

ISSN 0365-9615

**БЮЛЛЕТЕНЬ
ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ
БИОЛОГИИ
И МЕДИЦИНЫ**

9

2014

ВЛИЯНИЕ ФОСФОКРЕАТИНА И ЭТИЛМЕТИЛГИДРОКСИПИРИДИНА СУКЦИНАТА НА ЭКСПРЕССИЮ БЕЛКОВ Вах И Bcl-2 В КАРДИОМИОЦИТАХ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА СПОНТАННО ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС

М.М.Азова, М.Л.Благонравов, В.А.Фролов

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

Исследовали влияние фосфокреатина и этилметилгидроксипиридина сукцината на экспрессию белков Вах и Bcl-2 в кардиомиоцитах левого желудочка спонтанно гипертензивных крыс линии SHR. Оба препарата не оказывают влияния на экспрессию Bcl-2, но достоверно снижают содержание белка Вах, причем фосфокреатин обладает более выраженным эффектом. Полученные данные указывают на значимую роль энергетического дефицита и окислительного стресса в индукции апоптоза кардиомиоцитов при генетически обусловленной артериальной гипертензии.

Ключевые слова: *апоптоз, артериальная гипертензия, кардиомиоцит, фосфокреатин, мексидол*

Артериальная гипертензия (АГ) различного генеза сопровождается усилением запрограммированной гибели кардиомиоцитов (КМЦ), триггерами которой могут выступать разные факторы, включая механические силы, окислительный стресс, гипоксию, хроническое персистирование ростовых факторов и т.д. [1,2,4,7,9]. При повышенном АД в клетках миокарда развивается умеренный энергетический дефицит, обусловленный возрастающей нагрузкой на сердечную мышцу, ее гипертрофией и кальциевой перегрузкой митохондрий. Снижение содержания АТФ, в свою очередь, способствует открытию митохондриальных пор и высвобождению проапоптотических факторов [8]. Формирование окислительного стресса при гипертонии преимущественно связано с деятельностью дыхательной цепи митохондрий [5] и активируемой ангиотензином II НАДФ-оксидазы [9]. В связи со способностью АФК индуцировать апоптоз, можно предполагать их участие в инициации наблюдаемой при АГ запрограммированной гибели КМЦ.

В проведенных нами ранее исследованиях показана способность макроэргов и в меньшей степени антиоксидантов снижать интенсивность апоптоза КМЦ [3], однако конкретные звенья апоптотических сигнальных путей, на которые воздействуют данные препараты, требуют дальнейшего изучения.

Целью данной работы являлось исследование влияния фосфокреатина, относящегося к макроэргическим соединениям, и этилметилгидроксипиридина сукцината, являющегося антигипоксантом и антиоксидантом, на экспрессию белков Вах и Bcl-2 в КМЦ левого желудочка (ЛЖ) сердца при генетически обусловленной АГ у крыс.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на самцах спонтанно гипертензивных 15-недельных крыс линии SHR. В I серии эксперимента спонтанно гипертензивные крысы не получали лечения ($n=4$). Во II серии крысам SHR за 10 сут до достижения ими 15-недельного возраста ежедневно внутривентриально вводили неон (действующее вещество — фосфокреатин)

в дозе 30 мг/кг ($n=4$) или мексидол (действующее вещество — этилметилгидроксипиридина сукцинат) в дозе 5 мг/кг ($n=4$). Контрольную группу составили 15-недельные нормотензивные крысы линии Wistar-Kyoto.

Крысам под общим обезболиванием вскрывали грудную клетку и производили экстирпацию сердца. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с приказом Минздрава 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.).

Образцы миокарда ЛЖ фиксировали в течение 72 ч в 10% нейтральном забуференном формалине, обрабатывали и заливали в парафин по общепринятой методике. Гистологические срезы толщиной 5 мкм наносили на стекла с поли-L-лизинным покрытием.

Иммуногистохимическое исследование содержания белков Bcl-2 и Вах выполняли с использованием первичных кроличьих поликлональных антител (“Santa Cruz Biotechnology Inc.”). Результаты реакции визуализировали с помощью набора реагентов “UltraVision Detection System” (“Thermo Scientific”). Препараты докрашивали гематоксилином Майера. Реакция считалась положительной при появлении коричневой окраски. При 400-кратном увеличении микроскопа с использованием сетки Автандилова исследовали 20 полей зрения в каждом препарате. При этом определяли отношение количества равноудаленных точек, приходящихся на позитивно окрашенную цитоплазму КМЦ, к общему количеству точек, занимаемых цитоплазмой КМЦ.

Полученные результаты обрабатывали в программе “Statistica 6.0” (“StatSoft Inc.”), для оценки достоверности различий изучаемых выборок применяли U критерий Манна—Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Bcl-2 в КМЦ экспрессировался на очень низком уровне и выявлялся не во всех полях зрения. Тем не менее у крыс линии SHR, не получавших ле-

чения, его содержание в миокарде ЛЖ было достоверно ниже, чем в контроле. В работе [6] также продемонстрирован невысокий уровень экспрессии данного белка в миокарде крыс SHR и Wistar-Kyoto, но достоверных отличий между линиями не выявили. Большое внимание привлекает проапоптотический белок Вах, содержание которого в ЛЖ крыс линии SHR почти в 3 раза превышало соответствующий показатель нормотензивных животных. Усиление экспрессии Вах служит доказательством значимости митохондриального пути в реализации программированной гибели КМЦ у гипертензивных животных, т.к. данный белок участвует в формировании пор в митохондриальной мембране, через которые высвобождаются цитохром C, эндонуклеаза G, AIF и другие проапоптотические факторы [10].

Экзогенный фосфокреатин у крыс линии SHR в КМЦ ЛЖ значительно уменьшал содержание Вах, которое при этом оставалось достоверно более высоким, чем у нормотензивных животных, что позволяет предполагать мультифакториальную природу усиления экспрессии данного белка в клетках миокарда в условиях повышенного АД. Введение неотона значимого влияния на содержание Bcl-2 в КМЦ не оказывало, хотя и наблюдалась некоторая тенденция к его увеличению.

При введении мексидола были получены аналогичные результаты: экспрессия Bcl-2 не изменялась, и достоверно уменьшалось содержание Вах, которое при этом было значимо выше, чем в контроле. Обращает на себя внимание тот факт, что влияние мексидола на экспрессию Вах достоверно слабее влияния неотона. Это объясняет обнаруженное нами ранее менее выраженное снижение общей интенсивности апоптоза после лечения этилметилгидроксипиридина сукцинатом по сравнению с эффектом после применения фосфокреатина [3].

Таким образом, генетически обусловленная АГ у крыс сопровождается активацией митохондриального пути апоптогенной сигнальной трансдукции, триггерами которой, вероятно, выступают энергетический дефицит и в меньшей мере окислительный стресс.

Содержание белков Bcl-2 и Вах (%) в КМЦ ЛЖ сердца крыс ($M \pm m$)

Белок	Линия Wistar-Kyoto	Линия SHR		
		без лечения	неотон	мексидол
Bcl-2	2.27±0.24	0.72±0.13*	1.34±0.26*	0.75±0.13*
Вах	14.32±0.72	42.18±1.61*	22.27±1.46**	32.02±1.30**

Примечание. $p < 0.05$ по сравнению * с линией Wistar-Kyoto, ** с линией SHR без лечения.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азова М.М., Благодравов М.Л., Демуров Е.А., Фролов В.А. // Бюл. экспер. биол. 2012. Т. 153, № 6. С. 800-802.
2. Азова М.М., Благодравов М.Л., Фролов В.А. // Биол. мембраны. 2012. Т. 29, № 4. С. 227.
3. Азова М.М., Благодравов М.Л., Фролов В.А. // Кубанский науч. мед. вестн. 2012. № 4. С. 158-161.
4. *Bishopric N.H., Andreka P., Slepak T., Webster K.A.* // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2001. Vol. 1, N 2. P. 141-150.
5. *Chen Q., Vazquez E.J., Moghaddas S. et al.* // *J. Biol. Chem.* 2003. Vol. 278, N 38. P. 36 027-36 031.
6. *Fortuno M.A., Ravassa S., Etayo J.C., Dnez J.* // *Hypertension.* 1998. Vol. 32, N 2. P. 280-286.
7. *Fortuno M.A., Ravassa S., Fortuno A. et al.* // *Hypertension.* 2001. Vol. 38, N 6. P. 1406-1412.
8. *Gustafsson A., Gottlieb R.* // *Cardiovasc. Res.* 2008. Vol. 77, N 2. P. 334-343.
9. *Pollock D.M.* // *Hypertension.* 2005. Vol. 45, N 4. P. 477-480.
10. *Westphal D., Dewson G., Czabotar P.E., Kluck R.M.* // *Biochim. Biophys. Acta.* 2011. Vol. 1813, N 4. P. 521-531.

Получено 25.08.13

