

ЭКСПРЕССИЯ БЕЛКА Вах И МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ МИОКАРДА ПРИ ОСТРОЙ ГЕМОДИНАМИЧЕСКОЙ ПЕРЕГРУЗКЕ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

М.Л.Благонравов, А.Ю.Коршунова, М.М.Азова*, А.А.Брык, В.А.Фролов

*Кафедра общей патологии и патологической физиологии, *кафедра биологии и общей генетики Медицинского института ФГАОУ ВО РУДН, Москва, РФ*

В эксперименте на кроликах-самцах исследовали интенсивность экспрессии белка Вах в жизнеспособных кардиомиоцитах левого желудочка сердца как маркера внутриклеточного пути инициации апоптоза, а также морфологические изменения миокарда при острой гемодинамической перегрузке левого желудочка. Выявлено снижение содержания белка Вах в цитоплазме кардиомиоцитов, свидетельствующее об отсутствии вовлеченности митохондриального пути в реализацию апоптотической программы, которое сочетается с выраженными деструктивными изменениями миокарда левого желудочка.

Ключевые слова: апоптоз, Вах, острая перегрузка левого желудочка, кардиомиоцит, миокард

Первые исследования клеточной гибели как процесса, направленного на поддержание гомеостаза организма, начались более 150 лет назад [5]. Однако интенсивное развитие данного направления продолжилось лишь с середины XX в. с появлением понятий “программированная клеточная гибель” и “апоптоз” [11]. Согласно современным представлениям, различные типы гибели клеток объединяют в две группы. Первая — гибель клетки, “возникшая в результате несчастного случая” (accidental cell death, ACD), обусловленная несовместимыми с жизнью повреждениями и невосприимчивая к фармакологическим или генетическим вмешательствам. Вторая группа — генетически запрограммированная “регулируемая” клеточная смерть (regulated cell death, RCD). Важно отметить, что физиологические случаи регулируемой клеточной гибели, возникающие без нарушения функционального состояния клетки, например, при эмбриональном развитии и иммунном ответе, как правило, называют “программированной клеточной гибелью” (programmed cell death, PCD) [6].

Адрес для корреспонденции: blagonravovm@mail.ru. Благонравов М.Л.

В механизмах интеграции, активации и ингибирования процессов клеточной гибели важную роль играют митохондрии. Так, изменение проницаемости наружной мембраны митохондрий (mitochondrial outer membrane permeabilization, MOMP), зачастую необходимое для активации каспазного каскада, возникает при реализации внутриклеточного пути инициации апоптоза [7,10]. Данный механизм опосредован такими проапоптотическими факторами белковой природы, как Вах (Bcl-2-associated X protein) и Вак (Bcl-2 antagonist/killer), относящимися к семейству Bcl-2. Олигомерный белковый комплекс Вах/Вак, образующий в мембране митохондрий пороподобные структуры, регулирует дополнительные механизмы выхода межмембранных белков (цитохром С, SMAC/DIABLO и др.), необходимых для запуска процессов дезинтеграции клеточных структур и образования апоптосом [6,7,10].

В течение последних лет исследование апоптоза как одного из наиболее значимых типов регулируемой клеточной гибели является перспективным направлением в изучении заболеваний сердечно-сосудистой системы ввиду потенциальной возможности влияния на данный процесс и сохранения функциональных резервов миокарда.

Согласно данным экспериментальных исследований, апоптоз кардиомиоцитов играет важную роль в процессе морфологических изменений миокарда при хронической гемодинамической перегрузке левого желудочка (ЛЖ) [1], а также при хронической сердечной недостаточности [3]. Вместе с тем имеются данные, согласно которым эффективность ингибирования апоптоза при развитии хронической сердечной недостаточности сомнительна, что, вероятно, связано с более весомым вкладом в процесс ремоделирования миокарда таких компенсаторно-приспособительных механизмов, как гипертрофия кардиомиоцитов и усиление процессов ангиогенеза [9].

Несмотря на наличие большого количества данных, посвященных изучению программированной клеточной гибели миокарда, нет единого представления об особенностях развития данного процесса при остром повреждении сердечной мышцы. Механизмы регуляции апоптоза при острой гемодинамической перегрузке ЛЖ, в частности при определенных формах гипертонического криза, имеющей определенные особенности адаптационных реакций, остаются малоизученными. Во многих работах по изучению апоптоза кардиомиоцитов, в том числе на основе оценки активности каспаз, выявлено усиление активности маркеров апоптотической гибели клетки при острой перегрузке миокарда ЛЖ [3,4,8]. Однако отдельные молекулярные механизмы, участвующие в индукции и реализации данного процесса и связанных с ними явлений, изучены мало.

Цель данного исследования — определение интенсивности экспрессии белка Вах в кардиомиоцитах ЛЖ сердца как маркера внутриклеточного механизма инициации апоптоза, а также оценка морфологических изменений миокарда при острой гемодинамической перегрузке ЛЖ.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на кроликах-самцах породы шиншилла массой 3-3.5 кг, которые были разделены на 4 группы по 4 особи: контрольную (интактные животные) и опытные (кролики с острой перегрузкой ЛЖ через 1, 3 и 5 сут соответственно). Содержание животных и работа с ними проводились в соответствии с Приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г. и Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.). Гемодинамическую перегрузку ЛЖ моделировали хирургическим методом путем сужения восходящей аорты на 1/3 от ее первоначального диаметра с помощью металлической спирали.

В соответствующие сроки у животных под общим обезболиванием проводили торакотомию и экстирпацию сердца. Полученные образцы ткани миокарда ЛЖ фиксировались в течение 72 ч в 4% нейтральном параформальдегиде. Материал обрабатывали и заливали в парафин по общепринятой методике. Гистологические срезы толщиной 5 мкм готовили на микротоме "Slid-2003" и наносили на стекла с поли-L-лизинным покрытием (для иммуногистохимического исследования) и на обычные предметные стекла (для морфометрического анализа). Срезы депарафинировали ксилолом и проводили по спиртам нисходящей концентрации.

Интенсивность экспрессии белка Вах оценивали с использованием первичных козьих поликлональных антител ("Santa Cruz Biotechnology"). Результаты иммуногистохимической реакции кардиомиоцитов оценивали с использованием реагентов системы детекции "ImmunoCruz goat LSAB Staining System" ("Santa Cruz Biotechnology") и дополнительного окрашивания препаратов миокарда гематоксилином Майера. Реакция считалась положительной при коричневом окрашивании миофибрилл. Проводили световую микроскопию 30 полей зрения в каждом препарате миокарда на микроскопе "Nikon Eclipse E-400" с видеосистемой на основе камеры "Watec 221S" с использованием сетки Автандилова. При этом определяли отношение количества равноудаленных точек, приходящихся на позитивно окрашенную цитоплазму кардиомиоцитов, к общему количеству точек, занимаемых цитоплазмой.

Морфометрический анализ гистологических срезов миокарда проводили при окрашивании гематоксилином и эозином. Методом световой микроскопии при увеличении 400 в 30 полях зрения с помощью сетки Автандилова оценивали содержание (в объемных процентах, об.%) миофибрилл, ядер кардиомиоцитов, участков деструкции и инфильтрации, объем внеклеточного пространства. Также рассчитывали ядерно-цитоплазматическое соотношение: процентное отношение ядер кардиомиоцитов к числу мышечных волокон.

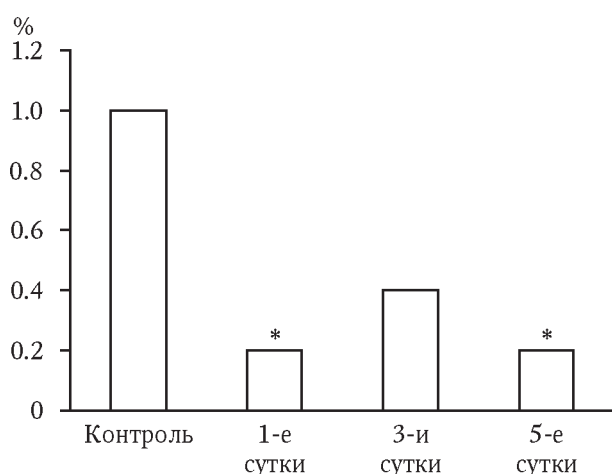
Достоверность полученных данных определяли с использованием *t* критерия Стьюдента (за достоверную принималась разность средних при $p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

На 1-е сутки от начала острой перегрузки ЛЖ отмечалось статистически значимое по сравнению с контролем снижение содержания белка Вах в цитоплазме кардиомиоцитов. На 3-и сутки

наблюдалось небольшое повышение данного показателя относительно 1-х суток и отличие от контроля становилось недостоверным, на уровне тенденции. На 5-е сутки исследования экспрессия Вах несколько снижалась по сравнению с предыдущим сроком и вновь устанавливалась на уровне, достоверно более низком по сравнению с контролем (рисунок). Таким образом, полученные данные в целом свидетельствуют об уменьшении экспрессии белка Вах в миокарде ЛЖ.

При качественной оценке срезов миокарда после проведения иммуногистохимической реакции на Вах при острой перегрузке ЛЖ отмечался мозаичный, неравномерный характер окрашивания, а также относительно низкая плотность положительной окраски кардиомиоцитов. В то же время наблюдалась тенденция к увеличению количества позитивно окрашенных кардиомиоцитов с более выраженной интенсивностью реакции в зонах миокарда, граничащих с очагами



Содержание белка Вах в кардиомиоцитах ЛЖ кроликов на 1, 3 и 5-е сутки острой гемодинамической перегрузки ЛЖ.

* $p < 0.05$ по сравнению с контролем.

деструктивных и инфильтративных изменений, а также обладающих более развитой сетью кровоснабжения.

На 1-е сутки эксперимента отмечались слабо выраженные структурные изменения в миокарде ЛЖ по сравнению с контролем: гомогенизация поперечной исчерченности и повышенная оксифильность кардиомиоцитов, признаки застойных явлений в сосудистом русле, а также участки геморрагии. По сравнению с контролем достоверно уменьшался объем миофибрилл, увеличивалось внеклеточное пространство (таблица), что может быть вызвано как развитием внеклеточного отека, так и уменьшением количества жизнеспособных мышечных волокон. Также статистически значимо уменьшалось количество ядер кардиомиоцитов в ЛЖ.

Через 3 сут после стенозирования восходящей аорты по сравнению с 1-ми сутками изменения миокарда имели более значимый и менее однородный характер: сохраненные участки миокарда чередовались с патологически измененными, границы миофибрилл становились менее четкими, встречались участки пересокращения мышечных волокон, сохранялись зоны геморрагии, появлялись участки гистиоцитарной инфильтрации, нарастали признаки внутри- и внеклеточного отека. По данным морфометрии, по сравнению с 1-ми сутками достоверно снижалось содержание миофибрилл и увеличивалось количество участков деструкции. Продолжалось снижение количества ядер кардиомиоцитов. Объем внеклеточного пространства оставался на уровне 1-х суток.

По истечении 5 сут патологические изменения миокарда сохраняли свою неравномерность, приобретая еще более выраженный характер. Нарастала гомогенизация миофибрилл, зоны инфильтрации расширялись. Сохранялась тенденция к уменьшению содержания миофибрилл. Общее

Данные морфометрии гистологических срезов миокарда ЛЖ через 1, 3 и 5 сут от возникновения острой гемодинамической перегрузки ЛЖ (об.%; $M \pm m$)

Структурные элементы	Контроль	Срок исследования, сутки		
		1-е	3-и	5-е
Мышечные волокна	88.04±0.37	84.60 ±1.02*	82.72±0.96*	81.79±2.06*
Ядра	5.48±0.21	3.31±0.20*	5.08±0.24 ⁺	4.46±0.23*
Ядерно-цитоплазматическое соотношение	0.06±0.003	0.04±0.003*	0.06±0.003 ⁺	0.06±0.003
Сосуды	1.01±0.77	0.73±0.20	0.42±0.17	0.14±0.09
Участки деструкции	0.29±0.06	0.30±0.07	0.36±0.16	2.58±1.24
Внеклеточное пространство	6.19±0.32	10.31±0.79*	10.69±0.83*	9.50±1.26*

Примечание. $p < 0.05$ по сравнению *с контролем, ⁺с предыдущим сроком.

количество ядер не изменялось относительно такового на 3-и сутки. Площадь участков деструкции ткани морфологически увеличивалась, однако оставалась статистически незначимой на протяжении всего эксперимента.

Ядерно-цитоплазматическое соотношение незначительно, но при этом достоверно снижалось по сравнению с контролем только в 1-е сутки исследования.

В проведенных нами ранее исследованиях по изучению апоптоза кардиомиоцитов ЛЖ сердца на идентичной экспериментальной модели было выявлено повышение уровня активности как эффекторной каспазы-3, так и инициаторной каспазы-8, опосредующей реализацию апоптотической гибели клетки по внешнему пути [2]. В этой связи установленное в данной работе снижение уровня экспрессии белка Вах свидетельствует о том, что инициация апоптотических процессов в кардиомиоцитах ЛЖ при острой перегрузке ЛЖ не зависит от митохондриального пути и обусловлена преимущественно рецепторно-опосредованными сигнальными механизмами.

Таким образом, при острой гемодинамической перегрузке ЛЖ наблюдается снижение интенсивности экспрессии белка Вах в кардиомиоцитах ЛЖ, сочетающееся с выраженными морфологическими изменениями в миокарде, пик которых приходится на 5-е сутки процесса.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азова М.М., Благодравов М.Л., Фролов В.А. Апоптоз клеток миокарда крыс при генетически обусловленной артериальной гипертензии // Биол. мембраны. 2012. Т. 29, № 4. С. 227-230.
2. Благодравов М.Л., Азова М.М., Фролов В.А. Биохимическое исследование апоптоза клеток миокарда при острой перегрузке левого желудочка в эксперименте // Вопр. биол., мед и фарм. химии. 2010. Т. 8, № 8. С. 49-54.
3. Прошина Л.Г., Федорова Н.П., Быкова О.С. Особенности гистохимической и иммуноцитохимической перестройки тканей сердца в процессе адаптации к экстремальным воздействиям // Вестн. НовГУ. 2010. № 59. С. 121-123.
4. Choi Y.H., Cowan D.B., Moran A.M., Colan S.D., Stamm C., Takeuchi K., Friehs I., del Nido P.J., McGowan F.X. Jr. Myocyte apoptosis occurs early during the development of pressure-overload hypertrophy in infant myocardium // J. Thorac. Cardiovasc. Surg. 2009. Vol. 137, N 6. P. 1356-1362.
5. Clarke P.G., Clarke S. Nineteenth century research on cell death // Exp. Oncol. 2012. Vol. 34, N 3. P. 139-145.
6. Galluzzi L., Bravo-San Pedro J.M., Vitale I., Aaronson S.A., Abrams J.M., Adam D., Alnemri E.S., Altucci L., Andrews D., Annicchiarico-Petruzzelli M., Baehrecke E.H., Bazan N.G., Bertrand M.J., Bianchi K., Blagosklonny M.V., Blomgren K., Borner C., Bredesen D.E., Brenner C., Campanella M., Candi E., Cecconi F., Chan F.K., Chandel N.S., Cheng E.H., Chipuk J.E., Cidlowski J.A., Ciechanover A., Dawson T.M., Dawson V.L., De Laurenzi V., De Maria R., Debatin K.M., Di Daniele N., Dixit V.M., Dynlacht B.D., El-Deiry W.S., Fimia G.M., Flavell R.A., Fulda S., Garrido C., Gougeon M.L., Green D.R., Gronemeyer H., Hajnoczky G., Hardwick J.M., Hengartner M.O., Ichijo H., Joseph B., Jost P.J., Kaufmann T., Kepp O., Klionsky D.J., Knight R.A., Kumar S., Lemasters J.J., Levine B., Linkermann A., Lipton S.A., Lockshin R.A., López-Otín C., Lugli E., Madeo F., Malorni W., Marine J.C., Martin S.J., Martinou J.C., Medema J.P., Meier P., Melino S., Mizushima N., Moll U., Muñoz-Pinedo C., Nuñez G., Oberst A., Panaretakis T., Penninger J.M., Peter M.E., Piacentini M., Pinton P., Prehn J.H., Puthalakath H., Rabinovich G.A., Ravichandran K.S., Rizzuto R., Rodrigues C.M., Rubinsztein D.C., Rudel T., Shi Y., Simon H.U., Stockwell B.R., Szabadkai G., Tait S.W., Tang H.L., Tavernarakis N., Tsujimoto Y., Vanden Berghe T., Vandenaebelle P., Villunger A., Wagner E.F., Walczak H., White E., Wood W.G., Yuan J., Zakeri Z., Zhivotovsky B., Melino G., Kroemer G. Essential versus accessory aspects of cell death: recommendations of the NCCD2015 // Cell Death Differ. 2015. Vol. 22, N 1. P. 58-73.
7. Green D.R., Galluzzi L., Kroemer G. Cell biology. Metabolic control of cell death // Science. 2014. Vol. 345. doi: 10.1126/science.1250256.
8. Moorjani N., Ahmad M., Catarino P., Brittin R., Trabzuni D., Al-Mohanna F., Narula N., Narula J., Westaby S. Activation of apoptotic caspase cascade during the transition to pressure overload-induced heart failure // J. Am. Coll. Cardiol. 2006. Vol. 48, N 7. P. 1451-1458.
9. Park M., Vatner S.F., Yan L., Gao S., Yoon S., Lee G.J., Xie L.H., Kitsis R.N., Vatner D.E. Novel mechanisms for caspase inhibition protecting cardiac function with chronic pressure overload // Basic Res. Cardiol. 2013. Vol. 108, N 1. P. 324.
10. Tait S.W., Green D.R. Mitochondria and cell death: outer membrane permeabilization and beyond // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2010. Vol. 11, N 9. P. 621-632.
11. Vaux D.L. Apoptosis timeline // Cell Death Differ. 2002. Vol. 9, N 4. P. 349-354.