

---

---

## ОБЩАЯ ПАТОЛОГИЯ И ПАТОЛОГИЧЕСКАЯ ФИЗИОЛОГИЯ

---

---

### БЕЛОК ТЕПЛОВОГО ШОКА HSP60 В КАРДИОМИОЦИТАХ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА СЕРДЦА КРЫС ПРИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ И ЕЁ СОЧЕТАНИИ С ИНСУЛИНОЗАВИСИМЫМ САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ

М.Л.Благонравов<sup>1</sup>, А.П.Склифасовская<sup>1</sup>,  
А.Ю.Коршунова<sup>1</sup>, М.М.Азова<sup>2</sup>, А.О.Курлаева<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Кафедра общей патологии и патологической физиологии имени В.А.Фролова, <sup>2</sup>кафедра биологии и общей генетики Медицинского института ФГАОУ ВО РУДН, Москва, РФ

В кардиомиоцитах АТФ-зависимые высокомолекулярные HSP70 и HSP90 играют важную роль в защите миокарда от повреждённых белков, появляющихся, в частности, в результате усиления окислительного стресса. Молекулярный шаперон HSP60 имеет особое значение для кардиомиоцитов, так как отвечает за сборку протеинов митохондриального матрикса. Исследовали особенности экспрессии HSP60 в кардиомиоцитах левого желудочка сердца при артериальной гипертензии, инсулинозависимом сахарном диабете и их сочетании. Эксперимент проводили на крысах-самцах линии Wistar-Kyoto в возрасте 38 нед и линии SHR в возрасте 38 и 57 нед. Инсулинозависимый сахарный диабет моделировали путём однократного парентерального введения стрептозотоцина в дозе 65 мг/кг. Экспрессию HSP60 в кардиомиоцитах левого желудочка оценивали методом иммуногистохимического исследования. При артериальной гипертензии, сахарном диабете и их сочетании происходит достоверное уменьшение по сравнению с контролем содержания HSP60 в кардиомиоцитах левого желудочка. Данное наблюдение можно рассматривать как один из механизмов патогенеза повреждения миокарда, обусловленного артериальной гипертензией и сахарным диабетом.

**Ключевые слова:** белки теплового шока; HSP60; миокард; артериальная гипертензия; сахарный диабет

Белки теплового шока активно исследуются в связи с их способностью проявлять цитопротективные свойства на фоне различных типов клеточного стресса. Они участвуют во многих внутриклеточных процессах, таких как свёртывание белков, сборка мультимолекулярных комплексов, поддержание правильной формы ферментов. Их продукция усиливается в ответ на воздействие широкого спектра стрессорных

факторов, включая окислительный и термический стресс, ишемию, функциональную перегрузку [12].

Защитные свойства белков теплового шока в мышечных клетках, в том числе в кардиомиоцитах, играют особую роль в поддержании их функционального состояния. Сократительная активность миокарда требует постоянного контроля за качеством состава белков саркомера, включая их синтез, поддержание правильной структуры, рефолдинг, утилизацию в протеосомах или процессинг до молекулярных пептидов.

*Адрес для корреспонденции:* blagonravovm@mail.ru. Благонравов М.Л.

Патогенез повреждения миокарда различного генеза на клеточном и субклеточном уровнях опосредуется нарушениями состава и функциональных свойств белков кардиомиоцитов. В частности, имеют место усиление окислительного стресса, посттрансляционные модификации, снижение стабильности белков, способствующее их неправильному свёртыванию. Эти повреждённые белки проявляют токсические свойства в отношении кардиомиоцитов, что, в частности, происходит в процессе развития сердечной недостаточности. Молекулярные шапероны, такие как HSP70, HSP90 и ко-шапероны CHIP BAG-3, играют ключевую роль в защите миокарда от подобных процессов [11].

В ряде исследований показано, что белки теплового шока действуют как внутриклеточные шапероны, защищая генетический материал клетки, препятствуют инициации апоптоза по митохондриальному пути, а также некротической гибели клетки [13]. Был введён специальный термин «система наблюдения за стрессом» (SOS) для механизма восприятия внеклеточного пула белков теплового шока, который предположительно является формой клеточной коммуникации в стрессовых условиях [2]. Однако механизмы высвобождения белков теплового шока с различной молекулярной массой в условиях патологии, активирующие альтернативные пути коммуникации, изучены мало.

Индукция синтеза белков теплового шока, вызванная метаболическими нарушениями, активизирует антиоксидативные внутриклеточные процессы, снижая клеточный ацидоз, а также ингибирует генерацию воспалительных медиаторов [9]. Вместе с тем установлено, что ответ организма на тепловой стресс ослабляется у пациентов с сахарным диабетом 2-го типа. В частности, у пациентов с сахарным диабетом снижается экспрессия HSP70 [7]. В исследовании [14] отмечена повышенная продукция основных белков теплового шока, включая HSP60, HSP70, HSP72, как в жировой ткани, так и в клетках крови у тучных людей, не страдающих сахарным диабетом. Кроме того, установлено, что индукция HSP72 приводит к улучшению процессов накопления липидов в печени и жировой ткани, снижению воспалительных сигналов и повышению чувствительности к инсулину. При диабете инсулинорезистентность приводит к снижению содержания активных белков теплового шока в инсулинзависимых тканях, по-видимому, посредством гликирования HSP70, в результате чего нарушается рефолдинг внутриклеточных белков [6].

Белок теплового шока HSP60, являющийся молекулярным шапероном, необходим клетке для сборки протеинов, импортированных в митохондриальный матрикс [3]. Была создана индуцибельная кардиоспецифическая модель нокаута *Hsp60*. Делеция гена *Hsp60* в кардиомиоцитах взрослых мышей изменяет активность митохондриального комплекса, митохондриальный мембранный потенциал и продукцию АФК, что в итоге приводит к развитию дилатационной кардиомиопатии и сердечной недостаточности [4]. Существует предположение о том, что при сахарном диабете HSP60 поступает также во внеклеточное пространство, что вызывает активацию провоспалительных цитокинов и усугубление метаболических нарушений в ткани в целом [5].

Несмотря на наличие большого количества данных, посвящённых участию белков теплового шока в ответных реакциях клеток на воздействие патологических факторов при различных заболеваниях, нет однозначного представления об их роли в патогенезе повреждения миокарда, обусловленного хронической перегрузкой и метаболическими нарушениями.

Цель данного исследования — изучить особенности экспрессии белка теплового шока HSP60 в кардиомиоцитах левого желудочка сердца при артериальной гипертензии (АГ), инсулинозависимом сахарном диабете (СД) и при сочетании данных видов патологии.

## МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 25 крысах-самцах линий Wistar-Kyoto (WKY, нормотензивные) и SHR (спонтанно гипертензивные) массой 290-400 г. Все манипуляции с животными проводились в соответствии с приказом Минздрава СССР № 755 от 12.08.1977 г. и Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 18.03.1986 г.).

Крысы были разделены на 5 групп (по 5 особей в каждой). Первую группу (контроль) составили интактные крысы линии WKY в возрасте 38 нед, 2-ю — крысы линии SHR в возрасте 38 нед, 3-ю — крысы линии SHR в возрасте 57 нед, 4-ю — крысы линии WKY в возрасте 38 нед с инсулинозависимым СД, 5-ю — крысы линии SHR в возрасте 38 нед с инсулинозависимым СД.

Нормотензивные крысы линии WKY и крысы линии SHR с генетически обусловленной АГ получены из питомника лабораторных жи-

вотных «Пушино» (филиал Института биоорганической химии им. акад. М.М.Шемякина и Ю.А.Овчинникова РАН). У 5 крыс линии SHR из этой же партии в возрасте 38 нед измерялось АД методом телеметрического мониторинга с использованием оборудования DSI. У всех животных систолическое АД было выше 190 мм рт. ст., диастолическое — выше 140 мм рт. ст.

Инсулинозависимый СД у крыс 4-й и 5-й групп моделировали путём однократного интраперитонеального введения стрептозотоцина (Alfa Aesar) в дозе 65 мг/кг массы тела. Раствор стрептозотоцина для инъекций готовили на цитратном буфере при 4°C непосредственно перед введением. Через 3 сут измеряли уровень глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены, с использованием глюкометра AccuChek Active (Roche Diabetes Care GmbH). Для дальнейшего эксперимента отбирали животных с уровнем гликемии выше 16 ммоль/л. Длительность развития СД у животных составила 30 сут с момента верификации гипергликемии. Концентрация глюкозы в крови измерялась также на 30-е сутки эксперимента. Уровень гликемии у крыс WKY с СД на 3-и сутки составил  $17.92 \pm 0.8$  ммоль/л, на 30-е сутки —  $28.8 \pm 2.28$  ммоль/л; у крыс SHR с СД на 3-и сутки —  $19.44 \pm 1.9$  ммоль/л, на 30-е сутки —  $30.92 \pm 1.72$  ммоль/л. На 25-е сутки эксперимента у этих животных измеряли уровень глюкозы и кетоновых тел в моче. У всех крыс наблюдалась глюкозурия (концентрация глюкозы  $>112$  ммоль/л) и кетонурия (концентрация кетоновых тел от 0.5 до 4.0 ммоль/л).

Под общим обезболиванием проводили торакаотомию и экстирпацию сердца. Полученные образцы ткани миокарда левого желудочка (ЛЖ) фиксировали в течение 72 ч в 4% нейтральном параформальдегиде. Материал обрабатывали и заливали в парафин по общепринятой методике. Гистологические срезы толщиной 5 мкм готовили на микротоме Slidit 2003 и наносили на стёкла с поли-L-лизинным покрытием (для иммуногистохимического исследования) и на обычные предметные стёкла (для морфологического анализа). Срезы для иммуногистохимического исследования депарафинировали ксилолом и проводили по спиртам нисходящей концентрации. Для оценки экспрессии HSP60 в кардиомиоцитах ставили реакцию с первичными кроличьими поликлональными антителами Anti-HSP60 antibody produced in rabbit (Sigma-Aldrich). Результаты иммуногистохимической реакции визуализировали с использованием набора реагентов Rabbit specific HRP/DAB (ABC) Detection IHC

Kit (Abcam). Препараты докрашивали гематоксилином Майера. Реакция считалась положительной при появлении коричневого окрашивания цитоплазмы кардиомиоцитов. Проводили световую микроскопию в 30 полях зрения в каждом препарате миокарда при 400-кратном увеличении на микроскопе Nikon Eclipse E-400 с видеосистемой на основе камеры Watec 221S.

Количественный анализ позитивно окрашенных кардиомиоцитов проводили с помощью сетки Автандилова: определяли отношение количества равноудалённых точек, приходящихся на позитивно окрашенную цитоплазму кардиомиоцитов, к общему количеству точек, занимаемых цитоплазмой. Морфологический анализ гистологических срезов миокарда проводили при окрашивании гематоксилином и эозином. Методом световой микроскопии при увеличении 400 в 30 полях зрения оценивали содержание миофибрилл, ядер кардиомиоцитов, участков деструкции и инфильтрации, объём внеклеточного пространства.

Полученные результаты статистически обрабатывали в программе Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.). Для каждого показателя вычисляли среднее значение и ошибку среднего. Для определения достоверности различий полученных данных применяли *U* критерий Манна—Уитни (за достоверную принималась разность средних значений при  $p \leq 0.05$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

**Иммуногистохимическое исследование.** Во всех опытных группах содержание HSP60 в цитоплазме кардиомиоцитов ЛЖ достоверно уменьшалось по сравнению с контролем (рисунок). При более длительном течении АГ (крысы SHR в возрасте 57 нед) и при сочетании АГ и СД снижение экспрессии HSP60 было менее выражено, чем при АГ на более коротком сроке (крысы SHR в возрасте 38 нед) и при изолированном СД.

При качественном анализе срезов миокарда ЛЖ после проведения иммуногистохимической реакции на HSP60 наблюдалась следующая картина. В контрольной группе отмечалось положительное окрашивание цитоплазмы значительного количества кардиомиоцитов. Высокая плотность окрашивания определялась преимущественно в толще миокарда, а по направлению к эпикарду и эндокарду, а также в областях миокарда, окружающих кровеносные сосуды, отмечалось некоторое уменьшение количества клеток с позитивной реакцией на HSP60 с тен-

денций к снижению интенсивности окраски. В кардиомиоцитах, визуализируемых в продольном сечении, положительное окрашивание цитоплазмы наблюдалось на значительном протяжении.

В группе крыс с АГ в возрасте 38 нед значительно снижалась по сравнению с контрольной группой численная плотность положительно окрашенных кардиомиоцитов. Был характерен мозаичный тип распределения окрашивания отдельных клеток. Относительно более высокая плотность окрашивания наблюдалась в среднем слое миокарда. По направлению к эпикарду и эндокарду количество кардиомиоцитов с положительной окраской заметно уменьшалось. Вокруг сосудов выявлялись только локальные участки с положительно окрашенной цитоплазмой кардиомиоцитов низкой интенсивности.

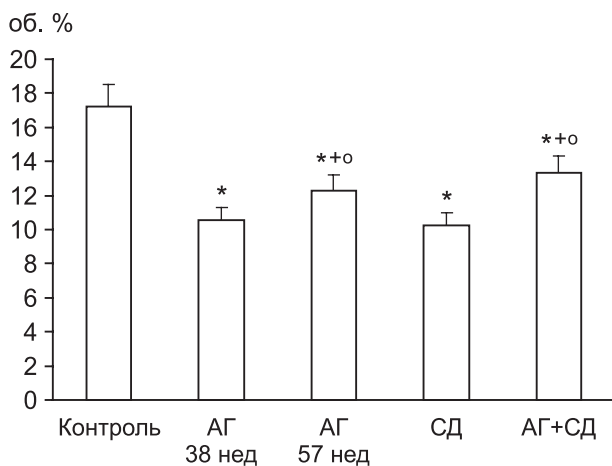
В группе крыс с АГ в возрасте 57 нед также снижалась по сравнению с контрольной группой численная плотность кардиомиоцитов с позитивной реакцией на HSP60. Наблюдалось окрашивание преимущественно цитоплазмы отдельных кардиомиоцитов, однако, в отличие от 38-недельных крыс с АГ, в миокарде чаще встречались кардиомиоциты с положительной иммуногистохимической реакцией. Положительно окрашенные кардиомиоциты в основном выявлялись в среднем слое миокарда, а также в слое, прилегающем к эндокарду. Ближе к эпикарду локальное окрашивание было сосредоточено вокруг сосудов. Усиление интенсивности

окрашивания цитоплазмы кардиомиоцитов отмечалось в области ЛЖ, граничащей с межжелудочковой перегородкой.

При изолированном СД уменьшалось количество положительно окрашенных кардиомиоцитов по сравнению с контролем. При этом отмечалась тенденция к повышению численной плотности клеток с позитивной иммуногистохимической реакцией по мере приближения к межжелудочковой перегородке. С другой стороны, существенной разницы по количеству и характеру распределения окрашенных клеток между слоями миокарда ЛЖ не наблюдалось.

Для 38-недельных крыс с АГ в сочетании с СД было характерно, как и для животных других опытных групп, снижение численности кардиомиоцитов с позитивной реакцией на HSP60. При этом окраска была более интенсивной, чем у крыс с АГ в возрасте 57 нед и у крыс с изолированным СД. Также наблюдалась тенденция к более диффузному распределению окрашивания по сравнению с другими группами. Большее количество клеток с позитивной реакцией встречалось в области миокарда, прилегающей к эндокарду. Ближе к эпикарду, напротив, выявлялись единичные участки положительного окрашивания, в основном только вокруг микрососудов. Также отмечалось усиление окрашивания в области ЛЖ, граничащей с межжелудочковой перегородкой.

**Морфологическое исследование.** В контрольной группе мышечные волокна чётко контурировались, располагались в основном плотно и параллельно друг другу. Тканевые, клеточные и внутриклеточные структуры просматривались отчётливо. Коллаген был в малом количестве, располагался между миофибриллами в виде тонких прослоек, а также вокруг микрососудов. Участки деструкции встречались крайне редко и имели небольшую площадь. В группе крыс с АГ в возрасте 38 нед наблюдалась гипертрофия миофибрилл, встречались локальные участки нарушения их пространственной ориентации. Количество межклеточного пространства и стромальных элементов не изменялось по сравнению с контролем. Отмечалась тенденция к увеличению количества сосудов микроциркуляторного русла. В группе крыс с АГ в возрасте 57 нед наблюдалась значительная гипертрофия миофибрилл, существенно увеличивалось количество участков нарушения их пространственной ориентации. Количество стромальных элементов незначительно увеличивалось по сравнению с контролем, площадь межклеточного пространства не изменялась.



Содержание белка теплового шока HSP60 в кардиомиоцитах ЛЖ при АГ (крысы линии SHR в возрасте 38 и 57 нед), инсулинозависимом СД (крысы линии WKY в возрасте 38 нед) и при сочетании АГ и СД (крысы линии SHR в возрасте 38 нед).

$p \leq 0.05$  по сравнению \*с контролем, \*с АГ 38 нед, °с СД.



Сохранялась тенденция к увеличению количества микрососудов. При изолированном СД мышечные волокна лежали в основном параллельно друг другу, значительно увеличивалось количество коллагена между миофибриллами, а также вокруг сосудов. Отмечалась гипотрофия миофибрилл, а также утолщение стенки микрососудов. В группе 38-недельных крыс с АГ в сочетании с СД миофибриллы были гипертрофированы, встречались участки нарушения их пространственной ориентации, а также поперечные разрывы миофибрилл. Ядер кардиомиоцитов становилось меньше. Количество стромальных элементов значительно увеличивалось по сравнению с контролем, площадь межклеточного пространства значительно уменьшалась. Наблюдалось также увеличение по сравнению с контролем количества сосудов микроциркуляторного русла, стенка которых утолщена.

Результаты проведенного исследования свидетельствуют о снижении по сравнению с контролем интенсивности экспрессии HSP60 в кардиомиоцитах ЛЖ как при гемодинамической перегрузке ЛЖ, обусловленной АГ, так и при метаболических нарушениях в миокарде, связанных с СД. Более того, сочетание АГ и СД не сопровождается развитием синергетического отрицательного эффекта в отношении данного процесса. Напротив, отмечается даже несколько менее выраженное угнетение продукции HSP60. Подавление синтеза HSP60, вероятнее всего, связано с энергодиффицитом, развивающимся на фоне перегрузки ЛЖ или инсулинозависимого СД. Было показано, что экспрессия АТФ-зависимых высокомолекулярных HSP70 и HSP90 значительно снижается под влиянием гипоксии в тканях головного мозга, миокарда, печени и скелетной мускулатуры [8].

Белок теплового шока HSP60 имеет для клеток, обладающих сократительной активностью, особое значение — он отвечает за сборку белков митохондриального матрикса. Снижение продукции HSP60 способно привести к ухудшению функционального состояния митохондрий. Установлено, в частности, что дефицит HSP60 в клетках сопровождается усилением продукции АФК и, как следствие, развитием митохондриальной дисфункции [1]. Поддержание HSP60 на физиологическом уровне в клетках скелетной мускулатуры, согласно данным [10], предупреждает усиление окислительного стресса, обусловленного ингибированием СОД при инсулинозависимом СД.

Таким образом, уменьшение продукции HSP60 можно рассматривать в качестве одного из механизмов патогенеза альтерации миокарда ЛЖ, обусловленного артериальной гипертензией и (или) сахарным диабетом.

## ЛИТЕРАТУРА

1. Cömert C., Fernandez-Guerra P., Bross P. A cell model for HSP60 deficiencies: modeling different levels of chaperonopathies leading to oxidative stress and mitochondrial dysfunction // *Methods Mol. Biol.* 2019. Vol. 1873. P. 225-239.
2. De Maio A. Extracellular heat shock proteins, cellular export vesicles, and the Stress Observation System: a form of communication during injury, infection, and cell damage. It is never known how far a controversial finding will go! Dedicated to Ferruccio Ritossa // *Cell Stress Chaperones*. 2011. Vol. 16, N 3. P. 235-249.
3. Deocaris C.C., Kaul S.C., Wadhwa R. On the brotherhood of the mitochondrial chaperones mortalin and heat shock protein 60 // *Cell Stress Chaperones*. 2006. Vol. 11, N 2. P. 116-128.
4. Fan F., Duan Y., Yang F., Trexler C., Wang H., Huang L., Li Y., Tang H., Wang G., Fang X., Liu J., Jia N., Chen J., Ouyang K. Deletion of heat shock protein 60 in adult mouse cardiomyocytes perturbs mitochondrial protein homeostasis and causes heart failure // *Cell Death Differ.* 2020. Vol. 27, N 2. P. 587-600.
5. Juwono J., Martinus R.D. Does Hsp60 provide a link between mitochondrial stress and inflammation in diabetes mellitus? // *J. Diabetes Res.* 2016. Vol. 2016. ID 8017571. doi: 10.1155/2016/8017571
6. Krause M., Heck T.G., Bittencourt A., Scorzaron S.P., Newsholme P., Curi R., Homem de Bittencourt P.I.Jr. The chaperone balance hypothesis: the importance of the extracellular to intracellular HSP70 ratio to inflammation-driven type 2 diabetes, the effect of exercise, and the implications for clinical management // *Mediators Inflamm.* 2015. Vol. 2015. ID 2049205. doi: 10.1155/2015/2049205
7. Nakhjavani M., Morteza A., Khajeali L., Esteghamati A., Khalilzadeh O., Asgarani F., Outeiro T.F. Increased serum HSP70 levels are associated with the duration of diabetes // *Cell Stress Chaperones*. 2010. Vol. 15, N 6. P. 959-964.
8. Nguyen V.C., Deck C.A., Pamerter M.E. Naked moirats reduce the expression of ATP-dependent but not ATP-independent heat shock proteins in acute hypoxia // *J. Exp. Biol.* 2019. Vol. 222, Pt 22. ID jeb211243. doi: 10.1242/jeb.211243
9. Noble E.G., Shen G.X. Impact of exercise and metabolic disorders on heat shock proteins and vascular inflammation // *Autoimmune Dis.* 2012. Vol. 2012. ID 836519. doi:10.1155/2012/836519

10. *Nonaka K., Une S., Komatsu M., Yamaji R., Akiyama J.* Heat stress prevents the decrease in succinate dehydrogenase activity in the extensor digitorum longus of streptozotocin-induced diabetic rats // *Physiol. Res.* 2018. Vol. 67, N 1. P. 117-126.
11. *Ranek M.J., Stachowski M.J., Kirk J.A., Willis M.S.* The role of heat shock proteins and co-chaperones in heart failure // *Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci.* 2018. Vol. 373. ID 20160530. doi: 10.1098/rstb.2016.0530
12. *Rodríguez-Iturbe B., Johnson R.J.* Heat shock proteins and cardiovascular disease // *Physiol. Int.* 2018. Vol. 105, N 1. P. 19-37.
13. *Takayama S., Reed J.C., Homma S.* Heat-shock proteins as regulators of apoptosis // *Oncogene.* 2003. Vol. 22, N 56. P. 9041-9047.
14. *Tiss A., Khadir A., Abubaker J., Abu-Farha M., Al-Khairi I., Cherian P., John J., Kavalakatt S., Warsame S., Al-Ghimlas F., Elkum N., Behbehani K., Dermime S., Dehbi M.* Immunohistochemical profiling of the heat shock response in obese non-diabetic subjects revealed impaired expression of heat shock proteins in the adipose tissue // *Lipids Health Dis.* 2014. Vol. 13. ID 106. doi: 10.1186/1476-511X-13-106

Получено 14.05.20

