

Д.В. Рябенко¹
 Л.Л. Сидорик²
 О.В. Сергиенко¹
 И.В. Трунина¹
 В.И. Бобык²
 О.М. Федоркова²
 Т.В. Ковеня²
 Г.Х. Мацука²

¹Институт кардиологии, Киев

²Институт молекулярной биологии и генетики, Киев

Ключевые слова:

морфология, аутоиммунные реакции, белки, экспериментальное исследование.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время известно достаточно большое число этиологических факторов дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) (Caforio A.L.P., 1994; Амосова Е.Н., 1994; Goldman J.H., McKenna W.J., 1995). Однако патогенетические механизмы ДКМП все еще не ясны. На сегодняшний день одной из основных теорий патогенеза ДКМП является вирусно-иммунологическая, в соответствии с которой важную роль в развитии и прогрессировании миокардиальных повреждений играют аутоиммунные реакции (Caforio A.L.P., 1994; Амосова Е.Н., 1994; Goldman J.H., McKenna W.J., 1995). При ДКМП выявлен широкий спектр антигенов-мишеней (Caforio A.L.P. et al., 1990; Limas C.J. et al., 1990; Fu M. et al., 1994). Один из главных аутоантигенов при ДКМП - миозин, о значении которого свидетельствуют результаты не только клинических, но и экспериментальных исследований (Caforio A.L.P. et al., 1990). Известна экспериментальная модель миокардита у мышей, который может трансформироваться в ДКМП и индуцируется кардиальным, то есть предсердным, миозином (Smith S., Allen P., 1991; Liao L. et al., 1993; 1995). В то же время нами выявлено, что морфологические изменения сократительного миокарда, подобные таковым при ДКМП у человека, происходят при иммунизации мышей не предсердным, а желудочковым человеческим миозином (Рябенко Д.В. и соавт., 2000).

Цель исследования - изучение динамики морфологических изменений мышцы сердца у экспериментальных животных и определение уровня циркулирующих антител (АТ) у мышей после иммунизации желудочковым миозином человека.

ОБЪЕКТ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследовали миокард 45 мышей-самцов линии BALB/c в возрасте 12–16 нед. Животных 1-й группы (29 мышей) иммунизировали смесью полного адью-

МИОЗИН-ИНДУЦИРОВАННОЕ ПОВРЕЖДЕНИЕ МИОКАРДА: ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

Резюме. Изучена динамика морфологических изменений мышцы сердца, определен уровень циркулирующих антител у мышей линии BALB/c через 7, 21 и 52 дня после повторной иммунизации желудочковым миозином человека. Установлено, что в результате иммунизации миозином в миокарде мышей происходят гемоциркуляторные нарушения, обратимые и необратимые диссеминированные повреждения кардиомиоцитов, подобные морфологическим изменениям сократительного миокарда при дилатационной кардиомиопатии у человека. Гемоциркуляторные нарушения были наиболее выражены на 21-й день после иммунизации, а объем миоцитолитических и сегментарных контрактурных повреждений – через 52 дня. Морфологические изменения сопровождались значительным повышением уровня циркулирующих антимиозиновых антител, наиболее выраженным – на 21-й и 52-й дни эксперимента.

ванта Фрейнда (ПАФ) и миозина, выделенного из миокарда желудочков больных с ДКМП (МЖД), умерших вследствие прогрессирования сердечной недостаточности. Миозин, выделенный по описанной ранее методике (Бобык В.И. и соавт., 1993), разводили изотоническим раствором натрия хлорида до конечной концентрации 2 мг/мл. Мышей иммунизировали путем подкожного введения 200 мкл антигена (АГ) (2 мг/мл), смешанными со 100 мкл ПАФ. Через 7 дней проводили повторную иммунизацию с использованием 100 мкл МЖД (1 мг/мл), смешанного со 100 мкл ПАФ. Мышей умерщвляли путем декапитации под легким наркозом эфиром через 7, 21 и 52 дня после повторной иммунизации. Проводили морфологическое исследование и определяли уровень АТ в пуле сывороток. Сердце останавливали перфузией охлажденного (+4 °С) 4% раствора параформальдегида. Из боковых стенок левого и правого желудочков и межжелудочковой перегородки единообразно во всех случаях через толщу миокарда от основания до верхушки сердца иссекали кусочки, которые фиксировали в течение 24 ч в 10% растворе формалина на 0,1 М фосфатном буфере (рН=7,4), по стандартизованной схеме обезжировали в спиртах восходящей крепости и заливали в парафин. Из ткани миокарда изготавливали срезы толщиной 5 мкм, которые окрашивали гематоксилином и эозином, по методу Ван-Гизона, гематоксилином - основным фуксином пикриновой кислоты (ГОФП) по методу, предложенному J.T. Lie и соавторами (1971).

Состояние сократительного аппарата кардиомиоцитов изучали методом поляризационной микроскопии. Для объективизации степени повреждения мышцы сердца определяли относительную площадь, занятую кардиомиоцитами с фуксинорагией саркоплазмы при окраске по Lie J.T. и соавторам (1971), контрактурными повреждениями (КП) различной степени по Ю.Г. Целлариусу и соавторам (1980), миоцитолитическими поврежде-

ниями (МП), очагами резорбции некротизированных кардиомиоцитов (РК) и очагами кардиосклероза (ОК). Измерения осуществляли при 200-кратном увеличении. В каждом случае производили морфометрическую оценку не менее 30 участков миокарда, полученных методом случайного отбора (Автандилов Г.Г. и соавт., 1981).

Для проведения иммунологического анализа кровь животных собирали в пробирки, инкубировали в течение 1 ч в термостате при температуре 37 °С. Полученную сыворотку крови центрифугировали при ускорении 2000 g в течение 10–15 мин при температуре 4 °С. Надосадочную жидкость собирали в пробирку, добавляли 50% от полученного объема перегнанного глицерина и хранили при температуре –20 °С. Уровень АТ определяли методом твердофазного иммуноферментного анализа (ELISA) в модификациях (Matsiota P. et al., 1987). Определяли уровень АТ против МЖД и миозина, выделенного из желудочка сердца у практически здорового человека (МЖН), погибшего в результате случайной травмы.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета статистических программ «STATISTICA for Windows 5.0, StatSoft, Inc., США»; оценку достоверности различий показателей – с помощью t-критерия Стьюдента и Mann–Whitney U тест, значения $p < 0,05$ рассматривали как критерий достоверности различий.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

При изучении морфологических изменений миокарда выявлено, что на I этапе эксперимента (7-й день после иммунизации) в миокарде мышей 1-й группы преобладают гемоциркуляторные нарушения в виде полнокровия артериальных и венозных сосудов, преимущественно вен и венул с агрегацией эритроцитов и стазом в некоторых из них. Периваскулярный отек выражен нерезко. В межклеточной ткани незначительно увеличено количество фибробластов, обнаружены единичные тучные клетки без признаков дегрануляции.

На фоне описанных гемоциркуляторных нарушений в миокарде стенки обоих желудочков и межжелудочковой перегородки с помощью поляризационной микроскопии выявлены единичные кардиомиоциты (КМЦ) с сегментарными контрактурами I, II и III степени, с субсегментарными контрактурными изменениями и внутриклеточным миоцитоллизисом (табл. 1).

Клетки с контрактурными изменениями I и II степени отличаются глыбчатостью, эозинофилией и гранулярной фуксиноррагией саркоплазмы. КМЦ с сегментарными контрактурами III степени характеризуются потерей поперечной и продольной исчерченности, базофилией и сегментарной фуксиноррагией саркоплазмы. В клетках с очаговым внутриклеточным миоцитоллизисом саркоплазма слабо воспринимает красители и оптически просветлена.

Через 21 день после иммунизации (II этап) во всех исследованных зонах миокарда мышей отмечено усиление гемоциркуляторных расстройств по сравнению с предшествовавшим сроком на-

Таблица 1
Относительный объем (%), занимаемый КМЦ с различными типами повреждения в миокарде мышей в различные сроки после иммунизации МЖД и ПАФ (по данным световой микроскопии) (M±m)

Этап эксперимента	Группа животных	Типы повреждения КМЦ			
		КП	РК	ОК	МП
I	1-я	1,12±0,29	0,24±0,12 ^c	0,00±0,00	1,24±0,31 ^c
	2-я	1,40±0,39	0,00±0,00	0,00±0,00	0,00±0,00
II	1-я	2,32±0,39*	1,36±0,34* ^{a,c}	0,92±0,28*	6,76±0,64* ^{a,c}
	2-я	1,32±0,39	0,00±0,00	0,00±0,00	0,12±0,09
III	1-я	2,48±0,41* ^{a,c}	1,68±0,34* ^{a,c}	2,64±0,53* ^{a,c}	14,00±1,09* ^{a,c}
	2-я	0,80±0,25	0,08±0,08	0,00±0,00	0,00±0,00
IV	1-я	5,16±0,69* ^{a,c}	1,12±0,36* ^{a,c}	1,12±0,32* ^{a,c}	8,56±0,69* ^{a,c}
	2-я	0,68±0,22	0,00±0,00	0,00±0,00	0,04±0,04

* Достоверность различий с аналогичными показателями на I этапе (7 дней) эксперимента ($p < 0,01$); ^a достоверность различий с аналогичными показателями у мышей 2-й группы ($p < 0,05$).

блюдения – более выражено венозное полнокровие, в большем количестве вен и венул отмечены признаки стаза. Наряду с полнокровием артериальных сосудов на II этапе выявлены признаки повреждения стенки отдельных артерий и артериол. В строме увеличивается количество тучных клеток, часть из них с признаками дегрануляции. Также по сравнению с I этапом увеличивается количество фибробластов и коллагеновых волокон.

При поляризационной микроскопии в миокарде обнаруживают диффузно рассеянные КМЦ с сегментарными контрактурами I, II и III степени, единичные клетки с субсегментарными контрактурными изменениями (см. табл. 1). На II этапе отмечено некоторое увеличение относительного объема рубцовых изменений. Распространенность внутриклеточного миоцитоллизиса на этом этапе эксперимента уже значительно превышает относительный объем КМЦ с сегментарными контрактурными повреждениями (см. табл. 1). Альтеративные изменения миокарда в данном сроке наблюдения сочетаются с начальными проявлениями гипертрофии КМЦ в виде увеличения объема саркоплазмы и ядер в отдельных группах мышечных волокон и появления двухъядерных КМЦ.

Через 52 дня после последней иммунизации (III этап) признаки острых гемоциркуляторных нарушений выражены в значительно меньшей степени, чем на II этапе. Полнокровие отдельных вен, венул выражено незначительно, агрегация эритроцитов и стаз не обнаружены. Слабо выражен периваскулярный отек. Признаки повреждения стенки артериальных сосудов не выявлены. Количество тучных клеток значительно меньше, чем на 21-й день эксперимента, и признаки дегрануляции отмечаются лишь в единичных тканевых базофилах. Усиление стромальной реакции обнаружено лишь у одного из экспериментальных животных – увеличено количество фибробластов и волокнистых компонентов стромы, наличие в ней единичных круглоклеточных инфильтратов.

Распространенность сегментарных контрактурных повреждений КМЦ не увеличивается. Однако по сравнению с I и II этапами значительно увеличивается относительный объем рубцовых изменений сократительного миокарда и особенно распространенность очагового внутриклеточного миоцитоллизиса КМЦ (см. табл. 1). Наряду с этим усугубляются процессы

гипертрофии миокарда - увеличивается объем групп КМЦ с признаками гипертрофии, двухъядерных мышечных клеток. Изредка в миокарде обнаруживают признаки несостоятельной гипертрофии в виде дистрофических изменений гипертрофированных КМЦ.

Для исключения влияния возможных побочных воздействий изучены морфологические изменения сердца при иммунизации мышей только адьювантом Фрейнда (2-я группа).

На 7-й день после иммунизации (I этап) в миокарде животных 2-й группы нарушения гемоциркуляции были значительно менее выражены, чем в 1-й группе. Гемоциркуляторные расстройства у мышей 2-й группы характеризуются полнокровием части артерий, вен, венул и капилляров со стазом в отдельных венозных сосудах и нерезко выраженным периваскулярным отеком. Признаки повреждения стенок артериальных сосудов не обнаружены. Количество фибробластов в строме не увеличено.

В миокарде мышей 2-й группы обнаруживают обратимые единичные сегментарные контрактурные повреждения КМЦ I—III степени и единичные КМЦ с признаками внутриклеточного миоцитолитоза (см. табл. 1).

На 21-й день (II этап) в миокарде мышей 2-й группы отмечают уменьшение нарушений гемоциркуляции по сравнению с таковым на I этапе эксперимента. Часть венозных сосудов запустевает. Отмечен нерезко выраженный отек стромы с увеличением количества тучных клеток без признаков дегрануляции. Распространенность и характер повреждения КМЦ практически аналогичны таковым на I этапе эксперимента.

Через 52 дня после иммунизации (III этап) гемоциркуляторные изменения в миокарде мышей 2-й группы выражены крайне слабо - отмечают полнокровие отдельных вен, венул и капилляров. Периваскулярный отек крайне незначителен, межклеточного - нет. В одном случае в строме обнаружены единичные небольшие круглоклеточные инфильтраты, включающие эозинофильные гранулоциты. Тучные клетки единичны, без признаков дегрануляции. Пролiferация фибробластов не выявлена. Повреждения КМЦ аналогичны таковым в предшествовавшие сроки наблюдения (см. табл. 1).

Наряду с морфологическими изменениями изучен уровень АТ в сыворотке крови мышей обеих групп (табл. 2). Результаты анализа свидетельствуют, что уже на I этапе эксперимента у мышей 1-й группы определяют очень высокие титры циркулирующих антимиозиновых АТ. Однако наиболее высокий их уровень определяется на II и III этапах эксперимента. По результатам исследования, в сыворотке крови мышей этой группы выявляют иммунный ответ на МЖН (см. табл. 2). Однако если на II этапе исследования иммунный ответ на МЖД был на 63% выше, чем на МЖН, то на III этапе иммунный ответ на МЖН уже в 2,7 раза превышал таковой на МЖД (см. рисунок). Это, вероятно, указывает на то, что по истечении времени в организме животных вырабатывается пул АТ, способ-

Таблица 2
Уровень АТ против МЖД и МЖН в пуле сыворотки крови у мышей в различные сроки после иммунизации МЖД и ПАФ (ед. опт. пл.)

Группа животных	Антигены	Этап эксперимента		
		I	II	III
1-я	МЖД	0,226	0,845	0,673
	МЖН	0,369	0,739	0,632
2-я	МЖД	0,013	0,028	0,039
	МЖН	0,023	0,038	0,014

ных уже реагировать с несколько иными субфрагментами белковой молекулы миозина.

Таким образом, в результате иммунизации МЖД в миокарде мышей происходят гемоциркуляторные нарушения, обратимые и необратимые диссеминированные повреждения КМЦ, близкие к морфологическим изменениям сократительно-

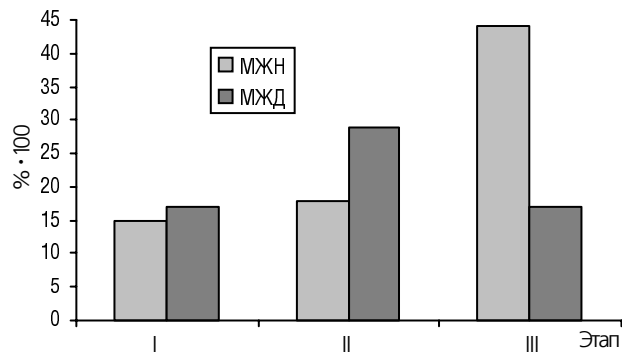


Рисунок. Степень превышения (в %) уровня АТ в пуле сыворотки крови у мышей 1-й группы над аналогичными показателями во 2-й группе животных на различных этапах эксперимента

го миокарда при ДКМП у человека. Выраженность этих нарушений и альтерации КМЦ меняется в зависимости от сроков наблюдения. Так, на протяжении практически всего периода наблюдения в миокарде мышей отмечают значительные гемоциркуляторные нарушения, наиболее выраженные на II этапе исследования, сопровождающиеся сегментарными КП и очагового МП КМЦ. Распространенность МП в несколько раз превышает относительный объем сегментарных КП уже на II и особенно на III этапах эксперимента.

В целом динамика изменений сократительного миокарда после иммунизации МЖД может рассматриваться как диссеминированные рецидивирующие повреждения КМЦ. В пользу последнего предположения свидетельствует наличие альтеративных изменений КМЦ, завершающихся некрозом, плазматическим пропитыванием и резорбцией единичных погибших клеток с формированием звездчатых ОК. О возможном персистирующем характере миокардиального повреждения также свидетельствуют морфологические проявления стромальной реакции в виде слабо выраженного отека межклеточной ткани, очагового увеличения количества фибробластов и коллагеновых волокон, а также КМЦ с признаками гипертрофии.

Выявленные сегментарные и субсегментарные КП КМЦ и очаговый внутриклеточный миоцитолитоз могут быть обусловлены гипоксическим (вследствие гемоциркуляторных изменений) воздействием на мышечные клетки. Однако уменьшение выраженности гемоциркуляторных изменений, наряду с прогрес-

сируючим увеличением относительного объема рубцовых изменений и внутриклеточного миоцитолитоза на III этапе, позволяют предположить, что еще одним важным механизмом является иммуногенный механизм миокардиального повреждения. Результаты определения уровня АТ в сыворотке крови у мышей подтверждают участие иммунной системы в перестроющей альтерации миокарда.

Отсутствие значительных нарушений гемоциркуляции и минимальный относительный объем как сегментарных КП, так и очагов внутриклеточного миоцитолитоза у мышей 2-й группы, которым проводили иммунизацию только адьювантом Фрейнда, свидетельствует о том, что морфологические изменения в миокарде животных 1-й группы обусловлены именно их иммунизацией МЖД - миокардиальным антигеном человека. Следовательно, в результате иммунизации МЖД получена экспериментальная модель иммуногенного миозин-индуцированного ДКМП-подобного повреждения миокарда. Эта модель кардиомиопатии представляется нам очень удобным объектом как для изучения патогенетических механизмов формирования ДКМП, так и для разработки новых подходов к ее диагностике и лечению.

ЛИТЕРАТУРА

- Авандилов Г.Г., Яблучанский Н.И., Губенко В.Г.** (1981) Системная стереометрия в изучении патологического процесса. Медицина, Москва, 191 с.
- Амосова Е.Н.** (1994) Дилатационная кардиомиопатия как полиэтиологическое заболевание. Укр. кардіол. журн., 1: 17–20.
- Бобык В.И., Веберов А.В., Рябенко Д.В. и др.** (1993) Выделение основных тканеспецифических антигенов из миокарда здоровых лиц и больных дилатационной кардиомиопатией. Биополимеры и клетка, 9: 63–65.
- Рябенко Д.В., Сидорик Л.Л., Бобык В.И. и др.** (2000) Морфологические особенности аутоиммунного повреждения миокарда, вызванного различными миокардиальными антигенами человека: сравнительное экспериментальное исследование. Укр. ревматол. журн., 2: 55–60.
- Целлариус Ю.Г., Семенова Л.А., Непомнящих Л.М.** (1980) Очаговые повреждения и инфаркт миокарда: Световая, поляризационная и электронная микроскопия: Метод. разработка по патолог. Новосибирск, Анатомии, 72 с.
- Caforio A.L.P.** (1994) Role of autoimmunity in dilated cardiomyopathy. Brit. Heart J., 72(Suppl.): S30–S34.
- Caforio A.L.P., Bonifacio E., Stewart J.T. et al.** (1990) Novel organ-specific circulating autoantibodies in dilated cardiomyopathy J. Amer. Coll. Cardiol., 15: 1527–1534.
- Fu M., Hoebeke J., Matsui S. et al.** (1994) Autoantibodies against cardiac G-protein-coupled receptors define different populations with cardiomyopathies but not with hypertension. Clin. Immunol. Immunopathol., 72: 15–20.
- Goldman J.H., McKenna W.J.** (1995) Immunopathogenesis of dilated cardiomyopathies. Cur. Sci., 10: 306–311.
- Liao L., Sindhwani R., Leinwand L. et al.** (1993) Cardiac alpha-myosin heavy chain differ in their induction of myocarditis: identification of pathogenic epitopes. J. Clin. Invest., 92: 2877–2882.
- Liao L., Sindhwani R., Rojkind M. et al.** (1995) Antibody-mediated autoimmune myocarditis depends on genetically determined target organ sensitivity. J. Exp. Med., 181: 1123–1131.
- Lie J.T., Holley K.E., Kampa W.R., Titus J.L.** (1971) New histochemical method for morphologic diagnosis of early stages of myocardial ischemia. Mayo. Clin. Proc., 46: 319–327.
- Limas C.J., Limas C., Kubo S., Olivari M.** (1990) Anti-beta-receptor antibodies in human dilated cardiomyopathy and correlation with HLA-DR antigens. Amer. J. Cardiol., 65: 483–487.
- Matsiota P., Druet P., Dasquet P. et al.** (1987) Natural autoantibodies in systemic lupus erythematosus. Clin. Exp. Immunol., 69: 79–88.
- Smith S., Allen P.** (1991) Myosin-induced acute myocarditis is T cell-mediated disease. J. Immunol., 147: 2141–2147.

МИОЗИН-ИНДУКОВАНЕ УШКОДЖЕННЯ МІОКАРДА: ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНЕ ДОСЛІДЖЕННЯ

Д.В. Рябенко, Л.Л. Сидорик, О.В. Сергієнко, І.В. Труніна, В.І. Бобик, О.М. Федоркова, Т.В. Ковеня, Г.Х. Мацука

Резюме. Вивчено динаміку морфологічних змін серцевого м'яза, визначено рівень циркулюючих антитіл у мишей лінії BALB/c через 7, 21 і 52 дні після повторної імунізації шлуночковим міозином людини. Встановлено, що в результаті імунізації міозином у міокарді мишей відбуваються гемоциркуляторні порушення, оборотні й необоротні дисеміновані ушкодження кардіоміоцитів, подібні до морфологічних змін скорочувального міокарда при дилатативній кардіоміопатії у людини. Гемоциркуляторні порушення були найбільш виражені на 21-й день після імунізації, а обсяг міоцитолітичних і сегментарних контрактурних ушкоджень – через 52 дні. Морфологічні зміни супроводжувалися значним підвищенням рівня циркулюючих антиміозинових антитіл, найбільш вираженим – на 21-й та 52-й дні експерименту.

Ключові слова: морфологія, аутоімунні реакції, білки, експериментальне дослідження.

MYOSIN-INDUCED MYOCARDIAL DAMAGE: EXPERIMENTAL STUDY

D.V. Ryabenko, L.L. Sidorik, O.V. Sergienko, I.V. Trunina, V.I. Bobyk, O.M. Fedorkova, T.V. Kovenia, G.Kh. Matsuka

Summary. The examination of line BALB/c mice heart muscle morphological changes dynamics and definition of circulating antibodies level at 7, 21 and 52 days after reimmunization by human ventricular myosin was carried out. The result of investigation has shown that immunization by a myosin leads to disturbances of haemocirculation and reversible and irreversible disseminated damages of cardiomyocytes liken to morphological changes of contractile myocardium described at human dilated cardiomyopathy. Haemocirculatory disturbances were most expressed for 21 days after an immunization, and volume of myocytolysis and segmental contractive damages – through 52 days. The morphological changes were accompanied by considerable rising of level of circulating antimyosin antibodies, whose the most high level was detected on the 21st and 52 days of experiment.

Key words: morphology, autoimmune responses, proteins, experimental examination.

Адрес для переписки:

Рябенко Дмитрий Васильевич
03151, Киев, ул. Народного ополчения, 5
Институт кардиологии им. Н.Д. Стражеско
АМН Украины