

ОБЩАЯ ПАТОЛОГИЯ И ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

ИНДУКЦИЯ КАСПАЗНОГО КАСКАДА КАК НЕСПЕЦИФИЧЕСКИЙ ОТВЕТ МИОКАРДА НА ПОВРЕЖДЕНИЕ

М.Л.Благодоров

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

В 3 сериях исследования у кроликов моделировали острую гемодинамическую перегрузку левого желудочка, очаговую ишемию левого желудочка и дифтерийную интоксикацию. На 1, 3 и 5-е сутки от начала экспериментов оценивали активность каспазы-3 и каспазы-8 в миокарде отдельно левого и правого желудочков. Показано, что активность каспазы-3 увеличивается в левом желудочке во всех 3 моделях патологических процессов в сердце, а в правом — при острой перегрузке и ишемическом повреждении левого желудочка. Активность каспазы-8 повышается только в левом желудочке при его гемодинамической перегрузке, а в остальных случаях достоверно не изменяется. Сделан вывод о том, что индукцию каспазного каскада можно рассматривать в качестве неспецифического ответа миокарда на повреждение. При этом конкретные механизмы, ответственные за возникновение и передачу апоптогенных стимулов в клетках сердечной мышцы, имеют свои особенности.

Ключевые слова: каспаза, миокард, ишемия, перегрузка, дифтерия

За последнее десятилетие в литературе появилось значительное количество работ, посвященных проблеме апоптоза кардиомиоцитов (КМЦ) при различных заболеваниях сердечно-сосудистой системы. Так, показано, что активность апоптотических процессов повышается в миокарде при артериальной гипертензии [5], на фоне прогрессирующей дилатационной кардиомиопатии [1], при миокардитах [4,6]. Относительно роли программированной клеточной гибели в изменении тканевого гомеостаза сердечной мышцы при ишемическом повреждении однозначного мнения среди исследователей нет. В одних публикациях отмечается, что ишемия миокарда сопровождается усилением апоптоза КМЦ [2,3], однако другие авторы придерживаются противоположной точки зрения [9]. Примечательно, что некоторое время назад получила широкое распространение концепция, согласно которой апоптоз сердечных миоцитов

является фактором, обеспечивающим переход от первичной патологии сердца к формированию хронической сердечной недостаточности [7,8]. С учетом ведущей роли цистеиновых протеаз (каспаз) в реализации апоптотической гибели клеток можно допустить в качестве предположения, что индукция каспазного каскада является неспецифическим ответом миокарда на повреждение. Для оценки правомочности этой гипотезы было выполнено данное исследование — изучение активности эффекторной каспазы-3 и инициаторной каспазы-8 на трех принципиально отличающихся друг от друга моделях патологических процессов в сердце.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Исследование проводилось на кроликах-самцах породы шиншилла массой 3.0-3.5 кг в 3 сериях; в каждой серии использовали 20 животных, разделенных на 4 группы: контрольную (интактные кролики) и 3 опытные (1, 3 и 5 сут от начала соот-

ветствующего экспериментального патологического процесса). В I серии у животных опытных групп моделировали острую гемодинамическую перегрузку левого желудочка (ЛЖ), во II — очаговую ишемию ЛЖ, в III — дифтерийную интоксикацию. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с приказом МЗ СССР № 755 от 12.08.1977 г.

Острую гемодинамическую перегрузку ЛЖ воспроизводили у кроликов путем сужения восходящей аорты на $\frac{1}{3}$ с помощью металлической спирали. Очаговую ишемию ЛЖ моделировали методом перевязки нисходящей ветви левой коронарной артерии на границе ее средней и нижней трети. Дифтерийную интоксикацию вызывали посредством однократного внутривенного введения нативного дифтерийного токсина, предварительно оттитрованного на морских свинках, в дозе 0.3 минимальной летальной дозы на 1 кг массы тела кролика.

У всех животных под общим наркозом вскрывали грудную клетку и выполняли экстирпацию сердца. Из стенки ЛЖ и ПЖ вырезали образцы миокарда массой 200-250 мг. При этом у животных с острой очаговой ишемией миокарда ткань ЛЖ выделяли из участков жизнеспособной сердечной мышцы, граничащей с зоной некроза. Образцы 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 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 фирмы "Sigma"). Гомогенаты центрифугировали на микроцентрифуге "Heraeus fresco 17" ("Thermo Electron LED GMBH"; здесь и далее — оборудование Центра коллективного пользования (НОЦ) РУДН) при 15 000g в течение 30 мин при 4°C и 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 дитиотреитол, 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 длине волны

405 нм. Активность каспазы-3 рассчитывали по разнице скоростей расщепления субстрата в пробах без и в присутствии ингибитора с учетом калибровочной кривой оптической плотности стандарта pNA.

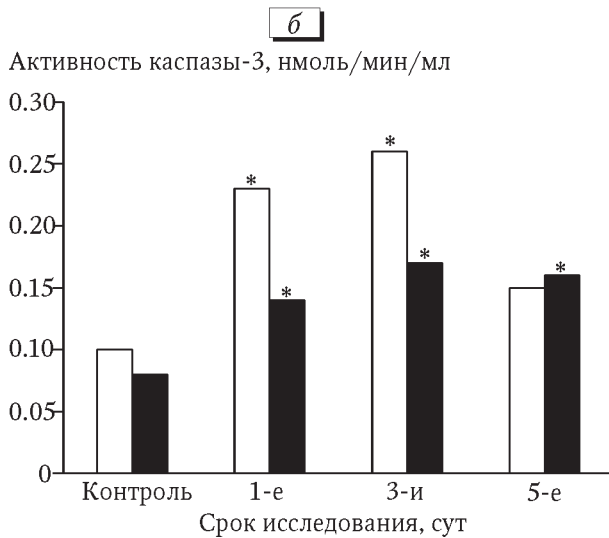
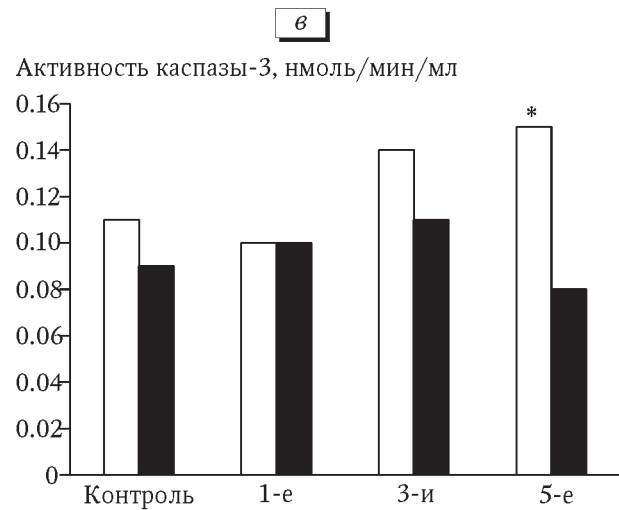
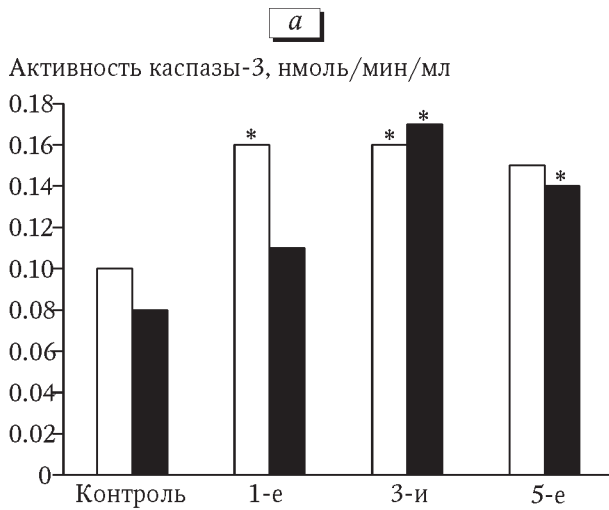
Активность каспазы-8 определяли колориметрическим методом по скорости расщепления синтетического субстрата Ac-IETD-pNA (N-ацетил-Иле-Глу-Тре-Асп-нитроанилин; "Sigma"). Супернатант инкубировали в 96-луночных микропланшетах при 37°C в реакционном буфере (20 мМ HEPES pH 7.4, 2 мМ ЭДТА, 5 мМ дитиотреитол, 0.1% CHAPS, 5% сахароза) 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 длине волны 405 нм. Активность каспазы-8 рассчитывали по разнице скоростей расщепления субстрата в пробах без и в присутствии ингибитора с учетом калибровочной кривой оптической плотности стандарта pNA.

Полученные данные статистически обрабатывали с использованием программ, разработанных на кафедре общей патологии и патологической физиологии РУДН, а также программы "Biostat". При анализе результатов применяли *t* критерий Стьюдента (за достоверную принималась разность средних значений при $p < 0.05$). Связь между отдельными процессами и явлениями устанавливалась на основании корреляционного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

При стенозировании восходящей аорты на 1-е сутки исследования наблюдается достоверное повышение специфической активности каспазы-3 в миокарде ЛЖ (рисунок, а). Для ПЖ статистически значимого отличия данного показателя от контроля не отмечается. К 3-м суткам активность каспазы-3 в ЛЖ сохраняется на прежнем уровне, а в ПЖ увеличивается и становится достоверно выше контрольного значения. На 5-е сутки появляется тенденция к снижению активности каспазы-3 в миокарде обоих желудочков, однако в ЛЖ данный показатель уже не имеет статистически значимого отличия от контрольного уровня, а в ПЖ по-прежнему остается достоверно выше него.

При очаговом ишемическом повреждении ЛЖ на 1-е сутки эксперимента происходит повышение активности каспазы-3 как в макроскопически неизменной области самого ЛЖ, так и в миокарде ПЖ (рисунок, б). К концу 3-х суток продолжается увеличение данного показателя, и в обоих желудочках он достигает пикового уровня. К 5-м суткам



Активность каспазы-3 в миокарде желудочков сердца кроликов при острой гемодинамической перегрузке ЛЖ (а), очаговой ишемии ЛЖ (б) и дифтерийной интоксикации (в).

Светлые столбики – ЛЖ, темные – ПЖ. * $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем.

активность каспазы-3 в ЛЖ значительно снижается и возвращается к контролю, а в ПЖ не изменяется относительно предыдущего срока.

Динамика активности каспазы-3 в миокарде ЛЖ и ПЖ при дифтерийной интоксикации представлена на рисунке (в).

В ЛЖ на 1-е сутки исследования изменений нет, на 3-и сутки отмечается тенденция к увеличению данного показателя, а на 5-е сутки рост активности продолжается, и отличие от контрольного уровня становится достоверным. Характерно, что в ПЖ активность каспазы-3 не имеет статистически значимого отличия от нормы ни на одном из сроков исследования. Можно предположить, в ПЖ дифтерийный токсин, с одной стороны, способствует снижению активности каспазы-3, а с другой — вызывает определенные изменения метаболизма, в результате которого активируется каспазный каскад, вследствие чего суммарный эффект заключается в отсутствии какой-либо динамики. В ЛЖ, имеющем значительно большую массу, количества

введенного токсина, по-видимому, недостаточно для прямого подавления активности каспазы-3, но при этом метаболические нарушения имеют сопоставимую с ПЖ выраженность, что и приводит к активации каспазных механизмов.

Учитывая, что при всех трех исследованных типах повреждения сердца, в основе которых лежат принципиально разные патогенетические механизмы, наблюдается достоверное повышение активности каспазы-3, мы считаем, что индукцию каспазного каскада можно расценивать в качестве неспецифического ответа миокарда на повреждение.

Исследовали активность каспазы-8 в миокарде желудочков сердца (таблица). Во всех сериях измерения проводили только в контроле и на тех сроках, когда активность каспазы-3 достигала максимального значения. Это связано с тем, что каспаза-8 является инициаторным ферментом и по ее активности можно лишь судить о вовлеченности внешнесигнального механизма в процесс стимуляции апоптоза.

Активность каспазы-8 в миокарде желудочков при различных типах патологических процессов в сердце ($M \pm m$)

Модель патологии сердца		Контроль	Срок исследования		
			1-е сутки	3-и сутки	5-е сутки
ЛЖ	Перегрузка ЛЖ	0.19±0.05	0.39±0.05*	н.о.	н.о.
	Очаговая ишемия ЛЖ	0.19±0.05	н.о.	0.27±0.04	н.о.
	Дифтерийная интоксикация	0.61±0.02	н.о.	н.о.	0.75±0.1
ПЖ	Перегрузка ЛЖ	0.28±0.06	н.о.	0.35±0.03	н.о.
	Очаговая ишемия ЛЖ	0.28±0.06	н.о.	0.34±0.04	н.о.
	Дифтерийная интоксикация	н.о.	н.о.	н.о.	н.о.

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

Полученные данные свидетельствуют о том, что значение исследованного показателя достоверно превышало норму только в миокарде ЛЖ при его острой гемодинамической перегрузке; во всех остальных случаях отличия недостоверны. Следовательно, при стенозировании восходящей аорты индукция каспазного каскада осуществляется в ЛЖ или только по внешнему (рецепторно-опосредованному) пути, или по внешнему и внутреннему (митохондриальному) путям. При ишемическом повреждении ЛЖ, дифтерийном поражении миокарда, а также при перегрузке ПЖ, вызванной застоем крови в малом круге кровообращения, активация каспаз происходит только по митохондриальному пути. Таким образом, несмотря на неспецифический характер ответа каспазного каскада на альтерацию сердца, конкретные механизмы, ответственные за возникновение и передачу апоптогенных стимулов в клетках миокарда, имеют свои особенности.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Лушникова Е.Л., Непомнящих Л.М. // Вестн. РАМН. 2006. № 7. С. 43-52.
2. Рыбакова М.Г., Кузнецова И.А. // Арх. патол. 2005. Т. 67, № 5. С. 23-25.
3. Abbate A., Morales C., De Falco M. et al. // Int. J. Cardiol. 2007. Vol. 121, N 1. P. 109-111.
4. Abbate A., Sinagra G., Bussani R. et al. // Am. J. Cardiol. 2009. Vol. 104, N 7. P. 995-1000.
5. González A., Ravassa S., López B. et al. // Curr. Opin. Cardiol. 2006. Vol. 21, N 4. P. 288-294.
6. Kytö V., Saraste A., Saukko P. et al. // Am. J. Cardiol. 2004. Vol. 94, N 6. P. 746-750.
7. Petrovic D. // Folia boil. (Praha). 2004. Vol. 50, N 2. P. 58-62.
8. Sharma A.K., Dhingra S., Khaper N., Singal P.K. // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. 2007. Vol. 293, N 3. P. H1384-H1390.
9. Takemura G., Fujiwara H. // J. Cell. Mol. Med. 2006. Vol. 10, N 1. P. 56-75.

Получено 29.02.10