

УДК 616-092.18; 616-092.9

## ОСОБЕННОСТИ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ РАЗЛИЧНОГО ГЕНЕЗА

Азова М.М.

*ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки РФ,  
Москва, e-mail: azovam@mail.ru*

В данной работе в обобщенном виде представлены результаты исследования динамики и механизмов инициации апоптотической гибели кардиомиоцитов у спонтанно гипертензивных крыс и кроликов с вазоренальной артериальной гипертензией. Показано, что при артериальной гипертензии достоверно повышается интенсивность апоптоза кардиомиоцитов левого и правого желудочков сердца, причем при его реализации преобладают некаспазные механизмы. При вазоренальной гипертензии одним из индукторов клеточной гибели является энергетический дефицит в клетках миокарда. В левом желудочке сердца спонтанно гипертензивных крыс основным триггером апоптотических процессов также выступает энергетический дефицит, но рецепторно-опосредованный путь передачи апоптогенного сигнала активируется окислительным стрессом. К факторам, способствующим преобладанию индукторов апоптоза кардиомиоцитов над его супрессорами у спонтанно гипертензивных крыс, относится эндотелин-1. Индукторы апоптоза клеток миокарда в правом желудочке спонтанно гипертензивных крыс отличаются от таковых в левом желудочке и требуют дальнейшего изучения.

**Ключевые слова:** апоптоз, кардиомиоцит, артериальная гипертензия, энергетический дефицит

## SOME ASPECTS OF CARDIOMYOCYTE APOPTOTIC CELL DEATH IN HYPERTENSION OF DIFFERENT TYPES

Azova M.M.

*Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, e-mail: azovam@mail.ru*

Investigations of the dynamics and induction of cardiomyocyte apoptotic cell death in spontaneously hypertensive rats and rabbits with vasorenal hypertension were summarized in this article. It was found that cardiomyocyte apoptosis rate in the left and right ventricles significantly increased under hypertension and caspase independent mechanisms were predominant in its implementation. Energy deficiency in myocardial cells is one of the factors inducing apoptotic cell death in vasorenal hypertension. Energy deficiency is also the main trigger of apoptotic processes in the left ventricle of spontaneously hypertensive rats, but extrinsic pathway is activated by oxidative stress. One of the factors facilitating to predominance of apoptotic inducers is endothelin-1. Inducers of myocardial cell apoptosis in the right ventricle differ from those in the left ventricle and should be further investigated.

**Keywords:** apoptosis, cardiomyocyte, hypertension, energy deficiency

Апоптоз представляет собой генетически детерминированный механизм клеточной гибели, иницируемый в ответ на внутриклеточные или внешние стимулы. Будучи физиологическим феноменом, данный способ элиминации клеток участвует в обеспечении тканевого гомеостаза и развития организма. Однако не менее важна роль апоптоза в формировании и прогрессировании патологических процессов. Так, многие наблюдения показывают, что программируемая гибель (ПКГ) кардиомиоцитов (КМЦ) относится к ключевым факторам, способствующим развитию сердечной недостаточности [9]. Учитывая, что одной из главных проблем современного здравоохранения являются сердечно-сосудистые заболевания, важнейшей медико-биологической проблемой стало выявление механизмов индукции и реализации апоптоза клеток миокарда с целью разработки медикаментозных способов регуляции данного процесса.

**Целью настоящей работы** является обобщение собственных результатов, полу-

ченных при исследовании механизмов инициации и динамики апоптотической гибели КМЦ при артериальной гипертензии (АГ) различного генеза, и их сопоставление с современными литературными данными.

В качестве модели эссенциальной АГ были взяты самцы спонтанно гипертензивных крыс линии SHR в возрасте 8 недель (стадия становления гипертонии), 15 недель (стабилизация повышенного АД на постоянном уровне) и 52 недель (длительно существующая артериальная гипертензия). Вторичная АГ моделировалась у самцов кроликов породы «Шиншилла» путем сужения брюшной аорты на 1/3 над местом отхождения от нее почечных артерий, при котором развивающаяся ишемия почек приводила к устойчивому повышению артериального давления. Сроками забора материала для оценки апоптоза кардиомиоцитов являлись 1, 2 и 4 недели после перенесенной операции. Контрольные группы животных были представлены нормотензивными крысами линии Wistar-Kyoto соответствующего возраста и пола и интактными кро-

ликами. Апоптоз КМЦ оценивался методом TUNEL, при этом определялся индекс апоптоза, представляющий собой отношение числа TUNEL-позитивных ядер КМЦ к общему количеству ядер КМЦ в поле зрения. Колориметрическим методом исследовалась активность каспазы 3 и каспазы 8 в миокарде подопытных животных.

Согласно полученным данным у спонтанно гипертензивных крыс в первые недели жизни интенсивность апоптоза КМЦ левого (ЛЖ) и правого (ПЖ) желудочков сердца значительно ниже, чем у нормотензивных животных, затем по мере развития АГ индекс апоптоза возрастает и у 15-недельных животных становится достоверно выше контроля. Однако далее динамика процесса в ЛЖ и ПЖ отличается. В ЛЖ у годовалых крыс линии SHR индекс апоптоза снижается до контрольных значений, в то время как в ПЖ продолжает увеличиваться. Вероятно, ЛЖ более эффективно, чем ПЖ, адаптируется к хронической гемодинамической перегрузке. При оценке активности каспазы 3 в ЛЖ нами были получены аналогичные результаты, однако в ПЖ отличий от контроля ни на одном из сроков исследования обнаружено не было [5]. Полученные результаты дают возможность предположить наличие некаспазных механизмов в реализации программной гибели КМЦ в условиях генетически обусловленной АГ, причем наиболее существенную роль они играют в миокарде ПЖ. В ЛЖ 15-недельных крыс линии SHR также было обнаружено достоверное повышение активности каспазы 8, указывающее на активацию рецепторно-опосредованного пути индукции апоптоза.

При исследовании миокарда кроликов с вазоренальной АГ было выявлено статистически значимое повышение индекса апоптоза КМЦ ЛЖ уже через неделю после моделирования АГ и его дальнейшее увеличение вплоть до 4-х недель. В ПЖ интенсивность апоптотической гибели КМЦ у кроликов с 1-недельной АГ возрастала еще более существенно, нежели в ЛЖ, но оставалась на том же уровне на остальных сроках исследования с выраженной тенденцией к увеличению через 4 недели после моделирования АГ [2]. Исследование активности каспазы 3 показало достоверное ее повышение в ЛЖ лишь к 4-недельному, а в ПЖ – к 2-недельному сроку [4, 6], что подтверждает предположение о преобладании при АГ некаспазных механизмов гибели КМЦ, к числу которых можно отнести высвобождающиеся из митохондрий проапоптотические факторы: AIF (apoptosis-inducing factor) и эндонуклеазу G [17, 20]. Отсутствие активации каспазы 8 в миокар-

де кроликов с вазоренальной АГ указывает на формирование в данном случае внутриклеточного апоптотического сигнала.

При АГ триггерами апоптотической программы в КМЦ могут выступать различные факторы, включая механические силы, окислительный стресс, гипоксию, хроническое персистирование ростовых факторов и т.д. Установлено, что растяжение КМЦ крыс повышает индекс апоптоза, что сопровождается увеличением экспрессии Fas-рецептора на клетках, и, следовательно, активацией внешнего сигнального пути инициации ПКГ [12]. Однако механические силы нельзя считать основным индуктором апоптоза сердечных миоцитов в связи с отсутствием выраженной корреляции между интенсивностью процесса и уровнем артериального давления у крыс.

Ключевыми участниками апоптотической гибели клетки являются митохондрии. ПКГ может быть опосредована открытием митохондриальных mPTP пор (mitochondrial permeability transition pore) во внутренней мембране митохондрий или повышением проницаемости внешней мембраны, высвобождением проапоптотических белков и последующим апоптозом [15]. Повышение проницаемости митохондриальных мембран и потеря разности потенциалов может рассматриваться своеобразной «точкой невозврата» в событиях, ведущих к клеточной гибели [14], которая может осуществляться как через активацию каспаз, так и через высвобождение каспазо-независимых эффекторов. МРТ-зависимая гибель КМЦ имеет место при кальциевой перегрузке митохондрий, окислительном стрессе и под действием некоторых других факторов [16, 18, 19, 25]. Существует ряд исследований, результаты которых позволяют полагать, что гипоксия является главным «нарушителем» равновесия между выживанием и гибелью клеток сердца [13]. Конкретным триггерным фактором в данном случае вероятнее всего выступает энергетический дефицит, приводящий к нарушению ионного транспорта, кальциевой перегрузке митохондрий и высвобождению из митохондрий проапоптотических факторов. Показано, что временное и обратимое снижение содержания АТФ в клетках стимулирует их апоптотическую гибель, в то время как почти полное истощение энергетических запасов вызывает некроз [23].

Для выявления возможной вовлеченности энергетического дефицита в индукцию апоптоза КМЦ нами было исследовано влияние неотона, действующим веществом которого является макроэргическое соединение фосфокреатин, на индекс апоп-

тоза и активность каспаз у животных с АГ различного генеза. Было обнаружено, что данный препарат предотвращает активацию каспазы 3 как при вазоренальной АГ у кроликов, так и у спонтанно гипертензивных крыс, однако не влияет на активность каспазы 8, повышение которой наблюдается в ЛЖ 15-недельных крыс линии SHR [3]. Индекс апоптоза в ЛЖ и ПЖ кроликов опытной группы при введении неотона значимо снижался, но был достоверно выше контрольных значений, что указывает на значимость энергетического дефицита при индукции ПКГ КМЦ у кроликов с вазоренальной АГ, но в данном случае существенную роль играют и другие триггеры апоптоза. В ЛЖ крыс линии SHR неотон снижал индекс апоптоза до контрольного уровня, но не влиял на соответствующий показатель в ПЖ. Следовательно, механизмы инициации апоптотической гибели КМЦ в ПЖ и ЛЖ спонтанно гипертензивных крыс отличаются, и нарушение энергетического баланса индуцирует ПКГ сердечных миоцитов только в ЛЖ.

Возможным индуктором апоптоза клеток миокарда может также выступать окислительный стресс, формирование которого связано как с деятельностью дыхательной цепи митохондрий [11, 24], так и НАДФ-оксидазы, активируемой ангиотензином II [21]. Для проверки данного предположения животным опытных групп вводился препарат «Мексидол», действующим веществом которого является этилметилгидроксипиридина сукцинат. Данный препарат, являясь производным 3-оксипиридина, обладает выраженными антиоксидантными свойствами, а сукцинат, входящий в его состав, усиливает окислительные процессы в цикле Кребса, увеличивая таким образом синтез АТФ. Оказалось, что мексидол, так же как и неотон, предотвращает активацию каспаз в миокарде кроликов с вазоренальной АГ, а также значимо снижает индекс апоптоза в ЛЖ, хотя данный показатель продолжает оставаться выше контроля. Однако, в отличие от неотона, мексидол не влияет на интенсивность апоптоза в ПЖ. При введении мексидола спонтанно гипертензивным крысам предотвращается активация не только каспазы 3, но и каспазы 8, что указывает на окислительный стресс как возможный индуктор рецепторно-опосредованной передачи апоптотического сигнала. Индекс апоптоза в ЛЖ крыс линии SHR также снижается под влиянием мексидола, но остается значимо выше контроля [1]. Следовательно, сукцинат, в отличие от фосфокреатина, не может полностью компенсировать энергодефицит, формирующийся в КМЦ ЛЖ спонтанно

гипертензивных крыс, что, возможно, обусловлено нарушением функций митохондрий на уровне дыхательной цепи.

Уже несколько десятилетий ангиотензин II является наиболее широко исследуемым фактором при изучении гипертензии, причем в последнее время внимание фокусируется на его способности стимулировать синтез эндотелина-1 [8, 22], который, взаимодействуя с  $ET_A$ -рецептором, приводит к сужению кровеносных сосудов и гипертрофии миокарда [10], что может опосредованно стимулировать ПКГ КМЦ. В этой связи было исследовано влияние ВQ-123, относящегося к селективным антагонистам  $ET_A$ -рецепторов, на апоптоз КМЦ 15-недельных спонтанно гипертензивных крыс. Было обнаружено, что введение ВQ-123 предупреждает повышение индекса апоптоза и активацию инициаторной каспазы 8 и эффекторной каспазы 3 в миокарде ЛЖ [7]. Полученные результаты позволяют полагать, что эндотелин-1 способствует индукции программированной гибели клеток миокарда при артериальной гипертензии. Вероятно, апоптогенное действие данного пептида обусловлено как его вазоконстрикторными свойствами, так и участием в развитии гипертрофии миокарда. При исследовании миокарда ПЖ изменений в интенсивности апоптоза под влиянием блокады  $ET_A$ -рецепторов выявлено не было. Отличия результатов, полученных при исследовании левого и правого желудочков сердца, могут быть обусловлены существенной ролью паракринного и аутокринного действия ET-1, вырабатываемого кардиомиоцитами левого желудочка. Это предположение подтверждается литературными данными, показывающими, что при перегрузке миокарда повышается интенсивность синтеза ET-1 в кардиомиоцитах левого желудочка, а в правом желудочке данный показатель остается неизменным [10].

### Выводы

1. При артериальной гипертензии различного генеза достоверно повышается интенсивность апоптотической гибели кардиомиоцитов левого и правого желудочков сердца, причем в ее реализации преобладают некаспазные механизмы.

2. При вазоренальной гипертензии значимым, но не единственным индуктором апоптоза КМЦ является энергетический дефицит в клетках миокарда.

3. В левом желудочке сердца спонтанно гипертензивных крыс основным триггером апоптотических процессов вероятно выступает энергетический дефицит. Определенный вклад в реализацию апоптотической

программы вносит окислительный стресс, активирующий рецепторно-опосредованный путь передачи апоптогенного сигнала.

4. К факторам, способствующим преобладанию индукторов апоптоза КМЦ над его супрессорами, у спонтанно гипертензивных крыс относится эндотелин-1.

5. Индукторы апоптоза КМЦ в правом желудочке спонтанно гипертензивных крыс отличаются от таковых в левом желудочке и требуют дальнейшего изучения.

*Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009–2013 гг. Гос. контракт № П1302 от 09.06.2010 г.*

#### Список литературы

1. Азова М.М., Благодоров М.Л., Гигани О.Б., Гигани О.О., Фролов В.А. // Человек и его здоровье. – 2012. – № 2. – С. 10–13.
2. Азова М.М., Благодоров М.Л., Гигани О.Б. и соавт. // Эколого-физиологические проблемы адаптации: материалы XV всероссийского симпозиума. – М., 2012. – С. 22–23.
3. Азова М.М., Благодоров М.Л., Демуров Е.А., Фролов В.А. // Биол. эксп. биол. и мед. – 2012. – Т. 153, № 6. – С. 800–802.
4. Азова М.М., Благодоров М.Л., Фролов В.А. // Вестник РУДН. Серия «Медицина». – 2011. – № 4. – С. 44–47.
5. Азова М.М., Благодоров М.Л., Фролов В.А. // Биологические мембраны. – 2012. – Т. 29, № 4. – С. 227–230.
6. Азова М.М., Благодоров М.Л., Фролов В.А. // Вопросы биол. меди фарм. химии. – 2012. – № 5. – С. 27–30.
7. Азова М.М., Благодоров М.Л., Фролов В.А. // Новые технологии в рекреации здоровья населения: материалы V региональной научно-практической конференции. – Владикавказ, 2012. – С. 149–152.
8. Alexander B.T., Cockrell K.L., Rinewalt A.N., et al. // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 2001, Vol. 280, R. 1388–R1392.
9. Anversa P., Olivetti G., Leri A., et al. // *Curr Opin Nephrol Hypertens.*, 1997, no. 6, pp. 169–176.
10. Brunner F., Bras-Silva C., Cerdeira A.S., Leite-Moreira A.F. // *Pharmacol Ther.*, 2006, Vol. 111, no. 2, pp. 508–531.
11. Chen Q., Vazquez E.J., Moghaddas S. et al. // *J Biol Chem.*, 2003, Vol. 278, pp. 36027–36031.
12. Cheng W., Li B., Kajstura J. et al. // *J Clin Invest.*, 1995, Vol. 96, pp. 2247–2259.
13. Depre C., Taegtmeyer H. // *Cardiovasc Res.*, 2000, Vol. 45, pp. 538–548.
14. Green D.R., Kroemer G. // *Science.*, 2004, Vol. 305, pp. 626–629.
15. Gustafsson A.B., Gottlieb R.A. Mechanisms of apoptosis in the heart // *J Clin Immunol.* – 2003. – Vol. 23. – P. 447–459.
16. Halestrap A.P. // *Biochem. Soc. Trans.* – 2006. – Vol. 34. – P. 232–237.
17. Kim G.T., Chun Y.S., Park J.W., Kim M.S. // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2003. – Vol. 309. – P. 619–624.
18. Kim J.S., He L., Lemasters J.J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* – 2003. – Vol. 304. – P. 463–470.
19. Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. // *Physiol. Rev.* – 2007. – Vol. 87. – P. 99–163.
20. Li L.Y., Luo X., Wang X. // *Nature.* – 2001. – Vol. 412, pp. 95–99.
21. Pollock D.M. // *Hypertension.* – 2005. – Vol. 45. – P. 477–480.
22. Sasser J.M., Pollock J.S., Pollock D.M. // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 2002, Vol. 283, R. 243–R248.
23. Skulachev V.P. // *Apoptosis.* – 2006. – Vol. 11. – P. 473–485.
24. Turrens J.F. // *J Physiol.* – 2003. – Vol. 552. – P. 335–344.
25. Zoratti M., Szabo I. // *Biochim. Biophys. Acta.*, 1995, Vol. 1241, pp. 139–176.

#### References

1. Azova M.M., Blagonravov M.L., Gigani O.B. et al. *Kurskij nauchno-prakticheskij vestnik «Chelovek i ego zdorov'e»*, 2012, no. 2, pp. 10–13.
2. Azova M.M., Blagonravov M.L., Gigani O.B. et al. *Materialy XV vserossijskogo simpoziuma «Jekologo-fiziologicheskie problemy adaptacii»*, Moscow, 2012, pp. 22–23.
3. Azova M.M., Blagonravov M.L., Demurov E.A., Frolov V.A. *Bull. Exp. Biol. Med.*, 2012, V. 153, no. 6, pp. 800–802.
4. Azova M.M., Blagonravov M.L., Frolov V.A., *Vestnik RUDN, serija «Medicina»*, 2011, no. 4, pp. 44–47.
5. Azova M.M., Blagonravov M.L., Frolov V.A. *Biol. membr.*, 2012, Vol. 29, no. 4, pp. 227–230.
6. Azova M.M., Blagonravov M.L., Frolov V.A. *Voprosy biol. med. i farm. himii*, 2012, no. 5, pp. 27–30.
7. Azova M.M., Blagonravov M.L., Frolov V.A. *Materialy V regional'noj nauchno-prakticheskoi konferencii «Novye tehnologii v rekreacii zdorov'ja naselenija»*, Vladikavkaz, 2012, pp. 149–152.
8. Alexander B.T., Cockrell K.L., Rinewalt A.N., et al. // *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 2001, Vol. 280, R. 1388–R1392.
9. Anversa P., Olivetti G., Leri A., et al., *Curr Opin Nephrol Hypertens.*, 1997, no. 6, pp. 169–176.
10. Brunner F., Bras-Silva C., Cerdeira A.S., Leite-Moreira A.F. // *Pharmacol Ther.*, 2006, Vol. 111, no. 2, pp. 508–531.
11. Chen Q., Vazquez E.J., Moghaddas S. et al., *J Biol Chem.*, 2003, Vol. 278, pp. 36027–36031.
12. Cheng W., Li B., Kajstura J. et al., *J Clin Invest.*, 1995, Vol. 96, pp. 2247–2259.
13. Depre C., Taegtmeyer H., *Cardiovasc Res.*, 2000, Vol. 45, pp. 538–548.
14. Green D.R., Kroemer G., *Science*, 2004, Vol. 305, pp. 626–629.
15. Gustafsson A.B., Gottlieb R.A. *J Clin Immunol.*, 2003, Vol. 23, pp. 447–459.
16. Halestrap A.P. *Biochem. Soc. Trans.*, 2006, Vol. 34, pp. 232–237.
17. Kim G.T., Chun Y.S., Park J.W., Kim M.S. *Biochem Biophys Res Commun.*, 2003, Vol. 309, pp. 619–624.
18. Kim J.S., He L., Lemasters J.J. *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, 2003, Vol. 304, pp. 463–470.
19. Kroemer G., Galluzzi L., Brenner C. *Physiol. Rev.*, 2007, Vol. 87, pp. 99–163.
20. Li L.Y., Luo X., Wang X. *Nature*, 2001, Vol. 412, pp. 95–99.
21. Pollock D.M., *Hypertension*, 2005, Vol. 45, pp. 477–480.
22. Sasser J.M., Pollock J.S., Pollock D.M., *Am J Physiol Regul Integr Comp Physiol.*, 2002, Vol. 283, R. 243–R248.
23. Skulachev V.P., *Apoptosis*, 2006, Vol. 11, pp. 473–485.
24. Turrens J.F., *J Physiol.*, 2003, Vol. 552, pp. 335–344.
25. Zoratti M., Szabo I., *Biochim. Biophys. Acta.*, 1995, Vol. 1241, pp. 139–176.

#### Рецензенты:

Зотова Т.Ю., д.м.н., профессор кафедры общей патологии и патологической физиологии ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки РФ, г. Москва;

Иванов В.П., д.м.н., профессор, заведующий кафедрой биологии, медицинской генетики и экологии ГБОУ ВПО «Курский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения и социального развития РФ, г. Курск.

Работа поступила в редакцию 07.11.2012.