

РЕМОДЕЛИРОВАНИЕ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫСЫ ПОСЛЕ НЕОНАТАЛЬНОГО КРИПТОСПОРИДИОЗА. II. ДЕФОРМАЦИЯ, ИЗБЫТОЧНАЯ ПОЛИПЛОИДИЯ И ГИПЕРЭКСПРЕССИЯ *HIF-1α*

© О. В. Анацкая,¹ Н. В. Сидоренко, И. В. Матвеев,
А. В. Кропотов, А. Е. Виноградов

ФГБУН Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;

¹ электронный адрес: anatskaya@mail.cytspb.rssi.ru

Эпидемиологические исследования свидетельствуют о том, что заболевания детского возраста повышают вероятность возникновения в отдаленном будущем патологий сердечно-сосудистой системы. Основываясь на данных о том, что самой частой причиной недомоганий у детей являются инфекционные гастроэнтериты, мы исследовали влияние криптоспоридиоза на ремоделирование кардиомиоцитов и сердца в 18 возрастных группах крыс 1-го мес жизни. Заболевание, индуцированное широко распространенным протозойным энтеропатогеном человека и животных *Cryptosporidium parvum*, проявлялось в замедлении роста и умеренной диарее. Методами полимеразной цепной реакции в реальном времени, цитофотометрии и анализа изображений мы установили, что криптоспоридиоз ассоциирован с атрофией сердца, а также со снижением количества общего белка в кардиомиоцитах и их истончением, избыточной полиплоидизацией и гиперэкспрессией индуцируемого гипоксией фактора (*HIF-1α*). Ремоделирование кардиомиоцитов и атрофия сердца проявлялись во всех 18 возрастных группах. Однако различалась интенсивность этих изменений, которая уменьшалась от младших групп к старшим. Избыточная полиплоидизация и гиперэкспрессия *HIF-1α* были зарегистрированы преимущественно у животных 6—13-суточного возраста, в то время как у более старших животных они проявлялись слабо и были статистически недостоверными. Период развития крысы с 6-х по 13-е сут совпадает с усиленной полиплоидизацией кардиомиоцитов и с их переключением с пролиферативного роста на гипертрофический. Таким образом, наши данные показали, что криптоспоридиозный гастроэнтерит может быть потенциальным фактором риска сердечно-сосудистых заболеваний и что период полиплоидизации кардиомиоцитов является одним из критических периодов в постнатальном развитии сердца.

Ключевые слова: неонатальные кардиомиоциты, полиплоидия, атрофия, удлинение, криптоспоридиозный гастроэнтерит, критический период в развитии сердца, *HIF-1α*.

Данные ретроспективных эпидемиологических исследований свидетельствуют о том, что многие неинфекционные заболевания взрослых людей происходят из-за замедления роста, недостаточного питания и воспалительных процессов в детстве. Эту взаимосвязь впервые описал в 1989 г. профессор Портландского университета (США) Дэвид Баркер с сотрудниками, назвав ее «онтогенетическим программированием» (Barker et al., 1989). Сейчас онтогенетическое программирование привлекает большое внимание исследователей: создано несколько институтов и крупных центров, занимающихся только этой проблемой (www.mrc.soton.ac.uk, www.geneimprint.com, www.nida.nih.gov, www.nationalchildrensstudy.gov). В результате их работы стало известно, что ишемическая болезнь сердца, гипертония и инфаркт миокарда в значительной степени являются следствием недомоганий, перенесенных в детстве (Gluckman, Hanson, 2004; Crimmins, Finch, 2006; Nuyt, Szyf, 2007; Finch, 2010). В то же время, несмотря на многочисленные статистические данные, механизмы и причины взаимосвязи между недомоганиями детского возраста и нарушением работы сердца у взрослых людей до конца неясны.

Основываясь на данных медицинской статистики о том, что наиболее частой причиной заболеваний у младенцев, детей и подростков являются инфекционные заболевания кишечника, которые вызывают воспаление, мальабсорбцию, тахикардию и отток ресурсов от формирующегося сердца (Finch, Crimmins, 2004; Curione et al., 2010; Alter et al., 2011; Rodríguez et al., 2011), мы разработали модель криптоспоридиозного гастроэнтерита у неонатальных крыс, вызванного энтеропатогеном протозойной природы *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa, Sporozoa).

Криптоспоридиозный гастроэнтерит — широко распространенное заболевание человека и животных, представляющее особую опасность для детей, у которых оно приводит к длительной (до нескольких месяцев) диарее и резкому замедлению роста (Бейер и др., 2002, 2006; Chalmers, Davies, 2010). В странах с жарким климатом (таких, например, как Замбия, Индия и Бразилия) криптоспоридиоз ассоциирован с повышением смертности пациентов всех возрастов (Meireles, 2010; Kelly, 2011), а в развитых странах, таких как Англия, Германия и США, зарегистрированы ежегодные летние вспышки эпидемий криптоспоридиоза (Chako et al., 2010).

Заражение ооцистами криптоспоридий происходит, как правило, через загрязненную воду, пищу или при контакте с домашними животными (Fayer, 2004; Neira-Munoz et al., 2007; Fayer et al., 2010). Эндогенное развитие паразита протекает в клетках эпителиальной выстилки нижних отделов тонкого кишечника (Fayer, 2004; Fayer et al., 2010). Поселяясь в экстрацитоплазматической зоне энтероцитов, криптоспоридии нарушают всасывание питательных веществ ворсинками этих клеток, вызывают воспаление и диарею секреторно-осмотического типа (Chalmer, Davis, 2010).

Используя модель криптоспоридиоза, мы изучили влияние данного заболевания на следующие параметры сердца неонатальных крыс: относительная масса сердца (отношение массы сердца к массе тела), соотношение длины и ширины кардиомиоцитов, содержание в них общего белка, уровень плоидности, а также уровень экспрессии индуцируемого гипоксией фактора (*HIF-1α*).

Известно, что относительная масса сердца прямо пропорциональна объему сердечного выброса и интенсивности базального метаболизма и обратно пропорциональна частоте пульса (Bishop, Butler, 1995; Bishop, 1999, 2005). Кроме того, этот параметр является основным фактором, лимитирующим функциональную способность сердца (см. обзор: Bishop, 1999).

Соотношение длины и ширины кардиомиоцитов, как и содержание общего белка, характеризуют силу сокращения желудочка сердца. Длина клеток пропорциональна объему желудочка, а ширина — толщине стенок желудочка (Li et al., 2004; Chen et al., 2010). Содержание общего белка отражает количество сократительных белков в кардиомиоцитах (Schlüter et al., 1995).

Избыточная полиплоидизация кардиомиоцитов является одним из хорошо установленных маркеров ответа на стресс (Rumyantsev, 1977). Проявляя признаки биологической пластичности, полиплоидия изменяется в ответ на изменение скорости и условий роста, филогенетические особенности, физиологическую и патологическую перегрузку, гормональный и метаболический дисбаланс и разного рода инфекции (Rumyantsev, 1977; Мартынова и др., 1983, 2002; Brodsky et al., 1985, 1991; Rumyantsev et al., 1990; Kellerman et al., 1992; Anatskaya, Vinogradov, 2002, 2004a, 2004b; Анацкая, Виноградов, 2004; Anatskaya et al., 2007, 2010; Walsh et al., 2010). Наши недавние сравнительные исследования транскриптомов показали, что полиплоидизация может принимать участие в регуляции основных жизненных процессов клетки, включая энергетический обмен, дифференцировку, репарацию, транскрипцию, поддержание цитоскелета и даже внеклеточного матрикса (Anatskaya, Vinogradov, 2007, 2010; Анацкая, Виноградов, 2010).

Транскрипционный фактор *HIF-1α* регулирует широкий спектр внутриклеточных и системных ответов на гипоксию и другие факторы стресса, включая воздействие свободных радикалов, факторов роста, метаболитов, ионов, цитокинов и даже механического растяжения (Görlach, 2009; Semenza, 2011, 2012). В связи с этим уровень *HIF-1α* считают важным индикатором патологических изменений (Görlach, 2009).

Целью нашей работы было исследовать механизмы взаимосвязи между гастроэнтеритом и возникновением патологий сердечно-сосудистой системы. Для этого мы изучили влияние криптоспоридиозного гастроэнтерита на ремоделирование сердца и кардиомиоцитов крыс 1-го мес жизни, сопоставив относительную массу сердца,

отношение длины и ширины кардиомиоцитов, содержание в них общего белка, уровни плоидности и экспрессию *HIF-1α* у переболевших и контрольных животных.

Материал и методика

Животные. Ооцисты криптоспоридий получали от 7—14-суточных телят из животноводческих ферм Ленинградской обл. Мазки, приготовленные из проб содержимого кишечника телят, окрашивали карболовым фуксином по Циллю—Нильсону. Пробы брали от наиболее зараженных животных, содержащих 25—40 ооцист и более в одном поле зрения микроскопа при увеличении 600×.

Выделение чистой культуры ооцист проводили с помощью прерывистого градиента плотности перколла (Waldman et al., 1986). Сначала суспензию ооцист из содержимого кишечника в PBS (1 : 9) центрифугировали при 500 g в течение 15 мин; затем супернатант сливали, добавляли 15 мл PBS и 3 мл этоксиэтана и, тщательно встряхнув, осаждали центрифугированием при 500 g в течение 5 мин. Неочищенные ооцисты осторожно собирали со дна пробирки. Для получения необходимого количества ооцист процедуру повторяли многократно (до 15 раз).

Затем ооцисты тщательно очищали от детрита и микроорганизмов с помощью центрифугирования в прерывистом градиенте перколла с плотностью 1.04—1.08 г/мл. На верхний слой перколла с плотностью 1.04 г/мл помещали осадок ооцист, полученный на первом этапе очистки (нижний слой перколла с плотностью 1.08 г/мл). Полученную смесь центрифугировали при 250 g в течение 10 мин. После центрифугирования осевшие на дно ооцисты аккуратно собирали пипеткой. С помощью камеры Горяева подсчитывали концентрацию ооцист. Для заражения использовали образцы, которые содержали 10⁶ или более живых ооцист криптоспоридий в 1 мл взвеси. Полученные ооцисты хранили в бихромате калия (K₂Cr₂O₇). Перед заражением смесь трижды отмывали PBS с последующим центрифугированием при 500 g в течение 15 мин.

Самки крыс линии Wistar были взяты из вивария нашего института. Каждую самку с крысятами (6—10 детенышей) содержали в отдельной клетке. Для заражения использовали крысят 1—22-суточного возраста. Вскрытие проводили через 4 сут (т. е. на 5-е сут) после заражения, т. е. в возрасте 5—26 сут. От каждой из 18 возрастных групп было исследовано по 5—6 опытных и 3 контрольные особи. Каждое животное получало перорально раствор, содержащий примерно 2 · 10⁵ ооцист *C. parvum* в PBS. Контрольные животные получали такой же объем PBS без паразитов. Зараженные и интактные животные находились в разных клетках, для того чтобы предотвратить заражение последних.

Оценка интенсивности заражения. Для определения степени паразитической нагрузки мазки содержимого кишечника анализировали с помощью микроскопа после окраски 1%-ным генциан-фиолетовым в водном растворе в течение 15 с и дофискации метанолом (Сидоренко и др., 2004). Животных, мазки которых содержали 11—20 эндогенных стадий в одном поле зрения микроскопа (об. 40×, ок. 15×), отбирали для эксперимента. Эти животные были отнесены к среднезараженным. Животные с такой степенью заражения были выбраны

Таблица 1

Последовательности использованных праймеров

Название гена	Последовательность	Температура плавления, °C
β-актин	Прямая: 5'-CCACACCCGCCACCAAGTTCG-3'	64
	Обратная: 5'-ACATGCCGGAGCCGTTGTCTCG-3'	64
Глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа (GPDH)	Прямая: 5'-GGGGGCTCTCTGCTCCTCCC-3'	66
	Обратная: 5'-CAGGCGTCCGATACGGCCAA-3'	63
Индукцируемый гипоксией фактор (<i>HIF-1α</i>)	Прямая: 5'-CCCATCCATGTGACCATGAGG-3'	64
	Обратная: 5'-TCAGCACCAAGCACGTCATAGG-3'	64

потому, что криптоспориоз именно средней тяжести преобладает у детей (Zu et al., 1994).

Оценка функционального потенциала сердца. Для того чтобы понять, как меняется функциональный потенциал сердца, мы измерили долю отношения массы тела к массе сердца — индекс сердца. Хотя этот метод не позволяет оценить все необходимые функциональные характеристики (включая артериальное давление), он приобретает все большее распространение. Недавние исследования показали, что индекс сердца прямо пропорционален объему сердечного выброса и интенсивности метаболизма и обратно пропорционален частоте пульса (Bishop, Butler, 1995). Показано также, что относительная масса сердца является основным фактором, ограничивающим функциональную способность органа (Bishop, 1999).

Получение и исследование изолированных кардиомиоцитов. Изолированные кардиомиоциты получали из апикальной части левого желудочка методом щелочной диссоциации (Anatskaya, Vinogradov, 2004a, 2004b). Для этой цели кусочки, взятые из апикальной части левого желудочка, массой 25—30 мг фиксировали 10%-ным формальдегидом в течение 12 ч, промывали под проточной водой в течение 24 ч и помещали на 25 мин в 50%-ный КОН при 56 °C. После щелочной диссоциации кусочки ткани аккуратно промывали в 3 сменах дистиллированной воды и пипетировали в 10 мл дистиллированной воды до тех пор, пока не получали однородную суспензию. Концентрацию клеток и степень их повреждения оценивали с помощью фазово-контрастного микроскопа. Затем 5 капель суспензии помещали на предметное стекло, сушили на воздухе и фиксировали абсолютным метанолом. От каждого животного было проанализировано не менее 500 кардиомиоцитов.

Плоидность клеток оценивали после окрашивания Hoechst 33258 в концентрации 20 мкг/мл в течение 15 мин. Количественный анализ изображений, полученных с помощью микроскопа Zeiss Axioskop, снабженного видеокамерой VarioCam (PCO Computer Optics GMBH), проводили с использованием программы VideoTest. Изменение формы кардиомиоцитов (т. е. отношение их длины к ширине) также оценивали с помощью программы VideoTest.

Средний уровень плоидности кардиомиоцитов рассчитывали по формуле

$$PLD = \sum i \cdot n_i$$

где PLD — среднее число геномов на клетку, n_i — число кардиомиоцитов i -того класса плоидности.

Эталоном диплоидного содержания ДНК служили спленоциты того же животного. Так как у 2-недельных крыс пропорция кардиомиоцитов в S-фазе составляет 1.5—2 % (Rumyantsev, 1977), мы исключали ядра с количеством ДНК, отличающимся от кратного эталонному более чем на 10 %, рассматривая их как находящиеся в S-фазе.

Для определения содержания белка в кардиомиоцитах мазки изолированных клеток окрашивали 0.1%-ным раствором нафтолового желтого в 1%-ной уксусной кислоте в течение 30 мин и промывали в трех сменах 1%-ной уксусной кислоты и в трех сменах 100%-ного изобутанола в течение 3 с при комнатной температуре (Anatskaya et al., 2010). Содержание белка оценивали на изображениях кардиомиоцитов, полученных с помощью светового микроскопа Axio Scope (Carl Zeiss, Germany) и программы ImageJ 1.40g (National Institute of Health, Maryland, США). Для каждого животного оценивали не менее 200 клеток. Каждую клетку обрабатывали 3 раза по параметру «Mean Grey Value». Данные представлены в виде средних значений и их стандартной ошибки.

Тотальную РНК выделяли из замороженных фрагментов апикальной части левого желудочка сердца массой 10—15 мг с помощью реагента Trizol (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией фирмы-изготовителя или протокола с использованием гуанидинтиоцианата (Chomczynski, Sacchi, 1987) с модификацией (Матвеев, 2005; Matveev et al., 2007). Качество выделенной РНК оценивали при помощи электрофореза в 1.5%-ном агарозном геле, содержащем 5 мкг/мл бромистого этидия в ТАЕ-буфере (Sambrook et al., 1989). Чистоту и сохранность РНК оценивали по четкости полос 18 и 28S рибосомальных РНК, наблюдаемых в ультрафиолетовом свете. Количество выделенной РНК оценивали спектрофотометрически по поглощению ультрафиолетового света с длиной волны 260 нм (Sambrook et al., 1989). ДНК удаляли из препарата РНК, обрабатывая препарат ДНКазой, свободной от РНКазы. Каждая реакционная смесь объемом 40 мкл содержала около 10 мкг РНК и 1 Ед. ДНКазы (DNase RNase-free; Roche-Boehringer-Mannheim, Франция). Реакцию проводили при комнатной температуре в течение 30 мин. Реакционную смесь депротеинизировали фенол-хлороформом, РНК осаждали этанолом (Sambrook et al., 1989). Для получения кДНК проводили обратную транскрипцию РНК с помощью набора реактивов для синтеза первой цепи кДНК Revert Aid™ (Fermentas, Литва). Качество синтезированной кДНК проверяли методом ПЦР. Образцы хранили при –20 °C.

Анализ экспрессии *HIF-1α* с помощью ПЦР в реальном времени. Праймеры конструировали с помощью программ Primer3 и Primer designing

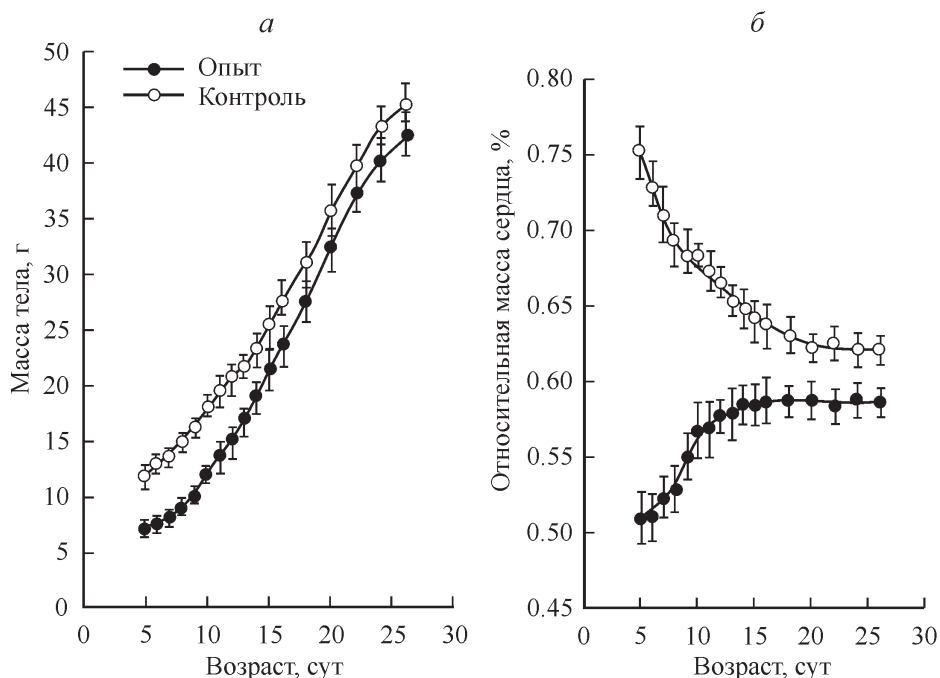


Рис. 1. Снижение массы тела и индекса сердца крыс разного возраста на 5-е сут после заражения *Cryptosporidium parvum*. а — снижение массы тела крыс, б — снижение относительной массы сердца крыс, в % от массы тела. Светлые символы — контроль, темные — опыт. Представлены значения $\bar{X} \pm S_x$ для 3—6 животных.

(NCBI; <http://primer3.sourceforge.net/releases.php>). Синтез праймеров заказывали в фирме Синтол (последовательности праймеров указаны в табл. 1). Количественную оценку транскрипции мРНК проводили на системе ABI PRISM 7700 Sequence Detection System (Applied Biosystems, Foster City, США) после проверки эффективности ПЦР. Эффективность оценивали с помощью построения калибровочных кривых для генов *HIF-1α*, β-актина и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (Bustin et al., 2005). Для этой цели делали серию разведений мРНК, проводили обратную транскрипцию, а затем ПЦР в реальном времени (Bustin et al., 2005; Huggett et al., 2005). Полученные калибровочные кривые оказались практически параллельными для всех генов, что подтверждает примерно одинаковую эффективность ПЦР и позволяет применить метод ΔCt (Schmittgen, Livak, 2008) для оценки различий в экспрессии.

Реакционная смесь (25 мкл) содержала 0.5 мкл прямого праймера, 0.5 мкл обратного праймера, 1 мкл к-ДНК-матрицы и 10 мкл 10-кратного красителя Power SYBR green (Applied Biosystems, США). Каждую реакцию проводили 3 раза в следующих условиях: 5 мин при 95 °C (для активации ДНК-полимеразы), затем 50 циклов при 95 °C в течение 15 с, при 60 °C в течение 15 с и 72 °C в течение 50 с. Уровень экспрессии гена *HIF-1α* (NCBI Gene ID 29560) нормализовали по уровню экспрессии генов домашнего хозяйства — β-актина (*Aktβ*, NCBI Gene ID 81822) и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (*GABDH*, NCBI Gene ID 24383) с помощью метода ΔΔCt (Schmittgen, Livak, 2008).

Результаты

Криптоспоридиоз приводит к замедлению роста и снижению индекса сердца. На 5-е сут после заражения криптоспоридиозом крысята де-

монстрировали небольшое замедление роста (рис. 1, а) и значительную атрофию сердца (рис. 1, б). Наиболее сильное влияние заболевания проявлялось в младших группах с еще не установившейся иммунной системой. Достоверные различия в массе тела между экспериментальными и контрольными животными одного возраста были зарегистрированы только для 10 младших групп (Mann—Whitney, $P < 0.03$). В то же время различия в индексе сердца оказались высоко достоверными для животных всех возрастов. При этом от младшей группы к старшей разница в индексе сердца между опытом и контролем уменьшилась от 49 (Mann—Whitney, $P < 0.001$) до 6 ($P < 0.01$) %.

Криптоспоридиоз связан с избыточной полиплоидизацией кардиомиоцитов. В разных возрастных группах влияние криптоспоридиоза на ploidy кардиомиоцитов проявлялось по-разному. У животных пяти младших групп, зараженных в возрасте 1—5 сут и взятых в опыт в возрасте 5—9 сут, была отмечена более слабая полиплоидизация, чем у контрольных крысят. Также было зарегистрировано заметное количество клеток с пикнотичными или фрагментированными ядрами (от 3 до 6 %), что свидетельствовало о гибели кардиомиоцитов путем апоптоза или некроза.

В кардиомиоцитах животных следующих четырех возрастных групп (т. е. 10—13-суточного возраста) в ответ на криптоспоридиоз, напротив, происходила избыточная полиплоидизация (табл. 2; рис. 2). У этих животных средняя ploidy клеток составляла около 5.5 генома на клетку, в то время как в контроле эта величина не превышала 3.5 генома. Такое интенсивное накопление происходило в основном из-за появления октаплоидных клеток с одним октаплоидным, двумя тетраплоидными или четырьмя диплоидными ядрами (табл. 2; рис. 2). Суммарная доля октаплоидных клеток у многих животных превышала 20 % (табл. 2). Мы также обнаружили небольшое количество (около 1 %) клеток с 16 геномами

Таблица 2

Процентное соотношение кардиомиоцитов разных классов плоидности у зараженных и контрольных животных (среднее $\pm$ ошибки среднего)

Возраст при заражении, сут	Возраст при эксперименте, сут	N	Классы плоидности кардиомиоцитов			
			2c	(2c×2)+4c	(2c×4)+(4c×2)+8c	(8c×2)+16c ^a
Контрольные животные						
1	5	4	64.9 ± 0.8	35.1 ± 1.9	—	—
2	6	4	58.5 ± 0.9	41.5 ± 1.1	—	—
3	7	4	54.5 ± 1.3	45.5 ± 2.2	—	—
4	8	4	53.3 ± 1.0	46.7 ± 3.2	—	—
5	9	4	35.7 ± 1.2	64.3 ± 2.8	—	—
6	10	4	32.3 ± 1.1	67.5 ± 1.8	0.2 ± 0	—
7	11	3	25.7 ± 0.9	73.8 ± 3.2	0.5 ± 0	—
8	12	4	23.4 ± 0.9	75.4 ± 2.9	1.2 ± 0.2	—
9	13	3	21.8 ± 1.1	75.8 ± 2.7	2.4 ± 0.4	—
10	14	4	19.4 ± 1.0	77.0 ± 1.6	3.6 ± 0.3	—
11	15	4	19.1 ± 1.2	77.3 ± 1.9	3.6 ± 0.4	—
12	16	4	18.3 ± 0.7	77.8 ± 3.0	3.9 ± 0.5	—
14	18	3	17.1 ± 0.9	78.8 ± 1.7	4.1 ± 0.4	—
16	20	3	16.7 ± 1.4	79 ± 1.8	4.3 ± 0.7	—
18	22	3	14.5 ± 1.3	81.1 ± 2.3	4.0 ± 0.6	—
20	24	3	15.4 ± 1.7	80.4 ± 2.1	4.2 ± 0.3	—
22	26	3	14.7 ± 1.5	81.2 ± 1.9	4.1 ± 0.2	—
Зараженные животные						
1	5	5	89.7 ± 3.8	11.3 ± 1.4	—	—
2	6	5	81.7 ± 4.3	18.3 ± 1.8	—	—
3	7	5	73.3 ± 4.6	26.7 ± 1.7	—	—
4	8	6	66.7 ± 2.3	33.3 ± 1.5	—	—
5	9	6	54.3 ± 2.1	45.7 ± 2.6	—	—
6	10	5	10.7 ± 0.9	67.6 ± 1.9	21.4 ± 1.4	0.30 ± 0.01
7	11	6	5.4 ± 0.4	64.2 ± 2.3	29.5 ± 1.1	0.90 ± 0.04
8	12	5	7.2 ± 0.2	64.8 ± 2.8	27.4 ± 1.0	0.60 ± 0.02
9	13	6	10.5 ± 1.1	64.9 ± 2.1	24.1 ± 1.2	0.50 ± 0.01
10	14	6	11.2 ± 1.2	69.3 ± 2.3	19.5 ± 1.2	—
11	15	5	12.3 ± 1.4	69.7 ± 3.2	18.0 ± 0.5	—
12	16	6	15.2 ± 0.9	71.4 ± 2.4	13.4 ± 0.9	—
14	18	6	15.7 ± 1.3	73.0 ± 3.7	11.3 ± 1.3	—
16	20	5	15.8 ± 1.4	74.4 ± 4.3	9.8 ± 1.1	—
18	22	6	16.5 ± 1.5	77.9 ± 3.1	5.6 ± 0.5	—
20	24	5	15.3 ± 1.8	79.8 ± 3.9	3.9 ± 0.6	—
22	26	5	14.1 ± 1.6	81.4 ± 1.9	4.5 ± 0.5	—

Примечание. N — число исследованных животных. ^a Высокополиплоидные клетки зараженных животных, отсутствующие в контроле (2c $\times$ 4)+(4c $\times$ 2)+8 и (8c $\times$ 2)+16c.

(рис. 2, 3). У контрольных животных из соответствующих возрастных групп доля клеток с тетраплоидными ядрами не превышала 2 %, а клеток с 8 и 16 геномами найдено не было.

У животных, взятых в опыт на 14-е сут после рождения, наблюдалось значительное ослабление влияния криптоспоридиа на плоидность клеток (рис. 2). С увеличением возраста эта тенденция усиливалась, так что у крысят из самых старших возрастных групп, взятых в опыт на 22—26-е сут, плоидность кардиомиоцитов была такой же, как в контроле, и составила около 3.8 генома на клетку (рис. 2).

Эти данные показывают, что криптоспоридиа оказывает наиболее сильное влияние на плоидность кардиомиоцитов у животных 10—13-суточного возраста, которые были заражены ооцистами криптоспоридий на 6—9-е сут после рождения соответственно. В более старших возрастных группах влияние заболевания на плоидность клеток резко ослабевает, пропавая вовсе к 18 сут.

Криптоспоридиа ассоциирован с усилением экспрессии *HIF-1 α* на уровне мРНК. Для того чтобы выяснить, сопровождается ли криптоспоридиа усилением активности основного регулятора клеточного ответа на гипоксический стресс — *HIF-1 α* , мы оце-

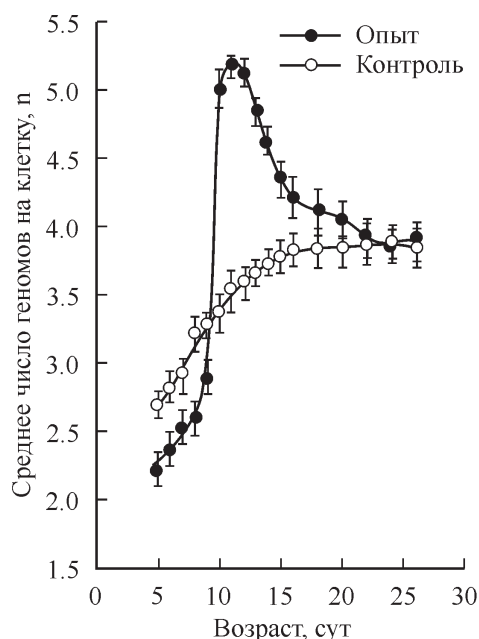


Рис. 2. Увеличение средней плоидности кардиомиоцитов крыс разного возраста на 5-е сут после заражения криптоспоридиозом.

Видны особенно сильное повышение плоидности у 10-, 11-, 12- и 13-суточных животных (т. е. зараженных на 6, 7, 8 и 9-е сут после рождения) и резкое ослабление ответа у животных, взятых в опыт на 14-е сут после рождения (т. е. зараженных в 10-суточном возрасте). Светлые символы — контроль, темные — опыт. Представлены значения $\bar{X} \pm S_x$ для 3—6 животных.

нили экспрессию этого транскрипционного фактора на уровне мРНК у 10-, 13- и 18-суточных животных.

Результаты, полученные методом ПЦР в реальном времени с использованием двух внутренних контролей (β -актина и глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы), показали, что криптоспоридиоз ассоциирован с умеренным повышением экспрессии *HIF-1 α* во всех возрастных группах и что влияние заболевания снижается с увеличением возраста животных (рис. 5, а, б). Самые существенные изменения — на 31—58 % — были обнаружены у 10- и 13-суточных крыс (Mann—Whitney, $P < 0.01$ по сравнению с обоими контролями) (рис. 5, а—в), в то время как у самых старших животных 18-суточного возраста повышение уровня мРНК составило всего 7—9 % (Mann—Whitney, $P < 0.05$ по сравнению с обоими внутренними контролями). Интересно отметить, что изменения плоидности кардиомиоцитов, вызванные криптоспоридиозом, также значительно сильнее выражены в младших возрастных группах по сравнению со старшими (рис. 2; 4, в).

Криптоспоридиоз вызывает ремоделирование формы и атрофию кардиомиоцитов. Морфометрический анализ показал, что криптоспоридиоз ассоциирован с удлинением и сужением кардиомиоцитов, а также со снижением в них количества белка (рис. 4—6). Влияние криптоспоридиоза на изменение формы кардиомиоцитов становилось менее выраженным с увеличением возраста животных. При этом уменьшение интенсивности изменений происходило постепенно. Соотношение длины и ширины кардиомиоцитов у крысят из самой младшей группы почти вдвое превышало контрольное значение (8.81 ± 0.11 в эксперименте и

4.57 ± 0.08 в контроле; Mann—Whitney, $P < 0.005$), а содержание общего белка снизилось более чем на 40 % (рис. 4—6). В то же время у животных из самой старшей группы отношение длины и ширины клеток было примерно на 25 % больше, чем в контроле (7.1 ± 0.13 в эксперименте и 5.4 ± 0.04 в контроле; Mann—Whitney, $P < 0.01$), а содержание общего белка снизилось всего на 12 % (Mann—Whitney, $P < 0.01$) (рис. 4—6).

Снижение количества белка в кардиомиоцитах привело к увеличению соотношения ДНК : белок в клетке. Гиперполиплоидия значительно усилила этот эффект. Наиболее сильные изменения произошли у животных из пяти младших групп. У этих животных количество белка в расчете на геном уменьшилось более чем в 2 раза (рис. 3). Разница в количестве белка, приходящегося на геном, у крысят из младшей и старшей групп варьировала от 280 до 18 % (Mann—Whitney, $P < 0.0001$ для пяти младших групп, $P < 0.001$ для остальных групп).

Обсуждение

Исследование взаимосвязи гастроэнтерита и патологических изменений в сердце может способствовать выяснению новых факторов патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний. До настоящего времени этому вопросу практически не было уделено внимания. Более того, данные медицинской статистики, подтверждающие существование взаимосвязи между патологией желудочно-кишечной и сердечно-сосудистой систем (Segall, 2008), вызывали лишь скептические комментарии (Al-Delaimy, 2008; Elwood, 2008). Физиологи отказывались восприни-

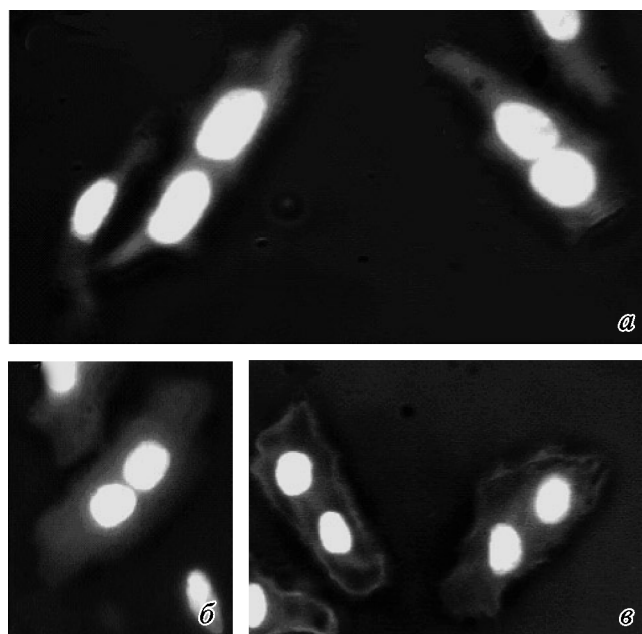


Рис. 3. Избыточная полиплоидизация кардиомиоцитов после неонатального криптоспоридиоза у животного, зараженного на 8-е сут и взятого в опыт на 12-е сут после рождения.

а — клетки зараженного животного; видны кардиомиоциты с двумя октаплоидными ядрами. б, в — кардиомиоциты контрольного животного такого же возраста; клетки с диплоидными ядрами. Окраска ядер — Hoechst 33258, подсветка — проходящий свет и люминесценция, фазовый контраст. Увел. 400 $\times$.

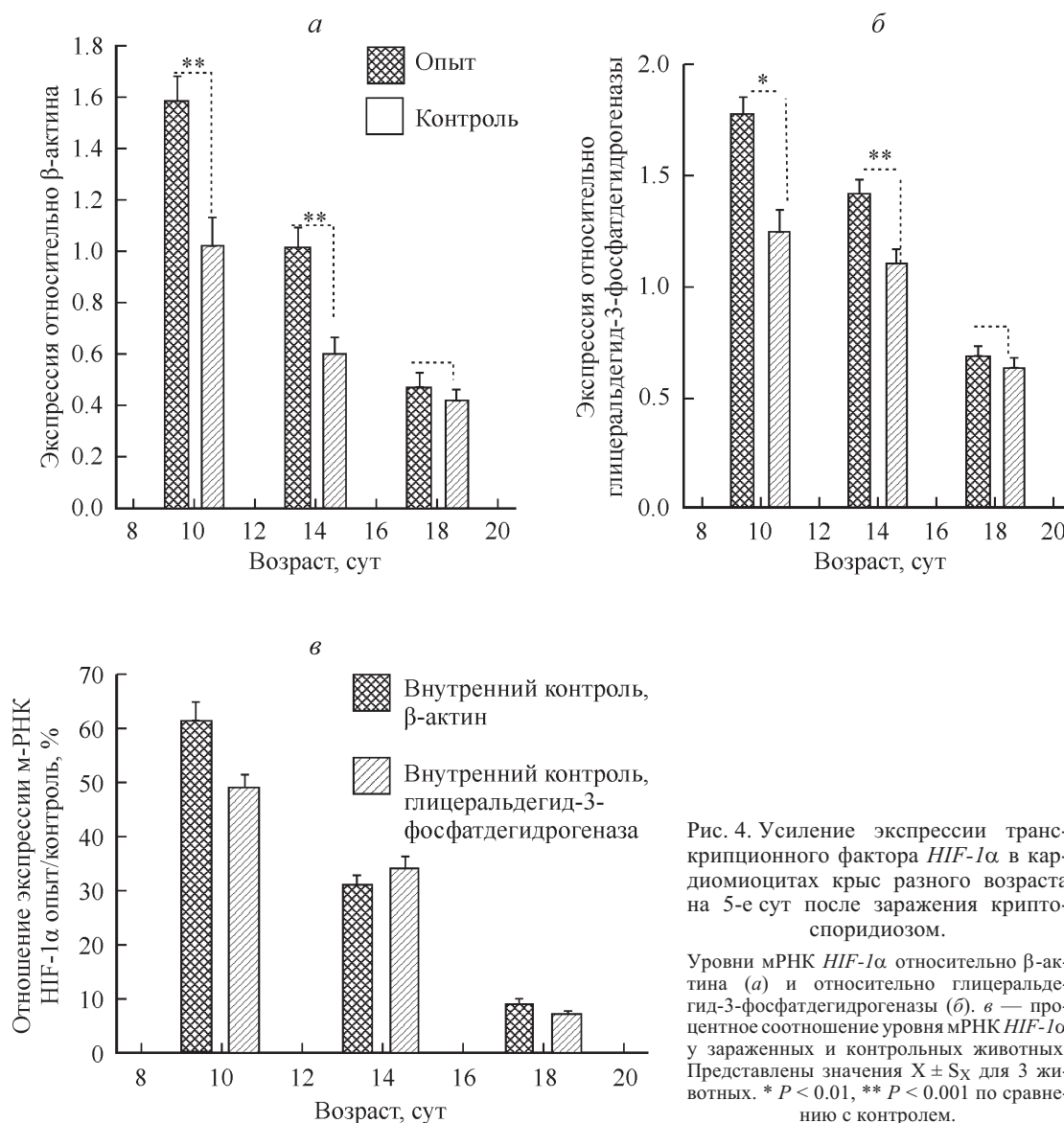


Рис. 4. Усиление экспрессии транскрипционного фактора *HIF-1α* в кардиомиоцитах крыс разного возраста на 5-е сут после заражения криптоспориозом.

Уровни мРНК *HIF-1α* относительно β-актина (а) и относительно глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназы (б). в — процентное соотношение уровня мРНК *HIF-1α* у зараженных и контрольных животных. Представлены значения $\bar{X} \pm S_x$ для 3 животных. * $P < 0.01$, ** $P < 0.001$ по сравнению с контролем.

мать всерьез эпидемиологические исследования до тех пор, пока не будут выявлены механизмы взаимосвязи (Elwood, 2008).

Первые успехи в изучении влияния гастроэнтерита на сердце были достигнуты недавно — в 2010—2011 гг., когда была обнаружена четкая взаимосвязь между воспалением кишечника, не затрагивающим сердце (т. е. без миокардита), и нарушением Q- и T-пиков электрокардиограммы, указывающих на тахикардию (Curione et al., 2010). Было также показано, что состав кишечной микрофлоры и ее метаболитов влияет на риск развития атеросклероза (Wang et al., 2011). Тем не менее клеточные и молекулярные механизмы влияния гастроэнтерита на сердце до сих пор остаются невыясненными.

Одной из важных причин слабой изученности пусковых факторов дисфункции сердца, связанной с гастроэнтеритом, является трудность при выборе экспериментальной модели, позволяющей управлять тяжестью заболевания и точно устанавливать время его окончания (Curione et al., 2010). Разработанная нами модель неонатального криптоспориоза дает возможность регулировать интенсивность заражения (варьированием количества вводи-

мых в организм ооцист) и точно устанавливать время полного выздоровления животных (Бейер и др., 2002; Анацкая и др., 2010).

Основным результатом нашей работы является обнаружение связи неонатального криптоспориозного гастроэнтерита с атрофией сердца и ремоделированием кардиомиоцитов, затрагивающим и ядро, и цитоплазму. Ремоделирование ядра проявляется в гиперполиплоидизации, а ремоделирование цитоплазмы — в сужении, удлинении и атрофии клеток. В результате цитоплазма, которая в клетках здоровых животных заполнена миофибриллами, в клетках переболевших особей содержит дополнительные или увеличенные ядра вместо миофибрилл. Кроме того, мы показали, что при криптоспориозе повышается экспрессия транскрипционного фактора *HIF-1α*. Выявленные изменения являются общепринятыми маркерами патологий сердца.

Удлинение, сужение и гиперполиплоидизация кардиомиоцитов часто сопровождают гипертонию, инфаркт миокарда, ишемическую болезнь сердца, тахикардию и некоторые врожденные патологии, связанные с перегрузкой сердца (Мартынова и др., 1983; Rumyantsev et al.,

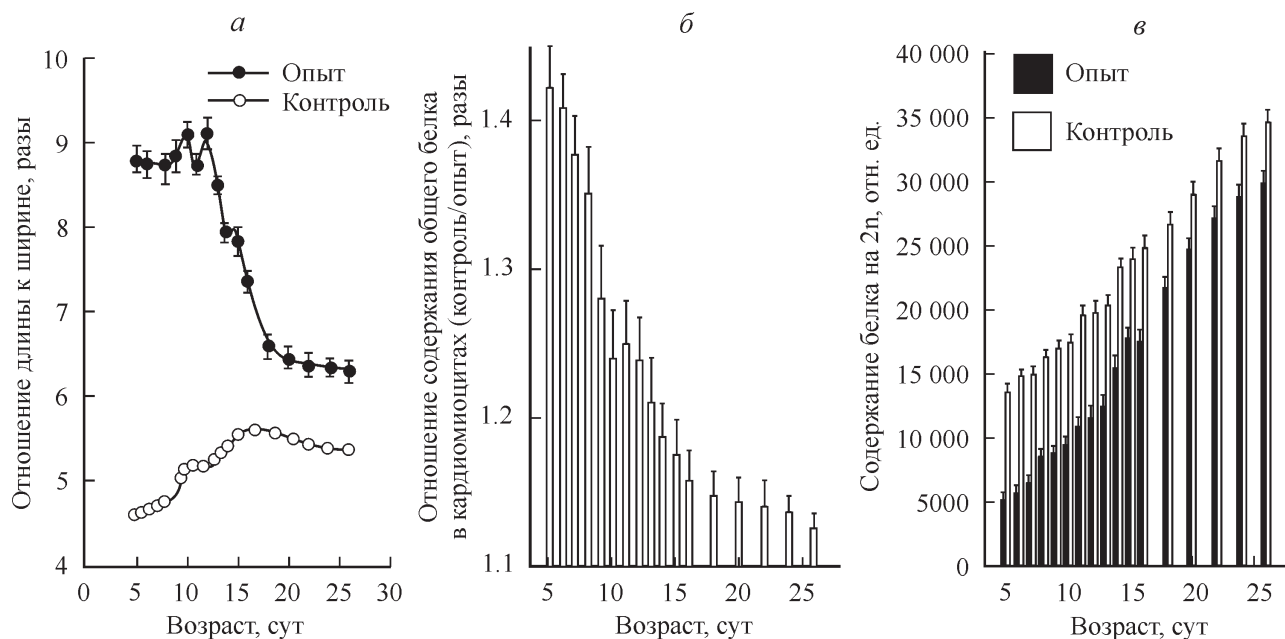


Рис. 5. Удлинение, сужение и атрофия кардиомиоцитов крыс разного возраста на 5-е сут после заражения криптоспориديозом. а — отношение длины кардиомиоцитов к ширине (темные символы — контроль, светлые символы — опыт); б — отношение содержания общего белка в кардиомиоцитах контрольных и переболевших животных; в — содержание белка в расчете на диплоидный геном у контрольных (темные столбцы) и зараженных (светлые столбцы) животных. Представлены значения $\bar{X} \pm S_x$ для 3–6 животных.

1990; Kellerman et al., 1992; Ерохина и др., 1995, 1997; Шляхто и др., 2007).

Повышение уровня мРНК гена *HIF-1α* в кардиомиоцитах характерно для длительной, по крайней мере более 1 сут, гипоксии, связанной с ишемией, тахикардией или атрофией сердца (Görlach, 2009). И хотя найден-

ные нами различия в экспрессии *HIF-1α* между больными и здоровыми животными составляют всего 9–58 % (в зависимости от возраста животных при заражении), все же они могут быть существенными, потому что транскрипционные факторы экспрессируются слабо и присутствуют в клетках в количестве всего нескольких сотен

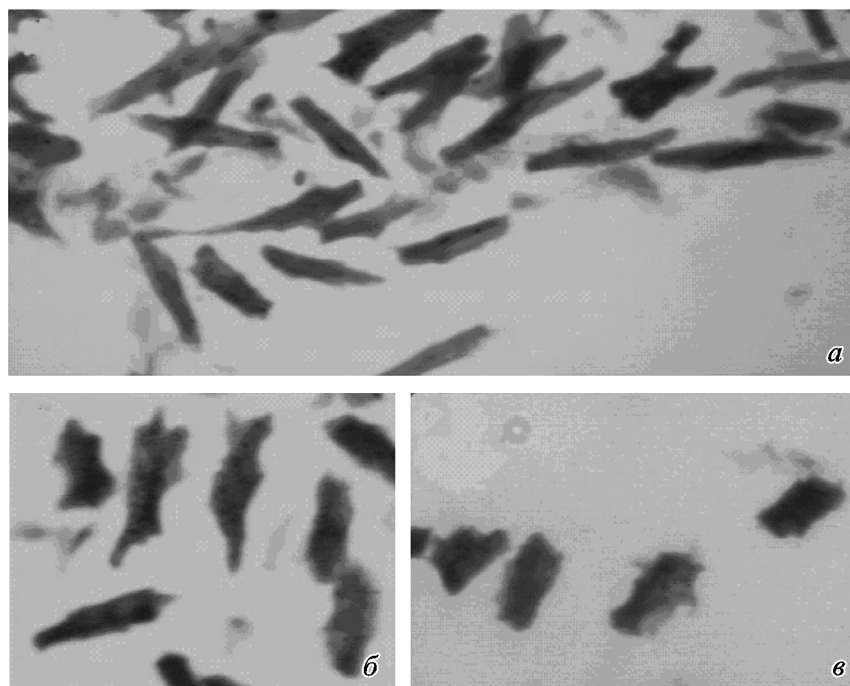


Рис. 6. Ремоделирование кардиомиоцитов после неонатального криптоспориديоза у крысы, зараженной на 8-е сут и взятой в острый опыт на 12-е сут после рождения.

а — клетки зараженного животного (видны узкие и удлиненные кардиомиоциты); б, в — кардиомиоциты контрольного животного такого же возраста (видны более широкие и короткие клетки). Окраска — нафтоловый желтый, проходящий свет. Увел. 200×.

или даже нескольких десятков молекул (Ideker et al., 2011). Это означает, что относительно небольшое повышение количества мРНК *HIF-1α* может привести к дисрегуляции почти 200 его генов-мишеней (Semenza, 2011, 2012).

Результаты наших недавних исследований также свидетельствуют о том, что при криптоспориозе происходят физиологические изменения, характерные для повышенной экспрессии *HIF-1α* в кардиомиоцитах. Это проявляется в замещении цепи быстрого α -миозина с высокой АТФазной активностью тяжелой цепью медленного β -миозина с низкой АТФазной активностью (Анацкая и др., 2011). Такое замещение не только подтверждает тот факт, что миофибриллам приходится обеспечивать сокращение в условиях гипоксии (Lowes et al., 1997; Naddad et al., 2006), но и свидетельствует о пониженной активности кальциевой АТФазы саркоплазматического ретикулума (SERCA), для которой *HIF-1α* является прямым супрессором (Bekeredjian et al., 2010; Kuschel et al., 2012). Также мы показали, что криптоспориоз ассоциирован с увеличением экспрессии белка теплового шока Hsp70 (Анацкая и др., 2004), для которого *HIF-1α* выступает позитивным регулятором (Horowitz, 2010).

Сдвигая время заражения ооцистами криптоспориоза посуточно на протяжении 1-го мес жизни крысы (составляющего примерно половину периода постнатального онтогенеза до достижения половозрелости), мы установили, что влияние криптоспориоза на разные морфологические и физиологические характеристики кардиомиоцитов зависит от возраста животных при заражении. Количество общего белка, форма клеток и соотношение экспрессии тяжелых цепей миозина, найденное нами ранее у зараженных крыс (Анацкая и др., 2011), меняются во всех возрастных группах, проявляя лишь небольшое ослабление ответа на заболевание от младших групп к старшим. В то же время повышенная плоидность ядер наблюдается только у 9—14-суточных животных, зараженных на 5—10-е сут после рождения. Интересно, что усиленная экспрессия *HIF-1α* также наиболее отчетливо проявляется именно в этих возрастных группах, что может указывать на существование взаимосвязи между полиплоидизацией и индукцией фактора *HIF-1α*. Наши сравнительные исследования полногеномных микрочипов показали, что влияние полиплоидизации на транскриптом кардиомиоцитов и гепатоцитов проявляется в повышении уровня экспрессии *HIF-1α* и большинства его генов-мишеней (Anatskaya, Vinogradov, 2007). Кроме того, на тетраплоидных и околотетраплоидных клеточных линиях было показано, что увеличение копий генов — один из механизмов гиперэкспрессии *HIF-1α*, который помогает клетке адаптироваться к условиям гипоксии (Secades et al., 2009).

Известно, что кардиомиоциты крысы с 9-х по 14-е сут после рождения переходят от пролиферативного роста к гипертрофическому (Li et al., 1997). Для кардиомиоцитов человека аналогичный временной интервал приходится на период с 7-го по 14-й годы жизни (Takamatsu et al., 1983). После окончания переходного периода плоидность кардиомиоцитов перестает возрастать в ответ на перегрузку сердца (рис. 2), связанную с криптоспориозом, а избыточная экспрессия *HIF-1α* резко ослабевает (рис. 4). В то же время сдвиг соотношения изоформ тяжелых цепей α - и β -миозина в сторону β -миозина и ремоделирование формы клеток, напротив, продолжают (Анацкая и др., 2011).

Тот факт, что плоидность кардиомиоцитов повышается после гастроэнтерита лишь у животных из некоторых возрастных групп, позволяет предположить, что геномные дупликации могут быть одним из механизмов онтогенетического программирования функциональных возможностей взрослого сердца, а период изменения плоидности — чувствительным (или критическим) периодом в развитии сердца.

Оснований для этого предположения есть несколько. С одной стороны, известно, что полиплоидизация кардиомиоцитов необратима. Экспериментальные данные, полученные на мышках и крысах с измененной скоростью роста, а также результаты исследований кардиомиоцитов людей, перенесших патологии сердца в детстве или имеющих врожденные заболевания сердца (пороки митрального клапана или тетраду Фалло), подтверждают, что избыточная полиплоидизация, зарегистрированная в детстве, сохраняется и во взрослом состоянии (Brodsky et al., 1985; Campbell et al., 1991; Erokhina et al., 1992; Ерохина и др., 1995, 1997).

С другой стороны, сравнительные исследования, проведенные почти на 100 видах теплокровных, свидетельствуют о том, что избыточная полиплоидизация кардиомиоцитов ассоциирована со снижением аэробной способности сердца и с уменьшением подвижности животных (Anatskaya, Vinogradov, 2002, 2004a). На млекопитающих и птицах показано, что кардиомиоциты «атлетических» видов содержат примерно в 2 раза меньше геномов, чем клетки малоподвижных видов сходной массы (Anatskaya, Vinogradov, 2002, 2004b). Клинические исследования свидетельствуют о том, что у человека высокая плоидность кардиомиоцитов ассоциирована с ишемической болезнью сердца и с инфарктом миокарда. Эта взаимосвязь может быть обусловлена тем, что полиплоидия меняет профиль экспрессии узко- и широкоэкспрессируемых генов, вызывая перестройку метаболизма и запуск защитных механизмов (Anatskaya, Vinogradov, 2007, 2010).

Таким образом, используя мультиметодический подход и новую экспериментальную модель, мы смогли сделать первые шаги к пониманию физиологических, молекулярных и клеточных механизмов взаимосвязи между гастроэнтеритом и возникновением патологии сердечно-сосудистой системы. Наши данные показали, что гастроэнтерит ассоциирован с изменениями, характерными для снижения энергетики и сократительной способности сердца, представляя (вместе с литературными данными о взаимосвязи между гастроэнтеритом и тахикардией; Cugione, 2010) тот комплекс нарушений, который соответствует международному определению кардиомиопатии: «кардиомиопатией называют гетерогенную группу патологических состояний миокарда, ассоциированную с механической и/или электрической дисфункцией, сопровождающейся тахикардией» (Maron et al., 2006). Это позволяет говорить о новом типе кардиомиопатии, которую можно назвать гастроэнтеритная или, точнее, криптоспориозная кардиомиопатия. Кроме того, нам удалось обнаружить критический период в постнатальном развитии сердца и описать его физиологические особенности.

Авторы признательны за помощь в работе и рекомендации О. И. Подгорной, С. О. Скарлато, А. Н. Томилину, Н. М. Усмановой и Г. И. Штейну. Также авторы выражают особую благодарность И. А. Гамалей, М. Г. Мартыновой и И. И. Тюревой за ценные замечания и полезное обсуждение.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект 12-04-01199) и программы президиума РАН «Механизмы интеграции молекулярных систем при реализации физиологических функций».

Список литературы

- Анацкая О. В., Виноградов А. Е. 2004. Полиплоидия: значение для функции кардиомиоцитов и потенциала работы сердца. Цитология. 46 (2) : 105—114.
- Анацкая О. В., Виноградов А. Е. 2010. Особенности метаболизма полиплоидных клеток по данным биоинформатического анализа. Цитология. 52 (1) : 52—62.
- Анацкая О. В., Матвеев И. В., Сидоренко Н. В., Харченко М. В., Кропотов А. В., Виноградов А. Е. 2011. Ремоделирование кардиомиоцитов крыс после неонатального криптоспориоза. I. Изменение состава сократительных белков. Цитология. 53 (11) : 848—858.
- Анацкая О. В., Сидоренко Н. В., Александрова С. А., Свежова Н. В., Виноградов А. Е., Бейер Т. В. 2004. Отдаленные последствия криптоспориоза для сердца неонатальных крыс: гиперэкспрессия Hsp70, повышение плоидности и снижение сократительной способности кардиомиоцитов. В кн.: Материалы Международной конференции, посвященной 125-летию академика К. И. Скрябина. 22—24.
- Анацкая О. В., Сидоренко Н. В., Бейер Т. В., Виноградов А. Е. 2010. Неонатальный гастроэнтерит как причина долговременной атрофии, деформации и необратимой гиперполиплоидизации кардиомиоцитов. Кардиология. 10 (12) : 35—44.
- Бейер Т. В., Анацкая О. В., Сидоренко Н. В., Виноградов А. Е., Свежова Н. В. 2002. Морфофункциональные изменения в гепатоцитах неонатальных крыс, зараженных кишечным протозойным патогеном *Cryptosporidium parvum* (Coccidia, Sporozoa). Цитология. 44 (11) : 1046—1057.
- Бейер Т. В., Сидоренко Н. В., Анацкая О. В. 2006. Кишечный криптоспориоз раннего возраста и его негативные последствия. Мед. паразитол. 1 : 3—7.
- Ерохина И. Л., Селиванова Г. В., Власова Т. Д., Емельянова О. И. 1997. Корреляция между уровнем полиплоидии и гипертрофии и степенью повреждения кардиомиоцитов предсердия человека при некоторых врожденных и приобретенных патологиях сердца. Цитология. 39 (10) : 889—899.
- Ерохина И. Л., Селиванова Г. В., Власова Т. Д., Емельянова О. И., Сорока В. В. 1995. Цитофотометрическое, морфометрическое и электронно-микроскопическое исследование кардиомиоцитов предсердия человека при ишемической болезни сердца. Цитология. 37 (4) : 291—297.
- Мартынова М. Г., Антипанова Е. М., Румянцев П. П. 1983. Содержание ДНК, телец полового хроматина и ядрышек в ядрах мышечных клеток нормальных и гипертрофированных предсердий человека. Цитология. 25 (5) : 614—619.
- Мартынова М. Г., Селиванова Г. В., Власова Т. Д. 2002. Уровни плоидности и число ядер в кардиомиоцитах миноги и рыб. Цитология. 44 (4) : 387—391.
- Матвеев И. В. 2005. Поиск дифференциально экспрессирующихся генов в различных группах клеток медузы *Aurelia aurita*. Цитология. 47 (5) : 431—435.
- Сидоренко Н. В., Филимонов Н. Ю., Анацкая О. В., Свежова Н. В., Бейер Т. В. 2004. Реакция клеток перенхимы печени крыс на заражение кишечным протозойным патогеном *Cryptosporidium parvum* (Sporozoa, Coccidia). Цитология. 46 (2) : 114—125.
- Шляхто Е. В., Бокерия Л. А., Рыбакова М. Г., Семернин Е. Н., Селиванова Г. В., Власова Т. Д., Борисов К. В., Парфенов В. Н., Гудкова А. Я. 2007. Клеточные аспекты патогенеза гипертрофической кардиомиопатии: роль полиплоидии кардиомиоцитов и активации в миокарде ядерного антигена пролиферирующей клетки. Цитология. 49 (10) : 817—824.
- Al-Delaimy W. K. 2008. Commentary: lactose and ischaemic heart disease: a weak 28-year-old hypothesis. Int. J. Epidemiol. 37 : 1214—1216.
- Alter S. J., Vidwan N. K., Sobande P. O., Omolaja A., Bennett J. S. 2011. Common childhood bacterial infections. Curr. Probl. Pediatr. Adolesc. Health Care. 41 : 256—283.
- Anatskaya O. V., Vinogradov A. E. 2002. Myocyte ploidy in heart chambers of birds with different locomotor activity. J. Exp. Zool. 293 : 427—441.
- Anatskaya O. V., Vinogradov A. E. 2004a. Heart and liver as developmental bottlenecks of mammal design: evidence from cell polyploidization. Biol. J. Linn. Soc. 83 : 175—186.
- Anatskaya O. V., Vinogradov A. E. 2004b. Paradoxical relationship between protein content and nucleolar activity in mammalian cardiomyocytes. Genome. 47 : 565—578.
- Anatskaya O. V., Vinogradov A. E. 2007. Genome multiplication as adaptation to tissue survival: evidence from gene expression in mammalian heart and liver. Genomics. 89 : 70—80.
- Anatskaya O. V., Vinogradov A. E. 2010. Somatic polyploidy promotes cell function under stress and energy depletion: evidence from tissue-specific mammal transcriptome. Funct. Integr. Genomics. 10 : 433—446.
- Anatskaya O. V., Sidorenko N. V., Vinogradov A. E., Beyer T. V. 2007. Impact of neonatal cryptosporidial gastroenteritis on epigenetic programming of rat hepatocytes. Cell Biol. Int. 31 : 420—427.
- Anatskaya O. V., Sidorenko N. V., Vinogradov A. E., Beyer T. V. 2010. Neonatal cardiomyocyte ploidy reveals critical windows of heart development. Int. J. Cardiol. 141 : 81—91.
- Barker D. J., Winter P. D., Osmond C., Margetts B., Simmonds S. J. 1989. Weight in infancy and death from ischaemic heart disease. Lancet. 9 : 577—580.
- Bekeredjian R., Walton C. B., MacCannell K. A., Ecker J., Kruse F., Outten J. T., Sutcliffe D., Gerard R. D., Bruick R. K., Shohet R. V. 2010. Conditional HIF1alpha expression produces a reversible cardiomyopathy. PLoS One. 5 : e11693.
- Bishop C. M. 1999. The maximum oxygen consumption and aerobic scope of birds and mammals: getting to the heart of the matter. Proc. Biol. Sci. 266 : 2275—2281.
- Bishop C. M. 2005. Circulatory variables and the flight performance of birds. J. Exp. Biol. 208 : 1695—1708.
- Bishop C., Butler P. 1995. Physiological modelling of oxygen consumption in birds during flight. J. Exp. Biol. 198 : 2153—2163.
- Brodsky V. Ya., Chernyaev A. L., Vasilyeva I. A. 1991. Variability of the cardiomyocyte ploidy in normal human hearts. Virchows Arch. B Cell. Pathol. Incl. Mol. Pathol. 61 : 289—294.
- Brodsky V. Ya., Delone G. V., Tsirekidze N. N. 1985. Genome multiplication in cardiomyocytes of fast- and slow-growing mice. Cell Differ. 17 : 175—181.
- Bustin S. A., Benes V., Nolan T., Pfaffl M. W. 2005. Quantitative real-time RT-PCR—a perspective. J. Mol. Endocrinol. 34 : 597—601.
- Campbell S. E., Korecky B., Rakusan K. 1991. Remodeling of myocyte dimensions in hypertrophic and atrophic rat hearts. Circ. Res. 68 : 984—996.
- Chako C. Z., Tyler J. W., Schultz L. G., Chiguma L., Beerntsen B. T. 2010. Cryptosporidiosis in people: it's not just about the cows. J. Vet. Intern. Med. 24 : 37—43.
- Chalmers R. M., Davies A. P. 2010. Minireview: clinical cryptosporidiosis. Exp. Parasitol. 124 : 138—146.
- Chen Y. F., Redetzke R. A., Said S., Beyer A. J., Gerdes A. M. 2010. Changes in left ventricular function and remodeling after myocardial infarction in hypothyroid rats. Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 298 : H259—H262.
- Chomczynski C., Sacchi N. 1987. Single-step method of RNA isolation by acid guanidinium thiocyanate-phenol-chloroform extraction. Anal. Biochem. 162 : 156—159.
- Crimmins E. M., Finch C. E. 2006. Infection, inflammation, height, and longevity. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 103 : 498—503.
- Curione M., Aratari A., Amato S., Colotto M., Barbato M., Leone S., Tego A., Panetti D., Parlapiano C. 2010. A study on QT in-

terval in patients affected with inflammatory bowel disease without cardiac involvement. Intern. Emerg. Med. 5 : 307—310.

Elwood P. 2008. Commentary: lactose and ischaemic heart disease: a sweet hypothesis ... but nothing more! Int. J. Epidemiol. 37 : 1211—1213.

Erokhina I. L., Selivanova G. V., Vlasova T. D., Komarova N. I., Emeljanova O. I., Soroka V. V. 1992. Ultrastructure and biosynthetic activity of polyploid atrial myocytes in patients with mitral valve disease. Acta Histochem. Suppl. 42 : 293—299.

Fayer R. 2004. Cryptosporidium: a water-borne zoonotic parasite. Vet. Parasitol. 126 : 37—56.

Fayer R., Santin M., Dargatz D. 2010. Species of *Cryptosporidium* detected in weaned cattle on cow-calf operations in the United States. Vet. Parasitol. 170 : 187—192.

Finch C. E. 2010. Evolution in health and medicine Sackler colloquium: evolution of the human lifespan and diseases of aging: roles of infection, inflammation, and nutrition. Proc. Nat. Acad. Sci. USA. 107 (Suppl. 1) : 1718—1724.

Finch C. E., Crimmins E. M. 2004. Inflammatory exposure and historical changes in human life-spans. Science. 305 : 1736—1739.

Gluckman P. D., Hanson M. A. 2004. Living with the past: evolution, development, and patterns of disease. Science. 305 : 1733—1736.

Görlach A. 2009. Regulation of Hif-1 alpha at the transcriptional level. Curr. Pharm. Des. 15 : 3844—3852.

Haddad F., Qin A. X., Bodell P. W., Zhang L. Y., Guo H., Giger J. M., Baldwin K. M. 2006. Regulation of antisense RNA expression during cardiac MHC gene switching in response to pressure overload. Amer. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 290 : H2351—H2361.

Horowitz M. 2010. Genomics and proteomics of heat acclimation. Front. Biosci. 2 : 1068—1080.

Huggett J., Dheda K., Bustin S., Zumla A. 2005. Real-time RT-PCR normalization strategies and considerations. Genes Immun. 6 : 279—284.

Ideker T., Dutkowski J., Hood L. 2011. Boosting signal-to-noise in complex biology: prior knowledge is power. Cell. 144 : 860—863.

Kellerman S., Moore J. A., Zierhut W., Zimmer H. G., Campbell J., Gerdes A. M. 1992. Nuclear DNA content and nucleation patterns in rat cardiac myocytes from different models of cardiac hypertrophy. J. Mol. Cell. Cardiol. 24 : 497—505.

Kelly P. 2011. Treatment and prevention of cryptosporidiosis: what options are there for a country like Zambia? Parasitology. 138 : 1488—1491.

Kuschel A., Simon P., Tug S. 2012. Functional regulation of *HIF-1α* under normoxia — is there more than post-translational regulation? J. Cell. Physiol. 227 : 514—524.

Li F., Wang X., Gerdes A. M. 1997. Formation of binucleated cardiac myocytes in rat heart. II. Cytoskeletal organization. J. Mol. Cell. Cardiol. 29 : 1553—1565.

Li F., Wang X., Yi X. P., Gerdes A. M. 2004. Changes in left ventricular function and remodeling after myocardial infarction in hypothyroid rats. Structural basis of ventricular remodeling: role of the myocyte. Curr. Heart Fail. Rep. 1 : 5—8.

Lowes B. D., Minobe W., Abraham W. T., Rizeq M. N., Bohlmeier T. J., Quaije R. A., Roden R. L., Dutcher D. L., Robertson A. D., Voelkel N. F., Badesch D. B., Groves B. M., Gilbert E. M., Bristow M. R. 1997. Changes in gene expression in the intact human heart. Downregulation of alpha-myosin heavy chain in hypertrophied, failing ventricular myocardium. J. Clin. Invest. 100 : 2315—2324.

Maron M. S., Olivetto I., Zenovich A. G., Link M. S., Pandian N. G., Kuvin J. T., Nistri S., Cecchi F., Udelson J. E., Maron B. J. 2006. Hypertrophic cardiomyopathy is predominantly a disease of left ventricular outflow tract obstruction. Circulation. 114 : 2232—2239.

Matveev I. V., Shaposhnikova T. G., Podgornaya O. I. 2007. A novel *Aurelia aurita* protein mesoglein contains DSL and ZP domains. Gene. 399 : 20—25.

Meireles M. V. 2010. Cryptosporidium infection in Brazil: implications for veterinary medicine and public health. Rev. Bras. Parasitol. Vet. 19 : 197—204.

Neira-Munoz E., Okoro C., McCarthy N. D. 2007. Outbreak of waterborne cryptosporidiosis associated with low oocyst concentrations. Epidemiol. Infect. 135 : 1159—1164.

Nuyt A. M., Szyf M. 2007. Developmental programming through epigenetic changes. Circ. Res. 100 : 452—455.

Rodriguez L., Cervantes E., Ortiz R. 2011. Malnutrition and gastrointestinal and respiratory infections in children: a public health problem. Int. J. Environ. Res. Public. Health. 8 : 1174—1205.

Rumyantsev P. P. 1977. Interrelations of the proliferation and differentiation processes during cardiac myogenesis and regeneration. Int. Rev. Cytol. 51 : 186—227.

Rumyantsev P. P., Erokhina I. L., Antipanova E. M., Martynova M. G. 1990. DNA and sex chromatin content in nuclei of conductive system and working myocytes of normal and hypertrophied human heart. Acta Histochem. Suppl. 39 : 225—237.

Sambrook J., Fritsch E. F., Maniatis T. 1989. Molecular cloning. A laboratory manual. (2nd Edition). New York: Cold Spring Harbor Laboratory. 523 p.

Schlüter K. D., Millar B. C., McDermott B. J., Piper H. M. 1995. Regulation of protein synthesis and degradation in adult ventricular cardiomyocytes. Amer. J. Physiol. 269 : C1347—C1355.

Schmittgen T. D., Livak K. J. 2008. Analyzing real-time PCR data by the comparative C(T) method. Nat. Protoc. 3 : 1101—1108.

Secades P., Rodrigo J. P., Hermesen M., Alvarez C., Suarez C., Chiara M. D. 2009. Increase in gene dosage is a mechanism of Hif-1alpha constitutive expression in head and neck squamous cell carcinomas. Genes Chromosomes Cancer. 48 : 441—454.

Segall J. J. 2008. Hypothesis: is lactose a dietary risk factor for ischaemic heart disease? Int. J. Epidemiol. 37 : 1204—1208.

Semenza G. L. 2011. Oxygen sensing, homeostasis, and disease. N. Engl. J. Med. 365 : 537—347.

Semenza G. L. 2012. Hypoxia-inducible factors in physiology and medicine. Cell. 148 : 399—408.

Takamatsu T., Nakanishi K., Fukuda M., Fujita S. 1983. Cytofluorometric nuclear DNA-determinations in infant, adolescent, adult and aging human hearts. Histochemistry. 77 : 485—494.

Waldman E., Tzipori S., Forsyth J. R. 1986. Separation of *Cryptosporidium* species oocysts from feces by using a percoll discontinuous density gradient. J. Clin. Microbiol. 23 : 199—200.

Walsh S., Pontén A., Fleischmann B. K., Jovinge S. 2010. Cardiomyocyte cell cycle control and growth estimation *in vivo* — an analysis based on cardiomyocyte nuclei. Cardiovasc. Res. 86 : 365—373.

Wang Z., Klipfell E., Bennett B. J., Koeth R., Levison B. S., Dugar B., Feldstein A. E., Britt E. B., Fu X., Chung Y. M., Wu Y., Schauer P., Smith J. D., Allayee H., Tang W. H., DiDonato J. A., Lusis A. J., Hazen S. L. 2011. Gut flora metabolism of phosphatidylcholine promotes cardiovascular disease. Nature. 472 : 57—63.

Zu S. X., Li J. F., Barrett L. J., Fayer R., Shu S. Y., McAuliffe J. F., Roche J. K., Guerrant R. L. 1994. Seroepidemiologic study of *Cryptosporidium* infection in children from rural communities of Anhui, China and Fortaleza, Brazil. Amer. J. Trop. Med. Hyg. 51 : 1—10.

RAT CARDIOMYOCYTE REMODELING AFTER NEONATAL CRYPTOSPORIDIOSIS.
II. ELONGATION, EXCESSIVE POLYPLOIDIZATION AND *HIF-1α* OVEREXPRESSION

O. V. Anatskaya,¹ N. V. Sidorenko, I. V. Matveev, A. V. Kropotov, A. E. Vinogradov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg;

¹ e-mail: anatskaya@mail.cytspb.rssi.ru

Retrospective epidemiological studies evidence that infant diseases leave survivors with an increased susceptibility to cardiovascular diseases in later life. At the same time, the mechanisms of this link remain poorly understood. Based on medical statistics reporting that infectious gastroenteritis is the most common cause of maladies in babies, infants and children, we analysed the effects of moderate cryptosporidial gastroenteritis on the heart and ventricular cardiomyocyte remodelling in rats of the first month of life. The disease was challenged by a worldwide human protozoic pathogen *Cryptosporidium parvum* (Apicomplexa, Sporozoa). The main symptoms manifested in the growth retardation moderate diarrhea. Using real-time PCR, cytophotometry, confocal microscopy and image analysis, we indicated that cryptosporidiosis was associated, with the atrophy heart and the elongation, narrowing, protein content decrease and hyperpolyploidization of cardiomyocytes and the moderate overexpression of hypoxia inducible factor 1α (*HIF-1α*) mRNA. Cardiomyocyte shape remodeling and heart atrophy presented in all age groups. The severity of these changes, however, declined gradually from younger to older groups. In contrast, hyperpolyploidization and *HIF-1α* mRNA overexpression were registered mainly among animals aged between 6 and 13 days, and were barely detected and non-significant in older age groups. In the rat the time period covering 6—13 days after birth is known to coincide with the intensive cardiomyocyte polyploidization and the switch from proliferation to hypertrophy. Thus, our data indicate that neonatal cryptosporidiosis may be potential cardiovascular diseases risk factor and that one of the critical time windows for the growing heart covers the time period when cardiomyocyte undergo polyploidization.

Key words: neonatal cardiomyocytes, polyploidy, atrophy, elongation, cryptosporidial gastroenteritis, critical period in heart formation, *HIF-1α*.
