

## ОБЩАЯ ПАТОЛОГИЯ И ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

# АКТИВНОСТЬ НЕКОТОРЫХ ФЕРМЕНТОВ КАСПАЗНОГО КАСКАДА И СОКРАТИТЕЛЬНАЯ ФУНКЦИЯ МИОКАРДА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ОЧАГОВОЙ ИШЕМИИ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА

М.Л.Благонравов, М.М.Азова, М.В.Онуфриев\*, В.А.Фролов

*Кафедра общей патологии и патологической физиологии (зав. — В.А.Фролов) ГОУ ВПО РУДН; \*Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Москва*

У кроликов-самцов породы шиншилла моделировали очаговую ишемию левого желудочка. Через 1, 3 и 5 сут изучали активность каспазы-3 и каспазы-8 в миокарде левого и правого желудочка, а также сократительную активность сердечной мышцы. В перинфарктной зоне левого желудочка и в миокарде правого желудочка активность каспазы-3 достоверно повышалась, а активность каспазы-8 не отличалась от таковой в контроле. Также показаны значительное снижение сократительной способности левого желудочка и резкое увеличение гемодинамической нагрузки на правый желудочек. Полученные результаты свидетельствуют об индукции внутреннего (митохондриального) пути апоптоза клеток миокарда, наиболее вероятно, за счет гипоксии в левом желудочке и в результате перегрузки в правом желудочке.

**Ключевые слова:** апоптоз, ишемия, каспаза, миокард, сократительная функция

При остром инфаркте миокарда повреждение левого желудочка (ЛЖ) сердца не ограничивается лишь участком ткани, имеющим макроскопические признаки некроза. Ишемии подвергается более широкая область сердечной мышцы, в результате чего формируется так называемая перинфарктная зона, в которой имеются немногочисленные участки некротической гибели клеток, но большая часть кардиомиоцитов (КМЦ) в течение определенного времени сохраняет жизнеспособность. Данное состояние, получившее название “гибернации” или “оглушения”, сопровождается включением генетических механизмов молекулярной адаптации клеток к продолжающемуся ишемическому воздействию [10]. Есть также данные о том, что в перинфарктных и даже отдаленных неповрежденных участках стенки ЛЖ появляются отчетливые признаки воспалительной реакции [4]. При этом в пре-

некротической зоне миокарда имеет место индукция апоптоза КМЦ [3,13]. Отмечено, что при ишемии ЛЖ апоптотической гибели подвергаются также КМЦ правого желудочка (ПЖ) [5]. Вместе с тем остаются недостаточно понятными конкретные механизмы, за счет которых в условиях указанной патологии в клетках миокарда ЛЖ и ПЖ стимулируется апоптоз.

Цель исследования — изучение активности некоторых ферментов каспазного каскада и показателей сократительной способности ЛЖ и ПЖ.

### МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводили на кроликах-самцах породы шиншилла (масса тела 3.0-3.5 кг) в двух параллельных сериях, в каждой из которых были представлены 20 животных, разделенных на 4 группы. В 1-ю (контрольную) группу вошли интактные кролики, в три опытные — кролики с очаговой ишемией ЛЖ длительностью 1, 3 и 5 сут соответственно. Содержание и работу с животными осуществляли в

соответствии с приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г.

Очаговую ишемию ЛЖ моделировали перевязкой нисходящей ветви левой коронарной артерии на границе ее средней и нижней трети (в ходе хирургической операции под общим наркозом).

В I серии эксперимента исследовали биохимические механизмы, ответственные за апоптоз клеток сердечной мышцы. Для этого в миокарде перинфарктной области ЛЖ, а также в ПЖ определяли активность эффекторной каспазы-3 и инициаторной каспазы-8. Активированные каспазы играют ключевую роль в реализации заключительных стадий программированной клеточной гибели за счет способности к расщеплению определенных белковых субстратов. Появление продуктов подобного специфического протеолиза — важный маркер апоптоза [1]. Каспаза-3 представляет собой конечный фермент каспазного каскада, обеспечивающий программированную гибель клеток при реализации апоптогенных механизмов как по внутреннему, так и по внешнему сигнальным путям. По активности этого фермента можно судить об изменении интенсивности апоптоза в динамике изучаемого процесса, поэтому данный показатель исследовали на каждом сроке эксперимента. Инициаторная каспаза-8 активируется при воздействии разных триггерных молекул (ФНО, лимфотоксина и др.) на специфические мембранные рецепторы (Fas-, TNF-, DR- и др.) [15], что отражает лишь включение внешнего сигнального пути реализации апоптоза. В этой связи считали достаточным измерение активности каспазы-8 только в те сроки, когда активность каспазы-3 достигала максимального значения.

Под общим наркозом животным вскрывали грудную клетку и выполняли экстирпацию сердца. Из стенки ЛЖ и ПЖ вырезали образцы миокарда массой 200-250 мг. При этом ткань ЛЖ выделяли из участков жизнеспособной сердечной мышцы, граничащей с зоной некроза. Ткань миокарда отдельно ЛЖ и ПЖ измельчали в гомогенизаторе WiseTis серии HG-15 с ротором 8 мм при скорости 4500 об/мин. Для этого использовали среду выделения (20 мМ HEPES pH 7.5, 10 мМ KCl, 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ DTT), 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 фирмы “Sigma”). Гомогенаты центрифугировали на микроцентрифуге Heraeus fresco 17 (Thermo Electron LED GMBH; оборудование Центра коллективного пользования (НОЦ) РУДН, создан в рамках реализации Приоритетного национального проекта “Образование”) при 15 000g в

течение 30 мин при 4°C. Полученные супернатанты использовали для оценки активности каспазы-3 и каспазы-8.

Активность каспазы-3 определяли колориметрическим методом по скорости расщепления синтетического субстрата Ac-DEVD-pNA (N-ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп-нитроанилин, “Sigma”). Супернатант инкубировали в 96-луночных микропланшетах в течение 95 мин при 37°C в реакционном буфере (20 мМ HEPES pH 7.4, 2 мМ ЭДТА, 5 мМ DTT, 0.1% CHAPS) в двух параллельных пробах, одна из которых содержала 20 нМ Ac-DEVD-pNA, а другая — 20 нМ Ac-DEVD-pNA и 2 нМ специфического ингибитора каспазы-3 Ac-DEVD-CHO. Оптическую плотность регистрировали каждые 10 мин на ИФА-ридере Sunrise (“Tecan”) при  $\lambda=405$  нм. Активность каспазы-3 рассчитывали по разнице скоростей расщепления субстрата в пробах без ингибитора и в присутствии ингибитора с учетом калибровочной кривой оптической плотности стандарта pNA.

Активность каспазы-8 определяли колориметрическим методом по скорости расщепления синтетического субстрата Ac-IETD-pNA (N-ацетил-Иле-Глу-Тре-Асп-нитроанилин, “Sigma”). Супернатант инкубировали в 96-луночных микропланшетах при 37°C в реакционном буфере (20 мМ HEPES pH 7.4, 2 мМ ЭДТА, 5 мМ DTT, 0.1% CHAPS, 5% сахараза) в двух параллельных пробах, одна из которых содержала 20 нМ Ac-IETD-pNA, а другая — 20 нМ Ac-IETD-pNA и 0.05 нМ специфического ингибитора каспазы-8 Ac-IETD-CHO. Оптическую плотность регистрировали каждые 10 мин в течение 1 ч на ИФА-ридере Sunrise (“Tecan”) при  $\lambda=405$  нм. Активность каспазы-8 также рассчитывали по разнице скоростей расщепления субстрата в пробах без ингибитора и в присутствии ингибитора с учетом калибровочной кривой оптической плотности стандарта pNA.

Во II серии эксперимента исследовали сократительную способность ЛЖ и ПЖ. Под наркозом грудную клетку животного вскрывали, и сразу же его переводили на искусственную вентиляцию легких. Затем с использованием аппаратно-программного комплекса “Микард” (совмещенный с ПК аналогово-цифровой преобразователь с электрометрическими датчиками) измеряли внутрижелудочковое давление в ЛЖ и ПЖ в условиях реальной гемодинамики (ВДР), а также максимально развиваемое внутрижелудочковое давление (ВДМ) при 5-секундной окклюзии восходящей аорты.

Полученные данные обрабатывали с использованием программ, разработанных на кафедре общей патологии и патологической физиологии РУДН, а также программы “Biostat”. При анализе результатов применяли *t* критерий Стьюдента (до-

стоверной считали разность средних значений при  $p \leq 0.05$ ). Связь между отдельными процессами и явлениями устанавливали на основании корреляционного анализа.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

К концу 1-х суток эксперимента в миокарде ЛЖ достоверно увеличивалась активность каспазы-3 (табл. 1). На 3-и сутки данный показатель достигал максимальных значений, а на 5-е сутки практически возвращался к исходному. Полученные данные указывают на активизацию ферментных механизмов, ответственных за апоптоз, в миокарде ЛЖ в острый период его ишемического повреждения.

Активность каспазы-8, которую определяли на 3-и сутки исследования, имела лишь тенденцию к увеличению, но достоверно от контроля не отличалась. Таким образом, индукция каспазного каскада при ишемии ЛЖ осуществляется, по-видимому, только по внутреннему (митохондриальному) пути и не зависит от внешних механизмов сигнальной трансдукции, опосредованных мембранными рецепторами смерти.

В миокарде ПЖ сердца при очаговой ишемии ЛЖ также отмечено достоверное повышение активности каспазы-3, причем на всех трех сроках эксперимента (табл. 2). Как и в ЛЖ, активность каспазы-8 на 3-и сутки исследования достоверно не отличалась от контрольного значения, что также свидетельствует о реализации механизмов апоптоза лишь по внутреннему сигнальному пути.

**Таблица 1.** Активность каспазы-3 и каспазы-8 в миокарде ЛЖ при его очаговой ишемии ( $M \pm m$ )

Группа	Каспаза-3	Каспаза-8
Контрольная	0.1±0.01	0.19±0.05
Опытные		
1-е сутки	0.23±0.03*	Не определяли
3-и сутки	0.26±0.04*	0.27±0.04
5-е сутки	0.15±0.04	Не определяли

**Примечание:** здесь и в табл. 2, 3: \* $p \leq 0.05$  по сравнению с контролем.

**Таблица 2.** Активность каспазы-3 и каспазы-8 в миокарде ПЖ при очаговой ишемии ЛЖ ( $M \pm m$ )

Группа	Каспаза-3	Каспаза-8
Контрольная	0.08±0.01	0.28±0.06
Опытные		
1-е сутки	0.14±0.02*	Не определяли
3-и сутки	0.17±0.03*	0.34±0.04
5-е сутки	0.16±0.02*	Не определяли

Данные, характеризующие сократительную способность сердечной мышцы при ишемии ЛЖ, представлены в табл. 3.

ВДР ЛЖ достоверно и значительно снизилось в 1-е сутки исследования. В последующие сроки наблюдалась тенденция к постепенному возврату данного показателя к исходному уровню, однако вплоть до 5-х суток он оставался достоверно ниже контрольного значения. Динамика изменения ВДМ ЛЖ была аналогичной. Полученные данные указывают на закономерное ослабление сократительной способности миокарда ЛЖ в острый период его ишемического повреждения.

В ПЖ к концу 1-х суток отмечено резкое повышение как ВДР, так и ВДМ. В последующие сутки наблюдалось постепенное снижение данных показателей. Эти изменения, по-видимому, связаны со значительно увеличившейся гемодинамической нагрузкой на ПЖ на фоне ослабления сократительной способности ЛЖ.

Для выяснения возможных механизмов взаимосвязи между индукцией апоптотической гибели КМЦ и изменениями внутрисердечной гемодинамики при очаговой ишемии проведен корреляционный анализ по средним значениям между соответствующими показателями ЛЖ и ПЖ.

Полученные данные свидетельствуют о наличии сильной отрицательной корреляционной связи между ВДР ЛЖ и активностью каспазы-3 (-0.856), а также между ВДМ ЛЖ и активностью каспазы-3 в ЛЖ (-0.857). Корреляционные связи между ВДР ЛЖ и активностью каспазы-3, а также ВДМ ПЖ и активностью каспазы-3 были положительными (0.886 и 0.647 соответственно). Имеются основания рассматривать два механизма, которыми можно объяснить эту связь: тем, что сократительная способность ЛЖ падает в результате апоптотической гибели КМЦ, обеспечиваемой каспазой-3, или тем, что снижение сократительной способности миокарда ЛЖ становится причиной индукции каспазного каскада. Однако были высказаны предположения, заставлявшие усомниться в наличии прямой взаимозависимости между установленными в ходе данного исследования явлениями. Судя по степени повышения активности каспазы-3 в ЛЖ, усиление апоптоза КМЦ происходит не настолько резко, чтобы за короткий срок вызвать значительное снижение сократительной функции миокарда. Однако нет доказательств возможности индукции апоптоза КМЦ в результате снижения контрактильной активности сердечной мышцы. В этой связи представляется более убедительным следующее объяснение результатов корреляционного анализа по ЛЖ. По-видимому, снижение сократительной функции ЛЖ и апоптоз КМЦ связаны общей причиной,

**Таблица 3.** Показатели сократительной способности сердца при очаговой ишемии ЛЖ ( $M \pm m$ ; мм рт. ст.)

Группа	ЛЖ		ПЖ	
	ВДР	ВДМ	ВДР	ВДМ
Контрольная	135.7 $\pm$ 3.2	182.8 $\pm$ 3.4	31.48 $\pm$ 0.55	47.0 $\pm$ 0.95
Опытные	1-е сутки	110.6 $\pm$ 3.1*	50.12 $\pm$ 1.0*	59.8 $\pm$ 1.53*
	3-и сутки	115.6 $\pm$ 2.8*	47.1 $\pm$ 1.2*	53.3 $\pm$ 1.59*
	5-е сутки	117.4 $\pm$ 1.1*	144.6 $\pm$ 3.8*	46.6 $\pm$ 0.81*

которой может быть гипоксия в ишемизированных КМЦ. Известно, что выраженный и продолжительный дефицит кислорода в клетках стимулирует митохондриальные механизмы их апоптотической гибели [11]. В частности установлено, что в условиях гипоксии в клетках активизируется фактор, индуцируемый при гипоксии  $1\alpha$ , который стабилизирует проапоптотический белок p53 [9], а также увеличивает продукцию белков Bcl-2 [6,7,14]. Кроме того, гипоксия, нарушая транспорт электронов и протонов по дыхательной цепи, приводит к снижению мембранного потенциала и резко увеличивает проницаемость внутренней мембраны митохондрий. В результате в цитоплазму клетки из митохондрий начинает усиленно поступать цитохром C, который является важнейшим внутриклеточным индуктором каспазного каскада [11].

Для ПЖ характерна сильная положительная корреляционная связь между ВДР ПЖ и активностью каспазы-3 и положительная связь средней силы между ВДМ ПЖ и активностью каспазы-3, что вполне закономерно и свидетельствует об индукции ферментативных механизмов апоптоза вследствие значительной гемодинамической перегрузки ПЖ. Это согласуется с данными ряда авторов, показавших, что апоптоз КМЦ усиливается при повышении нагрузки на миокард [2,8,12].

Результаты исследования позволяют сделать следующие выводы. Во-первых, для миокарда ЛЖ при его очаговой ишемии характерны повышение активности каспазы-3 и снижение сократительной способности. Наличие сильной отрицательной корреляционной связи между активностью каспазы-3 и показателями функционального состояния ЛЖ косвенно свидетельствует о потенцировании механизмов апоптоза КМЦ по внутреннему (митохондриальному) пути под действием гипоксии. Во-вторых, в ПЖ также имеет место активизация каспазного каскада, наиболее вероятной причиной которой является его гемодинамическая перегрузка, вызванная ослаблением сократительной способности ЛЖ. В-третьих, в миокарде обоих желудочков сердца активность каспазы-8 достоверно не меняется,

что указывает на отсутствие участия внешних (рецепторно-опосредованных) механизмов в индукции апоптоза КМЦ как при ишемии ЛЖ, так и при перегрузке ПЖ. Следовательно, передача апоптотического сигнала осуществляется в обоих желудочках сердца лишь по внутреннему (митохондриальному) пути.

Работа выполнена в рамках ФЦП "Научные и научно-педагогические кадры инновационной России" на 2009-2013 гг.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Лушников Е.Ф., Абросимов А.Ю. Гибель клетки (апоптоз). М., 2001. С. 104.
2. Фролов В.А., Дроздова Г.А., Мустяца В.Ф., Благодяров М.Л. Гипотензивная терапия и сердце. М., 2009. С. 251.
3. Abbate A., Bussani R., Biondi-Zoccai G.G. et al. // Eur. Heart J. 2005. Vol. 26, N 19. P. 2039-2045.
4. Abbate A., Bussani R., Liuzzo G. et al. // Heart. 2008. Vol. 94, N 6. P. 737-742.
5. Abbate A., Bussani R., Sinagra G. et al. // Am. J. Cardiol. 2008. Vol. 102, N 6. P. 658-662.
6. Boyd J.M., Malstrom S., Subramanian T. et al. // Cell. 1994. Vol. 79, N 2. P. 341-351.
7. Bruick R.K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2000. Vol. 97, N 16. P. 9082-9087.
8. Condorelli G., Morisco C., Stasi G. et al. // Circulation. 1999. Vol. 99, N 23. P. 3071-3078.
9. Chen D., Li M., Luo J., Gu W. // J. Biol. Chem. 2003. Vol. 278, N 16. P. 13 595-13 598.
10. Depre C., Vatner S.F. // Heart Fail. Rev. 2007. Vol. 12, N 3-4. P. 307-317.
11. Greijer A.E., van der Wall E. // J. Clin. Pathol. 2004. Vol. 57, N 10. P. 1009-1014.
12. Hang T., Jiang S., Wang C. et al. // Acta Cardiol. 2007. Vol. 62, N 5. P. 461-465.
13. Oie E., Clausen O.P., Yndestad A. et al. // Scand. Cardiovasc. J. 2002. Vol. 36, N 2. P. 108-116.
14. Sowter H.M., Ratcliffe P.J., Watson P. et al. // Cancer Res. 2001. Vol. 61, N 18. P. 6669-6673.
15. Wallach D., Kang T.B., Kovalenko A. // Cell Death Differ. 2008. Vol. 15, N 10. P. 1533-1541.