

УДК 61:577.15; 616-092.9

©Коллектив авторов

## **ОЦЕНКА АКТИВНОСТИ КАСПАЗЫ-3 В ТКАНИ МИОКАРДА КРОЛИКОВ ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЙ ГЕМОДИНАМИЧЕСКОЙ ПЕРЕГРУЗКЕ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА СЕРДЦА**

***М.Л. Благонравов<sup>1\*</sup>, М.В. Онуфриев<sup>2</sup>, Е.А. Демуров<sup>1</sup>, Н.В. Гуляева<sup>2</sup>, В.А. Фролов<sup>1</sup>***

<sup>1</sup>Государственное образовательное учреждение высшего профессионального образования “Российский университет дружбы народов”, Медицинский факультет, Кафедра общей патологии и патологической физиологии, ул. Миклухо-Маклая, д. 8, 117198, Москва; тел.: +7(495) 787-38-03 доб. 19-88; факс: +7(495) 434-73-03; эл. почта: blagonravovm@mail.ru

<sup>2</sup>Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии РАН, Лаборатория функциональной биохимии нервной системы

Известно, что хроническая перегрузка левого желудочка сердца сопровождается повышением интенсивности апоптоза кардиомиоцитов. Вместе с тем, на данный момент нет достаточных сведений о том, в каком направлении и в какой степени феномен программированной клеточной гибели меняется при острой перегрузке левого желудочка, патогенез которой существенно отличается от хронической. Исследовали активность каспазы-3 в ткани миокарда левого желудочка кроликов на 1, 3 и 5 сутки после моделирования острой гемодинамической перегрузки левого желудочка путём хирургического сужения восходящей аорты. В качестве контрольной группы использовали интактных кроликов. Установлено, что активность каспазы-3 достоверно повышается в обоих желудочках на 1-е сутки процесса, на 3-и сутки становится в 2 раза выше контрольного значения, а к 5-м суткам снижается практически до контрольного значения. На основании полученных результатов был сделан вывод, что острая гемодинамическая перегрузка левого желудочка может являться причиной усиления апоптоза в ткани миокарда обоих желудочков сердца в первые несколько суток от начала патологического процесса.

**Ключевые слова:** миокард, левый желудочек, правый желудочек, перегрузка, каспаза, апоптоз.

**ВВЕДЕНИЕ.** Аспартат-специфические цистеиновые протеазы, относящиеся к семейству каспаз (ICE/CED-3 – interleukin-1 beta-converting enzyme – интерлейкин-1 бета-превращающий фермент), играют ключевую роль в реализации

---

\* - адресат для переписки

механизма апоптотической гибели клеток большинства млекопитающих, что позволяет использовать определение их активности в качестве индикатора интенсивности апоптоза [1, 2].

К настоящему времени описано уже более 15 ферментов из данного семейства, которое включает в себя 3 подгруппы: инициаторные, провоспалительные и эффекторные. Последние формируют так называемый каспазный каскад, ответственный за индукцию, трансдукцию и амплификацию внутриклеточных апоптотических сигналов [3].

Индукция апоптоза может быть обусловлена как внешними стимулами, передаваемыми в клетку через мембранные “рецепторы смерти” (Fas-L и другие лиганды, относящиеся к суперсемейству рецепторов к TNF – фактору некроза опухолей) [4, 5], так и специфическими изменениями внутриклеточных молекул, в частности, нарушениями нативной структуры ДНК, при которых запускается митохондриальный механизм программированной клеточной гибели [6]. Реализация первого из названных путей обеспечивается с участием каспазы-8 [7, 8]. Во втором случае через поры митохондриальной мембраны в цитоплазму выходит цитохром c и другие факторы, активирующие каспазный каскад [9, 10]. Однако при любом из описанных вариантов конечным ферментом каспазной цепи, необходимым для конденсации хроматина, фрагментации ДНК с последующим образованием апоптотических телец, является каспаза-3 [11]. Таким образом, данный фермент может быть использован в качестве универсального маркера для оценки интенсивности программированной клеточной гибели, независимо от конкретного пути её реализации. Кроме того, преимуществом данной методики является высокая степень её специфичности по отношению к исследуемому явлению.

В последнее десятилетие в литературе появился ряд работ, в которых приводятся результаты исследования апоптоза кардиомиоцитов (КМЦ) при различных формах патологии сердечно-сосудистой системы методом оценки активности каспазы-3 в миокарде. Некоторые экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о том, что при хронической перегрузке левого желудочка (ЛЖ), вызванной как артериальной гипертензией, так и медленно прогрессирующим стенозом грудной аорты, активность каспазы-3 в миокарде резко увеличивается [12-14].

Вместе с тем, остаётся малоизученным вопрос об интенсивности апоптоза при острой гемодинамической перегрузке ЛЖ, патогенез которой принципиально отличается от хронической, что и определило предмет нашего внимания в данном исследовании.

**МЕТОДИКА.** Эксперимент был поставлен на 20 кроликах-самцах породы “Шиншилла” массой 3,0–3,5 кг., которые были разделены на 4 группы (по 5 животных в каждой): 1 контрольная (интактные кролики) и 3 подопытных (по одной группе на каждый из 3-х сроков исследования: 1, 3 и 5 суток соответственно). Кроликам из подопытных групп с целью моделирования острой гемодинамической перегрузки ЛЖ под общим наркозом выполняли хирургическую операцию, при которой производилось сужение восходящей аорты примерно на 1/3 путём навинчивания на неё металлической спирали меньшего диаметра.

Далее у всех животных в соответствии с приведённой выше схемой исследования под общим наркозом выполняли вскрытие грудной клетки и экстирпацию сердца для последующего биохимического исследования.

Ткань миокарда отдельно левого и правого желудочков сердца измельчали с использованием специального механического устройства и гомогенизировали в среде выделения (20 mM HEPES, pH 7,5, 10 mM KCl, 1,5 mM MgCl<sub>2</sub>, 1 mM ДТТ, 1 mM фенилметилсульфонилфторид, по 10 мкг/мл апротинина, пепстатина А и лейпептина): “Sigma”, (США); в гомогенизаторе Potter S (тефлон–стекло; “Braun”, ФРГ) со скоростью 1500 об/мин. Гомогенаты центрифугировали при 15000 g в течение 30 мин при 4°C и полученные супернатанты использовали для оценки активности каспазы-3.

Активность каспазы-3 определяли флуориметрическим методом по скорости расщепления синтетического флуорогенного субстрата Ас-DEVD-АМС (N-ацетил-Асп-Глу-Вал-Асп-7-амино-4-трифторфторметилкумарин, "Biomol", США) [15]. Супернатант инкубировали 60 мин при 37°C в реакционном буфере (50 мМ HEPES, pH 7,5, 10% сахара, 10 мМ дитиотреитол, 0,1% CHAPS) в двух параллельных пробах, одна из которых содержала 100 мкМ Ас-DEVD-АМС, а другая 100 мкМ Ас-DEVD-АМС и 10 мкМ специфического ингибитора каспазы-3 Ас-DEVD-CHO. Флуоресценцию регистрировали каждые 10 мин на спектрофлуориметре Hitachi F-3000 при длине волны возбуждения 380 нм и эмиссии 440 нм. Активность каспазы-3 рассчитывали по разнице скоростей расщепления субстрата в пробах без ингибитора и в присутствии ингибитора с учетом калибровочной кривой флуоресценции стандарта АМС. Концентрацию белка в супернатантах определяли по методу Bradford [16].

Все числовые данные подвергались статистической обработке с помощью программ, разработанных на кафедре общей патологии и патологической физиологии, а также программы "Biostat". Вычислялись среднее значение, ошибка среднего и среднеквадратическое отклонение. Использовался t-критерий Стьюдента. За достоверное принималось отличие средних при  $p \leq 0,05$ .

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ.** Как следует из данных, представленных в таблице 1, общая Ас-DEVD-расщепляющая активность в миокарде левого желудочка сердца достоверно увеличивается уже к концу 1-х суток его гемодинамической перегрузки. К 3-м суткам процесса данный показатель продолжает нарастать и становится выше контрольного значения более чем в 2 раза. На 5-е сутки активность ферментов, расщепляющих субстрат каспазы-3, несколько снижается по сравнению с предыдущим сроком, но продолжает оставаться на уровне, достоверно более высоком по сравнению с контролем.

Таблица 1. DEVD-расщепляющая активность (пмоль АМС/мин/мг белка) в миокарде левого желудочка сердца кроликов при стенозе восходящей аорты.

Показатель	Контроль	Сроки процесса		
		1-е сутки	3-и сутки	5-е сутки
<b>S</b>	<b>0,70±0,06</b>	<b>1,31±0,21*</b>	<b>1,55±0,29*</b>	<b>1,19±0,21*</b>
<b>S+I</b>	<b>0,38±0,04</b>	<b>0,41±0,08</b>	<b>0,51±0,04*</b>	<b>0,54±0,05*</b>
<b>S-SI</b>	<b>0,32±0,08</b>	<b>0,90±0,26*</b>	<b>1,04±0,26*</b>	<b>0,64±0,19</b>

Примечание: здесь и в таблице 2: S - активность протеолитических ферментов в пробах с субстратом каспазы-3 Ас-DEVD-АМС (общая DEVD-расщепляющая активность), S+I - активность в пробах, к которым кроме субстрата был добавлен специфический ингибитор каспазы-3 Ас-DEVD-CHO (неспецифическая, оставшаяся после ингибирования активность), S-SI - разница между активностью в S и S+I, активность каспазы-3. Звёздочкой отмечены показатели, достоверно отличающиеся от контроля при  $p \leq 0,05$ . Приведены средние значения  $\pm$  ошибка средних 5 опытов.

В пробах, к которым помимо субстрата был добавлен специфический ингибитор каспазы-3, остаточная активность, по-видимому, других протеолитических ферментов также постепенно нарастает по мере развития патологического процесса, достоверно отличаясь от контроля на 3-и и 5-е сутки. Однако это происходит значительно менее интенсивно, чем в пробах с субстратом без добавления ингибитора каспазы-3 (рис. 1).

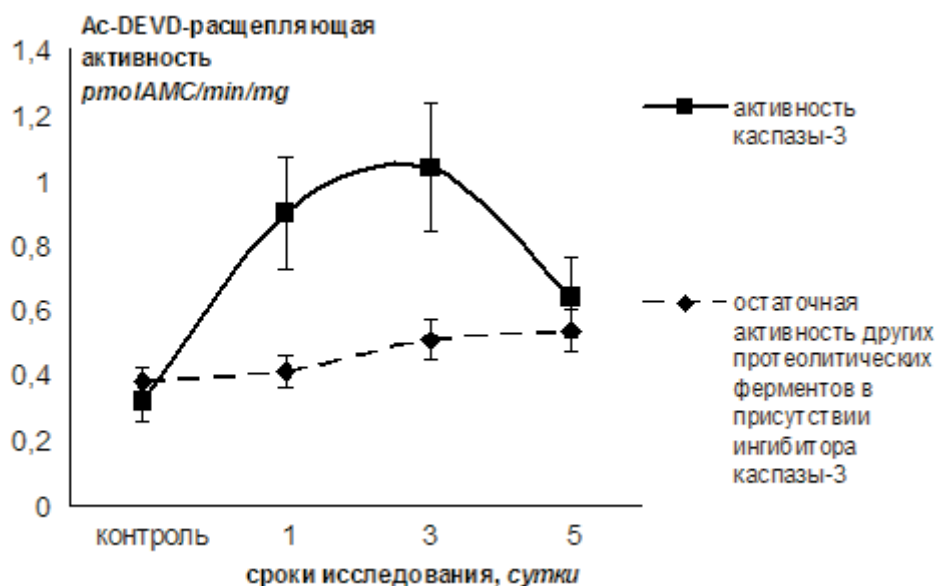


Рисунок 1.

Динамика Ас-DEVD-расщепляющей активности в миокарде левого желудочка сердца кроликов на фоне его острой гемодинамической перегрузки.

Некоторое увеличение активности ферментов, расщепляющих субстрат каспазы-3 в присутствии её ингибитора, можно объяснить тем, что другие протеолитические ферменты могут активироваться в динамике процесса и вносить свой вклад в расщепление субстрата каспазы-3.

Специфическая активность каспазы-3, под которой мы понимаем разницу между Ас-DEVD-расщепляющей активностью в пробах с субстратом и при добавлении специфического ингибитора каспазы-3, достоверно увеличивалась на 1-е сутки процесса, становилась ещё выше к концу 3-х суток. Однако на 5-е сутки наблюдалось заметное уменьшение данного показателя по сравнению с двумя предыдущими сроками и значение её хоть и превышало норму, но отличие было недостоверным.

В миокарде правого желудочка (ПЖ) сердца (табл. 2) активность каспазы-3 достоверно увеличивается на 1-е сутки острой перегрузки ЛЖ, становится ещё выше к 3-м суткам, достигая максимума, а на 5-е сутки резко снижается почти до контрольного уровня, что позволяет говорить об инактивации данного фермента после осуществления им проапоптотических функций к концу эксперимента.

Таблица 2. DEVD-расщепляющая активность (пмоль AMC/мин/мг белка) в миокарде правого желудочка сердца кроликов при стенозе восходящей аорты.

Показатель	Контроль	Сроки процесса		
		1-е сутки	3-и сутки	5-е сутки
<b>S</b>	<b>0,86±0,08</b>	<b>1,56±0,25*</b>	<b>1,83±0,32*</b>	<b>0,96±0,18</b>
<b>S+I</b>	<b>0,4±0,06</b>	<b>0,36±0,06</b>	<b>0,53±0,02*</b>	<b>0,34±0,09</b>
<b>S-SI</b>	<b>0,46±0,07</b>	<b>1,20±0,21*</b>	<b>1,30±0,31*</b>	<b>0,62±0,13</b>

Ас-DEVD-расщепляющая активность в присутствии ингибитора каспазы-3 достоверно увеличивалась лишь на 3-и сутки процесса, но менее существенно, чем в пробах без ингибитора. Анализируя динамику процесса в целом, можно сказать, что активность других протеаз, способных расщеплять субстрат каспазы-3, незначительно менялась по сравнению с контролем.

Как и в случае с ЛЖ, на всех сроках эксперимента отличия Ас-DEVD-расщепляющей активности в пробах без ингибитора и при добавлении ингибитора являются достоверными (рис. 2).

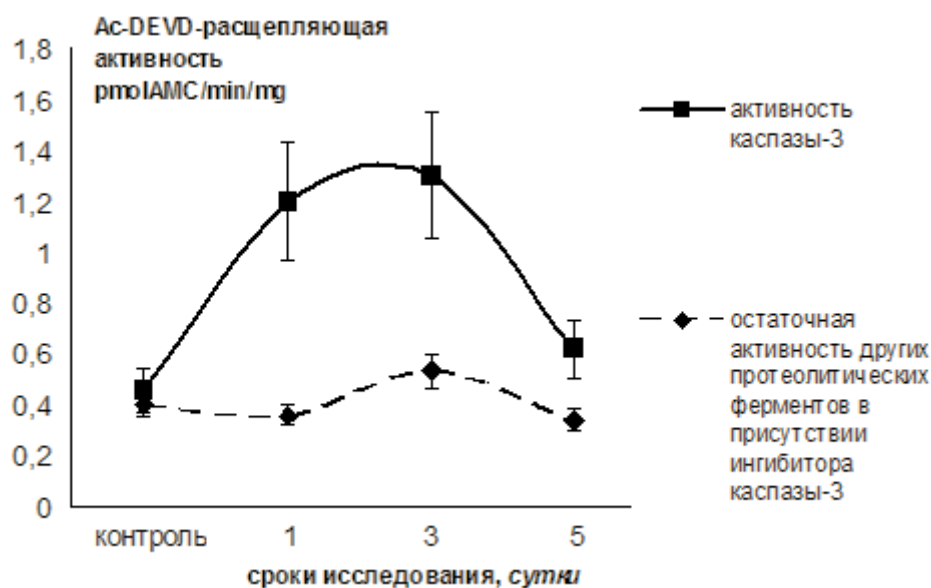


Рисунок 2.

Динамика Ас-DEVD-расщепляющей активности в миокарде правого желудочка сердца кроликов на фоне острой гемодинамической перегрузки левого желудочка.

Таким образом, динамика активности каспазы-3 в миокарде левого и правого желудочков сердца в нашем исследовании является сходной: на протяжении первых 3-х суток патологического процесса происходит стремительное увеличение данного показателя с максимумом на 3-и сутки, а затем к 5 суткам отмечается его снижение, более выраженное в миокарде ПЖ, где каспаза-3 практически возвращается на уровень нормы, однако, в миокарде ПЖ активность каспазы-3 увеличивается в первые трое суток патологического процесса несколько более интенсивно, чем в миокарде ЛЖ.

Результаты проведенного исследования позволяют дать оценку некоторым явлениям, которые наблюдаются в миокарде под влиянием его острой перегрузки. Во-первых, на ранних стадиях адаптации сердца к внезапно возросшему сопротивлению сердечному выбросу происходит резкое увеличение активности каспазы-3 в миокарде ЛЖ и ПЖ, что может свидетельствовать об интенсификации апоптоза клеток миокарда, вероятнее всего кардиомиоцитов. КМЦ млекопитающих обладают крайне ограниченной способностью к регенерации [17], поэтому их гибель посредством некроза или апоптоза должна неизбежно привести к снижению сократительной способности миокарда или, как минимум, к дефициту его резервных возможностей. Данное предположение согласуется с результатами исследований, в которых установлена связь между апоптозом КМЦ и развивающейся сердечной недостаточностью [17-19].



Другим важным и при этом несколько менее ожидаемым результатом нашего исследования стало увеличение активности каспазы-3 в миокарде правого желудочка при перегрузке левого, что также может указывать на усиление апоптоза. Механизм здесь, по-видимому, основывается также на гемодинамической перегрузке ПЖ, но связанной в данном случае с застойными явлениями в малом круге кровообращения на фоне, вероятно, увеличения конечного диастолического объема в левом желудочке. Однако для правого желудочка потеря КМЦ является обстоятельством гораздо более критическим, т.к. он в меньшей степени адаптирован к перегрузке и, являясь для сердца “входом в систему” [20], может довольно быстро привести к декомпенсации его деятельности в целом.

Таким образом, можно предположить, что усиление апоптоза КМЦ представляет собой реакцию не только на хроническую, но и на острую перегрузку желудочков. Чем это можно объяснить? В одной из своих предыдущих работ мы установили, что на ранних стадиях экспериментальной артериальной гипертензии в миокарде параллельно развиваются два процесса: гипертрофия миофибрилл и усиление апоптоза КМЦ, причём между двумя этими явлениями прослеживается сильная достоверная корреляционная связь. Это позволило нам сделать вывод о том, что апоптоз является фактором, ограничивающим чрезмерную гипертрофию миокарда при постепенно возрастающей на него гемодинамической нагрузке [21]. Вполне возможно, что усиление апоптоза КМЦ при острой перегрузке также является своего рода превентивным ответом на неизбежную гипертрофию.

Между тем, пожалуй, наиболее сложно на основе полученных нами результатов и имеющихся в литературе сведений объяснить механизмы, за счёт которых избыточная нагрузка, падающая на левый желудочек, приводит к усилению апоптоза в ткани миокарда. Известно, что при артериальной гипертензии интенсификация программированной клеточной гибели КМЦ связана с повышением содержания в крови ангиотензина-II [22]. Однако в экспериментах по хронической перегрузке сердца у постепенно растущих кроликов, которым предварительно в возрасте нескольких дней после рождения накладывали спираль на восходящую аорту, с течением времени также нарастала интенсивность апоптоза КМЦ [12], что в данном случае скорее связано с увеличением сопротивления сердечному выбросу, а не с влиянием ангиотензина-II плазмы. Возможно, причиной индукции программированной клеточной гибели КМЦ при увеличении механической нагрузки является повышение степени растяжения стенки желудочков, при котором значительно активизируется поступление в клетку ионов  $Ca^{2+}$ , а последний, как известно, стимулирует каспазный каскад [23].

**ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ВЫВОДЫ.** При остро возникающем стенозе восходящей аорты наблюдается резкое увеличение активности каспазы-3 в миокарде обоих желудочков. Это позволяет сделать следующий вывод: острая гемодинамическая перегрузка левого желудочка может являться причиной усиления апоптоза в ткани миокарда обоих желудочков сердца в первые несколько суток от начала патологического процесса.

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

## ЛИТЕРАТУРА

1. Gurtu V., Kain S.R., Zhang G. (1997) *Anal. Biochem.*, **251**(1), 98-102.
2. Thornberry N.A. (1997) *Br. Med. Bull.*, **53**(3), 478-490.
3. Chowdhury I., Tharakan B., Bhat G.K. (2008) *Comp. Biochem. Physiol. B. Biochem. Mol. Biol.*, **151**(1), 10-27.
4. Schultz D.R., Harrington W.J. Jr. (2003) *Semin. Arthritis Rheum.*, **32**(6), 345-369.

5. *Sheikh M.S., Huang Y.* (2003) *Cell Cycle*, **2**(6), 550-552.
6. *Kim R., Emi M., Tanabe K.* (2006) *Cancer Chemother. Pharmacol.*, **57**(5), 545-553.
7. *Beere H.M.* (2005) *J. Clin. Invest.*, **115**(10), 2633-2639.
8. *Kiechle F.L., Zhang X.* (2002) *Clin. Chim. Acta.*, **326**(1-2), 27-45.
9. *Jourdain A., Martinou J.C.* (2009) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**(10), 1884-1889.
10. *Scorrano L.* (2009) *Int. J. Biochem. Cell Biol.*, **41**(10), 1875-1883.
11. *Porter A.G., Jänicke R.U.* (1999) *Cell Death Differ.*, **6**(2), 99-104.
12. *Choi Y.H., Cowan D.B., Moran A.M., Colan S.D., Stamm C., Takeuchi K., Friehs I., del Nido P.J., McGowan F.X.* (2009) *J. Thorac. Cardiovasc. Surg.*, **137**(6), 1356-1362.
13. *Diep Q.N., El Mabrouk M., Yue P., Schiffrin E.L.* (2002) *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **282**(5), 1635-1641.
14. *González A., López B., Ravassa S., Querejeta R., Larman M., Díez J., Fortuño M.A.* (2002) *Hypertension*, **39**(1), 75-80.
15. *Яковлев А.А., Онуфриев М.В., Степаничев М.Ю., Браун К., Гуляева Н.В.* (2001) *Нейрохимия*, **18**, 41-43.
16. *Bradford M.M.* (1976) *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
17. *Goldspink D.F., Burniston J.G., Tan L.B.* (2003) *Exp. Physiol.*, **88**(3), 447-458.
18. *Sabbah H.N.* (2001) *Cardiovasc. Drugs Ther.*, **15**(6), 525-528.
19. *van Empel V.P., Bertrand A.T., Hofstra L., Crijns H.J., Doevendans P.A., De Windt L.J.* (2005) *Cardiovasc. Res.*, **67**(1), 21-29.
20. *Казанская Т.А., Фролов В.А.* (1995) Правый желудочек сердца, РУДН, М
21. *Фролов В.А., Дроздова Г.А., Риегер П., Благонаравов М.Л.* (2004) *Бюл. Экспер. биол.*, **137**(3), 249-252.
22. *Fabris B., Candido R., Bortoletto M., Zentilin L., Sandri M., Fior F., Toffoli B., Stebel M., Bardelli M., Belgrado D., Giacca M., Carretta R.* (2007) *J. Hypertens.*, **25**(7), 1481-1490.
23. *Liao X.D., Tang A.H., Chen Q., Jin H.J., Wu C.H., Chen L.Y., Wang S.Q.* (2003) *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **310**(2), 405-411.

Поступила: 26. 02. 2010.

# ASSESSMENT OF CASPASE-3 ACTIVITY IN RABBIT MYOCARDIAL TISSUE DURING EXPERIMENTAL HEMODYNAMIC OVERLOAD OF THE LEFT VENTRICLE OF THE HEART

*M.L. Blagonravov<sup>1</sup>, M.V. Onufriev<sup>2</sup>, E.A. Demurov<sup>1</sup>, N.V. Guliaeva<sup>2</sup>, V.A. Frolov<sup>1</sup>*

<sup>1</sup>Department of General Pathology and Pathological Physiology, Russian University of Peoples' Friendship, Medical Faculty, 8, Miklukho-Maklaya str., Moscow, 117198 Russia; tel.: +7(495) 787-38-03; fax: +7(495) 434-73-03; e-mail: blagonravovm@mail.ru

<sup>2</sup>Laboratory of Functional Biochemistry of the Nervous System, Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, Russia

It's well known that chronic overload of the cardiac left ventricle is accompanied by an increase in the cardiomyocyte apoptosis rate. However direction and extent of programmed cell death changes under an acute overload of the left ventricle still requires detailed investigation. Caspase-3 activity has been investigated in myocardium of rabbits on the 1, 3 and 5 days after modeling of left ventricle hemodynamic overload caused by surgical narrowing of the ascending aorta. Control group included intact animals. It was found that caspase-3 activity significantly increased in both ventricles on day 1; it increased more than twofold above controls on day 3; it began to decrease by day 5. On the basis of the obtained data it was concluded that: an acute hemodynamic overload of the left ventricle is a cause of apoptosis acceleration in the myocardial tissue of both cardiac ventricles during first days of the investigated process.

**Key words:** myocardium, left ventricle, right ventricle, overload, caspase, apoptosis.