

Апоптоз кардиомиоцитов и гипертрофия миокарда в динамике генетически обусловленной артериальной гипертензии у крыс

М.М.Азова¹, М.Л.Благоднаров², В.А.Фролов², О.Б.Гигани¹, О.О.Гигани¹

¹Российский университет дружбы народов, кафедра биологии и общей генетики, Москва (и.о. зав. кафедрой — проф. В.П.Щипков);

²Российский университет дружбы народов, кафедра общей патологии и патологической физиологии, Москва (зав. кафедрой — проф. В.А.Фролов)

В кардиомиоцитах спонтанно гипертензивных крыс исследованы интенсивность апоптоза с помощью метода TUNEL и ядерно-цитоплазматическое отношение, отражающее степень гипертрофии миокарда желудочков сердца. Обнаружено, что генетически обусловленную артериальную гипертензию у крыс сопровождает достоверное повышение индекса апоптоза кардиомиоцитов желудочков сердца, причем динамика клеточной гибели в правом и левом желудочках различна. Гипертрофия миокарда начинает развиваться в первые недели жизни крыс линии SHR на фоне сниженного апоптоза, и ее влияние на программированную гибель кардиомиоцитов более существенно в левом желудочке сердца.

Ключевые слова: апоптоз, кардиомиоциты, гипертрофия, артериальная гипертензия

Apoptosis of Cardiomyocytes and Myocardial Hypertrophy in Dynamics of Genetically Determined Hypertension in Rats

M.M.Azova¹, M.L.Blagonravov², V.A.Frolov², O.B.Gigani¹, O.O.Gigani¹

¹Peoples' Friendship University of Russia, Department of Biology and General Genetics, Moscow (Acting Head of the Department — Prof. V.P.Schipkov);

²Peoples' Friendship University of Russia, Department of General Pathology and Pathological Physiology, Moscow (Head of the Department — Prof. V.A.Frolov)

The rates of cardiomyocyte apoptosis and myocardial hypertrophy were investigated in spontaneously hypertensive rats by TUNEL-assay and evaluation of nuclear-cytoplasmic ratio relatively. It was found that genetic hypertension in rats was accompanied by a significant increase in apoptotic index of ventricular cardiomyocytes, and the dynamics of programmed cell death in the right and left ventricles was different. Myocardial hypertrophy began to develop in SHR rats within the first weeks of life and was associated with reduced apoptosis rate. Moreover its effect on the programmed death of cardiomyocytes was more marked in the left ventricle of the heart.

Key words: apoptosis, cardiomyocytes, hypertrophy, arterial hypertension

Апоптоз представляет собой одну из форм клеточной гибели, свойственную эукариотическим организмам, находящимся на разных ступенях эволюционного развития [1]. Этот регулируемый процесс, который сопровождается изменением экспрессии определенных генов и фор-

мирование специфического клеточного фенотипа, возник для обеспечения тканевого гомеостаза и, главное, постоянства генетического материала [2]. Нарушения в механизмах инициации и реализации апоптотической гибели клеток могут способствовать развитию различных патологических процессов, особенно если это касается клеток с низким пролиферативным потенциалом, к числу которых относят и кардиомиоциты (КМЦ). В последние десятилетия интерес ученых во всем мире привлекает исследование роли апоптоза КМЦ в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. Уже накоплено немало экспериментальных доказательств усиления апоптоза в миокарде при ишемии, острой и хронической перегрузке, миокардитах [3–6].

Для корреспонденции:

Азова Мадина Мухамедовна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии и общей генетики Российского университета дружбы народов

Адрес: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8

Телефон: (495) 434-5288

E-mail: azovam@mail.ru

Статья поступила 25.06.2012, принята к печати 31.10.2012

Артериальная гипертензия (АГ) — один из наиболее распространенных видов патологии сердечно-сосудистой системы, создающий условия для повышения интенсивности программированной гибели клеток миокарда. Апоптогенными стимулами при этом могут быть активные формы кислорода, цитокины, ангиотензин II, растяжение кардиомиоцитов и другие факторы [7, 8]. Возможно также, что существенное влияние на гибель КМЦ оказывает развивающаяся при АГ гипертрофия миокарда [3, 9].

Целью данной работы было исследование интенсивности апоптоза и степени гипертрофии кардиомиоцитов правого и левого желудочков сердца в динамике генетически обусловленной артериальной гипертензии у крыс.

Материалы и методы

Эксперименты проводили на приобретенных в питомнике «Пушино» лабораторных животных — самцах спонтанно гипертензивных крыс (SHR) трех возрастов (8, 15 и 52 нед). В качестве контроля к крысам линии SHR использовали выращенных в виварии РУДН нормотензивных животных линии Wistar–Kyoto соответствующих возрастов. Численность каждой группы составляла 3 особи.

Под общим обезболиванием крысам вскрывали грудную клетку и производили экстирпацию сердца. Содержание животных и работу с ними проводили в соответствии с приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977. На проведение экспериментальной работы получено разрешение Этического комитета медицинского факультета РУДН (протокол № 92 от 15.04.2009). Образцы миокарда левого (ЛЖ) и правого (ПЖ) желудочков фиксировали в течение 72 ч в 10% растворе забуференного нейтрального формалина. Далее проводили обработку материала и заливку в парафин по общепринятой методике.

Иммуногистохимическое исследование. Гистологические срезы толщиной 5 мкм наносили на стекла с поли-L-лизинным покрытием. Апоптоз кардиомиоцитов оценивали по интенсивности фрагментации ДНК в ядрах, определяемой методом TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase mediated dUTP Nick End Labeling) с использованием набора реактивов Apo-BrdU-IHC In Situ DNA Fragmentation Assay Kit (BioVision, США). Препараты докрашивали гематоксилином. Реакцию считали положительной при появлении коричневой окраски в ядрах кардиомиоцитов. Анализировали 20 полей зрения в каждом препарате. Для количественной оценки интенсивности апоптоза определяли его индекс, представляющий собой отношение числа TUNEL-позитивных ядер к общему количеству ядер кардиомиоцитов в поле зрения.

Гистологическое исследование. Срезы миокарда толщиной 5–7 мкм окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином. Анализировали 15 полей зрения в каждом препарате и с помощью сетки Автандилова определяли содержание ядер и миофибрилл. Затем на основании полученных данных вычисляли ядерно-цитоплазматическое отношение (ЯЦО), отражающее степень гипертрофии миокарда.

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

Статистические расчеты осуществляли с использованием программы «Statsoft Statistica v. 6.0», для оценки достоверности различий изучаемых выборок применяли *t*-критерий Стьюдента.

Результаты исследования и их обсуждение

Результаты оценки фрагментации ДНК в КМЦ крыс контрольных и опытных групп представлены в табл. 1.

Согласно полученным данным, у спонтанно гипертензивных крыс в первые недели жизни интенсивность апоптоза КМЦ левого и правого желудочков сердца значимо ниже, чем у нормотензивных животных. Затем по мере развития АГ индекс апоптоза у них возрастает и у 15-недельных животных становится достоверно выше контроля. Однако далее динамика процесса в ЛЖ и ПЖ различна. В ЛЖ у годовалых крыс линии SHR индекс апоптоза снижается до контрольных значений, в то время как в ПЖ продолжает статистически значимо возрастать. Вероятно, миокард ЛЖ, в отличие от ПЖ, более эффективно адаптируется к хронической перегрузке, вследствие чего она практически перестает оказывать апоптогенное действие. В ранее проведенном в тех же группах исследовании активности каспазы 3, являющейся одним из ключевых проапоптотических ферментов, в ЛЖ нами были получены аналогичные результаты, тогда как в ПЖ отличий от контроля ни на одном из сроков исследования не обнаружено [10]. Сравнение результатов обоих экспериментов позволяет предположить наличие некаспазных механизмов в реализации программированной гибели КМЦ в условиях генетически обусловленной АГ, причем наиболее существенна их роль в миокарде ПЖ.

В связи с тем, что многие исследователи связывают апоптотическую гибель клеток миокарда с развивающейся гипертрофией, в данной работе мы определяли ядерно-цитоплазматическое отношение в КМЦ желудочков сердца, отражающее степень гипертрофии миокарда (табл. 2).

Таблица 1. Индекс апоптоза кардиомиоцитов в желудочках сердца крыс, % ($M \pm m$)

Возраст крыс, нед	Контрольная группа		Группа SHR	
	левый желудочек	правый желудочек	левый желудочек	правый желудочек
8	7,50 ± 0,73	3,81 ± 0,55	4,95 ± 0,41*	2,05 ± 0,36*
15	10,12 ± 0,86	4,49 ± 0,85	25,98 ± 0,94*	11,37 ± 0,85*
52	11,53 ± 0,90	7,44 ± 0,77	10,23 ± 0,73	18,96 ± 1,14*

* — $p < 0,05$ при сравнении с соответствующим показателем контрольной группы

Таблица 2. Ядерно-цитоплазматическое отношение в кардиомиоцитах желудочков сердца крыс ($M \pm m$)

Возраст крыс, нед	Контрольная группа		Группа SHR	
	левый желудочек	правый желудочек	левый желудочек	правый желудочек
8	0,28 ± 0,01	0,23 ± 0,01	0,17 ± 0,01*	0,16 ± 0,01*
15	0,27 ± 0,01	0,26 ± 0,01	0,11 ± 0,01*	0,21 ± 0,01*
52	0,15 ± 0,01	0,12 ± 0,01	0,11 ± 0,01*	0,14 ± 0,01

* — $p < 0,05$ при сравнении с соответствующим показателем контрольной группы

В ЛЖ спонтанно гипертензивных крыс ЯЦО на всех сроках исследования было достоверно ниже контрольных значений, что подтверждает наличие гипертрофии миокарда, причем у 15-недельных животных с АГ данный показатель достигает минимума и выходит на плато. В ПЖ 8- и 15-недельных крыс линии SHR ЯЦО статистически значимо ниже контроля, однако у годовалых гипертензивных и нормотензивных животных различий не обнаружено. Таким образом, у крыс с АГ гипертрофические процессы в миокарде начинаются в первые недели жизни на фоне снижения апоптотической гибели КМЦ.

Существуют литературные данные, показывающие, что развитие гипертрофии миокарда у крыс линии SHR происходит раньше, чем формирование артериальной гипертензии [11]. Более того, проведенные в ходе ряда исследований скрещивания спонтанно гипертензивных и нормотензивных крыс показали независимость генетических детерминант, определяющих артериальное давление и гипертрофию миокарда [12, 13]. Полученные нами результаты и данные других исследователей демонстрируют, что ростовые стимулы, активируя разные киназы, оказывают на апоптотическую гибель КМЦ противоположный эффект [3, 9]. Следовательно, можно предположить, что сигнальные пути, опосредующие развитие гипертрофии миокарда у крыс линии SHR, по крайней мере на начальных этапах ее развития, также подавляют запрограммированную клеточную гибель. Однако, по мере дальнейшего развития гипертрофии и повышения артериального давления, индукторы апоптоза начинают преобладать над его супрессорами, стимулируя гибель КМЦ, причем в ЛЖ и ПЖ апоптогенные сигналы, видимо, различны. Так, исходя из полученных результатов, можно предположить, что влияние гипертрофии миокарда на апоптотическую гибель КМЦ более значимо в ЛЖ, поскольку прекращение ее нарастания в ЛЖ сопровождается падением индекса апоптоза до контрольных значений. В ПЖ корреляции между интенсивностью апоптоза и степенью гипертрофии миокарда не обнаружено.

Выводы

1. Генетически обусловленную артериальную гипертензию у крыс сопровождает достоверное повышение интенсивности апоптоза кардиомиоцитов левого и правого желудочков сердца.

2. Динамика интенсивности апоптотических процессов в левом и правом желудочках сердца различна.

3. Гипертрофия миокарда левого и правого желудочков начинает развиваться в первые недели жизни крыс линии SHR на фоне сниженного апоптоза, и ее влияние на запрограммированную гибель кардиомиоцитов более существенно в левом желудочке сердца.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг.

Литература

1. Гордеева А.В., Лабас Ю.А., Звягильская Р.А. Апоптоз одноклеточных организмов: механизмы и эволюция // Биохимия. 2004. Т.69. №10. С.1301–1313.
2. Elmore S. Apoptosis: A Review of Programmed Cell Death // Toxicol Pathol. 2007. V.35. №4. P.495–516.
3. Bishopric N.H., Andrecka P., Stepak T., Webster K.A. Molecular mechanisms of apoptosis in the cardiac myocyte // Curr Opin Pharmacol. 2001. №1. P.141–150.
4. Благодоров М.Л., Азова М.М., Ковязин В.А. и др. Апоптоз кардиомиоцитов при диффузном токсическом поражении миокарда в эксперименте // Фундаментальн. исслед. 2012. №5(2). С.252–255.
5. Благодоров 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. хим. 2010. №8. С.49–53.
6. Благодоров М.Л., Онуфриев М.В., Азова М.М., Фролов В.А. Активность некоторых ферментов каспазного каскада и сократительная функция миокарда при экспериментальной очаговой ишемии левого желудочка // Бюл. экспер. биол. и мед. 2010. Т.150. №12. С.612–615.
7. Hamet R., Richard L., Dam T.V. et al. Apoptosis in target organs in hypertension // Hypertension. 1995. №26. P.642–648.
8. Fortuno M.A., Ravassa S., Fortuno A. et al. Cardiomyocyte apoptotic cell death in arterial hypertension. Mechanisms and potential management // Hypertension. 2001. №38. P.1406–1412.
9. Bernardo B.C., Weeks K.L., Pretorius L., McMullen J.R. Molecular distinction between physiological and pathological cardiac hypertrophy: Experimental findings and therapeutic strategies // Pharmacol. Ther. 2010. №128. P.191–227.
10. Азова М.М., Благодоров М.Л., Фролов В.А. Апоптоз клеток миокарда крыс при генетически обусловленной артериальной гипертензии // Биол. мембраны. 2012. Т.29. №4. С.227–230.
11. Hamet P., Thorin-Trescases N., Moreau P. et al. Workshop: excess growth and apoptosis: is hypertension a case of accelerated aging of cardiovascular cells? // Hypertension. 2001. V.37. №2(2). P.760–766.
12. Innes B.A., McLaughlin M.G., Kapuscinski M.K. et al. Independent genetic susceptibility to cardiac hypertrophy in inherited hypertension // Hypertension. 1998. V.31. №3. P.261–267.
13. Постнов А.Ю., Фомина О.П., Петрухина В.А. и др. Генетическая модель гипертрофии миокарда без повышенного артериального давления у крыс // Артериал. гипертен. 2003. Т.9. №4. С.115–116.

Информация об авторах:

Благодоров Михаил Львович, доктор медицинских наук, доцент кафедры общей патологии и патологической физиологии Российского университета дружбы народов
Адрес: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8
Телефон: (495) 433-1211
E-mail: blagonravovm@mail.ru

Фролов Виктор Алексеевич, доктор медицинских наук, профессор, заведующий кафедрой общей патологии и патологической физиологии Российского университета дружбы народов
Адрес: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8
Телефон: (495) 434-7303
E-mail: frolov@med.rudn.ru

Гигани Ольга Борисовна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии и общей генетики Российского университета дружбы народов
Адрес: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8
Телефон: (495) 434-5288
E-mail: giolga@yandex.ru

Гигани Ольга Олеговна, кандидат биологических наук, доцент кафедры биологии и общей генетики Российского университета дружбы народов
Адрес: 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8
Телефон: (495) 434-5288
E-mail: ogigani@front.ru