

На правах рукописи

Коршунова Анна Юрьевна

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ ПРИ  
АЛЬТЕРАЦИИ МИОКАРДА РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

14.03.03 – патологическая физиология

Автореферат

диссертации на соискание ученой степени

кандидата медицинских наук

Москва – 2016

Работа выполнена на кафедре общей патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Министерства образования и науки РФ

Научный руководитель:

доктор медицинских наук **Благонравов Михаил Львович**

Официальные оппоненты:

**Пирожков Сергей Викторович**

доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры патофизиологии лечебного факультета ГБОУ ВПО «Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Министерства здравоохранения РФ

**Салмаси Жеан Мустафаевич**

доктор медицинских наук, профессор, профессор кафедры патофизиологии и клинической патофизиологии лечебного факультета ГБОУ ВПО «Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения РФ

Ведущая организация:

ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии»

Защита диссертации состоится « 05 » октября 2016 года в \_\_\_\_\_ часов на заседании диссертационного совета Д 212.203.06 при Российском университете дружбы народов по адресу: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 8.

С диссертацией можно ознакомиться в Научной библиотеке и на сайте ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» (адрес: 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, д. 6; сайт: <http://dissovet.rudn.ru>)

Автореферат разослан « \_\_\_\_\_ » \_\_\_\_\_ 2016 г.

Ученый секретарь

диссертационного совета Д 212.203.06

доктор биологических наук, доцент

М.М. Азова

## ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

**Актуальность проблемы.** Изучение изменений тканевого гомеостаза миокарда при различных патологических процессах на протяжении многих десятилетий является одним из самых приоритетных направлений экспериментальных исследований в области патофизиологии сердечно-сосудистой системы. Острая заинтересованность данной проблемой обусловлена тем, что кардиологические заболевания занимают ведущие позиции среди причин смерти от неинфекционных заболеваний с постоянной тенденцией к росту уровня заболеваемости, по данным статистических исследований ВОЗ [ВОЗ, 2015]. В то же время методы консервативного лечения, используемые в современной кардиологической практике, направлены преимущественно на замедление прогрессирования заболевания, но чаще всего они не обеспечивают полноценного восстановления морфо-функциональных свойств измененного миокарда. В связи с этим очевидна необходимость более детального изучения молекулярных и клеточных основ патогенеза различных по своей природе заболеваний миокарда.

На сегодняшний день описано уже более десятка различных типов клеточной гибели, которые, согласно современной классификации, подразделяются на две основные группы: «возникшая в результате несчастного случая» (*от англ. accidental cell death, ACD*) и генетически запрограммированная «регулируемая» клеточная смерть (*от англ. regulated cell death, RCD*). При этом под «программированной клеточной гибелью» (*от англ. programmed cell death, PCD*) подразумевается исключительно физиологические случаи RCD, возникающие без нарушения функционального состояния клетки, например, при эмбриональном развитии [L. Galluzzi et al., 2015].

В физиологических условиях существенную роль в поддержании гомеостаза миокарда играют процессы как апоптоза, так и аутофагии. Структура и функции кардиомиоцитов (КМЦ) тесно связаны с феноменом аутофагии, представляющей собой один из механизмов внутриклеточной регенерации, а также способ регулируемой клеточной гибели. При крайне ограниченном регенераторном потенциале миокарда существует непрерывный процесс обновления клеток в сердце взрослого организма, включающий в себя ликвидацию и замещение отдельных элементов поврежденной ткани сердца. Во время эмбриогенеза апоптоз участвует в развитии сердечных клапанов, проводящей системы и коронарных артерий [D. Qi et al., 2012]. В патологических условиях изменение активности механизмов, участвующих в реализации аутофагии и апоптоза КМЦ, наблюдается при некоторых видах повреждения сердца, возникающих, например, при ишемической болезни сердца, гемодинамической перегрузке и диффузных поражениях различного генеза [M. Li et al., 2016]. Одним из ключевых клеточных механизмов, который

опосредует стресс-индуцированную адаптацию, является аутофагия, имеющая характер функционально-резервного механизма компенсации энергетического потенциала клетки, восприимчивого к фармакологическому или генетическому регулированию [B. Loos et al., 2013]. Несмотря на то, что аутофагия может сопровождать регулирующую клеточную гибель [E. White, 2012; G. Marino et al., 2014], не во всех случаях она способствует её реализации [M. Elgendy et al., 2011; S.Y. Chen et al., 2011; D. Denton et al., 2012, 2013; Y. Liu et al., 2013; H. Varma et al., 2013; K. Nihira et al., 2014]. При этом механизмы, с помощью которых терапевтически индуцированная аутофагия может вызвать гибель клеток, остались в значительной степени не изучены [L. Kohli et al., 2013].

Согласно результатам ряда исследований, апоптоз КМЦ играет важную роль в патогенезе сердечной недостаточности при хронической перегрузке миокарда левого желудочка (ЛЖ) [А.П. Хлапов и др., 2008; Е.Н. Березикова, 2014]. Однако большое внимание уделяется также механизмам регулируемой клеточной гибели при остром повреждении миокарда [А.В. Ушаков и др., 2006].

Определенные патологические процессы в сердечно-сосудистой системе сопровождаются явлениями регулируемой клеточной гибели КМЦ, в частности, апоптозом или аутофагией. Последние по своей природе являются защитными механизмами, обеспечивающими сохранение нормального метаболизма как на клеточном, так и на тканевом уровне, однако, процессы регулируемой клеточной гибели могут участвовать в патогенезе хронической сердечной недостаточности на фоне первичной альтерации миокарда. Роль механизмов клеточной гибели в реализации компенсаторно-приспособительных процессов при остром повреждении сердца по-прежнему до конца не определена, что требует дальнейшего исследования.

**Степень разработанности темы.** На сегодняшний день накоплено значительное число данных о механизмах активации и реализации регулируемой клеточной гибели в процессе ремоделирования миокарда при различных заболеваниях сердечно-сосудистой системы. Разработана новая классификация клеточной гибели, учитывающая возможность управления механизмами гибели клеток, а также методы генетической и молекулярной терапии, направленной на сохранение функционально-активных структурных элементов миокарда.

Выявлена значимая роль клеточной гибели в сохранении нормальной функции миокарда на ранних стадиях ремоделирования сердца. При этом по-прежнему в исследованиях компенсаторно-приспособительных реакций с участием процессов гибели КМЦ преимущество отдается изучению хронических поражений сердечной мышцы.

**Цель исследования.** Изучить в эксперименте особенности отдельных видов регулируемой гибели КМЦ, а также патоморфологические изменения миокарда при очаговой ишемии ЛЖ, острой гемодинамической перегрузке ЛЖ и диффузном токсическом повреждении миокарда.

#### **Задачи исследования**

1. Дать качественную и количественную оценку морфологическому состоянию миокарда при острой очаговой ишемии ЛЖ и оценить активность процессов инициации BECN1-опосредованной аутофагии КМЦ пренекротической зоны.

2. Изучить механизмы внутриклеточной сигнализации апоптических процессов в КМЦ ЛЖ на фоне ишемического повреждения.

3. Провести анализ особенностей индукции BECN1-индуцированной аутофагии КМЦ, а также оценить патоморфологические изменения сердечной мышцы при острой гемодинамической перегрузке миокарда ЛЖ.

4. Исследовать особенности активации внутреннего (митохондриального) апоптогенного пути клеточной гибели при острой перегрузке ЛЖ.

5. Оценить морфологическое состояние миокарда и процессы BECN1-зависимой аутофагии в КМЦ ЛЖ при диффузном токсическом поражении сердца.

**Научная новизна.** Впервые проведено исследование процессов индукции BECN1-опосредованной аутофагии при остром повреждении сердечной мышцы (очаговой ишемии ЛЖ, острой гемодинамической перегрузке ЛЖ и диффузной интоксикации сердца).

Получены принципиально новые данные о механизмах BECN1-зависимой аутофагии и митохондриального пути активации апоптотической гибели КМЦ при острой очаговой ишемии ЛЖ и острой гемодинамической перегрузке ЛЖ.

Определены пути инициации данных типов регулируемой клеточной гибели КМЦ. Данные иммуногистохимического исследования показали, что при моделировании инфаркта миокарда апоптоз КМЦ пренекротической зоны происходит в большей степени по внутреннему (митохондриальному) пути, в то время как при гемодинамической перегрузке ЛЖ для КМЦ характерно угнетение данного сигнального пути активации апоптоза.

Впервые установлено, что в отличие от очагового повреждения миокарда при распространенном патологическом процессе токсического или гемодинамического генеза индуцирование BECN1-ассоциированной аутофагии снижается.

**Теоретическая и практическая значимость.** На основе проведенного исследования внутриклеточных механизмов реализации аутофагии и апоптоза КМЦ ЛЖ при различных патологических процессах выработан новый взгляд на

реализацию внутриклеточных механизмов на ранних стадиях ремоделирования миокарда. Полученные данные могут быть использованы для поиска и разработки лечебно-профилактических мероприятий, направленных на управление процессами клеточной гибели КМЦ с целью восстановления морфофункционального состояния поврежденного миокарда. Полученные результаты открывают новые перспективы для понимания молекулярных механизмов развития и прогрессирования сердечно-сосудистых заболеваний.

**Методология и методы диссертационного исследования.** Особенности развития процессов аутофагии и апоптоза КМЦ и морфологических изменений миокарда ЛЖ исследованы на экспериментальных моделях острой очаговой ишемии, гемодинамической перегрузки ЛЖ и диффузного токсического поражения сердечной мышцы. Механизмы реализации аутофагии и апоптоза изучались методом иммуногистохимии с применением первичных козьих поликлональных антител и системы детекции с использованием вторичных козьих антител «ImmunoCruz™ goat LSAB Staining System» («SantaCruzBiotechnology Inc.», США). Световая микроскопия гистологических срезов проводилась с помощью микроскопа «Nikon Eclipse E400» и видеосистемы «TauVideo» с программой «Tau Морфология» на основе камеры «Watec 221s».

Автор диссертационного исследования выражает благодарность д.м.н. Н.В. Ягловой, заведующей лабораторией развития эндокринной системы Федерального государственного бюджетного научного учреждения «Научно-исследовательский институт морфологии человека», за помощь в проведении иммуногистохимического исследования.

**Внедрение результатов исследования.** Результаты диссертационной работы внедрены в учебный процесс на кафедре общей патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова медицинского института ФГАОУ ВО «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки РФ.

#### **Положения, выносимые на защиту**

1. При острой ишемии ЛЖ очаговые нарушения архитектоники миокарда сопровождаются активацией процессов инициации BECN1-зависимой аутофагии КМЦ. Апоптогенная сигнальная трансдукция в КМЦ пренекротической зоны ЛЖ осуществляется за счет внутреннего (митохондриального) пути.

2. Острая гемодинамическая перегрузка ЛЖ, вызванная стенозированием восходящей аорты, приводит к развитию распространенных деструктивных изменений миокарда, а также угнетению BECN1-опосредованной аутофагии КМЦ ЛЖ и подавлению экспрессии белка BAX с последующей супрессией внутреннего пути индукции апоптоза.

3. Диффузное токсическое поражение сердца вызывает угнетение BDNF-индуцированной аутофагии КМЦ ЛЖ на фоне выраженного воспалительного ответа.

**Степень достоверности.** Данное экспериментальное исследование выполнено на животных, полученных из питомника «Манихино», при достаточном объёме выборки. Качество животных подтверждено сертификатом качества и сертификатом здоровья, выданными поставщиком. Морфологическое и иммуногистохимическое исследование проводили на оборудовании, сертифицированном для данного вида работ. Также применялись методы статистической обработки, полностью соответствующие поставленным задачам.

**Апробация результатов работы.** Работа апробирована на III международной студенческой научно-практической конференции с участием молодых ученых «Клинические и теоретические аспекты современной медицины», г. Москва, 2011 г.; Semmelweis International Students' Conference, Budapest, 2012 г.; на международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии», г. Москва, 2014 г.; The 61-st annual conference of the Israel Heart Society in association with the Israel Society of Cardiothoracic Surgery, Tel Aviv, 2014 г.; на VI международной научной конференции «Science4Health», г. Москва, 2015 г.; на Всероссийской научной конференции с международным участием «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии», г. Москва, 2016 г.; на совместном заседании кафедры общей патологии и патологической физиологии имени В.А. Фролова и кафедры патологической анатомии медицинского института РУДН, 2016 г.

**Публикации.** По материалам диссертации опубликовано 8 работ, в том числе 3 статьи в журналах, входящих в перечень, утверждённый ВАК Министерства образования и науки РФ.

**Структура и объём диссертации.** Диссертация состоит из введения, обзора литературы, главы с описанием материалов и методов исследования, 4-х глав, в которых изложены результаты собственного исследования и их обсуждения, заключения и списка литературы. Диссертация изложена на 141 странице машинописного текста, содержит 4 таблицы и 25 рисунков. Библиография включает 262 источника российской и зарубежной литературы.

## **МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Эксперимент проводился на 40 взрослых кроликах-самцах породы «Шиншилла» массой тела 3,0 – 3,5 кг в трёх отдельных сериях, которые определялись видом исследуемой альтерации миокарда (острая очаговая ишемия ЛЖ, острая гемодинамическая перегрузка ЛЖ, диффузное токсическое повреждение миокарда). В каждой серии животные были разделены на 3

группы, соответствующие срокам исследования: 1, 3 и 5 суток от начала соответствующего патологического процесса. Контрольную группу составили интактные кролики того же возраста и пола.

Моделирование острой очаговой ишемии ЛЖ у кроликов проводилось посредством хирургической операции путем наложения лигатуры на нисходящую ветвь левой коронарной артерии на границе её средней и нижней трети. Острая гемодинамическая перегрузка ЛЖ сердца моделировалась у кроликов методом сужения просвета восходящей аорты на 1/3 с использованием металлической спирали меньшего диаметра. Моделирование диффузного поражения сердечной мышцы производилось у кроликов путём однократного внутривенного введения 0,3 DLM/1 кг (DLM – минимальная летальная доза) нативного дифтерийного токсина, который предварительно оттитровывался на морских свинках. 1 DLM токсина соответствовала такому его количеству, которое при внутрибрюшинном введении морской свинке вызвало гибель более 50% животных в течение 3 суток [В.А. Фролов, М.В. Далин, 1996].

В условиях эксперимента содержание животных и взаимодействие с ними проводились в соответствии с приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г., а также требованиями, установленными Директивой Совета ЕС 86/609/ЕЭС от 24.11.1986 по охране животных, используемых в экспериментальных и других целях. На проведение экспериментов получено разрешение этического комитета медицинского факультета РУДН.

В соответствующие сроки у животных под общим наркозом вскрывалась грудная клетка, выполнялась экстирпация сердца и перфузия его через восходящую аорту 0,9% раствором NaCl. Из свободной стенки ЛЖ иссекали фрагменты миокарда размером 5x5 мм и фиксировали в течение 72 часов в 4% нейтральном параформальдегиде. Затем материал обрабатывали и заливали в парафин по общепринятой методике. Используя блоки препаратов, изготавливали гистологические срезы толщиной 5 мкм на микротоме «Slidt-2003» (Германия).

Гистологические срезы, предварительно окрашенные гематоксилином и эозином, исследовались с помощью светового микроскопа «Nikon Eclipse E400» при увеличении 400x и видеосистемы «TauVideo» с программой «Tau Морфология» на основе камеры «Watec 221s». При этом анализировали 90 полей в каждой серии эксперимента. Морфометрический анализ проводили в каждом поле зрения: определяли в объёмных процентах (об.%) относительное содержание в миокарде миофибрилл, ядер, сосудов, участков деструкции и межклеточных пространств с помощью сетки Автандилова [Г.Г. Автандилов, 1990]. Также рассчитывали «ядерно-цитоплазматическое отношение»: процентное отношение площади ядер КМЦ к площади мышечных волокон.



Для проведения иммуногистохимического исследования миокарда ЛЖ изготавливали гистологические срезы и наносили их на стёкла с поли-L-лизиновым адгезивным покрытием «Superfrost Ultra Plus» («Mentzel Glasser», Германия), депарафинировали ксилолом и проводили по спиртам нисходящей концентрации.

Иммуногистохимическое исследование процессов, опосредующих явления аутофагии и апоптоза в КМЦ, проводилось методом оценки экспрессии белков, являющихся маркёрами механизмов, опосредующих соответствующие виды клеточной гибели. Белок BECN1 является одним из важнейших в сигнализации интерактома аутофагии и рекомендован руководством по использованию и интерпретации анализов для мониторинга аутофагии (3-е издание, 2016) [D.J. Klionsky et al., 2016]. Также ранее было установлено, что BECN1 находится в связанном состоянии с антиапоптотическим белком BCL-2, что предполагает тесную взаимосвязь между механизмами инициации аутофагии и апоптоза [S. Pattingre et al., 2005]. Белок BAX относится к проапоптотическим белкам и совместно с белком BCL-2 участвует в реализации митохондриального пути инициации апоптоза. В настоящем исследовании на модели острой ишемии миокарда ЛЖ исследовалась экспрессия белков BECN1, BCL-2 и BAX; на модели острой перегрузки ЛЖ – BECN1 и BAX; на модели диффузного токсического повреждения миокарда ЛЖ – BECN1.

Для иммуногистохимического выявления экспрессии вышеуказанных белков использовались первичные козьи поликлональные антитела («SantaCruzBiotechnology Inc.», США). Результаты реакции визуализировали при помощи системы детекции с использованием биотинилированных вторичных анти-козьих антител «ImmunoCruz™ goat LSAB Staining System» («SantaCruzBiotechnology Inc.», США). Препараты докрасивали гематоксилином Майера («Биовитрум», Россия). Иммуногистохимическая реакция считалась положительной при появлении коричневой окраски в цитоплазме КМЦ с неповрежденной плазматической мембраной. Микроскопия срезов миокарда проводилась в 120 полях зрения в каждой серии эксперимента при 200-кратном увеличении с использованием сетки Автандилова. При этом определяли отношение количества равноудаленных точек, приходящихся на позитивно окрашенную цитоплазму КМЦ, к общему количеству точек, занимаемых цитоплазмой миофибрилл (в процентах).

Все числовые данные подвергались статистической обработке с использованием программного обеспечения «Google Sheets» (Google Inc., 2014), программы «Biostat» (McGraw-Hill, Inc., 1993). Вычислялась величина среднего значения, ошибки среднего, среднего квадратического отклонения. При этом использовали *t* критерий Стьюдента (за достоверную принималась разность средних при  $p \leq 0,05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

### Влияние острой очаговой ишемии на морфологическое состояние миокарда левого желудочка и экспрессию ВЕСN1, ВАХ, ВСL-2

По данным морфологического анализа миокарда, ЛЖ при острой очаговой ишемии по сравнению с контрольной группой выявлено достоверное уменьшение объемной площади миофибрилл и ядер КМЦ, увеличение внеклеточного пространства (табл. 1) на фоне интенсивных деструктивных процессов без явных морфологических признаков явлений регенерации.

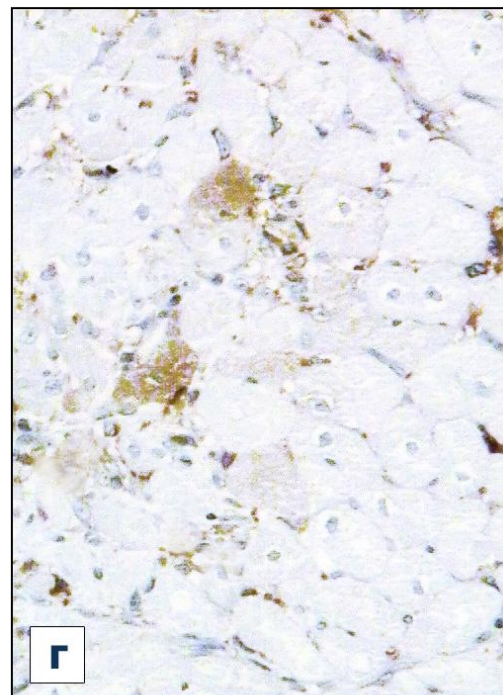
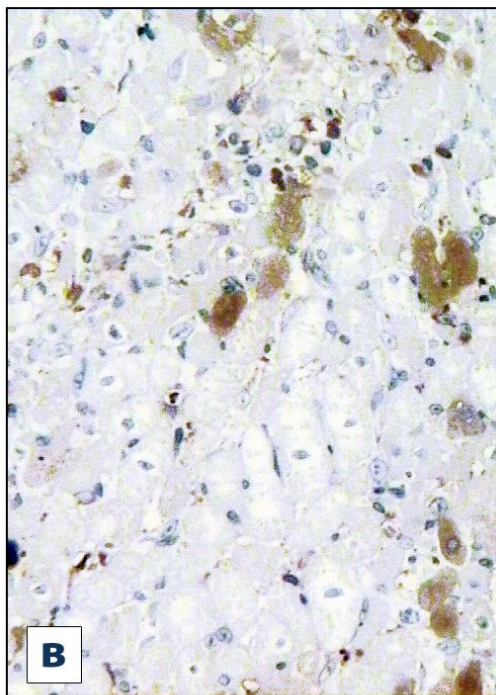
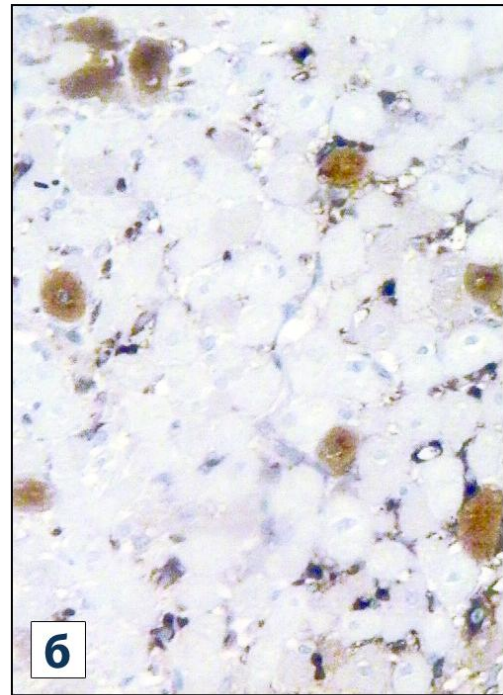
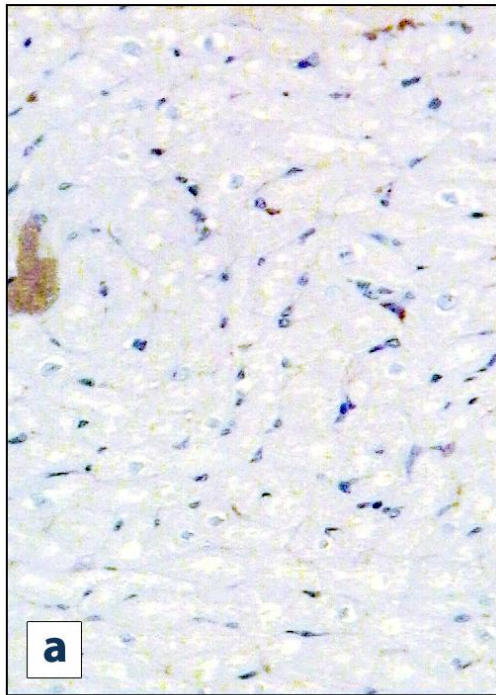
*Таблица 1.*

Данные морфометрического анализа гистологических срезов миокарда ЛЖ в контроле, через 1, 3 и 5 суток от возникновения острой очаговой ишемии ( $M \pm m$ )

Структурные элементы	Контроль	Сроки исследования		
		1 сут.	3 сут.	5 сут.
Мышечные волокна, об.%	88,04±0,37	72,81 ±2,05*	<u>59,14±3,22*</u>	51,69±3,72*
Ядра, об%	5,48±0,21	4,16±0,24*	<u>3,17±0,24*</u>	3,17±0,35*
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0,06±0,003	0,06±0,003	0,05±0,004*	0,04±0,004*
Сосуды, об%	1,01±0,77	0,30±0,13	<u>1,50±0,45</u>	1,64±0,53
Участки деструкции, об%	0,29±0,06	6,21±1,24*	<u>21,94±2,98*</u>	29,76±3,80*
Внеклеточное пространство, об%	6,19±0,32	16,14±1,34*	14,03±1,00*	13,67±1,11*

*Примечание:* (\*) – данные, достоверно отличающиеся от контроля, подчеркнутым шрифтом отмечены результаты, имеющие достоверное отличие по сравнению с предыдущим сроком исследования.

По результатам качественного анализа иммуногистохимической реакции срезов миокарда ЛЖ на белок ВЕСN1, наблюдался мозаичный, неравномерный характер положительной окраски КМЦ. При оценке экспрессии белка ВЕСN1 в контрольной группе в миокарде ЛЖ положительная иммуногистохимическая окраска КМЦ определяется в незначительном количестве КМЦ и достаточно неравномерно. Визуально отмечалась тенденция к увеличению количества положительно окрашенных миофибрилл в участках жизнеспособного миокарда, непосредственно граничащих с очагами деструктивно-инфильтративных изменений на фоне острой ишемии (рис. 1).



**Рис. 1.** Экспрессия белка VEGF1 в КМЦ ЛЖ кроликов. Перинфарктная зона. Поперечные срезы миокарда. Иммуногистохимическая окраска. Ув.  $\times 200$ .  
*а – контроль; очаговая ишемия ЛЖ: б – 1 сут., в – 3 сут., г – 5 сут.*

На 1-е сутки от возникновения очаговой ишемии ЛЖ отмечается достоверное по сравнению с контролем увеличение содержания белка BECN1 в цитоплазме КМЦ.

В последующие периоды исследования происходит постепенное снижение экспрессии BECN1 относительно 1-х суток, при этом значения как на 3-и, так и на 5-е сутки от начала процесса остаются на статистически значимом повышенном уровне относительно контрольных данных.

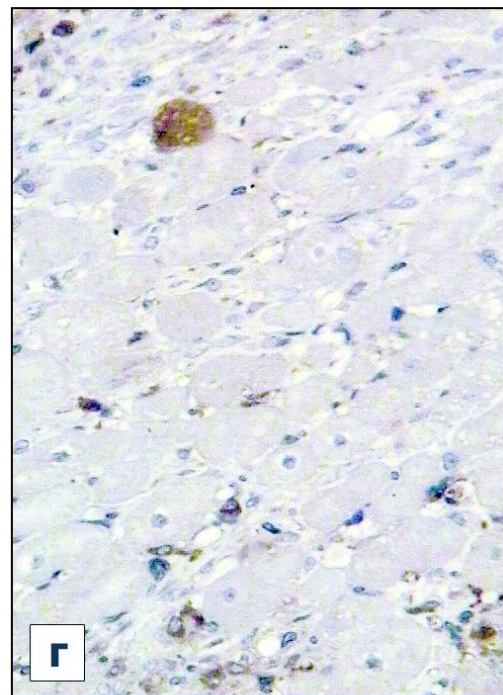
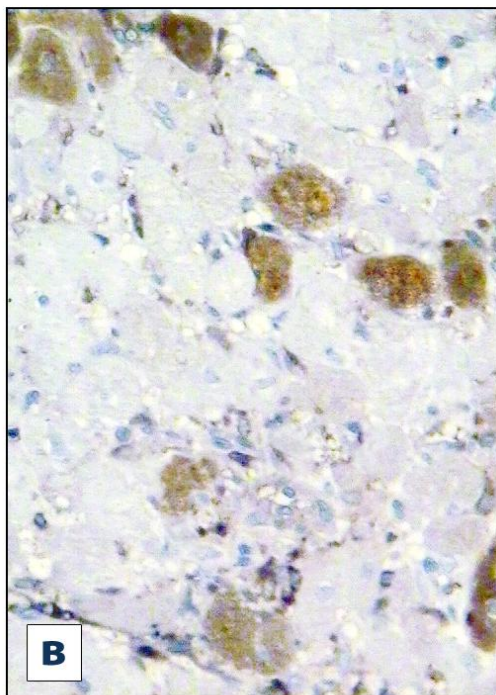
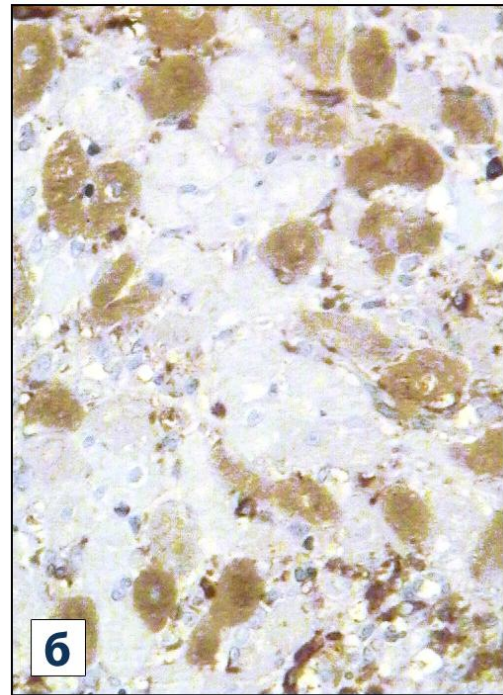
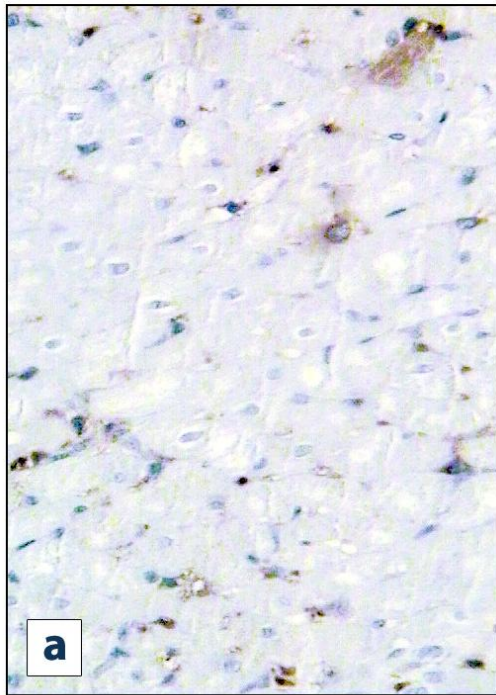
Таким образом, в целом можно говорить о повышении активности аутофагии КМЦ при ишемическом повреждении миокарда ЛЖ.

При иммуногистохимическом исследовании белка BAX в миокарде ЛЖ контрольной группы обнаруживается незначительное количество КМЦ с положительной слабоинтенсивной окраской. Однако уже на 1-е сутки исследования отмечается резкий подъём уровня экспрессии белка BAX, преобладающей в КМЦ перинфарктной зоны: интенсивность иммуногистохимической реакции усиливается по мере приближения к границе деструктивно измененного миокарда (рис. 2).

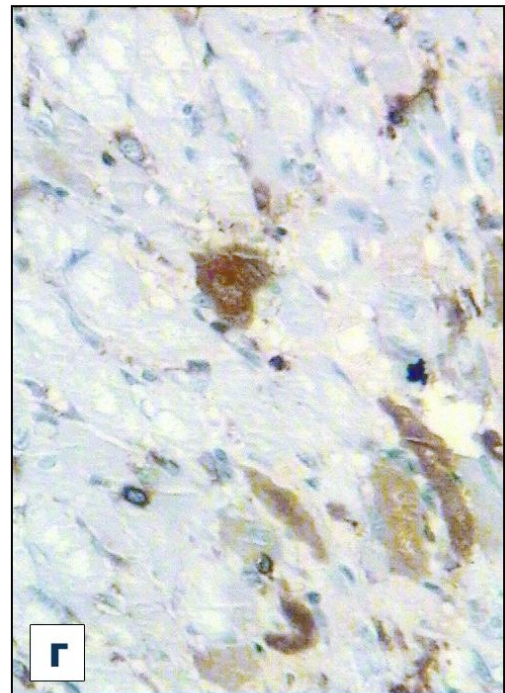
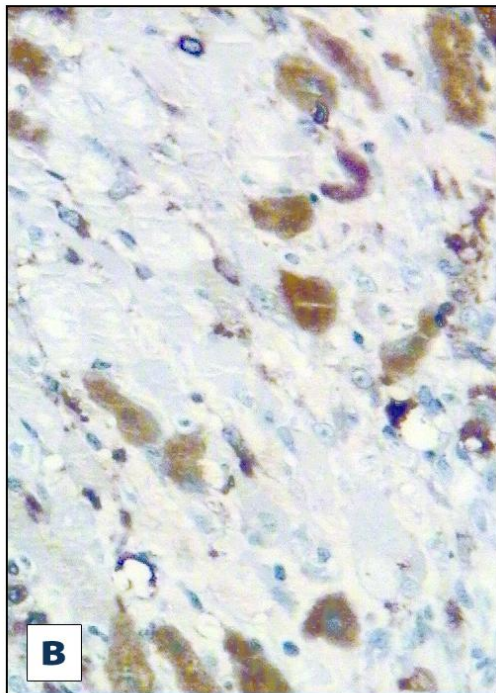
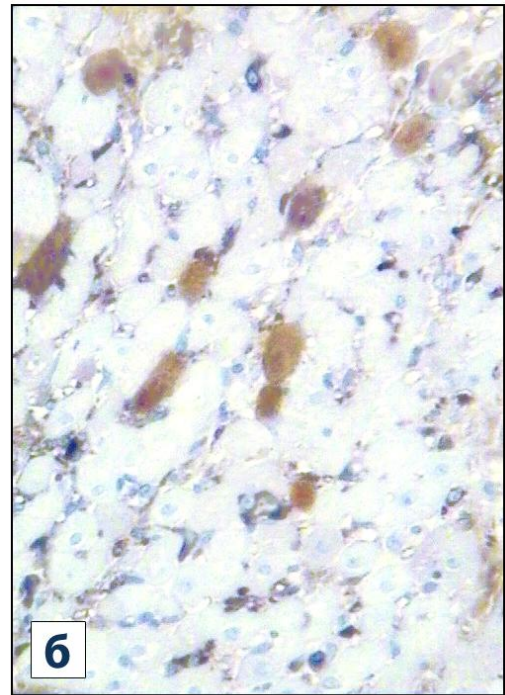
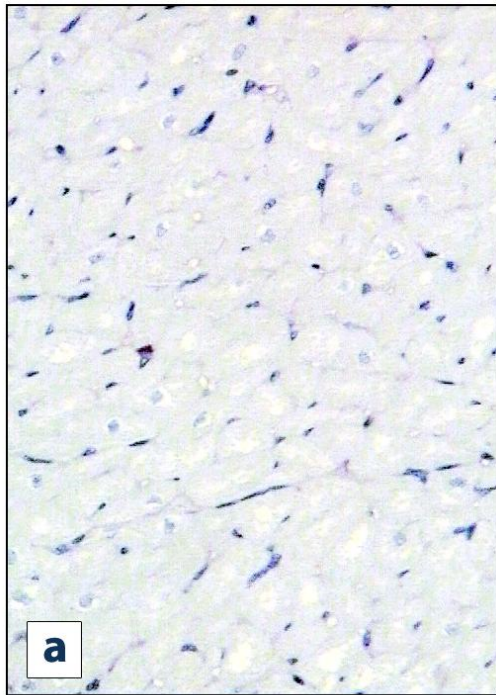
В последующие сроки (3-и и 5-е сутки) число позитивно окрашенных КМЦ постепенно снижается по сравнению с первыми сутками, однако, остается на уровне, достоверно повышенном по сравнению с контрольной группой. Следовательно, в ишемизированной зоне миокарда ЛЖ увеличивается интенсивность апоптотических процессов, реализуемых посредством проапоптозного фактора BAX.

При качественной оценке иммуногистохимической окраски в исследовании экспрессии белка BCL-2 КМЦ миокарда ЛЖ не отмечалось четкой взаимосвязи между усилением интенсивности положительной реакции цитоплазмы миофибрилл и положением по отношению к зоне ишемии. На участках перинфарктной зоны миокарда наблюдалось как сплошное, так и единичное неравномерное окрашивание КМЦ (рис. 3).

В миокарде ЛЖ интактных кроликов экспрессия белка BCL-2 практически не определяется, процентное содержание КМЦ с положительной иммуногистохимической реакцией составляет всего 0,04%. На 1-е сутки от начала острой ишемии миокарда отмечается достоверное повышение уровня позитивно окрашенных КМЦ. На 3-и сутки наблюдается статистически значимое повышение данного показателя по сравнению с предыдущими сутками. Однако на 5-е сутки число КМЦ с положительно окрашенной цитоплазмой снижается и практически достигает значений 1-х суток эксперимента.



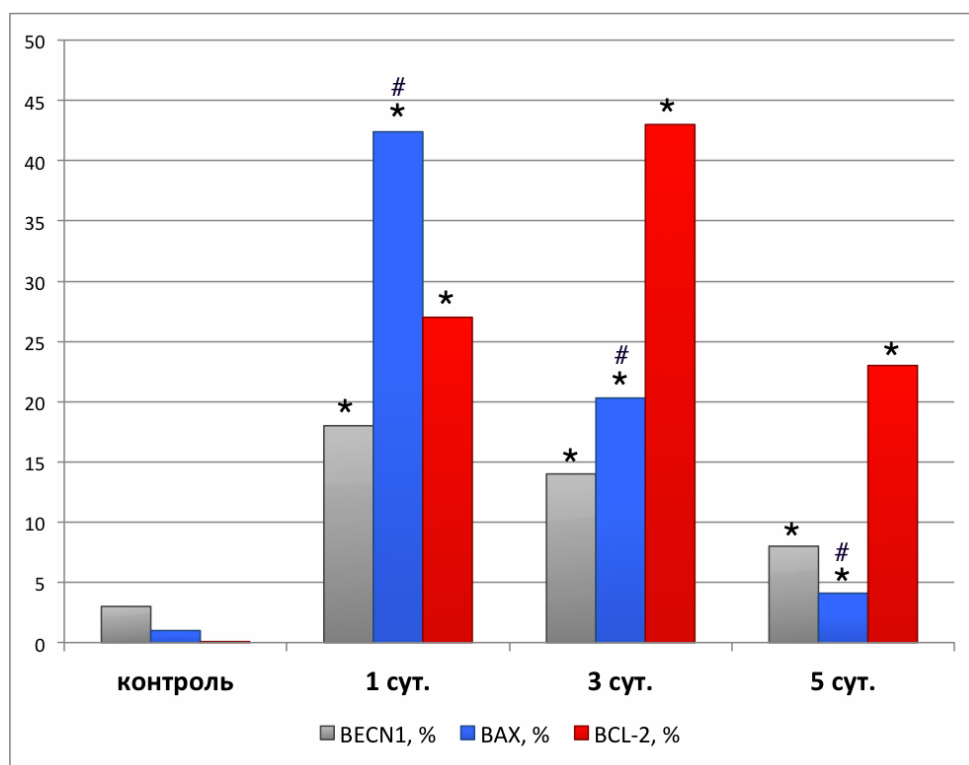
**Рис. 2.** Экспрессия белка VAX в КМЦ ЛЖ кроликов. Перинфарктная зона. Поперечные срезы миокарда. Иммуногистохимическая окраска. Ув.  $\times 200$ .  
*а – контроль; очаговая ишемия ЛЖ: б – 1 сут., в – 3 сут., г – 5 сут.*



**Рис. 3.** Экспрессия белка VCL-2 в КМЦ ЛЖ кроликов. Перинфарктная зона. Поперечные срезы миокарда. Иммуногистохимическая окраска. Ув.  $\times 200$ .  
*а – контроль; очаговая ишемия ЛЖ: б – 1 сут., в – 3 сут., г – 5 сут.*

Морфологические изменения при очаговой ишемии миокарда согласуются с результатами иммуногистохимического исследования. Повышение интенсивности процессов аутофагии в пренекротической зоне, по-видимому, носит преимущественно компенсаторно-приспособительный характер, способствуя сохранению численности функционально активных КМЦ и препятствуя расширению зоны инфаркта.

При этом усиление экспрессии белка ВАХ говорит о сопутствующей активизации апоптотических процессов в КМЦ, являющейся по своей сути типовой реакцией альтерированного миокарда. Однако учитывая последующее усиление экспрессии белка BCL-2 и постепенное снижение содержания белка ВАХ в КМЦ к 5-м суткам (рис. 4), можно предположить, что процессы активации апоптотических механизмов не завершаются апоптотической гибелью клетки (возможно речь идет о незавершенном апоптозе).



**Рис. 4.** Содержание белка BECN1, ВАХ и ВCL-2 в КМЦ ЛЖ миокарда кроликов в контроле и на 1, 3 и 5 сутки острой очаговой ишемии миокарда ЛЖ.

Примечание: (\*) – значения, достоверно отличающиеся от контроля при  $p \leq 0.05$ , (#) – достоверные отличия между значениями содержания белка ВАХ от содержания белка ВCL-2 на соответствующих сроках при  $p \leq 0.05$ .

### **Влияние острой гемодинамической перегрузки на морфологическое состояние миокарда левого желудочка и экспрессию BECN1 и ВАХ**

При световой микроскопии гистологических препаратов миокарда ЛЖ по сравнению с контролем структурные деструктивные изменения миокарда ЛЖ слабо выражены и носят преимущественно очаговый характер.

При острой гемодинамической перегрузке ЛЖ наблюдается значимое снижение объёмной доли жизнеспособных КМЦ на ранних стадиях развития острого повреждения миокарда на фоне умеренно нарастающих деструктивных процессов (таб. 2).

**Таблица 2.**

**Данные морфометрического анализа гистологических срезов миокарда ЛЖ в контроле, через 1, 3 и 5 суток от начала острой гемодинамической перегрузки ЛЖ (M±m)**

Структурные элементы	Контроль	Сроки исследования		
		1 сут	3 сут	5 сут
Мышечные волокна, об.%	88,04±0,37	84,60 ±1,02*	82,72±0,96*	81,79±2,06*
Ядра, об%	5,48±0,21	3,31±0,20*	<u>5,08±0,24</u>	4,46±0,23*
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0,06±0,003	0,04±0,003*	<u>0,06±0,003</u>	0,06±0,003
Сосуды, об%	1,01±0,77	0,73±0,20	0,42±0,17	0,14±0,09
Участки деструкции, об%	0,29±0,06	0,30±0,07	0,36±0,16	2,58±1.24
Внеклеточное пространство, об%	6,19±0,32	10,31±0,79*	10,69±0,83*	9,50±1,26*

*Примечание:* (\*) – данные, достоверно отличающиеся от контроля, подчеркнутым шрифтом отмечены результаты, имеющие достоверное отличие по сравнению с предыдущим сроком исследования.

По результатам качественного анализа иммуногистохимической реакции на VECN1, в миокарде ЛЖ при острой перегрузке положительная окраска КМЦ слабо выражена и носит скорее спорадический характер. На 1-е сутки от возникновения острой перегрузки ЛЖ отмечается достоверное снижение содержания VECN1 в цитоплазме КМЦ. К 3-м суткам наблюдается дальнейшее снижение экспрессии VECN1 относительно 1-х суток. Однако на 5-е сутки эксперимента данный показатель незначительно увеличивается, при этом по-прежнему находится на достоверно более низком по сравнению с контрольным значением уровне.

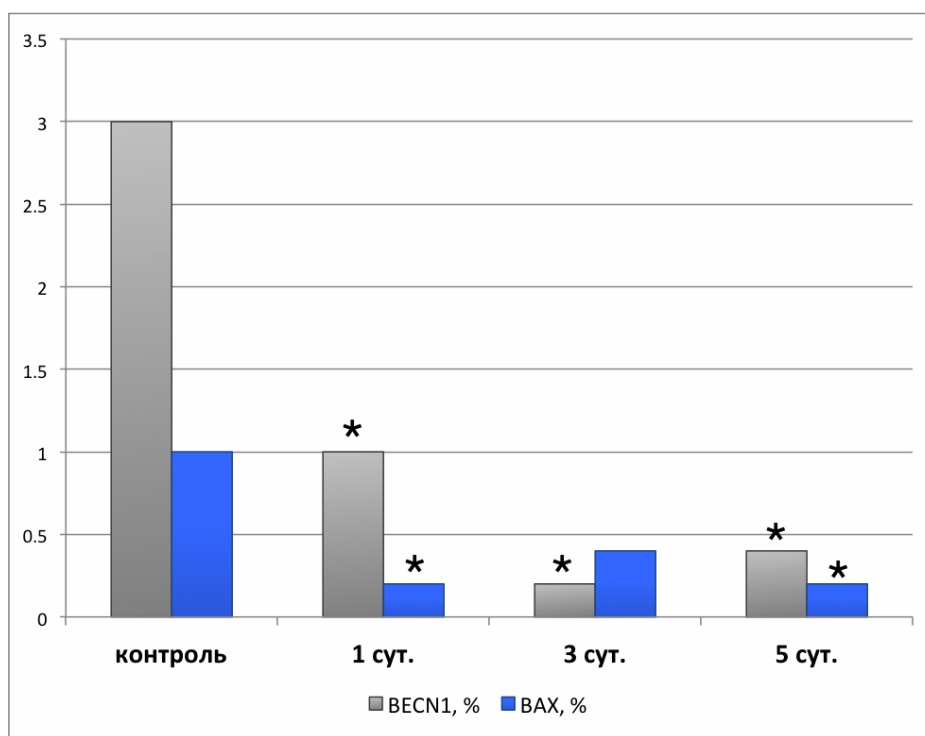
При качественной оценке срезов миокарда после проведения иммуногистохимической реакции на VAX при острой перегрузке ЛЖ отмечался мозаичный, неравномерный характер окрашивания, а также относительно низкая плотность положительной окраски КМЦ.

В течение 1-х суток от начала моделирования острой перегрузки ЛЖ отмечено статистически значимое снижение по сравнению с контролем содержания белка VAX в цитоплазме КМЦ. При этом на 3-и сутки выявлено



повышение данного показателя, однако, в отличие от контроля и предыдущих суток моделирования полученные изменения оказались недостоверными. На 5 сутки эксперимента степень экспрессии BAX несколько снижается по сравнению с предыдущим сроком и продолжает оставаться на уровне, достоверно более низком по сравнению с контролем.

Таким образом, проведенные иммуногистохимические исследования свидетельствовали об уменьшении степени индукции BCLN1-зависимой аутофагии. Что касается апоптотических механизмов, то, согласно, нашим данным, экспрессия проапоптозного фактора BAX также не увеличивается в КМЦ ЛЖ при острой гемодинамической перегрузке последнего, а, напротив, даже достоверно ниже контроля на 1-х и 5-х сутках процесса и имеет тенденцию к снижению на 3-х сутках (рис. 5), что свидетельствует о выключении митохондриального (внутреннего) сигнального пути инициации апоптоза.



**Рис. 5.** Содержание белка BCLN1 и BAX в КМЦ ЛЖ миокарда кроликов в контроле и на 1, 3 и 5 сутки острой гемодинамической перегрузки ЛЖ.

Примечание: (\*) – значения, достоверно отличающиеся от контроля при  $p \leq 0,05$ .

### **Влияние дифтерийной интоксикации на морфологическое состояние миокарда левого желудочка и экспрессию BCLN1**

При морфологическом анализе срезов миокарда, подверженного воздействию дифтерийного токсина, наблюдаются характерные нарастающие особенности инфильтративно-дегенеративных поражений миокарда, также именуемые в литературе «myolysis cordis toxica». Данные деструктивные изменения выражены умеренно, носят преимущественно очаговый характер.

В остром эксперименте деструктивные изменения в миокарде ЛЖ наблюдаются уже в 1-е сутки после возникновения диффузного поражения миокарда и опосредуют достоверное снижение числа миофибрилл (таб. 3).

**Таблица 3.**

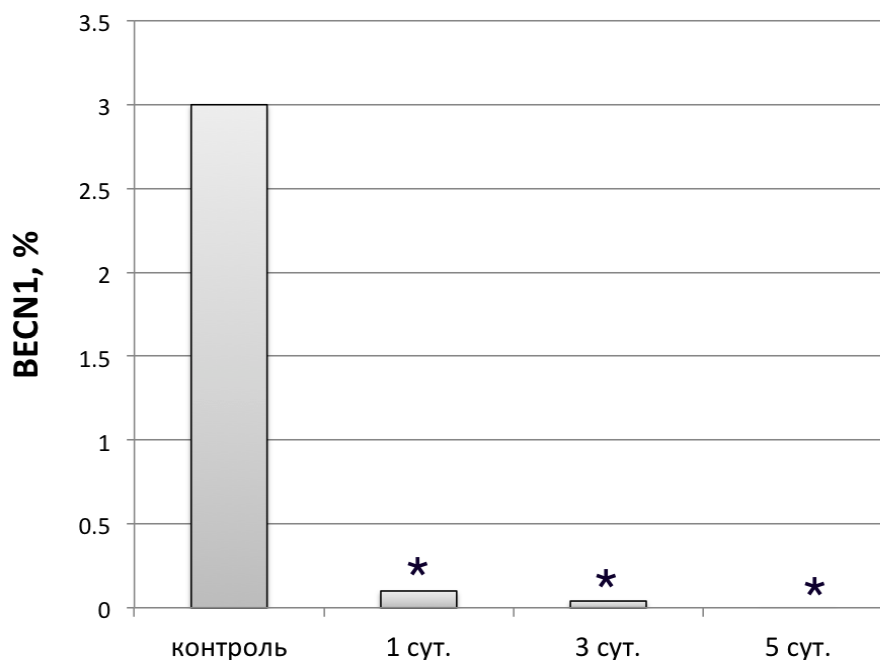
**Данные морфометрии гистологических срезов ЛЖ в контроле, через 1, 3 и 5 суток от возникновения острой дифтерийной интоксикации (M±m)**

Структурные элементы	Контроль	Сроки исследования		
		1 сут.	3 сут.	5 сут.
Мышечные волокна, об.%	88,04±0,37	81,52 ±1,25*	<u>84,51±0,86*</u>	<u>78,57±1,74*</u>
Ядра, об%	5,48±0,21	4,02±0,26*	<u>5,10±0,24</u>	5,16±0,34
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0,06±0,003	0,05±0,002	0,06±0,003	0,06±0,003
Сосуды, об%	1,01±0,77	0,61±0,21	0,44±0,27	0,69±0,19
Участки деструкции, об%	0,29±0,06	2,10±0,43*	1,32±0,32*	<u>5,04±0,76*</u>
Участки инфильтрации, об%	0,00±0,00	1,89±0,31*	<u>1,09±0,25*</u>	<u>4,91±0,86*</u>
Внеклеточное пространство, об%	6,19±0,32	10,01±0,88*	<u>7,40±0,58</u>	<u>5,39±0,70</u>

*Примечание:* (\*) – данные, достоверно отличающиеся от контроля, подчеркнутым шрифтом отмечены результаты, имеющие достоверное отличие по сравнению с предыдущим сроком исследования.

Световая микроскопия иммуногистохимических препаратов миокарда ЛЖ показала достоверное выраженное снижение экспрессии белка ВЕСN1 во все периоды экспериментального исследования, с тенденцией к снижению в каждые последующие сутки от начала дифтерийной интоксикации. Положительно окрашенные жизнеспособные КМЦ практически отсутствуют во всех полях зрения (рис. 6).

Интенсификация репаративной аутофагии характерна для альтерированного миокарда различной этиологии. Однако, согласно полученным результатам экспериментального моделирования диффузного токсического повреждения сердца, выраженные деструктивные явления вероятнее всего приводят к истощению функциональных резервов КМЦ, угнетая аутофагические процессы восстановления жизнеспособных клеток.



**Рис. 6.** Содержание белка BCSN1 в КМЦ ЛЖ миокарда кроликов в контроле и на 1, 3 и 5 сутки острой дифтерийной интоксикации.

Примечание: (\*) – значения, достоверно отличающиеся от контроля при  $p \leq 0,05$ .

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты, полученные в ходе настоящего диссертационного исследования, позволяют подвести *следующие итоги*:

1. При острой очаговой ишемии миокарда уменьшение жизнеспособных КМЦ и нарастание деструктивных явлений в миокарде сопровождается активацией процессов аутофагии КМЦ пренекротической зоны ЛЖ, о чем свидетельствует повышение экспрессии белка BCSN1. При этом на 3-и и 5-е сутки на фоне прогрессирующего повышения экспрессии антиапоптотического белка BCL-2 отмечается тенденция к снижению BCSN1-опосредованной аутофагии.

2. Ишемическое повреждение миокарда ЛЖ приводит на 1 сут. к интенсификации апоптотических процессов, реализуемых по митохондриальному (внутреннему) пути, на что указывает повышение экспрессии белка BAX в КМЦ на фоне относительно низкого уровня соотношения BCL-2/BAX. При этом, начиная с 3-х суток очаговой ишемии миокарда, соотношение BCL-2/BAX приобретает тенденцию к увеличению, на основании чего можно утверждать о преобладании антиапоптотических механизмов над апоптотическими.

3. Острая гемодинамическая перегрузка миокарда ЛЖ приводит к угнетению BECN1-индуцированной аутофагии КМЦ на фоне нарастающих патоморфологических изменений в сердечной мышце, проявляющихся в виде распространенной неравномерно распределенной деструкции миофибрилл, гистиоцитарной инфильтрации и застойных явлений в сосудистом русле.

4. В миокарде ЛЖ при острой перегрузке отмечается снижение экспрессии белка BAX, что указывает на угнетение апоптотических процессов в КМЦ, реализуемых по внутреннему (митохондриальному) пути.

5. Диффузное поражение миокарда ЛЖ, вызванное дифтерийным токсином, приводит к угнетению экспрессии белка BECN1 в КМЦ, что свидетельствует об ослаблении процессов аутофагии, которое может быть обусловлено как характерными кардиотоксическими деструктивными изменениями миоцитов, сопровождающимися выраженным воспалительным ответом, так и непосредственным действием токсина.

6. В зависимости от характера повреждения миокарда процессы, опосредующие механизмы реализации некоторых видов регулируемой гибели КМЦ, имеют различную направленность. При очаговой ишемии наблюдается увеличение интенсивности процессов BECN1-индуцированной аутофагии, а на 1 сут. также активация митохондриального пути апоптотической гибели. Острая перегрузка и токсическое повреждение сердечной мышцы сопровождаются угнетением аутофагии КМЦ.

**Практические рекомендации.** Результаты проведенного исследования могут быть использованы для разработки новых терапевтических методов, направленных на восстановление морфофункционального состояния миокарда на ранних стадиях заболеваний сердца различного генеза. При этом необходимо учитывать разнонаправленную роль процессов клеточной гибели при очаговых и диффузных процессах миокарда ЛЖ: при остром повреждении миокарда, чем сильнее выражены структурные изменения, тем интенсивнее развиваются процессы внутренней сигнализации апоптоза и BECN1-опосредованной аутофагии.

**Перспективы дальнейшей разработки темы.** Исследование регулируемой клеточной гибели, как одного из факторов ремоделирования миокарда, при остром повреждении миокарда открывает новые пути для разработки и исследования методов сохранения полноценной структуры и функциональной активности миокарда, подверженного различным патологическим влияниям на начальных стадиях заболевания с использованием патогенетического подхода. Также возникает необходимость изучения других механизмов компенсаторно-приспособительных реакций с целью формирования более полной картины ремоделирования сердца для создания инновационных методов лечения сердечно-сосудистых заболеваний.

## СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Korshunova A.Y. Cardiomyocyte apoptosis and morphological changes of the left ventricle in acute cardiac overload. // Materials of Semmelweis International Students Conference Semmelweis University. Budapest, 2012. – С. 16.
2. Коршунова А.Ю. Апоптоз кардиомицитов и изменения архитектоники миокарда при острой перегрузке левого желудочка. // Материалы III Международной Студенческой Научно – практической Конференции с участием молодых ученых «Клинические и теоретические аспекты современной медицины». г. Москва, 6-8 апреля 2011. – С. 22.
3. Коршунова А.Ю., Благодоров М.Л., Азова М.М., Величко Э.В., Фролов В.А. Структурные изменения миокарда при острой дифтерийной интоксикации в эксперименте. // Сборник научных трудов международной научной конференции «Актуальные вопросы морфогенеза в норме и патологии». г. Москва, 16-17 апреля 2014 г. – С. 5-6.
4. **Коршунова А.Ю., Благодоров М.Л., Азова М.М., Фролов В.А. Особенности структуры миокарда левого желудочка при острой дифтерийной интоксикации в эксперименте. // Вестник РУДН. Серия Медицина. – 2014. – № 3. – С. 21-25.**
5. Blagoderov M., Azova M., Korshunova A., Frolov V. Cardiomyocyte apoptosis is a non-specific response of the heart to different types of alteration // The 61-st annual conference of the Israel Heart Society in association with the Israel Society of Cardiothoracic Surgery. Tel Aviv, 30 April – 1 May 2014. – [Электронный ресурс]. – Режим доступа: <https://events.eventact.com/programview/PostersOverview.aspx?Event=11782&Agenda=50>.
6. Бондарь С.А., Коршунова А.Ю. Морфологическая характеристика миокарда левого желудочка при экспериментальной очаговой ишемии. // VI Международная научная конференция science4health. г. Москва, 14-18 апреля 2015 г. – С. 164-165.
7. **Благодоров М.Л., Коршунова А.Ю., Азова М.М., Бондарь С.А., Фролов В.А. Аутофагия кардиомиоцитов и морфологические изменения миокарда левого желудочка при острой очаговой ишемии. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2015. – Т. 160. – № 9. – С. 389-391.**
8. **Благодоров М.Л., Коршунова А.Ю., Азова М.М., Фролов В.А. экспрессия белка Вах и морфологические изменения миокарда при острой гемодинамической перегрузке левого желудочка в эксперименте. // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины – 2016. – Т. 161. – № 2. – С. 279-282.**

## СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

КМЦ – кардиомиоцит;

ЛЖ – левый желудочек;

ACD – accidental cell death – клеточная гибель, возникшая в результате несчастного случая;

BAH – BCL-2-associated X protein – BCL-2-ассоциированный X белок;

BCL-2 – B-cell lymphoma 2 – белок В-клеточной лимфомы-2;

BCL-XL – BCL-2 X-linked protein – BCL-2 X-связанный белок;

BECN1 – Beclin-1 – беклин-1;

PCD – programmed cell death – программированная клеточная гибель;

RCD – regulated cell death – регулируемая клеточная гибель.

## РЕЗЮМЕ

**кандидатской диссертации А.Ю. Коршуновой  
«Патогенетические особенности клеточной гибели при альтерации  
миокарда различного генеза»**

В представленном диссертационном исследовании было проведено изучение особенностей инициации процессов регулируемой клеточной гибели КМЦ миокарда ЛЖ, таких как аутофагия и апоптоз, а также морфологические особенности миокарда на начальных стадиях альтерации миокарда различного генеза. Эксперимент проводился на кроликах, у которых моделировали различные виды альтерации миокарда: острую очаговую ишемию миокарда ЛЖ, острую гемодинамическую перегрузку ЛЖ и диффузное токсическое повреждение сердца. Для оценки механизмов реализации процессов клеточной гибели проводилось морфологическое и иммуногистохимическое исследование миокарда ЛЖ. Активность аутофагии КМЦ оценивалась по экспрессии белка BECN1, апоптотические процессы в КМЦ – по экспрессии проапоптотического белка BAH и антиапоптотического белка BCL-2. Было установлено, что в зависимости от характера повреждения миокарда процессы, опосредующие механизмы реализации некоторых видов регулируемой гибели КМЦ, имеют различную направленность. При очаговой ишемии наблюдается увеличение интенсивности процессов BECN1-индуцированной аутофагии, а на 1 сут. также активация митохондриального пути апоптотической гибели. Острая перегрузка и токсическое повреждение сердечной мышцы сопровождаются угнетением аутофагии КМЦ.

## **SUMMARY**

### **of the thesis «Pathogenic Features of Cell Death in Myocardial Alterations of Different Genesis» by A.Yu. Korshunova**

In the present work the features of initiation of cardiomyocyte regulated cell death at the early stages of cardiac alteration of different etiology were studied. The experiments were performed on male rabbits in which we modeled acute ischemia of the left ventricle, hemodynamic overload of the left ventricle and a diffuse toxic damage of the myocardium. Mechanisms of cardiomyocyte autophagy and apoptosis were evaluated by means of morphological and immunohistochemical investigation of the myocardium. Cardiomyocyte autophagy was studied by estimation of protein BECN1 expression, apoptotic process in cardiomyocytes – by estimation of proapoptotic protein BAX and antiapoptotic protein BCL-2. It was found that mechanisms mediating realization of some types of cardiomyocyte regulated death may have different properties depending on the character of myocardial damage. It was shown that under acute myocardial ischemia the activity of BECN1-induced cardiomyocyte autophagy is increased and on the 1-st day there is also activation of mitochondrial pathway of cardiomyocyte apoptotic death. Acute toxic damage and acute overload of the left ventricle are accompanied by inhibition of cardiomyocyte autophagy.