

JOLITA PALUBINSKIENĖ, ELENA STALIORAITYTĖ,
DALIA PANGONYTĖ, REDA ŽIURAITIENĖ,
DANUTĖ KAZLAUSKAITĖ

KAIRIOJO SKILVELIO MIOKARDO REAKCIJA Į ISCHEMIJĄ: STRUKTŪROS POKYČIAI

Širdies raumuo, arba miokardas, sąlyginai skiriamas į dvi dalis. Tai pluoštais išsidėsčiusios širdies raumens ląstelės – kardiomiocitai, kuriuos supa ir tarpusavyje sutvirtina kolageno ir elastinių skaidulų tinklas, užimantis 24 proc. miokardo tūrio. Čia susitelkusios kraujagyslės, limfagyslės bei nervai ir makromolekulių kompleksai – tarpląstelinis matiksas (vadinamoji tarpląstelinė medžiaga) ir ne raumens, arba intersticiumo, ląstelės: fibroblastai, kapiliarų endotelio, lygiųjų raumenų, putliosios ląstelės.

Kardiomiocitai, sudarantys 75 proc. viso miokardo tūrio, yra pailgos ląstelės, kurių galuose esantys įterptiniai diskai juos tarpusavyje sujungia. Žmogaus kardiomiocitai paprastai turi vieną branduolį ląstelės centre. Širdis dirba susitraukiant kardiomiocitams. Todėl kiekvienos ląstelės citoplazmoje yra miofibrilės, sudarytos iš pakaitomis lygiagrečiai išsidėsčiusių kontraktiliųjų baltymų – aktino ir miozino, dėl kurių sąveikos ląstelės trumpėja.

Kiekviena širdies liga ilgainiui sukelia lėtinį širdies funkcijos nepakankamumą, kuris yra pagrindinė išsivysčiusių šalių gyventojų mirties priežastis. Ischeminė širdies liga (IŠL) pasireiškia įtekančio kraujo, taigi ir deguonies kiekio, sumažėjimu širdies raumenyje dėl aterosklerozinės kilmės širdies vainikinių arterijų, maitinančių miokardą, spindžio susiaurėjimo. Dėl šios priežasties silpniau susitraukia atitinkamos srities raumuo (kontraktacija), atsiranda širdies kairiojo skilvelio disfunkcija. Priklausomai nuo ischemijos pobūdžio ir trukmės, funkcija gali spontaniškai atsistatyti arba normalizuotis tik intervencijos (chirurginės) būdu. Jei vainikinė arterija užsikemša ties aterosklerozine plokštele susiformavus

trombui, įvyksta ir tam tikros srities miokardo žūtis – miokardo infarktas.

Miokardo infarktas reikšmingai pakeičia širdies veiklą – dalis miokardo negali susitraukti, pažeistoje srityje, šalinant negyvą audinį, atsiranda uždegimas, o vėliau – jungiamojo audinio randas, kuris ne tik nedalyvauja kontrakcijoje, bet ir gali trukdyti širdies ertmei prisipildyti diastolės metu. Be to, dėl uždegimo metu išsiskyrusių medžiagų bei daliai miokardo nedalyvaujant kontrakcijoje suplonėja pažeistoji sritis ir padidėja širdies ertmės tūris, tad pagal Laplaso dėsnį (*La Place law*) labiau įsitempia nepažeistos širdies sienos srities miokardas. Dėl padidėjusios miokardo įtampos dirginami ląstelių membranų receptoriai, suaktyvinami ir kardiomiocitų, ir intersticiumo ląstelių tam tikri genai, todėl atsiranda miokardo pokyčiai.

Darbo tikslas buvo įvertinti žmogaus širdies kairiojo skilvelio (KS), atokiau nuo infarkto arba susiaurėjusios vainikinės arterijos aprūpinamosios srities esančio miokardo kardiomiocitų ir intersticiumo tarpląstelinio matrikso pagrindinio komponento – fibrilinio kolageno kiekybinius struktūros pokyčius esant skilvelio ischeminei disfunkcijai ir po miokardo infarkto.

TYRIMO OBJEKTAI IR METODAI

Staiga (per 6 valandas nuo „grynosios“ IŠL, t. y. kai nebuvo nustatyta kitų širdies pokyčius lemiančių veiksnių, išskyrus ischemiją, simptomų atsiradimo pradžios) ne ligoninėje mirusių 86 vyrų (amžiaus vidurkis $48,6 \pm 8,2$ m.) širdys tirtos morfologiškai, taikant makro- ir histomorfometriškai biologinių vaizdų analizės sistemą. Tiriamieji suskirstyti į 2 grupes: ischeminės disfunkcijos grupę, kai 51 širdies miokardo nebuvo, ir poinfarktinių grupę, kai 35 širdžių miokarde rasta poinfarktinių randų. Kontrolinę grupę sudarė 29 vyrų (amžiaus vidurkis $46 \pm 3,1$ m.), staiga mirusių nuo traumų ir nesirgusių širdies ligomis, širdys.

Pirmiausia įvertintas vainikinių arterijų spindžio aterosklerozinio susiaurėjimo laipsnis bei išplitimas ir apskaičiuotas bendras stenozės indeksas¹.

Horizontalūs širdies KS pjūviai buvo fiksuoti 10 proc. formalinu ir įlieti

¹ Dalia Pangonytė, Elena Stalioraitytė, Reda Žiuraitienė, „Vainikinių arterijų aterosklerozė ir širdies struktūrų remodeliavimosi ypatumai“, *Lithuan.J.Cardiol.*, 1999, Nr. 6, p. 484–487.

į parafiną. Jų 4 μm storio histotopogramos dažytos hematoksilinu ir eozinu, pikrino rūgšties prisotintu raudonojo sirijaus tirpalu ir modifikuotu azano metodu.

Kardiomiocitų dydis (skersmuo ir ilgis) matuotas išilginiuose kardiomiocitų pjūviuose, kai buvo matomi abiejuose kardiomiocito galuose įterptiniai diskai ir branduolys, apskaičiuotas kardiomiocitų skerspjūvio plotas ir tūris, laikant, kad kardiomiocitas yra cilindro formos. Visais atvejais atlikti 65 kardiomiocitų matavimai.

Toliau nuo pažeistosios srities miokardo intersticiumo kolageninių skaidulų tinklo procentinį tūrį, skaidulų perimetrą ir plotelių skaičių regėjimo lauke, kurio plotas – 35 578 μm^2 , vertinome raudonuuoju sirijumi dažytuose preparatuose, naudodami *Quantimet 520* (Jungtinė Karalystė) vaizdų analizės sistemą. Kiekvienu atveju įvertinta vidutiniškai 100 laukų (originalusis padidėjimas 700 kartų), nupjautų išilgai kardiomiocitų, praleidžiant kraujagysles, kurių skersmuo > 20 μm , ir substitucinės fibrozės židinius.

STATISTINĖ ANALIZĖ

Histomorfometriniams duomenims palyginti naudotas dispersinės analizės (ANOVA) dviejų faktorių metodas, įvertinant grupės ir kiekvieno tiriamojo morfometrinių duomenų dispersijas (lizdinės imties analizė), laikant skirtumus statistiškai reikšmingus, kai $p < 0,05$. Taikant regresinę analizę, įvertintas vainikinių arterijų stenozės poveikis kardiomiocitų hipertrofijai ir histomorfometrinių rodiklių koreliacija.

REZULTATAI

Ischeminės disfunkcijos grupės tiriamųjų kardiomiocitų skersmuo buvo 8,2 proc., ilgis – 12,5 proc., skerspjūvio plotas – 17,2 proc., tūris – 32 proc. didesnis negu kontrolinės grupės, t. y. jie buvo hipertrofavęsi. Įvertinę poinfarktinės grupės tiriamųjų kardiomiocitų duomenis, nustatėme, kad nei ilgis, nei skersmuo statistiškai reikšmingai nesiskyrė nuo ischeminės disfunkcijos grupės analogiškų duomenų, tačiau buvo statistiškai reikšmingai didesni už kontrolinės grupės.

Ischeminės disfunkcijos grupės miokardo intersticinio kolageno tinklo matmenys buvo statistiškai reikšmingai didesni negu kontrolinės grupės: KS kolageno tinklo procentinis tūris – 1,5 karto, skaidulų plotelių skai-

čius – 1,2 karto, skaidulų perimetro – 1,3 karto, $p < 0,01$. Regresinė analizė atskleidė kolageno tinklo procentinio tūrio priklausomybę nuo vainikinių arterijų spindžio stenozės indekso: gauta riboto augimo Pearl-Reed'o regresinė kreivė ($R = 0,77$, $p < 0,0001$).

Poinfarktinės grupės miokardo intersticinio kolageno tinklo matmenys atokioje nuo miokardo rando srityje buvo didesni nei kontrolinės grupės: procentinis tūris – 2,2 karto, skaidulų plotelių skaičius – 1,6 karto, skaidulų perimetras – 1,9 karto, $p < 0,001$, taip pat statistiškai reikšmingai didesni negu ischeminės disfunkcijos grupės (atitinkamai 40, 32 ir 39 proc.).

Kolageno tinklo ir kardiomiocitų tūrio santykis esant ischeminei disfunkcijai ir po miokardo infarkto didėjo KS miokarde (1,6 karto, $p < 0,01$). Tai rodo fibrilinio kolageno kaupimąsi, t. y. difuzinę intersticinę fibrozę.

APTARIMAS

Miokardo persitvarkymas – kardiomiocitų hipertrofija ir intersticinio fibrilinio kolageno tinklo vešėjimas vyksta lėtai, laipsniškai progresuojant kraujagyslių aterosklerozinei stenozei ir kartojantis ischemijai. Tai nutinka kiekvieną kartą, kai miokardo deguonies poreikis neatitinka jo vainikinės kraujotakos pajėgumo. Tuomet dėl deguonies trūkumo vyksta miokardo pokyčiai, dalis ląstelių pažeidžiamos, kai kurios jų – negrįžtamai. Pažeistieji kardiomiocitai nesusitraukia, taigi didesnis krūvis tenka nepažeistosios srities kardiomiocitams, kurie hipertrofuoja, kad širdis galėtų atlikti tą pačią funkciją. Hipertrofuodamiesi kardiomiocitai storėja, kai daugėja miofibrilių, kurios išsidėsto lygiagrečiai, o išilgai miofibrilių daugėjant sarkomerų – kardiomiocitai ilgėja.

Širdies perkrova dėl tūrio, kuri paprastai pasireiškia esant nesandariems vožtuvams, lemia širdies ertmių plėtimąsi, ekscentrinę hipertrofiją ir kardiomiocitų ilgėjimą. Miokardo perkrova dėl spaudimo sukelia koncentrinę skilvelio hipertrofiją, kardiomiocitai storėja. Po miokardo infarkto skilvelio sieną veikia tiek padidėjęs tūris, tiek spaudimas, taigi kardiomiocitai ir ilgėja, ir storėja². Mūsų tyrimo metu nustatyta, kad kardiomiocitų matmenys, veikiant chroninei ischemijai, yra didesni ten, kur yra mažiau stenozuotos vainikinės arterijos aprūpinama sritis, o progresuojant IŠL, po

² Sudhir Gupta, Arun J.C. Prahash, Inder S. Anand, „Myocyte contractile function is intact in the post-infarct remodeled rat heart despite molecular alterations“, *Cardiovasc Res*, 2000, t. 48(1), p. 77–88.

miokardo infarkto statistiškai reikšmingai didesnių kardiomiocitų matmenų toliau nuo pažeistosios srities nenustatyta. Miokardo įtampa per ląstelių (ir kardiomiocitų, ir fibroblastų) membranų receptorius skatina tam tikrų genų raišką, baltymų ir signalinių molekulių sintezę bei ląstelių mitozinį aktyvumą. Mūsų nustatyta kardiomiocitų hipertrofija yra nepakankamas argumentas, siekiant paaiškinti miokardo masės didėjimą. Antonio P. Beltrami su bendraautoriais teigia, kad išsekus kardiomiocitų hipertrofijos rezervams prasideda kardiomiocitų proliferacija, kurią jie nustatė tirdami tik ląstelės mitozės metu aptinkamą baltymą Ki67³. Ischemijos metu kardiomiocitai negali hipertrofuotis dėl deguonies stygiaus. Hipertrofavusis kardiomiocitams ir nepakitus miokardo kapiliarų tinklui, pasireiškia sąlyginė atskirų kardiomiocitų ischemija. Dėl padidėjusio skilvelio tūrio labiau įsitempus sienai, išauga miokardo deguonies poreikis, dar labiau trikdoma ir taip ischemiškų kardiomiocitų kontrakcija, tad gali prasidėti miokardo pokyčiai: kardiomiocitų ir endotelio ląstelių apoptozė⁴.

Dar neseniai miokardo tarpląstelinis matriksas laikytas santykinai inertiniu, atraminiu kardiomiocitų karkasu. Dabar esama duomenų, kad jis yra dinamiška, metaboliškai aktyvi, daugiafunkcinė sudėtinga struktūra, turinti nepriklausomą svarbų poveikį širdžiai ir normaliai funkcionuojant, ir progresuojant, kai vystosi nepakankamumas.

Tarpląstelinis matriksas sekretuojamas vietiškai ir išsiplečia į tinklą, kuris apsupa ir sujungia miokardo ląsteles (kardiomiocitus, fibroblastus, putliąsias ląsteles, kraujagyslių endotelį ir lygiuosius miocitus), taip pat sudaro terpę signalinėms molekulėms. Pagrindiniai jo komponentai yra fibriliniai baltymai (kolagenas ir elastinas), rišamieji (adheziniai) baltymai (glikoproteinai – lamininas, fibronektinas, IV tipo kolagenas), antiadheziniai baltymai, proteoglikanai, hialurono rūgštis ir kt.

Kolageno skaidulos ir rišamieji baltymai per visur esančius transmembraninius receptorius, vadinamuosius integrinus, jungiasi prie ląstelių membranų ir citoskeleto. Taip susiformuoja jungtis tarp ląstelės aplinkos ir vidinės terpės. Įvairių miokardo ląstelių gebėjimas sintetinti tarpląstelinio

³ Antonio P. Beltrami, Konrad Urbanek, Jan Kajstura, Shao Min Yan, Nicoletta Finato, Rossana Bussani et al., „Evidence that human cardiac myocytes divide after myocardial infarction“, *N Engl J Med*, 2001, t. 344, p. 1750–1757.

⁴ Kirk R. Hutchinson, James A. Stewart Jr., Pamela A. Lucchesi, „Extracellular matrix remodelling during the progression of volume overload-induced heart failure“, *J Mol Cell Cardiol*, 2010, t. 48, p. 564–569.

matrikso komponentus skiriasi; fibroblastai ir lygiųjų raumenų ląstelės sintetina ir išskiria I ir III tipų kolageną, fibronektiną, kardiomiocitai – IV ir VI tipų kolageną ir proteoglikanus. Lamininą išskiria lygiųjų raumenų, endotelio ląstelės ir kardiomiocitai.

Nustatyta intersticinė fibrozė yra nesubalansuotos kolageno skaidulų sintezės ir jų skaidymo matrikso metaloproteinazėmis bei jų audinių inhibitoriaus veiklos rezultatas. Eksperimentais nustatyta, kad esant ischeminei disfunkcijai ne tik infarkto, bet ir atokiojoje srityje jau pirmąją savaitę aktyviau sintetina matrikso metaloproteinazės, tačiau labiau suaktyvėja kolageno, ypač I ir III tipo, sintezė⁵. Susidariusi intersticinė fibrozė turi įtakos širdies funkcijai, ypač diastolinei (sutrinka raumens atsipalaidavimas).

Fibroblastai, kurių plazminėje membranoje yra receptorių, reaguojančių į mechaninius stimulus, padidėjus miokardo įtampai dėl pasikeitusių darbo sąlygų, ima sintetinti autokriniškai (t. y. juos pačius) veikiančius peptidus – β transformuojantį augimo veiksni, skatinantį šių ląstelių fenotipo pokyčius, virtimą miofibroblastais. Kolageno tinklo perprodukcija ir miokardo intersticinė fibrozė yra siejama su miofibroblastų proliferacija⁶. Šios ląstelės, kilusios iš miokardo intersticiume esančių fibroblastų, turi daugiau savo paviršiuje angiotenzino receptorių, aktyviau sintetina kolageną ir mažiau išskiria matrikso metaloproteinazių. Miofibroblastų citoplazmoje randamas aktinas, manoma, gali dalyvauti šioms ląstelėms migruojant intersticiume bei rando kontrakcijoje. Žmogaus miokardo rando srityje šios ląstelės aptinkamos ir praėjus daugiau nei metams po infarkto⁷.

(Mio)fibroblastų sąrangos trimatėje erdvėje tyrimai atskleidė, kad šios ląstelės turi bendrų jungčių, labai panašių į plyšines kardiomiocitų jungtis. Galimas dalykas, fibroblastocitai plyšinėmis jungtimis yra susieti ir su kardiomiocitais, o jų gebėjimas kultūroje sutraukti kolageno gelį rodo

⁵ Jamshid Shirani, Vasken Dilsizian, „Molecular imaging in heart failure“, *Current Opinion in Biotechnology*, 2007, t. 18, p. 65–72.

⁶ Susanne W.M. Van den Borne, Satoshi Isobe, Johan W. Verjans, Artiomi Petrov, Dagfinn Lovhaug, Peng Li et al., „Molecular imaging of interstitial alterations in remodeling myocardium after myocardial infarction“, *JACC*, 2008, t. 52 (24), p. 2017–2028.

⁷ Karl T. Weber, Yao Sun, Javier Diez, Fibrosis, „A living tissue and the infarcted heart“, *JACC*, 2008, t. 52(24), p. 2029–2031.

šių ląstelių kontraktilumą⁸. Karlo T. Weberio ir bendraautorių nuomone, miofibroblastų veiklos rezultatas – intersticinė fibrozė gali turėti neigiamos įtakos netgi miokardo elektriniam stabilumui ir diastolinei KS funkcijai⁹.

Apibendrinant galima teigti, kad sergant IŠL, jau prieš įvykstant pirmajam miokardo infarktui, miokardo struktūros nuolat persitvarko. Nustatyta kardiomiocitų hipertrofija ir intersticinė fibrozė – intersticiumo kolageno skaidulų tinklo gausėjimas. Šių procesų intensyvumas tiesiogiai susijęs su vainikinių arterijų stenozuojamosios aterosklerozės laipsniu ir išplitimu. Po miokardo infarkto minėti procesai vyksta toliau. Iš pradžių reaktyviniai KS struktūriniai pokyčiai, esant ischemijai (miokardo infarktui), yra širdies prisitaikymo prie naujų širdies veiklos sąlygų elementai, kurie dėl nepalankių veiksnių (progresuojant vainikinių arterijų stenozuojamajai aterosklerozei) sudaro ischeminio širdies nepakankamumo pamatą.

LEFT VENTRICULAR RESPONSE TO MYOCARDIAL ISCHEMIA: STRUCTURAL CHANGES

Jolita Palubinskienė, Elena Stalioraitytė, Dalia Pangonytė,
Reda Žiuraitienė, Danutė Kazlauskaitė

Summary

The aim of the study was to detect changes in human left ventricular cardiac myocyte parameters as well as in the interstitial fibrillar collagen network in response to chronic ischemia and to the loss of myocardium due to myocardial infarction, distant from an acute injury or healed infarct site, before the emerging of symptoms of heart failure.

Object and methods. Heart specimens of 86 males (aged 48.6±8.2 yrs) who died suddenly out-of-hospital (within 6 hours of the onset of terminal event) due to IHD were investigated. Cases were divided into two groups: ischemic dysfunction group – 51 decedents with the first fatal acute attack and post-infarction

⁸ Edie C. Goldsmith, Adam Hoffman, Mary O. Morales, Jay D. Potts, Robert L. Price, Alex McFadden et al, „Organization of fibroblasts in the heart“, *Developmental Dynamics*, 2004, t. 230, p. 787–794.

⁹ Žr. Karl T. Weber, Yao Sun, Javier Diez, *op. cit.*

group – 35 decedents, who had a post-infarction scar detected at autopsy and no clinical and morphological signs of other heart disease or failure. Control group consisted of 29 males (aged 46.0 ± 3.1 yrs), who succumbed to external causes. A histomorphometrical investigation of left ventricular myocardium evaluating the cardiac myocyte dimensions and parameters of fibrillar collagen network as well as an evaluation of the coronary artery stenosis index were performed.

Results. Cardiac myocyte hypertrophy was also detected in the ischemic dysfunction group: cardiac myocyte volume was increased by 32.0 percent, as compared with the control group's same index, length and cross-sectional area by 12.5 percent and 17.2 percent, respectively. The cardiac myocyte parameters of the post-infarction group were insignificantly greater than of the ischemic dysfunction group. Interstitial collagen parameters in both the ischemic dysfunction group and the post-infarction group were greater than in the controls: percentage volume by 1.5 and 2.2 times, number of separate foci of fiber per field by 1.2 and 1.6 times and perimeter – by 1.3 and 1.9 times, respectively, $p < 0.05$. Changes in the cardiac myocyte size as well as of the fibrillar collagen network parameters in the ischemic dysfunction group correlated with the coronary artery stenosis index.

Conclusions. Left ventricular cardiac myocyte hypertrophy and interstitial fibrosis occur before the first myocardial infarction and depend upon the degree of coronary arteries' stenosis index. In post-infarction myocardium remote area cardiac myocytes' size does not increase significantly, but the interstitial fibrosis progresses.