

Кабетенова А.А.¹, Манишарипов Д.², Мухамедиева Е.³, Беркимбаева З.⁴, Манишарипова А.Т.⁴

ИЗУЧЕНИЕ И ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ПРОГРАММИРОВАННОЙ КЛЕТОЧНОЙ ГИБЕЛИ КАРДИОМИОЦИТОВ В ЭКСПЕРИМЕНТЕ

¹НИИШ, РК

²КазНМУ имени С.Д.Асфендиярова, РК

³Ассоциация Акшам, РК, ISMA, Латвия

⁴ИОГЦ, РК

⁵КРМУ, РК

Ключевые слова: апоптоз, кардиомиоциты, эксперимент

Резюме: Процессы апоптоза клеток миокарда у животных с коронарной недостаточностью изучены недостаточно. Целью работы было изучение и моделирование апоптоза клеток. Были применены методы: экспериментальные, гистологические, биохимические компьютерного моделирования. В результате работы изучен апоптоз кардиомиоцитов при модели коронарной недостаточности и проведено моделирование процесса.

Resume: The processes of apoptosis of myocardial cells with coronary artery disease in animals are not well understood. The purpose of this work was to study and modeling of apoptosis in animals with coronary insufficiency. Approaches used include: experimental, histological, biochemical computer simulation. As a result of studied cardiomyocyte apoptosis during coronary insufficiency model and process simulation conducted.

Актуальность. Сердечно-сосудистые заболевания являются актуальными как для отечественных, так и зарубежных научных исследований в силу своего высокого распространения, смертности. В связи с этим возрастает роль и значение исследований по изучению апоптоза и его моделированию при заболеваниях сердца. Апоптоз – это процесс программируемой клеточной гибели, альтернативный некрозу [1, 2]. Вместе с тем, работ по изучению феномена апоптоза клеток миокарда у животных с коронарной недостаточностью, недостаточно. Известно, что основными триггерными факторами запуска апоптоза клеток является дисбаланс свободно-радикальных, гормональных реакций, а также увеличение стрессовых нагрузок на организм [3].

Целью исследования явилось изучение процесса апоптоза клеток при коронарной недостаточности у животных и его моделирование.

Задачами исследования было: 1) изучить апоптотический индекс ткани миокарда животных в динамике развития коронарной недостаточности, 2) определить уровень в крови и ткани миокарда животных показателей оксидативного стресса.

Материалы исследования. Для экспериментальной части исследования было использовано 300 беспородных крыс-самцов весом 200-250 г. У 20 животных была вызвана коронарная недостаточность. Контрольную группу составили 20 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. Экспериментальные работы на

лабораторных животных проводились в соответствии с Европейской конвенцией по защите позвоночных животных.

Гистологические исследования ткани миокарда - окраски гематоксилин - эозином, суданом III, ШИК-реакцию на гликоген, реакцию на сукцинатдегидрогеназу - проводили по Пальцеву М.А. [4]. Исследования выполнены на микроскопе "Leica DM4000B" с объективом полуахроматическим/Fluotar, цифровой видеокамерой "Leica DFC 320" и разрешением 7,2 Мрх. фирмы «Leica Microsystems». Апоптоз в кардиомиоцитах определялся с помощью TUNEL метода. 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. У животных проводили ЭКГ исследования в I, II, III стандартных отведениях на аппарате ЭК1Т-3М2. Двухмерное ультразвуковое исследование сердца животных производили на аппарате «Алока 1700» при увеличении масштаба на 100% в программе "Teicholc". Уровни общего и свободного кортикостерона крови высчитывали методом Панкова Ю.А., Черкасова О.Р. [5]. Определение продуктов свободно - радикальных реакций производили на ЭПР-спектрометре фирмы «Bruker» (Япония) по методу Ажипа Я.И. [6]. Для изучения динамики развития коронарной недостаточности на 3, 7, 11, 14 сутки у животных изучались гистологические показатели сердца по описанным выше методикам. Моделирование процесса апоптоза было проведено с помощью компьютерных программ.

Результаты и их осуждение. Известно, что индукторами апоптоза могут являться стероидные гормоны, которые воздействуют на ядро клетки и приводят к запуску апоптоза клеток [2]. Результаты исследования показали (таблица 1), что уровень как свободного, так и общего кортикостерона крови у животных с коронарной недостаточностью был (в 1,3 раза и 1,5 раза, соответственно) выше по сравнению с аналогичными данными животных контрольной группы, $p < 0,05$.

Повышение уровня стероидного гормона крови у животных с коронарной недостаточностью свидетельствовало о наличии триггерного фактора активации апоптоза клеток. Другим универсальным механизмом запуска процесса апоптоза клеток считается нарушение баланса свободно-радикальных реакций, происходящих в организме при различных патологиях [7].

Таблица 1. Показатели свободного и общего кортикостерона крови животных с коронарной недостаточностью ($M \pm m$, нг/л)

Показатель	Контрольная группа n = 20	Группа КН n = 20	Достоверность различий
Свободный кортикостерон	40439,5 ± 2612,7	52681,3 ± 1768,1	P < 0,05
Общий кортикостерон	132584,2 ± 11612,4	196475,8 ± 12535,7	P < 0,05
Примечание - P – достоверность различий показателей между группами.			

Таблица 2 отражает показатели свободно–радикальных реакций крови животных с коронарной недостаточностью, вызванной иммобилизационным стрессом. В крови животных с коронарной недостаточностью 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.

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

В ткани миокарда животных с коронарной недостаточностью 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.

Полученные результаты у животных с коронарной недостаточностью свидетельствовали об изменении баланса свободно-радикальных реакций в ткани миокарда и повышенном уровне токсичных форм свободных радикалов, что является универсальной пусковой программой для активации процессов апоптоза клеток.

Таблица 2. Показатели свободно - радикальных реакций крови животных с коронарной недостаточностью (M ± m, нмоль/мл)

Показатель	Контрольная группа n = 40	Группа КН n = 56	Достоверность различий
Церулоплазмин	2,57 ± 0,21	4,32 ± 0,38	P < 0,05
Оксид азота	35,47 ± 3,14	7,44 ± 0,68	P < 0,001
Супероксиддисмутаза	15,64 ± 0,29	7,93 ± 0,44	P < 0,05
Супероксиданион	7,86 ± 0,13	19,56 ± 0,12	P < 0,001
Гидроксил радикал	2,82 ± 0,16	6,91 ± 0,10	P < 0,001
Ксантиноксидаза	0,59 ± 0,05	1,23 ± 0,07	P < 0,001
Пероксинитрит	0,96 ± 0,02	4,31 ± 0,07	P < 0,001
Примечание – P- достоверность различий показателей между группами.			

Гистологическое исследование ткани миокарда животных с коронарной недостаточностью, показало, что в отличие от ткани миокарда интактных животных, регистрировались зоны ишемии миокарда, мелкие очаги некроза мышечных волокон с отёчностью интерстиция. В ткани миокарда обнаружены множественные очаги пролиферации соединительнотканых элементов вокруг погибших групп мышечных волокон. Вместе с тем, в околонекротических зонах миокарда животных с коронарной недостаточностью выявлено полнокровие сосудов и не было отмечено четких деструктивных изменений

мышечных клеток. При изучении ткани миокарда животных контрольной группы патологических изменений не было обнаружено.

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

Иммуногистохимическое исследование ткани миокарда животных с коронарной недостаточностью в течение 3, 7, 11, 14-х суток показало не только наличие вариации индекса апоптоза от 18% до 61%, но и статистически достоверное повышение его с 3 по 14 суток.

Таким образом, изучение динамики изменений ткани миокарда животных с коронарной недостаточностью с 3-х по 14 сутки показало, что происходит постепенное увеличение количества кардиомиоцитов, вступивших на путь апоптоза. Моделирование показало, что со временем процессы апоптоза клеток при патологии постепенно увеличиваются.

Выводы:

1. Апоптотический индекс ткани миокарда животных на 3 сутки развития коронарной недостаточности был равен $21,4 \pm 3,5\%$, что было в 3,4 раза выше аналогичного показателя здоровых животных, $p < 0,001$.

2. 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, соответственно), ксантиноксидазы (в 2,1 и 2,6 раза, соответственно), пероксинитрита (в 4,5 и 3,5 раза, соответственно) по сравнению с аналогичными данными здоровых животных. 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. Нарушенный баланс свободно-радикальных реакций приводит к усилению процесса апоптоза клеток.

3. Изучение динамики изменений ткани миокарда животных с коронарной недостаточностью с 3-х по 14 сутки показало, что происходит постепенное увеличение количества кардиомиоцитов, вступивших на путь апоптоза.

Литература

1. Elsasser A., Suzuki K., Schaper J. Unresolved issues regarding the role of apoptosis in the pathogenesis of ischemic injury and heart failure // *J Mol Cell Cardiol.* - 2000. - №32.- P.711–724.
2. Narula J., Kolodgie F.D., Virmani R. Apoptosis and cardiomyopathy // *Curr Opin Cardiol.* – 2000. - №15.- P.183–188.
3. Rodriguez M., Lucchesi B.R., Schaper J. Apoptosis in myocardial infarction // *Ann Med.* – 2002. - №34.- P.470–479.
4. Пальцев М.А., Аничков Н.М. Патологическая анатомия. М.: Медицина, 2001.- 401 с.
5. Черкасова О.Р. Содержание общего кортикостерона. //Проблемы эндокринологии. – 2001.- № 1.- С.37-39.
6. Ажипа Я.И. Медико-биологические аспекты применения метода ЭПР. М.:Наука, 1983. - 528 с.

7. Непомнящих Л.М., Лушникова Е.Л., Семенов Д.Е. Регенеративно-пластическая недостаточность сердца: морфологические основы и молекулярные механизмы. М.: Медицина, 2003.-216 с.

Репозиторий БГМУ