

Роль апоптоза кардиомиоцитов в механизмах ишемического ремоделирования миокарда

Хлапов А.П.¹, Вечерский Ю.Ю.², Рязанцева Н.В.¹, Калюжин В.В.¹,
Мустафина Л.Р.¹, Шипулин В.М.², Новицкий В.В.¹

The role of cardiomyocyte apoptosis in mechanisms of ischemic myocardial remodeling

Khlapov A.P., Vechersky Yu.Yu., Ryazantseva N.V., Kalyuzhin V.V.,
Mustafina L.R., Shipulin V.M., Novitsky V.V.

¹ Сибирский государственный медицинский университет, г. Томск

² НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН, г. Томск

© Хлапов А.П., Вечерский Ю.Ю., Рязанцева Н.В. и др.

Исследована роль апоптоза кардиомиоцитов в механизмах ишемического ремоделирования миокарда. Материалом исследования являлись биоптаты миокарда левого желудочка 50 пациентов с ишемической болезнью сердца и хронической сердечной недостаточностью. Использованы методы коронаровентрикулографии, эхокардиографии, иммуногистохимии, TUNEL. Установлена существенная значимость апоптоза кардиомиоцитов на ранних этапах ремоделирования левого желудочка. При увеличении конечно-диастолического объема левого желудочка роль апоптоза кардиомиоцитов в патогенезе ремоделинга миокарда не значима. Полученные результаты указывают на важную предикторную роль регуляторных элементов апоптоза в диагностике ишемической болезни сердца и хронической сердечной недостаточности.

Ключевые слова: ремоделирование миокарда, апоптоз, хроническая сердечная недостаточность.

Here the role of cardiomyocyte apoptosis in mechanisms of ischemic myocardial remodeling was investigated. The samples of left ventricle were obtained on 50 patients with the diagnosed atherosclerotic disease of coronary arteries and heart failure. Obtained data allow to approve about the maximal importance of cardiomyocyte apoptosis at an early stages of ischemic myocardial remodeling. The role of cardiomyocyte apoptosis was decreased at a high volume of left ventricle. The received results suggest about an importance of cardiomyocyte apoptosis as a marker of ischemic myocardial remodeling and heart failure.

Key words: myocardial remodeling, apoptosis, heart failure.

УДК 616.127-005.4:616.15-018.5-091.818

Введение

Ишемическая болезнь сердца является одним из наиболее часто встречающихся заболеваний сердечно-сосудистой системы, в значительной степени определяя уровень летальности в популяции. По данным Всероссийского института профилактической медицины, показатели летальности при ишемической болезни сердца на сегодняшний день составляют более 800 случаев на 100 тыс. населения у мужчин и около 550 — у женщин, из которых на долю хронической сердечной недостаточности приходится более 90% [4].

В условиях кислородного голодания в сердце запускается каскад патологических реакций и процессов, обуславливающих ремоделинг миокарда, кульминационным клиническим признаком которого является хроническая сердечная недостаточность. Современной кардиологической наукой феномен ишемического ремоделирования миокарда рассматривается как сложный многоступенчатый процесс изменения структурно-геометрических характеристик левого желудочка, проявляющийся в виде гипертрофии и дилатации камер, приводящий к систолической и диастолической дисфункции и ухудшающий

качество жизни пациентов [2]. Ремоделирование миокарда предшествует клиническим проявлениям хронической сердечной недостаточности и сопровождает их.

В основе процесса ишемического ремоделирования миокарда лежат три фундаментальных механизма: фиброз, гипертрофия и гибель кардиомиоцитов [11]. В свете существующих на сегодняшний день представлений гибель кардиомиоцитов может происходить двумя путями — некроза и апоптоза (программируемая клеточная гибель). Во время инфаркта миокарда основным процессом, определяющим потерю клеточной массы сердца, является некроз кардиомиоцитов, приводящий к возникновению воспалительной реакции, пролиферации сосудистых клеток, макрофагальной инфильтрации, активации фибробластов и в конечном счете формированию рубца. Апоптоз кардиомиоцитов оканчивается образованием апоптотических тел без активации воспалительной реакции и является доминирующей формой гибели в условиях хронической ишемии [9].

Гипоксия, лежащая в основе ишемического повреждения миокарда, сопровождается выраженным энергетическим дефицитом, при котором энергетический метаболизм переключается на анаэробный гликолиз, следствием чего является накопление молочной кислоты. Избыток протонов H^+ удаляется из клетки путем сочетанной активности трех ион-специфичных мембранных транспортных систем: Na^+/H^+ -обменника, Na^+/HCO_3^- -котранспортера и вакуолярной протонной АТФ-азы. Существующий в условиях гипоксии дефицит аденозинтрифосфата (АТФ) нарушает работу этих механизмов, что может способствовать чрезмерному накоплению протонов H^+ и активации апоптоза [3]. В запуске апоптоза кардиомиоцитов при ацидозе может быть задействовано несколько механизмов: активация проапоптотических представителей суперсемейства bcl-2 (bnip3 и bax), перегрузка ионами Ca^{2+} , обусловленная сочетанной активностью Na^+/H^+ и Na^+/Ca^{2+} -обменников, приводящая к активации Ca^{2+} -зависимых ферментных систем эффекторной стадии апоптоза, а также активация

протеинкиназных систем сигнальной трансдукции (JNK, p38, протеинкиназа C δ) [10].

На фоне хронической ишемии миокарда апоптоз кардиомиоцитов также может быть запущен по внешнему (рецепторному) пути. Основанием для этого может служить как повышение содержания проапоптотических лигандов (Fas-L, TNF- α) в плазме крови, так и повышение количества рецепторов к соответствующим факторам на поверхности кардиомиоцитов (Fas-R, TNF-R1) [7].

В отличие от некроза апоптоз является упорядоченным и регулируемым процессом. Это дает возможность рассматривать его в качестве потенциальной терапевтической мишени при лечении ишемической болезни сердца и универсального диагностического маркера хронической сердечной недостаточности, способного патогенетически обосновать и скоординировать терапию, а также определить прогноз заболевания. В этой связи изучение роли ключевых регуляторных элементов апоптотического каскада кардиомиоцитов (проапоптотических и антиапоптотических представителей белков семейства bcl-2) в качестве предикторных маркеров хронической сердечной недостаточности ишемического генеза может иметь большое значение как для теоретической науки, так и для практической медицины.

Цель настоящего исследования — определение роли апоптоза кардиомиоцитов в механизмах развития ишемического ремоделирования миокарда.

Материал и методы

Материалом исследования явились биоптаты миокарда левого желудочка, полученные интраоперационно у 50 пациентов (45 мужчин, 5 женщин)

в возрасте 45—65 лет в условиях фармакологической кардиopleгии. Все исследования были выполнены

с информированного согласия обследованных и соответствовали этическим нормам Хельсинкской

декларации (2000). Критерием включения в исследование явилось наличие у пациентов ишемической болезни сердца — стенокардии напряжения (по классификации Канадского сердечно-сосудистого общества, функциональные классы II—IV) с документально подтвержденным атеросклеротическим поражением коронарных артерий и хронической сердечной недостаточности I—III функциональных классов (по NYHA). Критериями исключения из исследования служили кардиомиопатии неишемического генеза, патологии миокарда, ассоциированные с различными эндокринопатиями (кроме сахарного диабета), сочетание ишемической болезни сердца с поражением клапанного аппарата различной этиологии. Верификацию диагноза проводили на основании данных коронароангиографии, электрокардиографии и эхокардиографии. Для оценки коронарной перфузии вычисляли коронарный индекс, отражающий степень коронарной окклюзии и значимость окклюзированной артерии в кровоснабжении миокарда [1].

Для оценки роли апоптоза кардиомиоцитов в развитии хронической сердечной недостаточности пациенты были разделены на три клинические группы с учетом величин конечно-диастолического объема: I группа — менее 120 мл, II — от 120 до 150 мл, III группа — более 150 мл.

Полученный биопсийный материал фиксировался в 10%-м забуференном нейтральном формалине.

Определение морфологических признаков кардиосклероза осуществлялось в световом микроскопе после окраски срезов пикрофуксином по ван Гизону по стандартной методике. Оценка интенсивности кардиосклероза проводилась на основании вычисления склеротического индекса, отражающего объем соединительной ткани [12].

Определение экспрессии кардиомиоцитами ключевых белков-регуляторов апоптоза (bcl-2 и bax) выполнялось при помощи двухэтапного

авидин-биотинового метода с демаскировкой антигена (путем высокотемпературной обработки ткани) на парафиновых срезах с использованием моноклональных антител и визуализирующей системы фирмы «Dako Cytomation» (США) [6]. Проявление реакции контролировалось в микроскопе. Результаты иммуногистохимической реакции оценивались в световом микроскопе как отношение прореагировавших клеток к их общему количеству в 10 полях зрения.

Для выявления апоптоза кардиомиоцитов методом TUNEL был использован стандартный набор «Mebstain Apoptosis kit Direct» («Immunotech», Франция) согласно инструкции, предложенной фирмой-производителем. Результаты реакции оценивались как среднее количество прореагировавших ядер в 10 случайно выбранных участках по 100 мкм².

Статистическая обработка данных проводилась с использованием пакета программ статистического анализа Statistica for Windows (2002, версия 6.0) фирмы «Statsoft Inc.». Полученные данные обрабатывали методом вариационной статистики с вычислением для каждой выборки среднего арифметического значения M и среднеквадратического отклонения SD . Для оценки нормальности распределения данных использовали критерий Колмогорова—Смирнова, для оценки достоверности различий выборок — параметрический t -критерий Стьюдента и непараметрический критерий Манна—Уитни. Различие двух сравниваемых величин считали статистически достоверным, если вероятность их тождества оказывалась менее 5%.

Результаты исследования

Проведенное исследование показало наличие достоверного увеличения коронарного индекса у пациентов III группы по сравнению с группами I и II ($p < 0,05$): у больных I группы — $(3,96 \pm 1,13)$ усл. ед., II группы — $(5,14 \pm 1,62)$ усл. ед., III группы — $(9,37 \pm 1,84)$ усл. ед. Склеротический индекс, отражающий интенсивность склеротических процессов в миокарде, имел тенденцию к росту по мере увеличения конечно-диастолического объема (таблица).

Особенности реализации апоптоза кардиомиоцитов левого желудочка у больных с ишемическим ремоделированием миокарда ($M \pm SD$)

Регистрируемый показатель	Группа больных		
	I	II	III
Склеротический индекс, усл. ед	$9,53 \pm 1,43$	$12,26 \pm 1,17$ $p_1 < 0,05$	$15,58 \pm 2,08$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$
Bcl-2 ⁺ -кардиомиоциты, усл. ед	$0,04 \pm 0,02$	$0,05 \pm 0,02$ $p_1 > 0,05$	$0,04 \pm 0,01$ $p_1 > 0,05$ $p_2 > 0,05$
Bax ⁺ -кардиомиоциты, усл. ед	$0,53 \pm 0,17$	$0,24 \pm 0,11$ $p_1 < 0,05$	$0,21 \pm 0,09$ $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$
Bax/bcl-2, усл. ед	$13,25 \pm 2,31$	$4,80 \pm 1,64$ $p_1 < 0,05$	$5,25 \pm 1,30$ $p_1 < 0,05$ $p_2 > 0,05$
TUNEL ⁺ -ядра, усл. ед	$0,65 \pm 0,25$	$0,58 \pm 0,15$ $p_1 > 0,05$	$0,25 \pm 0,13$ $p_1 < 0,05$ $p_2 < 0,05$

Примечание. p_1 — достоверность различия показателей по сравнению с клинической группой I; p_2 — достоверность различия по сравнению с клинической группой II.

Иммуногистохимическое исследование не показало наличия достоверных различий в частоте экспрессии кардиомиоцитами антиапоптотического белка bcl-2 ни в одной из клинических групп (см. таблицу). Это может отражать одинаковую степень напряженности антиапоптотической системы при различных величинах конечно-диастолического объема.

Частота экспрессии проапоптотического белка bax в клинической группе I достоверно отличалась от аналогичного показателя в группах II и III (см. таблицу). Преобладание bax⁺-клеток в миокарде левого желудочка у пациентов с конечно-диастолическим объемом менее 120 мл наводит на мысль о предуготовленности кардиомиоцитов к апоптозу на ранних этапах ишемического ремоделирования миокарда и хронической сердечной недостаточности. Статистически значимых различий в содержании bax⁺-кардиомиоцитов в миокарде левого желудочка у больных II и III клинических групп не выявлено.

Оценка соотношения содержания bax и bcl-2 в кардиомиоцитах выявила достоверное увеличение показателя у больных I клинической группы, что позволяет говорить о прогностиче-

ской значимости этого критерия. Значения показателя bax/bcl-2 во II и III группах достоверно не различались (см. таблицу).

Повышенная чувствительность кардиомиоцитов к индукции апоптоза, характерная для ранних этапов ремоделирования миокарда и хронической сердечной недостаточности, подтверждается также результатами TUNEL-теста. Показано, что наибольшая встречаемость TUNEL⁺-ядер кардиомиоцитов характерна для I и II клинических групп (см. таблицу). Следует отметить, что присутствие TUNEL⁺-ядер в миокарде левого желудочка у пациентов всех клинических групп может прямо свидетельствовать о значимости апоптоза кардиомиоцитов в развитии ишемического ремоделирования миокарда.

Обсуждение

Гипоксическое повреждение миокарда является ведущим патогенетическим механизмом, лежащим в основе ишемической болезни сердца. Роль ишемического фактора в динамике ремоделирования миокарда отражается в виде увеличения значений склеротического индекса и объема левого желудочка при возрастании величины показателя коронарного индекса.

Ишемия, возникнув единожды, запускает сложный каскад метаболических реакций, лежащих в основе ишемического ремоделирования миокарда и формирования хронической сердечной недостаточности [5]. Одним из ключевых процессов, принимающих участие в ремоделинге миокарда, является апоптоз кардиомиоцитов. Однако существующие на сегодняшний день представления о роли дисрегуляции программированной гибели кардиомиоцитов в патогенезе хронической сердечной недостаточности весьма противоречивы.

Проведенное исследование позволило получить фактические данные, свидетельствующие о повышении содержания в кардиомиоцитах белка bax — маркера запуска программированной гибели клеток — у больных с конечно-диастолическим объемом сердца менее 120 мл. Наибольшая встречаемость TUNEL⁺-ядер в кардиомиоцитах также определялась в биоптатах ле-

вого желудочка, полученных у больных со значениями конечно-диастолического объема менее 150 мл. При увеличении конечно-диастолического объема частота встречаемости TUNEL⁺-ядер в миокарде заметно снижалась. Незначительная представленность белка bcl-2 в кардиомиоцитах у больных всех клинических групп свидетельствует о слабой напряженности антиапоптотической системы в условиях хронической ишемии. Изменение отношения bax/bcl-2 при увеличении конечно-диастолического объема может объясняться депрессией синтеза проапоптотического белка bax, что находит отражение в подавлении апоптоза кардиомиоцитов.

На основании приведенных результатов исследования можно предположить следующий гипотетический сценарий ремоделинга миокарда. В условиях хронической ишемии снижается эффективность антиапоптотической системы, в то время как синтез проапоптотического белка bax увеличивается, приводя к запуску эффекторных звеньев апоптотической программы. По мере усиления ишемии, что сопровождается увеличением коронарного индекса, происходит прогрессивное подавление синтеза проапоптотических белков, приводящее к подавлению реализации программированной гибели кардиомиоцитов. При этом ведущими компонентами ишемического ремоделирования миокарда и прогрессирования хронической сердечной недостаточности становятся другие факторы, такие как заместительный фиброз, скопление кардиомиоцитов друг относительно друга и др. [8].

Оценивая роль апоптоза кардиомиоцитов в клинической практике, следует отметить, что максимальная эффективность лечебных мероприятий, направленных на терапию ишемического ремоделирования миокарда, может наблюдаться лишь на ранних стадиях заболевания. На более поздних стадиях терапия, направленная на управление апоптозом, может оказаться малоэффективной.

В целом проведенное исследование позволяет предположить, что повышенная готовность кардиомиоцитов к активации программы апоптоза характерна для ранних этапов ишемиче-

ского ремоделирования миокарда и хронической сердечной недостаточности. В последующих стадиях ремоделирования миокарда, ассоциированных с ухудшением коронарного кровотока и усилением кардиосклероза, роль апоптоза кардиомиоцитов в патогенезе хронической сердечной недостаточности снижена. Полученные данные могут способствовать разработке новых направлений терапии ишемической болезни сердца и хронической сердечной недостаточности, определения прогноза и профилактики этих заболеваний.

Исследование выполнено при финансовой поддержке Совета по грантам Президента РФ, МД - 232.2007.7.

Литература

1. Белов Ю.В., Вараксин В.А. Постинфарктное ремоделирование левого желудочка сердца. От концепции к хирургическому лечению. М.: ДеНово, 2002. 194 С.
2. Бузиашвили Ю.И., Ключников И.В., Мелконян А.М. и др. Ишемическое ремоделирование левого желудочка (определение, патогенез, диагностика, медикаментозная и хирургическая коррекция) // Кардиология. 2002. № 10. С. 88—94.
3. Капелько В.И. Эволюция концепций и метаболическая основа ишемической дисфункции миокарда // Кардиология. 2005. № 9. С. 55—61.
4. Карпов Р.С., Мордвин В.Ф. Диагностика и лечение ишемической болезни сердца у женщин. Томск: Изд-во Том. ун-та, 2002. 196 с.
5. Крыжановский Г.Н. Дизрегуляторная патология: руководство для врачей и биологов. М.: Наука, 2002. 362 С.
6. Эллинди В.Н., Анисеева Н.В., Максимова Н.А. Практическая иммуногистохимия: Методические рекомендации. СПб., 2002. С. 202.
7. Garg S., Narula J., Chandrashekar Y. Apoptosis and heart failure: clinical relevance and therapeutic target // J. of Molecular and Cellular Cardiology. 2005. V. 38. P. 73—79.
8. Khoyneshad A., Jalali Z., Tortolani A.J. Apoptosis: Pathophysiology and therapeutic implications for the cardiac surgeon // Ann. Thorac. Surg. 2004. V. 78. P. 1109—1118.
9. Lip G.Y.H., Gibbs C.R., Beevers D.G. ABC of heart failure: Aetiology // BMJ. 2000. V. 320. P. 104—107.
10. Regula K.M., Kirshenbaum L.A. Apoptosis of ventricular myocytes: a means to an end // J. of Molecular and Cellular Cardiology. 2005. V. 38. P. 3—13.
11. Swynghedauw B. Molecular mechanisms of myocardial remodeling // Physiological Reviews. 1999. V. 79. № 1. P. 216—248.
12. Ye V.Z., Hodge G., Yong J.L. et al. Early myocardial fibrosis is associated with depletion of vasoactive intestinal peptide in rat heart // Exp. Physiol. 2002. V. 87. P. 539—546.

Хлапов А.П., Вечерский Ю.Ю., Рязанцева Н.В. и др. Роль апоптоза кардиомиоцитов в механизмах ишемического...

Поступила в редакцию 17.12.2007

Сведения об авторах

А.П. Хлапов — аспирант кафедры патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Ю.Ю. Вечерский — д-р мед. наук, НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН (г. Томск).

Н.В. Рязанцева — д-р мед. наук, профессор, зав. кафедрой фундаментальных основ клинической медицины СибГМУ (г. Томск).

В.В. Калюжин — д-р мед. наук, профессор кафедры внутренних болезней СибГМУ (г. Томск).

Л.Р. Мустафина — канд. мед. наук, врач-патологоанатом клиник СибГМУ (г. Томск).

В.М. Шипулин — д-р мед. наук, профессор, НИИ кардиологии ТНЦ СО РАМН (г. Томск).

В.В. Новицкий — д-р мед. наук, профессор, заслуженный деятель науки РФ, академик РАМН, зав. кафедрой патофизиологии СибГМУ (г. Томск).

Для корреспонденции

Хлапов Андрей Павлович, тел. (3822) 64-71-57, bclxl@mail.ru