

Л.В. Тумановська, В.Є. Досенко, В.С. Нагібін, Н.В. Макогон, О.О. Мойбенко

Апоптотична, аутофагічна та онкотична загибель кардіоміоцитів при аноксії – реоксигенації

В экспериментах на изолированных неонатальных кардиомиоцитах крысы было показано, что при моделировании аноксии – реоксигенации наблюдаются различные типы клеточной гибели: незапрограммированная (онкоз) и запрограммированная (апоптоз и аутофагическая клеточная смерть). При окраске пропидиум йодидом и бис-бензимидам соотношение живых, некротических и апоптотических клеток при аноксии – реоксигенации составляло 77, 14, 9 % соответственно (в контроле – 86, 9,6 и 4,4 %). Электронно-микроскопические исследования неонатальных кардиомиоцитов после аноксии – реоксигенации позволили выявить морфологические особенности каждого из видов клеточной смерти. Аутофагическая деструкция клеток подтверждалась специфической флуоресценцией монодансилкадаверина в вакуолярных образованиях кардиомиоцитов. Полученные результаты впервые указывают на наличие аутофагической клеточной смерти неонатальных кардиомиоцитов при аноксии – реоксигенации и обуславливают необходимость исследования ее роли в патогенезе сердечно-сосудистых заболеваний.

ВСТУП

Численні морфологічні, біохімічні та генетичні дослідження останніх років дозволили визначити декілька типів клітинної смерті: запрограмовану (апоптоз, аутофагічна смерть клітини тощо) та незапрограмовану (онкоз – процес, що призводить до некрозу). Механізми загибелі клітин при ішемії–реперфузії міокарда активно вивчаються протягом багатьох років. Патоморфологічні прояви ішемічного некрозу кардіоміоцитів загальновідомі, в той час як інші варіанти клітинної смерті почали вивчатися порівняно недавно. Чітко встановлено, що поряд з некротичними змінами в ішемізованому міокарді спостерігається і апоптотична загибель клітин [4, 9, 16]. Особливого значення апоптоз набуває при відновленні оксигенації міокарда, внаслідок чого гине додаткова кількість клітин навколоінфарктної зони. Аутофагічна клітинна смерть, як ще один шлях запрограмованої

клітинної смерті, до останнього часу не згадувалася в роботах, присвячених проблемі розвитку патологічних процесів у серці. Аутофагію (від грец. auto та phagos – самопожирання) можна визначити як біологічно запрограмований процес видалення органел і білкових структур, як механізм, що забезпечує клітину основними поживними елементами в разі переходу на ендогенне живлення. В окремих випадках аутофагія може закінчуватися самоперетравленням клітини (аутофагічна клітинна смерть), залишки якої видаляються за допомогою фагоцитозу макрофагами або іншими клітинами. Морфологічними ознаками аутофагічної клітинної смерті вважаються: секвестрація ділянки цитоплазми з органелами, утворення вакуолей, гіперплазія лізосом, конденсація хромосом тощо [7, 11, 14, 17, 19]. Такий шлях клітинної смерті досить детально описаний і має велике значення в патогенезі нейродегенеративних захворювань, проте практично

© Л.В. Тумановська, В.Є. Досенко, В.С. Нагібін, Н.В. Макогон, О.О. Мойбенко

не досліджувався при патології серцево-судинної системи. Деякі автори зазначають, що аутофагічна деструкція клітин серця може розглядатися як один із важливих механізмів загибелі кардіоміоцитів при ремоделюванні міокарда під час гіпертрофії, кардіоміопатія та при дії кардіотоксичних антибіотиків [3, 5, 8, 12, 17].

Мета нашого дослідження полягала у визначенні різних видів клітинної смерті при моделюванні аноксії – реоксигенації ізольованих неонатальних кардіоміоцитів.

МЕТОДИКА

Досліди було проведено на первинній культурі неонатальних кардіоміоцитів, отриманих з міокарда шлуночків дводобових щурів за допомогою ферментативного гідролізу [15]. Кількість живих і загинувших клітин, яку визначали методом включення 0,2%-го розчину трипанового синього, становила 85–95 та 5–15 % відповідно. Клітини розміщували на скельцях із щільністю 120 000 на 1 см². Культивування проводили при 37°C у газовому середовищі – 5 % CO₂ та 95 % атмосферного повітря протягом 1–2 діб. Живильне середовище складалося з наступних інгредієнтів: середовище Ігла в модифікації Дюльбекко (DMEM), середовище 199 (співвідношення DMEM/199 – 4 : 1), теляча сироватка – 15 %, Na₂CO₃ – 4,2 ммоль/л, HEPES – 15 ммоль/л та антибіотики (стрептоміцин – 100 мкг/мл, гентаміцин – 0,05 мг/мл, пеніцилін – 100 ОД/мл). Аноксію – реоксигенацію моделювали за допомогою аерації клітин безкисневою газовою сумішшю такого складу: 5 % CO₂ та 95 % Ar протягом 30 хв із наступною заміною живильного середовища та культивуванням клітин за вихідних умов протягом 60 хв. Кількість живих, некротичних та апоптотичних клітин оцінювали цитологічно за допомогою забарвлення кардіоміоцитів біс-бензимідом (Hoechst 33342) та пропідіум йодидом в однаковій концентрації

8,75 мкмоль/л. Перший з них проникає через непошкоджену мембрану клітин і забарвлює ядерний хроматин, візуалізуючи таким чином живі та апоптотичні клітини (останні мають фрагментовані та пікнотичні ядра). Пропідіум йодид не може проникати через плазматичну мембрану і забарвлює лише ядра клітин з пошкодженою плазмалевою, тобто некротичних. Для виявлення аутофагічних вакуолей застосовували специфічний барвник – монодансилкадаверин у концентрації 50 мкмоль/л (прижиттєве забарвлення клітин) [14]. Для електронно-мікроскопічних досліджень використовували рутинний метод заливки тканин в епоксидні смоли з фіксацією зразків в 2,5%-му глутаральдегіді на какодилатному буфері та постфіксацією 1%-ю осміевою кислотою. Ультратонкі зрізи контрастувалися в уранілацетаті та цитраті свинцю. Матеріал вивчали на електронному мікроскопі Jem – 100 CX (Японія).

Результати експериментів обробляли методом варіаційної статистики з використанням критерію t Стьюдента та критерію χ^2 за допомогою статистичних програм Origin 7,0 та Excel 2000. Статистично вірогідними вважалися результати для яких P<0,05.

РЕЗУЛЬТАТИ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

У результаті проведених досліджень було встановлено, що при відтворенні аноксії – реоксигенації кардіоміоцитів значно змінюється співвідношення живих, некротичних та апоптотичних клітин: 77, 14, 9 % відповідно (в контролі – 86, 9,6 та 4,4 %). Кількість апоптотичних клітин при цьому вірогідно збільшується в 2,1 раза (P<0,05) саме при відновленні оксигенації.

За даними світлової і електронної мікроскопії інтактна культура кардіоміоцитів (інкубація 24–48 год за вищеописаних умов) мала вигляд моношару витягнутих в різних напрямках полігональних клітин, що утворювали міжклітинні контакти. Електронно-

мікроскопічне дослідження показало, що при культивуванні за умов нормоксії (контроль) кардіоміоцити зберігали цілісність сарколеми, внутрішньоклітинну архітекτονіку, структуру мітохондрій, дифузний стан ядерного хроматину. Клітини характеризувалися наявністю міофібрил, великою кількістю мітохондрій та добре вираженим гранулярним ендоплазматичним ретикуломом (рис. 1,а). При відтворенні аноксії–реоксигенації спостерігалися різною мірою ушкоджені кардіоміоцити. Серед них були клітини, які зберігали

структуру, що була близькою до норми, некротичні, апоптотичні клітини, а також кардіоміоцити, які мали ознаки активації аутофагії (рис. 1, 2). Найбільш ранніми ультраструктурними ознаками ушкодження в деяких клітинах були: перинуклеарний набряк, деструкція або набряк окремих мітохондрій, вакуолізація апарату Гольджі, часткова втрата гранулярності ендоплазматичного ретикулума та його перебудова з утворенням поодиноких вакуолей, збільшення кількості та скупчення лізосом, утворення мієліноподібних фігур, вогни-

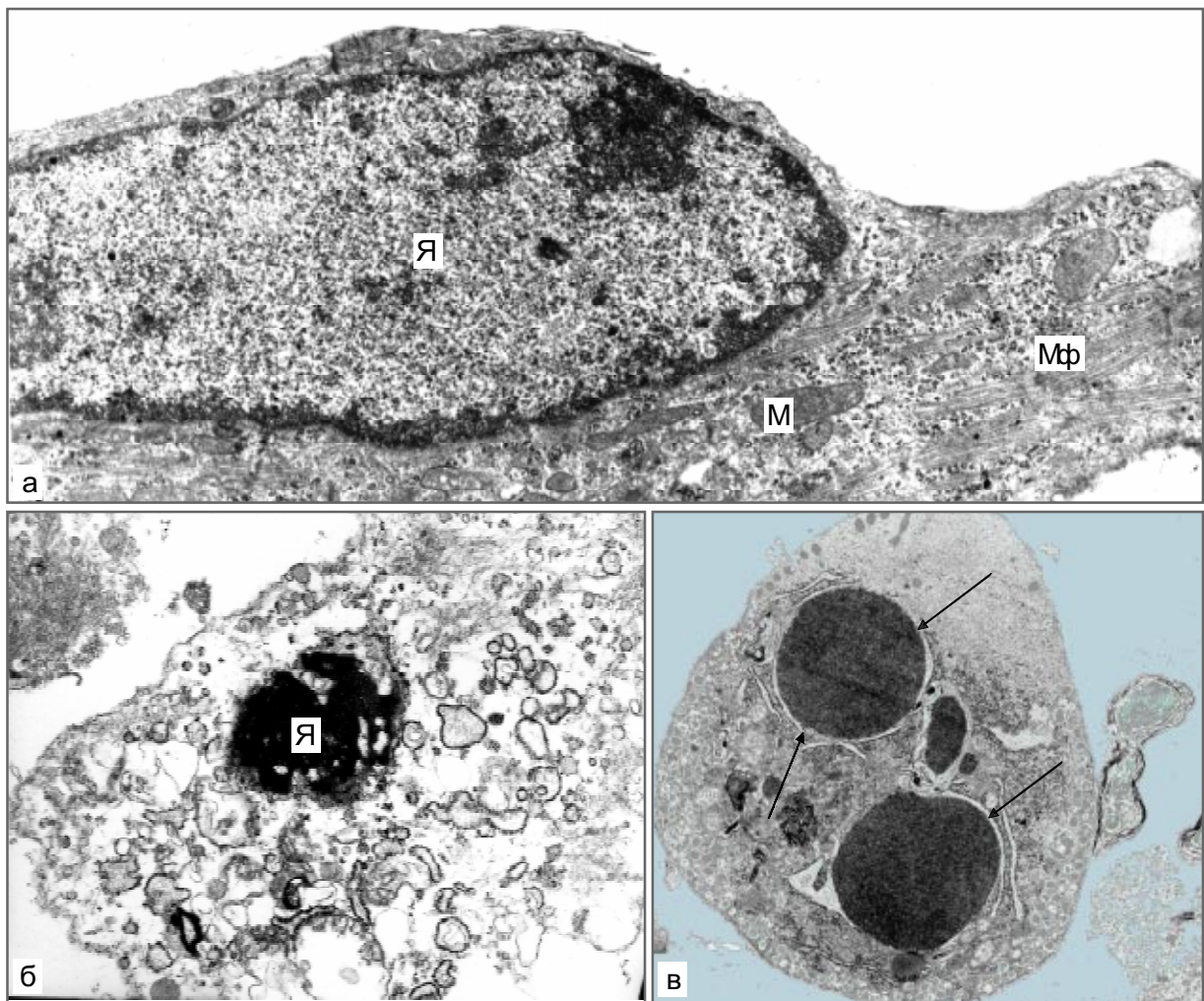


Рис. 1. Неонатальні кардіоміоцити: а – контроль Зб. 10000; б – аноксія – реоксигенація (некротизація). Зб. 8000; в – аноксія–реоксигенація (апоптоз, стрілками позначено фрагменти ядра). Зб. 8000. Мф – міофіламенти, М – мітохондрія, Я – ядро

щева вакуолізація сарколеми, маргінація ядерного хроматину.

Деструктивні процеси в деякій частині кардіоміоцитів можна було охарактеризувати як некротичні – гідратація цитоплазми, маргінація ядерного хроматину, набряк і руйнування мітохондрій, вакуолізація мембранних компонентів клітин і порушення цілісності саркоплазматичної мембрани з втратою характерної полігональної форми (див. рис. 1,б). Значна частина кардіоміоцитів мала ознаки пізніх стадій апоптозу – осміофілія цитоплазми, деструкція практич-

но усіх органел, конденсація хроматину та фрагментація ядра за умов збереження цілісності сарколеми, формування оточених мембраною фрагментів цитоплазми в результаті вип'ячування її ділянок, так званих “blebs”, з подальшим відокремленням від поверхні клітини апоптотичних тілець (див. рис. 1,в).

Морфологія певної частини кардіоміоцитів, які зазнали значних деструктивних змін, відрізнялася як від апоптотичних клітин, так і від некротичних наявністю великої кількості вакуолей різних розмірів

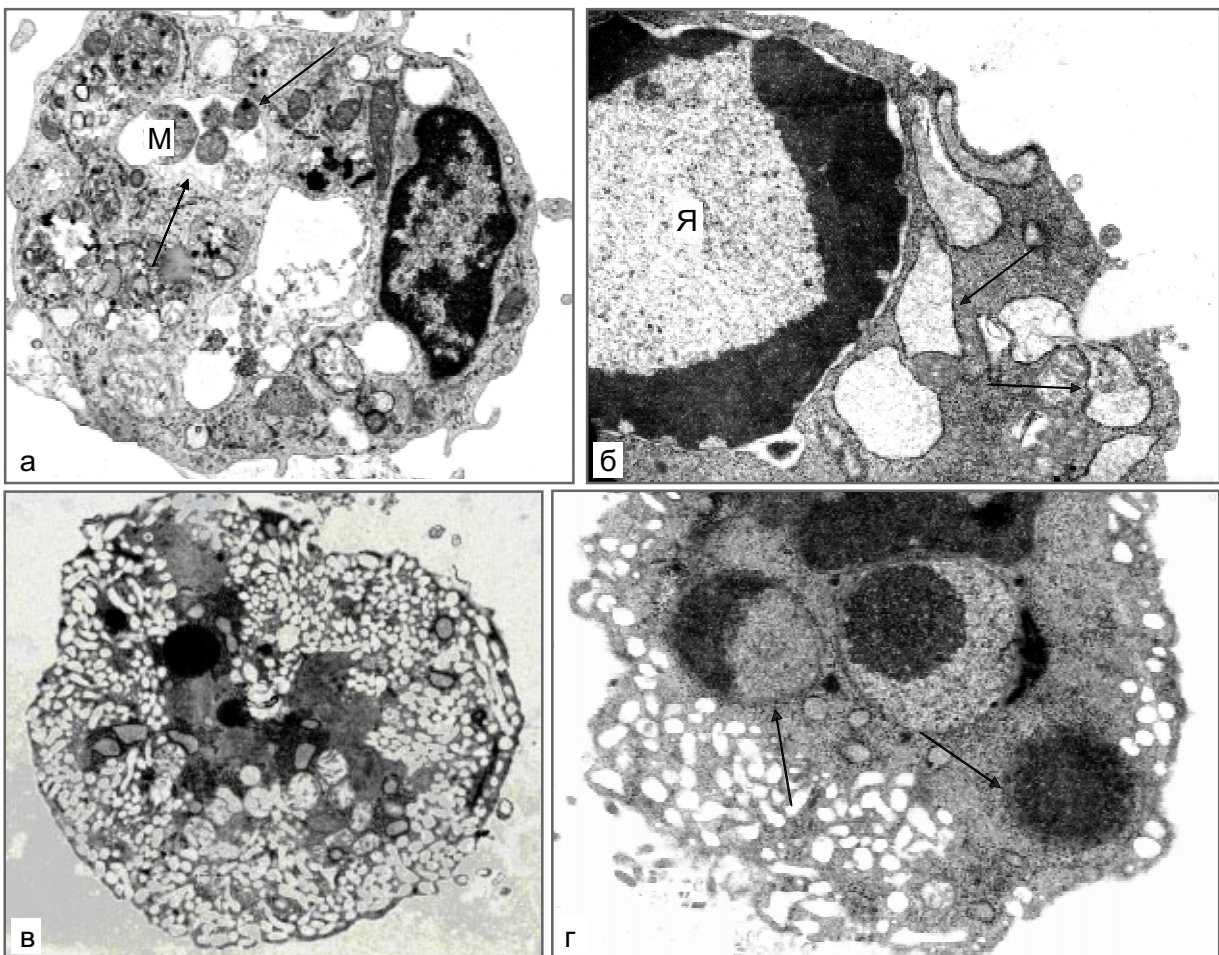


Рис. 2. Аноксія – реоксигенація неонатальних кардіоміоцитів щурів: а – аутофагічна деструкція кардіоміоцита (стрілки вказують на сформовану аутофагосому, яка містить мітохондрії). Зб. 8000; б – видалення вмісту постаутофагосом. Зб. 14000; в – кінцева стадія розвитку аутофагічної смерті клітини. Зб. 8000. г – клітина з морфологічними проявами як аутофагії, так і апоптозу (стрілками показано фрагменти ядра). Зб. 10000. Мф – міофіламенти, М – мітохондрія, Я – ядро

(що не є характерним для апоптозу). Ця вакуолізація кардіоміоцитів супроводжувалася значною осміофілією цитоплазми (характерною для апоптозу, проте нехарактерною для некрозу), конденсацією хроматину або пікнозом ядра (фрагментація ядра в таких клітинах не спостерігалася) та збереженням цілісності сарколеми (див. рис. 2,а,в). Утворення вакуолей за участю ендоплазматичного ретикулума, відбувалося внаслідок секвестрації ділянок цитоплазми, окремих органел або цитоплазматичних включень з подальшим перетворенням вмісту вакуолей у резидуальні тільця – залишкові продукти катаболічного процесу (див. рис. 2,а). Подальше видалення резидуальних тілець із клітини відбувалося за допомогою екзоцитозу, при цьому мембрана постаутофагосоми зливалася з цитоплазматичною мембраною, а матеріал, який вона містила, надходив в навколишнє середовище (див. рис. 2,б). Слід зазначити, що в клітинах з великою кількістю аутофагосом цитоплазма була гомогенною, а органели майже не візуалізувалися. Проте структура окремих мітохондрій залишалася незмінною навіть на пізніх стадіях цього процесу. Більш детальне вивчення організації вакуолей із застосуванням специфічного флюоресцентного барвника (монодансилкадаверину) показало, що ці утворення є аутофагічними вакуолями, а їх наявність може свідчити про розвиток аутофагічної смерті кардіоміоцитів.

Зазначені зміни є характерними для аутофагічної клітинної смерті, яка вперше описана при харчовій депривації клітин за умов нестачі амінокислот [7, 11]. Надалі було доведено, що аутофагічна клітинна смерть індукується рапаміцином – специфічним інгібітором протеїнкінази Tor (target of rapamycin). Ця серин-треонінова протеїнкіназа за наявності амінокислот і факторів росту координує активність транскрипції, трансляції, біогенезу рибосом, утворення транспортних РНК і має ще

низку функцій в регуляції клітинного росту. За умов нестачі амінокислот або при дії рапаміцину активність Tor знижується, що спричинює зупинку клітинного циклу в G1-періоді, припинення синтезу білка внаслідок гіпофосфорилування р70S6-кінази, необхідної для асоціації рибосом з ендоплазматичним ретикуломом, та, нарешті, аутофагію. Остання є багатостадійним, чітко відрегульованим процесом, що відбувається із залученням більше ніж 20 білків, які утворюють в цілому так званий APG (autophagosomal)-каскад. Слід зазначити, що ця система відрізняється надзвичайно високою консервативністю – більшість протеїнів дріжджів, залучених в аутофагію, гомологічні білкам ссавців. Описані й інші механізми запуску аутофагічної клітинної смерті. Зокрема, мутантний білок gas здатний індукувати аутофагічну клітинну смерть опосередковано через інозитол-3-фосфатпротеїнкіназу. Інсуліноподібний фактор росту (ILGF) також згадується в літературі як один з індукторів аутофагічної клітинної смерті. Водночас літературні дані [18] доводять, що за умов дії ILGF на клітини з нормальним і мутантним рецептором ILGF відбувається їх загибель, яка не попереджується інгібіторами апоптозу (пригнічення активності каспаз, введення антиапоптотичного білка bcl-XL, р35 тощо) та не має характерних морфологічних ознак апоптозу чи некрозу. Такий вид загибелі клітин попереджувався інгібіторами синтезу білків і відрізнявся вакуолізацією цитоплазми та конденсацією хроматину. На цих підставах автори вбачають новий варіант запрограмованої клітинної смерті – „параптоз”. Проте морфологічні характеристики та спосіб індукції цієї клітинної загибелі (через ILGF) повністю відповідають аутофагічній клітинній смерті, про яку автори згадують у своїй статті, однак не роблять спроби виключити наявність аутофагічної клітинної смерті перед тим як вводити новий термін.

Важливим фактором стимуляції аутофагії вважається пригнічення протеасомального протеолізу. Kostin та ін. показали, що в міокарді хворих на серцеву недостатність виникають зміни убіквітинізації (збільшення експресії убіквітину та активності убіквітинкон'югуючого ферменту) та деубіквітинізації (зниження активності ізопептидази T та системи, що деградує приєднаний до білка убіквітин) при незмінній активності протеасоми та її субодиночного складу. При цьому в багатьох клітинах серця (19 %) спостерігалось накопичення убіквітинізованих протеїнів, причому вони містилися в аутофагосомальних вакуолях. Однак можливості для деградації цих білків у лізосомах при згаданій патології, напевно, обмежені, бо за даними цих авторів активність катепсину D була вірогідно нижчою, ніж у контролі. Застосування монодансилкадаверину дозволило авторам упевнитися в тому, що аутофагічна клітинна смерть, разом з апоптозом та онкозом, спостерігається при серцевій недостатності [12].

За нашими результатами, введення інгібітора NO-синтаз (L-NNA) за умов ішемії–реперфузії серця собаки також спричинює активацію аутофагії [2]. Оскільки механізми розвитку аутофагічних процесів за умов патології серцево-судинної системи недостатньо вивчені пояснити цей феномен і появу ознак аутофагії при аноксії–реоксигенації ізольованих кардіоміоцитів у культурі досить важко. Можна думати, що порушення транспорту амінокислот через цитоплазматичну мембрану внаслідок оксидативного ураження білків-переносників і недостатнє енергозабезпечення цього процесу спричинює розвиток аутофагічної клітинної смерті опосередковано через пригнічення Tor. Не виключено, що порушення протеасомального протеолізу в кардіоміоцитах при аноксії – реоксигенації також відіграють певну роль у запуску аутофагічної клітинної смерті. За деякими даними при ішемії –

реперфузії знижується хімотрипсиноподібна активність 26S протеасоми [6]. За нашими результатами в ізольованих неонатальних кардіоміоцитах ця активність протеасоми знижується майже на 50 % при аноксії та відновлюється при реоксигенації [1]. Можливо, що розвиток аутофагії є наслідком зменшення кількості вільних амінокислот, які за звичайних умов утворюються при розщепленні протеасомою убіквітинізованих білків [7].

Загалом слід зазначити, що взаємовідносини різних видів клітинної смерті в кардіоміоцитах мають складний характер. Крім клітин, які можна було чітко віднести до апоптотичних, некротичних або аутофагічних завжди спостерігалися такі, що одночасно мали ознаки різних варіантів загибелі. Наприклад, при забарвленні бісбензимідом і пропідіум йодидом виявлялися клітини з фрагментованим ядром червоного кольору, що свідчить про порушення цілісності мембрани в клітині на термінальній стадії апоптозу. При електронно-мікроскопічному дослідженні (див. рис. 2,г) поодинокі кардіоміоцити при аноксії–реоксигенації мали одночасно патоморфологічні ознаки аутофагічної клітинної смерті та апоптозу (фрагментація ядра). Тобто ці процеси можуть відбуватися одночасно в одних і тих самих клітинах внаслідок того, що ті самі фактори індукують розвиток різних видів клітинної смерті залежно від інтенсивності впливу або через наявність спільних механізмів реалізації, скажімо, апоптозу та аутофагічної клітинної смерті, а також нашарування додаткових ушкоджувальних факторів під час аноксії–реоксигенації. Наприклад, чітко встановлено, що аутофагічна клітинна смерть індукується пригніченням активності протеасомального протеолізу [12]. Водночас безперечним фактом є те, що інгібітори протеасоми спричиняють розвиток апоптозу, зокрема внаслідок сповільнення деградації проапоптотичних білків [1, 13].

Отже, при моделюванні аноксії – реоксигенації кардіоміоцитів запускається не тільки програма апоптозу, але й програма аутофагічної клітинної смерті. Встановлений факт спонукає до пошуку та випробування препаратів, що здатні попереджувати як апоптоз, так і аутофагічну деструкцію клітин.

**L.V. Tumanovska, V.E. Dosenko, V.S. Nagibin,
N.V. Makogon, A.A. Moibenko**

АПОПТОТИС, АУТОФАГІЧНІ ТА ОНКОТИЧНІ КАРДИОМІОЦИТИ ТА ЇХНЯ СМЕРТЬ ПРИ АНОКСІЇ-РЕОКСИГЕНАЦІЇ

In experiments on isolated rat neonatal cardiomyocytes under anoxia-reoxygenation it was established the different types of cell death: non-programmed (oncotic) and programmed (apoptotic and autophagic). Propidium iodide and Hoechst 33342 staining revealed that alive, necrotic and apoptotic cell ratio after anoxia-reoxygenation was 77%, 14%, 9% respectively (86%, 9.6% and 4.4% in control). Electron microscopy of neonatal rat cardiomyocytes allows us to clarify the ultrastructural peculiarities of each type of cell death. Cytoplasm hydration, swelling, cell membrane components vacuolization and sarcolemmal integrity alteration were typical for necrosis. The features of apoptosis include: cytoplasm osmiophilia, cell organelle destruction, chromatin condensation and nucleus fragmentation as well as blebs and apoptotic body formation. Autophagic cell death was characterized by the presence of large amount of different size vacuoles accompanied by significant cytoplasm osmiophilia, chromatin condensation or nucleus picnosis (nucleus fragmentation was not observed in these cells) and preservation of sarcolemmal integrity. The autophagic cardiomyocytes destruction was proved by specific monodansylcadaverine staining of vacuolar structures. We first showed the anoxia-reoxygenation-related autophagic cell death of neonatal rat cardiomyocytes. These results strongly suggest the necessity of autophagic cell death investigation in pathogenesis of cardiovascular diseases.

A.A. Bogomoletz Institute of Physiology National Academy of Sciences of Ukraine, Kiev

СПИСОК ЛІТЕРАТУРИ

1. Веремеєнко К.Н., Досенко В.Є., Нагібін В.С. и др. Протеолитические ферменты и апоптоз // Укр. биохим. журн. – 2003. – **75**, №6. – С.10–24.
2. Мойбенко О.О., Юзьків М.Я., Тумановська Л.В., Коцюруба А.В. Гостра ішемія – реперфузія міокарда: роль системи оксиду азоту // Фізіол. журн. – 2004. – **50**, №2. – С.34–41.
3. Семенов Д.Е. Лушникова Е.Л. Непомнящий Л.М. Особенности антрациклиновой модели кардиомиопатии: снижение синтеза белка, нарушение внутриклеточной регенерации и безнекротическая элиминация кардиомиоцитов // Бюл. эксперим. биологии и медицины, 2001. – **131**, №5. – С.595–600.
4. Akao M., Ohler A., O'Rourke B., Marban E. Mitochondrial ATP-sensitive potassium channels inhibit apoptosis induced by oxidative stress in cardiac cells // Circulat. Res. – 2001. – **88**, №12. – P.1267–1275.
5. Aki T., Yamaguchi K., Fujimiya T., Mizukami Y. Phosphoinositide 3-kinase accelerates autophagic cell death during glucose deprivation in the rat cardiomyocyte-derived line H9c2 // Oncogene. – 2003. – **22**, №52. – P.8529–8535.
6. Bulteau A.-L., Lundberg K.C., Humphries K.M. et al. Oxidative modification and inactivation of the proteasome during coronary occlusion/reperfusion // J. Biol. Chem. – 2001. – **276**, № 32. – P.30057–30063.
7. Bursch W. The autophagosomal-lysosomal compartment in programmed cell death // Cell Death Differ. – 2001. – **8**. – P.569–581.
8. Hein S., Elsasser A., Kostin S. et al. Functional disturbances due to structural remodeling in the failing human heart // Arch. Mal. Coeur. Vaiss. – 2002. – **95**, №9. – P.815–820.
9. Kajstura J., Cheng W., Sarangarajan R. et al. Necrotic and apoptotic myocytes cell death in the aging heart of Fischer 344 rats // Amer. J. Physiol. – 1996 – **271**. – P.H1215–H1228.
10. Kitagawa H., Tani E., Ikemoto H. et al. Proteasome inhibitors induce mitochondria-independent apoptosis in human glioma cells // FEBS. Lett. – 1999. – **443**, №2. – P.181–186.
11. Klionsky D.J., Emr S.D. Autophagy as a regulated pathway of cellular degradation // Science. – 2000. – **290**. – P.1717–1721.
12. Kostin S., Pool L., Elsasser A. et al. Myocytes die by multiple mechanisms in failing human heart // Circulat. Res. – 2003. – **92**, №7. – P.715–724.
13. Marshansky V., Wang X., Bertrand R. et al. Proteasomes modulate balance among proapoptotic and antiapoptotic Bcl-2 family members and compromise functioning of the electron transport chain in leukemic cells // J. Immunol. – 2001. – **166**, №5. – P.3130–3142.
14. Munafo D.B., Colombo M.I. A novel assay to study autophagy: regulation of autophagosome vacuole size by amino acid deprivation // J. Cell Sci. – 2001. – **114**. – P.3619–3629.
15. Reinecke H., Zhang M., Bartosek T., Charles E.M. Survival, integration, and differentiation of cardiomyocyte grafts // Circulation. – 1999. – **100**, №2. – P.193–202.
16. Scarabelli T.M., Stephanou A., Pasini E. et al. Different signaling pathways induce apoptosis in endothe-

- lial cells and cardiac myocytes during ischemia/ reperfusion injury // *Circulat. Res.* – 2003. – **90**. – P.745–748.
17. Shimomura H., Terasaki F., Hayashi T. et al. Autophagic degeneration as a possible mechanism of myocardial cell death in dilated cardiomyopathy // *Jap. Circulat. J.* – 2001. – **65**. – P.965–968.
18. Sperandio S., De Belle I., Bredesen D. An alternative, nonapoptotic form of programmed cell death // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* – 2000. – **97**, №26. – P.14376–14381.
19. Terman A., Dalen H., Eaton J.W. et al. Mitochondrial recycling and aging of cardiac myocytes: the role of autophagocytosis // *Exp. Gerontol.* – 2003. – **38**, №8. – P.863–876.

Ін-т фізіології ім. О.О.Богомольця НАН України, Київ

Матеріал надійшов до редакції 26.04.2004