

УДК 616.124.2-008.46-07:616.127.8-092.9

АПОПТОЗ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ ДИФФУЗНОМ ТОКСИЧЕСКОМ ПОРАЖЕНИИ МИОКАРДА В ЭКСПЕРИМЕНТЕ**Благонравов М.Л., Азова М.М., Ковязин В.А., Бабиченко И.И., Фролов В.А.***ФГБОУ ВПО «Российский университет дружбы народов» Минобрнауки России,
Москва, e-mail: blagonravovm@mail.ru*

В данной работе изучались интенсивность и возможные механизмы апоптоза кардиомиоцитов левого и правого желудочков сердца при экспериментальном диффузном токсическом поражении миокарда методом TUNEL-анализа и оценки активности каспазы 3. У кроликов моделировали дифтерийную интоксикацию путём внутривенного введения нативного дифтерийного токсина. Далее исследование проводили на сроках 1, 3 и 5 суток. Установлено, что в левом желудочке количество TUNEL-позитивных ядер кардиомиоцитов увеличено на всех сроках эксперимента, однако, активность каспазы 3 достоверно повышалась лишь на 5-е сутки. В правом желудочке количество TUNEL-позитивных ядер увеличивалось на 3-и сутки, а к 5-м суткам возвращалось на уровень контроля. При этом активность каспазы 3 не имела статистически значимого отличия от контроля ни на одном из сроков исследования. Таким образом, при диффузном поражении сердца, обусловленном дифтерийной интоксикацией, в миокарде обоих желудочков активируются апоптотические процессы. Можно предположить, что индукция апоптоза кардиомиоцитов в левом желудочке связана с активацией каспазы 3 лишь на 5-х сутках эксперимента, а в первые 3-е суток, равно как и в правом желудочке на всём протяжении исследования, передача апоптогенного сигнала осуществляется либо за счёт других эффекторных ферментов каспазного каскада, либо посредством некаспазных механизмов.

Ключевые слова: дифтерийная интоксикация, апоптоз, кардиомиоцит, миокард, каспаза, TUNEL**CARDIOMYOCYTE APOPTOSIS IN EXPERIMENTAL DIFFUSE TOXIC LESION OF THE MYOCARDIUM****Blagonravov M.L., Azova M.M., Koviazin V.A., Babichenko I.I., Frolov V.A.***Peoples' Friendship University of Russia, Moscow, e-mail: blagonravovm@mail.ru*

Cardiomyocyte apoptosis rate and its possible mechanisms were studied in the left and right ventricles of the heart in experimental diffuse toxic lesion of the myocardium by TUNEL-assay and evaluation of caspase 3 activity. Diphtheria intoxication was modeled in rabbits by intravenous administration of native diphtheria toxin. Further investigation was performed on days 1, 3 and 5. It was shown that the number of TUNEL-positive cardiomyocyte nuclei was increased at all the investigated terms, however, caspase 3 activity significantly increased on day 5 only. In the right ventricle the number of TUNEL-positive cardiomyocyte nuclei increased on day 3 and returned to the controls by day 5. But caspase 3 activity had no significant difference at any terms. Thus diffuse lesion of the heart caused by diphtheria intoxication is accompanied by activation of apoptotic processes in the myocardium of both ventricles. It can be suggested that cardiomyocyte apoptosis in the left ventricle is induced due to caspase 3 activation as only from day 5. Within the first 3 days in the left ventricle and at all the terms in the right ventricle apoptotic signal transduction is driven either at the expense of some other effector caspases or by non-caspase mechanisms.

Keywords: diphtheria intoxication, apoptosis, cardiomyocyte, myocardium, caspase, TUNEL-assay

Диффузное поражение миокарда, развивающееся чаще всего при миокардитах различной этиологии и кардиомиопатиях, является причиной глубоких расстройств внутрисердечной и системной гемодинамики, обусловленных резким снижением систолической и диастолической функции сердца, а также теми или иными нарушениями проводимости. Поиск непосредственных причин, способствующих снижению количества функционально полноценных клеток миокарда, представляет собой одну из важнейших проблем современных фундаментальных исследований в области кардиологии. В последние годы активно изучаются механизмы, лежащие в основе генетически запрограммированной гибели кардиомиоцитов (КМЦ) при воспалительных и дистрофических заболеваниях сердечной мышцы. Так, в ряде работ показано, что интенсивность апоптоза КМЦ

значительно увеличивается при вирусном миокардите [5, 6, 9, 10]. Также установлена активация апоптотических процессов в миокарде при экспериментальном боррелиозе, вызванном изогенным серотипом *Borrelia turicatae* [8]. Однако, по данным G. Wang et al. [13], при развитии миокардита, обусловленного *Chlamydia trachomatis* и *Chlamydia pneumoniae*, признаки усиления апоптоза КМЦ отсутствуют. Использование тонких методов детекции маркёров апоптоза позволило ряду авторов выявить роль апоптотических механизмов в развитии дилатационной кардиомиопатии [2, 3, 7], а также аритмогенной правожелудочковой дисплазии [1]. Вопрос об участии запрограммированной гибели КМЦ в патогенезе гипертрофической и рестриктивной кардиомиопатии остаётся малоизученным. Следует отметить, что анализ апоптотических процессов зачастую проводится на осно-

вании какого-либо одного специфического маркера, что не всегда позволяет судить о конкретных молекулярных механизмах, ответственных за данное явление. В настоящей работе предпринимается попытка оценить особенности апоптотической гибели КМЦ при одном из наиболее тяжелых видов диффузного поражения сердца – дифтерийном миокардите – методом сопоставления данных биохимического и иммуногистохимического исследования.

Цель исследования – изучить интенсивность и возможные механизмы апоптоза КМЦ левого и правого желудочков (ЛЖ и ПЖ) сердца в динамике экспериментального диффузного токсического поражения миокарда методом TUNEL-анализа и оценки активности каспазы 3.

Материал и методы исследования

Эксперимент проводили на 32 кроликах-самцах породы «Шиншилла» массой тела 3–3,5 кг в двух параллельных сериях, каждая из которых включала 4 группы: 1 контрольную (интактные животные) и 3 опытных (диффузное токсическое поражение миокарда, обусловленное дифтерийной интоксикацией, на сроках 1, 3 и 5 сут). Дифтерийную интоксикацию моделировали путём однократного внутривенного введения кроликам нативного дифтерийного токсина в дозе 0,3 DLM (dosis letalis minima), предварительно оттитрованного на морских свинках.

В первой серии исследования проводили иммуногистохимическую оценку апоптоза КМЦ. Каждая группа включала в себя 3 кролика. Образцы миокарда ЛЖ и ПЖ фиксировали в течение 72 часов в 4%-м нейтральном параформальдегиде. Далее проводили обработку материала и заливку в парафин по общепринятой методике. Гистологические срезы толщиной 5 мкм изготавливали на микротоме «Slid-2003» (Германия) и наносили на стёкла с поли-L-лизинным покрытием. Срезы депарафинировали ксилолом и проводили по спиртам нисходящей концентрации. Апоптоз КМЦ оценивали путём постановки реакции TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) с использованием стандартного набора реактивов Apo-BrdU-INC In Situ DNA Fragmentation Assay Kit (BioVision, США). Препараты докрашивали гематоксилином. Реакция TUNEL считалась положительной при появлении коричневого окраски в ядрах КМЦ. Визуальный анализ препаратов миокарда выполняли с помощью светового микроскопа «Nikon Eclipse E400» при увеличении 400х и видеосистемы «TauVideo» с программой «Tau Морфология» на основе видеокамеры «Watec 221s». При этом анализировали 50 полей зрения в каждом препарате. Количественный анализ интенсивности апоптоза КМЦ выполняли методом расчёта индекса апоптоза, представляющего собой отношение числа TUNEL-положительных ядер КМЦ к общему количеству ядер КМЦ в поле зрения.

Во второй серии исследования определяли активность каспазы 3 в миокарде кроликов. Каждая группа включала в себя 5 кроликов. Ткань миокарда отдельно ЛЖ и ПЖ измельчали в гомогенизаторе WiseTis серии HG-15 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 апротинин, 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 на микроцентрифуге Heraeus fresco 17 (Thermo Electron LED GMBH, Германия) при 15000 g в течение 30 мин при 4°. В полученных супернатантах оценивали активность каспазы 3 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) 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.

Содержание животных и работа с ними проводились в соответствии с приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г.

Статистическую обработку данных проводили с помощью программ «Microsoft Excel» и «Biostat». Для каждого показателя вычисляли среднее значение, стандартную ошибку среднего. Достоверность отличий рассчитывали на основе t-критерия Стьюдента. Разность считалась достоверной при $p \leq 0,05$.

Результаты исследования и их обсуждение

Согласно данным иммуногистохимического исследования, в миокарде ЛЖ в контрольной группе отмечается небольшое количество TUNEL-положительных КМЦ. При этом индекс апоптоза составляет 0,14 (рис. 1). На 1-е сутки эксперимента число ядер КМЦ с положительной окраской заметно увеличивается, а индекс апоптоза становится достоверно выше контрольного уровня, достигая 0,2. В последующие сроки исследования (3-и и 5-е сутки) тенденция к росту количества TUNEL-положительных ядер КМЦ сохраняется: индекс апоптоза приобретает значения 0,22 и 0,24 соответственно.

В ПЖ, равно как и в ЛЖ, в контроле количество TUNEL-положительных ядер КМЦ незначительно. Индекс апоптоза также равен 0,14 (рис. 2). На 1-е сутки дифтерийной интоксикации индекс апоптоза достоверно от контрольного уровня не отличается. К 3-м суткам число положительно окрашенных ядер КМЦ увеличивается, что подтверждается статистически значимым повышением индекса апоптоза: он становится равен 0,19. Однако на 5-е сутки число апоптотически изменён-

ных ядер КМЦ существенно уменьшается относительно 3-х суток, а индекс апоптоза возвращается к исходному уровню.

Таким образом, диффузное повреждение миокарда, вызванное воздействием на

сердце дифтерийного токсина, сопровождается увеличением интенсивности апоптоза КМЦ в обоих желудочках сердца, однако, динамика активности апоптотических процессов в ЛЖ и ПЖ отличается.

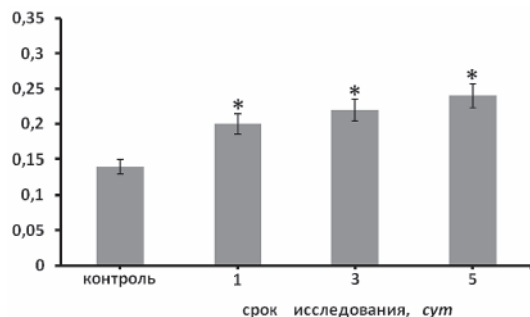


Рис. 1. Индекс апоптоза КМЦ ЛЖ сердца при дифтерийной интоксикации (отношение числа TUNEL-позитивных ядер к общему количеству ядер).

Плankи погрешностей – ошибки среднего (в%).
* $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой

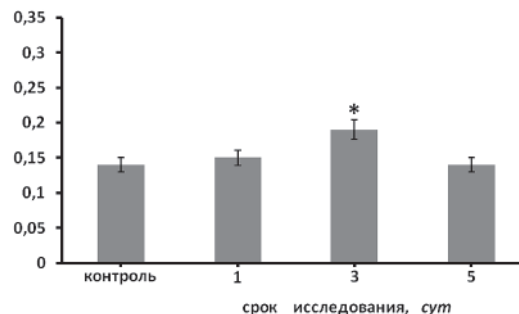


Рис. 2. Индекс апоптоза КМЦ ПЖ сердца при дифтерийной интоксикации (отношение числа TUNEL-позитивных ядер к общему количеству ядер).

Плankи погрешностей – ошибки среднего (в%).
* $p \leq 0,05$ по сравнению с контрольной группой

Обратимся к данным биохимического исследования апоптоза клеток миокарда ЛЖ и ПЖ. Как видно из результатов, представленных в таблице, в миокарде ЛЖ активность каспазы 3 достоверно повышается

по сравнению с контролем лишь на 5-е сутки эксперимента. При этом в миокарде ПЖ статистически значимого отличия по данному показателю не наблюдается ни на одном из сроков исследования.

Активность каспазы 3 в миокарде желудочков сердца кроликов при дифтерийной интоксикации, нмоль/мин/мл ($M \pm m$)

Показатель	Контроль	1-е сутки	3-и сутки	5-е сутки
ЛЖ	0,11 ± 0,01	0,1 ± 0,02	0,14 ± 0,01	0,15 ± 0,01*
ПЖ	0,09 ± 0,02	0,1 ± 0,02	0,11 ± 0,04	0,08 ± 0,02

Примечание: звёздочкой отмечены показатели, достоверно отличающиеся от контроля при $p \leq 0,05$.

Сравнение результатов эксперимента, полученных в первой и второй сериях, свидетельствует о том, что при дифтерийном поражении сердца усиление фрагментации ДНК в ядрах КМЦ обоих желудочков возможно без активации каспазы 3. Так, в ЛЖ количество TUNEL-позитивных ядер увеличено по сравнению с контрольной группой на всех сроках, тогда как активность каспазы 3 повышается лишь на 5-е сутки. В ПЖ активность каспазы 3 остаётся на уровне контроля на всём протяжении исследования, однако, на 3-и сут наблюдается увеличение ядер КМЦ с положительной реакцией TUNEL.

В связи с этим можно сделать два предположения. Во-первых, активация апоптотических процессов в клетках миокарда может осуществляться, минуя каспазу 3 за счёт иных каспазных ферментов, например, каспазы 7, которая в данном исследовании не определялась. Кроме того, индукция

апоптоза КМЦ может быть обусловлена и некаспазными механизмами. В частности, известно, что под действием апоптогенного сигнала из митохондрий высвобождается фактор AIF (apoptosis inducing factor) [4], активирующий эндонуклазу [4, 11, 12] и способный самостоятельно обеспечивать конденсацию хроматина и фрагментацию нуклеиновых кислот [12].

Заключение

При диффузном поражении сердца, обусловленном дифтерийной интоксикацией, в миокарде обоих желудочков активируются апоптотические процессы. При этом можно предположить, что индукция апоптоза КМЦ в ЛЖ связана с активацией каспазы 3 лишь на 5-х сутках эксперимента, а в первые 3-е суток, равно как и в ПЖ на всём протяжении исследования, передача апоптогенного сигнала осуществляется либо за счёт других эффекторных фермен-

тов каспазного каскада, либо посредством некаспазных механизмов.

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

Список литературы

1. Цыпленкова В.Г., Воробьев А.А. Ультраструктурная и иммуногистохимическая характеристика механизма гибели кардиомиоцитов при аритмогенной дисплазии правого желудочка // Архив патологии. – 2007. – Т. 69, № 6. – С. 3–7.
2. Aharinejad S., Andrukhoval O., Lucas T., Zuckermann A., Wieselthaler G., Wolner E., Grimm M. // *Ann. Thorac. Surg.* – 2008. – Vol. 86, № 1. – P. 109–114.
3. Birks E.J., Latif N., Enesa K., Folkvang T., Luong le A., Sarathchandra P., Khan M., Ovaal H., Terracciano C.M., Barton P.J., Yacoub M.H., Evans P.C. // *Cardiovasc. Res.* – 2008. – Vol. 79, № 3. – P. 472–480.
4. Daugas E., Nochy D., Ravagnan L., Loeffler M., Susin S.A., Zamzami N., Kroemer G. // *FEBS Lett.* – 2000. – Vol. 476, № 3. – P. 118–123.
5. DeBiasi R.L., Robinson B.A., Leser J.S., Brown R.D., Long C.S., Clarke P. // *J. Card. Fail.* – 2010. – Vol. 16, № 11. – P. 901–910.
6. Hu X., Wang H., Lu W., Dong Y., Cheng P. // *J. Tongji Med. Univ.* – 2001. – Vol. 21, № 3. – P. 256–258.
7. Ibe W., Saraste A., Lindemann S., Bruder S., Buerke M., Darius H., Pulkki K., Voipio-Pulkki L.M. // *Eur. J. Heart Fail.* – 2007. – Vol. 9, № 2. – P. 160–167.
8. Londoño D., Bai Y., Zückert W.R., Gelderblom H., Cadauid D. // *Infect. Immun.* – 2005. – Vol. 73, № 11. – P. 7669–7676.
9. Mihatsch K., Nestler M., Saluz H.P., Henke A., Munder T. // *Cardiovasc. Res.* – 2009. – Vol. 81, № 1. – P. 108–115.
10. Shen Y., Kan Q.C., Xu W., Chu Y.W., Xiong S.D. // *Iran J. Allergy Asthma Immunol.* – 2009. – Vol. 8, № 1. – P. 1–9.
11. Susin S.A., Daugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., Loeffler M., Costantini P., Ferri K.F., Irinopoulou T., Prévost M.C., Brothers G., Mak T.W., Penninger J., Earnshaw W.C., Kroemer G. // *J. Exp. Med.* – 2000. – Vol. 192, № 4. – P. 571–580.
12. Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M., Kroemer G. // *Nature.* – 1999. – Vol. 397, № 6718. – P. 441–446.
13. Wang G., Burczynski F., Hasinoff B., Zhong G. // *Microbiology.* – 2002. – 148. № Pt12. – P. 3955–3959.

References

1. Tsyplenkova V.G., Vorob'ev A.A., *Arkh. Patol.*, 2007, Vol. 69, no. 6, pp. 3–7.

2. Aharinejad S., Andrukhoval O., Lucas T., Zuckermann A., Wieselthaler G., Wolner E., Grimm M., *Ann. Thorac. Surg.*, 2008, Vol. 86, no. 1, pp. 109–114.

3. Birks E.J., Latif N., Enesa K., Folkvang T., Luong le A., Sarathchandra P., Khan M., Ovaal H., Terracciano C.M., Barton P.J., Yacoub M.H., Evans P.C., *Cardiovasc. Res.*, 2008, Vol. 79, no. 3, pp. 472–480.

4. Daugas E., Nochy D., Ravagnan L., Loeffler M., Susin S.A., Zamzami N., Kroemer G., *FEBS Lett.*, 2000, Vol. 476, no. 3, pp. 118–123.

5. DeBiasi R.L., Robinson B.A., Leser J.S., Brown R.D., Long C.S., Clarke P., *J. Card. Fail.*, 2010, Vol. 16, no. 11, pp. 901–910.

6. Hu X., Wang H., Lu W., Dong Y., Cheng P., *J. Tongji Med. Univ.*, 2001, Vol. 21, no. 3, pp. 256–258.

7. Ibe W., Saraste A., Lindemann S., Bruder S., Buerke M., Darius H., Pulkki K., Voipio-Pulkki L.M., *Eur. J. Heart Fail.*, 2007, Vol. 9, no. 2, pp. 160–167.

8. Londoño D., Bai Y., Zückert W.R., Gelderblom H., Cadauid D., *Infect. Immun.*, 2005, Vol. 73, no. 11, pp. 7669–7676.

9. Mihatsch K., Nestler M., Saluz H.P., Henke A., Munder T., *Cardiovasc. Res.*, 2009, Vol. 81, no. 1, pp. 108–115.

10. Shen Y., Kan Q.C., Xu W., Chu Y.W., Xiong S.D., *Iran J. Allergy Asthma Immunol.*, 2009, Vol. 8, no. 1, pp. 1–9.

11. Susin S.A., Daugas E., Ravagnan L., Samejima K., Zamzami N., Loeffler M., Costantini P., Ferri K.F., Irinopoulou T., Prévost M.C., Brothers G., Mak T.W., Penninger J., Earnshaw W.C., Kroemer G., *J. Exp. Med.*, 2000, Vol. 192, no. 4, pp. 571–580.

12. Susin S.A., Lorenzo H.K., Zamzami N., Marzo I., Snow B.E., Brothers G.M., Mangion J., Jacotot E., Costantini P., Loeffler M., Larochette N., Goodlett D.R., Aebersold R., Siderovski D.P., Penninger J.M., Kroemer G., *Nature*, 1999, Vol. 397, no. 6718, pp. 441–446.

13. Wang G., Burczynski F., Hasinoff B., Zhong G., *Microbiology*, 2002, Vol. 148, no. Pt12, pp. 3955–3959.

Рецензенты:

Рапопорт С.И., д.м.н., профессор, заведующий лабораторией «Хрономедицина и новые технологии в клинике внутренних болезней» ГБОУ ВПО «Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова» Минздравсоцразвития РФ, г. Москва;

Тюрин В.В., д.б.н., доцент, и.о. зав. кафедрой генетики, микробиологии и биотехнологии ФГБОУ «Кубанский государственный университет» Минобрнауки России, г. Краснодар.

Работа поступила в редакцию 23.04.2012.