

## ВЫЖИВАНИЕ КАРДИОМИОЦИТОВ И РЕПАРАЦИЯ ДНК В МИОКАРДЕ МЫШЕЙ C57BL/6 И MDX ПОСЛЕ ДИНАМИЧЕСКОГО СТРЕССА

© *И. В. Веженкова, В. М. Михайлов*

*Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург;  
электронный адрес: vmikhailov@mail.cytspb.rssi.ru*

Кардиомиоциты мышей mdx являются перспективной моделью для изучения выживания терминально дифференцированных кардиомиоцитов и формирования кардиомиопатии в условиях окислительного стресса. Для регистрации динамики возникновения и исчезновения двухнитевых разрывов (ДР) ДНК в кардиомиоцитах мышей mdx после динамического стресса использовали антитела к фосфорилированной форме гистона H2Ax ( $\gamma$ -H2AX). При отсутствии стресса ДР ДНК в ядрах клеток миокарда обнаружены как у мышей C57Bl (0.05 %), так и у мышей mdx (6.7 %). Через 1 ч после стресса у мышей C57Bl доля меченых ядер кардиомиоцитов возрастала до 1 %, а у мышей mdx — до 41.7 %. Через 24 ч после стресса в миокарде мышей mdx оставались окрашенными 5.2 % ядер кардиомиоцитов, у мышей C57Bl меченые ядра кардиомиоцитов не определялись. Через 24 ч после стресса клеточная потеря кардиомиоцитов у мышей mdx варьировала от 2.39 до 2.50 %. У мышей c57Bl общий уровень клеточной потери не превышал порога в 0.38 %. Полученные данные позволяют предположить, что в процессе выживания кардиомиоцитов мышей mdx задействован механизм репарации ДНК.

**Ключевые слова:** выживание кардиомиоцитов, окислительный стресс, динамический стресс, репарация ДНК, мыши C57Bl и mdx.

Изучение механизмов дифференцировки клеток и регенерации тканей, в частности механизмов миогенеза и регенерации мышц, — одна из важнейших проблем клеточной биологии и биологии развития. Процесс дифференцировки мышечных клеток — это сложный и многоступенчатый процесс, который не сводится лишь к созданию сократительного аппарата.

После того как была доказана способность умеренно дифференцированных кардиомиоцитов предсердий крыс синтезировать ДНК и делиться митозом (Румянцев, 1967), возникли новые задачи. Необходимо было не только установить, сочетается ли в генезе кардиомиоцитов миокарда пролиферация клеток, уже содержащих миофибриллы, с размножением морфологически недифференцированных миобластов, но и охарактеризовать целый ряд ранее неизвестных особенностей репродукции кардиомиогенных, или стволовых, клеток миокарда. До сих пор не дано оценки вклада стволовых клеток, или клеток-предшественников кардиомиоцитов, в поддержание клеточного состава миокарда (Flugelman, Lewis, 2004). Однако независимо от результатов решения вопроса об отнесении кардиомиоцитов к популяции обновляющегося типа не вызывает сомнения, что основную массу клеток миокарда представляют терминально дифференцированные кардиомиоциты «с достаточно жесткой репрессией синтеза ДНК и митозов» (Румянцев, 1982).

Частой причиной сердечной недостаточности является поражение сердечной мышцы, характеризующееся первичным нарушением ее метаболизма и сократительной функции, — дилатационная кардиомиопатия (ДКМП), в развитии которой генетическим нарушениям

придают все большее значение (Моисеев, 2001). Удельный вес ДКМП среди других кардиомиоцитов составляет 60 %.

ДКМП в сочетании с мышечной дистрофией встречается нередко. Это прежде всего мышечная дистрофия Дюшенна, мышечная дистрофия Беккера и ряд близких им форм болезни (Mestroni et al., 1998; Towbin et al., 1999). Миодистрофия Дюшенна — сцепленная с X-хромосомой мышечная дистрофия. Пациенты, страдающие этой генетически обусловленной болезнью, чаще всего умирают в сравнительно молодом возрасте из-за паралича дыхательной или сердечной мускулатуры, который развивается из-за потери сократительных клеток. Гибель сократительных клеток происходит из-за окислительного стресса, который развивается при отсутствии дистрофии (Lefaucheur, Sebille, 1995; Bornman et al., 1998). К сожалению, на данный момент известны далеко не все биохимические механизмы, посредством которых потеря дистрофина вызывает мышечную дисфункцию (Bia, 1999). Миодистрофия мышей mdx является экспериментальной моделью миодистрофии Дюшенна у человека. Она развивается в результате мутации в гене дистрофина (Monako et al., 1986; Emery, 2002). Исходя из этого для анализа патологии кардиомиоцитов взрослых организмов представляется возможным использование клеток с заранее известными генетическими дефектами, в частности кардиомиоцитов мышей mdx, носителей мутации в гене дистрофина.

В предыдущих работах было установлено, что при обычном содержании в миокарде мышей mdx апоптогическая морфология кардиомиоцитов наблюдается крайне редко (Михайлов и др., 1998). В миокарде мышей mdx

присутствуют повреждения ДНК в виде фрагментов величиной 65 000 пар нуклеотидов и отсутствуют низкомолекулярные фрагменты ДНК, которые указывали бы на развитие в миокарде апоптотической гибели клеток. Низкомолекулярная фрагментация ДНК в миокарде мышей mdx и C57Bl была зарегистрирована только после динамического стресса (Казаков, Михайлов, 2001). Эти данные позволили предположить участие репарации ДНК в выживании кардиомиоцитов, в первую очередь кардиомиоцитов мышей mdx, как при обычном содержании животных, так и после динамического стресса (Михайлов и др., 2003). Использование антител к фосфорилированной форме гистона H2Ax — гистону  $\gamma$ -H2Ax — дало возможность судить об образовании двухнитевых разрывов ДНК. Также была описана динамика исчезновения меченных анти- $\gamma$ -H2Ax-антителами клеток из миокарда (Веженкова, Михайлов, 2005; Михайлов, Веженкова, 2007). Однако эти данные только косвенно указывают на участие репарации ДНК в выживании кардиомиоцитов мышей mdx. Сам факт изменения количества определяемых двухнитевых разрывов ДНК не позволяет судить о реальном вкладе репарации ДНК в выживание кардиомиоцитов. Отсутствие морфологических данных о гибели или выживании клеток миокарда и особенно кардиомиоцитов после динамического стресса не позволяет точно судить о связи выживания кардиомиоцитов и репарации ДНК. Имеющиеся данные об уменьшении в популяции доли кардиомиоцитов с апоптотическими ядрами через 1 сут после динамического стресса не дают ответа на поставленный вопрос как из-за незначительного размера изученной популяции, так и из-за невозможности объяснить исчезновение апоптотических ядер. После динамического стресса мы не наблюдали гибели мышей mdx (Михайлов и др., 2001). Данные об исчезновении из миокарда меченных [ $^3$ H]-тимидином клеток также не дают ответа на поставленный вопрос из-за отсутствия объяснения возникновения величины доли меченных [ $^3$ H]-тимидином клеток миокарда: 2—3 % после однократного введения предшественника (Веженкова, Михайлов, 2005; Михайлов, Веженкова, 2007).

Целью данной работы является морфометрический подсчет изменений абсолютного количества кардиомиоцитов мышей mdx и C57Bl/6 до и после стресса с целью вычисления клеточной потери кардиомиоцитов мышей mdx и C57Bl/6, вызываемой динамическим стрессом.

## Материал и методика

Объектами исследования был миокард левых желудочков сердец двух групп мышей — C57Bl/6 и mdx массой  $20.0 \pm 0.5$  г. Мыши C57Bl/6 были получены из питомника «Рапполово» РАН. Мыши mdx были представлены д-ром Партриджем (Hammersmith Hospital, London) и получены для содержания от проф. Баранова (НИИ акушерства и гинекологии им. Д. Отта РАМН, Санкт-Петербург).

Две подгруппы мышей — C57Bl st(+) и mdx st(+) — подвергали умеренному динамическому стрессу — плаванию в течение 5 мин в воде при 12 °С. Такая нагрузка не вызывала гибели животных. Мыши двух других подгрупп — C57Bl st(-) и mdx st(-) — не плавали и служили контролем.

Сердца для анализа брали у мышей под диэтиловым эфирным наркозом через 1 ч и через 1 сут после введения [ $^3$ H]-тимидина. Срезы толщиной 7 мкм получали на криостате Bright C<sup>0</sup> LTD (Великобритания) и фиксировали

смесью этанола и метанола (1 : 1) в течение 3 мин при -20 °С. Каждое сердце было визуально разделено на три зоны — верхушку, середину и основание. В пределах каждой зоны было сделано по 15 срезов. Таким образом, для оценки концентрации кардиомиоцитов каждого сердца предварительные подсчеты были выполнены на 45 срезах.

Подсчет клеток осуществляли во всех полях зрения среза, используя объектив 60 $\times$ . Для того чтобы подсчитать площадь каждого среза, была изготовлена печатная плата с нанесенным на нее квадратом с точно заданной площадью — 1 мм<sup>2</sup> (ООО «Резонит», Санкт-Петербург). После этого каждый срез был сфотографирован на одном уровне с печатной платой и с помощью программы ImageJ подсчитана площадь среза и выражена в пикселях в единице площади. Подсчитав таким образом пиксели на фотографии платы с 1 мм<sup>2</sup> и со всего среза, через обычную пропорцию получили площадь среза. Подобным способом обрабатывали фотографию каждого среза с печатной платой. Для вычисления объема среза площадь каждого среза умножали на 7 мкм. Через отношение количества клеток в каждом срезе к его объему получили концентрацию, т. е. количество кардиомиоцитов и немышечных клеток в 1 мм<sup>3</sup> для каждой зоны сердца и для каждой подгруппы мышей. Для вычисления клеточной потери концентрацию клеток через 1 ч после динамического стресса принимали за 100 %. Зная концентрацию клеток через 24 ч после стресса, вычисляли при помощи пропорции ее процентный эквивалент. Разница между концентрациями клеток через 1 и 24 ч после динамического стресса, выраженная в процентах, и есть клеточная потеря через 24 ч после динамического стресса.

При постановке непрямого иммуноморфологического метода использовали моноклональные антитела к  $\alpha$ -саркомерному актину в разведении 1 : 200 (Sigma, clone 5C5, США) для возможности визуального разделения кардиомиоцитов и немышечных клеток. Локализацию реакции антител выявляли с помощью мышиной пероксидазы—антипероксидазы (Pharmacia, Швеция) по описанной схеме (Полак, Ван Норден, 1987). Пероксидазную активность определяли с помощью диаминобензидина. Ядра клеток визуализировали при помощи красителя Гимза.

## Результаты и обсуждение

Для оценки тотального числа миоцитов и их ядер используют различные методы, такие как морфометрия (Hort, 1953; Black-Schaffer, Turner, 1958; Ерохина, 1968; Anversa et al., 1980), биохимическое определение количества ДНК в миокарде и последующий пересчет данных на число ядер исходя из диплоидного эквивалента —  $6 \cdot 10^{-12}$  г ДНК (Petersen, Baserga, 1965; Adler et al., 1972) — и подсчет числа клеток, высвобождаемых из миокарда с помощью протеолитических ферментов (De Naan et al., 1971) или 50 % КОН (Белов и др., 1977).

Нами был выбран морфометрический анализ, так как, по нашему мнению, он является более точным. Например, при обработке миокарда концентрированной щелочью возможно резкое занижение оценки количества мышечных ядер из-за разрушения значительной части миоцитов.

В ряде работ не уделено должного внимания разграничению мышечных и немышечных клеток: данные расчетов, по-видимому, относятся к их совокупности (De Naan et al., 1971). В данной работе было проведено

Т а б л и ц а 1

**Содержание кардиомиоцитов (КМЦ) и немышечных клеток (НМК) в различных зонах сердца мышей mdx st- (в отсутствие стресса)**

Зона сердца	Содержание всего, кл./мм <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s_x$	Содержание КМЦ, кл./мм <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s_x$	Содержание НМК, кл./мм <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s_x$
Верхушка	$(45.46 \pm 3.40) \cdot 10^3$	$(25.78 \pm 2.90) \cdot 10^3$	$(19.68 \pm 2.60) \cdot 10^3$
Середина	$(65.38 \pm 2.80) \cdot 10^3$	$(37.32 \pm 3.10) \cdot 10^3$	$(28.06 \pm 3.80) \cdot 10^3$
Основание	$(63.91 \pm 2.90) \cdot 10^3$	$(34.31 \pm 2.40) \cdot 10^3$	$(29.60 \pm 2.90) \cdot 10^3$

Т а б л и ц а 2

**Содержание КМЦ и НМК в различных зонах сердца мышей c57Bl-**

Зона сердца	Содержание всего, кл./мм <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s_x$	Содержание КМЦ, кл./мм <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s_x$	Содержание НМК, кл./мм <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s_x$
Верхушка	$(71.81 \pm 4.90) \cdot 10^3$	$(40.27 \pm 4.30) \cdot 10^3$	$(31.54 \pm 3.40) \cdot 10^3$
Середина	$(85.13 \pm 2.60) \cdot 10^3$	$(41.55 \pm 2.30) \cdot 10^3$	$(43.58 \pm 3.90) \cdot 10^3$
Основание	$(81.46 \pm 2.70) \cdot 10^3$	$(42.14 \pm 4.60) \cdot 10^3$	$(39.32 \pm 3.10) \cdot 10^3$

Т а б л и ц а 3

**Содержание КМЦ и НМК в различных зонах сердца мышей mdx st+ через 1 ч после стресса**

Зона сердца	Содержание всего, кл./мм <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s_x$	Содержание КМЦ, кл./мм <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s_x$	Содержание НМК, кл./мм <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s_x$
Верхушка	$(45.81 \pm 3.70) \cdot 10^3$	$(25.29 \pm 3.00) \cdot 10^3$	$(20.58 \pm 2.20) \cdot 10^3$
Середина	$(65.07 \pm 4.19) \cdot 10^3$	$(37.74 \pm 3.30) \cdot 10^3$	$(27.33 \pm 3.10) \cdot 10^3$
Основание	$(64.63 \pm 3.10) \cdot 10^3$	$(35.85 \pm 2.90) \cdot 10^3$	$(28.78 \pm 2.50) \cdot 10^3$

Т а б л и ц а 4

**Содержание КМЦ и НМК в различных зонах сердца мышей mdx st+ через 24 ч после стресса**

Зона сердца	Содержание всего, кл./мм <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s_x$	Содержание КМЦ, кл./мм <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s_x$	Содержание НМК, кл./мм <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s_x$
Верхушка	$(44.63 \pm 3.80) \cdot 10^3$	$(24.65 \pm 2.40) \cdot 10^3$	$(20.56 \pm 3.10) \cdot 10^3$
Середина	$(62.75 \pm 2.60) \cdot 10^3$	$(36.46 \pm 2.40) \cdot 10^3$	$(27.29 \pm 3.50) \cdot 10^3$
Основание	$(62.77 \pm 2.40) \cdot 10^3$	$(34.99 \pm 3.60) \cdot 10^3$	$(28.77 \pm 2.60) \cdot 10^3$

Т а б л и ц а 5

**Потеря КМЦ и НМК в различных зонах сердца мышей mdx st+ через 24 ч после стресса**

Зона сердца	Потеря всего, %, $\bar{x} \pm s_x$	Потеря КМЦ, %, $\bar{x} \pm s_x$	Потеря НМК, %, $\bar{x} \pm s_x$
Верхушка	$2.58 \pm 0.30$	$2.50 \pm 0.20$	$0.08 \pm <0.01$
Середина	$3.56 \pm 0.50$	$3.41 \pm 0.60$	$0.15 \pm <0.01$
Основание	$2.42 \pm 0.30$	$2.39 \pm 0.40$	$0.03 \pm <0.01$

Т а б л и ц а 6

## Содержание КМЦ и НМК в различных зонах сердца мышей c57Bl st+ через 1 ч после стресса

Зона сердца	Содержание всего, кл./мм <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s_x$	Содержание КМЦ, кл./мм <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s_x$	Содержание НМК, кл./мм <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s_x$
Верхушка	$(71.37 \pm 4.20) \cdot 10^3$	$(39.80 \pm 4.80) \cdot 10^3$	$(31.56 \pm 3.50) \cdot 10^3$
Середина	$(86.34 \pm 3.70) \cdot 10^3$	$(42.53 \pm 3.60) \cdot 10^3$	$(43.80 \pm 3.80) \cdot 10^3$
Основание	$(81.23 \pm 2.60) \cdot 10^3$	$(41.68 \pm 4.00) \cdot 10^3$	$(39.55 \pm 2.90) \cdot 10^3$

Т а б л и ц а 7

## Содержание КМЦ и НМК в различных зонах сердца мышей c57Bl st+ через 24 ч после стресса

Зона сердца	Содержание всего, кл./мм <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s_x$	Содержание КМЦ, кл./мм <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s_x$	Содержание НМК, кл./мм <sup>3</sup> , $\bar{x} \pm s_x$
Верхушка	$(71.13 \pm 4.20) \cdot 10^3$	$(39.67 \pm 4.80) \cdot 10^3$	$(31.46 \pm 3.50) \cdot 10^3$
Середина	$(86.01 \pm 3.70) \cdot 10^3$	$(42.25 \pm 3.60) \cdot 10^3$	$(43.76 \pm 3.80) \cdot 10^3$
Основание	$(80.93 \pm 2.60) \cdot 10^3$	$(41.49 \pm 4.00) \cdot 10^3$	$(39.44 \pm 2.90) \cdot 10^3$

Т а б л и ц а 8

## Клеточная потеря КМЦ и НМК в различных зонах сердца мышей c57Bl st+ через 24 ч после стресса

Зона сердца	Потеря всего, %, $\bar{x} \pm s_x$	Потеря КМЦ, %, $\bar{x} \pm s_x$	Потеря НМК, % $\bar{x} \pm s_x$
Верхушка	$0.33 \pm <0.01$	$0.32 \pm <0.01$	$0.01 \pm <0.01$
Середина	$0.38 \pm <0.01$	$0.26 \pm <0.01$	$0.12 \pm <0.01$
Основание	$0.36 \pm <0.01$	$0.31 \pm <0.01$	$0.05 \pm <0.01$

разграничение между кардиомиоцитами и немышечными клетками при помощи моноклональных антител к  $\alpha$ -саркомерному актину. Результаты морфометрического анализа представлены в табл. 1—8.

Изначально следует отметить значительную разницу плотности клеток миокарда у мышей C57Bl и мышей mdx. Как видно из данных табл. 1 и 2, содержание всех клеток миокарда и, в частности, кардиомиоцитов у мышей C57Bl выше на 20—40 %, причем различия в наибольшей степени выражены на верхушке сердца. Это явление наблюдается как у контрольных животных, так и через 1 ч после динамического стресса (табл. 3, 6), что указывает на постоянную медленную потерю кардиомиоцитов миокардом мышей mdx в течение предшествующей жизни. Данный вывод не противоречит ранее сделанному заключению о том, что кардиомиоциты мышей mdx постоянно находятся в первой, начальной, стадии апоптоза, избегая, однако, вступления в деструктивную стадию апоптоза (Казаков, Михайлов, 2001; Михайлов и др., 2001). Изменения концентрации кардиомиоцитов (КМЦ) и немышечных клеток (НМК) через 1 ч после динамического стресса по сравнению с контролем не наблюдается (табл. 1 и 3, 2 и 6).

Как видно из данных табл. 5, клеточная потеря кардиомиоцитов у мышей mdx через 24 ч после стресса варьирует в пределах от 2.39 до 2.50 %. Полученные результаты имеют высокую степень корреляции с полученными

нами ранее сведениями о включении [<sup>3</sup>H]-тимидина в ядра кардиомиоцитов. Как было уже отмечено выше, через 1 ч после динамического стресса  $2.9 \pm 0.5$  % ядер кардиомиоцитов мышей mdx включают [<sup>3</sup>H]-тимидин. Потеря НМК у мышей mdx через 24 ч после стресса незначительна.

Также ранее были получены данные о том, что ДНК мышей c57Bl тоже реагирует с низкомолекулярным распадом в ответ на динамический стресс (Казаков, Михайлов, 2001). При использовании морфометрического метода и световой микроскопии эти результаты подтвердить пока не удалось. Как видно из данных табл. 8, потеря и КМЦ, и НМК у мышей c57Bl через 24 ч после стресса незначительна. Общий уровень клеточной потери не превысил порога в 0.38 %.

В связи с полученными данными можно сделать следующие выводы: 1) у мышей mdx содержание клеток миокарда ниже, чем у мышей c57Bl; 2) низкий уровень клеточной потери мышей mdx через 24 ч после стресса (от 2.39 до 2.50 %) по сравнению с высоким уровнем экспрессии гистона H2AX в ядрах кардиомиоцитов мышей mdx через 1 ч после динамического стресса ( $41.7 \pm 11.4$  %) говорит о непосредственном участии репарации ДНК в выживании кардиомиоцитов mdx; можно допустить, что именно благодаря этому свойству миокарда мышей mdx они выживают в условиях отсутствия дистрофина; 3) наблюдается корреляция между уровнем клеточной потери



мышей mdx через 24 ч после стресса (от 2.39 до 2.50 %) с полученными нами ранее сведениями о включении [<sup>3</sup>H]-тимидина в ядра кардиомиоцитов (2.9 ± 0.5 %). Представляет большой интерес выяснение участия репарации ДНК в выживании кардиомиоцитов больных миодистрофией Дюшенна, так как считается, что у человека миодистрофия Дюшенна приводит к летальному исходу из-за остановки сердца примерно в 50 % случаев.

### Список литературы

Белов Л. Н., Леонтьева Т. А., Коган М. Е. 1977. Количественная характеристика размножения мышечных клеток в течение постнатального кардиомиогенеза у мышей. Онтогенез. 8 (5) : 442—450.

Веженкова И. В., Михайлов В. М. 2005. Репаративный синтез ДНК как один из механизмов выживания кардиомиоцитов мышей mdx при динамическом стрессе. Цитология. 47 (54) : 800.

Ерохина И. Л. 1968. Динамика пролиферации клеточных элементов дифференцирующегося миокарда мыши. Цитология. 10 (11) : 1391—1409.

Казаков В. И., Михайлов В. М. 2001. Фрагментация ДНК кардиомиоцитов мышей mdx и c57Bl после стресса. Цитология. 43 (1) : 72—75.

Михайлов В. М., Веженкова И. В. 2007. Репаративный синтез ДНК как один из возможных механизмов выживания кардиомиоцитов мышей mdx. Цитология. 49 (6) : 491—496.

Михайлов В. М., Казаков В. И., Комаров С. А., Нилова В. К., Штейн Г. И. 1998. Апоптоз и деградация ДНК кардиомиоцитов мышей mdx и C57Bl. Цитология. 40 (5) : 401—406.

Михайлов В. М., Комаров С. А., Казаков В. И., Веженкова И. В., Штейн Г. И., Жестяников В. Д., Савельева Г. Е. 2003. Выживание и апоптоз кардиомиоцитов мышей mdx. Цитология. 45 (9) : 902—903.

Михайлов В. М., Комаров С. А., Нилова В. К., Штейн Г. И., Баранов В. С. 2001. Ультраструктурный и морфометрический анализ стадий апоптоза кардиомиоцитов мышей mdx. Цитология. 43 (8) : 729—733.

Моисеев В. С. 2001. Болезни сердца. В кн.: Руководство для врачей. Универсум Паблишинг. 234—235.

Полак Д., Ван Норден С. 1987. Введение в иммуноцитохимию: современные методы и проблемы. М.: Мир. 78 с.

Румянцев П. П. 1967. Электронномикроскопический анализ процессов дифференцировки и пролиферации клеточных элементов развивающегося миокарда. Арх. анат. гистол. эмбриол. 52 (3) : 66—67.

Румянцев П. П. 1982. Кардиомиоциты в процессах репродукции, дифференцировки и регенерации. Л.: Наука. 288 с.

Adler A. J., Langan T. A., Fasman G. D. 1972. Complexes of deoxyribonucleic acid with lysine-rich (f1) histone phosphorylation at two separate sites: circular dichroism studies. Arch. Biochem. Biophys. 153 : 769—777.

Amalfitano A., Chamberlain J. S. 1996. The mdx-amplification-resistant mutation system assay, a simple and rapid polymerase chain reaction-based detection of the mdx allele. Muscle Nerve. 19 : 1549—1553.

Anversa P., Olivetti G., Loud A. V. 1980. Morphometric study of early postnatal development in the left and right ventricular myocardium of the rat. I. Hypertrophy, hyperplasia, and binucleation of myocytes. Circ. Res. 46 : 495—502.

Bia B. L., Cassidy P. J., Young M. E., Rafael J. A., Leighton B., Davies K. E., Radda G. K., Clarke K. 1999. Decreased myocardial nNOS, increased iNOS and abnormal ECGs in mouse models of Duchenne muscular dystrophy. J. Mol. Cell. Cardiol. 31 : 1857—1862.

Black-Schaffer B., Turner M. E. 1958. Hyperplastic infantile cardiomegaly; a form of idiopathic hypertrophy with or without endocardial fibroelastosis; and a comment on cardiac atrophy. Amer. J. Pathol. 34 : 745—765.

Bornman L., Rossouw H., Gericke G. S., Polla B. S. 1998. Effects of iron deprivation on the pathology and stress protein expression in murine X-linked muscular dystrophy. Biochem. Pharmacol. 56 : 751—757.

De Haan R. L., Duning J. O. 1971. Mitotic growth of the cardiac myocytes. Carnegie Inst. Yearb. 70 : 1384—1389.

Emery A. E. 2002. The muscular dystrophies. Lancet. 359 : 687—695.

Flugelman M. Y., Lewis B. S. 2004. The promise of myocardial repair — towards a better understanding. Eur. Heart J. 25 : 1483—1485.

Hort W. 1953. Quantitative histological studies on growing heart. Virchows Arch. 323 : 223—242.

Lefaucheur J. P., Sebillé A. 1995. Muscle regeneration following injury can be modified in vivo immune neutralization of basic fibroblast growth factor, transforming growth factor by beta 1 or insulin-like growth factor I. J. Neuroimmunol. 57 : 85—91.

Mestroni L., Rocco C., Vatta M., Miocic S., Giacca M. 1998. Advances in molecular genetics of dilated cardiomyopathy. Cardiology Clinics. 16 : 603—609.

Monaco A. P., Neve R. L., Colletti-Feener C., Bertelson C. J., Kurnit D. M., Kunkel L. M. 1986. Isolation of candidate cDNAs for portions of the Duchenne muscular dystrophy gene. Nature. 323 : 646—650.

Petersen R. O., Baserga R. 1965. Nucleic acid and protein synthesis in cardiac muscle of growing and adult mice. Exp. Cell Res. 40 : 340—352.

Towbin J., Bowle S. K., Ortiz-Lopez R., Wang Q. 1999. Genetic basis of dilated cardiomyopathy. Cardiomyopathies. 56—65.

Поступила 10 X 2007

### CARDIOMYOCYTE SURVIVAL AND DNA REPAIR IN MYOCARDIUM FROM C57BL/6 AND MDX MICE AFTER DYNAMICAL STRESS

I. V. Vezhenkova, V. M. Mikhailov

Institute of Cytology RAS, St. Petersburg; e-mail: vmikhailov@mail.cytspb.rssi.ru

Mdx mice cardiomyocytes are a perspective model to study survival of terminally differentiated cardiomyocytes and formation of cardiomyopathy under conditions of oxidative stress. It was previously observed that dynamical stress induced formation of low molecular DNA fragments. It is beyond question that DNA fragmentation develops because of formation of double strand DNA breaks (DNA DSB). To record appearance and disappearance of DNA DSB we used antibodies to phosphorylated histone H2Ax (histone  $\gamma$ -H2Ax.). The presence of DNA DSB was estimated in 0.05 % and 6.7 % of cardiomyocytes in the myocardium from C57Bl and mdx mice without stress, respectively. The part of cardiomyocytes with DNA DSB increased in an hour after stress up to 1.0 % and 41.7 % in C57Bl and mdx mice, respectively. In 24 h after stress, the myocardium from mdx mice

contained 5.2 % of  $\gamma$ -H2Ax-positive cardiomyocytes and no C57Bl myocardium was found with any amount of  $\gamma$ -H2Ax-positive cells. The results presented show induction of DNA damage by dynamical stress and restoration of normal DNA structure in the cells of both strains in 24 h after stress. There was no mdx mice death after used dynamical stress. To estimate the real contribution of DNA repair to the survival of cardiomyocytes we have counted the cardiomyocyte loss. Morphometric analysis demonstrated that cell concentration in myocardium from mdx mice under normal conditions was less than that one in myocardium of C57Bl/6. The cell loss varied between 20 % for the base and 40 % for the apex of mdx mice hearts. In 24 h after stress, the cell loss in the myocardium of mdx mice amounted to 2.5 %. The difference between the number of cells with damaged DNA structure and the index of the real cell loss allows concluding that DNA repair makes a real contribution to the survival of mdx mice cardiomyocytes after dynamical stress.

Key words: cardiomyocyte survival, oxidative stress, dynamical stress, DNA repair, C57Bl mice, mdx mice.

---