

## ВЛИЯНИЕ БЛОКАДЫ $ET_A$ -РЕЦЕПТОРОВ НА АПОПТОЗ КАРДИОМИОЦИТОВ И РАЗВИТИЕ ГИПЕРТРОФИИ МИОКАРДА ПРИ ГЕНЕТИЧЕСКИ ОБУСЛОВЛЕННОЙ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

М. М. Азова, М. Л. Благоднаров, В. А. Фролов<sup>1</sup>

Исследованы интенсивность апоптоза кардиомиоцитов и степень гипертрофии желудочков сердца у спонтанно гипертензивных крыс без медикаментозного воздействия и после 10-дневного применения ВQ-123, относящегося к селективным антагонистам  $ET_A$ -рецептора. Обнаружено, что введение ВQ-123 предупреждает активацию апоптотических процессов и существенно ограничивает степень развития гипертрофии миокарда левого желудочка, но не оказывает влияния на те же явления в правом желудочке.

**Ключевые слова:** апоптоз, кардиомиоциты, артериальная гипертензия, ВQ-123,  $ET_A$ -рецепторы, эндотелин-1

### ВВЕДЕНИЕ

Артериальная гипертензия (АГ) представляет мультифакторный синдром, развитие которого опосредовано сложным комплексом нейрогуморальных механизмов. В последние годы особое внимание исследователей привлекает эндотелин-1 (ЕТ-1), влияние которого на состояние сосудистого тонуса определяется типом взаимодействующего с ним рецептора. Так,  $ET_A$ -рецептор, присутствующий в гладкомышечных клетках кровеносных сосудов и дыхательных путей, кардиомиоцитах и некоторых других клетках, опосредует вазоконстрикцию и клеточную пролиферацию, в то время как  $ET_B$ -рецептор, встречающийся преимущественно в эндотелиальных клетках и гладкой мускулатуре кровеносных сосудов, участвует в высвобождении окиси азота, являющегося вазодилатирующим агентом [1, 2, 6]. ЕТ-1, действуя как ростовой фактор, может способствовать гипертрофии миокарда и гладкой мускулатуры кровеносных сосудов [4, 10]. Таким образом,  $ET_A$ -опосредованные эффекты эндотелина, заключающиеся в сужении артериальных сосудов и ремоделировании сердечно-сосудистой системы, усугубляют течение АГ [4, 6, 9]. АГ и развивающаяся гипертрофия, в свою очередь, создают условия, при которых повышается интенсивность апоптоза клеток миокарда, что может привести к формированию хронической сердечной недостаточности [3, 5]. В этой связи можно предположить, что применение антагонистов  $ET_A$ -рецепторов будет способствовать снижению артериального давления, уменьшению гипертрофии и опосредованно воздействовать на программированную клеточную гибель кардиомиоцитов.

Целью данной работы явилось изучение влияния ВQ-123, относящегося к антагонистам  $ET_A$ -рецепторов, на активность апоптотических процессов и разви-

тие гипертрофии миокарда желудочков сердца у спонтанно гипертензивных крыс.

### МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Эксперимент проводили в двух последовательных сериях, каждая из которых включала 2 группы животных: 15-недельные спонтанно гипертензивные крысы линии SHR (опыт) и нормотензивные крысы линии Wistar-Kyoto того же возраста (контроль). В I серии эксперимента животные не получали лечения. Во II серии спонтанно гипертензивным крысам 1 раз в сутки в течение 10 дней внутрибрюшинно вводили ВQ-123 (“Sigma”, США), разведенный в 0,9 % водном растворе хлорида натрия, в дозе 100 нмоль/кг. Каждая исследованная группа включала 9 животных (6 — для биохимического, 3 — для иммуногистохимического и гистологического исследований). У животных контрольных и опытных групп под общим обезболиванием вскрывали грудную клетку и проводили экстирпацию сердца, затем выделяли фрагмент миокарда для последующего исследования.

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

**Биохимическое исследование.** Лизаты желудочков сердец крыс, полученные посредством гомогенизации фрагмента миокарда в среде выделения (20 мМ НЕРЕС, рН 7,5, 10 мМ КСl, 1,5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 1 мМ ДТТ), к которой добавляли коктейль ингибиторов протеаз (104 мМ АЕBSF; 0,08 мМ апротинин; 1,5 мМ пепстатин А; 2 мМ лейпептин; 4 мМ бестатин; 1,4 мМ Е-64) в соотношении 100:1, с последующим центрифугированием при 15000 g в течение 30 мин при температуре + 4 °С, использовали для оценки активности каспазы 3 и каспазы 8. Активность данных ферментов определяли колориметрическим методом с помощью наборов “Caspase 3 AssayKit, Colorimetric” и “Caspase 8 AssayKit, Colorimetric” (“Sigma”, США).

Для иммуногистохимического и гистологического исследований образцы миокарда желудочков сердец

<sup>1</sup> Кафедра общей патологии и патологической физиологии (зав. — проф. В. А. Фролов) ФГБОУ ВПО “Российский университет дружбы народов”, 117198, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 6.

Таблица 1. Показатели, характеризующие апоптоз и гипертрофию кардиомиоцитов левого желудочка сердца крыс ( $M \pm m$ )

Показатель	I серия эксперимента		II серия эксперимента	
	Контроль	SHR	Контроль	SHR + BQ-123
Активность каспазы 3, нмоль/(мин · мл)	0,18 ± 0,02	0,27 ± 0,03*	0,22 ± 0,03	0,18 ± 0,02
Активность каспазы 8, нмоль/(мин · мл)	1,06 ± 0,13	1,61 ± 0,06*	0,59 ± 0,07	0,52 ± 0,10
Индекс апоптоза, %	10,12 ± 0,86	25,98 ± 0,94*	10,12 ± 0,86	10,88 ± 0,71
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0,27 ± 0,01	0,11 ± 0,01*	0,27 ± 0,01	0,17 ± 0,01**

**Примечание.** \* — показатель достоверно отличается от контроля при  $p \leq 0,05$ , \*\* — показатель достоверно отличается от опыта I серии и контроля при  $p \leq 0,05$ .

крыс фиксировали в течение 72 ч в 10 % нейтральном забуференном формалине. Далее проводили обработку материала и заливку в парафин по общепринятой методике.

*Иммуногистохимическое исследование.* Гистологические срезы толщиной 5 мкм наносили на стекла с поли-L-лизинным покрытием. Апоптоз кардиомиоцитов оценивали по интенсивности фрагментации ДНК в ядрах, определяемой методом TUNEL (Terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labeling) с использованием набора реактивов Apo-BrdU-ИНС In Situ DNA Fragmentation Assay Kit ("BioVision", США). Препараты докрашивали гематоксилином. Реакцию считали положительной при появлении коричневой окраски в ядрах кардиомиоцитов. Анализировали 20 полей зрения в каждом препарате. Количественную оценку интенсивности апоптоза выполняли, определяя индекс апоптоза, представляющий собой отношение числа TUNEL-позитивных ядер к общему количеству ядер кардиомиоцитов в поле зрения.

*Гистологическое исследование.* Срезы миокарда толщиной 5 – 7 мкм окрашивали по стандартной методике гематоксилином и эозином. Анализировали 15 полей зрения в каждом препарате и с помощью сетки Автандилова определяли содержание ядер и миофибрилл. Затем на основании полученных данных вычисляли ядерно-цитоплазматическое отношение, отражающее степень гипертрофии миокарда.

Исследования проводили на оборудовании Центра коллективного пользования (НОЦ) РУДН и кафедры общей патологии и патологической физиологии медицинского факультета РУДН.

Статистические расчеты осуществляли с использованием программы STATISTICA 6.0 (StatSoft Inc.,

США). Для оценки достоверности различий изучаемых выборок применяли U-критерий Манна-Уитни и t-критерий Стьюдента.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В табл. 1 представлены результаты исследования миокарда левого желудочка сердца крыс контрольных и опытных групп.

Из приведенных данных следует, что введение BQ-123 спонтанно гипертензивным крысам предупреждает активацию апоптотических процессов в миокарде левого желудочка, что подтверждается отсутствием статистически значимого отличия в индексе апоптоза у контрольной и опытной групп во II серии эксперимента. Кроме того, наблюдается подавление активности каспазного каскада, звеньями которого являются инициаторная каспаза 8 и эффекторная каспаза 3.

Полученные результаты позволяют полагать, что ET-1 способствует индукции программированной гибели клеток миокарда при артериальной гипертензии. Вероятно, апоптогенное действие данного пептида обусловлено как его вазоконстрикторными свойствами, так и, в значительной степени, его участием в развитии гипертрофии миокарда, о наличии которой у гипертензивных крыс линии SHR свидетельствует статистически достоверное снижение ядерно-цитоплазматического отношения у животных опытной группы в I серии эксперимента. При введении крысам линии SHR соединения BQ-123 ядерно-цитоплазматическое отношение также достоверно снижается по сравнению с контрольным значением, что, по-видимому, обусловлено влиянием других факторов, способствующих развитию гипертрофии, ведущим из которых, является ангиотензин II [6, 8]. Тем не менее после медикаментозного воздействия наблюдается статистически зна-

Таблица 2. Показатели, характеризующие апоптоз и гипертрофию кардиомиоцитов правого желудочка сердца крыс ( $M \pm m$ )

Показатель	I серия эксперимента		II серия эксперимента	
	Контроль	SHR	Контроль	SHR + BQ-123
Активность каспазы 3, нмоль/(мин · мл)	0,11 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01	0,10 ± 0,01
Индекс апоптоза, %	4,49 ± 0,85	11,37 ± 0,85*	4,49 ± 0,85	10,42 ± 0,76*
Ядерно-цитоплазматическое отношение	0,26 ± 0,01	0,21 ± 0,01*	0,26 ± 0,01	0,22 ± 0,01*

**Примечание.** \* — показатель достоверно отличается от контроля при  $p \leq 0,05$ .

чимое повышение данного показателя, что позволяет говорить об ограничении степени развития гипертрофии левого желудочка у гипертензивных крыс.

Исследование миокарда правых желудочков сердец крыс контрольных и опытных групп показало, что при генетически обусловленной АГ происходит усиление апоптоза кардиомиоцитов, причем в реализации программированной гибели кардиомиоцитов правого желудочка преобладают некаспазные механизмы: достоверного изменения активности каспазы 3 не наблюдается ни в I, ни во II сериях исследования. Активность инициаторной каспазы 8 в миокарде правого желудочка мы не определяли в связи с тем, что не было выявлено отличий в активности эффекторной каспазы 3 (табл. 2). Было также обнаружено, что блокада ET<sub>A</sub>-рецептора не влияет на формирование гипертрофии и интенсивность апоптотических процессов в миокарде правого желудочка.

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 содержание ET-1 в крови у крыс линии SHR незначительно отличается от нормы [7], в то время как при перегрузке миокарда повышается интенсивность синтеза ET-1 в кардиомиоцитах левого желудочка, а в правом желудочке данный показатель остается неизменным [4].

Таким образом, разработка, испытания и внедрение в клиническую практику селективных антагонистов ET<sub>A</sub>-рецепторов могут стать основой нового подхода к лечению сердечно-сосудистых заболеваний и профилактике их последствий, направленного на ограниче-

ние апоптотической гибели и гипертрофии кардиомиоцитов.

## ВЫВОДЫ

1. Механизмы, вовлеченные в реализацию апоптотической гибели кардиомиоцитов и формирование гипертрофии у спонтанно гипертензивных крыс в правом и левом желудочках сердца различаются.

2. Блокада ET<sub>A</sub>-рецептора соединением BQ-123 значительно снижает активность апоптотических процессов и развитие гипертрофии в миокарде левого желудочка сердца, но не влияет на соответствующие показатели в правом желудочке.

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

## ЛИТЕРАТУРА

1. В. А. Визир, А. Е. Березин, А. В. Демиденко, *Укр. терапевт. журн.*, № 6, 25 – 31 (2003).
2. О. А. Гозмаков, *Кардиология*, № 2, 50 – 58 (2001).
3. В. А. Фролов, Г. А. Дроздова, В. Ф. Мустяца, М. Л. Благоврахов, *Гипотензивная терапия и сердце*, РУДН, Москва (2009).
4. F. Brunner, C. Bras-Silva, A. S. Cerdeira, A. F. Leite-Moreira, *Pharmacol Ther.*, **111**(2), 508 – 531 (2006).
5. M. A. Fortuno, S. Ravassa, A. Fortuno, et al., *Hypertension*, **38**, 1406 – 1412 (2001).
6. D. E. Kohan, N. F. Rossi, W. Inscho, D. M. Pollock, *Physiol. Rev.*, **91**, 1 – 77 (2011).
7. J.-S. Li, E. L. Schiffrin, *Hypertension*, **25**, 495 – 500 (1995).
8. M. Paul, A. P. Mehr, R. Kreutz, *Physiol. Rev.*, **86**, 747 – 803 (2006).
9. F. Rodriguez-Pascual, O. Busnadiego, D. Lagares, S. Lamas, *Pharmacol. Res.*, **63**, 463 – 472 (2011).
10. T. Yamazaki, Y. Yazaki, *Z. Kardiol.*, **89**, 1 – 6 (2000).

Поступила 01.06.12

## THE EFFECT OF ET<sub>A</sub> RECEPTOR BLOCKADE ON CARDIOMYOCYTE APOPTOSIS AND MYOCARDIAL HYPERTROPHY DEVELOPMENT IN GENETICALLY HYPERTENSIVE RATS

M. M. Azova, M. L. Blagonravov, and V. A. Frolov

Department of Medicine Russian University of Peoples Friendship, ul. Miklukho-Maklaya 6, Moscow, 117198, Russia

Cardiomyocyte apoptosis and hypertrophy have been studied in the left and right ventricular myocardium of spontaneously hypertensive rats without treatment and after 10-day administration of the ET<sub>A</sub>-receptor antagonist BQ-123. It is established that BQ-123 prevents the activation of cardiomyocyte apoptosis and significantly decreases the extent of hypertrophy development in the left ventricular myocardium, but does not influence the same mechanisms in the right ventricular myocardium.

**Key words:** Apoptosis; cardiomyocytes; hypertension; BQ-123, ET<sub>A</sub> receptor; endothelin-1