

БИОХИМИЧЕСКОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ КЛЕТОК МИОКАРДА ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

© Авторы, 2012

М.М. Азова

к.б.н., доцент, кафедра биологии и общей генетики, медицинский факультет, ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов» (Москва)
E-mail: azovam@mail.ru

М.Л. Благонравов

к.м.н., доцент, кафедра общей патологии и патологической физиологии, медицинский факультет, ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов». E-mail: blagonravovm@mail.ru

В.А. Фролов

д.м.н., профессор, зав. кафедрой общей патологии и патологической физиологии, медицинский факультет, ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов». E-mail: frolov@med.rudn.ru

Исследована активность каспазы 3 и каспазы 8 в миокарде левого желудочка кроликов при экспериментальной артериальной гипертензии, вызванной сужением брюшной аорты.

Ключевые слова: апоптоз, каспаза, миокард, артериальная гипертензия.

Caspase-3 and caspase-8 activity was investigated in left ventricular myocardial cells of rabbits with experimental arterial hypertension caused by stenosis of the abdominal aorta.

Keywords: apoptosis, caspase, myocardium, arterial hypertension.

Артериальная гипертензия (АГ) является одним из наиболее распространенных видов патологии сердечно-сосудистой системы. Ее прогрессирование часто сопровождается развитием хронической сердечной недостаточности (ХСН) [1]. Анализ состояния исследований в данной области показал, что большое влияние на формирование ХСН оказывает запрограммированная гибель кардиомиоцитов, являющихся в большинстве своем детерминированными клетками [2–4]. Несмотря на наличие многочисленных данных, доказывающих повышение интенсивности апоптоза клеток миокарда при АГ, молекулярные механизмы, которые регулируют данный процесс, остаются не до конца изученными. На современном этапе развития медико-биологических наук большинство экспериментов проводятся с применением TUNEL (terminal deoxynucleotide nick-end labeling) или морфологических методов детекции апоптотической гибели клеток [5, 6]. Однако эти методы позволяют лишь установить факт апоптоза и его интенсивность. Для выявления механизмов инициации запрограммированной клеточной гибели (ПКГ) более информативным является биохимическое исследование. Оно заключается в оценке активности каспаз, относящихся к ключевым проапоптотическим

ферментам. Изучение активности эффекторной каспазы 3 позволяет определить интенсивность апоптоза, а инициаторной каспазы 8 – выявить вовлеченность внешнего (рецепторного) механизма в индукцию процесса [7, 8].

Цель исследования – определение интенсивности и возможных путей инициации апоптоза клеток миокарда левого желудочка сердца кроликов в динамике развития вазоренальной артериальной гипертензии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Эксперименты проводились на 25 самцах кроликов породы «Шиншилла» массой 2,4...2,7 кг. Животные были разделены на 4 группы – контрольную ($n = 6$) и 3 опытных: животные с одно- ($n = 6$), двух- ($n = 6$) и четырехнедельной ($n = 7$) АГ. У кроликов опытных групп моделировали вазоренальную АГ по Голдблатт путем сужения брюшной аорты на 1/3 от исходного диаметра над местом отхождения от нее почечных артерий. В указанные выше сроки исследования животным вскрывали грудную клетку и производили экстирпацию сердца. Аналогичным образом получали материал у интактных кроликов контрольной

группы. Все описанные манипуляции осуществлялись под общим обезболиванием. Содержание животных и работа с ними проводились в соответствии с приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г.

Ткань миокарда левого желудочка сердца кроликов измельчали в гомогенизаторе «WiseTis» серии HG-15 («Daihan Scientific», Южная Корея) с ротором 8 мм при скорости 4500 об/мин. Для этого использовали среду выделения (20 mM HEPES, pH 7,5, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl₂, 1 mM ДТТ), к которой добавляли коктейль ингибиторов протеаз (104 mM AEBSF, 0,08 mM аprotинин, 1,5 mM пепстатин А, 2 mM лейпептин, 4 mM бестатин, 1,4 mM E-64) в соотношении 100:1 (все реактивы были произведены фирмой «Sigma», США). Гомогенаты центрифугировали в микроцентрифуге «Heraeus fresco 17» («Thermo Electron LED GmbH», Германия) при 15000 g в течение 30 мин при температуре +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», США). Супернатант инкубировали в 96-луночных микропланшетах в течение 95 мин при 37 °C в реакционном буфере (20 mM HEPES, pH 7,4, 2 mM ЭДТА, 5 mM дитиотреитол, 0,1 % CHAPS) в двух параллельных пробах, одна из которых содержала 20 нмоль Ac-DEVD-pNA, а другая – 20 нмоль Ac-DEVD-pNA и 2 нмоль специфического ингибитора каспазы 3 Ac-DEVD-CHO. Оптическую плотность регистрировали каждые 10 мин на ИФА-ридере «Sunrise» («Tecan», Швейцария) при длине волны 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», США). Супернатант инкубировали в 96-луночных микропланшетах при 37 °C в реакционном буфере (20 mM HEPES, pH 7,4, 2 mM ЭДТА, 5 mM дитиотреитол, 0,1% CHAPS, 5 % сахараза) в двух параллельных пробах, одна из которых содержала 20 нмоль Ac-IETD-pNA, а другая – 20 нмоль Ac-IETD-pNA и 0,05 нмоль специфического ингибитора каспазы 8 Ac-IETD-CHO. Оптическую плотность регистрировали каждые 10 мин в течение 1 ч на ИФА-ридере «Sunrise» («Tecan», Швейцария) при длине волны 405 нм. Активность каспазы 8 рассчитывали по разнице скоростей расщепления субстрата в пробах без ингибитора и в присутствии ингибитора с учетом калибровочной кривой оптической плотности стандарта pNA.

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 («StatSoft Inc.», США), для оценки достоверности различий изучаемых выборок применялся *U*-критерий Манна–Уитни.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В таблице приведены результаты оценки активности каспазы 3 и каспазы 8 в миокарде левого желудочка сердца кроликов при экспериментальной АГ.

В течение двух недель после моделирования АГ отличий в активности каспазы 3 у контрольных и опытных животных обнаружено не было. Достоверное увеличение активности данного фермента в миокарде левого желудочка наблюдалось лишь у животных с четырехнедельной АГ. Именно на этом сроке впоследствии определялась активность каспазы 8, и была обнаружена выражен-

Активность каспаз в миокарде левого желудочка кроликов при вазоренальной артериальной гипертензии, M±m

Показатель	Группа			
	Контроль	Одна неделя	Две недели	Четыре недели
Каспаза 3, нмоль/(мин·мл)	0,27±0,03	0,27±0,03	0,27±0,03	0,36±0,02*
Каспаза 8, нмоль/(мин·мл)	0,99±0,16	–	–	1,39±0,11

П р и м е ч а н и е : * – показатель достоверно отличается от контроля при $p \leq 0,05$.

ная тенденция к ее росту, однако отличие от контроля оказалось недостоверным.

Таким образом, полученные результаты позволяют говорить о значимом возрастании интенсивности апоптотических процессов в клетках миокарда левого желудочка при вазоренальной артериальной гипертензии. Недостоверность отличий в активности каспазы 8 у контрольной и опытных групп животных свидетельствует о преобладании митохондриального (внутреннего) механизма инициации клеточной гибели.

Вероятно, фактором, создающим условия для усиления ПКГ, в данном случае выступает хроническая перегрузка левого желудочка, возникающая в результате АГ. В проведенных ранее исследованиях на самцах кроликов с острой перегрузкой левого желудочка, вызванной сужением восходящей аорты, также было обнаружено достоверное увеличение активности каспазы 3 в миокарде левого желудочка, однако индукция каспазного каскада осуществлялась по рецептор-опосредованному пути [9]. Это позволяет предположить, что апоптоз выступает неспецифической реакцией миокарда на развивающуюся перегрузку, и отличия касаются лишь способов инициации процесса. Острая перегрузка приводит к повреждению структурных элементов сердечной мышцы, что сопровождается развитием воспалительной реакции и, как следствие, активацией каспазы 8. При медленно развивающейся перегрузке, обусловленной АГ, воспаление отсутствует, и рецепторный механизм не участвует в индукции ПКГ. В этой связи интересны результаты, полученные при изучении активности каспаз в миокарде правого желудочка при острой перегрузке левого желудочка [9]. В данном случае нагрузка на миокард правого желудочка развивается не столь резко и вызывается застоем крови в малом круге кровообращения. Как оказалось, активация апоптоза при этом происходит по митохондриальному пути, т.е. так же, как и при хронической перегрузке, обусловленной артериальной гипертензией.

Согласно современным данным, существуют различные механизмы, способствующие высвобождению проапоптотических факторов из митохондрий при АГ. Так, было обнаружено, что при растяжении кардиомиоцитов *in vitro* усиливается выработка активных форм кислорода, что индуцирует апоптотическую гибель клеток [10, 11]. Также показано, что ангиотензин II (АТ II), связываясь с рецепторами, стимулирует клеточную гибель через активацию белка p53 [12, 13]. Более того, про-

апоптотический эффект АТ II может быть частично обусловлен и стимуляцией синтеза альдостерона *in vivo* [14]. Можно также предположить, что ПКГ кардиомиоцитов усиливается в результате повышения концентрации цитозольного кальция, что способствует увеличению проницаемости митохондриальной мембраны и активации внутреннего механизма инициации апоптоза [2, 15, 16]. Известно, что АГ, увеличивающая нагрузку на сердечную мышцу и сопровождающаяся ремоделированием и гипертрофией миокарда, приводит к увеличению потребления клетками АТФ и гипоксии, вследствие чего формируется дефицит энергии в кардиомиоцитах. Дисбаланс энергопродукции и энергопотребления, обусловленный недостатком восполнения энергии в клетках, может также стать результатом кальциевой перегрузки митохондрий [17]. Обнаружено, что снижение содержания АТФ в клетках способствует активации белка p53, формированию апоптосомы и индукции каспазозависимой апоптотической гибели [18, 19]. Таким образом, механизмы, играющие ключевую роль в инициации программированной гибели клеток миокарда *in vivo*, требуют дальнейшего более глубокого изучения.

ВЫВОДЫ

1. При экспериментальной артериальной гипертензии повышается активность каспазы 3 в миокарде левого желудочка, что указывает на усиление апоптотических процессов в миокарде на фоне хронической перегрузки сердца.

2. Отсутствие достоверного повышения активности каспазы 8 в левом желудочке свидетельствует об инициации каспазного каскада по внутреннему сигнальному пути.

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

ЛИТЕРАТУРА

1. Фролов В.А., Дроздова Г.А., Мустяца В.Ф., Благодравов М.Л. Гипотензивная терапия и сердце: Монография. М.: РУДН. 2009. 292 с.
2. Бершова Т.В., Монаенкова С.В., Гасанов А.Г. Патогенетическое значение апоптоза кардиомиоцитов при сердечной недостаточности // Педиатрия. 2009. Т. 88. № 1. С. 147–154.
3. Li Z., Bing O.H., Long X., Robinson K.G., Lakatta E.G. Increased cardiomyocyte apoptosis during the transition to heart failure in the spontaneously hypertensive rat // Am. J. Physiol. 1997. № 272 (5 Pt 2). P. H2313–2319.

4. *Petrovic D.* Cytopathological basis of heart failure--cardiomyocyte apoptosis, interstitial fibrosis and inflammatory cell response // *Folia Biol (Praha)*. 2004. V. 50. № 2. P. 58–62.
5. *Манских В.Н.* Морфологические методы верификации и количественной оценки апоптоза // *Бюллетень сибирской медицины*. 2004. № 1. С. 63–70.
6. *Takemura G., Fujiwara H.* Morphological aspects of apoptosis in heart diseases // *J. Cell. Mol. Med.* 2006. V. 10. № 1. P. 56–75.
7. *Hengartner M.O.* The biochemistry of apoptosis // *Nature*. 2000. № 407. P. 770–776.
8. *Robertson J.D., Zhivotovsky B.* New Methodology is a Key to Progress // *Cell Cycle*. 2002. V. 1 № 2. P. 119–121.
9. *Благодаров 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.
10. *Gonzalez A., Fortuno M.A., Ravassa S. et al.* Cardiomyocyte apoptosis in hypertensive cardiomyopathy // *Cardiovasc. Res.* 2003. № 59. P. 549–562.
11. *Cheng W., Li B., Kajstura J. et al.* Stretch-induced programmed myocyte cell death // *J. Clin. Invest.* 1995. № 96. P. 2247–2259.
12. *Fortuño M.A., González A., Ravassa S. et al.* Clinical implications of apoptosis in hypertensive heart disease // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2003. V. 284. № 5. P. H1495–506.
13. *Leri A., Claudio P.P., Li Q. et al.* Stretch-mediated release of angiotensin II induces myocyte apoptosis by activating p53 that enhances the local rennin-angiotensin system and decreases the Bcl-2-to-Bax protein ratio in the cell // *J. Clin. Invest.* 1998. № 101. P. 1326–1342.
14. *De Angelis N., Fiordaliso F., Latini R. et al.* Appraisal of the role of angiotensin II and aldosterone in ventricular myocyte apoptosis in adult normotensive rat // *J. Mol. Cell Cardiol.* 2002. V. 34. № 12. P. 1655–1665.
15. *Lemasters J.J., Theruvath T.P., Zhong Z., Nieminen A.L.* Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death // *Biochim. Biophys. Acta.* 2009. V. 1787. № 11. P. 1395–1401.
16. *Chen X., Zhang X., Kubo H. et al.* Ca²⁺ influx-induced sarcoplasmic reticulum Ca²⁺ overload causes mitochondrial-dependent apoptosis in ventricular myocytes // *Circ. Res.* 2005. V. 97. № 10. P. 1009–1017.
17. *Постнов Ю.В.* О роли недостаточности митохондриального энергообразования в развитии первичной гипертензии: нейрогенная составляющая патогенеза гипертензии // *Кардиология*. 2004. № 6. С. 52–58.
18. *Li G.Y., Fan B., Su G.F.* Acute energy reduction induces caspase-dependent apoptosis and activates p53 in retinal ganglion cells (RGC-5) // *Exp. Eye Res.* 2009. V. 89. № 4. P. 581–589
19. *Samali A., O'Mahoney M., Reeve J. et al.* Identification of an inhibitor of caspase activation from heart extracts; ATP blocks apoptosome formation // *Apoptosis*. 2007. V. 12. № 3. P. 465–474.

Поступила 30 ноября 2011 г.

BIOCHEMICAL INVESTIGATION OF LEFT VENTRICULAR MYOCARDIAL CELL APOPTOSIS IN EXPERIMENTAL ARTERIAL HYPERTENSION

© Authors, 2012

M.M. Azova, M.L. Blagonravov, V.A. Frolov

Arterial hypertension (AH) is one of the dominant cardiovascular disorders that can often result in heart failure. It has been suggested that apoptosis may play a key role in heart failure as it causes the progressive loss of cardiomyocytes. Despite of many experimental data in this area, regulators of death and survival pathways in myocardial cell response to AH require further study. The experiment was performed on adult male Chinchilla rabbits in which arterial hypertension was modeled by abdominal aorta banding by 1/3 of its initial diameter. 1, 2 and 4 weeks later caspase-3 activity was measured in left ventricular myocardial cells. The activity significantly increased 4 weeks after modeling of AH. These results demonstrated enhanced apoptosis in left ventricular myocardial cells in experimental arterial hypertension. Caspase-8 activity was determined at 4 weeks after surgery. Absence of significant increasing of the activity indicated the predominance of intrinsic apoptogenic signals.