

М. М. АЗОВА<sup>1</sup>, М. Л. БЛАГОНРАВОВ<sup>2</sup>, В. А. ФРОЛОВ<sup>2</sup>

**ВЛИЯНИЕ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО ДЕФИЦИТА И ОКИСЛИТЕЛЬНОГО  
СТРЕССА НА АПОПТОЗ КАРДИОМИОЦИТОВ И ГИПЕРТРОФИЮ  
МИОКАРДА У СПОНТАННО ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС**

<sup>1</sup>Кафедра биологии и общей генетики медицинского факультета ФГБОУ ВПО

«Российский университет дружбы народов»,

Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8, тел. (495) 4345288. E-mail: azovam@mail.ru;

<sup>2</sup>кафедра общей патологии и патологической физиологии медицинского факультета

ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов»,

Россия, 117198, г. Москва, ул. Миклухо-Маклая, 8

У спонтанно гипертензивных крыс линии SHR исследовано влияние мексидола, обладающего антигипоксической и антиоксидантной активностью, и макроэргического препарата неотонана на интенсивность апоптоза кардиомиоцитов и степень гипертрофии миокарда желудочков сердца. Обнаружено, что в левом желудочке одним из индукторов апоптотической гибели кардиомиоцитов является энергетический дефицит, в то время как развитию гипертрофии миокарда способствует окислительный стресс. Механизмы, инициирующие соответствующие процессы в правом желудочке, отличаются от таковых в левом желудочке и требуют дальнейшего изучения.

*Ключевые слова:* апоптоз, кардиомиоциты, гипертрофия, артериальная гипертензия, неотон, мексидол.

**M. M. AZOVA<sup>1</sup>, M. L. BLAGONRAVOV<sup>2</sup>, V. A. FROLOV<sup>2</sup>**

**THE EFFECT OF ENERGY DEFICIENCY AND OXIDATIVE STRESS ON CARDIOMYOCYTE APOPTOSIS  
AND MYOCARDIAL HYPERTROPHY IN SPONTANEOUSLY HYPERTENSIVE RATS**

<sup>1</sup>Department of biology and general genetics, medical faculty of peoples' friendship University of Russia,

Russia, 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 8, tel. (495) 4345288. E-mail: azovam@mail.ru;

<sup>2</sup>department of general pathology and pathological physiology, medical faculty of peoples'

friendship University of Russia,

Russia, 117198, Moscow, Miklukho-Maklaya str., 8

The effect of high-energy drug neoton and antihypoxic and antioxidant drug mexidol on apoptosis of cardiomyocytes and myocardial hypertrophy was investigated in spontaneously hypertensive rats. It was found that energy deficiency was one of the triggers of cardiomyocyte apoptosis and oxidative stress promoted myocardial hypertrophy in left ventricle. Inducers of these processes in the right ventricle remain unknown and should be investigated further.

*Key words:* apoptosis, cardiomyocyte, hypertrophy, hypertension, neoton, mexidol.

**Введение**

Апоптотическая гибель клеток, изучению которой в последние десятилетия уделяется большое внимание, вовлечена в разнообразные физиологические и патологические процессы, в том числе и в развитие сердечно-сосудистых заболеваний [8]. Так, известно, что обусловленная программированной клеточной гибелью потеря кардиомиоцитов (КМЦ) при ишемии, острой и хронической перегрузке миокарда [6, 7, 9] способствует развитию хронической сердечной недостаточности [5]. В этой связи важной медико-биологической задачей становится изучение механизмов, участвующих в инициации и реализации апоптоза КМЦ при различных патологических процессах в сердечно-сосудистой системе, в том числе и при артериальной гипертензии (АГ). На сегодняшний день известны два пути индук-

ции апоптоза: внешний (рецепторно-опосредованный) и внутренний, реализующийся с участием митохондрий [11]. В проведенных нами ранее исследованиях было установлено, что в КМЦ при АГ преобладает внутриклеточный механизм формирования апоптотического сигнала [3, 4]. Логично предположить, что генетически запрограммированная клеточная гибель, свойственная организмам, стоящим на разных уровнях организации, должна индуцироваться факторами, имеющими ключевое значение для жизнедеятельности клетки. К их числу, несомненно, можно отнести обеспеченность клетки энергией. Энергетический дефицит приводит к нарушению транспорта кальция и других ионов и, как следствие, падению электрохимического градиента в митохондриях, дальнейшему снижению синтеза АТФ, образованию активных форм кислорода (АФК), откры-

тию пор и высвобождению в цитозоль проапоптотических факторов [10, 13]. Причинами энергодефицита в КМЦ при АГ могут быть увеличение нагрузки на сердечную мышцу и развивающаяся гипертрофия миокарда, что приводит к несоответствию между возрастающими потребностями миокарда в кислороде и уровнем его поступления с кровью.

Целью данной работы явилось исследование влияния неотона, относящегося к макроэргическим соединениям, и мексидола, являющегося антигипоксантом и антиоксидантом, на интенсивность апоптоза и степень гипертрофии кардиомиоцитов желудочков сердца при генетически обусловленной артериальной гипертензии у крыс.

### Материалы и методы

Эксперименты проводились на приобретенных в питомнике лабораторных животных «Пушино» самцах спонтанно гипертензивных крыс в возрасте 15 недель. В качестве контроля вместе с крысами линии SHR использовали выращенных в виварии РУДН 15-недельных нормотензивных животных линии Wistar-Kyoto. В I серии эксперимента спонтанно гипертензивные крысы не получали лечения (опыт 1). Во II серии крысам опытной группы за 10 дней до достижения ими 15-недельного возраста начинали ежедневное внутривентральное введение неотона (действующее вещество – фосфокреатин) в дозе 30 мг/кг (опыт 2) или мексидола (действующее вещество – этилметилгидроксипиридинасукцинат) в дозе 5 мг/кг (опыт 3). Численность каждой группы составляла 3 особи.

У 15-недельных крыс контрольной и опытных групп под общим обезболиванием вскрывали грудную клетку и производили экстирпацию сердца. Содержание животных и работа с ними проводились в соответствии с приказом Минздрава СССР от 12.08.1977 г. № 755.

Образцы миокарда левого (ЛЖ) и правого (ПЖ) желудочков фиксировали в течение 72 часов в 10%-ном нейтральном забуференном формалине. 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 (Terminaldeoxynucleotidyltransferase-mediated dUTP nick-end labeling) с использованием набора реактивов «Apo-Brd U-IN CIn Situ DNA Fragmentation Assay Kit» («BioVision», США). Препараты докрасивали гематоксилином. Реакция считалась положительной при появлении коричневой окраски в ядрах кардиомиоцитов. Анализировали 20 полей зрения в каждом препарате. Количественную

оценку интенсивности апоптоза выполняли, определяя индекс апоптоза, 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 проводились на оборудовании центра коллективного пользования (НОЦ) РУДН и кафедры общей патологии и патологической физиологии медицинского факультета РУДН.

Статистические расчеты осуществлялись с использованием программы «STATISTICA 6.0» («StatSoftInc.», США), для оценки достоверности различий изучаемых выборок применялся t-критерий Стьюдента.

### Результаты и обсуждение

При проведении I серии эксперимента было обнаружено, что у 15-недельных крыс линии SHR индекс апоптоза КМЦ обоих желудочков сердца достоверно выше, чем у нормотензивных животных (табл. 1)

Результаты II серии эксперимента показали, что неотон, действующим веществом которого является макроэргическое соединение фосфокреатин, препятствует повышению индекса апоптоза КМЦ ЛЖ у спонтанно гипертензивных крыс и поддерживает данный показатель на уровне контроля. При применении мексидола, содержащего сукцинат, окисление которого сопровождается синтезом АТФ, и антиоксидант этилметилгидроксипиридин, индекс апоптоза клеток миокарда ЛЖ также статистически значимо ниже, чем у опытных животных, не получавших лечения, но достоверно выше контрольного уровня (табл. 1). Исходя из того, что в отличие от мексидола неотон обеспечивает быстрый синтез АТФ без участия дыхательной цепи и не обладает антиоксидантным действием можно полагать, что энергетический дефицит в клетках миокарда ЛЖ в сравнении с окислительным стрессом играет большую роль в инициации апоптотических процессов. Однако, учитывая полученные нами ранее результаты, нельзя исключать вклад АФК в индукцию программированной гибели КМЦ. Так, в ходе предыдущего эксперимента было обнаружено, что мексидол предупреждает активацию каспазы 8, являющейся ключевым звеном рецепторного пути инициации апоптоза, в то время как неотон не оказывает влияния на активность данного фермента [1, 2]. Вероятно, АФК в КМЦ при АГ синтезируются не только в результате изменения

Таблица 1

### Индекс апоптоза кардиомиоцитов в желудочках сердца крыс, % (M±m)

Отдел сердца	Контроль	Опыт 1 (SHR)	Опыт 2 (SHR+неотон)	Опыт 3 (SHR+мексидол)
Левый желудочек	10,12±0,86	25,98±0,94*	11,30±0,65 <sup>1</sup>	16,51±0,73* <sup>1</sup>
Правый желудочек	4,49±0,85	11,37±0,85*	13,78±0,95*	11,91±0,91*

Примечание: \* – показатель достоверно отличается от контроля при p≤0,05,

<sup>1</sup> – показатель достоверно отличается от опыта 1 при p≤0,05.

### Ядерно-цитоплазматическое отношение в кардиомиоцитах желудочков сердца крыс (M±m)

Отдел сердца	Контроль	SHR	SHR+неотон	SHR+мексидол
Левый желудочек	0,27±0,01	0,11±0,01*	0,12±0,01*	0,15±0,01* <sup>1</sup>
Правый желудочек	0,26±0,01	0,21±0,01*	0,17±0,01* <sup>1</sup>	0,18±0,01* <sup>1</sup>

**Примечание:** \* – показатель достоверно отличается от контроля при  $p \leq 0,05$ ,

<sup>1</sup> – показатель достоверно отличается от опыта 1 при  $p \leq 0,05$ .

деятельности дыхательной цепи митохондрий, обусловленной снижением содержания АТФ в клетке, но и под влиянием других факторов [12].

В ПЖ ни один из препаратов не влияет на интенсивность апоптотических процессов, о чем свидетельствует отсутствие достоверного изменения индекса апоптоза у спонтанно гипертензивных крыс, которым вводили либо неотон, либо мексидол, по сравнению с животными той же линии, не получавшими лечения. Следовательно, механизмы инициации программированной клеточной гибели в ПЖ отличаются от таковых в ЛЖ и не зависят от окислительного стресса и нарушения энергетического баланса в клетке.

В связи с возможной ролью апоптоза как фактора, лимитирующего развитие гипертрофии миокарда, нами было также изучено влияние мексидола и неотона на степень гипертрофии КМЦ желудочков сердца спонтанно гипертензивных крыс. В таблице 2 приведены данные, полученные при исследовании ЯЦО в КМЦ крыс контрольной и опытных групп.

Согласно полученным результатам, ЯЦО в КМЦ ЛЖ при введении неотона не меняется и остается достоверно ниже контрольных значений, указывая на развивающуюся гипертрофию, в то время как интенсивность апоптоза под действием того же препарата значительно снижается. Таким образом, можно предположить, что апоптоз не является ответной реакцией миокарда на гипертрофию. Гипертрофия наряду с сопутствующей АГ перегрузкой сердечной мышцы вносит определенный вклад в формирование энергодифицита в КМЦ, но, возможно, при введении экзогенных источников энергии перестает оказывать апоптогенное действие. Лечение спонтанно гипертензивных крыс мексидолом приводит к статистически значимому повышению ЯЦО в КМЦ ЛЖ, но при этом оно остается достоверно ниже контроля, что указывает на наличие умеренного антигипертрофического эффекта данного препарата. Это, в свою очередь, свидетельствует об участии окислительного стресса в развитии гипертрофии ЛЖ у спонтанно гипертензивных крыс, причем, как было отмечено выше, причиной окислительного стресса является не только энергетический дефицит. Так, существуют исследования, показывающие, что ангиотензин II наряду с активацией НАДФ-оксидазы и синтезом АФК стимулирует образование эндотелина-1, способствующего развитию как гипертрофии, так и окислительного стресса в клетках миокарда [12].

В ПЖ введение обоих препаратов не предупреждает развития гипертрофии, на что указывает значимое снижение ЯЦО. Следовательно, факторы, ответственные за инициацию гипертрофических процессов, как и апоптоза, в ПЖ и ЛЖ отличаются.

Таким образом, механизмы индукции апоптотических и гипертрофических процессов в миокарде левого и правого желудочков сердца крыс линии SHR отличаются.

Одним из ключевых факторов, индуцирующих апоптоз кардиомиоцитов левого желудочка, является энергетический дефицит.

Значимый вклад в развитие гипертрофии миокарда левого желудочка вносит окислительный стресс.

Применение макроэргических препаратов и антиоксидантов может стать важным компонентом профилактики и лечения хронической сердечной недостаточности при артериальной гипертензии.

#### ЛИТЕРАТУРА

1. Азова М. М., Благодоров М. Л., Гигани О. Б., Гигани О. О., Фролов В. А. Мексидол как регулятор каспазозависимой апоптотической гибели клеток миокарда при артериальной гипертензии различного генеза // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2012. – № 2. – С. 10–13.
2. Азова М. М., Благодоров М. Л., Демуров Е. А., Фролов В. А. Энергетический дефицит как возможный фактор индукции каспазозависимого апоптоза клеток миокарда левого желудочка при генетически обусловленной и вторичной артериальной гипертензии // Бюллетень экп. биологии и медицины. – 2012. – Т. 153. № 6. – С. 800–802.
3. Азова М. М., Благодоров М. Л., Фролов В. А. Активность каспазы 3 и каспазы 8 в клетках миокарда правого желудочка при экспериментальной артериальной гипертензии // Вестник РУДН. Серия «Медицина». – 2011. – № 4. – С. 44–47.
4. Азова М. М., Благодоров М. Л., Фролов В. А. Биохимическое исследование апоптотической гибели клеток миокарда левого желудочка при экспериментальной артериальной гипертензии // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. – 2012. – № 5. – С. 27–30.
5. Бершова Т. В., Монаенкова С. В., Гасанов А. Г. Патогенетическое значение апоптоза кардиомиоцитов при сердечной недостаточности // Педиатрия. – 2009. – Т. 88. № 1. – С. 147–154.
6. Благодоров М. Л., Азова М. М., Фролов В. А. Биохимическое исследование апоптоза клеток миокарда при острой перегрузке левого желудочка в эксперименте // Вопросы биологической медицинской и фармацевтической химии. – 2010. – № 8. – С. 49–53.
7. 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 // Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. – 2010. – Т. 150. № 12. – С. 612–615.
8. Elmore S. Apoptosis: A review of programmed cell death // Toxicol. pathol. – 2007. – V. 35. № 4. – P. 495–516.
9. Fortuno M. A., Ravassa S., Fortuno A., Zalba G., Diez J. Cardiomyocyte apoptotic cell death in arterial hypertension. Mechanisms and potential management // Hypertension. – 2001. – V. 38. – P. 1406–1412.

10. Gustafsson A., Gottlieb R. Heart mitochondria: gates of life and death // Cardiovascular research. – 2008. – № 77. – P. 334–343.

11. Kang P. M., Izumo S. Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases // TRENDS in molecular medicine. – 2003. – V. 9. № 4. – P. 177–182.

12. Pollock D. M. Endothelin, angiotensin, and oxidative stress in hypertension // Hypertension. – 2005. – V. 45. – P. 477–480.

13. Tang L. H., Xia Z.-Y., Zhao B. et al. Phosphocreatine preconditioning attenuates apoptosis in ischemia-reperfusion injury of rat brain // Journal of biomedicine and biotechnology. – 2011. – V. 2011.

Поступила 18.09.2012

**А. В. АЛПАТОВ<sup>1</sup>, А. Н. ВАРНАВСКИЙ<sup>2</sup>, Р. А. ЗОРИН<sup>3</sup>**

## **ФАКТОРНЫЙ АНАЛИЗ ПАРАМЕТРОВ ЭЛЕКТРОЭНЦЕФАЛОГРАММ ДЛЯ ОЦЕНКИ ФУНКЦИОНАЛЬНОГО СОСТОЯНИЯ ЧЕЛОВЕКА ПРИ МОДЕЛИРОВАНИИ ЦЕЛЕНАПРАВЛЕННОЙ ДЕЯТЕЛЬНОСТИ**

<sup>1</sup>Кафедра биомедицинской и полупроводниковой электроники

Рязанского государственного радиотехнического университета,

Россия, 390005, г. Рязань, ул. Гагарина, 59/1, тел. 8-4912-46-03-66. E-mail: alpatov@sotcom.ru;

<sup>2</sup>кафедра автоматизации информационных и технологических процессов

Рязанского государственного радиотехнического университета,

Россия, 390005, г. Рязань, ул. Гагарина, 59/1,

тел. 8-4912-46-03-43. E-mail: varnavsky\_alex@rambler.ru;

<sup>3</sup>кафедра неврологии, нейрохирургии и медицинской генетики

Рязанского государственного медицинского университета имени академика И. П. Павлова,

Россия, 390039, г. Рязань, ул. Интернациональная, 3а, тел. 8-4912-36-01-66. E-mail: zorin.ra@gmail.com

В данной работе исследуются возможности использования факторного анализа спектральных показателей, корреляционной функции, функции когерентности в основных спектральных диапазонах с целью уменьшения пространства признаков и выделения наиболее информативных отведений для оценки функционального состояния человека при моделировании целенаправленной деятельности.

**Ключевые слова:** ЭЭГ, факторный анализ, спектральный анализ, функциональное состояние человека, целенаправленная деятельность.

**A. V. ALPATOV<sup>1</sup>, A. N. VARNAVSKY<sup>2</sup>, R. A. ZORIN<sup>3</sup>**

### **FACTOR ANALYSIS OF ELECTROENCEPHALOGRAPH PARAMETERS TO EVALUATE THE FUNCTIONAL CONDITION OF THE PERSON AT MODELING PURPOSEFUL ACTIVITY**

<sup>1</sup>Department of biomedical and semiconductor electronics of Ryazan state radio engineering university,  
Russia, 390005, Ryazan, Gagarin street, 59/1, tel. 8-4912-46-03-66. E-mail: alpatov@sotcom.ru;

<sup>2</sup>department of automation of information and technologic process of Ryazan state radio engineering university,  
Russia, 390005, Ryazan, Gagarin street, 59/1, tel. 8-4912-46-03-43. E-mail: varnavsky\_alex@rambler.ru;

<sup>3</sup>department of neurology, neurosurgery and medical genetics

of Ryazan state medical university named after academician I. P. Pavlov,

Russia, 390039, Ryazan, International street, 3a, tel. 8-4912-36-01-66. E-mail: zorin.ra@gmail.com

This paper examines the possibility using factor analysis of spectral indices, the correlation function, the coherence function in the main spectral bands to reduce feature space and to extract the most information leads for evaluation of the functional state of the person at modeling purposeful activity.

**Key words:** EEG, encephalography, factor analysis, spectral analysis, the functional state of the person, purposeful activity.

### **Введение**

Математический анализ электроэнцефалограмм (ЭЭГ) является одним из наиболее перспективных и сложных направлений фундаментальной и клинической нейрофизиологии [3]. Количество параметров, используемых в математическом анализе ЭЭГ при использовании различных методов анализа (спектрального, периодометрического, когерентного, корреляционного методов), может достигать нескольких тысяч

[7], однако рядом авторов указывается, что медицинская информация нередко является избыточной [4].

Существует определённая группа методов, позволяющих уменьшить количество исследуемых параметров или отобрать наиболее значимые для последующего анализа, в частности, факторный, дискриминантный анализ, технология нейронных сетей [4]. Факторный анализ можно рассматривать как один из основных методов редукции (свёртки) пространства