

М.Ю.Колесник

Запорожский государственный медицинский университет, Запорожье

Ключевые слова: кардиотрофин-1, аннексин V, миокард, экспериментальный сахарный диабет, спонтанно гипертензивные крысы.

Надійшла: 13.08.2013

Прийнята: 03.10.2013

УДК 616.127-007.61:577.112]:616-008.9]-092.9

РОЛЬ КАРДИОТРОФИНА-1 И АННЕКСИНА V В РЕМОДЕЛИРОВАНИИ МИОКАРДА СПОНТАННО ГИПЕРТЕНЗИВНЫХ КРЫС С ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

Реферат. Кардиотрофин-1 рассматривается одним из ключевых регуляторов процесса гипертрофии и гиперплазии кардиомиоцитов, а также имеет влияние на интенсивность апоптоза и чувствительность миокарда к ишемии. Цель – изучение роли кардиотрофина-1 в патологическом ремоделировании миокарда при сочетании сахарного диабета и артериальной гипертензии. Объектом исследования были спонтанно гипертензивные крысы, которым моделировали сахарный диабет. Уровень экспрессии кардиотрофина-1 анализировали иммуногистохимическим методом. Кардиомиоциты, которые находились в состоянии апоптоза, определяли с помощью антител к аннексину V. Установлено, что у гипертензивных крыс с диабетом тканевое содержание кардиотрофина-1 в миокарде левого желудочка в 2,6 раза выше по сравнению с животными без диабета. При этом моделирование сахарного диабета приводило к незначительному повышению концентрации аннексина V в миокарде. Высокое содержание кардиотрофина-1 при сочетании артериальной гипертензии и сахарного диабета рассматривается одним из фактором, который может снижать интенсивность апоптоза кардиомиоцитов.

Morphologia. – 2013. – Т. VII, № 3. – С. 60-64.

© М.Ю.Колесник, 2013

✉ zsmumk@gmail.com

Kolesnyk M.Yu. The role of cardiotrophin-1 and annexin V in myocardial remodelling of spontaneous hypertensive rats with experimental diabetes mellitus.

ABSTRACT. Background. Cardiotrophin-1 is thought to be one of the key regulator of cardiac hypertrophy and hyperplasia, and has influence on apoptosis intensity and sensitivity to ischemia. **Objective.** The aim of the investigation was to study the role of cardiotrophin-1 in pathological myocardial remodeling in arterial hypertension with diabetes. **Methods.** Spontaneous hypertensive rats with experimental diabetes were used in the study. The expression of cardiotrophin-1 was analyzed by immunohistochemical method. Apoptotic cells were confirmed by annexin V detection. **Results.** It was found that cardiac content of cardiotrophin-1 was 2.6-fold higher in myocardium of hypertensive rats with diabetes in comparison with rats without diabetes. The concentration of annexin V was slightly increased in animals with experimental diabetes. **Conclusion.** The high content of cardiotrophin-1 in hypertension with diabetes is thought to be the factor which decreases the intensity of cardiomycocytes' apoptosis.

Key words: cardiotrophin-1, annexin V, myocardium, experimental diabetes mellitus, spontaneous hypertensive rats.

Citation:

Kolesnyk MYu. [The role of cardiotrophin-1 and annexin V in myocardial remodelling of spontaneous hypertensive rats with experimental diabetes mellitus]. *Morphologia*. 2013; 7(3):60-4. Russian.

Введение

Поиск патогенетических механизмов ремоделирования миокарда при сочетании артериальной гипертензии и сахарного диабета представляет актуальную задачу для фундаментальных исследований. Особый интерес вызывает изучение ранних, потенциально обратимых механизмов, определяющих поражение сердца при данных заболеваниях. В настоящее время одним из универсальных регуляторов кардиального ремоделирования рассматривается кардиотрофин-1 [1, 2]. Данный лиганд является представителем

суперсемейства интерлейкина-6, обладающим способностью стимулировать гипертрофию и гиперплазию кардиомиоцитов как *in vivo*, так и *in vitro*. Свои биологические эффекты он реализует, взаимодействуя с гетеродимерным рецептором gp130 и рецептором фактора ингибирования лейкоцитов, что вызывает внутриклеточную активацию янус-киназы I и II типа, а также тирозинкиназы. Показано, что экспрессия кардиотрофина-1 усиливается в ответ на растяжение камер сердца и увеличение миокардиальной жесткости еще до повышения уровня натрийуретических пептидов.

На продукцию кардиотрофина-1 оказывают влияние норадреналин, укоротин, ангиотензин II, глюкоза, инсулин и реактивные формы кислорода [3]. Установлено участие кардиотрофина в повышении выживаемости кардиомиоцитов при ишемии, а также выявлены его антиапоптотические свойства [4, 5].

Биологические эффекты кардиотрофина-1 в отношении апоптоза кардиомиоцитов изучены не до конца. Одним из специфических маркеров, определяющих клетки миокарда в состоянии апоптоза, является аннексин V. Установлено, что во время апоптоза клетки высвобождают фосфатидилсерин на клеточной поверхности. Аннексин V с высокой аффинностью связывает фосфатидилсерин. При этом он проявляет очень низкую аффинность к другим фракциям фосфолипидов. Такой профиль связывания позволяет использовать аннексин V в качестве высокоспецифичного агента для определения апоптотических клеток. Роль кардиотрофина-1 и аннексина V в ремоделировании миокарда при артериальной гипертензии изучалась в единичных клинических и экспериментальных работах [6, 7]. При этом отсутствуют литературные данные об особенностях экспрессии данных маркеров при сочетании гипертензии и сахарного диабета.

Целью настоящей работы стало исследование роли кардиотрофина-1 в процессе миокардиального ремоделирования, а также его ассоциации с выраженностью апоптоза у крыс со спонтанной артериальной гипертензией (SHR) и экспериментальным сахарным диабетом.

Материалы и методы

Исследование проведено на спонтанно гипертензивных крысах-самцах линии SHR массой 220-300 г (n=20). В качестве контроля использовались нормотензивные крысы-самцы линии Вистар массой 220-270 г (n=10). Все манипуляции осуществлялись в соответствии с «Положениями про використання тварин у біомедичних дослідженнях», которые согласованы с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей». Работа выполнена на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Запорожского государственного медицинского университета (зав. – проф. Абрамов А.В.).

В первую группу были включены нормотензивные крысы-самцы линии Вистар (n=10). Вторая группа состояла из 10 интактных спонтанно гипертензивных крыс линии SHR. Третья группа была представлена животными SHR (n=10), которым моделировали сахарный диабет путем однократного внутривенного введения стрептозотоцина в дозе 50 мг/кг, разведенного *ex tempore* в 1 мл 0,1M цитратного буфера (pH=4,5) после 12-часового голодания. Далее каждое животное размещали в отдельной клетке при свободном доступе к воде и пище. В течение первых

суток эксперимента крысам выпаивали 20%-ный раствор глюкозы, в течение вторых – 10%-ный.

На 20-й день исследования у крыс всех групп измерялось систолическое артериальное давление (САД) методом плетизмографии при помощи прибора Transonic Animal Research Flowmeter T-106 Series (Transonic Systems Inc., США). Измерение проводилось трижды с усреднением полученных результатов.

Экспрессию кардиотрофина-1 оценивали иммуногистохимическим методом. Левый желудочек животных извлекали после одномоментной декапитации, фиксировали в жидкости Буэна и после стандартной гистологической обработки пропитывали и заливали в парапласт (MkCormick, США). На ротационном микротоме Microm-325 (Microm Corp., Германия) получали серийные срезы из различных отделов левого желудочка толщиной 5 мкм. Срезы депарафинировали и демаскировали в РТ-модуле (Thermo Scientific, США) в цитратном буферном растворе (Thermo Scientific, США). Состояние процессов апоптоза кардиомиоцитов анализировали, оценивая экспрессию аннексина V иммуногистохимическим методом. Для выявления кардиотрофина-1 и аннексина V гистологические срезы инкубировали с кроличьими поликлональными антителами (Novus Biologicals, США, кат. № NBP1-51255 и Abcam Inc., США, кат. № ab14196, соответственно) в разведении 1:200 во влажной камере (T= +4°C, 24 часа). Затем проводили инкубацию с козьими антителами к IgG кролика, конъюгированными с FITC (Sigma Chemical, США), в разведении 1:64 во влажной камере (T= +37°C, 45 мин.) и заключали в смесь глицерин/фосфатный буфер (9:1).

Изучение срезов проводили в ультрафиолетовом спектре возбуждения с помощью светового фильтра 38HE с высокой эмиссией (Carl Zeiss, Германия) на микроскопе AxioImager-M2 (Carl Zeiss, Германия). Изображение, получаемое с помощью 16-битной видеокамеры AxioCam-5HRm (Carl Zeiss, Германия), записывали в виде компьютерного файла для последующей обработки системой цифрового анализа изображения AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss, Германия).

При анализе срезов с иммунным окрашиванием к кардиотрофину-1 и аннексину V в автоматическом режиме выделялись зоны со статистически значимой флуоресценцией, для которых вычислялись следующие параметры:

1. Удельная площадь иммунореактивного материала (%), отражающая интенсивность экспрессии исследуемых белков в миокарде.

2. Интенсивность флуоресценции иммунореактивного материала, отражающая концентрацию (E_{if}) исследуемых белков в миокарде.

3. Удельное содержание (E_{if}/mm^2) исследуемых белков в миокарде.

Исследованию подвергали не менее 100 по-

лей зрения в каждой серии.

Статистическую обработку данных производили с помощью пакета программ Statistica 6.0 («StatSoft», США, № лицензии AXXR712D83 3214FAN5). Данные описательной статистики представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего. Сравнительный анализ в группах проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с

использованием критерия Ньюмена-Кейлса для множественных сравнений. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

При измерении САД уровень у нормотензивных крыс составил 126 ± 3 мм рт.ст., а у крыс со спонтанной гипертензией – 155 ± 5 мм рт. ст. ($p < 0,05$).

Таблица 1

Содержание кардиотрофина-1 и аннексина V в миокарде желудочков крыс

Параметр	Нормотензивные крысы	Крысы линии SHR	Крысы линии SHR с СД
Кардиотрофин-1			
Удельная площадь белка, %	$11,92 \pm 0,17$	$12,51 \pm 0,17^{*†}$	$15,13 \pm 0,21^{*§}$
Концентрация белка в миокарде, Е _{иФ}	$0,139 \pm 0,003$	$0,172 \pm 0,006^{*†}$	$0,376 \pm 0,017^{*§}$
Удельное содержание белка в миокарде, Е _{иФ} /мм ²	17502 ± 530	$20712 \pm 810^{†}$	$55132 \pm 2327^{*§}$
Аннексин-V			
Удельная площадь белка, %	$13,91 \pm 0,16$	$15,52 \pm 0,14^{*†}$	$17,91 \pm 0,09^{*§}$
Концентрация белка в миокарде, Е _{иФ}	$0,126 \pm 0,004$	$0,153 \pm 0,005^{*}$	$0,151 \pm 0,006^{*}$
Удельное содержание белка в миокарде, Е _{иФ} /мм ²	21348 ± 662	22859 ± 727	23581 ± 919

Примечание: данные представлены в виде «средняя±стандартная ошибка средней». Отличия статистически значимы при $p < 0,05$ по отношению к группе нормотензивных животных (*), крысам линии SHR (§), крысам SHR с СД (†). СД – сахарный диабет; SHR – спонтанно гипертензивные крысы

В нашем исследовании у животных линии SHR с экспериментальным диабетом отмечена наибольшая экспрессия кардиотрофина-1 (табл. 1). Его удельное содержание было в 3,15 раза больше значения у нормотензивных животных и в 2,66 раза, чем у спонтанно гипертензивных крыс без диабета (рис. 1,2). Аналогично направленные изменения отмечались при анализе удельной площади и концентрации белка в миокарде. Ранее в работе C.Pemberton и соавт. [8] было показано, что у крыс линии SHR 40-недельного возраста тканевая концентрация кардиотрофина-1 была на 25% выше по сравнению с нормотензивными животными линии Вистар-Киото. Также в данном исследовании было продемонстрировано, что концентрация маркера в предсердиях гипертензивных крыс в 8 раз выше, чем в желудочках. Параллельно оценивалась плазменная концентрация кардиотрофина-1 у больных с гипертонической болезнью, которая оказалась значимо выше по сравнению с нормотензивными индивидами. В работе B.Lopez и соавт. [9] отсутствие гена кардиотрофина-1 у мышей ассоциировалось с замедлением развития миокардиального фиброза, снижением артериальной жесткости и более высокой выживаемостью. В клиническом исследовании S.Ravassa и соавт. [10] у пациентов с гипертонической болезнью отмечали наибольшую концентрацию плазменного кардиотрофина-1 у лиц с систолической дисфункцией левого желудочка. В нашей

работе значительное увеличение миокардиального тканевого кардиотрофина-1 при моделировании сахарного диабета предположительно связано с влиянием гипергликемии.

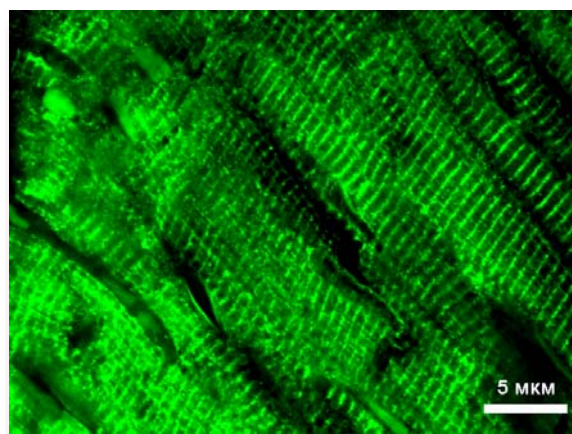


Рис. 1. Миокард крысы линии SHR с продольным расположением волокон. Реакция непрямой иммунофлюоресценции с кроличьими поликлональными антителами к кардиотрофину-1 крысы. Об. $\times 63$.

Кардиотрофин-1 является универсальным индуктором важнейших внутриклеточных сигнальных систем. Помимо указанных пролиферативных эффектов установлены антиапоптотические свойства кардиотрофина-1. В нашем исследовании интенсивность апоптоза оценивали по экспрессии аннексина V (рис. 3).

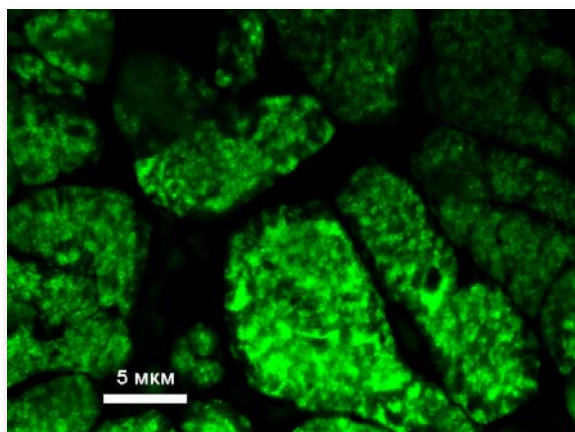


Рис. 2. Миокард крысы линии SHR с поперечным расположением волокон. Реакция непрямого иммунофлюоресценции с кроличьими поликлональными антителами к кардиотрофину-1 крысы. Об. $\times 63$.

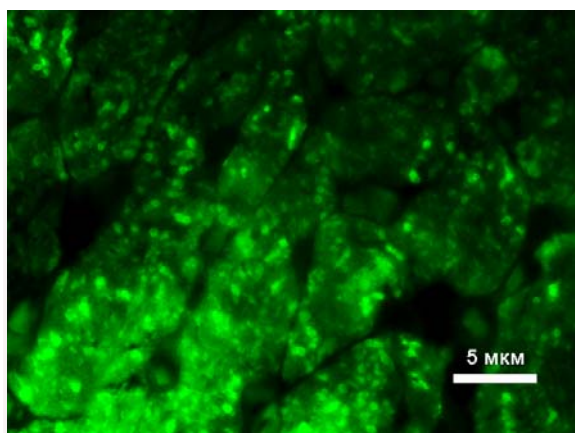


Рис. 3. Миокард крысы линии SHR. Реакция непрямого иммунофлюоресценции с кроличьими поликлональными антителами к аннексину V крысы. Об. $\times 63$.

Концентрация и удельная площадь белка были незначительно, но статистически значимо выше у гипертензивных животных. Ранее в работе S.Ravassa и соавт. [6] было показано, что апоптотический индекс кардиомиоцитов у крыс линии SHR был в 1,38 раза выше, чем у нормотензивных крыс линии Вистар-Киото. В другом исследовании апоптотический индекс у животных с гипертонией и экспериментальным диабетом

не отличался от показателя крыс без диабета в раннем возрасте, но достоверно увеличивался по мере старения животных [11]. При этом не было зафиксировано отличий в значении этого маркера между животными с диабетом и без него. Существуют данные о том, что кардиотрофин-1 может проявлять антиапоптотические свойства. В исследовании на соль-чувствительных гипертензивных крысах производили аутологичную трансплантацию скелетных миоцитов с геном кардиотрофина-1 [7]. Это позволяло предотвращать патологическое ремоделирование и дилатацию миокарда левого желудочка, тормозить развитие сердечной недостаточности. В другом исследовании проводили стимуляцию апоптоза на культурах кардиомиоцитов гипертензивных крыс с помощью ангиотензина II в зависимости от наличия кардиотрофина-1. Клетки, находящиеся в состоянии апоптоза, определяли с помощью аннексина V. Присутствие в культуре клеток кардиотрофина-1 достоверно снижало интенсивность апоптоза кардиомиоцитов и повышало их выживаемость при стимуляции ангиотензином II и реактивными формами кислорода [4].

По данным нашего исследования высокая концентрация кардиотрофина-1 в миокарде гипертензивных крыс с экспериментальным диабетом может выступать одним из протективных факторов в отношении апоптоза кардиомиоцитов. Данное предположение требует подтверждения в дальнейших исследованиях.

Выводы

1. При экспериментальном сахарном диабете у спонтанно гипертензивных крыс отмечается достоверное увеличение удельного содержания кардиотрофина-1 в миокарде в 2,66 раза.

2. Моделирование сахарного диабета крысам линии SHR приводит к незначительному повышению интенсивности апоптоза кардиомиоцитов.

Перспективы дальнейших разработок.

Планируется изучить влияние тканевых факторов роста на характер кардиального ремоделирования у животных со спонтанной гипертонией и экспериментальным сахарным диабетом.

Литературные источники References

1. Novel insights into the role of cardiotrophin-1 in cardiovascular diseases / P. Calabrò, G. Limongelli, L. Riegler // J. Mol. Cell Cardiol. – 2009. – Vol. 46, № 2. – P. 142-148.

Calabrò P, Limongelli G, Riegler L, Maddaloni V, Palmieri R, Golia E, Roselli T, Masarone D, Pacileo G, Golino P, Calabrò R. Novel insights into the role of cardiotrophin-1 in cardiovascular diseases. J Mol Cell Cardiol. 2009 Feb;46(2): 142-8. doi: 10.1016/j.yjmcc.2008.11.002. Epub 2008 Nov 13. Cited in: PubMed; PMID: 19059413.

2. Jougasaki M. Cardiotrophin-1 in cardiovascular regulation/ M. Jougasaki // Adv. Clin. Chem. – 2010. – Vol. 52. – P. 41-76.

Jougasaki M. Cardiotrophin-1 in cardiovascular regulation. Adv Clin Chem. 2010; 52: 41-76. Cited in: PubMed; PMID: 21275339.

3. Stejskal D. Cardiotrophin-1 : [review] / D. Stejskal. V. Ruzicka// Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky Olomouc. Czech. Repub. – 2008. – Vol.

152, № 1. – P. 9-19.

Stejskal D, Ruzicka V. Cardiotrophin-1. Review. Biomed Pap Med Fac Univ Palacky Olomouc Czech Repub. 2008 Jun;152(1):9-19. Cited in: PubMed; PMID: 18795069.

4. Characterization of the protective effects of cardiotrophin-1 against non-ischemic death stimuli in cardiomyocytes / N. Lopez, J. Díez, M. Fortuno // Cytokine. – 2005. – Vol.30, № 5. – P. 282-292.

López N, Díez J, Fortuño MA. Characterization of the protective effects of cardiotrophin-1 against non-ischemic death stimuli in adult cardiomyocytes. Cytokine. 2005 Jun 7;30(5):282-92. Cited in: PubMed; PMID: 15927854.

5. HIF-1-mediated up-regulation of cardiotrophin-1 is involved in the survival response of cardiomyocytes to hypoxia / P. Rabador, G. San Jose, C. Rodriguez [et al.] // Cardiovasc Res. – 2011. – Vol. 92, № 2. – P. 247-255.

Robador PA, San José G, Rodríguez C, Guadall A, Moreno MU, Beaumont J, Fortuño A, Díez J, Martínez-González J, Zalba G. HIF-1-mediated up-regulation of cardiotrophin-1 is involved in the survival response of cardiomyocytes to hypoxia. Cardiovasc Res. 2011 Nov 1;92(2):247-55. doi: 10.1093/cvr/cvr202. Epub 2011 Jul 19. Cited in: PubMed; PMID: 21771897.

6. Mechanisms of increased susceptibility to angiotensin II-induced apoptosis in ventricular cardiomyocytes of spontaneously hypertensive rats / S. Ravassa, M. Fortuño, A. González [et al.] // Hypertension. – 2000. – Vol. 36. – P. 1065-1071.

Ravassa S, Fortuño MA, González A, López B, Zalba G, Fortuño A, Díez J. Mechanisms of increased susceptibility to angiotensin II-induced apoptosis in ventricular cardiomyocytes of hypertensive rats. Hypertension. 2000 Dec;36(6):1065-71. Cited in: PubMed; PMID: 11116126.

7. Transplantation of cardiotrophin-1-expressing myoblasts to the left ventricular wall alleviates the transition from compensatory hypertrophy to congestive heart failure in Dahl salt-sensitive hypertensive rats / R. Toh, S. Kawashima, M. Kawai [et al.] // J. Am. Coll. Cardiol. – 2004. – Vol. 43, № 12. – P. 2337-2347.

Toh R, Kawashima S, Kawai M, Sakoda T, Ueyama T, Satomi-Kobayashi S, Hirayama S, Yokoyama M. Transplantation of cardiotrophin-1-expressing myoblasts to the left ventricular wall alleviates the transition from compensatory hypertrophy to congestive heart failure in Dahl salt-sensitive

hypertensive rats. J Am Coll Cardiol. 2004 Jun 16;43(12):2337-47. Cited in: PubMed; PMID: 15193703.

8. Plasma cardiotrophin-1 is elevated in human hypertension and stimulated by ventricular stretch / C. Pemberton, S. Raudsepp, T. Yandle [et al.] // Cardiovasc. Res. – 2005. – Vol. 68. – P.109-117.

Pemberton CJ, Raudsepp SD, Yandle TG, Cameron VA, Richards AM. Plasma cardiotrophin-1 is elevated in human hypertension and stimulated by ventricular stretch. Cardiovasc Res. 2005 Oct 1;68(1):109-17. Cited in: PubMed; PMID: 15978561.

9. Absence of cardiotrophin 1 is associated with decreased age-dependent arterial stiffness and increased longevity in mice / N. Lopez-Andres, L. Calvier, C. Labat [et al.] // Hypertension. – 2013. – Vol. 61. – P. 120-129.

López-Andrés N, Calvier L, Labat C, Fay R, Díez J, Benetos A, Zannad F, Lacolley P, Rossignol P. Absence of cardiotrophin 1 is associated with decreased age-dependent arterial stiffness and increased longevity in mice. Hypertension. 2013 Jan;61(1):120-9. doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.112.201699. Epub 2012 Nov 19. Cited in: PubMed; PMID: 23172930.

10. Association of cardiotrophin-1 with left ventricular systolic properties in asymptomatic hypertensive patients / S. Ravassa, O. Beloqui, N. Varo [et al.] // J Hypertens. – 2013. – Vol.31, № 3. – P. 587-594.

Ravassa S, Beloqui O, Varo N, Barba J, López B, Beaumont J, Zalba G, Díez J, González A. Association of cardiotrophin-1 with left ventricular systolic properties in asymptomatic hypertensive patients. J Hypertens. 2013 Mar;31(3):587-94. doi: 10.1097/HJH.0b013e32835ca903. Cited in: PubMed; PMID: 23429662.

11. Myocardial fibrosis and apoptosis, but not inflammation, are present in long-term experimental diabetes / S. Ares-Carrasco, B. Picatoste, A. Benito-Martin [et al.] // Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol. – 2009. – Vol. 297. – P. 2109-2119.

Ares-Carrasco S, Picatoste B, Benito-Martin A, Zubiri I, Sanz AB, Sánchez-Niño MD, Ortiz A, Egido J, Tuñón J, Lorenzo O. Myocardial fibrosis and apoptosis, but not inflammation, are present in long-term experimental diabetes. Am J Physiol Heart Circ Physiol. 2009 Dec;297(6):H2109-19. doi: 10.1152/ajpheart.00157.2009. Epub 2009 Oct 9. Cited in: PubMed; PMID: 19820199.

Колесник М.Ю. Роль кардіотрофіна-1 та анексина V у ремоделюванні міокарда спонтанно гіпертензивних щурів із експериментальним цукровим діабетом.

Реферат. Кардіотрофін-1 розглядається одним із ключових регуляторів процесу гіпертрофії та гіперплазії кардіоміоцитів, а також має вплив на інтенсивність апоптозу та чутливість міокарда до ішемії. Метою роботи стало вивчення ролі кардіотрофіна-1 у патологічному ремоделюванні міокарда при поєднанні цукрового діабету та артеріальної гіпертензії. Об'єктом дослідження були спонтанно гіпертензивні щури, яким моделювали цукровий діабет. Рівень експресії кардіотрофіна-1 аналізували імуногістохімічним методом. Кардіоміоцити, що перебували у стані апоптозу, визначали за допомогою антитіл до анексина V. Встановлено, що у гіпертензивних щурів із діабетом тканинний вміст кардіотрофіна-1 в міокарді лівого шлуночка у 2,6 рази вище порівняно із тваринами без діабету. При цьому моделювання цукрового діабету призводило до незначного підвищення концентрації анексину V у міокарді. Високий вміст кардіотрофіна-1 при поєднанні артеріальної гіпертензії та цукрового діабету розглядається одним з факторів, що може призводити до зниження інтенсивності апоптозу кардіоміоцитів.

Ключові слова: кардіотрофін-1, анексин V, міокард, експериментальний цукровий діабет, спонтанно гіпертензивні щури.