

АПОПТОЗ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ ВАЗОРЕНАЛЬНОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ КАК СЛЕДСТВИЕ НАРУШЕНИЯ ЭНЕРГЕТИЧЕСКОГО БАЛАНСА КЛЕТОК

Мадина Мухамедовна Азова*, Михаил Львович Благоданов, Виктор Алексеевич Фролов

Российский университет дружбы народов, г. Москва

Реферат

Цель. Исследование влияния фосфокреатина и этилметилгидроксипиридина сукцината на интенсивность апоптоза и степень гипертрофии кардиомиоцитов желудочков сердца в модели вазоренальной артериальной гипертензии у кроликов.

Методы. У кроликов опытных групп моделировали артериальную гипертензию по Н. Goldblatt путём сужения брюшной аорты на треть исходного диаметра над местом отхождения от неё почечных артерий. Выделяли четыре группы животных: с 4-недельной артериальной гипертензией, не получавших лечения; с 4-недельной артериальной гипертензией, получавших лечение фосфокреатином; с 4-недельной артериальной гипертензией, получавших лечение этилметилгидроксипиридина сукцинатом; интактные кролики (контрольная группа). У кроликов всех перечисленных групп определяли в кардиомиоцитах интенсивность апоптоза и степень гипертрофии миокарда путём определения ядерно-цитоплазматического отношения.

Результаты. Применение фосфокреатина и этилметилгидроксипиридина сукцината приводило к достоверному снижению индекса апоптоза в миокарде левого желудочка, в то время как аналогичным действием на правый желудочек обладает только фосфокреатин. Ни один из препаратов не оказывает влияния на степень гипертрофии миокарда, которая остаётся на уровне, характерном для животных, не получавших лечения.

Вывод. Один из факторов, индуцирующих апоптоз кардиомиоцитов, — энергетический дефицит, в связи с чем применение фосфокреатина или этилметилгидроксипиридина сукцината может стать важным компонентом профилактики и лечения хронической сердечной недостаточности при артериальной гипертензии; в условиях достаточного энергообеспечения гипертрофия миокарда не влияет на интенсивность апоптоза кардиомиоцитов.

Ключевые слова: апоптоз, кардиомиоциты, гипертрофия, артериальная гипертензия, фосфокреатин, этилметилгидроксипиридина сукцинат.

CARDIOMYOCYTE APOPTOSIS IN VASORENAL HYPERTENSION AS A CONSEQUENCE OF CATABOLISM ERROR M.M. Azova, M.L. Blagodarov, V.A. Frolov. Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, Russia. **Aim.** To investigate the effects of phosphocreatine and ethylmethylhydroxypyridine succinate on cardiomyocyte apoptosis intensity and degree of ventricular cardiomyocytes hypertrophy in rabbits with vasorenal hypertension (VH) model. **Methods.** VH was modeled on rabbits by artificial abdominal aortic stenosis by one-third of the diameter just above the renal arteries arising. Rabbits were divided to 4 groups: rabbits with 4-week VH without treatment, rabbits with 4-week VH treated with phosphocreatine, rabbits with 4-week VH treated with ethylmethylhydroxypyridine succinate, and healthy rabbits (control group). Cardiomyocyte apoptosis intensity and degree of ventricular cardiomyocytes hypertrophy was assessed in all of the rabbits by evaluation of nuclear-cytoplasmic ratio. **Results.** Use of phosphocreatine or ethylmethylhydroxypyridine succinate led to a significant reduction of the apoptotic index in the left ventricular myocardium, whereas the similar effect on the right ventricle was only typical for phosphocreatine. None of these drugs had an effect on myocardial hypertrophy degree, which remained on the same level as in the untreated hypertensive animals. **Conclusions.** Energy deficiency is one of the factors inducing cardiomyocyte apoptosis, so administration of phosphocreatine or ethylmethylhydroxypyridine succinate might be an important component of heart failure prevention and treatment in hypertension. Myocardial hypertrophy has no effect on the cardiomyocyte apoptosis intensity in case of proper energy supply. **Keywords:** apoptosis, cardiomyocytes, hypertrophy, arterial hypertension, phosphocreatine, ethylmethylhydroxypyridine succinate.

Апоптотическая гибель кардиомиоцитов (КМ) — один из факторов, способствующих развитию хронической сердечной недостаточности, который в последние десятилетия привлекает внимание многочисленных отечественных и зарубежных исследователей [3, 9]. Установлено, что в КМ, как и во многих других клеточных популяциях, существуют механизмы, обеспечивающие запрограммированную клеточную гибель как с участием внутриклеточных сигнальных путей, так и за счёт экзогенных факторов, взаимодействующих с рецепторами смерти на клеточной мембране [10]. В миокарде преобладают индукторы апоптоза над его супрессорами способствуют гипоксия, перегрузка миокарда, токсины, окислительный стресс [4, 5, 9, 13]. Известно, что

один из патологических процессов в сердечно-сосудистой системе, приводящих к хронической перегрузке сердца, — артериальная гипертензия (АГ). Возрастание нагрузки на сердечную мышцу и гипертрофические процессы вызывают увеличение энергопотребления в КМ и формирование энергетического дефицита, который в свою очередь влияет на транспорт ионов через мембрану, что приводит к кальциевой перегрузке митохондрий [11], нарушению работы дыхательной цепи, дальнейшему нарастанию энергетического дефицита и образованию активных форм кислорода [8, 13]. Таким образом, можно предполагать, что значимыми триггерами апоптотической гибели КМ при АГ выступают энергетический дефицит и окислительный стресс. Раскрытие механизмов инициации апоптоза КМ и возможностей их регуляции позволит усовершенствовать терапевти-

Таблица 1

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

	Контроль	Опыт 1 (АГ)	Опыт 2 (АГ + неотон)	Опыт 3 (АГ + мексидол)
Левый желудочек	4,74±0,46	31,97±1,04*	9,71±0,63*#	10,62±0,69*#
Правый желудочек	2,17±0,53	11,15±1,08*	8,08±0,77*#	11,07±1,18*

Примечание: АГ — артериальная гипертензия; *р ≤0,05 по сравнению с контролем; #р ≤0,05 по сравнению с опытом 1.

ческие подходы к предупреждению формирования и прогрессирования хронической сердечной недостаточности при АГ.

Целью данной работы было исследование влияния фосфокреатина, относящегося к макроэргическим соединениям, и этилметилгидроксипиридина сукцината, являющегося антигипоксанта и антиоксидантом, на интенсивность апоптоза и степень гипертрофии КМ желудочков сердца кроликов с вазоренальной АГ.

Исследование выполняли на 12 самцах кроликов породы «шиншилла» с массой тела 3–3,5 кг. У кроликов опытных групп моделировали АГ по Н. Goldblatt [7] путём сужения брюшной аорты на треть исходного диаметра над местом отхождения от неё почечных артерий. Контрольная группа была представлена интактными животными. Эксперимент проводили в двух параллельных сериях. В первой серии эксперимента животные с вазоренальной АГ сроком 4 нед не получали лечения (опыт 1). Во второй серии кроликам опытных групп, начиная с 18-х суток АГ, вводили внутримышечно фосфокреатин (неотон) в дозе 30 мг/кг (опыт 2) или этилметилгидроксипиридина сукцинат (мексидол) в дозе 5 мг/кг (опыт 3) 1 раз в сутки в течение 10 дней. Численность каждой группы — 3 особи.

Под общим обезболиванием кроликам контрольной и опытных групп вскрывали грудную клетку и производили экстирпацию сердца. Содержание животных и работа с ними соответствовали приказу Минздрава СССР №755 от 12.08.1977.

Образцы миокарда левого и правого желудочков фиксировали в течение 72 ч в 10% нейтральном забуференном формалине. Далее проводили обработку материала и заливку в парафин по общепринятой методике.

Для гистологического исследования срезы миокарда окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином. Анализировали 15 полей зрения в каждом препарате, и с помощью сетки Автандилова определяли содержание ядер и миофибрилл. Для оценки степени гипертрофии миокарда вычисляли ядерно-цитоплазматическое отношение.

Апоптоз КМ оценивали по интенсивности фрагментации дезоксирибонуклеиновой кислоты в ядрах, определяемой методом TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP Nick-End Labeling) с использованием набора реактивов «Apo-BrdU-*in situ* DNA fragmenta-

tion assay kit» (BioVision, США). Анализировали 20 полей зрения в каждом препарате. Вычисляли индекс апоптоза — отношение числа TUNEL-позитивных ядер к общему количеству ядер КМ в поле зрения.

Статистические расчёты осуществляли с использованием программы «Statistica 6.0» (StatSoft Inc., США), для оценки достоверности различий изучаемых выборок применяли t-критерий Стьюдента.

В табл. 1 представлены результаты исследования методом TUNEL интенсивности апоптоза КМ кроликов контрольной и опытных групп. У кроликов с 4-недельной АГ статистически значимо повышался индекс апоптоза в обоих желудочках сердца. Применение макроэргического соединения фосфокреатина (неотона) сопровождалось достоверным снижением индекса апоптоза КМ левого желудочка, однако данный показатель оставался значимо выше, чем в контрольной группе. Следовательно, можно предположить, что энергетический дефицит — существенный, но не единственный индуктор апоптотической гибели КМ при АГ. Аналогичным влиянием на апоптоз клеток миокарда обладает и комбинированный препарат мексидол, содержащий как сукцинат, окисление которого сопровождается синтезом аденозинтрифосфорной кислоты, так и антиоксидант этилметилоксипиридин. Таким образом, при АГ наряду с изменением энергетического баланса клетки и дисфункцией митохондрий, обусловленной кальциевой перегрузкой и нарушением работы электрон-транспортной цепи, что сопровождается образованием активных форм кислорода, значимым апоптогенным эффектом обладают и другие факторы. К их числу, согласно литературным данным, можно отнести ангиотензин II, стимулирующий апоптоз КМ через повышение экспрессии проапоптотического белка Вах, и растяжение КМ [6, 12]. Проведённое нами ранее в тех же группах животных исследование активности каспазы 3 (одного из проапоптотических ферментов) показало достоверное повышение её активности в левом желудочке у кроликов с 4-недельной АГ, причём введение неотона или мексидола снижало данный показатель до контрольного уровня [1, 2]. Сравнение полученных данных позволяет предполагать наличие некаспазных механизмов реализации апоптотической гибели КМ левого желудочка при вазоренальной АГ.

В правом желудочке неотон оказывал такое

Таблица 2

Ядерно-цитоплазматическое отношение в кардиомиоцитах желудочков сердца кроликов ($M \pm m$)

	Контроль	Опыт 1 (АГ)	Опыт 2 (АГ + неонот)	Опыт 3 (АГ + мексидол)
Левый желудочек	0,15±0,01	0,09±0,01*	0,09±0,01*	0,09±0,01*
Правый желудочек	0,15±0,01	0,10±0,01*	0,09±0,01*	0,10±0,01*

Примечание: АГ – артериальная гипертензия; * $p \leq 0,05$ по сравнению с контролем.

же действие на интенсивность апоптотических процессов, как и в левом желудочке, хотя его эффект не был столь резко выражен, в то время как применение мексидола не влияло на индекс апоптоза, который сохранялся на уровне, характерном для животных с 4-недельной АГ, не получавших медикаментозного лечения. Следовательно, механизмы инициации апоптоза в правом желудочке несколько отличаются от таковых в левом желудочке и в меньшей степени определяются нарушением энергетического баланса в клетке и окислительным стрессом.

Для изучения возможного влияния гипертрофии миокарда, сопровождающей вазоренальную АГ у кроликов, на интенсивность апоптоза КМ нами было также исследовано действие мексидола и неонота на ядерно-цитоплазматическое отношение в КМ, отражающее степень гипертрофии миокарда. Как видно из табл. 2, ядерно-цитоплазматическое отношение в КМ обоих желудочков сердца при введении препаратов не менялось и оставалось достоверно ниже контрольных значений, указывая на наличие гипертрофии. Таким образом, неонот и мексидол, снижая интенсивность апоптоза, не оказывают влияния на гипертрофические процессы в миокарде. Вероятно, в условиях достаточного энергообеспечения сердечных миоцитов при АГ гипертрофия КМ не обладает выраженным апоптогенным эффектом.

ВЫВОДЫ

1. Один из факторов, индуцирующих апоптоз кардиомиоцитов, – энергетический дефицит, в связи с чем применение фосфокреатина или этилметилгидроксипиридина сукцината может стать важным компонентом профилактики и лечения хронической сердечной недостаточности при артериальной гипертензии.

2. В условиях достаточного энергообеспечения гипертрофия миокарда не влияет на интенсивность апоптоза кардиомиоцитов.

ЛИТЕРАТУРА

1. Азова М.М., Благодаров М.Л., Гигани О.Б. и др. Мексидол как регулятор каспазозависимой апопто-

тической гибели клеток миокарда при артериальной гипертензии различного генеза // Человек и его здоровье. – 2012. – №2. – С. 10–13.

2. Азова М.М., Благодаров 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 // Бюлл. эксп. биол. и мед. – 2012. – Т. 153, №6. – С. 800–802.

3. Бершова Т.В., Монаенкова С.В., Гасанов А.Г. Патогенетическое значение апоптоза кардиомиоцитов при сердечной недостаточности // Педиатрия. – 2009. – Т. 88, №1. – С. 147–154.

4. Благодаров М.Л., Азова М.М., Фролов В.А. Активность каспазы 3 и каспазы 8 в миокарде желудочков сердца при экспериментальной дифтерийной интоксикации // Вопр. биол. мед. и фарм. хим. – 2011. – №2. – С. 28–31.

5. Благодаров 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. Fabris B., Candido R., Bortoletto M. et al. Dose and time-dependent apoptotic effects by angiotensin II infusion on left ventricular cardiomyocytes // J. Hypertens. – 2007. – Vol. 25, N 7. – P. 1481–1490.

7. Goldblatt H., Kahn J.R. Experimental hypertension: constriction of the aorta at various levels // JAMA. – 1938. – Vol. 9. – P. 685.

8. Gustafsson A.B., Gottlieb R.A. Heart mitochondria: gates of life and death // Cardiovasc. Res. – 2008. – Vol. 77. – P. 334–343.

9. Kang P.M., Izumo S. Apoptosis in heart: basic mechanisms and implications in cardiovascular diseases // TRENDS in Molec. Med. – 2003. – Vol. 9, N 4. – P. 177–182.

10. Kang P.M., Izumo S. Apoptosis and heart failure. A critical review of the literature // Circ. Res. – 2000. – Vol. 86. – P. 1107–1113.

11. Lemasters J.J., Theruvath T.P., Zhong Z., Nieminen A.-L. Mitochondrial calcium and the permeability transition in cell death // Biochim. Biophys. Acta. – 2009. – Vol. 1787, N 11. – P. 1395–1401.

12. Ravassa S., Fortuno M.A., Gonzalez A. et al. Mechanisms of increased susceptibility to angiotensin II-induced apoptosis in ventricular cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats // Hypertension. – 2000. – Vol. 36. – P. 1065–1071.

13. Sugamura K., Keaney Jr.J.F. Reactive oxygen species in cardiovascular disease // Free Radic. Biol. Med. – 2011. – Vol. 51, N 5. – P. 978–992.