

**ДИНАМИКА РАЗВИТИЯ МИОКАРДИТА У КРЫС,  
ИММУНИЗИРОВАННЫХ СЕРДЕЧНЫМ МИОЗИНОМ С НЕПОЛНЫМ  
АДЬЮВАНТОМ ФРЕЙНДА.**

© М. П. Морозова<sup>1</sup>, С. А. Гаврилова<sup>1</sup>, Л. В. Земцова<sup>2</sup>, Л. С. Погодина<sup>2</sup>,  
А. Б. Постников<sup>2</sup>, Ю. С. Ченцов<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Факультет фундаментальной медицины МГУ им. М. В. Ломоносова, Россия, 119192,  
Москва, Ломоносовский пр. 31, корп.5, e-mail: morozova.masha@gmail.com;

<sup>2</sup>Биологический факультет МГУ им. М. В. Ломоносова, Россия, 119991, Москва,  
Воробьевы горы, 1, стр. 12.

Исследовано развитие миокардита у крыс после однократной подкожной инъекции сердечного миозина крысы (800 мкг/кг) в смеси с неполным адьювантом Фрейнда (НАФ); контролем служили интактные животные и крысы, инъецированные только НАФ. На 4, 14 и 21-е сутки опыта методами световой и электронной микроскопии проводили морфологический и морфометрический анализ ткани миокарда. Полимеразной цепной реакцией в миокарде исследовали экспрессию IL-1 $\beta$ , IL-6, VEGF, TNF $\alpha$  и iNOS. Иммуноферментным анализом в сыворотке крови оценивали титр антител к сердечному миозину и уровень нитратов и нитритов. Установлено, что однократная подкожная инъекция сердечного миозина в смеси с НАФ вызывает миокардит у крыс уже на 4-е сутки опыта с максимумом воспалительного ответа на 21-е сутки после инъекции, при этом происходит значительное повреждение и гибель части кардиомиоцитов. Иммунизация крыс НАФ в отличие от ранее исследовавшегося полного адьюванта Фрейнда не приводила к существенному развитию воспалительного ответа в миокарде.

*Ключевые слова:* миокардит, НАФ, кардиомиоциты, провоспалительные цитокины.

Рос. физиол. журн. им. И. М. Сеченова. Т. 98. № 2. С. 0—0. 2012

M. P. Morozova<sup>1</sup>, S. A. Gavrilova<sup>1</sup>, L. V. Zemcova<sup>2</sup>, L. S. Pogodina<sup>2</sup>, A. B. Postnikov<sup>2</sup>,  
Y. S. Chentsov<sup>2</sup>. DYNAMIC OF MYOCARDITIS DEVELOPMENT IN RATS AFTER INJECTION OF CARDIAC MYOSINE COMBINED WITH IFA. <sup>1</sup>Faculty of Basic Medicine, Moscow State University, Moscow, 117192, 31 Lomonosovsky Pr; <sup>2</sup>Faculty of Biology, Moscow State University, Moscow, 119899; e-mail: morozova.masha@gmail.com.

Myocarditis development was investigated after immunization rats with single subcutaneous injection of cardiac myosin (800  $\mu$ g/kg) with incomplete Freund's adjuvant (IFA) (M + IFA group). Control group received equal volume of IFA alone or nothing (intact group). On days 4, 14, and 21 after injection, light and electron microscopy of heart sections, morphometric analysis, estimation of proinflammatory cytokines (IL-1 $\beta$ , IL-6, VEGF, TNF $\alpha$  and iNOS) expression were used to evaluate inflammatory response in myocardium. In addition, we estimated cardiac myosin antibody levels in blood serum and nitrite and nitrate levels in blood serum. Our data showed that immunization with cardiac myosin combined with IFA led to inflammatory response in the rat myocardium. Acute inflammation (i.e. lymphocyte infiltration of myocardium and increase of proinflammatory cytokines level) in M + IFA group occurred on 21 days after immunization.

*Key words:* myocarditis, IFA, cardiomyocytes, proinflammatory cytokines.

RUSSIAN JOURNAL OF PHYSIOLOGY. V. 98. N 2. P. 0—0. 2012

Развитие воспалительного процесса в миокарде сопровождается такие заболевания сердца, как инфаркт миокарда, ишемическая болезнь, кардиомиопатии, миокардиты. Изолированно оценить вклад воспаления в повреждение миокарда и рассмотреть его ключевые механизмы можно в экспериментальных условиях, например на модели аутоиммунного миокардита животных<sup>[13, 22]</sup>. Поскольку течение миокардита во многом сходно у человека и грызунов, приоритетными в исследовании являются модели миокардита на мышах и крысах.

Для создания модели аутоиммунного миокардита животных инъецируют специфическими белками сердца, наиболее часто антигеном выступает сердечный миозин<sup>[13, 28]</sup>. В качестве неспецифического активатора иммунитета обычно используют полный адьювант Фрейнда (ПАФ). Однако ПАФ способен сам вызывать воспаление в сердце крыс уже на ранних сроках после инъекции, вероятно, благодаря наличию компонентов стенок туберкулезной палочки в своем составе<sup>[3]</sup>.

Целью настоящего исследования было выяснение сроков максимальной воспалительной реакции в сердце, не осложненной собственным эффектом ПАФ, поэтому в качестве активатора неспецифического иммунитета при моделировании аутоиммунного миокардита мы использовали неполный адьювант Фрейнда (НАФ), не содержащий агрессивной составляющей ПАФ — *Micobacterium tuberculosis*.

## МЕТОДИКА

Работа выполнена на самцах белых беспородных крыс ( $n = 68$ ) с начальным весом  $225 \pm 25$  г, содержащихся в виварии с регулируемым режимом светового дня (12 ч — день, 12 ч — ночь) и свободным доступом к воде и пище.

*Протокол эксперимента.* Аутоиммунный миокардит моделировали однократным подкожным введением миозина сердца крысы в дозе 800 мкг белка/кг веса в смеси с неполным адьювантом Фрейнда (НАФ) в общем объеме 200 мкл в 4 точки спины: 2 инъекции в подлопаточную область справа и слева, в центр спины и в основание хвоста (группа М + НАФ,  $n = 28$ ). Контрольным крысам по аналогичной схеме и в эквивалентном объеме вводили НАФ (группа НАФ,  $n = 30$ ). Дополнительным контролем служила возрастная интактная группа (группа ИК,  $n = 10$ ). Миозин, использованный для иммунизации, выделяли из сердец крыс этой же популяции<sup>[28]</sup>. Его чистоту проверяли методом SDS-электрофореза в восстанавливающих условиях, содержание примесей составило 5 %. Хранили миозин в 0.3 М растворе КС1 в концентрации 8 мг/мл с добавлением 50 % глицерина при  $-20$  °С.

Динамика развития аутоиммунного миокардита исследовали на 4, 14 и 21-е сутки после иммунизации. Образцы крови и миокарда сердца забирали у наркотизированных хлоралгидратов (400 мг/кг) крыс.

Для проведения микроскопических исследований у трех животных из каждой экспериментальной группы иссекали сердце. Для световой микроскопии кусочки миокарда левого желудочка фиксировали 4 %-формалином, обезвоживали в спиртовых растворах и заливали в среду Histomix. Срезы окрашивали гематоксилином и эозином по методу Маллори — для выявления соединительной ткани, а также по методу Романовского, применяемого для окрашивания клеток крови, в модификации для парафиновых срезов<sup>[9]</sup>

Для электронно-микроскопического исследования выделяли отдельные мышечные волокна, фиксировали 4 %-ным глутаровым альдегидом, дофиксировали 1 %-ным раствором тетраоксида осмия, обезвоживали, заключали в эпон 812. Для ориентировки кардиомиоцитов использовали полутонкие срезы, окрашенные метиленовым синим. Ультратонкие срезы продольно ориентированных кардиомиоцитов дополнительно контрастировали 2 %-ным водным раствором уранилацетата и цитратом свинца по Рейнолдсу, просматривали в электронном микроскопе JEM-100В.

*Морфометрический анализ.* На парафиновых срезах, окрашенных по методу Романовского, подсчитывали количество лимфоцитов и тучных клеток в поле зрения микроскопа (при увеличении  $10 \times 90 \times 1.6$  и  $10 \times 40 \times 1.6$  соответственно). Для каждого животного просчитывали по 80—120 (для лимфоцитов) и 30—60 (для тучных клеток) полей зрения. Площадь поперечного сечения кардиомиоцитов в их ядродержащей части (S) определяли на

Т а б л и ц а 1

Праймеры исследуемых генов и условия амплификации

Ген	Праймеры	Локализация (п.н.)	Длина продукта (п.н.)	t°C отжига
IL-1β	CAACA AAAAATGCCTCGTGC TGCTGATGTACCAAGTTGGG	464—482 776—794	330	58
IL-2	CATGTACAGCATGCAGCTCGCATCC CCACCACAGTTGCTGGCTCATCATC	14—38 399—423	409	59
IL-6	GACTGATGTTGTTGACAGCCACTGC TAGCCACTCCTTCTGTGACTCTAACT	111—135 594—619	508	62
TNFα	CACGCTCTTCTGTCTACTGA GGACTCCGTGATGTCTAAGT	135—154 656—675	540	60
VEGF	GGACCCTGGCTTTACTGCTGTACC TCACCGCCTTGGCTTGTACA	29—52 625—546	616	60
iNOS	GGCTCCTTCAAAGAGGCAAAAATAGA AGTAATGGCCGACCTGATGTTGC	445—470 704—426	281	58
β-актин	TGACGTTGACATCCGTAAAGACCTC GTAAAACGCAGCTCAGTAACAGTCCG	936—960 1210—1236	300	59

Примечание. п. н. — пары нуклеотидов.

срезах, окрашенных гематоксилин-эозином, с помощью компьютерной программы Image Score; просчитано по 100—150 клеток для каждого животного.

На электроннограммах с помощью стандартного метода квадратной тестовой системы коротких отрезков [6] определяли удельные доли миофибрилл ( $V_{V_{mf}}$ ) и митохондрий ( $V_{V_{mt}}$ ) в саркоплазме кардиомиоцитов.

Апоптоз кардиомиоцитов на парафиновых срезах миокарда оценивали методом TUNEL-анализа с помощью набора «Apop Tag Plus Peroxidase In situ Apoptosis Detection kit» [15]. Срезы докрасивали метиленовым синим. Результат выражали как относительную долю апоптотических ядер от общего числа ядер кардиомиоцитов на срезе. Для каждого контрольного и опытного животного просчитывали около 2000 ядер кардиомиоцитов при увеличении  $10 \times 90 \times 1.6$ .

Суммарное содержание нитритов и нитратов в сыворотке крови определяли фотометрически с помощью цветной реакции Грисса [26]. В результате взаимодействия реактива Грисса (2 %-ного раствора сульфаниламида и 0.1 %-ного раствора NEDD в соотношении 1:1) с нитритами образуется окрашенный продукт; оптическую плотность которого измеряли при  $\lambda = 492$  нм на фотометре для планшетов Multiskan EX (ThermoLabsystems). Нитрат в пробах восстанавливали до нитрита при помощи  $VCl_3$ . Для расчета концентраций нитритов и нитратов в пробах использовали калибровочные растворы  $NaNO_2$  и  $NaNO_3$ , которые готовили на смеси дистиллированной воды и 96 %-ного этанола в соотношении 1:2.

Оценка экспрессии провоспалительных цитокинов и индуцибельной формы NO-синтазы (iNOS). Растерты в жидком азоте образцы миокарда совмещали с 10-кратным объемом фосфатно-солевого буфера (1.7 мМ  $KH_2PO_4$ , 5.2 мМ  $Na_2HPO_4$ , 0.15 М  $NaCl$ , pH 7.4) и эквивалентным объемом 6 М раствора гуанидина. Выделение РНК из образцов, ДНКазную обработку, обратную транскрипцию и полимеразную цепную реакцию (ПЦР) проводили по стандартной методике [32]. Праймеры для ПЦР представлены в табл. №1 (SYNTOL, Россия).

Результаты ПЦР оценивали методом электрофореза в 1.7 %-ном агарозном геле с 5—7 мкл бромида этидия. Содержание кДНК цитокинов в исходных образцах было нормировано относительно экспрессии гена β-актина.

Определение титра антител иммуноферментным анализом. Титр антител к миозину определяли в сыворотке крови методом твердофазного иммуноферментного анализа. Антиген, миозин сердца крысы, в концентрации 1 мкг/мл в посадочном буфере (150 мМ  $NaCl$ , 10 мМ  $KH_2PO_4$ , pH 7.4) вносили в лунки и инкубировали 1.5 ч в термошейкере при +37 °С. Неспецифическое связывание антител блокировали 2 %-ным раствором бычьего сывороточного альбумина в отмывочном буфере (150 мМ  $NaCl$ , 10 мМ  $KH_2PO_4$ , 0.1 % Tween 20, pH

7.4). Сыворотки в разведении 1:50 — 1:109350 инкубировали на 96-луночном планшете с кроличьими антикрысинными антителами с пероксидазной меткой. Реакцию проявляли в течение 10 мин раствором субстрата и хромогена — 50 мМ 0.1 М цитратного буфера (50 мМ лимонной кислоты, 50 мМ трехзамещенного цитрата натрия, pH 5.0), 7 мкг ортофенилендиамина, 10 мкл 30 %-ного раствора перекиси водорода. Реакцию останавливали добавлением 1 N раствора  $H_2SO_4$ .

Статистический анализ результатов проводили в пакете программ STATISTIKA 6.0 с помощью непараметрического U-критерия Манна—Уитни. Различия признавались значимыми при  $p < 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

*Методами световой микроскопии* у крыс группы М + НАФ на 4-е сутки эксперимента выявлены признаки диффузно-очаговой воспалительной реакции: инфильтрация лимфоидных клеток, расширение кровеносных сосудов, отек интерстиция. Кардиомиоциты в очагах воспаления имели извитую форму и зоны цитоплазмы, лишённые поперечной исчерченности. На 14-е сутки изменения в миокарде этих крыс прогрессировали, затрагивали все большее число кардиомиоцитов; выраженные скопления лимфоидных клеток встречались все чаще. (рис. 1) К 21-м суткам эксперимента инфильтрация иммунных клеток в миокард еще больше усилилась; между измененными кардиомиоцитами отмечался детрит. Окраска по методу Маллори выявила увеличение прослоек соединительной ткани на 14-е и особенно на 21-е сутки опыта.

У крыс, иммунизированных только НАФ, изменения миокарда наблюдались на 14-е сутки и в несколько большей степени — на 21-е сутки. Так же как в группе М + НАФ, имело место расширение сосудов и отек ткани, очаговая инфильтрация лимфоидными клетками, изменения отдельных кардиомиоцитов. Однако все это было выражено в меньшей степени по сравнению с группой М + НАФ (рис. 1)

*Морфометрический анализ срезов миокарда*, окрашенных по методу Романовского, показал, что в сердечной ткани интактных животных в небольшом числе выявляются лимфоциты. В миокарде крыс, иммунизированных миозином, количество лимфоцитов увеличено по сравнению с интактным контролем на всех сроках опыта, однако из-за большого разброса данных достоверные различия с контролем (в 2 раза) отмечаются лишь на 14-е сутки. В миокарде крыс группы НАФ увеличение числа лимфоцитов относительно интактных животных, сопоставимое по выраженности с данными для группы М + НАФ, выявлено лишь на 21-е сутки. Статистической разницы между группами М-НАФ и НАФ по данному параметру на этом сроке показано не было (табл. 2).

Определение числа тучных клеток на тех же срезах миокарда показало, что в группе М + НАФ уже на 4-е сутки наблюдается тенденция к увеличению их количества по сравнению с интактными животными в 2.4 раза ( $p = 0.056$ ), на 21-е сутки тенденция к увеличению сохраняется — контрольные значения превышены в 3.4 раза ( $p = 0.067$ ). У крыс группы НАФ количество тучных клеток достоверно не отличается от интактного контроля на всех сроках эксперимента (табл. 2).

Измерение на срезах площадей поперечного сечения кардиомиоцитов (S) показало достоверное увеличение этого параметра в группе М + НАФ по сравнению с группой ИК на 14-е и 21-е сутки на 21 и 27 % соответственно. В группе НАФ достоверных изменений S не отмечалось (табл. 2).

*На электронно-микроскопическом уровне* в очагах воспаления миокарда у крыс группы М + НАФ на всех сроках опыта наблюдали сходные изменения ультраструктуры клеток сердца, выраженность этих изменений нарастала к 21-м суткам эксперимента. Можно было выделить два типа измененных кардиомиоцитов: со значительными контрактурами миофибрилл — КМЦ-1 и с отеком цитоплазмы — КМЦ-2.

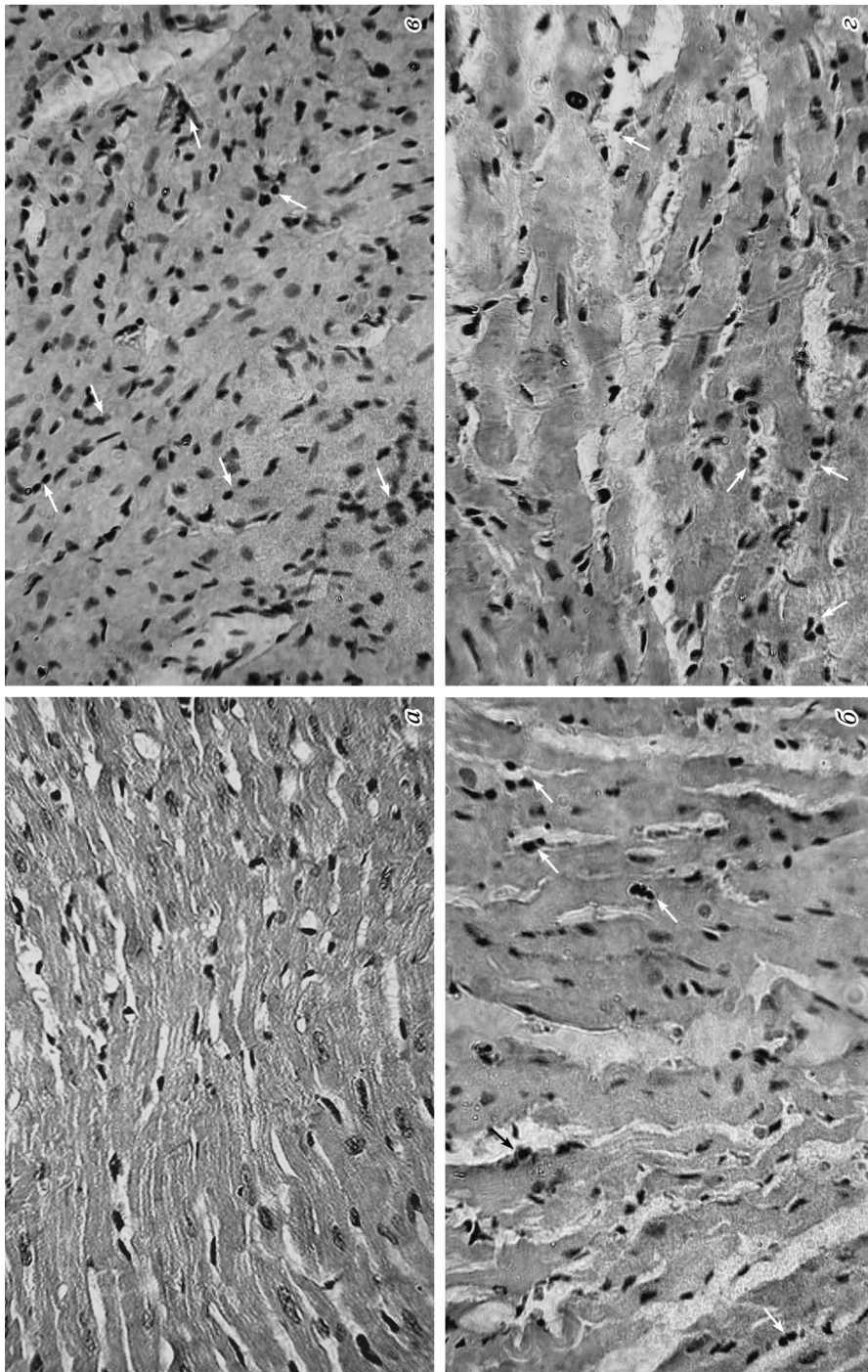


Рис. 1. Миокард левого желудочка крысы.

*а* — интактные животные, *б* — 4-е сутки после инъекции М + НАФ, *в* — 21-е сутки после инъекции М + НАФ, *г* — 21-е сутки после инъекции НАФ. Окраска гематоксилином и эозином. Ув.  $40 \times 10 \times 1,6$ . Стрелками указаны лимфоидные клетки.

Т а б л и ц а 2

Влияние иммунизации миозином в смеси с НАФ и только НАФ на уровень нитратов и нитритов в сыворотке крови крыс, морфологические и морфометрические параметры КМЦ.

Исследуемые параметры	Экспериментальные группы	4-е сутки	14-е сутки	21-е сутки
Уровень NO <sub>2</sub> -/NO <sub>3</sub> - в сыворотке крови, мкмоль	М + НАФ	63.5, 61.5, 72.6	57.7, 53.8, 83.2	63.5, 58.5, 79.4
	НАФ	76.6, 70.7, 83.0	57.0, 52.3, 62.8	71.8, 62.6, 89.5
	ИК		67.7, 60.6, 74.1	
Площадь поперечного сечения КМЦ, мкм <sup>2</sup>	М + НАФ	252, 243, 262	297, 278, 299*	311, 289, 332*
	НАФ	228, 222, 250	265, 246, 266	231, 223, 307
	ИК		245, 236, 279	
Число лимфоцитов на 100 полей зрения микроскопа	М + НАФ	10, 7, 11	10, 9, 10*	9, 6, 12
	НАФ	6, 6, 7	5, 5, 8	12, 10, 13*
	ИК		5, 4, 8	
Число тучных клеток на 100 полей зрения микроскопа	М + НАФ	24, 20, 38 <sup>#</sup>	21, 11, 31,	34, 14, 54 <sup>+</sup>
	НАФ	22, 8, 39	13, 3, 13	19, 19, 27
	ИК		10, 5, 20	
Удельная доля миофибрилл, %	М + НАФ	45.2, 41, 7, 47.0	41.7, 38, 7, 45.2	47.0, 46, 7 47.3
	НАФ	42.9, 42.9, 42.9	39.3, 37.5, 42.3	50.0, 46.4, 50.0
	ИК		48.8, 47.6, 51.8	
Удельная доля митохондрий, %	М + НАФ	31.0, 30.4, 31.0	28.6, 27.4, 29.8	30.4, 28.9, 31.8
	НАФ	33.3, 32.1, 34.5	34.5, 33.9, 35.1	31.0, 29.8, 33.3
	ИК		29.8, 28.9, 30.7	

Примечание. п. н. — Данные представлены в виде медианы, первой и третьей квартилей. Отличие от ИК: \* $p < 0.05$ ; <sup>#</sup> $p < 0.056$ ; <sup>+</sup> $p < 0.067$ .

Для КМЦ-1 (рис. 2) характерны инвагинации ядерной оболочки, увеличение количества пристеночного хроматина и крупные глыбки конденсированного хроматина по всей площади ядра. Характерны контрактуры миофибрилл часто в виде поперечных широких полос, вплоть до образования гомогенной массы дезорганизованных миофиламентов. Митохондрии в таких клетках в основном не отличались от нормы, хотя иногда присутствовали их измененные формы: крупные, набухшие митохондрии с просветленным матриксом и деградирующими кристами, с поврежденной наружной мембраной. Наиболее измененные митохондрии были среди массы пересокращенных миофибрилл. Изредка в субсарколеммальных и окооядерных участках встречались очень мелкие митохондрии с довольно плотным матриксом и немногочисленными кристами. Кроме того, для КМЦ-1 характерны выступы субсарколеммальной цитоплазмы в виде «почек» и «фестонов», заполненных митохондриями, а также увеличение числа лизосом.

Ультраструктура КМЦ-2 (рис. 3) отличалась просветленной, как бы обводненной, цитоплазмой чаще в субсарколеммальной и перинуклеарной зонах. Для КМЦ-2 была характерна нормальная структура ядра и миофибрилл, хотя иногда встречались участки разволокнения, лизиса, локального пересокращения или перерастяжения миофибрилл. Митохондрии обычно нормальной структуры располагались в основном разрозненно, иногда встречались крупные и отдельные набухшие митохондрии. Каналы саркоплазматического ретикулума также выглядели набухшими. «Почки» и «фестоны» в таких клетках отсутствовали или были слабо выражены, встречались участки разрушенной сарколеммы.

В кардиомиоцитах обоих типов иногда присутствовали крупные аутофагические вакуоли со светлым тонкозернистым содержимым, окруженные одной или двойной мембраной. Встречались также кардиомиоциты с разьединенными вставочными дисками и/или признаками некротической деградации цитоплазмы.

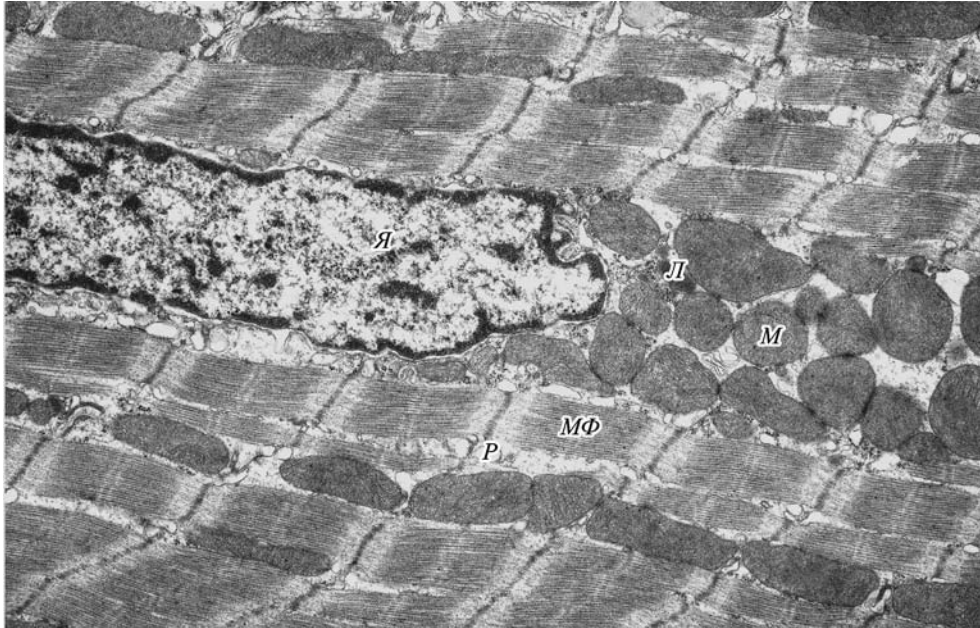


Рис. 2. Ультраструктура кардиомиоцита интактной крысы. Ув.  $\times 13\,500$ .  
 Я — ядро, МФ — миофибриллы, М — митохондрии, Р — саркоплазматический ретикулум, Л — лизосомы.

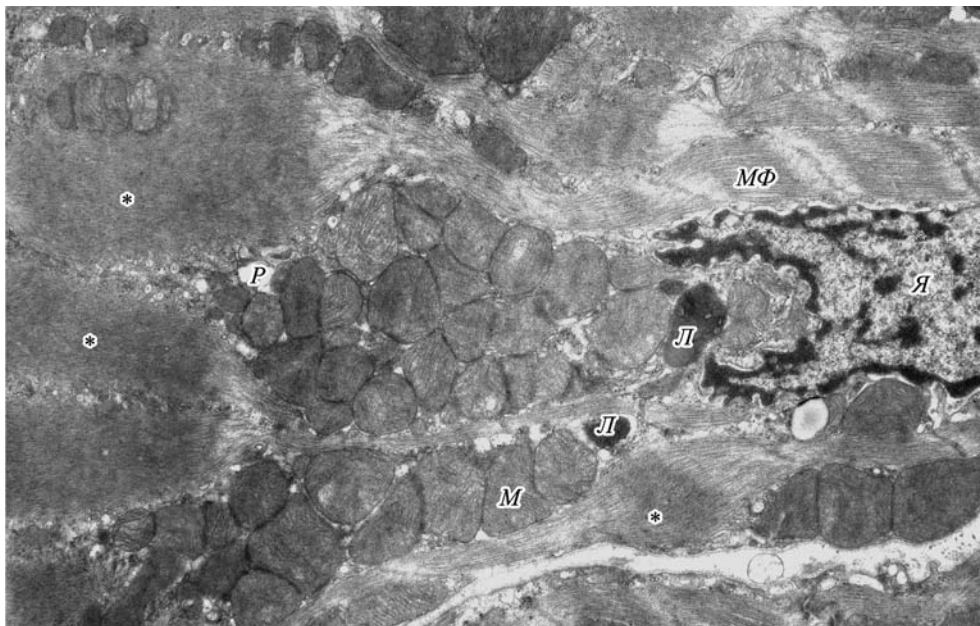


Рис. 3. Ультраструктура кардиомиоцита типа 1 крысы, 14-е сутки после инъекции М + НАФ. Ув.  $\times 13\,500$ . Звездочкой указаны контрактуры миофибрилл.

Т а б л и ц а 3

Влияние иммунизации миозина с НАФ и только НАФ на содержание мРНК провоспалительных цитокинов и iNOS в миокарде крыс на разных сроках после инъекции.

Цитокины	Экспериментальные группы	4-е сутки	14-и сутки	21-е сутки
IL-1 $\beta$	М + НАФ	70.0 <sup>***</sup>	16.5	30.8 <sup>*+</sup>
	НАФ	1.6	9.9	1.2
	ИК		2.0	
iNOS	М + НАФ	18.9 <sup>***</sup>	1.9	4.8 <sup>**++</sup>
	НАФ	0.2	2.3	0.2
	ИК		0.3	
VEGF	М + НАФ	0.5 <sup>**++</sup>	0.2 <sup>***</sup>	0.2 <sup>**++</sup>
	НАФ	0.005	0.06	0.008
	ИК		0.02	
IL-6	М + НАФ	918.9 <sup>**++</sup>	64.4 <sup>ff</sup>	51.2 <sup>++ff</sup>
	НАФ	5.4	32.2	2.0
	ИК		18.1	

Примечание. п. н. — Отличие от ИК: \*  $p < 0.05$ ; \*\* $p < 0.001$ ; отличие между группами М + НАФ и НАФ:  $p < 0.05$ ; ++ $p < 0.001$ ; отличие внутри группы М + НАФ на 4-е сутки от 14 и 21 суток: ff $p < 0.001$ . Данные предоставлены в виде значений мРНК, умноженных на 1000.

Изредка наблюдались клетки, совмещающие черты вышеописанных типов.

Визуально КМЦ-1 преобладали среди поврежденных клеток в миокарде крыс группы М+НАФ на 4-е сутки, тогда как количество КМЦ-2 постепенно увеличивалось к 14-м суткам и они преобладали на 21-е сутки.

У животных группы НАФ в кардиомиоцитах наблюдались изменения, сходные с описанными для группы М + НАФ. Однако КМЦ-1 преобладали среди измененных клеток на всех сроках опыта. Количество КМЦ-2 на 21-е сутки увеличилось, но не превышало количество КМЦ-1.

Морфометрический анализ, проведенный на электронограммах, показал, что инъекция М-НАФ или только НАФ не приводила к статистически значимому изменению удельной доли миофибрилл и удельной доли митохондрий у иммунизированных животных на всех сроках эксперимента, хотя значения медиан  $V_{V_{MF}}$  в группах М-НАФ и НАФ значительно меньше, чем в группе ИК, особенно на 14-е сутки опыта (табл 2).

В норме количество апоптотических ядер в миокарде интактных животных составило  $0.104 \pm 0.07$  % от общего числа ядер кардиомиоцитов. В то же время у крыс группы М+НАФ доля меченых ядер была статистически значимо увеличена в 2.4 раза —  $0.253 \pm 0.11$  % на 21-е сутки после инъекции — срок максимальной воспалительной реакции.

Анализ содержания нитритов и нитратов показал, что иммунизация сердечным миозином с НАФ не приводила к статистически значимым изменениям содержания метаболитов оксида азота на всех исследуемых сроках. Это может означать, что при данной схеме иммунизации участие NO в воспалительном процессе на системном уровне не выявляется. Инъекция одного НАФ не оказывала достоверного влияния на уровень  $NO_2^-/NO_3^-$  в крови по сравнению с ИК (табл 2).

Как показали результаты ПЦР, иммунизация животных сердечным миозином с НАФ приводила к массивной экспрессии мРНК воспалительных цитокинов: IL-1 $\beta$ , VEGF и IL-6 - и iNOS в ткани миокарда уже на 4-е сутки воспалительной реакции (табл. 3). Для факторов IL-1 $\beta$  и iNOS было выявлено последующее повторное повышение содержания их мРНК на 21-е сутки. В группе НАФ уровень



экспрессии генов провоспалительных цитокинов статистически значимо не отличался от ИК (табл. 3).

*Имуноферментный анализ* сывороток животных, иммунизированных М+НАФ или только НАФ, не выявил статистически значимого отличия в содержании антител к сердечному миозину от ИК на всех экспериментальных сроках. Титр аутоантител был выявлен у единичных животных на 14-е и 21-е сутки после инъекции М + НАФ.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Несмотря на то что в экспериментальной практике наряду с полным адьювантом Фрейнда применяется его более мягкий аналог без фрагментов клеточных стенок микобактерий, использование неполного адьюванта Фрейнда для моделирования аутоиммунного миокардита довольно редкая практика. В нашем предыдущем исследовании подкожная инъекция ПАФ через 3—4 суток приводила к развитию воспалительной реакции, которую выявили при микроскопическом анализе миокарда крыс [3, 6]. Чтобы избежать реакции на компоненты *Micobacterium tuberculosis* в миокарде и отделить ее от воспалительного процесса, вызванного антителами при активации гуморального звена иммунной реакции, мы заменили ПАФ на НАФ — более «мягкий» активатор неспецифического иммунитета, не содержащий в своем составе агрессивных компонентов стенок микобактерий. Согласно новому протоколу моделирования аутоиммунного миокардита, мы также производили забор биологического материала на 4-е сутки эксперимента, чтобы проследить события, происходящие в миокарде на ранних сроках после инъекции. Опираясь на собственные результаты и результаты других исследований, для выявления стадии острой воспалительной реакции мы исследовали образцы крови и миокарда на 4, 14 и 21-е сутки после инъекции, согласно общепринятым срокам [17, 21].

Полученные нами в этой работе морфологические и морфометрические данные об изменении структуры миокарда при инъекции М + НАФ, в том числе сведения об инфильтрующих миокард клетках иммунной системы, соответствуют диагностическому морфологическому критерию миокардита, принятому в 1986 г. (США, Даллас) [8]. Они свидетельствуют об умеренном развитии воспалительного ответа в сердце на 4-е сутки с максимумом на 21-й день после однократной инъекции. Однако при иммуноферментном анализе пикового накопления аутоантител к сердечному миозину мы не зарегистрировали. Вероятно, пик накопления аутоантител формируется позднее, за пределами исследуемых экспериментальных сроков, что может быть связано с более медленным развитием воспалительной реакции, чем в экспериментах с применением полного адьюванта Фрейнда [3]. Возможно также, что сила активации адаптивного звена иммунитета оказалась недостаточна для выработки достаточного количества аутоантител.

Однократная инъекция НАФ также приводила к увеличению количества лимфоцитов в миокарде, но статистически значимо лишь через 21 сутки опыта, причем наличие воспаления в сердце не подтвердилось биохимическими анализами. Также нет отличий по результатам морфометрии, количеству тучных клеток, уровню апоптоза. Это свидетельствует об определенной адекватности использования в качестве контроля группы НАФ.

Согласно данным литературы, главными участниками аутоиммунной реакции в сердце являются лимфоциты [11, 23]. Определенный вклад в развитие воспаления вносят и тучные клетки [14]. Помимо увеличения числа лимфоцитов в миокарде крыс группы М + НАФ нами была выявлена тенденция к увеличению числа тучных клеток уже на ранних сроках опыта, она достигала максимума к 21-м суткам. Скорее всего, статистически значимых изменений числа тучных клеток, так же как и лимфоцитов, на 21-е сутки не было получено в виду малой выборки живот-

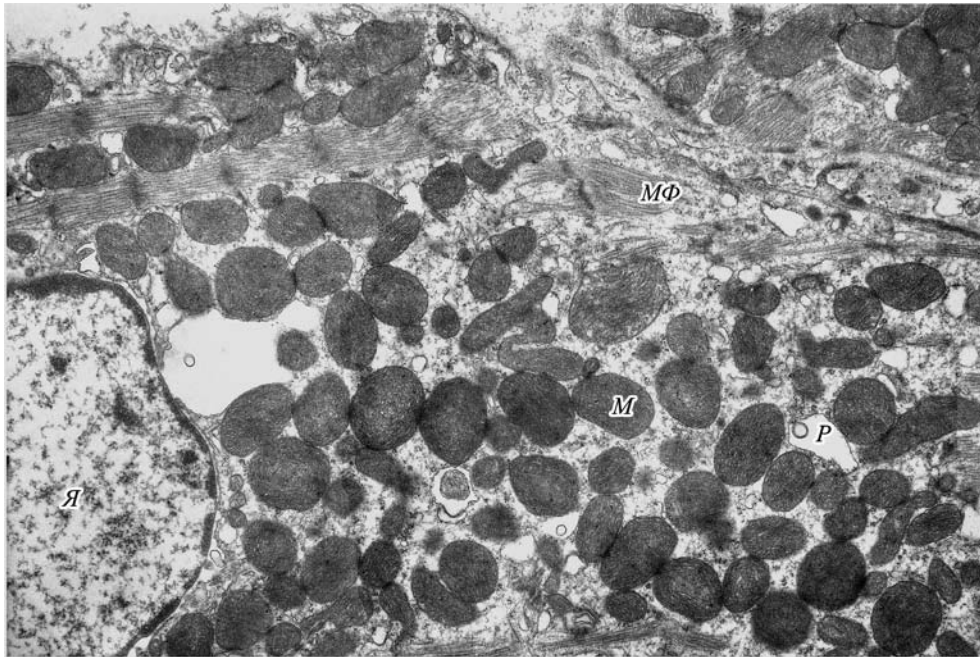


Рис. 4. Ультраструктура кардиомиоцита типа 2 крысы, 14-е сутки после инъекции М + НАФ. Ув.  $\times 13\,500$ .

ных, материал которых подвергался гистологическому анализу, и достаточно большого разброса данных. Однако детальный (по 9—10 животных в каждой экспериментальной группе) биохимический анализ экспрессии мРНК провоспалительных цитокинов в миокарде говорит о значительном увеличении воспалительных регуляторов — на порядки по сравнению с ИК, что обеспечивается, скорее всего, инфильтрующими ткань лимфоцитами. Однако известно, что тучные клетки также являются источником провоспалительных цитокинов, в частности TNF $\alpha$ , и протеаз — они также вносят вклад в развитие воспаления и могут напрямую вызывать локальные повреждения в сердце [2, 11]. Кроме того, известно, что тучные клетки усиливают синтез коллагена фибробластами [1] и ремоделирование миокарда. Эти факты согласуются с нашими результатами об увеличении содержания соединительной ткани в миокарде к 21-м суткам опыта.

У крыс, иммунизированных М + НАФ, на 14-е и 21-е сутки наблюдалось значительное повреждение и гибель части кардиомиоцитов. Вместе с тем морфометрический анализ показал достоверное умеренное увеличение S КМЦ, иммунизированных М+НАФ крыс, на 14-е и 21-е сутки опыта по сравнению с ИК. Подобные изменения размеров кардиомиоцитов могут свидетельствовать о развитии гипертрофии миокарда. Однако морфометрический анализ не показал увеличения удельной доли миофибрилл, что обычно свойственно гипертрофирующимся кардиомиоцитам [6], скорее даже происходит ее снижение в группе М + НАФ. Поэтому в данном случае с учетом характера изменений ультраструктуры клеток сердца (возрастание числа отечных КМЦ-2) можно полагать, что увеличение S связано с развитием отека многих кардиомиоцитов по мере прогрессирования воспаления в миокарде. КМЦ-2 характеризовались лизисом миофиламентов, т.е. разрушением сократительного аппарата, свидетельствующим о развитии в них атрофических процессов [6] (рис. 4).

Отек цитоплазмы, наблюдаемый в КМЦ-2, вероятно, связан с повреждением сарколеммы цитотоксическими клетками, которые участвуют в развитии воспали-

тельной реакции в миокарде [11]. Просветление и отек цитоплазмы могут быть признаками развития некротической гибели этих клеток, что подтверждает и накопление детрита в интерстиции.

Большое количество КМЦ-2 наблюдалось на 14-е и особенно на 21-е сутки после инъекции М+НАФ, т.е. когда была наиболее выражена воспалительная реакция в миокарде. На более ранних этапах чаще встречались КМЦ-1.

Наиболее характерные для КМЦ-1 изменения — контрактуры миофибрилл, отмечаемые иногда и в КМЦ-2, могут быть следствием нарушения электролитного баланса из-за увеличения проницаемости сарколеммы, утечки ионов калия из поврежденной клетки и падения его внутриклеточной концентрации [10]. Кроме того, наличие контрактур может свидетельствовать об истощении энергетических запасов АТФ в локальных пулах у миофибрилл [20]. Последнее напрямую связано с нарушением функционирования митохондрий. Выявленное нами набухание митохондрий с просветлением матрикса, деструкцией крист, повреждением наружной мембраны является признаком значительного нарушения их функций и может быть связано с гипоксией, развивающейся в очагах воспаления, а также с нарушением электролитного обмена в цитоплазме из-за повреждения сарколеммы.

Для КМЦ-1 были также характерны признаки повреждения ядерного аппарата — инвагинации ядерной оболочки, конденсация хроматина, которые считают признаками апоптотических клеток, в том числе в кардиомиоцитах [5, 7, 19, 24]. В миокарде крыс группы М-НАФ TUNEL-анализ выявил двухкратное увеличение частоты встречаемости апоптоза на 21-е сутки опыта. Апоптоз в кардиомиоцитах может быть инициирован цитотоксическими CD8+ Т-клетками через Fas-FasL систему и высвобождение ими сериновых протеаз, действием цитокинов Th1-кле-



Рис. 5. Аутофагическая вакуоль (указана звездочкой) и разъединение вставочных дисков (указано стрелками) в кардиомиоцитах крысы, 21-е сутки после инъекции М + НАФ. Ув.  $\times 25\ 000$ .

ток [11]. Возможно и участие в этом тучных клеток, содержащих в гранулах TNF $\alpha$  [11, 18]. Иногда в кардиомиоцитах, имеющих признаки апоптоза, встречались области с отеком, т. е. наблюдалось сочетание признаков апоптоза и некроза. Это согласуется с литературными данными [7, 16].

В обоих типах измененных кардиомиоцитов нами были обнаружены аутофагические вакуоли с гомогенным содержимым и деградирующими органеллами. В норме аутофагия является способом обновления органелл [25, 30], однако в стрессовых ситуациях под действием активных форм кислорода и снижении содержания АТФ в цитоплазме также может быть запущен процесс аутофагоцитоза. При сильных повреждениях клеток аутофагия служит для удаления деградировавших структур [4]. Как причина гибели кардиомиоцитов она описана в немногих работах, в частности при дилатационной кардиомиопатии у человека [29] и при аутоиммунном миокардите, вызванном у мышей дифтерийным токсином [12] (рис. 5)

Таким образом, полученные нами результаты морфологического исследования свидетельствуют о развитии миокардита при введении подопытным крысам сердечного миозина в смеси с НАФ, при этом происходит значительное повреждение и гибель части кардиомиоцитов. Возможно, наблюдаемые нами изменения кардиомиоцитов представляют собой разные стадии их повреждения в ходе эксперимента, что проявляется в изменении соотношения КМЦ-1 и КМЦ-2 на разных сроках опыта.

Помимо морфологического исследования был проведен биохимический анализ миокарда и сыворотки крови. Поскольку воспалительный процесс сопровождается активацией iNOS, синтезирующей NO в огромных количествах, оценка уровня содержания нитритов и нитратов — конечных метаболитов оксида азота — может дать представление об активности иммунной системы организма. Исследование суммарного содержания нитритов и нитратов в сыворотке крови крыс дало большой разброс данных, и достоверного отличия иммунизированных животных от ИК на всех сроках опыта зарегистрировано не было. Таким образом, на системном уровне отсутствует изменение уровня конечных метаболитов NO, что указывает на незначительный воспалительный ответ, развивающийся в сердце. Кроме того, НАФ не содержит стенок убитых туберкулезных палочек — одного из важных индукторов запуска экспрессии iNOS. Однако методом ПЦР нами было обнаружено повышение содержания мРНК iNOS в миокарде крыс группы М+НАФ на 4-е и 21-е сутки опыта, которое, вероятно, связано с активностью лимфоцитов, инфильтрующих миокард.

Показано, что инициация и развитие аутоиммунного миокардита у крыс в ответ на инъекцию миозина в смеси с ПАФ связано с действием провоспалительных цитокинов хелперных лимфоцитов Th1 [23]. Начало воспалительного процесса сопровождается высвобождением цитокинов IL-1 $\beta$ , IL-6, VEGF. Нами было показано увеличение содержания мРНК этих цитокинов в миокарде крыс группы М + НАФ на 4-е сутки опыта, что согласуется с литературными данными [17, 28]. Для IL-1 $\beta$ , так же как и для iNOS, была выявлена вторая волна увеличения экспрессии на 21-е сутки, вероятно, связанная с каскадным накоплением повреждений в миокарде и необходимостью вовлекать все большее число иммунных клеток для регуляции процессов удаления детрита и ремоделирования ткани.

Как нами было показано ранее, иммунизация сердечным миозином в смеси с ПАФ белых беспородных крыс приводила к значительному воспалению в миокарде уже на 2-е сутки опыта [3, 6]. Максимальное проявление воспалительной реакции в миокарде наблюдали на 14—21-е сутки, к 28-м суткам воспаление угасало. Сопоставляя эти данные с новой моделью, где иммунизация сердечным миозином проводилась в смеси с НАФ, легко заметить, что при использовании НАФ развитие воспалительного ответа в миокарде растягивается во времени, максимальная инфильтрация лимфоцитов отмечается на более поздних сроках. Вероятно, это связано с применением более мягкого активатора иммунного ответа: НАФ, депонируя сердечный миозин, способствует увеличению времени представления анти-

гена макрофагам и антиген презентирующим клеткам сердца, однако не содержит мощного активатора иммунитета — фрагментов стенок туберкулезной палочки. Иммунизация крыс одним НАФ не приводила к существенному развитию воспалительного ответа в миокарде, что указывает на адекватность выбранного нами контроля в данной модели аутоиммунного миокардита.

Таким образом, данный эксперимент показал, что иммунизация сердечным миозином в смеси с НАФ вызывает развитие миокардита у крыс. Согласно проведенным морфологическим и биохимическим тестам, воспалительная реакция начинается на 4 сутки после инъекции и наиболее выражена к 21-м суткам опыта.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.

- [1] *Арташян О. С., Юшков Б. Г., Мухлынина Е. А.* Изучение функциональной активности тучных клеток при иммобилизационном стрессе. *Цитология* 48 (8) : 665—668. 2006.
- [2] *Быков В. Л.* Секреторные механизмы и секреторные продукты тучных клеток. *Морфология*. 115 (2) : 64—72. 1999.
- [3] *Гаврилова С. А., Морозова М. П., Княженцева А. К., Погодина Л. С., Постников А. Б., Ченцов Ю. С.* Динамика развития аутоиммунного миокардита у крыс. *Известия РАН. Сер. биол.* 5 : 1—13. 2010
- [4] *Манских В. Н.* Пути гибели клетки и их биологическое значение. *Цитология*. 49 (11) : 909—915. 2007.
- [5] *Михайлов В. М., Комаров С. А., Нилова В. К., Штейн Г. И., Баранов В. С.* Ультраструктурный и морфометрический анализ стадий апоптоза кардиомиоцитов мышей MDX. *Цитология*. 43 (8) : 729—727. 2001.
- [6] *Непомнящих Л. М.* Морфология важнейших общепатологических процессов в сердце. Новосибирск Наука. 352. 1991.
- [7] *Погодина Л. С., Шорникова М. В., Ченцов Ю. С.* Электронномикроскопическая характеристика кардиомиоцитов левого желудочка сердца крыс после индукции апоптоза изопротеренолом. *Известия. РАН. Сер. биол.* 1 : 26—37. 2006.
- [8] *Ройтберг Г. Е., Струтынский А. В.* Внутренние болезни. Сердечно-сосудистая система. М. БИНОМ. 856. 2007.
- [9] *Ромейс Б.* Фиксация, окраска гистологического материала. — Москва. Микроскопическая техника. 1954.
- [10] *Семенова Л. А., Целлариус Ю. Г.* Ультраструктура мышечных клеток сердца при очаговых метаболических повреждениях. Новосибирск. Наука. 143 : 23. 1978.
- [11] *Afanasyeva M., Georgakopoulos D., Rose N. R.* Autoimmune myocarditis: cellular mediators of cardiac dysfunction. *Autoimmunity Rev.* 3 : 476—486. 2004.
- [12] *Akazawa H., Komazaki S., Shimomura H., Terasaki F., Zou Y., Takano H., Nagai T., Komuro I.* Diphtheria toxin-induced autophagic cardiomyocyte death plays a pathogenic role in mouse model of heart failure. *J. Biol. Chem.* 279 (39) : 41 095—41 103. 2004.
- [13] *Cunningham M.* Cardiac myosin and the TH1/TH2 paradigm in autoimmune myocarditis. *Am. J. Pathol.* 159 (1) : 5—12. 2001.
- [14] *Fairweather D., Frisancho-Kiss S., Gatewood S., Njoku D., Steele R., Barrett M., Rose N. R.* Mast cells and innate cytokines are associated with susceptibility to autoimmune heart disease following coxsackievirus B3 infection. *Autoimmunity*. 37 (2) : 131—145. 2004.
- [15] *Gavrieli Y., Sherman Y., Ben-Sasson S. A.* Identification of programmed cell death in situ via specific labeling of nuclear DNA fragmentation. *J Cell Biol.* 119 (3) : 493—501. 1992
- [16] *Goldspink D. F., Burniston J. G., Ellison G. M., Clark W. A., Tan L. B.* Catecholamine-induced apoptosis and necrosis in cardiac and skeletal myocytes of the rat in vivo: the same or separate death pathways? *Exp. Physiol.* 89 (4) : 407—416. 2004.
- [17] *Hanawa H., Abe S., Hayashi M., Yoshida T., Yoshida K., Shiono T., Fuse K., Ito M., Tachikawa H., Kashimura T., Okura Y., Kato K., Kodama M., Maruyama S., Yamamoto T., Aizawa Y.* Time course of gene expression in rat experimental autoimmune myocarditis. *Clin. Sci. (Lond.)*. 103 (6) : 623—632. 2002.
- [18] *Hara M., Matsumori A., Ono K., Kido H., Hwang M.W., Miyamoto T., Iwassaki A., Okada M., Nakatani K., Sawayama S.* Mast cells cause apoptosis of cardiomyocytes and proliferation of other intramyocardial cells in vitro. *Circulation*. 100 (13) : 1443—1449. 1999.

- [19] *Harmon B. V., Winterford C. M., O'Brien B. A., Allan D. J.* Morphological criteria for identifying apoptosis. *Cell biology: a laboratory handbook*. 1 : 327—340. 1998.
- [20] *Hearse D. J., Garlick P. B., Humphrey S. M.* Ischemic contracture of the myocardium: mechanisms and prevention. *Am. J. Cardiol.* 39 (7) : 986—993. 1977.
- [21] *Hirono S., Islam M. O., Nakazawa M., Yoshida Y., Kodama M., Shibata A., Izumi T., Imai S.* Expression of inducible nitric oxide synthase in rat experimental autoimmune myocarditis with special reference to changes in cardiac hemodynamics. *Circ. Res.* 80 (1) : 11—20. 1997.
- [22] *Huber S.* Autoimmunity in myocarditis: relevance of animal models. *Clin. Immunol. Immunopathol.* 83 (2) : 93—102. 1997.
- [23] *Izumi T., Takehana H., Matsuda C., Jokoyama H., Kohno K., Suzuki K., Inomata T.* Experimental autoimmune myocarditis and its pathomechanism. *Herz.* 25 (3) : 274—278. 2000.
- [24] *Kerr J. F. R., Wyllie A. H., Currie A. R.* Apoptosis: a basic biological phenomenon with wide ranging implications in tissue kinetics. *Brit. J. Cancer.* 26 : 239—257. 1972.
- [25] *Lockshin R. A., Zakeri Z.* Apoptosis, autophagy, and more. *IJBCB.* 36 : 2405—2419. 2004.
- [26] *Miranda K. M., Espey M. G., Wink D. A.* A rapid, simple spectrophotometric method for simultaneous detection of nitrate and nitrite. *Nitric Oxide.* 5 (1) : 62—71. 2001.
- [27] *Murakami U., Uchida K., Hiratsuka T.* Cardiac myosin from pig heart ventricle. Purification and enzymatic properties. *J. Biochem.* 80 (3) : 611—619. 1987.
- [28] *Okura Y., Yamamoto T., Goto S., Inomata T., Hirono S., Hanawa H., Feng L., Wilson C. B., Kihara I., Izumi T., Shibata A., Aizawa Y., Seki S., Abo T.* Characterization of cytokine and iNOS mRNA expression in situ during the course of experimental autoimmune myocarditis in rats. *J Mol Cell Cardiol.* 29 (2) : 491—502. 1997.
- [29] *Shimomura H., Terasaki F., Hayashi T., Kitaura Y., Isomura T., Suma H.* Autophagic degeneration as a possible mechanism of myocardial cell death in dilated cardiomyopathy. *Jpn. Circ. J.* 65 (11) : 965—968. 2001.
- [30] *Tsujimoto Y., Shimizu S.* Another way to die: autophagic programmed cell death. *Cell Death Differentiation.* 12 : 1528—1534. 2005.
- [31] *Wakisaka Y., Niwano S., Niwano H., Saito J., Yoshida T., Hirasawa S., Kawada H., Izumi T.* Structural and electrical ventricular remodeling in rat acute myocarditis and subsequent heart failure. *Cardiovasc. Res.* 63 (4) : 689—699. 2004.
- [32] *Zhdanov A. V., Sosulina L. Y., Kurbanova D. F., Van'ko L. V., Sukhikh G. T.* Expression of cytokine genes in blood mononuclear cells in women with pyoinflammatory diseases of adnexa uteri. *Bull. Exp. Biol. Med.* 134 (5) : 477—481. 2002.

Поступила 16 XI 2011