
ОБЩАЯ ПАТОЛОГИЯ И ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

ЭНЕРГЕТИЧЕСКИЙ ДЕФИЦИТ КАК ВОЗМОЖНЫЙ ФАКТОР ИНДУКЦИИ КАСПАЗОЗАВИСИМОГО АПОПТОЗА КЛЕТОК МИОКАРДА ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА ПРИ ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННОЙ И ВТОРИЧНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

М.М.Азова, М.Л.Благоднаров, Е.А.Демуров, В.А.Фролов

Кафедра общей патологии и патологической физиологии (зав. — В.А.Фролов) ФГБОУ ВПО РУДН, Москва

У кроликов породы шиншилла с вазоренальной артериальной гипертензией и спонтанно-гипертензивных крыс определяли активность каспазы-3 и каспазы-8 в миокарде левого желудочка после 10-дневного применения макроэргического соединения фосфокреатина. Обнаружено, что введение фосфокреатина предупреждает активацию каспазы-3, наблюдаемую при вторичной и генетически обусловленной артериальной гипертензии, но не влияет на активность каспазы-8. Полученные результаты свидетельствуют о том, что при обоих видах артериальной гипертензии внутренний механизм инициации каспазного каскада в клетках миокарда преобладает над внешним, а одним из его индукторов является дефицит энергии.

Ключевые слова: *апоптоз, каспаза, артериальная гипертензия, миокард, фосфокреатин*

Апоптоз — генетически детерминированная программа клеточной гибели, индуцируемая внешними или внутриклеточными стимулами и реализующаяся через различные сигнальные пути, ведущими участниками которых являются инициаторные и эффекторные каспазы.

Факторами, индуцирующими апоптоз, являются нарушения ряда ключевых процессов, ответственных за нормальное функционирование клетки, к числу которых наряду с необратимыми повреждениями ДНК можно отнести и дефицит энергии в клетке. Показано, что способ клеточной гибели зависит от степени несоответствия энергетических потребностей клетки и продукции энергии в митохондриальном окислительном фосфорилировании [8]. Так, временное и обратимое снижение содержания АТФ в клетках стимулирует их апоптотическую гибель, реализующуюся через активацию белка р53, формирование апоптосомы и индукцию каспазного каскада [10,11], в то время

как почти полное истощение клеточных запасов АТФ вызывает некроз. Данное явление может быть объяснено тем, что сами апоптотические процессы являются энергозависимыми, и их осуществление затрудняется в условиях выраженного энергетического дефицита.

В последние годы значительное внимание уделяется изучению механизмов инициации и реализации апоптоза конечно детерминированных клеток, к числу которых относятся и кардиомиоциты. Показано, что артериальная гипертензия (АГ) способствует усилению программированной клеточной гибели в миокарде [1,3,5]. Можно предположить, что одним из индукторов апоптотической программы при АГ является дефицит энергии в кардиомиоцитах, связанный с возрастанием потребления клетками АТФ вследствие увеличившейся нагрузки на сердечную мышцу и развивающейся гипертрофии миокарда. Недостаточное энергообразование в клетках также может стать результатом кальциевой перегрузки митохондрий, приводящей к разобщению дыхательной цепи и

окислительного фосфорилирования [2]. Дефицит АТФ, в свою очередь, нарушает работу ионных насосов и наряду с кальциевой перегрузкой способствует снижению мембранного потенциала митохондрий и, как следствие, открытию пор и высвобождению проапоптотических факторов [4,7,9]. Представляется возможным оценить роль энергодефицита в индукции апоптотической гибели клеток миокарда при АГ методом введения в организм гипертензивных животных макроэргов. Цель данного исследования — изучение влияния фосфокреатина, относящегося к макроэргическим соединениям, на активность каспазы-3 и каспазы-8 в клетках миокарда левого желудочка (ЛЖ) при АГ различного генеза.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование выполнялось на самцах кроликов породы шиншилла ($n=24$) массой тела 3.0-3.5 кг и 15-недельных самцах крыс линий SHR и Wistar-Kyoto ($n=24$).

Влияние фосфокреатина на активность отдельных звеньев каспазного каскада в клетках миокарда ЛЖ при вторичной АГ изучали на кроликах. Эксперимент проводили в двух параллельных сериях, каждая из которых включала две группы животных: 1-я (опытная) — кролики с вазоренальной АГ сроком 4 нед; 2-я (контроль) — интактные кролики. АГ у кроликов опытных групп моделировали по Goldblatt [6] путем сужения брюшной аорты на $\frac{1}{3}$ от исходного диаметра над местом отхождения от нее почечных артерий. В I серии эксперимента животные не получали лечения, во II серии кроликам опытной группы, начиная с 18 сут АГ, вводили внутримышечно “Неотон” (действующее вещество фосфокреатин) в дозе 30 мг/кг в течение 10 сут.

Действие фосфокреатина на активность каспаз в миокарде ЛЖ при генетически обусловленной АГ изучали на крысах по аналогичной схеме. Опытные группы были представлены спонтанно-гипертензивными крысами линии SHR, а контрольные группы — нормотензивными крысами линии Wistar-Kyoto. Во II серии крысам опытной группы за 10 сут до достижения ими 15-недельного воз-

раста начинали ежедневное внутривентральное введение неотона в дозе 30 мг/кг.

В каждую группу вошли по 6 животных.

В соответствующие сроки всем животным под общим обезболиванием вскрывали грудную клетку и проводили экстирпацию сердца. Затем из стенки ЛЖ выделяли фрагмент миокарда массой 200-250 мг для биохимического исследования.

Содержание животных и работа с ними проводились в соответствии с приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г.

Лизаты ЛЖ сердца кроликов и крыс, полученные посредством гомогенизации фрагмента миокарда в среде выделения (20 мМ HEPES pH 7.5, 10 мМ KCl, 1.5 мМ MgCl₂, 1 мМ дитиотреитол), к которой добавляли коктейль ингибиторов протеаз (104 мМ AEBSF, 0.08 мМ апротинин, 1.5 мМ пепстатин А, 2 мМ лейпептин, 4 мМ бестатин, 1.4 мМ E-64) в соотношении 100:1 (все реактивы “Sigma”) с последующим центрифугированием при 15 000g в течение 30 мин при 4°C, использовали для оценки активности каспазы-3 и каспазы-8. Активность данных ферментов определяли колориметрическим методом с помощью наборов “Caspase 3 Assay Kit, Colorimetric” и “Caspase 8 Assay Kit, Colorimetric” (“Sigma”).

Исследования проводили на оборудовании Центра коллективного пользования (НОЦ) РУДН и Кафедры общей патологии и патологической физиологии медицинского факультета РУДН.

Статистические расчеты проводили с использованием программы “Statistica 6.0” (“StatSoft Inc.”), для оценки достоверности различий изучаемых выборок применяли U критерий Манна—Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Активность каспазы-3 в миокарде ЛЖ достоверно повышается по сравнению с контролем у кроликов с 4-недельной АГ, не получавших лечения (I серия). При этом активность каспазы-8 хотя и проявляет выраженную тенденцию к увеличению, однако от контрольного значения статистически значимо не отличается, что указывает на преобладание при вазоренальной АГ митохондриального механизма индукции каспазного каскада (табл. 1). Во II серии

Таблица 1. Активность каспазы-3 и каспазы-8 (нмоль/мин×мл) в миокарде ЛЖ сердца кроликов ($M \pm m$)

Показатель	I серия		II серия	
	контроль	АГ 4 нед	контроль	АГ 4 нед+неотон
Каспаза-3	0.27±0.03	0.36±0.02*	0.23±0.02	0.23±0.02
Каспаза-8	0.99±0.16	1.39±0.11	Н.о.	Н.о.

Примечание. * $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем. Н.о. — не определяли.

Таблица 2. Активность каспазы-3 и каспазы-8 (нмоль/мин×мл) в миокарде ЛЖ сердца крыс ($M \pm m$)

Показатель	I серия		II серия	
	контроль	SHR	контроль	SHR+неотон
Каспаза-3	0.18±0.02	0.27±0.03*	0.20±0.03	0.23±0.03
Каспаза-8	1.06±0.13	1.61±0.06*	0.51±0.10	0.95±0.10*

Примечание. * $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем.

эксперимента активность каспазы-3 в миокарде кроликов с АГ, получавших неотон, не отличается от контроля. Следовательно, неотон предупреждает увеличение интенсивности каспазозависимых апоптотических процессов в клетках миокарда ЛЖ, что позволяет рассматривать энергодефицит в качестве одного из ведущих механизмов индукции апоптоза кардиомиоцитов при вторичной АГ. Поскольку в I серии достоверного отличия от контроля при оценке активности каспазы-8 не обнаружено, данный показатель в миокарде кроликов с АГ, получавших неотон, нами не определялся.

У крыс линии SHR с генетически обусловленной АГ, не получавших лечения, к 15-недельному возрасту достоверно по сравнению с контролем повышается активность каспазы-3 и каспазы-8 (табл. 2), что свидетельствует об участии внешнего (рецепторно-опосредованного) пути в индукции каспазного каскада в клетках миокарда ЛЖ у спонтанно-гипертензивных крыс. В этой связи во II серии эксперимента после введения неотона мы измеряли активность обеих каспаз. Активность каспазы-3 в миокарде гипертензивных крыс, получавших препарат, статистически значимо от контроля не отличалась, в то время как активность каспазы-8 оставалась достоверно выше контрольного уровня. Следовательно, можно предположить, что передача апоптотического сигнала по внешнему (рецепторному) пути не связана с дефицитом энергии в миокарде. При этом отсутствие изменений активности каспазы-3 свидетельствует о том, что внешний путь апоптогенной сигнальной трансдукции не является определяющим и при генетически обусловленной АГ. Вероятно, как и в случае со вторичной АГ, основной вклад в инициацию каспазоза-

висимой апоптотической гибели клеток миокарда вносит внутриклеточный (митохондриальный) сигнал, возникающий в результате энергодефицита.

Таким образом, как при генетически обусловленной, так и при вторичной АГ в миокарде ЛЖ сердца вероятнее всего доминирует митохондриальный механизм индукции каспазного каскада, а одним из его триггерных факторов является дефицит энергии в клетке.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009-2013 годы (государственный контракт № П1302 от 9 июня 2010 г.).

ЛИТЕРАТУРА

1. Азова М.М., Благодаров М.Л., Фролов В.А. // Вестн. РУДН. Сер. Медицина. 2011. № 4. С. 44-47.
2. Постнов Ю.В. // Кардиология. 2004. № 6. С. 52-58.
3. Фролов В.А., Дроздова Г.А., Мустяца В.Ф., Благодаров М.Л. Гипотензивная терапия и сердце. М., 2009.
4. Chen X., Zhang X., Kubo H. et al. // Circ. Res. 2005. Vol. 97, N 10. P. 1009-1017.
5. Fortuno M.A., Ravassa S., Fortuno A. et al. // Hypertension. 2001. Vol. 38, N 6. P. 1406-1412.
6. Goldblatt H., Kahn J.R. // JAMA. 1938. Vol. 9. P. 685.
7. Gustafsson A.B., Gottlieb R.A. // Cardiovasc. Res. 2008. Vol. 77, N 2. P. 334-343.
8. Kushnareva Y., Newmeyer D. // Ann. N.Y. Acad. Sci. 2010. Vol. 1201. P. 50-57.
9. Lemasters J.J., Theruvath T.P., Zhong Z., Nieminen A.L. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. Vol. 1787, N 11. P. 1395-1401.
10. Li G.Y., Fan B., Su G.F. // Exp. Eye Res. 2009. Vol. 89, N 4. P. 581-589.
11. Samali A., O'Mahoney M., Reeve J. et al. // Apoptosis. 2007. Vol. 12, N 3. P. 465-474.

Получено 27.02.11