

УДК 616.132.2-002-08:616-092.18:612.08

А. Т. Манишарипова, А. С. Джакупова, Л. Е. Токешова,
Д. П. Сафонов, З. А. Булентаева, Е. Е. Гриневич

ИЗУЧЕНИЕ ПРОЦЕССОВ АПОПТОЗА КЛЕТОК В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

Аннотация. Изучено влияние стероидных гормонов и показателей свободно-радикальных реакций на апоптоз кардиомиоцитов при коронарной недостаточности у крыс. Выявлено, что при коронарной недостаточности имеется дисбаланс гормонов коры надпочечников и свободно-радикальных процессов кардиомиоцитов, которые вызывают процесс апоптоза кардиомиоцитов.

Ключевые слова: апоптоз, кардиомиоциты, кортикостерон, иммуногистохимия.

Abstract. Apoptosis of cardiomyocyte in coronary insufficiency decreases the quantity of viable cardiomyocyte. This leads to decrease in cardiac contractility and progression of cardiac insufficiency. In our research influence of steroid hormones and parameters of free - radical reactions on apoptosis of cardiomyocyte is investigated at coronary insufficiency at rats. It is revealed, that at coronary insufficiency is present disbalance hormones of a bark of adrenal glands and free-radical processes cardiomyocytes which cause process the apoptosis of cardiomyocyte.

Keywords: apoptosis, cardiomyocytes, corticosteron, immunohistochemistry.

Сердечно-сосудистые заболевания являются актуальными в силу своего ощутимого социально-экономического ущерба обществу. В связи с этим возрастает роль и значение исследований по разработке научно-обоснованных фундаментальных исследований ишемической болезни сердца (ИБС).

В настоящее время существует многочисленные теории механизмов развития ИБС. Одним из возможных механизмов патогенеза заболевания может быть процесс клеточного апоптоза. Апоптоз – это процесс программируемой клеточной гибели, альтернативный некрозу. С помощью апоптоза клетки прекращают свое существование при различных физиологических и патологических процессах [1]. Предполагается, что выбор направления сигнализации в сторону апоптоза клетки в большей степени зависит от белка Р53 и Bcl-2 [2]. В настоящее время интенсивно исследуются процессы апоптоза клеток при развитии ИБС [3]. Так, имеются научные обобщения в области изучения апоптоза кардиомиоцитов при сердечной недостаточности. В них показано, что апоптоз является важным компонентом гибели кардиомиоцитов и во многом определяет нарушения сократительной функции миокарда [4, 5].

Известно, что основными триггерными факторами запуска апоптоза клеток является дисбаланс свободно-радикальных реакций, увеличение стрессовых нагрузок на организм [6]. Однако работы по изучению стрессовых гормонов на развитие процесса апоптоза кардиомиоцитов при коронарной недостаточности до сих пор не были проведены.

Наиболее перспективным в решении вопроса коррекции процесса апоптоза кардиомиоцитов при коронарной недостаточности, вызванной длительным стрессом, может оказаться мицеллярная форма органического нитрата. Известно, что мицеллы могут долго сохранять высокий уровень концентрации лекарственных препаратов в крови, а также ограничивают метаболизм препарата до попадания его внутрь клетки [7]. Поэтому мицеллы из фосфати-

дилинозитола, нагруженные изосорбидом динитратом, могут оказывать существенное влияние на процесс апоптоза кардиомиоцитов. Вместе с тем изучение влияния мицеллярной формы изосорбида динитрата на процессы апоптоза клеток до сих пор не проводилось.

Целью исследования явилось изучение процесса апоптоза клеток и путей его коррекции у животных с коронарной недостаточностью.

Материалы и методы исследования

Для исследования было использовано 35 беспородных крыс-самцов весом 200–250 г, приобретенных в виварии НИИОРиО МЗ РК. У 20 животных с помощью стресса по Ф. З. Меерсону [8] была вызвана коронарная недостаточность (группа 1). Контрольную группу составили 15 крыс-самцов с массой 200–250 г, содержащихся на одной диете, при комнатной температуре, в аэрируемых клетках, в одинаковых с опытными животными условиях, не подвергавшихся стрессовым воздействиям. Опыты проводились в осенне-зимний период в экспериментальной лаборатории НИИ кардиологии и внутренних болезней МЗ РК. Экспериментальные работы на лабораторных животных проводились в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных для научных целей.

Гистологические исследования ткани миокарда – окраски гематоксилин-эозином проводили по стандартным методикам. Апоптоз в кардиомиоцитах определялся с помощью TUNEL-метода [9]. Для определения апоптоза *in situ* готовили парафиновые срезы. После депарафинизации и регидротации срезы помещались в 3 % раствор H_2O_2 в метаноле на 15 мин. После промывки срезов проводился ретривинг антигенов в течение 20 мин в кипящем 10 mM цитратном буфере (pH 6,0) с последующим медленным остыванием. Неспецифическое авидин/биотин связывание подавлялось авидин/биотин блоком (Vector, USA) по 15 мин в каждом растворе. Неспецифическое белковое связывание подавлялось 0,03 % раствором казеина в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем срезы инкубировались в первичных антителах в разведении 1:400. После промывки образцов в растворе PBS-T они инкубировались со вторичными антителами в разведении 1:400 в течение 1 ч. Визуализацию проводили с использованием стрептавидина, конъюгированного с пероксидазой (Dako USA) и диаминобензидина (Dako USA) в качестве субстрата. Клетки, окрашенные в черный цвет, оценивали как апоптозопозитивные клетки. Апоптотический индекс ткани миокарда рассчитывали как отношение числа позитивно окрашенных ядер к общему числу кардиомиоцитов. Подсчеты производились в 20 произвольных выбранных полях зрения при увеличении 400^x [10]. Исследования выполнены на микроскопе «Leica DM4000B» с объективом полуахроматическим/Fluotar, цифровой видеокамерой «Leica DFC 320» и разрешением 7,2 Мр фирмы «Leica Microsystems». Уровни общего и свободного кортикостерона крови высчитывали методом [11] в модификации. Определение продуктов свободно-радикальных реакций производили на ЭПР-спектрометре фирмы «Bruker» (Япония) [12]. Кровь и ткань на исследования брали при декапитации животных. Кровь подвергали лиофильной сушке. После лиофилизации биологических образцов изучали концентрации свободных радикалов кислорода методом электронного парамагнитного резонанса (ЭПР-спектроскопия) при тем-

пературе жидкого азота минус 196 °С. Содержание вещества в лиофилизате определяли методом ЭПР-спектроскопии с помощью спин-ловушки диэтилдитиокарбамата натрия (Sigma) в дозе 0,35 мг на 200 мкл крови.

Полученные при исследовании данные были подвергнуты математической обработке методом вариационной статистики с определением для каждого показателя средней величины (M), ошибки средней (m) и критерия t -Стьюдента с помощью пакета прикладных программ Windows (Excel – U.8.0). В качестве статистической значимости различий использовался уровень значимости $p < 0,05$.

Полученные результаты и их обсуждение

Известно, что индукторами апоптоза могут являться стероидные гормоны, которые воздействуют на ядро клетки и приводят к запуску апоптоза клеток [1]. Результаты исследования показали (табл. 1), что уровень как свободного, так и общего кортикостерона крови у животных с коронарной недостаточностью был (в 1,3 и 1,5 раза соответственно) выше по сравнению с аналогичными данными животных контрольной группы, $p < 0,05$.

Таблица 1

Показатели свободного и общего кортикостерона крови животных с коронарной недостаточностью ($M \pm m$, нг/л)

Показатель	Контрольная группа, $n = 15$	Группа 1, $n = 20$	Достоверность различий
Свободный кортикостерон	$40439,5 \pm 2612,7$	$52681,3 \pm 1768,1$	$p < 0,05$
Общий кортикостерон	$132584,2 \pm 11612,4$	$196475,8 \pm 12535,7$	$p < 0,05$

Примечание. p – достоверность различий показателей между группами.

Повышение уровня стероидного гормона крови у животных в условиях стресса свидетельствовало о наличии триггерного фактора активации апоптоза клеток [2].

Исследование показателей свободно-радикальных реакций крови животных со стрессом показало следующее. В крови животных со стрессом достоверно повышались концентрации супероксиданиона, гидроксил радикала (в 2,5 раза), ксантиноксидазы (в 2,1 раза), пероксинитрита (в 4,5 раза), а также понижались уровни оксида азота (в 4,8 раза) и супероксиддисмутазы (в 2 раза) по сравнению с аналогичными данными животных контрольной группы.

Результаты изучения показателей свободно-радикальных реакций ткани миокарда показали следующее. В ткани миокарда животных со стрессом были достоверно повышены концентрации супероксиданиона (в 2,7 раза), гидроксил радикала (в 2,4 раза), ксантиноксидазы (в 2,6 раза), пероксинитрита (в 3,5 раза), а также понижены уровни оксида азота (в 2,7 раза), супероксиддисмутазы (в 1,8 раза) по сравнению с аналогичными данными животных

контрольной группы. Дисбаланс свободно-радикальных реакций является универсальной пусковой программой для активации процессов апоптоза клеток [5].

Анализ полученных нами результатов показал, что у животных в условиях стресса происходит изменение баланса свободно-радикальных реакций в сторону повышения образования токсичных свободных радикалов, которые являются индукторами процессов апоптоза клеток.

Иммуногистохимическое исследование ткани миокарда животных контрольной группы показало следующее. Ткань миокарда интактных животных содержала единичные кардиомиоциты со специфическим окрашиванием, характерным для апоптотических клеток. Подсчет апоптотического индекса ткани миокарда животных контрольной группы показал, что он равен $6,3 \pm 3,1 \%$. Полученные данные указывают на единичные случаи подверженности кардиомиоцитов здоровых животных процессу апоптоза, который, по-видимому, носит физиологический характер.

Результаты иммуногистохимического исследования показали, что у животных в условиях стресса достоверно повышается количество специфически окрашенных ядер кардиомиоцитов по сравнению с аналогичным показателем животных контрольной группы (рис. 1). Так, индекс апоптоза клеток ткани миокарда животных со стрессом был равен $21,4 \pm 3,5 \%$, что оказалось в 3,4 раза выше аналогичного показателя животных контрольной группы, $p < 0,001$.

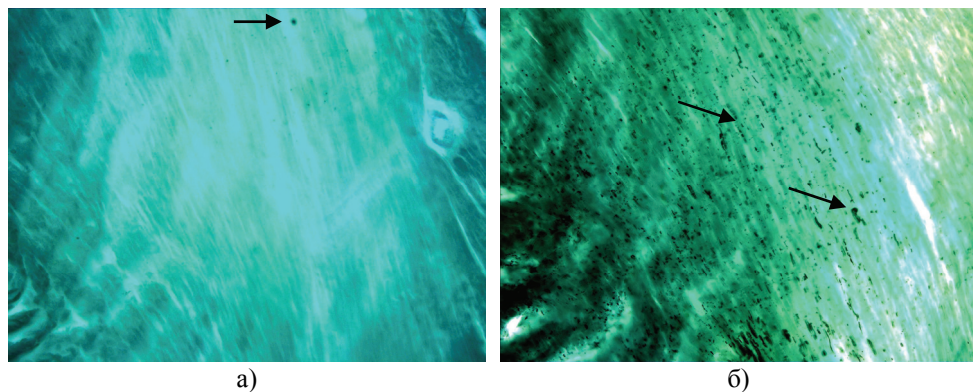


Рис. 1. Ткань миокарда интактной крысы (а) и крысы со стрессом (б) при иммуногистохимическом исследовании (TUNEL): в ткани миокарда интактной крысы (а) зарегистрировано только несколько TUNEL-положительных ядер кардиомиоцитов. В ткани миокарда крысы в условиях стресса (б) количество TUNEL-положительных ядер кардиомиоцитов увеличено. TUNEL-положительные ядра регистрировались как темные точки ($\uparrow$), TUNEL-метод, $100\times$

Таким образом, при коронарной недостаточности в эксперименте дисбаланс свободно-радикальных реакций в организме, повышение количества гормона стресса крови приводит к усилению процессов апоптоза кардиомиоцитов.

Выводы

1. В крови и ткани миокарда животных с коронарной недостаточностью регистрируется достоверное повышение уровня супероксиданиона (в 2,5 и 2,7 раза соответственно), гидроксил радикала (в 2,5 и 2,4 раза соответствен-

но), ксантинооксидазы (в 2,1 и 2,6 раза соответственно), пероксинитрита (в 4,5 и 3,5 раза соответственно) по сравнению с аналогичными данными здоровых животных.

2. В крови и в ткани миокарда животных с коронарной недостаточностью достоверно понижается содержание оксида азота (в 4,8 и 2,7 раза соответственно), супероксиддисмутазы (в 2 и 1,8 раза соответственно) по сравнению с такими же данными здоровых животных.

3. Апоптотический индекс ткани миокарда животных при коронарной недостаточности был в 3,4 раза выше аналогичного показателя здоровых животных, $p < 0,001$.

Список литературы

1. **Белушкина, Н. Н.** Молекулярные основы патологии апоптоза / Н. Н. Белушкина, С. Е. Северин // Архив патологии. – 2000. – № 1. – С. 51–59.
2. **Пальцев, М. А.** Межклеточные взаимодействия / М. А. Пальцев, А. А. Иванов, С. Е. Северин. – М. : Медицина, 2003. – 288 с.
3. **Залесский, В. Н.** Апоптоз при ишемии и реперфузии миокарда / В. Н. Залесский, Т. И. Гавриленкова, А. А. Фильченков // Врачебное дело. – 2002. – № 3. – С. 8–15.
4. **Багмет, А. Д.** Ремоделирование сосудов и апоптоз в норме и при патологии / А. Д. Багмет // Кардиология. – 2002. – № 5. – С. 83–85.
5. **Сторожаков, Г. И.** Роль апоптоза в развитии атеросклероза, ишемии миокарда и сердечной недостаточности / Г. И. Сторожаков, Д. Б. Утешев // Сердечная недостаточность. – 2000. – Т. 1. – № 4. – С. 45–52.
6. **Yomamoto, S.** On the nature of cell death during remodeling of hypertrophied human myocardium / S. Yomamoto, K. Savado, H. Shimomura, K. Kawamura, T. N. James // J. Mol. Cell cardiol. – 2000. – P. 161–175.
7. **Mansharipova, A.** Apoptosis suppression – a first line therapy for post MI cardiac insufficiency? / Almagul Mansharipova, Ali Ahsan, Alihan Djusipov, Almas Begdullaev, Zeinep Bulentayeva, Murat Gilmanov, Yekaterina Grinevich, Zhangentkhan Abilaiuly, Galina Shokareva // Eurasian journal of BioMedicine. – 2008. – V. 1. – № 3. – P. 11–16.
8. **Меерсон, Ф. З.** Адаптационная медицина: Концепция долговременной адаптации / Ф. З. Меерсон. – М. : Дело, 1993. – 272 с.
9. **Meyard, L.** Programmed death of T cells in HIV-1 infection / L. Meyard, S. A. Otto, R. R. Jonker // Science. – 1992. – V. 257. – P. 217–219.
10. **Браниште, Т. А.** Апоптоз и гибернация кардиомиоцитов перирубцовой зоны как фактор хронической аневризмы сердца / Т. А. Браниште [и др.] // Кардиология. – 2004. – № 5. – С. 4–7.
11. **Черкасова, О. Р.** Содержание общего кортикостерона / О. Р. Черкасова // Проблемы эндокринологии. – 2001. – № 1. – С. 37–39.
12. **Ажипа, Я. И.** Медико-биологические аспекты применения метода ЭПР / Я. И. Ажипа. – М. : Наука, 1983. – 528 с.

Манишарипова Алмагуль Тулеуовна
руководитель отдела кардиологии,
Научно-исследовательский институт
кардиологии и внутренних болезней
(Республика Казахстан, г. Алматы)

E-mail: dralma@mail.ru

Mansharipova Almagul Tuleuovna
Head of cardiology sub-department, Re-
search Institute of cardiology and internal
diseases (Republik of Kazakhstan, Almaty)

Джакупова Айгуль Саруаровна

кандидат медицинских наук,
Научно-исследовательский институт
кардиологии и внутренних болезней
(Республика Казахстан, г. Алматы)

E-mail: aigulyk197575@mail.ru

Dzhakupova Aygyul Saruarovna

Candidate of medical sciences, Research
Institute of cardiology and internal diseases
(Rebublik of Kazakhstan, Almaty)

Токешова Лиза Есеркеповна

научный сотрудник, ТОО «Казнаномед»

E-mail: dralma@mail.ru

Tokeshova Liza Eserkepovna

Researcher, "Kaznanomed" ltd.

Сафонов Дмитрий Павлович

младший научный сотрудник, отдел
менеджмента научных исследований,
Научно-исследовательский институт
кардиологии и внутренних болезней
(Республика Казахстан, г. Алматы)

E-mail: galina.2005@mail.ru

Safonov Dmitry Pavlovich

Junior researcher, sub-department of re-
search management, Research Institute of
cardiology and internal diseases (Rebublik
of Kazakhstan, Almaty)

Булентаева Зейнеп Асылбековна

заведующая лабораторией молекулярной
генетики, Институт общей генетики
и цитологии.

E-mail: zikagirl@mail.ru

Bulentaeva Zaynep Asylbekovna

Head of laboratory of molecular genetics,
Institute of general genetics and cytology,
Republik of Kazakhstan.

Гриневич Екатерина Евгеньевна

научный сотрудник, ТОО «Казнаномед»

E-mail: grinkath@mail.ru

Grinevich Ekaterina Evgenyevna

Researcher, "Kaznanomed" ltd.

УДК 616.132.2-002-08:616-092.18:612.08

Маншарипова, А. Т.

Изучение процессов апоптоза клеток в эксперименте / А. Т. Маншарипова, А. С. Джакупова, Л. Е. Токешова, Д. П. Сафонов, З. А. Булентаева, Е. Е. Гриневич // Известия высших учебных заведений. Поволжский регион. Медицинские науки. – 2010. – № 3 (15). – С. 29–34.