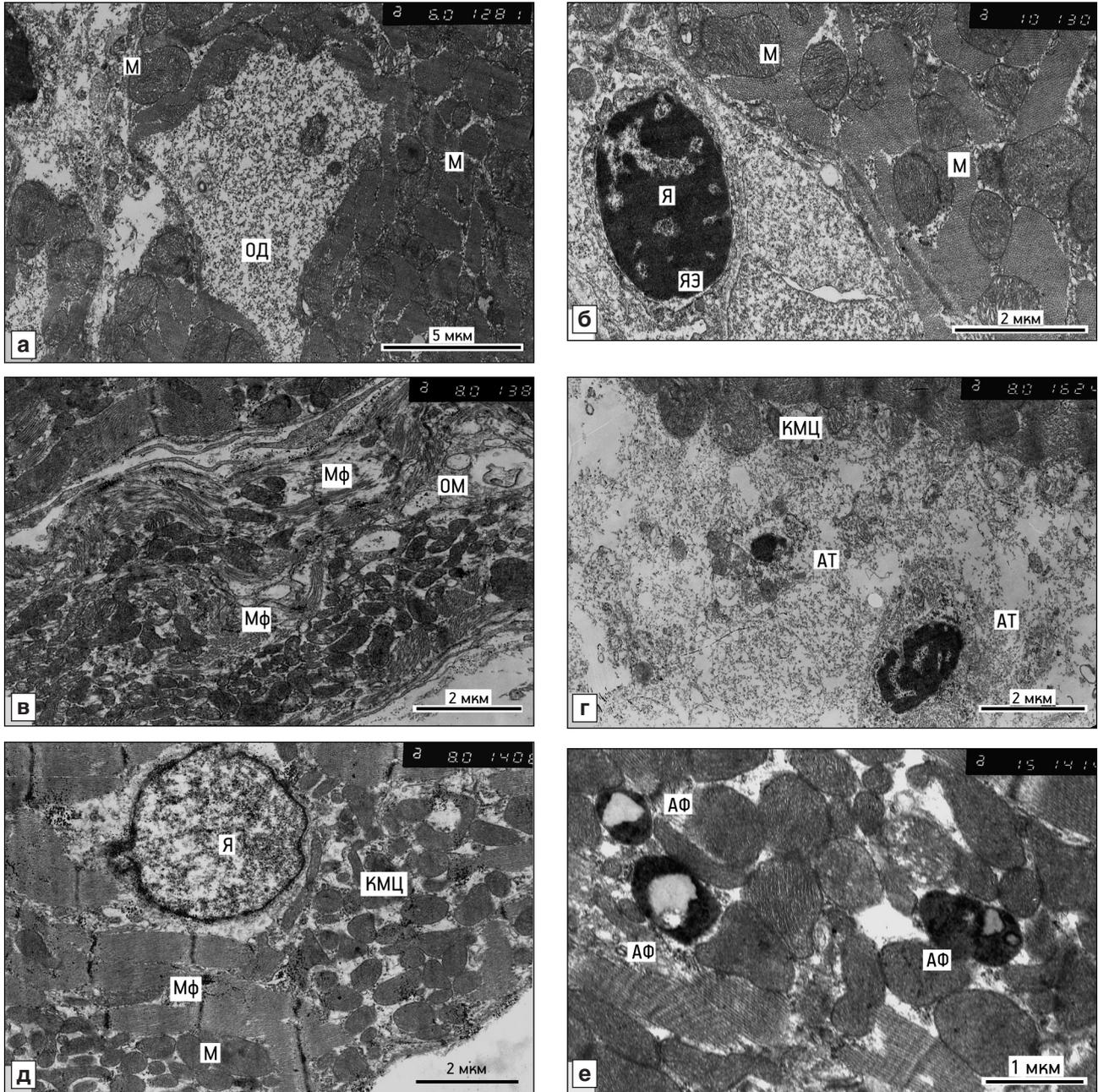
В саркоплазме КМЦ выявляется избыточное количество скоплений электронно-плотных гранул кальция.

Многие сосуды микроциркуляторного русла миокарда претерпевают изменения деструктивного характера. Просветы капилляров заполнены выбухающими телами измененных эндотелиоцитов с гиперхромными ядрами, многочисленными микроворсинками, расположенными в просвете сосуда в результате клазматоза цитоплазмы эндотелиоцита, а также аморфными бесструктурными массами. Имеются отек перикапиллярного пространства, истончение и повреждение стенок сосудов, в результате чего из них в интерстиций миокарда попадают фрагменты распавшихся органелл. В интерстиции выявляются также апоптотически измененные эндотелиоциты поврежденных капилляров (см. рисунки, б).

Увеличивается площадь интерстициального фиброза миокарда за счет разрастания и уплотнения соединительной ткани на месте разрушенных КМЦ и капилляров. Развивается диффузный фиброз сердечной мышцы.

Характерным признаком ультраструктурной реорганизации миокарда крыс на 30-е сутки после последней инъекции доксорубицина является деградация сократительного аппарата КМЦ, сопровождающаяся разволокнением и фрагментацией миофибрилл (см. рисунки, в), появлением многочисленных зон пересокращения мышечных волокон, развитием очагов миоцитолитического. Среди измененных миофибрилл наблюдаются обширные скопления митохондрий, часть которых имеют вид набухших осмиофильных структур с поврежденным матриксом.

В результате активизации процессов клазматоза в КМЦ нарушается целостность сарколеммы. Через эти участки в интерстициальное



Миокард крысы на 4-е (а), 30-е (б) и 60-е (в) сутки после моделирования хронической формы антрациклиновой кардиомиопатии.

а — очаг деструкции в саркоплазме кардиомиоцита; б — апоптоз эндотелиоцита капилляра в интерстиции миокарда; в — разволокнение и фрагментация миофибрилл кардиомиоцита; г — апоптотические тела в интерстиции миокарда; д — феномен «таяния» хроматина в ядре кардиомиоцита; е — аутофагосомы в саркоплазме кардиомиоцита. ОД — очаг деструкции саркоплазмы; М — митохондрии; ЯЭ — ядро эндотелиоцита; КМЦ — кардиомиоцит; Мф — миофибриллы; ОМ — область миоцитолита; АТ — апоптотическое тело; Я — ядро; АФ — аутофагосомы

пространство попадают разрушенные фрагменты миофиламентов КМЦ и митохондрий.

Ядра КМЦ локализируются в субсарколеммальной области, содержат множественные инвагинации ядерной оболочки и маргинально расположенный конденсированный гетерохроматин. В интерстиции миокарда выявляются апоптотические тельца, состоящие из фрагментов ядер и органелл КМЦ,

окруженных тонким ободком саркоплазмы (см. рисунок, г).

В этот срок хронической кардиомиопатии сохраняются последствия токсического действия доксорубицина на сосуды микроциркуляторного русла миокарда. Многие сосуды повреждены, в них определяются эндотелиоциты с апоптотически измененными ядрами, фрагменты распав-

шихся органелл саркоплазмы и аморфные массы разрушенных клеток крови. На месте некоторых разрушенных капилляров выявляются многочисленные скопления ламеллярных структур, образованных при деструкции их эндотелиоцитов. В сохранившихся капиллярах эндотелиальная выстилка истончена и на большом протяжении фрагментирована, просвет заполнен аморфным бесструктурным содержимым.

Процессы изменения миокарда сопровождаются увеличением площади интерстициального фиброза и расширением экстрацеллюлярного матрикса за счет усиленного синтеза коллагеновых волокон.

На 60-е сутки после последней инъекции доксорубина наблюдаются признаки дальнейшего преобразования миокарда и, прежде всего, процессы повреждения и разрушения миофибрилл, приводящие к развитию сократительной недостаточности сердечной мышцы. Характерны различия повреждений миофибрилл в одном и том же КМЦ: одни из них подвергаются фрагментации, а другие — одновременно фрагментации и истончению путем разволокнения на отдельные миофиламенты. Пучки миофибрилл в КМЦ имеют разнонаправленный ход, теряется четкость Z-линий в саркомерах, местами граница между саркомерами не прослеживается. В области разволокнения миофибрилл выявляются множественные очаги миоцитолита, которые местами сливаются и формируют зоны, заполненные хлопьевидным осадком и ламеллярными структурами.

В КМЦ определяются округлые светлые ядра с незначительными инвагинациями ядерной оболочки, содержащие мелкодисперсные включения хроматина с вкраплениями гетерохроматинных глыбок и рибосомальных гранул, и светлые ядрышки. Краевые скопления гетерохроматина отсутствуют. В нуклеоплазме выявляются значительные электронно-прозрачные зоны, лишенные хроматина (феномен «таяния» хроматина) (см. рисунок, д).

Митохондрии КМЦ претерпевают полиморфные изменения. Многие из них выглядят как крупные осмиофильные структуры с поврежденным матриксом. Часть митохондрий, сосредоточенных в окооядерной и подсарколеммальной областях, подвергаются литическим изменениям, в результате чего их матрикс становится электронно-прозрачным. Некоторые поврежденные митохондрии подвергаются аутофагии (см. рисунок, е).

Сарколемма некоторых КМЦ на большем протяжении подвергается разрушению в результате усиленного клазматоза. Ее фрагменты вместе с прилежащими поврежденными органеллами

полностью отделяются от КМЦ и смещаются в интерстиций миокарда, где формируют ламеллярные структуры. В некоторых КМЦ имеются подсарколеммальные электронно-прозрачные зоны, содержащие единичные митохондрии, элементы эндоплазматической сети и комплекса Гольджи.

Отмечается изменение большинства сосудов системы микроциркуляции миокарда. Просвет многих сосудов сужен вследствие выбухания в него эндотелиоцитов с гипертрофированными ядрами, которые закрывают большую его часть. Эндотелиальная выстилка капилляров истончена, образует многочисленные выросты со стороны люминальной и аблюминальной поверхностей. Наряду с описанными выше, выявляются сосуды, переполненные эритроцитарными массами. В некоторых из них наблюдаются повреждения стенки с выходом эритроцитов в интерстициальное пространство и образованием интракардиальных гематом.

На фоне деструктивных процессов в сердечной мышце активизируются фибробласты интерстиция. Разрастание соединительной ткани приводит к развитию диффузного заместительного фиброза, обусловленного разрушением капилляров и миофибриллярного аппарата КМЦ. Новообразованные коллагеновые волокна сдавливают сохранившиеся капилляры, нарушают в них кровоток и оттесняют их от КМЦ, что способствует развитию ишемии миокарда.

Обсуждение полученных данных. Исследования ультраструктурной организации миокарда левого желудочка у крыс в разные сроки после моделирования хронической формы антрациклиновой кардиомиопатии выявили прогрессирующие изменения миокарда, в основе которых лежат деструктивные процессы, способствующие гибели КМЦ и подавляющие его функциональную активность.

При токсическом поражении сердечной мышцы антрациклиновыми антибиотиками происходит повреждение структурных компонентов КМЦ. Антрациклины связываются с сократительными белками этих клеток, повреждают их структуру, индуцируют лизис миофибрилл, что в совокупности приводит к значительному снижению сократимости миокарда [4, 12, 13].

Содержание внутриклеточного кальция уменьшается, вероятно, вследствие снижения интенсивности синтетических и метаболических процессов в КМЦ, а также изменения экспрессии генов белков, регулирующих освобождение и поглощение кальция саркоплазматической сетью. Отмечаются секвестрация гранул

кальция и последующее их поглощение аутофагосомами [6].

Одним из факторов, обуславливающих возникновение ишемии миокарда после химиотерапии антрациклиновыми антибиотиками, является дисфункция эндотелия. Антрациклины повышают уровень эндотелина-1 и снижают содержание оксида азота в плазме крови пациентов, получавших лечение данными препаратами [15].

В ранние сроки после моделирования хронической формы антрациклиновой кардиомиопатии у животных выявляются необратимые признаки поражения миокарда — деструктивные изменения КМЦ и эндотелиоцитов капилляров с формированием распадающихся апоптотических телец, деградация сократительного аппарата, появление обширных очагов лизиса саркоплазмы и миофибрилл, повреждение сосудов микроциркуляторного русла. Увеличивается площадь интерстициального фиброза миокарда за счет разрастания в нем коллагеновых волокон на месте гибнущих КМЦ и капилляров.

Электронно-микроскопические исследования миокарда крыс в более отдаленные периоды (на 30-е и 60-е сутки) после введения доxorубина и моделирования хронической формы антрациклиновой кардиомиопатии выявили признаки прогрессирования деструктивных процессов в сердечной мышце. Появление светлых ядер в КМЦ с отдельными мелкодисперсными включениями эухроматина и электронно-прозрачными зонами, лишенными хроматина (феномен «таяния» хроматина), указывает на угнетение их синтетической функции. Разрушение сарколеммы КМЦ, повреждения сократительного аппарата клетки — фрагментация, разволокнение, истончение миофибрилл, их разнонаправленная ориентация, разрушение Z-линий и появление обширных очагов миоцитолита свидетельствуют о развитии необратимых структурных изменений в КМЦ. Отмечаются дегенеративные изменения и последующий лизис митохондрий, подвергающихся аутофагии.

Сильное деструктивное действие доxorубина оказывает на сосуды микроциркуляторного русла миокарда. Сохранившиеся капилляры сдавливаются разросшимися новообразованными коллагеновыми волокнами в интерстиции миокарда, просвет их сужается. Указанные изменения сосудов сердечной мышцы нарушают кровоток в системе микроциркуляции и способствуют развитию ее ишемии.

Представленные результаты, полученные на экспериментальной модели, раскрывают морфологическую основу патогенеза поздней хронической антрациклиновой кардиомиопатии и раз-

вития сердечной недостаточности антрациклинового генеза.

ЛИТЕРАТУРА

1. Боголепов Н.Н. Методы электронно-микроскопического исследования мозга. М., 1976.
2. Лушникова Е.Л., Непомнящих Л.М., Розенберг В.Д. Морфологические и молекулярно-генетические основы дилатационной кардиомиопатии. М.: Изд-во РАМН, 2004.
3. Технический кодекс установившейся практики. ТКП 125–2008 (02040). Надлежащая лабораторная практика. Постановление Министерства здравоохранения Респ. Беларусь № 56 от 28 марта 2008 г.
4. Akao M., O'Rourke B., Kusuoka H. Differential actions of cardioprotective agents on the mitochondrial death pathway // *Circ. Res.* 2003. Vol. 7, № 92(2). P. 195–202.
5. Bertinchant J.P., Larue C., Pernel I. et al. Release kinetics of serum cardiac troponin I in ischemic myocardial injury // *Clin. Biochem.* 1996. Vol. 29. P. 587–594.
6. Boucek R.J.J., Miracle A., Anderson M. Persistent effects of doxorubicin on cardiac gene expression // *J. Mol. Cell Cardiol.* 1999. Vol. 31. P. 1435–1446.
7. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals Used for Experimentation and other Scientific Purposes, N 123 of 18 March 1986; Protocol of Amendment to the European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and other Scientific Purposes, Strasbourg, 22 June 1998.
8. Gille L., Nohl H. Analyses of the molecular mechanism of adriamycin-induced cardiotoxicity // *Free Radic. Biol. Med.* 1997. Vol. 23, Suppl. 5. P. 775–782.
9. Grenier M.A., Lipshultz S.E. Epidemiology of anthracycline cardiotoxicity in children and adults // *Semin. Oncol.* 1998. Vol. 25, Suppl. 10. P. 72–85.
10. Jensen B.V., Skovsgaard T., Nielsen S.L. Functional monitoring of anthracycline cardiotoxicity: a prospective, blinded, long-term observational study of outcome in 120 patients // *Ann. Oncol.* 2002. Vol. 13. P. 699–709.
11. Kumar S., Marfatia R., Tannenbaum S. et al. Doxorubicin-induced cardiomyopathy 17 years after chemotherapy // *Tex. Heart Inst. J.* 2012. Vol. 39, № 3. P. 424–427.
12. L'Ecuyer T., Sanjeev S., Thomas R. et al. DNA damage is an early event in doxorubicin-induced cardiac myocyte death // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2006. Vol. 291, № 3. P. 1273–1280.
13. Sacco G., Giampietro R., Salvatorelli E. et al. Chronic cardiotoxicity of anticancer anthracyclines in the rat: role of secondary metabolites and reduced toxicity by a novel anthracycline with impaired metabolite formation and reactivity // *Br. J. Pharmacol.* 2003. Vol. 139, № 3. P. 641–651.
14. Takemura G., Fujiwara H. Doxorubicin-induced cardiomyopathy from the cardiotoxic mechanisms to management // *Prog. Cardiovasc. Dis.* 2007. Vol. 49. P. 330–352.
15. Yamashita J., Ogawa M., Nomura K. Plasma endothelin-1 and doxorubicin cardiotoxicity // *N. Engl. J. Med.* 1994. Vol. 331. P. 1528–1529.
16. Yeh E.T., Bickford C.L. Cardiovascular complications of cancer therapy: incidence, pathogenesis, diagnosis and management // *J. Am. Coll. Cardiol.* 2009. Vol. 16, № 53. P. 2231–2247.

17. Zhou S., Starkov A., Froberg M.K. et al. Cumulative and irreversible cardiac mitochondrial dysfunction induced by doxorubicin // *Cancer Res.* 2001. Vol. 61. P. 771–777.

Поступила в редакцию 26.08.2016
Получена после доработки 19.04.2017

**ULTRASTRUCTURAL BASES
OF THE REORGANIZATION
OF THE MYOCARDIUM IN CHRONIC
ANTHRACYCLINE CARDIOMYOPATHY
IN THE EXPERIMENT**

S.A. Novakovskaya, Ye. V. Fyodorova, L.I. Archakova

Electron-microscopic method was used to study the mechanisms of ultrastructural reorganization of the myocardium and blood vessels of the microvascular bed of the heart muscle from rats

(n=30) at different time intervals after modeling of chronic anthracycline cardiomyopathy. The signs of progressive destructive changes in the myocardium, leading to the death of cardiomyocytes and the disturbances of its functional activity were demonstrated. The vessels of the microvascular bed of the myocardium underwent irreversible structural changes and were compressed by the newly formed collagen fibers in the myocardial interstitium. Exclusion of the blood vessels of the heart muscle from the blood flow is a likely cause of myocardial ischemia and congestive heart failure development.

Key words: *myocardium, cardiomyocyte, endotheliocyte, anthracyclines, doxorubicin*

«Center for Electron and Light microscopy» Laboratory,
Institute of Physiology, National Academy of Sciences of Belarus,
Minsk