

Апоптоз как инициальный механизм повреждения эндотелиоцитов в патогенезе артериальной гипертонии у женщин пожилого возраста

Рюмшин М.А.

ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава

России, Курск

Научный руководитель: д.м.н., профессор Горшунова Н.К.

В проведенном исследовании изучен механизм патологического апоптоза эндотелиоцитов при артериальной гипертонии у женщин пожилого возраста, играющий важную роль в патогенезе повреждения сосудистой стенки и приводящий к развитию эндотелиальной дисфункции, которая признается важным звеном в формировании и прогрессировании артериальной гипертонии как патологии. По результатам оценки биохимических маркеров апоптоза была установлена высокая активность пути клеточного разрушения, именуемого как «запрограммированная клеточная смерть», имеющего на данном этапе защитно-адаптивное значение, очищающего циркуляторное русло от морфологически и функционально трансформировавшихся, а также оторвавшихся от субэндотелиального слоя эндотелиальных клеток сосудистой стенки. В исследовании принимали участие 42 пожилые женщины со средним возрастом – 67,1±4,4 года. Критерии отбора — артериальная гипертония II стадии, 1-2 степени. В группу контроля вошли 27 женщин аналогичного возраста без сердечно-сосудистых заболеваний с нормальным уровнем артериального давления.

Отмечено повышение активности проапоптотических рецепторов в 4 раза и активированных ими каспаз-8 и 3 в 2 раза у больных артериальной гипертонией относительно группы женщин, не страдающих данной патологией. В итоге было подтверждено значение апоптоза в патогенезе повреждения сосудистой стенки при артериальной гипертонии у женщин пожилого возраста.

Ключевые слова: артериальная гипертония, апоптоз, каспазы, эндотелиальная дисфункция, женщины пожилого возраста.

Apoptosis as the primary mechanism of endothelial cell damage in the pathogenesis of arterial hypertension in elderly women

Ryumshin M.A.

Kursk State Medical University, Russia, Kursk

Scientific adviser: Ph.D., Professor N.K. Gorshunova

The study examined the mechanism of pathological apoptosis of endotheliocytes in hypertension in elderly women which takes main role in pathway of vascular lesions. All that causes endothelial dysfunction which entails development and progression of arterial hypertension. According to the results of the evaluation of apoptosis biochemical markers the pathway of cell destruction which known as “programmed cell death” is having high level of activity; at this point it appears as protective and adaptive mechanism which eliminate from the circulatory bed morphologically and functionally transformed endothelial cells, which were detached from the subendothelial layer. The study involved 42 elderly women with an average age of 67.1 ± 4.4 years. Selection criteria - arterial hypertension Grade 1-2, stage 1-2. The control group included 27 women of similar age without cardiovascular diseases with normal arterial pressure.

Increasing activity level of proapoptotic receptors was noted 4 times, activated by them caspases-8 and 3 was noted 3 times in patients with arterial hypertension relative to the group of women not suffering from this pathology. As a result, the importance of apoptosis in the pathogenesis of vascular lesions in arterial hypertension in elderly women was confirmed.

Key words: arterial hypertension, apoptosis, caspases, endothelial dysfunction, elderly women

Артериальная гипертония (АГ) — самое распространенное заболевание в структуре сердечно-сосудистой патологии, при котором сосудистая стенка изменяется как морфологически, так и функционально. Инициальными механизмами поражения сосудистой стенки как главного органа-мишени при АГ считаются эндотелиальная дисфункция (ЭД) и апоптоз. По своей сути данные механизмы отражают поражение на клеточном, субклеточном и молекулярном уровнях функционирования сердечно-сосудистой системы. Эндотелий – однослойный пласт плоских клеток, выстилающих внутреннюю поверхность кровеносных сосудов, а также полостей сердца. До недавнего времени считалось, что главная функция эндотелия – это полировка сосудов изнутри. И только в конце XX века, стало ясно, что основной причиной артериальной гипертонии и других сердечно-сосудистых заболеваний является патология эндотелия. Именно сейчас приходит понимание, насколько важна роль этого органа, именно органа, так как суммарный вес эндотелиальных клеток составляет от 1,5 до 2 кг, что сопоставимо с массой печени, а площадь его поверхности равна площади футбольного поля. Эндотелиальные клетки выполняют следующие функции: защитную функцию, играя роль барьера, обладают выраженной эндо-, пара-, и аутокринной функциями, благодаря чему осуществляется регуляция артериального сосудистого тонуса при секреции эндотелиоцитами вазоактивных веществ, таких как окись азота (NO) и эндотелин-1, дисбаланс в системе секреции как первого, так и второго приводит к нарушению регуляции сосудистого тонуса, осуществляет баланс между профибринолитической и протромбогенной системами, кроме того эндотелий осуществляет метаболический гомеостаз с помощью синтезируемых и секретируемых биоэффektorных веществ, эндотелий активно участвует в процессе местного воспаления как защитно-приспособительного механизм, пропуская из крови через стенку сосуда в ткань, подверженную воспалительному процессу, защитные антитела и лейкоциты. Вопросы патоморфологии эндотелиоцитов при хроническом воздействии повышенного артериального давления на главный орган-мишень в научных исследованиях до конца не изучены, что подчеркивает необходимость исследований, направленных на изучение субклеточных и молекулярных механизмов повреждения сосудистой стенки при артериальной гипертонии, вызывающих морфофункциональную трансформацию эндотелиоцитов. Одним из таких механизмов признается апоптоз — одна из форм клеточного разрушения, обозначающаяся как «запрограммированная клеточная смерть», приводящая к развитию эндотелиальной дисфункции.

Апоптоз возникает под действием вне- и внутриклеточных факторов, осуществляемый включением специальных внутриклеточных взаимосвязанных процессов, которые регулируются особыми генетическими программами. Апоптоз клеток очень часто встречается при нормальном эмбриогенезе (гибель клеток протока первичной почки, нейробласты первичных ганглиев), кроме того нормальный апоптоз клеток играет роль биоассенизатора: он запускает гибель неправильно развивающейся или потенциально опасной клетки, примером чего служит образование «мертвой зоны» вокруг раковой клетки, при апоптозе клеток-соседей. В рамках данного исследования рассматривается патологический апоптоз эндотелиоцитов, возникающий при структурной трансформации клетки в результате длительного воздействия повышенного артериального давления на сосудистую стенку, характеризующийся высокой ферментативной активностью. В развитии апоптотического пути выделяют стадии обратимых и необратимых изменений. В стадию обратимых изменений процесс может остановиться и клеточные органеллы репарируются, в стадию необратимых изменений репарация невозможна, клетка превращается в апоптотическое тельце. Реализация апоптоза на молекулярном уровне укладывается в 4 стадии: активация сигнальных путей передачи (FAS-лиганд и факторы некроза опухолей), внутриклеточная стадия контроля и интеграции — осуществление взаимодействия между внутриклеточными адаптерными белками с доменами смерти и белками семейства Bcl-2 с активацией P53, разрушение клетки, осуществляемое активированным каспазным каскадом и ДНКазами, фагоцитоз апоптотических телец рецепторно-обусловленным путем. Примечательно, что прямая реализация апоптотической программы обусловлена комплексной активацией адаптерных белков, гранзимов и цитохрома C с последующей активизацией цистеиновых аспартатспецифических протеаз(каспаз) и эндонуклеаз, а опосредованная реализация осуществляется путем одновременной экспрессией генов апоптоза (BAD, BAX, P53) и репрессией антиапоптотических генов (Bcl и Bcl-XL) с дисбалансом между белками промоторами апоптоза и ингибиторами апоптоза в пользу первых, также запускающих каспазный каскад.

Главная роль в разрушении клетки по апоптотическому пути принадлежит активации каспаз, каскаду внутриклеточных ферментов. активизирующихся при гибели цитоплазматического рецепторного комплекса или нарушении целостности митохондрий. Каспазы являются эффекторами, реализующие программу апоптоза. Эти энзимы участвуют в последовательности явлений, запускаемых в ответ на проапоптотические сигналы и реализующиеся в разрезании серии внутриклеточных

структурных белков, что приводит в итоге к разборке клетки. Каспазы являются цистеиновыми аспартатспецифичными протеазами, они постоянно синтезируются практически во всех клетках в виде проферментов (неактивная форма), активирующихся при апоптозе. Прокаспазы (32-56 кДа) состоят из 4 доменов: N-концевого домена, большой (17-21 кДа) и малой (10-13 кДа) субъединицы и короткой связующей области между ними. При активации, обусловленной поступлением апоптотического сигнала от экстрацеллюлярных апоптотических рецепторов N-концевой домен и связующий фрагмент между субъединицами отщепляются. Образуется каспазный гетеродимер. Активная форма каспазы - это тетрамер, состоящий из двух таких гетеродимеров. В настоящее время изучено 10 каспаз, среди которых центральное место в процессе апоптоза занимают каспазы 3 и 8. Координатором апоптотического пути служит каспаза 8, непосредственно связанная с мембранным рецепторным комплексом, переходящая из про-каспазы в активную форму в ответ на воздействие апоптоз-индуцирующих внеклеточных факторов и ответственная за активацию каспазного каскада и, в результате, процессов разрушения внутриклеточных структур. Активированная каспаза-8 может инициировать апоптоз двумя путями. Первый из них – непосредственная активация эффекторной каспазы-3. Второй путь – обходной – запускается, если уровень каспазы-8 в апоптосоме недостаточен для активации каспазы-3. Каспазе 3 отведена строго эффекторная роль в комплексе с каспазой 9 в формировании апоптотической гибели клетки, характеризующаяся реализацией сигнала к распаду клетки. Регулирование процесса апоптоза осуществляется сигналами, генерируемыми при связывании цитокинов с экстрацеллюлярными мембранно-связанными рецепторами, принадлежащих к семейству туморонекротических белков. Один из них - Apo-1/Fas. Fas/APO-1, также называемый CD95 (CD - cluster differentiation), способен запускать в клетке апоптоз после взаимодействия с его лигандом (FasL) или с агонистическими моноклональными антителами (MA) к Fas. Передача сигнала при апоптозе осуществляется от рецептора Fas/APO-1, цитоплазматическая часть которого содержит так называемые домены смерти DD(death domain). Данные домены представлены как модуль, который играет важную роль в передаче сигнала апоптоза. Вместе с другими важными модулями – эффекторным доменом смерти DED (death effector domain) , а также доменом активации и рекрутирования каспазы – CARD (caspase recruitment domain), DD по сходству характеристик объединяют в суперсемейство доменов смерти. Каждый из этих доменов способен участвовать в белок-белковых взаимодействиях одного типа. При таких взаимодействиях эти

домены смерти объединяются с другим доменом смерти (пример CARD с CARD, DD с DD, DED с DED) за счет шести перекрещивающихся α -спиралей. Начало процесса апоптоза через этот рецептор происходит при связывании проапоптотического лиганда (мембраносвязанного цитокина), роль которого исполняет фактор некроза опухолей. Простота данного механизма инициации апоптоза подтверждается последующей самоактивацией прокаспазы 8, переходящей в активную каспазу, которая происходит без каких-либо дополнительных ферментативных активностей.

В результате действия биохимического каскада реакций повреждаются клеточное ядро, ДНК и цитозольные органеллы, в цитоплазме конденсируются и сморщиваются гранулы без их разрушения, расширяется эндоплазматический ретикулум, теряются мембранные микроворсинки — эндотелиоциты погибают, обнажая базальную мембрану сосудистой стенки, создавая условия для повышения проницаемости для клеток крови, вазоактивных веществ, нарушая регулирование функций сосудистой стенки. Возникают условия для формирования атеросклеротических и фибротических процессов.

Цель исследования — определение роли апоптотического процесса в патогенезе повреждения сосудистого эндотелия при артериальной гипертензии у женщин пожилого возраста.

Материалы и методы исследования. В исследовании приняли участие 42 пожилые женщины, страдающие артериальной гипертензией II стадии, 1-2 степени, средний возраст – $67,1 \pm 4,4$ года и 27 женщин аналогичного возраста без сердечно-сосудистых заболеваний с нормальным уровнем артериального давления. Критерии исключения из исследования: вторичные гипертензии, сахарный диабет, заболевания щитовидной железы, внутренних органов в стадии обострения, системные заболевания соединительной ткани, анемии, злокачественные новообразования, тяжелые нарушения сердечного ритма.

У всех обследуемых проводилось исследование крови с помощью наборов для иммуноферментного анализа (ИФА), оценивались активности апоптотических ферментов: каспазы-8 и 3, человеческого s-АРО-1/Fas. Для определения sАРО-1/Fas использовались наборы компании Bender MedSystems (Австрия), для определения каспазы-8 – компании eBioscience (США).

Статистический анализ полученных результатов проведен с помощью методов описательной статистики в программах Microsoft Excel, BIOSTAT, Statistica 6.0; достоверность результатов определялась по критерию Стьюдента и считалась значимой при $p < 0,05$.

Результаты исследования.

Проведенное исследование показало, что хроническая АГ продолжительностью более 11 лет вследствие гипоксии, механических повреждений стенки сосудов сопровождалась гибелью эндотелиоцитов, активацией про- и апоптотических механизмов.

В таблице 1 представлены значения изученных параметров.

<i>Показатели</i>	sAPO-1/Fas, пг/мл	Каспаза-8, нг/мл	Каспаза-3 нг/мл
<i>Основная группа, n=42</i>	<i>154,8±27,2</i>	<i>0,36±0,05</i>	<i>11,5±0,8</i>
<i>Группа сравнения, n=24</i>	<i>41,8±1,5</i>	<i>0,15±0,04</i>	<i>5,4±0,8</i>
<i>p<</i>	<i>0,01</i>	<i>0,01</i>	<i>p<0,01</i>

Таблица 1. Показатели про- и апоптотической активности, у пожилых женщин с АГ

Полученные результаты показали, что у женщин, страдающих АГ, наблюдалось повышение про- и апоптотической активности. Достоверно установлено повышение активности проапоптотических рецепторов в 4 раза у больных артериальной гипертонией (154,8±27,2 пг/мл) относительно группы женщин, не страдающих данной патологией (41,8±1,5 пг/мл). Уровень sAPO-1/Fas характеризовал состояние клеточных рецепторов, активация которых запускала ферментативный (каспазный) апоптотический каскад с последующим распадом клеточного ядра, что способствовало гибели эндотелиоцитов и нарушению функции сосудистой стенки. Уровни каспазы-8 (0,36±0,05 нг/мл) и каспазы-3 (11,5±0,8 нг/мл) у страдающих артериальной гипертонией достоверно превосходят аналогичные показатели у группы сравнения более чем в 2 раза, что подтверждает высокую активность процесса апоптоза эндотелиальных клеток.

Таким образом, инициацию апоптоза эндотелиальных клеток сосудистой стенки у женщин пожилого возраста, страдающих артериальной гипертонией, можно считать механизмом развития и прогрессирования повреждения сосудистой стенки при артериальной гипертонии.

Литература:

1. Владимирская, Т.Э. Морфологические изменения и апоптоз эндотелиальных клеток коронарных артерий при атеросклерозе /Т.Э.Владимирская, И.А. Швед, С.Г. Криворот//Кардиология.-2014.-Т.54.-№12. С.44-46
2. Белушкина Н.Н. Молекулярные основы патологии апоптоза/Н.Н.Белушкина, С.Е.Северин// Архив патологии.-2001.-№1.-С.51-60
3. Беляева, И.Г. субклиническое воспаление и реакция апоптоза лимфоцитов периферической крови у больных артериальной гипертонией / И.Г. Беляева, Л.Н. Мингазетдинова // Международный журнал прикладных и фундаментальных исследований. - 2010. - №12. - . 35-36.
4. Горшунова, Н.К., Мауэр, С.С. Коррекция биоэффекторного дисбаланса при эндотелиальной дисфункции у больных артериальной гипертонией пожилого возраста//Фундаментальные исследования.-2013.-№7 (ч.2).С296-360
5. Шишкин, А.Н. Эндотелиальная дисфункция и артериальная гипертензия /А.Н. Шишкин, М.Л.Лындина // Артериальная гипертензия. – 2008. - Т.14, № 4. – . 315319.
6. Мартынова Е.А. Регуляция активности каспаз в апоптозе // Биоорг. хим. 2003. Т.29. № 5. С.518–543.