

УДК [616.127–005.8:616.12–008.46]:577.175.852

ВОЗДЕЙСТВИЕ БЛОКАТОРА РЕЦЕПТОРА AT_1 НА МОРФОЛОГИЧЕСКИЕ И МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПОКАЗАТЕЛИ ПРИ ПОСТИНФАРКТНОЙ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

С.Н. Литвинович; И.Р. Ёрш, к.м.н.; И.С. Цыдик, к.м.н.

УО «Гродненский государственный медицинский университет»

В эксперименте на чёрных 8-недельных лабораторных мышах линии C57BL6/J изучено воздействие блокатора рецептора AT_1 на массу миокарда левого желудочка сердца, рост соединительной ткани в неповреждённой части миокарда, апоптоз кардиомиоцитов, экспрессию белка CCN_1 и активность его гена после экспериментального инфаркта миокарда и развившейся сердечной недостаточности. Блокирование рецептора AT_1 телмисартаном у экспериментальных животных не влияло как на массу миокарда левого желудочка сердца, так и на показатель отношения массы миокарда к длине большеберцовой кости, однако привело к снижению площади и процентного её содержания, апоптоза, экспрессии белка CCN_1 и активности его гена.

Ключевые слова: эксперимент, CCN_1 , телмисартан, апоптоз, соединительная ткань.

In the experiment on 8-week C57BL6/J laboratory mice the influence of AT_1 blocker on the left ventricular myocardial mass, connective tissue growth in the unaffected myocardium, cardiomyocytes apoptosis, CCN_1 protein expression and its gene activity following simulated infarction as well as the resulting cardiac insufficiency has been investigated. Telmisartane-induced AT_1 receptor block in the experimental animals affect neither the left ventricular myocardial mass nor the myocardial mass and tibia length ratio, however the former resulted in the decrease in the mass area and its percentage composition together with apoptosis, CCN_1 protein expression and its gene activity.

Key words: experiment, CCN_1 , telmisartane, apoptosis, connective tissue.

Введение

Хроническая сердечная недостаточность (ХСН) является наиболее частым и серьёзным осложнением заболеваний сердечно-сосудистой системы. ХСН приводит к потере трудоспособности, значительному уменьшению продолжительности жизни больных и остаётся важнейшей проблемой здравоохранения в развитых странах.

Важную роль при ХСН играет тканевая ренин-ангиотензиновая система (РАС). Образование ангиотензина в тканях было выявлено Dzau [1]. Активность тканевой РАС нарастает постепенно, однако сохраняется долговременно. Синтезированный в миокарде ангиотензин II (AT -II) увеличивает его сократимость прямо или опосредованно, облегчая высвобождение норадреналина из окончаний сердечных нервов. AT -II активирует протоонкогены и стимулирует гипертрофию мышечных волокон и разрастание соединительной ткани [4]. Как и катехоламины, высокие уровни AT -II могут вызывать желудочковые аритмии у пациентов с ХСН [5, 2].

Эффекты AT -II в организме можно нивелировать двумя путями – изменить его синтез (например, применением ингибиторов АПФ) или блокировать его эффекты, которые осуществляются за счет связывания AT -II с широко распространенными в организме специфическими мембранными рецепторами: тип 1 (AT_1 -рецепторы) и тип 2 (AT_2 -рецепторы), каждый из которых регулирует в клетках разнонаправленные процессы. AT_1 -рецепторы ответственны за вазоконстрикцию, рост клеток, положительное инотропное действие на миокард, высвобождение катехоламинов и альдостерона. Считается, что AT_2 -рецепторы являются одним из звеньев саморегуляции ренин-ангиотензиновой системы [3].

Материалы и методы

Экспериментальные исследования проводились на чёрных 8-недельных лабораторных мышах, которые были разделены на следующие группы:

1 группа – 12 самцов мышей C57BL6/J, у которых выполнена операция без перевязки передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии (C57BL6/J);

2 группа – 9 самцов мышей C57BL6/J, у которых произведена перевязка передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии (ИМ C57BL6/J);

3 группа – 15 самцов мышей C57BL6/J, у которых была перевязана передняя межжелудочковая ветвь левой венечной артерии и которые в течение последующих 8 недель получали антагонист рецептора AT_1 – телмисартан, растворённый в воде для питья в дозе 1 мг/кг массы тела (ИМ C57BL6/J+ TEL).

Исследования проводились со строгим соблюдением требований Европейской конвенции (Страсбург, 1986) по содержанию, кормлению и уходу за подопытными животными, а также выводу их из эксперимента и последующей утилизации. Операции проводились под 1.5% изофлюрановым наркозом. Экспериментальный инфаркт миокарда осуществлялся путём перевязки нисходящей ветви левой венечной артерии. Применялись следующие методы исследований: эхокардиографический, морфометрический, гистологический, иммунофлюоресцентный, Вестерн Блоттинг, статистический и метод полимеразной цепной реакции реального времени.

Результаты и обсуждение

Непосредственно перед выведением животных из эксперимента было выполнено ультразвуковое исследование сердца. Оценена в $см^2$ площадь рубцовой ткани на участке инфаркта. У животных (ИМ C57BL6/J) с незаблокированными рецепторами AT_1 площадь рубцовой ткани на участке инфаркта миокарда составляла от 0,07 $см^2$ до 0,21 $см^2$, при среднем значении – 0,12 $см^2$. В то же время, в группе экспериментальных животных (ИМ C57BL6/J+ TEL), у которых было ограничено воздействие на клетку AT -II путём блокирования рецепторов AT_1 площадь рубцовой ткани на участке инфаркта миокарда увеличилась по сравнению с предыдущей группой на 17% и составила в среднем 0,14 $см^2$ при колебании от 0,06 до 0,3 $см^2$. Однако достоверных различий в площади рубцовой ткани на участке инфаркта миокарда между группами экспериментальных животных не выявлено.

При помощи полимеразной цепной реакции реального времени была исследована активность гена натрий-

уретического пептида в кардиомиоцитах. В двух группах экспериментальных животных, которым была произведена перевязка передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии, показатель искомого пептида был одинаков и составлял: в группе мышей (ИМ С57ВL6/Ж), у которых произведена перевязка передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии – 10,68 у.е., в группе мышей (ИМ С57ВL6/Ж+ТЕЛ), у которых была перевязана передняя межжелудочковая ветвь левой венечной артерии и которые в течение последующих 8 недель получали антагонист рецептора АТ₁ – 10,27 у.е. По сравнению с контрольной группой животных (С57ВL6/Ж), уровни данного пептида были увеличены более чем в 10 раз ($p < 0.001$, $p < 0.0001$), что подтверждает в группах животных, у которых был вызван экспериментальный инфаркт миокарда наличие у них сердечной недостаточности.

Была определена масса миокарда левого желудочка сердца в исследуемых группах животных. В группе экспериментальных животных (ИМ С57ВL6/Ж) с произведенной перевязкой передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии масса миокарда колебалась в пределах от 0,112 до 0,17 грамм при её среднем значении 0,13 грамм. В группе экспериментальных животных (ИМ С57ВL6/Ж + ТЕЛ), у которых была перевязана передняя межжелудочковая ветвь левой венечной артерии и которые в течение последующих 8 недель получали антагонист рецептора АТ₁ телмисартан, масса миокарда составила в среднем 0,14 грамм, при колебании её значения от 0,105 до 0,17 грамм. Увеличение массы миокарда левого желудочка сердца в группах экспериментальных животных с произведенной перевязкой передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии (ИМ С57ВL6/Ж) не было связано с блокированием рецепторов АТ₁ телмисартаном (ИМ С57ВL6/Ж + ТЕЛ). В контрольной группе (С57ВL6/Ж) масса миокарда в среднем составила 0,1 грамма (колебания массы от 0,081 до 0,14 грамм). Масса миокарда левого желудочка сердца у экспериментальных животных (ИМ С57ВL6/Ж) после развившейся сердечной недостаточности увеличилась по сравнению с контрольной группой (С57ВL6/Ж) на 30% ($p < 0.01$), а у животных после ограничения воздействия на клетку ангиотензина II путём блокирования рецепторов АТ₁ телмисартаном (ИМ С57ВL6/Ж + ТЕЛ) на 40% ($p < 0.0005$) по сравнению с той же контрольной группой животных (С57ВL6/Ж).

Как известно, длина большеберцовой кости характеризует возраст животного, в связи с этим мы изучили соотношение массы миокарда левого желудочка сердца к длине большеберцовой кости в исследуемых группах животных. В группе экспериментальных животных (ИМ С57ВL6/Ж) с произведенной перевязкой передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии показатель отношения массы миокарда левого желудочка сердца к длине большеберцовой кости колебался в пределах от 0,0062 гр/мм до 0,0092 гр/мм при его среднем значении 0,0076 гр/мм. Аналогичные данные наблюдались в группе животных (ИМ С57ВL6/Ж+ТЕЛ), у которых была перевязана передняя межжелудочковая ветвь левой венечной артерии и которые в течение последующих 8 недель получали ингибитор рецептора АТ₁ телмисартан, показатель отношения массы миокарда левого желудочка сердца к длине большеберцовой кости составил в среднем 0,0077 гр/мм, при колебании его значения от 0,0056 гр/мм до 0,0094 гр/мм. Увеличение показателя отношения массы миокарда левого желудочка сердца к длине большеберцовой кости в группах животных с произведенной перевязкой передней межжелудочковой ветви левой ве-

нечной артерии не было связано с блокированием рецептора АТ₁ телмисартаном.

В контрольной группе (С57ВL6/Ж) показатель отношения массы миокарда левого желудочка сердца к длине большеберцовой кости составил в среднем 0,0058 гр/мм при колебании данного показателя от 0,0045 гр/мм до 0,0079 гр/мм. Показатель отношения массы миокарда левого желудочка сердца к длине большеберцовой кости у экспериментальных животных (ИМ С57ВL6/Ж) после развившейся сердечной недостаточности увеличился по сравнению с контрольной группой (С57ВL6/Ж) на 31% ($p < 0.01$), а у животных (ИМ С57ВL6/Ж + ТЕЛ) в результате приема блокатора рецептора АТ₁ на 32% ($p < 0.0005$) по сравнению с контрольной группой (С57ВL6/Ж).

Была исследована площадь соединительной ткани в неповрежденной части миокарда левого желудочка сердца. В группе экспериментальных животных (ИМ С57ВL6/Ж + ТЕЛ), у которых была перевязана передняя межжелудочковая ветвь левой венечной артерии и которые в течение последующих 8 недель получали антагонист рецептора АТ₁ телмисартан, наблюдалось снижение площади соединительной ткани в неповрежденной части миокарда левого желудочка сердца на 21,2% ($p > 0.05$) по сравнению с аналогичной группой животных, не получавших данный препарат (ИМ С57ВL6/Ж). В группе экспериментальных животных (ИМ С57ВL6/Ж) с произведенной перевязкой передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии площадь соединительной ткани в неповрежденной части миокарда левого желудочка сердца колебалась в пределах от 439,20 мкм² до 1360,48 мкм² при его среднем значении 966,57 мкм². В группе экспериментальных животных (ИМ С57ВL6/Ж+ТЕЛ), у которых была перевязана передняя межжелудочковая ветвь левой венечной артерии и которые в течение последующих 8 недель получали антагонист рецептора АТ₁, площадь соединительной ткани в неповрежденной части миокарда левого желудочка сердца составила в среднем 760,92 мкм², при колебании её значения от 469,28 мкм² до 1414,82 мкм². В контрольной группе животных (С57ВL6/Ж) площадь соединительной ткани в неповрежденной части миокарда левого желудочка сердца составила 971,64 мкм² (колебания площади соединительной ткани в неповрежденной части миокарда левого желудочка сердца от 515,82 мкм² до 1359,77 мкм²). Площадь соединительной ткани в неповрежденной части миокарда левого желудочка сердца у экспериментальных животных (ИМ С57ВL6/Ж) после развившейся сердечной недостаточности уменьшилась по сравнению с контрольной группой (С57ВL6/Ж) на 0.5%, а у животных после приема антагониста рецептора АТ₁ телмисартана (ИМ С57ВL6/Ж + ТЕЛ) на 21% ($p > 0.05$) по сравнению с группой контроля (С57ВL6/Ж).

Был изучен показатель процентного содержания соединительной ткани в неповрежденной части миокарда левого желудочка сердца. В группе экспериментальных животных (ИМ С57ВL6/Ж+ТЕЛ), у которых была перевязана передняя межжелудочковая ветвь левой венечной артерии и которые в течение последующих 8 недель получали антагонист рецептора АТ₁ телмисартан, наблюдалось снижение показателя процентного содержания соединительной ткани в неповрежденной части миокарда левого желудочка сердца на 20% ($p > 0.05$), по сравнению с аналогичной группой животных, не получавших данный препарат (ИМ С57ВL6/Ж). В группе экспериментальных животных (ИМ С57ВL6/Ж) с произведенной перевязкой передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии показатель процентного содержания соеди-

нительной ткани в неповрежденной части миокарда левого желудочка сердца изменялся от 0,11% до 0,35%, при его среднем значении 0,25%. В группе экспериментальных животных (ИМ C57BL6/J+ТЕЛ), у которых была перевязана передняя межжелудочковая ветвь левой венечной артерии и которые в течение последующих 8 недель получали антагонист рецептора AT_1 телмисартан, показатель процентного содержания соединительной ткани в неповрежденной части миокарда левого желудочка сердца составил в среднем 0,20%, при колебании его значения от 0,12% до 0,37%. В контрольной группе экспериментальных животных (C57BL6/J) показатель процентного содержания соединительной ткани в неповрежденной части миокарда левого желудочка сердца составил 0,25% (колебания показателя процентного содержания соединительной ткани в неповрежденной части миокарда левого желудочка сердца от 0,13% до 0,35%).

Было изучено отношение количества апоптотических ядер к поверхности среза. Так, в группе животных (ИМ C57BL6/J), у которых была произведена перевязка передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии, значение данного показателя увеличилось в 5,6 раз ($p < 0.0005$) по сравнению с контрольной группой животных (C57BL6/J). Колебания изучаемого показателя в группе животных (ИМ C57BL6/J) с произведенной перевязкой передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии составили от 1,92 у.е. до 10,99 у.е., при его среднем значении 5,6 у.е. А в контрольной группе (C57BL6/J) без перевязки указанной артерии значения данного показателя колебались в пределах от 0 у.е. до 3,1 у.е. при его среднем значении 1 у.е. Увеличение показателя отношения количества апоптотических ядер к поверхности среза в 3,2 раза ($p < 0.01$) по сравнению с контрольной группой животных наблюдалось в группе животных (ИМ C57BL6/J+ТЕЛ), у которых была перевязана передняя межжелудочковая ветвь левой венечной артерии и которые в течение последующих 8 недель получали антагонист рецептора AT_1 телмисартан при колебании изучаемого показателя от 0 у.е. до 6,79 у.е. и его среднем значении 3,24 у.е. Уменьшение показателя отношения количества апоптотических ядер к поверхности среза в группах животных с произведенной перевязкой передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии было обусловлено ограничением воздействия на клетку ангиотензина II путём блокирования рецептора AT_1 . В группе экспериментальных животных с ограничением воздействия на клетку АГ-II путём блокирования рецепторов AT_1 (ИМ C57BL6/J + ТЕЛ) телмисартаном приводит к снижению данного показателя на 42,1% ($p > 0.05$) по сравнению с аналогичной экспериментальной группой животных, не получавших телмисартан (ИМ C57BL6/J).

Кроме того, также был изучен показатель отношения количества апоптотических ядер к ядрам кардиомиоцитов в группах экспериментальных животных. В двух группах экспериментальных животных после перевязки передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии изменение показателя отношения количества апоптотических ядер к ядрам кардиомиоцитов по сравнению с контрольной группой экспериментальных животных носило однонаправленный характер и проявлялось увеличением данного показателя. Так, в группе экспериментальных животных (ИМ C57BL6/J), у которых была произведена перевязка передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии, произошло увеличение данного показателя по сравнению с контрольной группой (C57BL6/J) в 7,2 раза ($p < 0.0005$). Колебания изучаемого

показателя в группе животных (ИМ C57BL6/J) с произведенной перевязкой передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии составили от 2,45 у.е. до 14,05 у.е., при его среднем значении 7,21 у.е. В контрольной группе (C57BL6/J) без перевязки данной артерии значение этого показателя колебалось в пределах от 0 у.е. до 3,16 у.е. при его среднем значении 1 у.е. Несмотря на увеличение показателя отношения количества апоптотических ядер к ядрам кардиомиоцитов в группе экспериментальных животных, получавших антагонист рецептора AT_1 (ИМ C57BL6/J + ТЕЛ) телмисартан в 3,7 раза ($p < 0.01$) по сравнению с контрольной группой животных (C57BL6/J), изучаемый показатель уменьшился на 48,6% ($p < 0.01$) по сравнению с аналогичной группой животных с незаблокированными рецепторами AT_1 (ИМ C57BL6/J). Среднее значение показателя отношения количества апоптотических ядер к ядрам кардиомиоцитов в группе экспериментальных животных (ИМ C57BL6/J + ТЕЛ) составляло 3,7 у.е. при колебании изучаемого показателя от 0 у.е. до 6,55 у.е.

Методом Вестерн Блоттинга была изучена экспрессия белка CCN_1 в левом желудочке сердца при постинфарктной сердечной недостаточности.

В группе экспериментальных животных (ИМ C57BL6/J), которым была выполнена перевязка передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии, произошло увеличение экспрессии цитопротекторного белка CCN_1 в 2,3 раза ($p < 0.01$) по сравнению с контрольной группой животных (C57BL6/J). В группе экспериментальных животных (ИМ C57BL6/J+ТЕЛ) с перевязанной передней межжелудочковой ветвью левой венечной артерии, у которых было ограничено воздействие на клетку ангиотензина II путём приема ингибитора рецептора AT_1 телмисартана, наблюдалось уменьшение экспрессии белка CCN_1 в 2,7 раза ($p < 0.01$) по сравнению с аналогичной группой экспериментальных животных, которая не получала данный препарат (ИМ C57BL6/J), и на 16% ($p > 0.05$) по сравнению с контрольной группой животных без перевязки указанной артерии (C57BL6/J).

Была также изучена активность гена белка CCN_1 при помощи полимеразной цепной реакции реального времени. В группе экспериментальных животных (ИМ C57BL6/J) с произведенной перевязкой передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии по сравнению с контрольной группой животных без выполненной перевязки данной артерии не наблюдалось изменения активности гена белка CCN_1 . Ограничение воздействия на клетку АГ-II путём приема ингибитора рецептора AT_1 (телмисартан) привело к снижению активности гена белка CCN_1 на 31% ($p > 0.05$) в группе экспериментальных животных с произведенной перевязкой передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии по сравнению с аналогичной группой (ИМ C57BL6/J) не получавших данный препарат.

Выводы

Для подтверждения сердечной недостаточности у экспериментальных животных следует использовать ультразвуковой метод, а также определение уровня натрийуретического пептида. Достоверных различий в площади рубцовой ткани на участке инфаркта миокарда между группами экспериментальных животных не выявлено. По сравнению с контрольными группами животных уровни натрийуретического пептида, у которых был вызван экспериментальный инфаркт миокарда и в дальнейшем развилась хроническая сердечная недостаточность, были увеличены более чем в 10 раз.

Блокирование рецепторов AT_1 телмисартаном у экспериментальных животных не влияло как на массу миокарда левого желудочка сердца, так и на показатель отношения массы миокарда к длине большеберцовой кости при постинфарктной сердечной недостаточности. Поскольку при инфаркте миокарда образуется зона некроза и выключается часть миокарда из процесса сокращения, то за счёт уменьшения площади работоспособной мышцы происходит увеличение нагрузки на сердечную мышцу. Поэтому увеличение как массы миокарда левого желудочка сердца, так и показателя отношения массы миокарда левого желудочка сердца к длине большеберцовой кости у экспериментальных животных после перевязки передней межжелудочковой ветви левой венечной артерии обусловлено развившимся инфарктом миокарда и является компенсаторным механизмом, направленным на поддержание сократительной способности миокарда.

Ограничение воздействия на клетку АГ-II путём блокирования рецепторов AT_1 (ИМ C57BL6/J+ТЕЛ) телмисартаном приводит к снижению площади соединительной ткани в неповреждённой части миокарда левого желудочка сердца при постинфарктной сердечной недостаточности на 21,2 % ($p>0.05$), а её процентного содержания – на 20 % ($p>0.05$) по сравнению с аналогичной группой животных (ИМ C57BL6/J) без воздействия на данный рецептор.

Блокада рецептора AT_1 в группе экспериментальных животных (ИМ C57BL6/J + ТЕЛ) приводит к уменьшению показателя отношения количества апоптотических ядер к поверхности среза на 42,1% ($p>0.05$), а показателя отношения количества апоптотических ядер к ядрам кардиомиоцитов в 3,7 раза ($p<0.01$) по сравнению с группой животных с незаблокированными рецепторами AT_1 (ИМ C57BL6/J).

Ограничение воздействия на клетку ангиотензина II путём блокирования рецепторов AT_1 (ИМ C57BL6/J+ТЕЛ) телмисартаном приводит к снижению экспрессии белка CCN_1 в 2,7 раза ($p<0.01$) по сравнению с аналогичной экспериментальной группой животных, не получавших данный препарат (ИМ C57BL6/J).

Блокирование рецепторов AT_1 телмисартаном у экспериментальных животных (ИМ C57BL6/J + ТЕЛ) приводит к ограничению воздействия на клетку ангиотензина II, что проявляется снижением активности гена искомого белка в миокарде левого желудочка сердца на 31% ($p>0.05$) при постинфарктной сердечной недостаточности при сравнении с группой экспериментальных животных, не получавших данный препарат (ИМ C57BL6/J).

Литература

1. Dzau, V.J. Implications of local angiotensin production in cardiovascular physiology and pharmacology / V.J. Dzau // Am.J.Cardiol. – 1987. – V.59. – P. 59–65.
2. Dzau, V.J. Cardiac renin-angiotensin system. Molecular and functional aspects/ V.J. Dzau // Am.J. Med. – 1988. – V.84. – P. 22–27.
3. Goodfriend, T. Angiotensin receptors and their antagonists / T. Goodfriend, M. Elliot // New Engl. J. Med. – 1996. – Vol. 334. – P. 1649–1654.
4. Kaye, D. Cytokines and cardiac hypertrophy: Roles of angiotensin II and basic fibroblast growth factor / D. Kaye, R. Kelly R. // Clin. Exp.Pharmacol.Physiol. – 1996. – V.3. – P. 136–141.
5. Linz W. Beneficial effects of the converting enzyme inhibitor, ramipril, in ischemic rat hearts / W. Linz, B. Scholkens // J.Cardiovasc.Pharmacol. – 1986. – V.8. – P. 91–99.

Поступила 06.10.2010