

УДК: 612.017.2+612.014.462

© Н. В. РУСЕЦКАЯ, 2014

Н. В. Русецкая

ФУНКЦИОНАЛЬНОЕ СОСТОЯНИЕ КАРДИОМИОЦИТОВ КАК ИНДИКАТОРА ФАКТОРОВ СТРЕССА

Национальная медицинская академия последипломного образования
имени П.Л. Шупика, г. Киев

Введение. В настоящее время установлено важное значение стресса и апоптоза в регуляции работы сердечно - сосудистой системы.

Цель. Изучение влияния стресса разной этиологии на функциональное состояние кардиомиоцитов крыс, как модели патологии миокарда.

Материалы и методы. Исследования проводились на проточном цитометре, с использованием набора для определения апоптоза Annexine V-FITC Apoptosis detection Kit 1, изменения митохондриального мембранного потенциала клеток оценивали используя методику с флуорохромами родамин 123 и пропилий йодид.

Результаты. Выявлено, что психо-эмоциональная стрессовая нагрузка снижает пролиферативную активность кардиомиоцитов. Также было показано снижение суммарного апоптоза кардиомиоцитов в 1 группе животных до 52,59±8,98%, в сравнении с контрольной группой 84,87±4,84%. Выявлено, что у животных первой группы увеличивается количество некротических КМЦ до 4,89±2,02%, в сравнении с контролем где этот показатель составлял 0,68±0,17%.

Выводы. Таким образом, установлено, что длительная иммобилизация в сочетании с гипо- и гипертермическим шоком на фоне психо-эмоциональной стрессорной нагрузки приводит к накоплению необратимых изменений в кардиомиоцитах экспериментальных животных о чем свидетельствует увеличение количества кардиомиоцитов, идентифицируемых на поздней стадии апоптоза и некроза.

Ключевые слова: кардиомиоциты; стресс; апоптоз; некроз; пролиферация; индуктор апоптозу; клеточный цикл.

ВСТУПЛЕНИЕ

Как известно, перенапряжение нервной системы, стрессы становятся бичом жителей высокоразвитых стран. Многочисленные исследования показали дифференцированное влияние стресса разной этиологии и продолжительности на функционирование организма. Кратковременный острый стресс стимулирует организм, тогда как хронический стресс отрицательно сказывается практически на всех системах организма.

Одной из основных причин возникновения сердечно - сосудистых заболеваний (ССЗ) в развитых странах является хронический стресс [1]. Исследование механизмов гибели клеток при заболеваниях сердца стало в последние годы одной из самых сложных и актуальных проблем медицинских наук [2]. Апоптоз, привлекает к себе внимание кардиологов, как потенциальный патогенетический фактор при различных ССЗ, поскольку, среди всех известных механизмов гибели клеток, этот вариант смерти является наиболее высокорегулируемым [3, 4]. Это дает возможность рассмотреть его в качестве потенциальной терапевтической «мишени» при лечении ССЗ. Информация о роли апоптоза, в смерти кардиомиоцитов, может стать значимой в диагностике и оценке прогноза развития ССЗ, а также коррекции лечения [5, 6].

Таким образом, вопрос изучения взаимосвязи между стрессорной нагрузкой и развитием патологий сердечно - сосудистой системы весьма актуален на сегодняшний день.

Цель. Изучить влияние стресса разной этиологии на функциональное состояние кардиомиоцитов крыс, как модели патологии миокарда.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование функционального состояния клеток миокарда проводилось на белых беспородных самцах крыс ($n=60$) весом 200-250г. Животные содержались на стандартном рационе вивария. Все процедуры проводились соответственно международным правилам гуманного отношения к животным.

За основу психо-эмоционального напряжения была выбрана сенсорно-контактная модель изучения агрессивности и исследования влияния психо-эмоционального стрессорного напряжения крыс, как фактора развития патологических состояний миокарда [7].

Перед началом стрессирования были проведены лабораторные исследования крови у экспериментальных животных.

Экспериментальных животных ежедневно высаживали попарно в темные биксы, каждый день сменяя им партнеров, которые были иммобилизованы. Дополнительно крыс, которые находились в пеналах, погружали в воду $t +50^{\circ}\text{C}$, постепенно увеличивая время пребывания, после чего их же погружали в воду $t +42^{\circ}\text{C}$ с целью формирования экстремальной нагрузки на сердце с помощью психо-эмоционального напряжения и физического истощения (1 группа). Животные группы 2, ежедневно подвергались только психо-эмоциональным нагрузкам. Третья группа животных подвергалась только иммобилизационной и термальной нагрузке без психо-эмоционального компонента. Последняя группа животных (группа 4), являлась контрольной и не подвергалась действию стрессорных факторов. Стрессорная нагрузка увеличивалась постепенно на протяжении всего исследования длительностью 112 суток.

Для определения уровня апоптоза анексиновым методом и изучения мембранного потенциала митохондрий, готовили суспензии кардиомиоцитов в буферном растворе на механическом ресуспендизаторе BD Medimachine (Becton Dickinson, США) с использованием набора для определения апоптоза Annexine V-FITC Apoptosis detection Kit I (BD Bioscience Pharmingen, США).

Изменения митохондриального мембранного потенциала клеточной суспензии оценивали, используя методику с флуорохромами родамином 123 (Fluka) и пропидий йодидом (Sigma) [8]. Предложенный метод позволяет определить в исследуемом образце: жизнеспособные клетки, некротические и апоптотические клетки.

Пролиферативную активность оценивали путем определения клеточного цикла суспензии кардиомиоцитов с использованием флуоресцентного зонда пропидий йодид (Sigma) [8].

Также было проведено исследование функционального состояния кардиомиоцитов с использованием индукторов апоптоза, что имитирует в исследовании действие патогенных факторов.

В качестве индуктора апоптоза использовали дексаметазон, который проявляет свою активность, связываясь с цитоплазматическими рецепторами,

расположенными внутри клеток мишеней, и азид натрия, который является ингибитором протонной помпы и дает возможность определить функциональный резерв митохондрий.

Индекс индукции апоптоза определяли после инкубирования клеток в питательной среде с индуктором апоптоза в течении 18 часов при 37°C.

Статистическую обработку проводили с использованием программы Statistica, применяли t-критерий Стьюдента и описательную статистику. Доверительные интервалы средних значений определяли путем подсчета стандартной ошибки. Различия считали статистически значимыми при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

В результате проведенных исследований выявлена, низкая пролиферативная активность кардиомиоцитов, которая практически не изменялась в зависимости от типа стрессовой нагрузки. У животных второй группы было зафиксировано статистически достоверное ($p < 0,05$) увеличение количества клеток в G1 фазе до $61,59 \pm 2,61\%$, и снижение количества клеток в S фазе, что дало возможность сделать вывод, о влиянии психо - эмоциональной нагрузки на пролиферативную активность клеток, в дальнейшем, данный феномен, может приводить к сердечной недостаточности, поскольку репарационные возможности органа снижаются (рис. 1).

Изучение распределения клеток по типу клеточной гибели, при действии экспериментальной стрессорной нагрузки проводилось в два этапа: по мембранным маркерам (ранняя и поздняя стадии апоптоза) и по изменениям митохондриального мембранного потенциала (апоптоз и некроз), внутриклеточный запуск гибели клетки.

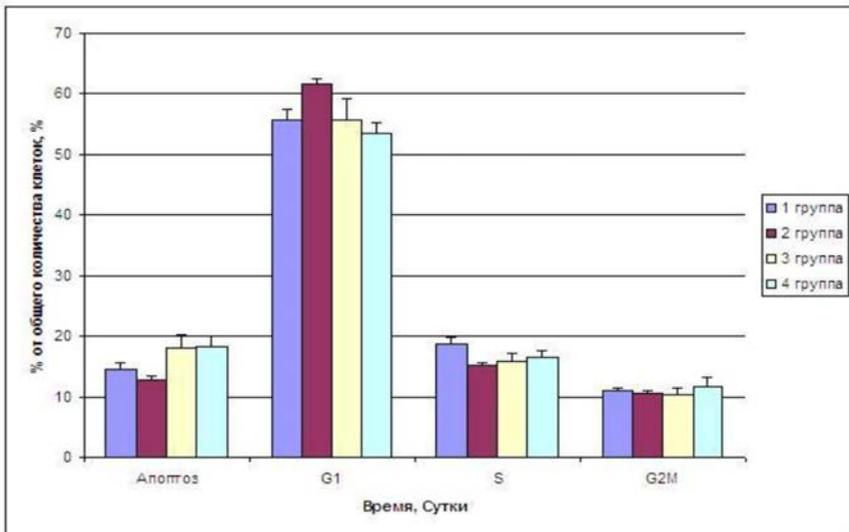


Рис. 1. Распределение кардиомиоцитов крыс по стадиям клеточного цикла под влиянием разных типов стрессорной нагрузки

Определение транслокации фосфатидилсерина и изменения проницаемости цитоплазматической мембраны, дало возможность установить статистически значимое ($p < 0,05$) снижение суммарного апоптоза кардиомиоцитов в 1 группе животных до $52,59 \pm 8,98\%$, в сравнении с контрольной группой $84,87 \pm 4,84\%$ (табл. 1.). Выявлено, что данный параметр, в других экспериментальных группах, показал снижение количества кардиомиоцитов с признаками апоптоза.

При исследовании ранней и поздней стадии апоптоза в 1 группе наблюдалось статистически значимое ($p < 0,05$) снижение уровня апоптотических клеток на ранней стадии до $28,51 \pm 3,84\%$, в сравнении с контрольными показателями $73,21 \pm 11,15\%$, тогда как в других группах, статистически достоверных изменений не было. Изучение поздней – энергозависимой стадии спонтанного апоптоза, выявило статистически достоверное ($p < 0,05$) увеличение в 1 группе до $24,08 \pm 9,51\%$, у животных 2 группы, наблюдалось снижение показателя до $6,7 \pm 2,12\%$, в сравнении с контрольными значениями $11,67 \pm 6,76\%$. Похожая тенденция, в изменении уровня апоптотических клеток, наблюдалась и при изучении изменений митохондриального мембранного потенциала КМЦ. В первой группе значение соответствовало $23,42 \pm 1,92\%$, во второй $15,58 \pm 2,76\%$, в третьей $18,04 \pm 1,00\%$, а в четвертой $15,76 \pm 1,60\%$ (табл. 1).

Также было определено, что у животных первой группы статистически достоверно ($p < 0,05$) увеличивается количество некротических КМЦ до $4,89 \pm 2,02\%$, в сравнении с контролем где этот показатель составлял $0,68 \pm 0,17\%$. В других экспериментальных группах количество некротических клеток было на уровне контрольного значения (табл. 1).

Таблица 1

Изменение показателей клеточной гибели КМЦ экспериментальных животных в ответ на разные типы стрессорной нагрузки (%)

Определяемые показатели	Группа-1	Группа-2	Группа-3	Группа-4
Показатель суммарного апоптоза КМЦ	$52,59 \pm 8,98^*$	$78,29 \pm 6,16$	$88,99 \pm 4,35$	$84,55 \pm 13,68$
Количество КМЦ на ранней стадии апоптоза	$28,51 \pm 3,84^*$	$70,62 \pm 12,11$	$69,84 \pm 12,18$	$73,21 \pm 11,15$
Количество КМЦ на поздней стадии апоптоза	$24,08 \pm 9,51^*$	$6,7 \pm 2,12^*$	$14,39 \pm 15,01$	$11,67 \pm 6,76$
Изменение митохондриального мембранного потенциала	$23,42 \pm 1,92^*$	$15,58 \pm 2,76$	$18,04 \pm 1$	$15,76 \pm 1,6$
Количество некротических КМЦ	$4,89 \pm 2,02^*$	$0,64 \pm 0,63$	$0,56 \pm 0,50$	$0,68 \pm 0,17$

*Примечание: * показатель статистически достоверно отличается от соответствующего в контроле - $p < 0,05$.*

Для определения функционального состояния кардиомиоцитов нами были использованы индукторы апоптоза: дексаметазон и азид натрия.

Инкубация кардиомиоцитов с дексаметазоном, привела к снижению количества апоптических клеток в 1 группе животных по результатам анексинового теста, но при этом увеличилось количество таких клеток по результатам исследования мембранного митохондриального потенциала (табл. 2), что указывает на истощение самих кардиомиоцитов.

Таблица 2

Изменение показателей клеточной гибели кардиомиоцитов экспериментальных животных под действием индукторов апоптоза (%)

Определяемые показатели	Группа-1	Группа-2	Группа-3	Группа-4
Показатель суммарного апоптоз КМЦ	55,23±9,66*	78,29±6,16	88,99±4,35	84,55±13,68
Количество КМЦ на ранней стадии апоптоза	35,44±15,05*	69,07±12,21	82,07±8,27	73,17±24,08
Количество КМЦ на поздней стадии апоптоза	19,79±9,52*	9,21±7,43	6,92±4,24*	11,38±10,57
Изменение митохондриального мембранного потенциала	21,83±3,94*	13,04±3,65	13,49±1,00	12,98±1,50
Количество некротических КМЦ	4,44±2,93*	0,31±0,17	0,7±0,64*	0,29±0,05

Примечание: *показатель статистически достоверно отличается от соответствующего в контроле - $p < 0,05$.

Изучение действия азид натрия выявило тенденции аналогичные данным по спонтанному апоптозу. Наиболее значимые изменения всех изучаемых показателей отмечались у животных, которые подвергались психо-эмоциональному напряжению и иммобилизационно-термическому (рис. 2).

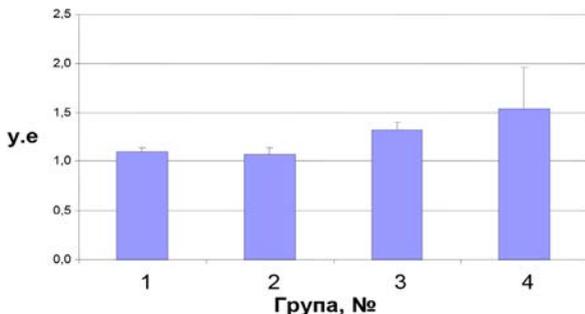


Рис. 2. Изменение индекса индукции кардиомиоцитов экспериментальных животных под влиянием разных типов стрессорной нагрузки (азид натрия)

Из изложенного выше следует, что длительная иммобилизация в сочетании с гипо- и гипертермическим шоком на фоне психо-эмоциональной стрессорной нагрузки приводит к накоплению необратимых изменений в кардиомиоцитах экспериментальных животных о чем свидетельствует увеличение количества кардиомиоцитов, идентифицируемых на поздней стадии апоптоза и некроза. Как известно данные процессы являются необратимыми и свидетельствуют о развитии дисфункции органа, поскольку увеличение некротического поражения вызывает увеличение нагрузки на весь организм, а в органе развиваются воспалительные процессы с лавиноподобным увеличением очага поражения. Данные полученные при использовании ингибиторов (дексаметазона и азида натрия) выявили, что действие стресса приводит к истощению энергетической составляющей клеток.

Литература

1. Доклад о состоянии здравоохранения в Европе 2012: Всемирная организация здравоохранения. - 2013. - С. 190.
2. Бершова Т.В. Патогенетическое значение апоптоза кардиомиоцитов при сердечной недостаточности / Т.В. Бершова, С.В. Монаенкова, А.Г. Гасанов // Педиатрия. – 2009. - Т. 88, №5. - С. 147-154.
3. Залесский В.Н. Апоптотический и аутофагический пути гибели клетки при гипертрофии и ремоделировании миокарда / Залесский В.Н., Стаднюк Л.А., Великая Н.В. // Журн. АМН України. - 2003. - Т. 9, №4. - С. 699 - 712.
4. Jugdutt B. I. Matrix metalloproteinases as markers of adverse remodeling after myocardial infarction / B. I. Jugdutt // J. Card. Fail. - 2006. - Vol. 12. - P. 73 - 76.
5. Don't lose heart-therapeutic value of apoptosis prevention in the treatment of cardiovascular disease / J. L. Reeve, A. M. Duffy, T. O'Brien, A. Samali // J. Cell. Mol. Med. - 2005. - Vol. 9. - P. 609 - 622.
6. Hussain D. Stress immunity and health: research findings and implications/ D. Hussain // International Journal of Psychosocial Rehabilitation. - 2011 - Vol. 15, № 1. - P. 94-100.
7. Kudryavtseva N.N. A sensory contact model for the study of aggressive and submissive behavior in male mice / N.N.Kudryavtseva // Aggressive behavior. - 1991. - Vol. 17. - P. 285-291.
8. Flow cytometry: a practical approach 3rd edition / University of Oxford; edited by Michael G. Ormerod. - Oxford: Oxford Univ. Press, 2000. - 276 p.

Н. В. Русецька

Функціональний стан кардіоміоцитів як індикатора факторів стресу

Національна медична академія післядипломної освіти
імені П.Л.Шупика

Вступ. На сьогодні визначене важливе значення стресу і апоптозу в регуляції роботи серцево-судинної системи.

Мета. Вивчення стреса різної етіології на функціональний стан кардіоміоцитів щурів, як моделі патології міокарда.

Матеріали і методи. Дослідження проводили на проточному цитометрі, з використанням набору для визначення апоптозу Annexine V-FITC Apoptosis

detection Kit I, зміни мітохондріального мембранного потенціалу клітин оцінювали використовуючи методику з флуорохромами родамін 123 і пропідій йодид.

Результати. Виявлено, що психо-емоційне стресове навантаження знижує проліферативну активність кардіоміоцитів. Також встановлено зниження сумарного апоптозу кардіоміоцитів у тварин 1 групи до $52,59 \pm 8,98\%$, в порівнянні з контрольною групою $84,87 \pm 4,84\%$. Визначено, що у тварин 1 групи збільшується кількість некротичних кардіоміоцитів до $4,89 \pm 2,02\%$, в порівнянні з контролем де цей показник дорівнював $0,68 \pm 0,17\%$.

Висновки. Таким чином, експериментальним шляхом встановлено, що тривала іммобілізація в сполученні з гіпо- і гіпертермічним шоком на фоні психо-емоційного стресорного навантаження призводить до накопичення незворотніх змін в кардіоміоцитах експериментальних тварин про, що свідчить збільшення кількості кардіоміоцитів, на пізній стадії апоптозу і некрозу.

Ключові слова: кардіоміоцити; стрес; апоптоз; некроз; проліферація; індуктор апоптозу; клітинний цикл.

N. Rusetskaia

Functional state of cardiomyocytes as an indicator of stress factors

Shupyk National Medical Academy of Postgraduate Education

Introduction. It is now established the importance of the stress and the regulation of apoptosis in the cardiovascular system (CVS).

Aim. To investigate influence of different types of stress load on the functional state of rat cardiomyocytes, as a model of myocardial pathology.

Methods and materials. The study was performed on a flow cytometer using Annexine V-FITC Apoptosis detection Kit I and rhodamine 123 in combination with propidium iodide to detect changes in mitochondrial membrane cell potential. Results. The psycho-emotional stress load was revealed to reduce the proliferative activity of cardiomyocytes. There was found an increased level of cardiomyocytes in G1 phase in the second group of animals ($61,59 \pm 2,61\%$) and reduced total apoptosis of cardiomyocytes in the first group (up to $52,59 \pm 8,98\%$) in comparison with the control group ($84,87 \pm 4,84\%$). Also, it was determined an increased level of necrotic cardiomyocytes in the first group (up to $4,89 \pm 2,02\%$) in comparison with a control group ($0,68 \pm 0,17\%$).

Conclusions. The results indicate that the long-term immobilization in combination with hypo- and hyperthermic shock against the background of psycho-emotional stress load leads to the accumulation of irreversible changes in cardiomyocytes of experimental animals as evidenced by the increase in the number of cardiomyocytes during the late stage of apoptosis and necrosis.

Key words: cardiomyocytes, stress, apoptosis, necrosis, proliferation, apoptosis inducer, cell cycle.

Відомості про авторів:

Русецька Наталія Василівна – с.н.с. ЦНДЛ НМАПО імені П.Л.Шупика. Адреса: Київ, вул. Дорогожицька, 9.