

АПОПТОЗ КАРДИОМИОЦИТОВ В ПАТОГЕНЕЗЕ ОСТРОГО ИНФАРКТА МИОКАРДА И ПОСТИНФАРКТНОГО РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ СЕРДЦА У БОЛЬНЫХ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Доц. А. В. УШАКОВ, проф. М. В. РАССЕЛ, проф. А. Б. БОРИСОВ

CARDIOMYOCYTE APOPTOSIS IN THE PATHOGENESIS OF ACUTE MYOCARDIAL
INFARCTION AND POSTINFARCTION HEART REMODELING IN DIABETES MELLITUS

A. V. USHAKOV, M. V. RASSEL, A. B. BORISOV

*Крымский государственный медицинский университет им. С. И. Георгиевского,
Симферополь, Украина,*

Медицинский факультет университета Мичигана, Анн Арбор, США

Обобщены данные литературы и представлены результаты собственных исследований особенностей развития и патогенетической роли апоптоза кардиомиоцитов при развитии острого инфаркта миокарда и постинфарктного ремоделирования сердца у больных сахарным диабетом.

Ключевые слова: сахарный диабет, апоптоз кардиомиоцитов, острый инфаркт миокарда, ремоделирование сердца.

The authors generalize the literature data and present the original findings on development features and pathogenetic role of cardiomyocyte apoptosis in acute myocardial infarction and Post-Infarction heart remodeling in diabetes mellitus.

Key words: diabetes mellitus, cardiomyocyte apoptosis, acute myocardial infarction, heart remodeling.

Несмотря на множество исследований, посвященных инфаркту миокарда (ИМ), остаются во многом не ясными клеточные и молекулярные механизмы изменений, происходящих в сердечной мышце. Это касается процессов, имеющих место в зоне инфаркта, пограничной зоне и в миокарде, удаленном от инфарктированного участка. Малоизвестны механизмы поражения миокарда в остром (первые часы и дни) и в более позднем периоде ИМ при так называемом постинфарктном ремоделировании сердца.

Особый интерес представляет патогенез ИМ у больных сахарным диабетом (СД), так как ИМ у них характеризуется более тяжелым течением и высокой смертностью по сравнению с лицами, не страдающими СД. Известно, что на фоне СД механизмы острого ишемического повреждения миокарда и его последствия имеют специфический характер, обусловленный особым течением воспалительных, репаративных и ряда других процессов. Однако конкретные механизмы ухудшения прогноза при ИМ у больных СД изучены недостаточно. Одним из ключевых факторов, определяющих формирование морфо-функциональной картины ИМ и соответственно характер клинического течения и прогноз заболевания, является смерть кардиомиоцитов (КМЦ).

На сегодняшний день известны три различных механизма, по которым могут умирать клетки человеческого организма: некроз, апоптоз и аутофагия. Среди механизмов развития ИМ наибольший

интерес представляет апоптоз, так как этот вариант смерти КМЦ является наиболее высокорегулируемым при разработке методов терапевтического воздействия [1]. Показано, что в перинфарктной зоне вскоре после развития ИМ повышается экспрессия антиапоптозного белка Bcl-2 [2]. В зоне же самого ИМ на стадии острой ишемии экспрессия Bcl-2 снижена, а экспрессия проапоптозного Bax повышена [3]. При этом важно отметить, что в начале ишемии, когда КМЦ еще жизнеспособны, резко повышена экспрессия EAT/mcl-1 — гена, индукция которого является одним из наиболее ранних последствий активации Bcl-2 [4]. В то же время в более поздние сроки (свыше месяца после развития ИМ) в перинфарктной зоне экспрессия Bcl-2 снижается, а экспрессия Bax повышается [5].

В перинфарктной зоне при ишемии-реперфузии резко возрастает экспрессия Fas — рецептора клеточной смерти [6]. При этом уровень лиганда Fas повышается после начала реперфузии [7]. Показано также, что при ИМ повышено содержание sFas — ингибитора апоптоза [8]. На модели ишемии-реперфузии миокарда выявлено увеличение экспрессии p53 — мощного стимулятора апоптоза, после реперфузии, которое блокировалось прекодиционированием [9]. В качестве стимуляторов активации p53 в миокарде рассматриваются активные формы кислорода (АФК) [10]. АФК способны повышать частоту апоптоза как в зоне инфаркта [11], так и в удаленном от нее

миокарде [12]. При этом торможение активности свободнорадикального окисления приводит к уменьшению количества КМЦ, претерпевающих апоптоз после развития ИМ [13].

Резко уменьшает частоту апоптоза и размер ИМ прекодиционирование [14]. Антиапоптотное действие прекодиционирования развивается под воздействием АТФ-зависимых K^+ каналов и реализуется через сигнальную систему протеинкиназы С [15]. Важным механизмом, опосредующим антиапоптотное действие прекодиционирования является поддержание внутриклеточного рН. Антиапоптотный эффект прекодиционирования нивелируется блокадой вакуолярной протонной АТФазы [16]. Посткодиционирование повышает выживаемость КМЦ при реперфузии миокарда посредством активации группы киназ, именуемых RISK (Reperfusion Injury Salvage Kinases) [17].

Данные о роли апоптоза в постинфарктном ремоделировании левого желудочка (ЛЖ) и развитии постинфарктной сердечной недостаточности (СН) противоречивы. Наличие апоптотного варианта смерти КМЦ продемонстрировано в остром периоде ИМ и в раннем постинфарктном периоде [18]. В этом исследовании показана прямая корреляция между диаметром ЛЖ и частотой апоптоза в зоне инфаркта, но не в удаленных областях миокарда ЛЖ. В то же время была выявлена корреляция конечно-диастолического диаметра ЛЖ именно с частотой апоптоза в неинфарктированном удаленном миокарде ЛЖ, а не в пограничной с инфарктом зоне [19].

Суммируя имеющиеся данные о роли апоптоза в развитии неблагоприятного варианта ремоделирования ЛЖ в постинфарктном периоде и развитии СН, можно сказать, что в зоне самого ИМ и пограничной зоне отдельную роль играет апоптоз, развитие которого обусловлено связанным с ишемией критическим нарушением метаболизма КМЦ [6, 18, 19], и апоптоз в миокарде, удаленном от зоны инфаркта [20], механизмы индукции которого пока недостаточно ясны.

Заслуживает рассмотрения вопрос о роли ишемии и реперфузии в индукции апоптоза КМЦ. Во многих исследованиях, начиная с пионерской работы R. A. Gottlieb et al. [цит. по 21], впервые продемонстрировавших развитие апоптоза при ишемии-реперфузии миокарда, было показано, что при реперфузии частота апоптоза увеличивается в большей степени, чем при ишемии. На основании этих данных возможен вывод о роли апоптоза в развитии реперфузионного повреждения миокарда и о негативной для миокарда роли реперфузии в целом. Однако в данном случае речь, вероятно, идет о том, что восстановление кровотока приводит к повышению энергетического потенциала КМЦ, находящихся в состоянии критической ишемии. Вследствие этого некоторые клетки, являющиеся необратимо нежизнеспособными, получают возможность претерпеть апоптоз вместо некроза, что более выгодно с точки

зрения минимизации повреждения для организма в целом. Это подтверждается тем фактором, что, несмотря на повышение частоты апоптоза сразу после реперфузии, общее количество КМЦ, претерпевших апоптоз, при ИМ с реперфузией меньше, чем без нее [3], равно как меньше и общая масса инфаркта, что подтверждено другими исследованиями [22].

На сегодняшний день известно большое количество внеклеточных регуляторных молекул, способных ингибировать развитие апоптоза и повышать жизнеспособность КМЦ при ИМ. К ним относятся, прежде всего, различные ростовые факторы — инсулиноподобный фактор роста I и фактор роста фибробластов 1 [23]; фактор роста гепатоцитов [24]; эритропоэтин [25]; гормон роста [26]; гранулоцитарный колониестимулирующий фактор [27]; члены семейства трансформирующего фактора роста β [28]; фактор роста эндотелия сосудов, ангиопоэтин-2 и фактор роста тромбоцитов [29]. Кроме того, показано, что антиапоптотное действие на КМЦ при ИМ оказывают эстрогены [30]; аденомедуллин [31]; эндотелин-1 [32]; эндогенные опиоиды [33]; адипонектин [34]; комплекс интерлейкина-6 с его растворимым рецептором [35]; фактор некроза опухоли α [23] и ряд других медиаторов. Изучение механизмов антиапоптотного действия этих факторов при ИМ может внести особый вклад в создание универсальной концепции механизмов развития ишемического повреждения и антиишемической защиты миокарда, а также послужить основой для разработки новых высокоэффективных методов кардиопротекции.

Интересными представляются взаимоотношения про- и антиапоптотных факторов КМЦ в диабетическом сердце (ДС). Суммируя эти данные, можно сказать, что развитие диабетической кардиомиопатии (ДКМП) характеризуется значительным повышением числа КМЦ, умирающих по механизму апоптоза, что приводит к уменьшению количества сократительных элементов в миокарде и играет существенную роль в снижении функциональных возможностей ДС. Ведущую роль в потенцировании развития апоптоза КМЦ при СД как по рецептор-опосредованному так и по митохондриезависимому пути играет повышение активности процессов свободнорадикального окисления [36, 37]. Однако необходимо отметить, что этот механизм является не единственным. В условиях липотоксического повреждения миокарда, наиболее типичного проявления нарушения энергетического метаболизма КМЦ у лиц, страдающих СД 2-го типа, апоптоз может быть индуцирован также механизмами, не зависящими от АФК [38]. Известно, что нарушения метаболизма делают КМЦ более устойчивыми к развитию апоптоза при остром ишемическом повреждении миокарда и потенцируют развитие прекодиционирования [39, 40]. В литературе мало работ, посвященных апоптозу при ИМ на

фоне СД, и все они проведены на животных моделях [41, 42].

Для оценки роли апоптоза КМЦ при ИМ у больных СД нами был проведен сравнительный анализ развития различных вариантов клеточной смерти в остром периоде ИМ у больных СД 2-го типа и пациентов, не страдающих СД.

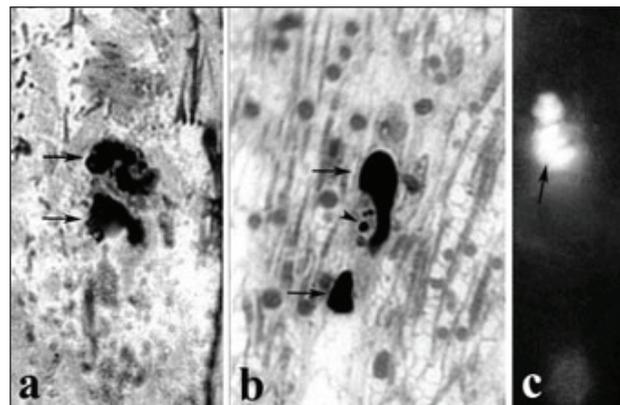
Исследованы образцы миокарда, взятые при аутопсии 13 больных ИМ ЛЖ, умерших в сроки от 1 до 4 суток после начала заболевания; 7 из них страдали СД 2-го типа и 6 не имели нарушений углеводного обмена. Проводилась световая и электронная микроскопия. Наличие апоптоза определяли по типичной морфологии и интрануклеосомной фрагментации ДНК в ядрах КМЦ с использованием метода TUNEL (terminal deoxynucleotidyl transferase-mediated dUTP nick-end labelling) (см. рисунок). Частота апоптоза оценивалась в участках миокарда, непосредственно граничащих с зоной массивного некроза, глубоких слоях перинекротической зоны, свободной стенке, также удаленной от зоны инфаркта левого и правого желудочков (ПЖ).

Сравнительный анализ изученных образцов показал отсутствие достоверных различий в количестве КМЦ, претерпевающих апоптоз в участках, граничащих с зоной массивного некроза у больных СД и не страдающих этим заболеванием ($0,82 \pm 0,34$ и $0,51 \pm 0,31$ % соответственно). В то же время в перинфарктной зоне у больных СД таких клеток уже значительно (в 2,8 раза) больше, чем у пациентов без СД ($0,31 \pm 0,03$ и $0,11 \pm 0,06$ % соответственно, $p < 0,05$). В миокарде свободных стенок обоих желудочков у тех и других больных количество апоптозных КМЦ значительно меньше, чем в пограничной и глубоких слоях перинфарктной зон. При этом в удаленном от зоны инфаркта у больных СД количество КМЦ, умирающих по апоптозному механизму, больше в ЛЖ ($0,08 \pm 0,03$ и $0,03 \pm 0,02$ % соответственно, $p < 0,05$) и в 2,3 раза в ПЖ ($0,07 \pm 0,04$ и $0,03 \pm 0,02$ % соответственно, $p < 0,05$).

Таким образом, данные литературы и результаты наших исследований свидетельствуют о важной роли апоптоза КМЦ в патогенезе острого ИМ и постинфарктного ремоделирования сердца.

Литература

1. Don't lose heart-therapeutic value of apoptosis prevention in the treatment of cardiovascular disease / J. L. V. Reeve, A. M. Duffy, T. O'Brien, A. Samali // J. Cell. Mol. Med.— 2005.— Vol. 9.— P. 609–622.
2. BCL2 protein is topographically restricted in tissues characterized by apoptotic cell death / D. M. Hockenbery, M. Zutter, W. Hickey et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA.— 1991.— Vol. 88.— P. 6961–6965.
3. Programmed myocyte cell death affects the viable myocardium after infarction in rats / W. Cheng, J. Kajstura, J. A. Nitahara et al. // Exp. Cell. Res.— 1996.— Vol. 226.— P. 316–327.
4. The EAT/mcl-1 gene, an inhibitor of apoptosis, is up-regulated in the early stage of acute myocardial infarction / K. Matsushita, A. Umezawa, S. Iwanaga et al. // Biochim. Biophys. Acta.— 1999.— Vol. 1472.— P. 471–478.
5. Expression of bcl-2 protein, an inhibitor of apoptosis, and Bax, an accelerator of apoptosis, in ventricular myocytes of human hearts with myocardial infarction / J. Misao, Y. Hayakawa, M. Ohno et al. // Circulat.— 1996.— Vol. 94.— P. 1506–1512.
6. Apoptotic and necrotic myocyte cell deaths are independent contributing variables of infarct size in rats / J. Kajstura, W. Cheng, K. Reiss et al. // Lab. Invest.— 1996.— Vol. 74.— P. 86–107.



Морфологические и молекулярные маркеры апоптоза в инфарцированном миокарде больного СД 2-го типа:

- a* — конденсация хроматина и формирование полукруглых ядер (стрелки);
b — фрагментация ядра на сферические тельца, содержащие высококонденсированный хроматин (стрелки);
c — интрануклеосомная фрагментация ДНК (стрелка) в ядре КМЦ, визуализируемая по флюоресценции (реакция TUNEL). $\times 1460$

При этом наличие СД обуславливает увеличение частоты апоптоза как в перинфарктной, так и в удаленной от инфаркта зоне. Активация апоптоза в перинфарктной зоне является ведущим механизмом затяжного течения процесса гибели КМЦ, экспансии ИМ и замедления репаративных процессов и может увеличить вероятность разрыва миокарда, формирования аневризмы сердца, развития ДКМП. Увеличение функциональной нагрузки на эти участки из-за выключения из насосной деятельности значительной части сократительного миокарда при ИМ может усугубить метаболизм КМЦ и способствовать развитию апоптоза. Потеря сократительных КМЦ в неинфарцированных зонах в сочетании с изначально сниженным функциональным резервом диабетического миокарда приводят к быстрому истощению компенсаторных возможностей и развитию прогрессирующей СН как в острую фазу ИМ, так и в постинфарктном периоде.

7. Clinical implications of circulating soluble Fas and Fas ligand in patients with acute myocardial infarction / T. Ohtsuka, M. Hamada, O. Sasaki et al. // *Coron. Artery Dis.*— 1999.— Vol. 10.— P. 221–225.
8. Regulation of cardiomyocyte apoptosis by redox-sensitive transcription factors / N. Maulik, H. Sasaki, S. Adya et al. // *FEBS Lett.*— 2000.— Vol. 485.— P. 7–12.
9. Chinoin, a novel drug against cardiomyocyte apoptosis induced by hypoxia and reoxygenation / J. G. Shen, X. S. Quo, B. Jiang et al. // *Biochim. Biophys. Acta.*— 2000.— Vol. 1500.— P. 217–226.
10. Galang N., Sasaki H., Maulik N. Apoptotic cell death during ischemia/reperfusion and its attenuation by antioxidant therapy // *Toxicology.*— 2000.— Vol. 148.— P. 111–118.
11. Activation of JNK in the remote myocardium after large myocardial infarction in rats / W. G. Li, A. Zaheer, L. Coppey et al. // *Biochem. Biophys. Res. Comm.*— 1998.— Vol. 246.— P. 816–820.
12. Antioxidants attenuate myocyte apoptosis in the remote non-infarcted myocardium following large myocardial infarction / H. J. Oskarsson, L. Coppey, R. M. Weiss, W. G. Li // *Cardiovasc. Res.*— 2000.— Vol. 45.— P. 679–687.
13. Ischemic preconditioning decreases apoptosis 2 in rat hearts in vivo / C. A. Piot, D. Padmanaban, P. C. Ursell et al. // *Circulat.*— 1997.— Vol. 96.— P. 1598–1604.
14. Takashi E., Wang Y., Ashraf M. Activation of mitochondrial K (ATP) channel elicits late preconditioning against myocardial infarction via protein kinase C signaling pathway // *Circ. Res.*— 1999.— Vol. 85.— P. 1146–1153.
15. Preconditioning rabbit cardiomyocytes: role of pH, vacuolar proton ATPase, and apoptosis / R. A. Gottlieb, D. L. Gruol, J. Y. Zhu et al. // *J. Clin. Invest.*— 1996.— Vol. 97.— P. 2391–2398.
16. Postconditioning: a form of «modified reperfusion» protects the myocardium by activating the phosphatidylinositol 3-kinase-Akt pathway / A. Tsang, D. J. Hausenloy, M. M. Mocanu, D. M. Yellon // *Circ. Res.*— 2004.— Vol. 95.— P. 230–232.
17. Apoptosis and post-infarction left ventricular remodeling / A. Baldi, A. Abbate, R. Bussani et al. // *J. Mol. Cell. Cardiol.*— 2002.— Vol. 34.— P. 165–174.
18. Cardiomyocyte apoptosis and ventricular remodeling after myocardial infarction in rats / E. Palojoki, A. Saraste, A. Eriksson et al. // *Am. J. Physiol.*— 2001.— Vol. 280.— P. H2726–H2730.
19. Progressive left ventricular remodeling and apoptosis late after myocardial infarction in mouse heart / F. Sam, D. B. Sawyer, D. L. Chang et al. // *Am. J. Physiol.*— 2000.— Vol. 279.— P. H422–H428.
20. Reperfusion injury induces apoptosis in rabbit cardiomyocytes / R. A. Gottlieb, K. O. Bursleson, R. A. Kloner et al. // *J. Clin. Invest.*— 1994.— Vol. 94.— P. 1621–1628.
21. Gibbons R. J., Miller T. D., Christian T. F. Infarct size measured by single photon emission computed tomographic imaging with (99m) Tc-sestamibi: A measure of the efficacy of therapy in acute myocardial infarction // *Circulat.*— 2000.— Vol. 101.— P. 101–108.
22. Inflammation and ischemia: macrophages activated by fibronectin fragments enhance the survival of injured cardiac myocytes / J. Trial, R. D. Rossen, J. Rubio, A. A. Knowlton // *Exp. Biol. Med. (Maywood).*— 2004.— Vol. 229.— P. 538–545.
23. Hepatocyte growth factor protects cardiac myocytes against oxidative stress-induced apoptosis / K. Kitta, R. M. Day, T. Ikeda et al. // *Free Radic. Biol. Med.*— 2001.— Vol. 31.— P. 902–910.
24. Recombinant human erythropoietin pretreatment attenuates myocardial infarct size: a possible mechanism involves heat shock protein 70 and attenuation of nuclear factor-kappaB / B. Xu, G. H. Dong, H. Liu et al. // *Ann. Clin. Lab. Sci.*— 2005.— Vol. 35.— P. 161–168.
25. Growth hormone prolongs survival in experimental postinfarction heart failure / A. Cittadini, J. Isgaard, M. G. Monti et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.*— 2003.— Vol. 41.— P. 2154–2163.
26. Granulocyte colony-stimulating factor treatment enhances the efficacy of cellular cardiomyoplasty with transplantation of embryonic stem cell-derived cardiomyocytes in infarcted myocardium / S. W. Cho, S. J. Gwak, I. K. Kim et al. // *Biochem. Biophys. Res. Comm.*— 2006.— Vol. 340.— P. 573–582.
27. The Transforming Growth Factor- β Superfamily Member Growth-Differentiation Factor-15 Protects the Heart From Ischemia/Reperfusion Injury / T. Kempf, M. Eden, J. Strelau et al. // *Circ. Res.*— 2006, Jan 5; [Epub ahead of print]; PMID: 16397141.
28. Growth factor-mediated reversal of senescent dysfunction of ischemia-induced cardioprotection / J. Zheng, A. Chin, I. Duignan et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*— 2006.— Vol. 290.— P. H525–H530.
29. 17-beta-estradiol increases cardiac remodeling and mortality in mice with myocardial infarction / M. van Eickels, R. D. Patten, M. J. Aronovitz et al. // *J. Am. Coll. Cardiol.*— 2003.— Vol. 41.— P. 2084–2092.
30. Adrenomedullin gene delivery attenuates myocardial infarction and apoptosis after ischemia and reperfusion / K. Kato, H. Yin, J. Agata et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*— 2003.— Vol. 285.— P. H1506–H1514.
31. Calcineurin pathway is required for endothelin-1-mediated protection against oxidant stress-induced apoptosis in cardiac myocytes / T. Kakita, K. Hasegawa, E. Iwai-Kanai et al. // *Circ. Res.*— 2001.— Vol. 88.— P. 1239–1246.
32. Ischemic preconditioning and morphine attenuate myocardial apoptosis and infarction after ischemia-reperfusion in rabbits: role of delta-opioid receptor / S. Okubo, Y. Tanabe, K. Takeda et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*— 2004.— Vol. 287.— P. H1786–H1791.
33. Adiponectin protects against myocardial ischemia-reperfusion injury through AMPK- and COX-2-dependent mechanisms / R. Shibata, K. Sato, D. R. Pimentel et al. // *Nat. Med.*— 2005.— Vol. 11.— P. 1096–1103.
34. Interleukin-6/soluble interleukin-6 receptor complex reduces infarct size via inhibiting myocardial apoptosis / K. Matsushita, S. Iwanaga, T. Oda et al. // *Lab. Invest.*— 2005.— Vol. 85.— P. 1210–1223.

35. Cardiomyocyte apoptosis induced by short-term diabetes requires mitochondrial GSH depletion / S. Ghosh, T. Pulinilkunnil, G. Yuen et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*— 2005.— Vol. 289.— P. H768–H776.
36. Antioxidative treatment prevents activation of death-receptor- and mitochondrion-dependent apoptosis in the hearts of diabetic rats / J. Bojunga, D. Nowak, P. S. Mitrou et al. // *Diabetol.*— 2004.— Vol. 47.— P. 2072–2080.
37. Palmitate-induced apoptosis in neonatal cardiomyocytes is not dependent on the generation of ROS / D. L. M. Hickson-Bick, G. C. Sparagna, L. M. Buja, J. B. McMillin // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*— 2002.— Vol. 282.— P. H656–H664.
38. Reversal of hyperglycemic preconditioning by angiotensin II: role of calcium transport / V. Pastukh, S. Wu, C. Ricci et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*— 2005.— Vol. 288.— P. H1965–H1975.
39. *Schaffer S. W., Croft C. B., Solodushko V.* Cardioprotective effect of chronic hyperglycemia: effect on hypoxia-induced apoptosis and necrosis // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*— 2000.— Vol. 278.— P. H1948–H1954.
40. Sustained cardiomyocyte apoptosis and left ventricular remodeling after myocardial infarction in experimental diabetes / T. Backlund, E. Palojoki, A. Saraste et al. // *Diabetol.*— 2004.— Vol. 47.— P. 325–330.
41. Poly (ADP-ribose) polymerase contributes to the development of myocardial infarction in diabetic rats and regulates the nuclear translocation of apoptosis-inducing factor / C. Y. Xiao, M. Chen, Z. Zsengeller, C. Szabo // *J. Pharmacol. Exp. Ther.*— 2004.— Vol. 310.— P. 498–504.
42. Streptozotocin-induced hyperglycemia exacerbates left ventricular remodeling and failure after experimental myocardial infarction / T. Shiomi, H. Tsutsui, M. Keuchi et al. // *Am. Coll. Cardiol.*— 2003.— Vol. 42.— P. 165–172.

Поступила 10.02.2006