

АПОПТОЗ КАРДИОМИОЦИТОВ ПРИ ИШЕМИЧЕСКОМ СТРЕССЕ: ЦИТОКСИЧЕСКИЕ И РЕГУЛЯТОРНЫЕ ВЛИЯНИЯ АКТИВНЫХ ФОРМ КИСЛОРОДА НА МИОКАРД

Институт кардиологии им. Н.Д.Стражеско АМН Украины, Киев
Медицинское научно-практическое объединение "Медстрой", Киев

Апоптоз рассматривают как физиологическую противоположность клеточного деления, вносящую вклад в гибель кардиомиоцитов при ишемии-реперфузии и сердечной недостаточности [1-5]. Этот процесс требует затрат энергии, нуждается в экспрессии *de novo* генов апоптоза (p53, bax и др.) и управляется генетической программой. Типичными индукторами апоптоза являются активные формы кислорода (АФК) и ионы Ca^{2+} , которые участвуют также и в патогенезе (ишемическим стрессом индуцированного) повреждения миокарда. Кардиомиоциты подверженные гипоксии, гибнут по "сценарию" апоптоза, это сочетается с экспрессией Fas — m РНК [6]. Апоптотическая и некротическая гибель кардиомиоцитов при ишемии-реперфузии вносит независимый вклад в размер зоны инфаркта [7]. Апоптоз является характерной особенностью сосудистой патологии человека; предположительно, он может модулировать клеточные повреждения и случивание эндотелия, приводящие к закупорке сосудов [8-10]. Апоптоз зависит от длительности реперфузии; ишемия, продолжающаяся менее 1ч., не вызывает гибель клетки [11]. Апоптотические клетки выявляются после 90-минутной реперфузии. Эти результаты подтверждаются фрагментацией ДНК при реперфузии сердца в течении 120 мин.

Каспазы-семейство цистеиновых протеиназ, которые играют центральную роль в апоптозе [12]. Последние исследования показали,

что активация проксимальных каспаз приводит к активации дистальных каспаз в процессе апоптоза. Активация каспазы 3 (ced-3) начинается, когда каспаза 9 связывается с Араф-1 и эта реакция инициируется выходом цитохрома С в цитозоль. Каспаза 9 непосредственно активируется белком Араф-1 и цитохромом С. Значительное накопление цитохрома С в цитозоле над миофибриллами и около интеркалирующих дисков кардиомиоцитов при сердечной недостаточности было обнаружено в результате изучения трансплантатов сердца. В исходном исследовании было показано расщепление поли (ADP-рибозо) полимеры (PARK) на апоптотические фрагменты в миокарде, подвергнутом ишемии-реперфузии [13]. Введение ингибитора каспаз YVAD-cmk блокировало активацию каспаз и уменьшало число апоптотических клеток. Это исследование показало, что каспазы являются важнейшими медиаторами повреждения миокарда при ишемическом стрессе [14]. Удаление сыворотки крови и глюкозы — компонентов ишемии *in vivo* — вызывало апоптоз, который блокировался ингибитором каспаз zVAD-fmk [13]. Во время ишемии цитохром С выходил из митохондрий. Это одно из самых ранних событий в ишемизированном миокарде. Сценарий индуцированного ишемией апоптоза клеток миокарда, возможно, обусловлен повышением уровня Ca^{2+} в цитозоле, выходом цитохрома С совместно с фактором Араф-1 и прокаспазой 9, запуском активации

каспазы 3 и последующих этапов апоптотического процесса.

Внутриклеточные пути цитотоксических и регуляторных влияний АФК на миокард

Развитие ишемической болезни сердца зависит от многих факторов, включая нарушение метаболизма липидов, гомеостаза кальция и продукции АФК. Эти факторы вызывают появление "сигнала смерти", приводящего к апоптотической гибели клеток и, как следствие, к инфаркту миокарда [15]. Первая "линия защиты" в сердце млекопитающих от ишемического повреждения представлена внутриклеточными антиоксидантами, такими как супероксиддисмутаза (СОД), каталаза, глутатионпероксидаза и глутатионредуктаза. Белки, продуцируемые в сердце в ответ на окислительный стресс, также могут работать как система защиты.

Существовавшая в течении длительного времени точка зрения, что АФК вредны для биологических тканей, была поставлена под сомнение после недавно обнаруженного факта, что АФК могут служить сигнальными молекулами [16]. Митогенетические сигналы, опосредованные образованием АФК, активировали факторы транскрипции, включая NF- κ B, антиоксидантные ферменты и Bcl-2 [17]. По мере увеличения длительности ишемии и реперфузии уровень редокс-чувствительных факторов транскрипции в сердце (редокс-сигнализации), в том числе ядерный фактор NF- κ B и транскрипционный фактор AP-1, неуклонно возрастают. Основой редокс-сигнализации является то, что окисляющие условия поддерживаются стабилизирующими дисульфидами на внешней поверхности клетки, в то время как внутренняя среда поддерживается в восстановленном состоянии с помощью свободных сульфгидрильных групп. Главная дисульфидредуктаза — тиоредоксин, ответственная за поддержание внутри клетки восстановленного состояния, представляет собой низкомолекулярный редокс-активный белок с двумя цистеиновыми остатками в активном центре. Тиоредоксин присутствует во всех клетках животных, включая клетки сердца [18]. Имеют-

ся указания на то, что тиоредоксин может быть индуцирован при окислительном стрессе и играть важную роль в регулировании передачи сигналов активными формами кислорода при ишемии-реперфузии [17]. Он может быть важным компонентом защиты клеток от ишемического повреждения мышцы сердца. Было обнаружено, что окисленный тиоредоксин поступает в кровь у пациентов, перенесших операцию кардиопульмонального шунтирования. Занятия плаванием сопровождались уменьшением окислительного H_2O_2 стресса, вызванного ишемией-реперфузией, и сопутствующим увеличением уровня тиоредоксин-редуктазы, что приводило к защите миокарда от повреждения (цит. по [17]). Тиоредоксин ослабляет повреждение мышечных эндотелиальных клеток после гипоксии-реоксигенации в среде без тиолов, что свидетельствовало о защитном действии тиоредоксина при ишемическом повреждении миокарда с помощью механизма редокс-сигнализации [17, 18].

Механизмы внутриклеточной сигнализации для адаптации миокарда к ишемии

Живые клетки, в том числе кардиомиоциты, содержат ферменты, которые одновременно вырабатывают АФК и внутриклеточный редокс-буфер в ответ на ишемический стресс. В зависимости от имеющегося количества антиоксидантов и свободных радикалов кислорода АФК либо разрушаются, либо существуют длительное время. Таким образом, молекулы АФК могут выполнять роль вторичных посредников (мессенджеров), образование которых либо усиливается, либо уменьшается в ответ на физиологические стимулы типа ишемии. Многие факторы роста и цитокины вызывают окислительный стресс и повышают образование специфических антиоксидантных ферментов [18, 19]. Факторы, связанные с влиянием окружающей среды (включая тепловые, УФ-, воздействия окислителей), также вызывают окислительный стресс, который затем индуцирует антиоксидантные ферменты [1].

Первым свидетельством роли АФК как вторичного мессенджера может служить обнаружение про-

дукции АФК во время индуцированной агонистами активации ядерного фактора NF- κ B [19]. NF- κ B регулирует индуцибельную экспрессию ряда генов, участвующих в выживании и удалении клеток с помощью механизмов апоптоза. В миокарде, подвергнутом ишемии-реперфузии, NF- κ B управляет геном антиапоптоза bcl-2 и проапоптотическими факторами bax и p53. Разнонаправленные внеклеточные сигналы от интерлейкина 1 (IL-1), фактора некроза опухоли α (TNF- α), H_2O_2 и др. приводят в совокупности к развитию окислительного стресса, который сопровождается активацией NF- κ B [20]. Подобная активация NF- κ B может быть заблокирована антиоксидантами, такими как витамин E или α -липовая кислота [23]. Антиоксиданты типа N-ацетилцистеина могут предотвратить активацию NF- κ B, подавляя образование АФК (цит. по [17]).

Адаптация миокарда к ишемии сопровождается активацией некоторых тирозинкиназ [16]. Рецепторные тирозинкиназы играют важную роль в редокс-сигналикации путем аутофосфорилирования их собственных тирозинов внутри кардиомиоцитов. Фосфорилирование тирозинкиназы связано с активацией фосфолипаз C (PLC) и D(PLD), приводящих к активации множества киназ, включая фосфокиназу C (PKC) и митоген-активирующую протеинкиназу (МАР-киназу). PLD очень важна при адаптации к ишемии [21]. Показано существование связи между ишемической адаптацией и активацией PLD, в конечном счете приводящей к активации изоферментов PKC [22]. Предварительное воздействие ингибиторов тирозинкиназы частично уменьшает адаптацию к ишемии [23]. Важную роль в передаче сигнала внутри клетки играет митоген-активирующая протеинкиназа [24–26]. В ответ на внутриклеточную стимуляцию МАР-киназа быстро активируется и регулирует функции клетки, индуцируя фосфорилирование таких белков, как онкогенный продукт c-jun, рибосомальная протеинкиназа S6, участвующие в активированном стрессом механизме передачи сигнала [26]. В сердечной мышце был обнаружен протеинкиназный каскад, активируемый митогенами [24]. Участие МАР-киназ в адаптации

миокарда включает путь сигнала по цепочке тирозинкиназа — фосфолипаза D — МАР-киназа 2 [27].

В процессе функционирования внутриклеточных сигнальных механизмов, ведущих к ишемической адаптации, необходимы один или несколько участков МАР-киназного каскада. Среди трех различных семейств МАР-киназ известны два, регулируемые внеклеточным стрессом: активируемая стрессом протеинкиназа (SAPK), известная также как c-Jun-концевая киназа (JNK), и p38 МАР-киназа (цит. по [24]). Каждая из киназ выполняет в клетке различные функции, так как они имеют разные клеточные мишени и участвуют в различных механизмах передачи сигнала. Ишемическая адаптация запускает регулируемый тирозинкиназой путь передачи сигнала, приводящий к транслокации и активации p38 МАР-киназы и МАР-КАР-киназы 2 [27]. Ишемия-реперфузия усиливала индукцию белков JNK 1, c-JUN и p38 МАР-киназы. Ишемическая адаптация также сопровождалась повышением уровней этих киназ. Однако последующее повышение JNK 1, p38 и c-Jun, опосредованное ишемией-реперфузией, блокировалось при такой адаптации. По-видимому, активация индуцируемых стрессом протеинкиназ необходима для адаптации миокарда к ишемии, однако она является преходящей и быстро уменьшается при последующей ишемии-реперфузии [28].

Активация PKC в клетке является важным звеном в механизме адаптивной противоишемической защиты сердца [29]. Так, рецепторы α_1 -агониста фенилэфрина, ангиотензина 1 (AT1) и брадикинина B_2 могут активировать PKC, а также при предварительной перфузии могут подготовить сердце к ишемии [29, 30]. Разнообразные стресс-сигналы также активируют PKC. Например, механический стресс растяжения активировал PKC в культуре миоцитов (цит. по [24]). Стимуляция α_1 -рецепторов и ионы Ca^{2+} могут транслоцировать и активировать PKC [27].

Наряду с NF- κ B — редокс-чувствительным фактором транскрипции, другой редокс-чувствительной сигнальной молекулой и важным регулятором экспрессии генов является AP-1, который индуци-

руется разнообразными стрессовыми сигналами (включая экогенные), а также окислительным и ишемическим стрессом. AP-1 реагирует на окислительный стресс и АФК играют ключевую роль в его активации. Ишемическая адаптация может повышать уровень AP-1 и NF- κ B в сердце [31]. Стресс, вызванный ишемией-реперфузией, приводит к одновременной активации c-Jun и Ap-1, которая может быть ингибирована такими перехватчиками АФК, как DMTU [11].

Исследования главного (p53) гена, контролирующего апоптоз, привели к противоречивым результатам. В одних работах отмечено увеличение активности p53 при ишемии-реперфузии миокарда [32], в других адаптация миокарда к ишемии предотвращала возрастание активности p53 [31].

Ген bcl-2 предотвращает гибель клетки и функционирует как внутриклеточный антиоксидант. Прове-

денный недавно анализ белков семейства гена bcl-2 выявил сложную сеть реакций, регулирующих апоптоз. Внутри семейства гена bcl-2 одни участники могли подавлять апоптоз, а другие вызывать его [33]. Среди белков, кодируемых генами этого семейства, Bcl-2 и Bcl-x_L действовали как репрессоры клеточной гибели [33], в то время как Bax и альтернативный продукт Bcl-x вызывали гибель клетки [34]. Если Bax преобладал над Bcl, то он препятствовал подавляющему воздействию Bcl-2 на апоптоз. Сходным образом избыток Bcl-x_S противодействовал Bcl-x_L. Таким образом, баланс между молекулами Bcl-2, Bax Bcl-x_{L/S} может определять судьбу кардиомиоцитов при действии цитотоксических агентов или стресса, вызванного генотоксическими влияниями окружающей среды. Сообщалось, что p53 активирует транскрипцию гена bax через p53-зависимые реакции и одновременно понижает уровень экспрес-

сии bcl-2 (цит. по [32]).

Из изложенного выше следует, что выживание и гибель кардиомиоцитов практически зависят от редокс-состояния. В то время как значительный резерв антиоксидантов гарантирует восстановленное состояние окружения кардиомиоцитов, при ишемической болезни сердца этот резерв истощается, что и приводит к изменению редокс-состояния. Подобные изменения редокс-состояния определяют, погибнет кардиомиоцит или нет, и, если погибнет, то произойдет ли эта гибель по типу некроза или — апоптоза. Альтернатива выжить или погибнуть, по-видимому, зависит от редокс-сигнализации, регуляции транскрипции некоторых редокс-чувствительных генов и от восстановительных процессов в ДНК. Однако для полного изучения патофизиологических функций редокс-сигнализации необходимы дальнейшие исследования.

ЛИТЕРАТУРА

1. Залесский В.Н., Стадник Л.А., Великая Н.В. Апоптотический и аутофагический пути гибели клетки при гипертрофии и ремоделировании миокарда // Журн. АМН України. — 2003. — Т. 9, № 4. — С. 699-712.
2. Залесский В.Н., Гавриленко Т.П. Апоптоз при ишемии и реперфузии миокарда // Врач. дело. — 2002. — № 1. — С. 8-15.
3. Фильченков А.А., Залесский В.Н. Апоптоз кортикальных нейронов при развитии ишемических инсультов // Нейрофизиология. — 2002. — Т. 34, № 6. — С. 468-484.
4. Залесский В.Н., Поливода С.Н. Апоптоз кардиомиоцитов, сердечная недостаточность и постинфарктное ремоделирование (проблемы и перспективы) // Запорожский медицинский журнал. — 2003. — № 5. — С. 55-58.
5. Стойка Р.С., Фильченков А.А., Залесский В.Н. Цитокины и клетки мишени в регуляторной системе атерогенеза. // Успехи сов. биологии. — 2003. — Т. 123, № 1. — С. 82 — 97.
6. Tanaka M., Inada T., Fujiwara H. et al. Expression of heart shock protein after ischemic preconditioning in rabbit hearts. // Jap. Circul. — 1998. — 62. — P. 512-516.
7. Seger R., Krebs E.G. The MAPK signaling cascade. // FASEB J. — 1995. — 9. — P. 726-735.
8. Kajstura J., Cheng W. et al. Apoptotic and necrotic myocyte cell death are independent contributing variables of infarct size in rats. // Lab. Invest. — 1996. — 74. — P. 86 — 107.
9. Залесский В.Н., Дынник О.Б. Апоптоз-зависимая дисфункция эндотелия и атеросклероз // Кровообіг та гемостаз. — 2003. — № 2. — С. 22-28.
10. Дынник О.В., Березовский В.А., Залесский В.Н. Методы диагностики апоптоз-зависимых состояний // Лікування та діагностика. — 2003. — № 4. — С. 57-60.
11. Fliss H., Gattengen D. Apoptosis in ischemic and reperfused rat myocardium // Circ. Res. — 1996. — 79. — P. 949-956.
12. Фильченков А.А. Каспазы: регуляторы апоптоза и других клеточных функций // Биохимия. — 2003. — Т. 68, вып. 4. — С. 453-466.
13. Bialik S., Cryns V.L., Drincik A. et al. The mitochondrial apoptotic pathway is activated by serum and glucose deprivation in cardiac myocytes. // Circ. Res. — 1999. — 85. — P. 403-414.
14. Holly T.A., Drincik A., Byun Y. et al. Caspase inhibition reduces myocyte cell death induced by mitochondrial ischemia and reperfusion in vivo. // J. Mol. Cell Cardiol. — 1999. — 31. — P. 1709 — 1715.
15. Rodriguer M., Lucchesi B.R., Schaper J. Apoptosis in myocardial infarction // Ann. of Medicine. — 2002. — 34. — P. 470 — 479.
16. Das D.K., Maulik N. Evaluation of antioxidant effectiveness in ischemia reperfusion tissue injury. // Methods Enzymol. — 1994. — 233. — P. 601- 610.
17. Maulik N., Engelman R.M., Rouson J.A. et al. Ischemic preconditioning reduces apoptosis by upregulating Anti-death gene Bcl-2. // Circulation. — 1999. — 100 (Suppl 2). — P. 369 — 375.
18. Halestrap A.P., Kerr P.M., Javadov S. et al. Elucidating the molecular mechanisms of the permeability transition and its role in reperfusion injury of the heart. // Biochim. Biophys. Acta. — 1998. — 1366. — P. 79-94.
19. Bromme H.J. and Holz J. Apoptosis in the heart: when and why? // Mol. Cell Biochem. — 1996. — 163/164. — P. 261-275.
20. Beg A.A., Baltimore D. An essential role of NF- κ B in preventing TNF- α induced cell death. // Science. — 1996. — 274. — P. 787 — 789.
21. Cohen M.V., Lin Y., Lin G.S. et al. Phospholipase D plays a role in ischemic preconditioning in rabbit heart. // Circulation. — 1996. — 94. — P. 1713 — 1718.
22. Eskildsen-Helmond Y.E., Dekkers D.H., Loe K.S. et al. Exploration of the possible roles of phospholipase D and protein kinase C in the mechanism of ischemic preconditioning in the myocardium. // Ann. N.Y. Acad. Sci. — 1998. — 793. — P. 210 — 225.
23. Fryer R.M., Schultz H.J., Gross G.J. Pretreatment with tyrosine kinase inhibitors attenuates ischemic preconditioning in rat hearts. // Am. J. Physiol. — 1998. — 275. — P. H 2009 — H 2015.
24. Zu Y.L., Ai Y., Gilchrist A. High expression and activation of MAP kinase-