

© Ю. В. Лискова, А. А. Стадников, С. П. Саликова, 2017
УДК 612.12-008.46-003.93-055:599.323.4

Ю. В. Лискова¹, А. А. Стадников¹, С. П. Саликова²

ПОЛОВЫЕ ОСОБЕННОСТИ РЕГЕНЕРАТОРНЫХ СВОЙСТВ МИОКАРДА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

¹ Кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии (зав. — проф. А. А. Стадников), ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет» Минздрава РФ; ² 2-я кафедра терапии (усовершенствования врачей) (зав. — проф. В. Б. Гриневич), ФГБ ВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Министерства обороны РФ, Санкт-Петербург

У крыс (n=40) обоего пола в условиях экспериментальной сердечной недостаточности (СН) с помощью методов световой микроскопии, иммуноцитохимии, морфометрии исследован миокард левого желудочка. Установлено, что при СН происходит существенная реорганизация мышечных и стромальных элементов миокарда. У животных с СН выявлены половые особенности как ремоделирования, так и регенерационных возможностей миокарда. Показаны половые особенности экспрессии белков Ki-67, каспазы-9, виментина. Обсуждается роль кардиопротективных влияний эстрогенов на миокард левого желудочка, а также значение других факторов, влияющих на половые особенности регенерации миокарда при СН.

Ключевые слова: кардиомиоциты, регенерация, ремоделирование, сердечная недостаточность, пол

В результате экспериментальных и клинических исследований получены доказательства половых особенностей ремоделирования сердца [6]. Показано, что при одинаковых патологических условиях изменения в миокарде на молекулярном и клеточном уровне оказываются менее значительными у женщин, чем у мужчин [9]. Половой диморфизм и лучший исход сердечно-сосудистых заболеваний у женщин в большинстве случаев связывают с кардиопротективными воздействиями эстрогенов на миокард [6]. Считается, что половые особенности ремоделирования миокарда можно объяснить не только активностью половых гормонов. При сканировании генома были выявлены половые различия в некоторых генах и/или молекулярных путях, регулирующих структуру кардиомиоцитов (КМЦ) с последующим влиянием на их сократительную функцию [9]. В настоящее время экспериментальные исследования половых различий продолжают, но существуют ли они в эндогенном регенераторном потенциале миокарда и влияют ли на особенности его ремоделирования при сердечной недостаточности (СН), остаются до конца неясными.

Цель настоящей работы — изучить особенности регенераторного потенциала миокарда левого желудочка (ЛЖ) у крыс обоего пола в условиях

экспериментальной сердечной недостаточности (СН).

Материал и методы. Исследование проведено на 40 крысах: самцах (n=15) и самках (n=25) линии Вистар массой 230–260 г. Контролем служили 10 интактных крыс: самцов (n=5) и самок (n=5). С целью моделирования гипотензивного состояния у 10 крыс под анестезией эфирным рауш-наркозом проводили билатеральную овариэктомию (ОЭ). Через 2 мес после билатеральной ОЭ у ОЭ-самок (n=40), у интактных самок (n=10) и у самцов (n=10) вызывали СН путем подкожного введения в течение 14 сут 0,1 мл 1% раствора мезатона с последующим плаванием до глубокого утомления [3], после чего животных декапитировали под эфирным рауш-наркозом. Содержание крыс в виварии и проведение экспериментов соответствовали «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденных приказами МЗ СССР № 1045 от 06.04.1973 г., № 1179 от 10.10.1983 г. Миокард ЛЖ у контрольных и экспериментальных крыс был подвергнут стандартной однотипной гистологической обработке. Парафиновые срезы окрашивали гематоксилином Майера — эозином. Проводили иммуногистохимические (ИГХ) реакции: оценку экспрессии синтеза белков Ki-67 — индекс пролиферации (ИП), виментина (vim) — степень фиброза и каспазы-9 (cas-9) — индекс апоптоза (ИА) с использованием моноклональных антител и набора реактивов (Spring Bioscience, США). ИП и ИА определяли как число окрашенных КМЦ, деленное на 1000 клеток в случайно выбранных 20 полях зрения. Оценка локализации и интенсивности иммунной реакции vim+ проводили полуколичественным методом +/- в случайно выбранных 20 полях зрения (100%): (–) — нет иммунопозитивных клеток в миокарде;

Сведения об авторах:

Лискова Юлия Владимировна (e-mail: liskovaj@bk.ru), Стадников Александр Абрамович (e-mail: alexander.stadnikov@yandex.ru), кафедра гистологии, цитологии и эмбриологии, ФГБОУ ВО «Оренбургский государственный медицинский университет», 460000, г. Оренбург, ул. Советская, 6

Саликова Светлана Петровна (e-mail: cardiosvet@rambler.ru), 2-я кафедра терапии усовершенствования врачей, ФГБ ВОУ ВО «Военно-медицинская академия им. С. М. Кирова» Министерства обороны РФ, 194044, Санкт-Петербург, ул. Акад. Лебедева, 6

(+) — легкая, изменения единичных клеток; (++) — умеренная, изменения мелкоочагового характера или группы клеток; (+++) — высокая, крупноочаговые изменения или изменения в большой группе клеток, (+++++) — тотальные изменения, все клетки иммунопозитивны. Морфометрию осуществляли в соответствии со сложившимися принципами системного количественного анализа [1]. Цитологический анализ структурно-функциональной реорганизации мышечной и стромальной частей миокарда проводили в условных полях зрения микроскопа ОРТИКА В-350 (Италия), микрофотографии получали с использованием цифровой фотокамеры ScoreTek DCM 500 (Италия) и программы ScorePhoto с указанной окулярной вставкой при исследовании 20 полей зрения гистологических срезов (об. 40, ок. 20). Для определения объемной плотности (ОП) КМЦ, их ядер и стромы миокарда было применено наложение квадратной сетки ($Pt=225$) на микрофотографии гистологических срезов миокарда при стандартном увеличении. Методом сплошного подсчета оценивали относительное содержание КМЦ с 1, 2, 3 ядрами и более. В каждом препарате исследовали не менее 1000 клеток. Статистический анализ количественных данных проводили с использованием программного обеспечения Statistica 6.0 и Excel. Определяли среднее значение и его стандартную ошибку. Различия считали значимыми при $P \leq 0,05$.

Результаты исследования. Миокард у интактных животных на светооптическом уровне имел строение, свойственное всем млекопитающим. При этом в сердечной мышце у здоровых крыс-самок по сравнению с самцами отмечено некоторое уменьшение диаметра КМЦ и их ядер, уменьшение диаметра и плотности расположения сосудов микроциркуляторного русла (МЦР), а также преобладание пула одноядерных КМЦ (табл. 1).

В тканевой реорганизации миокарда у животных всех групп с СН имелись нарушения кровообращения; наблюдались полиморфизм ядер КМЦ и «опустошение» околядерных зон; гипертрофи-

рованные и атрофированные КМЦ. Происходило возрастание объема соединительной ткани более чем в 2 раза в группах ОЭ-самок и самцов с СН по сравнению с контролем (см. табл. 1), увеличение количества полиморфно-клеточных инфильтратов в строме с единично встречающимися внутриклеточно локализованными лимфоцитами в КМЦ. В миокарде ЛЖ самок с СН по сравнению с самцами и ОЭ-самками с СН на фоне умеренной реорганизации мышечных и немышечных элементов миокарда чаще встречались КМЦ с сохраненными морфологическими признаками. Количественные изменения популяции КМЦ характеризовались значимым уменьшением доли одноядерных и увеличением двуядерных КМЦ у самцов с СН по сравнению с противоположными значениями у самок с СН (см. табл. 1).

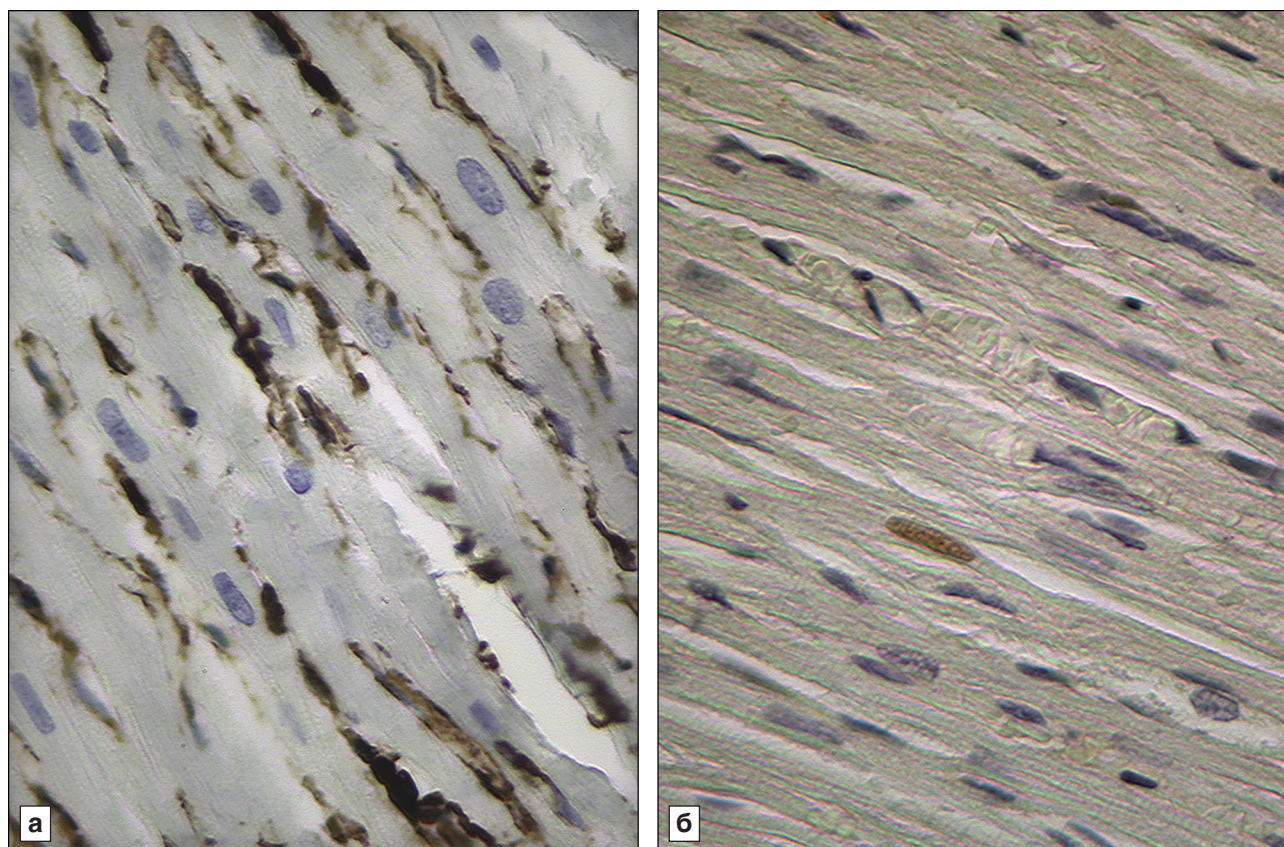
При ИГХ-исследовании миокарда ЛЖ у крыс всех групп регистрировались КМЦ и клетки внеклеточного матрикса (ВМ) с различной степенью экспрессии Ki-67, cas-9, vim (рисунк, а) (по критериям оценки экспрессии Ki-67, каспазы-9, виментина) (табл. 2). В миокарде ЛЖ у интактных крыс обоего пола встречались единичные Ki-67(+) (см. рисунок, б), cas-9(+)-иммунопозитивные КМЦ. Отмечалось увеличение Ki-67(+)-КМЦ в группах крыс-самок с СН и ОЭ-самок с СН по сравнению с контролем и у самцов с СН. Значимое увеличение количества cas-9(+)-КМЦ наблюдалось в миокарде у крыс-самцов с СН и ОЭ-крыс с СН по сравнению с контролем (см. табл. 2). При ИГХ-оценке экспрессии vim в миокарде ЛЖ у интактных крыс обоего пола преобладала легкая и умеренная степень активности vim(+)-клеток ВМ (см. табл. 2). Высокая степень экспрессии vim(+)

Таблица 1

Морфометрические показатели кардиомиоцитов (КМЦ) левого желудочка у крыс различных групп ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Показатель	Контрольные группы		Экспериментальные группы		
	Самки	Самцы	Самки 14 сут с СН	Самки ОЭ + 14 сут с СН	Самцы 14 сут с СН
Диаметр КМЦ, мкм	11,16±0,9	15,6±0,3	14,5±0,7	14±4	18,5±1,7
Диаметр ядра КМЦ, мкм	3,04±0,28	4,35±0,22	4,8±0,3	5,3±0,6	5,7±0,6
Объемная плотность, %:					
КМЦ	85±4	80,7±2,3	74±4	68±4*	61±3 [#]
стромы	14,7±2,8	18,3±1,7	25,5±2,9	35±4*	38±3 [#]
Относительное содержание КМЦ, %:					
одноядерных	24±5	22±6	32±4*	21±5	15,5±2,9*
двуядерных	76±3	80±5	73±6	82±4	84,7±1,7
многоядерных (3 ядра и более)	2,10±0,20	2,3±0,4	0,8±0,6	1,4±0,5	2,3±0,8

* Различия по сравнению с показателями у контрольных самок значимы при $P < 0,05$.[#] Различия по сравнению с показателями у контрольных самцов значимы при $P < 0,05$.



Миокард левого желудочка крысы-самца (а) и крысы-самки (б) с сердечной недостаточностью.

а — виментин-позитивные стромальные клетки; б — Ki-67-позитивный кардиомиоцит. а — иммуноцитохимическая реакция на виментин; б — иммуноцитохимическая реакция на Ki-67. Об. 40, ок. 10

Таблица 2

Экспрессия сигнальных белков (Ki-67, каспаза-9, виментин) в миокарде левого желудочка у крыс различных групп ($\bar{x} \pm s_{\bar{x}}$)

Группы животных	ИП, %, Ki-67	ИА, %, каспаза-9	Виментин
Интактные самки (контроль)	1,2±0,3	0,9±0,06	+/++ (30/70%)
Интактные самцы (контроль)	1,1±0,2	1,1±0,04	+/++ (25/75%)
Самки 14 сут СН	5,5±0,7*	4,0±1,2	++/+++ (80/20%)
Овариэктомированные самки+14 сут СН	4,2±0,6*	9,0±0,9*	++/+++ (60/40%)
Самцы 14 сут СН	2,77±08	12,0±1,4*	++/+++ (20/80%)

Примечание. СН — экспериментальная сердечная недостаточность; ИП — индекс пролиферации; ИА — индекс апоптоза (количество иммунопозитивных КМЦ). Виментин — степень фиброза (клетки стромы).

* Различия значимы по сравнению с показателями в контрольных группах при $P < 0,05$.

встречалась в строме миокарда у самцов с СН и меньшая у ОЭ-самок с СН по сравнению с контролем и у самок с СН.

Обсуждение полученных данных. При экспериментальной СН происходили значительные изменения мышечных и стромальных элементов миокарда, что согласуется с результатами наших предыдущих работ [2, 3]. При этом в миокарде у крыс обоего пола происходила реорганизация как КМЦ, так и ВМ миокарда.

Активация стромального компонента миокарда характеризовалась расширением сосудов микроциркуляторного русла с явлениями сладжирования, межмышечным отеком и диапедезом эритроцитов, скоплением клеток фибробластоподобного ряда. Эти результаты согласуются с ИГХ-картиной экспрессии белка промежуточных филаментов — виментина. При экспериментальной СН возрастание количества vim(+)-клеток между волокнами миокарда и периваскулярно сопровождалось увеличением количества Ki-67(+)-

клеток стромы, что демонстрирует пролиферативную активность ВМ. Это согласуется со сведениями о том, что стромальные клетки пролиферируют со значительно большей скоростью (в 20–40 раз), чем КМЦ, обуславливая замещение дефекта в зоне повреждения [5]. При сравнительном анализе выраженность описанных изменений преобладала в строме миокарда у самцов, способствуя развитию диффузного и очагового кардиосклероза. Половые особенности ремоделирования ВМ ряд авторов объясняют более низкой активностью матриксных металлопротеиназ и р-38 МАП-киназ в миокарде у особей женского пола, а также ингибирующим действием эстрогенов на экспрессию генов ренин-ангиотензин-альдостероновой системы и пролиферацию фибробластов [9].

При экспериментальной СН наблюдалось возрастание доли гипертрофированных КМЦ с увеличенными в диаметре ядрами, смещенными на периферию. В других, расположенных группами КМЦ со светлой разряженной цитоплазмой встречались небольшие пикнотизированные ядра. Полиморфизм ядер КМЦ, усиление литических повреждений отдельных КМЦ, а также групп мышечных волокон свидетельствуют об истощении компенсаторных механизмов в миокарде, дезадаптации и формировании регенераторно-пластической недостаточности, что согласуется с результатами и других исследователей [4]. Выраженность реактивных процессов в миокарде и значимое снижение объемной плотности КМЦ преобладали у самцов с экспериментальной СН в сравнении с самками обеих групп. По данным ряда работ, одним из возможных механизмов кардиопротекции у особей женского пола считается низкая плотность β -адренорецепторов в КМЦ [6].

Клеточная пролиферация и апоптоз являются сопряженными процессами и важными механизмами поддержания тканевого гомеостаза миокарда. В нашем исследовании отмечалось повышение индекса пролиферации КМЦ (экспрессия белка Ki-67) у крыс обоего пола с экспериментальной СН, со значимым увеличением у крыс-самок с СН в отличие от самцов с СН. КМЦ, экспрессирующие Ki-67(+), в основном были представлены одноядерными, реже двуядерными гипертрофированными или обычных размеров КМЦ. Известно, что покоящиеся клетки (G_0) негативны по содержанию Ki-67, антиген экспрессируется в клетках поздней G_1 (G_{1b}), а также в клетках S , G_2 и M фазах клеточного цикла [11]. Изменение пролиферативной активности КМЦ в нашем исследовании сочеталось с изменением

количества одно-, дву- и многоядерных миоцитов. Увеличение Ki-67(+)-КМЦ у самок с СН сопровождалось возрастанием доли одноядерных КМЦ, а у самцов — уменьшением доли одноядерных и увеличением доли двуядерных КМЦ. Данный факт можно рассматривать как половые особенности активации клеточных форм регенерации КМЦ. Можно предположить, что регенеративные процессы могут происходить в миокарде и за счет резидентных клеток, вступающих в митотический цикл уже во взрослом организме, или слияния клеток-предшественников из костного мозга с существующими КМЦ [10]. Рядом исследователей отмечены половые особенности в количестве прогениторных клеток, располагающихся в области предсердий и верхушки сердца, со значимым преобладанием их у особей женского пола, что однозначно может влиять на регенераторные возможности миокарда в норме и при патологии [11].

Считается, что сигнальные пути, приводящие клетку к митозу (протеинкиназа C, клеточные протоонкогены и др.), также обеспечивают чувствительность ее хроматина к эндонуклеазам, запуская при этом программированную клеточную гибель [10]. При анализе апоптотического индекса (экспрессия каспазы-9) выявлены половые особенности, заключающиеся в значимом увеличении КМЦ с признаками апоптоза в группе самцов с СН и несущественном — в группе самок с СН. Половые различия в жизнеспособности КМЦ ряд авторов связывают как с эстроген-индуцированной активацией протеинкиназы B [6], так и с высокой экспрессией теломеразы в КМЦ у особей женского пола [8, 9]. Кроме того, в ряде работ показано, что эстрогены предупреждают снижение мышечной массы миокарда у особей женского пола через активацию аутофагии [7], уменьшая количество атрофически и дистрофически измененных КМЦ, что отмечено и в нашем исследовании. Увеличение индекса апоптоза в группе ОЭ-крыс с СН в сравнении с таковым у самок с СН подтверждает антиапоптотическое действие эстрогенов на миокард.

Резюмируя изложенное, можно заключить, что регенераторный потенциал КМЦ и адаптационные возможности миокарда при СН значительно выше у крыс-самок, чем у самцов. Данные различия, на наш взгляд, зависят не только от активности половых гормонов, но, вероятно, имеют многофакторный характер. Механизмы контроля пролиферации КМЦ, включая генетические, связанные с X- и Y-хромосомой, а также с молекулами самых разных классов, остаются предметом многочисленных дискуссий. На наш взгляд,

более глубокое понимание половых различий пролиферации клеток миокарда, приводящих к особенностям ремоделирования сердца при СН, откроет путь к созданию новых, дифференцированных подходов в лечении пациентов с данной патологией.

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 11-04-97000 p_поволжье_a).

ЛИТЕРАТУРА

1. Автандилов Г.Г. Проблемы патогенеза и патологоанатомической диагностики болезней в аспектах морфометрии. М.: Медицина, 1984.
2. Лискова Ю.В., Саликова С.П., Стадников А.А. Структурная реорганизация миокарда овариэктомированных крыс с экспериментальной сердечной недостаточностью при введении мелатонина // Морфология. 2013. Т. 144, вып. 5. С. 25–29.
3. Лискова Ю.В., Саликова С.П., Стадников А.А. Экспериментальные модели сердечной недостаточности: состояние вопроса и результаты собственного исследования // Морфол. ведомости. 2014. № 1. С. 46–53.
4. Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Семенов Д.Е. Регенераторно-пластическая недостаточность сердца: морфологические основы и молекулярные механизмы. М.: ПAMH, 2003.
5. Fan D., Takawale A., Lee J., Kassiri Z. Cardiac fibroblasts, fibrosis and extracellular matrix remodeling in heart disease // Fibrogenesis. Tissue Repair. 2012. Vol. 5, № 15. P. 1–13.
6. Fazal L., Azibani F., Vodovar N. et al. Effects of biological sex on the pathophysiology of the heart // British J. Pharmacol. 2014. Vol. 171, № 3. P. 555–566. doi:10.1111/bph.12279
7. Koenig A., Sateriale A., Budd R.C. et al. The role of sex differences in autophagy in the heart during coxsackievirus B3 induced myocarditis // J. Cardiovasc. Transl. Res. 2014. Vol. 7, № 2. P. 182–191. doi:10.1007/s12265-013-9525-5.
8. Leri A., Barlucchi L., Limana F. et al. Telomerase expression and activity are coupled with myocyte proliferation and preservation of telomeric length in the failing heart // PNAS. 2001. Vol. 98, № 15. P. 8626–8631. doi:10.1073/pnas.151013298.
9. Piro M., Della Bona R.D., Abbate A. et al. Sex-Related differences in myocardial remodeling // J. Am. Coll. Cardiol. 2010. Vol. 55, № 11. P. 1057–1065. doi:10.1016/j.jacc.2009.09.065.
10. Senyo S.E., Lee R.T., Kühn B. Cardiac regeneration based on mechanisms of cardiomyocyte proliferation and differentiation // Stem Cell Res. 2014. Vol. 13, № 3. Pt B. P. 532–541. doi:10.1016/j.scr.2014.09.003.
11. Steinhauser M.L., Lee R.T. Regeneration of the heart // EMBO Mol. Med. 2011. Vol. 3, № 12. P. 701–712. doi:10.1002/emmm.201100175.

Поступила в редакцию 14.04.2017

GENDER-RELATED PECULIARITIES OF THE MYOCARDIAL REGENERATIVE CAPACITIES IN EXPERIMENTAL CARDIAC FAILURE

Yu. V. Liskova¹, A. A. Stadnikov¹, S. P. Salikova²

Myocardium of the left ventricle was studied in rats (n=40) of both sexes with an experimental heart failure (HF) using light microscopy, immunocytochemistry and morphometry. The substantial reorganization of the muscular and stromal elements of the myocardium was found in animals with HF. Both remodeling and regenerative capacities of the myocardium in animals with HF demonstrated gender-associated peculiarities. Gender-related distinctions were also found in the expression of Ki-67, caspase 9 and vimentin. The role of the cardioprotective effects of estrogens on the myocardium of the left ventricle as well as the importance of other factors influencing gender-related characteristics of myocardium regeneration in HF, are discussed.

Key words: *cardiomyocytes, regeneration, remodeling, heart failure, gender*

¹ Department of Histology, Cytology, and Embryology, Orenburg State Medical University; ² 2nd Department of Therapeutics (Advanced Medical Education), S.M. Kirov Military Medical Academy, St. Petersburg