

МЕТОДЫ ИЗУЧЕНИЯ АПОПТОТИЧЕСКОЙ ГИБЕЛИ КЛЕТОК МИОКАРДА

Азова М.М.

Российский университет дружбы народов, каф. биологии и общей генетики, г. Москва

Одной из наиболее актуальных проблем современного здравоохранения выступают заболевания сердечнососудистой системы. Особое внимание уделяется молекулярным основам хронической сердечной недостаточности, и активно обсуждается гипотеза значимости гибели клеток миокарда в ее развитии. Многие исследователи отводят апоптозу ведущую роль в структурных изменениях сердца, обусловленных потерей мышечных клеток. Однако, несмотря на наличие ряда работ по исследованию механизмов апоптоза кардиомиоцитов и его влияния на развитие кардиомиопатий, многие методологические и концептуальные вопросы остаются нерешенными. Для их прояснения в первую очередь необходима оптимизация методов оценки сердечного апоптоза.

Методы идентификации апоптотической гибели клеток можно разделить на следующие группы:

- световая микроскопия с применением обычных методов фиксации и окрашивания;
- флуоресцентная микроскопия;
- электронно-микроскопические методы;
- выявление олигонуклеосомной деградации ДНК *in situ*;
- иммуногистохимическое выявление белков-маркеров, участвующих в программированной гибели клеток (ПКГ), или фрагментированной ДНК;
- определение активности каспаз.

Изучение апоптоза на окрашенных стандартными способами препаратах применяется очень широко ввиду относительной простоты этих методов. Полученные при подсчете апоптотически измененных клеток результаты выражают в виде так называемого апоптотического индекса. Критериями программированной гибели клеток могут выступать маргинация и пикноз хроматина, изменение контуров ядра, изменение контуров и фрагментация клеток, появление свободно лежащих ядер.

Флуоресцентная микроскопия часто используется для выявления ПКГ. Исследуют как витально окрашенные клетки во взвеси, так и фиксированные препараты. При работе с живыми клетками широко применяется мечение аннексином V, позволяющим обнаружить на внешней стороне плазматической мембраны появляющийся в процессе апоптоза фосфатидилсерин.

Большинство электронно-микроскопических признаков ПКГ составляют те же изменения, которые выявляются при световой микроскопии. Ведущее значение придается морфологии ядерных структур. Также рассматриваются изменения цитолеммы (выпячивания и пузырьки на мембране - блеббинг), структура митохондрий, фрагментация эндоплазматического ретикулаума. В целом, электронная микроскопия по сравнению со световой считается более надежным способом выявления апоптоза.

Для обнаружения деградации ДНК *in situ* применяют так называемый TUNEL-метод (terminal deoxynucleotide nick-end labeling), основанный на детекции 3'-концов ДНК, суть которого заключается в специфическом связывании с 3'-концом разорванной нити ДНК dUTP, меченого биотином. Также разрывы ДНК можно регистрировать на электрофореграммах.

С помощью иммуногистохимических исследований определяют наличие белков, формирующих каскад биохимических процессов, приводящих к апоптозу. Часто к этой группе методов относят и TUNEL.

В последние годы идентификацию апоптоза проводят, определяя активность каспаз, как инициаторных, так и эффекторных. В большинстве работ, проводимых с изучением активности каспаз, рассматривается каспаза 3, т.к. различные пути апоптотической гибели сходятся на ней, и ее активация указывает на наличие апоптоза. Однако, если в исследование вводится определение активности каспазы 8, то помимо выявления программированной клеточной гибели как таковой, можно определить и путь ее запуска, т.к. активация каспазы 8 указывает на рецепторный (внешний) механизм инициации процесса. Именно это является серьезным преимуществом данного метода.

В зависимости от типа клеток, их состояния и вида индуктора основные признаки апоптоза могут варьировать. При более строгом подходе необходимо учитывать, что критерием апоптоза может быть только комплекс признаков. Хотя наиболее распространенной техникой оценки апоптоза в срезах тканей является TUNEL, данный метод не является строго специфичным для апоптоза. Показано, что TUNEL-позитивное окрашивание ассоциировано не только с апоптотическими кардиомиоцитами, но и с некротическими кардиомиоцитами и даже кардиомиоцитами, подвергающимися репарации ДНК, что может привести к достаточно высокому уровню ложноположительных результатов.

Таким образом, при изучении апоптотической гибели клеток миокарда в первую очередь необходимо подобрать наиболее эффективную комбинацию методов, позволяющих достоверно выявлять апоптоз кардиомиоцитов и определять его интенсивность. Это должно быть сочетание как гистологических, в том числе и иммуногистохимических (например, TUNEL), так и биохимических (измерение активности каспаз или других белков, участвующих в апоптозе) методов.

Работа выполнена в рамках Федеральной целевой программы «Научные и научно-педагогические кадры инновационной России» на 2009-2013 гг.

ЛИТЕРАТУРА

1. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке». 2009. Т. 11. № 4.
2. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке». 2008. Т. 10. № 4.
3. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке». 2007. Т. 9. № 4.
4. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке». 2006. Т. 8. № 4.
5. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке». 2005. Т. 7. № 4.
6. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке». 2004. Т. 6. № 4.
7. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке». 2003. Т. 5. № 4.
8. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке». 2002. Т. 4. № 4.
9. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке». 2001. Т. 3. № 4.
10. Сборник научных тезисов и статей «Здоровье и образование в XXI веке». 1999. Т. 2. № 4.
11. Электронный сборник научных трудов «Здоровье и образование в XXI веке». 2009. Т. 11. № 12.
12. Электронный сборник научных трудов «Здоровье и образование в XXI веке». 2008. Т. 10. № 12.
13. Электронный сборник научных трудов «Здоровье и образование в XXI веке». 2007. Т. 9. № 12.
14. Электронный сборник научных трудов «Здоровье и образование в XXI веке». 2006. Т. 8. № 12.
15. Электронный сборник научных трудов «Здоровье и образование в XXI веке». 2005. Т. 7. № 12.
16. Электронный сборник научных трудов «Здоровье и образование в XXI веке». 2004. Т. 6. № 12.
17. Электронный сборник научных трудов «Здоровье и образование в XXI веке». 2003. Т. 5. № 12.
18. Электронный сборник научных трудов «Здоровье и образование в XXI веке». 2002. Т. 4. № 12.
19. Электронный сборник научных трудов «Здоровье и образование в XXI веке». 2001. Т. 3. № 1.