BECLIN-1-ЗАВИСИМАЯ АУТОФАГИЯ КАРДИОМИОЦИТОВ ЛЕВОГО ЖЕЛУДОЧКА СЕРДЦА ПРИ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1-ГО ТИПА У КРЫС ГЕНЕТИЧЕСКИХ ЛИНИЙ WISTAR-KYOTO И SHR

М.Л.Благонравов, А.П.Склифасовская, Е.А.Демуров, А.А.Каримов

Кафедра общей патологии и патологической физиологии имени В.А.Фролова Медицинского института ФГАОУ ВО РУДН, Москва, РФ

Аутофагия рассматривается как один из механизмов прогрессирования сердечной недостаточности, однако в определённых условиях она может выступать и в качестве адаптационного механизма. Beclin-1 играет ключевую роль в процессе аутофагии. Исследовали особенности экспрессии Beclin-1 в кардиомиоцитах левого желудочка сердца при артериальной гипертензии, сахарном диабете 1-го типа и их сочетании. Эксперименты проводили на крысах-самцах линии Wistar-Kyoto в возрасте 38 нед и линии SHR в возрасте 38 и 57 нед. Сахарный диабет 1-го типа моделировали путём однократного парентерального введения стрептозотоцина. Экспрессия Beclin-1 в кардиомиоцитах левого желудочка сердца крыс оценивали иммуногистохимическим методом. При артериальной гипертензии отмечалось снижение интенсивности Beclin-1-зависимой аутофагии кардиомиоцитов, тогда как для сочетанной патологии был характерен противоположный эффект, проявляющийся в достоверном увеличении экспрессии белка Beclin-1.

Ключевые слова: *аутофагия; Beclin-1; миокард; артериальная гипертензия; сахарный диабет*

К одним из основных механизмов системы контроля качества белка (PQC — Protein Quality Control) относится аутофагия — катаболический процесс, обеспечивающий разрушение долгоживущих цитозольных белков и органелл. В нормальных условиях, когда запас питательных веществ в клетке достаточен, уровень аутофагии, как правило, невысок. В этом случае аутофагический поток необходим для поддержания жизнедеятельности клеток. Однако в условиях выраженного повреждения тканей, а также при возникновении глубокого энергодефицита, сопровождающегося развитием стойких метаболических изменений по причине интенсификации оксидативного стресса, аутофагия может выступать в качестве одного из механизмов программируемой клеточной гибели [5].

Усиление аутофагии наблюдается при клеточном стрессе, связанном чаще всего с дефицитом питательных веществ. При патологии сердечно-сосудистой системы стресс может быть также обусловлен перегрузкой сердца при увеличении сопротивления сердечному выбросу на фоне артериальной гипертензии или стеноза аорты. При этом повышение интенсивности аутофагии кардиомиоцитов происходит параллельно с развитием их гипертрофии [3]. Ишемия миокарда сопровождается преходящим увеличением аутофагического потока, который, однако, со временем начинает уменьшаться, опускаясь ниже нормального стационарного уровня [11]. На модели острой очаговой ишемии левого желудочка (ЛЖ) показано, что в 1-е сутки содержание Beclin-1 в цитоплазме кардио-

Адрес для корреспонденции: blagonravovm@mail.ru. Благонравов М.Л.
doi: 10.47056/0365-9615-2021-171-1-32-37

миоцитов достоверно увеличивается, а на 3-и и 5-е сутки постепенно снижается, оставаясь выше контрольного уровня [1]. Во время ишемии интенсификация аутофагии кардиомиоцитов направлена на пополнение метаболических субстратов и удаление повреждённых органелл [13]. Истощение питательных веществ активирует АМФ-активированную протеинкиназу (AMPK), которая, в свою очередь, ингибирует mTOR, устраняя основной тормозной фактор данного процесса [7]. В этом контексте аутофагия рассматривается как адаптивный ответ на ишемическое повреждение с кардиопротективным эффектом.

В условиях реперфузии, когда содержание кислорода и питательных веществ восстанавливается, в метаболизме клетки доминирует процесс накопления АФК. При этом конечные эффекты изменённого аутофагического потока могут оказать как положительное, так и отрицательное влияние на ткань. Так, активация Beclin-1 необходима для инициации аутофагии в ранней фазе ишемии, однако его стойкая активация во время реперфузии может привести к чрезмерной катаболической активации и гибели клеток [11].

В последние годы появились данные о роли аутофагии кардиомиоцитов в развитии сердечной недостаточности, вызванной гипертрофией миокарда. На модели гемодинамической перегрузки ЛЖ, обусловленной сужением аорты, было показано, что увеличение аутофагического потока коррелирует со степенью гипертрофии ЛЖ [15]. Снижение интенсивности аутофагии репрессирующей микроРНК-30а ускоряет прогрессирование сердечной гипертрофии [12], а фармакологическое ингибирование аутофагии 3-метиладенином (3-мА) уменьшает фиброз в той же модели [10]. Однако другие данные [15] свидетельствуют о том, что низкоуровневый аутофагический поток необходим для адаптивного ответа при гипертрофии сердечной мышцы.

У пациентов в терминальной стадии дилатационной кардиомиопатии обнаружены ультраструктурные изменения, которые включают накопление аутофагических вакуолей и повреждённых органелл, каждая из которых связана с морфологическими признаками гибели кардиомиоцитов. При этом в образцах миокарда пациентов с дилатационной кардиомиопатией, у которых проводилась механическая разгрузка с помощью желудочкового вспомогательного устройства (LVAD — Left Ventricular Assist Device), отмечается снижение экспрессии аутофагических маркеров [4]. В совокупности эти наблюдения согласуются с моделью, в которой аутофагия является дезадаптивной реакцией на перегрузку давлением [15].

В целом аутофагия рассматривается как один из важных факторов прогрессирования сердечной недостаточности, который, однако, в определённых условиях может выступать и в качестве защитно-приспособительного механизма в ослабленном сердце. Несмотря на наличие значительного количества данных об адаптивном и дезадаптивных эффектах аутофагии при различных видах сердечно-сосудистой патологии, не существует единого мнения о её роли в патогенезе повреждения миокарда.

Цель данного исследования — сравнение особенностей экспрессии Beclin-1 (фактора, играющего основную роль в процессе аутофагии) в кардиомиоцитах ЛЖ сердца при инсулинозависимом сахарном диабете (СД) у нормотензивных инбредных крыс линии Wistar-Kyoto, первичной артериальной гипертензии (АГ) и её сочетании с инсулинозависимым СД у спонтанно-гипертензивных инбредных крыс линии SHR.

МЕТОДИКА ИССЛЕДОВАНИЯ

Работа выполнена на 25 самцах крыс линий SHR и Wistar-Kyoto массой 290-400 г. Содержание животных и работу с ними осуществляли в соответствии с Европейской конвенцией о защите позвоночных животных, используемых для экспериментов или в иных научных целях (Страсбург, 1986 г.). Животные были разделены на 5 групп (по 5 особей в каждой): 1-я (контроль) — интактные нормотензивные крысы линии Wistar-Kyoto, достигшие возраста 38 нед; 2-я — гипертензивные крысы линии SHR в возрасте 38 нед; 3-я —крысы линии SHR в возрасте 57 нед; 4-я — крысы линии Wistar-Kyoto в возрасте 38 нед, имеющие инсулинозависимый СД длительностью 30 сут; 5-я — гипертензивные крысы линии SHR в возрасте 38 нед, имеющие инсулинозависимый СД длительностью 30 сут.

Инсулинозависимый СД у крыс 4-5-й группы моделировали путём однократного интраперитонеального введения стрептозотоцина (Alfa Aesar) в дозе 65 мг/кг массы. Раствор стрептозотоцина для инъекций готовили на цитратном буфере при 4ºС непосредственно перед введением. Уровень глюкозы в крови, взятой из хвостовой вены, измеряли через 3 сут с использованием глюкометра AccuChek Active (Roche Diabetes Care GmbH). Для дальнейшего исследования отбирали животных с уровнем глике-

мии выше 16 ммоль/л. Длительность развития СД от момента верификации гипергликемии у животных обеих групп составила 30 сут.

У животных всех групп в сроки, соответствующие возрасту, под общим обезболиванием проводили торакотомию и экстирпацию сердца. Полученные образцы ткани миокарда ЛЖ фиксировали в 4% растворе нейтрального параформальдегида в течение 72 ч. Полученный материал ткани миокарда обрабатывали по общепринятой методике и заливали в парафин. Для иммуногистохимического исследования на микротоме Slidt 2003 готовили гистологические срезы толщиной 5 мкм и наносили на стёкла с поли-L-лизиновым покрытием. Полученные срезы ткани миокарда депарафинировали ксилолом и проводили по спиртам нисходящей концентрации.

Для оценки экспрессии Beclin-1 в кардиомиоцитах проводили реакцию с первичными кроличьими поликлональными антителами Anti-Beclin-1 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. Появление коричневого окрашивания цитоплазмы кардиомиоцитов расценивали как положительную реакцию. Затем 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. С использованием сетки Автандилова проводили количественный анализ позитивно окрашенных кардиомиоцитов: определяли отношение количества равноудалённых точек, приходящихся на позитивно окрашенную цитоплазму клеток, к общему количеству точек, занимаемых цитоплазмой.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием программы Statistica 6.0 (StatSoft, Inc.). Для каждого показателя вычисляли среднее значение и ошибку среднего. Для определения достоверности отличий полученных данных применяли *U* критерий Манна—Уитни (за достоверную принималась разность средних значений при $p \leq 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В группе изолированного СД, а также при сочетании АГ и СД отмечалось достоверное по сравнению с контролем увеличение экспрессии Beclin-1 в цитоплазме кардиомиоцитов ЛЖ сердца. У крыс с АГ (линия SHR) в возрасте 38 и 57 нед, напротив, наблюдалось статистически значимое прогрессирующее снижение содержания Beclin-1 в миокарде ЛЖ относительно контроля (рис. 1).

При качественном анализе срезов миокарда ЛЖ после проведения иммуногистохимической реакции на Beclin-1 в контрольной группе отмечалось положительное локальное окрашивание цитоплазмы кардиомиоцитов по ходу миофибрилл, периодически окрашивание встречалось в виде вкраплений, распространённых диффузно (рис. 2, *а*). Плотность окрашивания была преимущественно одинаковой как в толще миокарда, так и по направлению к эпикарду и эндокарду. В областях миокарда, окружающих кровеносные сосуды, позитивное окрашивание не наблюдалось.

У крыс с АГ в возрасте 38 нед плотность появления положительно окрашенных кардиомиоцитов снижалась по сравнению с контролем. Был характерен локальный тип распределения окрашивания отдельных клеток низкой интенсивности. По направлению к эпикарду отмечалось незначительное уменьшение количества отдельно окрашенных клеток, а по направлению к эндокарду интенсивность и плотность окрашивания как отдельных кардиомиоцитов, так и группы клеток увеличивалась по сравнению с толщей миокарда.

У крыс с АГ в возрасте 57 нед наблюдалось снижение интенсивности окрашивания кардиомиоцитов (рис. 2, *б*). В толще миокарда окрашивание было диффузным, низкой интенсивности, но на значительном протяжении. Встречались отдельные интенсивно окрашенные клетки.

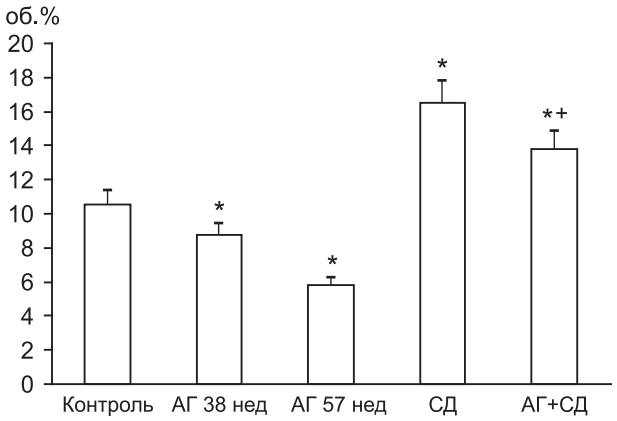

Рис. 1. Содержание Beclin-1 в кардиомиоцитах ЛЖ при АГ (крысы SHR, 38 и 57 нед), инсулинозависимом СД (крысы Wistar-Kyoto, 38 нед) и при сочетании АГ и СД (крысы SHR, 38 нед).
$p \leq 0.05$ по сравнению *с контролем, +с группой СД.

По направлению к эпикарду плотность окрашивания снижалась, но увеличивалась его интенсивность. Наблюдались редкие интенсивно окрашенные кардиомиоциты. По направлению к эндокарду интенсивность окрашивания клеток усиливалась.

При изолированном СД отмечалось увеличение количества положительно окрашенных кардиомиоцитов по сравнению с контролем. При этом было характерно окрашивание высокой интенсивности, сплошное на значительном протяжении в толще миокарда, также встречались отдельные интенсивно окрашенные клетки (рис. 2, *в*). По направлению к эндокарду интенсивность сплошного окрашивания усиливалась, по направлению к эпикарду снижалась и плотность, и интенсивность окрашивания вплоть до полного исчезновения.

У крыс с АГ в сочетании с СД интенсивность окрашивания цитоплазмы кардиомиоцитов усиливалась по сравнению с контролем (рис. 2, *г*). В толще миокарда наблюдалось интенсивное окрашивание отдельных волокон клеток, причём плотность окрашивания по направлению к эндокарду и эпикарду изменялась. Так, по направлению к эпикарду окрашивание было плотным, точечным, с высокой интенсивностью, а по направлению к эндокарду — менее интенсивным, но сплошным, однако встречались участки и с высокоинтенсивным окрашиванием.

В результате проведённого эксперимента было выявлено значимое снижение уровня экспрессии Beclin-1 в кардиомиоцитах ЛЖ крыс при АГ разной длительности, причём на сроке 57 нед уровень Beclin-1 снижался в 2 раза по сравнению с контролем. Однако при СД он увеличивался в 1.5 раза по сравнению с контролем. При сочетании АГ (38 нед) и СД также происходило увеличение экспрессии Beclin-1 по сравнению с контролем.

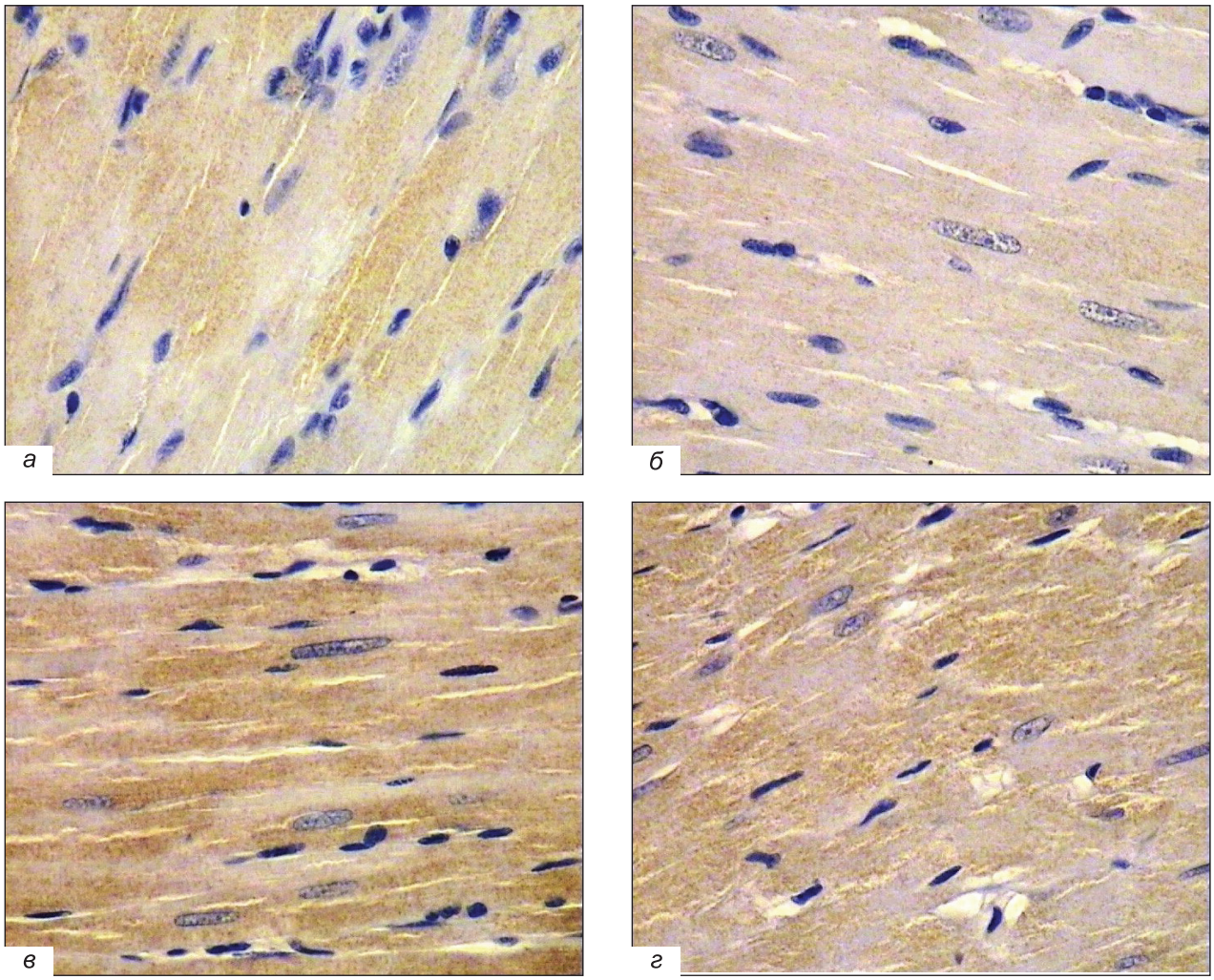

Рис. 2. Экспрессия Beclin-1 в кардиомиоцитах. Миокард ЛЖ крыс. Иммуногистохимическое окрашивание, ×400. *а* — контроль; *б* — АГ, 57 нед; *в* — СД; *г* — АГ (38 нед)+СД.

Усиление синтеза Beclin-1 при СД может быть обусловлено тем, что Beclin-1-зависимая аутофагия является одним из механизмов, опосредующих связь между продукцией АФК и увеличением взаимодействий полиморфноядерных циркулирующих лейкоцитов с эндотелием при данной патологии. Инициация воспалительных механизмов, характерных для диабета и гипергликемии, способствует выработке хемокинов и АФК, что изменяет функции эндотелия и полиморфноядерных циркулирующих лейкоцитов, увеличивая их взаимодействие. При этом уровень Beclin-1 дифференциально коррелирует с параметрами взаимодействия полиморфноядерных циркулирующих лейкоцитов с эндотелием [2].

С другой стороны, при выраженном энергодефиците, возникающем при прогрессировании инсулинорезистентности, изменяется клеточный метаболизм, возникает потребность в мобилизации внутриклеточных ресурсов за счёт деградации клеточных органелл и повторного использования белков клетки для процессов синтеза. При этом в условиях стресса изменяется гомеостаз эндоплазматического ретикулума, происходит его "заболачивание" за счёт в том числе накопления неправильно свёрнутых белков. В этих условиях происходит активация аутофагического потока, направленная на сохранение клетки и предотвращение активации программируемой клеточной гибели. Так, в исследовании [14] мыши с нокаутом гена *STR4* (серин/треониновая киназа 4) демонстрируют увеличение аутофагического потока за счёт экспрессии белка аутофагии LC3-II (ассоциированный с микротрубочками белок 1A/1B лёгкой цепи 3, конъюгат LC3-I и фосфатидилэтаноламина), у них также подавляется активация апоптотической программы через Bax по митохондриальному пути за счёт разрушения комплекса Beclin1—Bcl-2 и усиления взаимодействия между Bcl-2 и Bax.

Снижение синтеза Beclin-1 при АГ, вероятнее всего, связано с тем, что в условиях перегрузки давлением происходит подавление активности ряда генов митохондриальной аутофагии, в частности гена *Drp1* (Dynamin-1-like protein). В исследовании [9] было установлено, что в условиях поперечного сужения аорты через 5 сут происходит снижение аутофагического потока ниже физиологического уровня в ответ на перегрузку давлением из-за увеличения фракции выброса. Введение экзогенного Beclin-1 проводило к увеличению аутофагического потока, ослаблению митохондриальной дисфункции и замедлению прогрессирования сердечной недостаточности [9]. Таким образом, снижение регуляции митохондриальной аутофагии играет важную роль в опосредовании развития митохондриальной дисфункции при перегрузке давлением, тогда как восстановление митохондриальной аутофагии путём активации продукции Beclin-1 ослабляет прогрессирование сердечной недостаточности при повышенном АД.

При сочетании гемодинамической перегрузки и СД в кардиомиоцитах уровень Beclin-1 был статистически значимо выше, чем в контроле. При этом он был ниже, чем при изолированном СД. Это обусловлено наложением двух противоположных эффектов, однако, по-видимому, преобладает усиление аутофагического потока, обусловленное СД. Данный процесс может быть связан как с активацией провоспалительных механизмов в условиях гипергликемии, так и с угнетением аутофагии при перегрузке давлением в силу активации различных механизмов [6]. В обоих случаях снижение интенсивности аутофагии при перегрузке и повышение уровня базальной аутофагии при СД играет скорее дезадаптивную роль в процессе повреждения кардиомиоцитов, вызванного различными стрессорными факторами.

При воздействии различных стрессорных факторов на кардиомиоциты в условиях как гемодинамической перегрузки, так и метаболических нарушений, вызванных гипергликемией, Beclin-1-зависимая аутофагия играет важную роль в процессе выживания клеток. При различной патологии необходимо титровать аутофагический поток, при этом титрование аутофагии при одной патологии может иметь неблагоприятные последствия при сопутствующих заболеваниях сердечно-сосудистой системы [8].

Таким образом, для хронической перегрузки ЛЖ, обусловленной развитием АГ, характерно снижение интенсивности Beclin-1-зависимой аутофагии кардиомиоцитов. При изолированном инсулинозависимом СД, а также при его сочетании с АГ наблюдается противоположный эффект, проявляющийся в достоверном увеличении экспрессии белка Beclin-1.

ЛИТЕРАТУРА

1. *Blagonravov M.L., Korshunova A.Y., Azova M.M., Bondar' S.A., Frolov V.A.* Cardiomyocyte autophagia and morphological alterations in the left ventricular myocardium during acute focal ischemia // Bull. Exp. Biol. Med. 2016. Vol. 160, N 3. P. 398-400. doi: 10.1007/s10517-016-3180-1

2. *De Marañon A.M., Iannantuoni F., Abad-Jiménez Z., Canet F., Díaz-Pozo P., López-Domènech S., Jover A., Morillas C., Mariño G., Apostolova N., Rocha M., Victor V.M.* Relationship between PMN-endothelium interactions, ROS production and Beclin-1 in type 2 diabetes // Redox Biol. 2020. Vol. 34. ID 101563. doi: 10.1016/j.redox.2020.101563
3. *Fisch S., Gray S., Heymans S., Haldar S.M., Wang B., Pfister O., Cui L., Kumar A., Lin Z., Sen-Banerjee S., Das H., Petersen C.A., Mende U., Burleigh B.A., Zhu Y., Pinto Y.M., Liao R., Jain M.K.* Kruppel-like factor 15 is a regulator of cardiomyocyte hypertrophy // Proc. Natl Acad. Sci. USA. 2007. Vol. 104, N 17. P. 7074-7079. doi: 10.1073/pnas.0701981104
4. *Kassiotis C., Ballal K., Wellnitz K., Vela D., Gong M., Salazar R., Frazier O.H., Taegtmeyer H.* Markers of autophagy are downregulated in failing human heart after mechanical unloading // Circulation. 2009. Vol. 120, N 11, Suppl. P. S191-S197. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.108.842252
5. *Loos B., Engelbrecht A.M.* Cell death: a dynamic response concept // Autophagy. 2009. Vol. 5, N 5. P. 590-603. doi: 10.4161/auto.5.5.8479
6. *Maejima Y., Isobe M., Sadoshima J.* Regulation of autophagy by Beclin 1 in the heart // // J. Mol. Cell. Cardiol. 2016. Vol. 95. P. 19-25. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.10.032
7. *Matsui Y., Takagi H., Qu X., Abdellatif M., Sakoda H., Asano T., Levine B., Sadoshima J.* Distinct roles of autophagy in the heart during ischemia and reperfusion: roles of AMP-activated protein kinase and Beclin 1 in mediating autophagy // Circ. Res. 2007. Vol. 100, N 6. P. 14-922. doi: 10.1161/01.RES.0000261924.76669.36
8. *Schiattarella G.G., Hill J.A.* Therapeutic targeting of autophagy in cardiovascular disease // J. Mol. Cell. Cardiol. 2016. Vol. 95, N 5. P. 86-93. doi: 10.1016/j.yjmcc.2015.11.019
9. *Shirakabe A., Zhai P., Ikeda Y., Saito T., Maejima Y., Hsu C.P., Nomura M., Egashira K., Levine B., Sadoshima J.* Drp1-dependent mitochondrial autophagy plays a protective role against pressure-overload-induced mitochondrial dysfunction and heart failure // Circulation. 2016. Vol. 133, N 13. P. 1249-1263. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.115.020502
10. *Weng L.Q., Zhang W.B., Ye Y., Yin P.P., Yuan J., Wang X.X., Kang L., Jiang S.S., You J.Y., Wu J., Gong H., Ge J.B., Zou Y.Z.* Aliskiren ameliorates pressure overload-induced heart hypertrophy and fibrosis in mice // Acta Pharmacol. Sin. 2014. Vol. 35, N 8. P. 1005-1014. doi: 10.1038/aps.2014.45
11. *Xie M., Kong Y., Tan W., May H., Battiprolu P.K., Pedrozo Z., Wang Z.V., Morales C., Luo X., Cho G., Jiang N., Jessen M.E., Warner J.J., Lavandero S., Gillette T.G., Turer A.T., Hill J.A.* Histone deacetylase inhibition blunts ischemia/reperfusion injury by inducing cardiomyocyte autophagy // Circulation. 2014. Vol. 129, N 10. P. 1139-1151. doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.113.002416
12. *Yin X., Peng C., Ning W., Li C., Ren Z., Zhang J., Gao H., Zhao K.* miR-30a downregulation aggravates pressure overload-induced cardiomyocyte hypertrophy // Mol. Cell. Biochem. 2013. Vol. 379, N 1-2. P. 1-6. doi: 10.1007/s11010-012-1552-z
13. *Zhang H., Bosch-Marce M., Shimoda L.A., Tan Y.S., Baek J.H., Wesley J.B., Gonzalez F.J., Semenza G.L.* Mitochondrial autophagy is an HIF-1-dependent adaptive metabolic response to hypoxia // J. Biol. Chem. 2008. Vol. 283, N 16. P. 10 892-10 903. doi: 10.1074/jbc.M800102200
14. *Zhang M., Zhang L., Hu J., Lin J., Wang T., Duan Y., Man W., Feng J., Sun L., Jia H., Li C., Zhang R., Wang H., Sun D.* MST1 coordinately regulates autophagy and apoptosis in diabetic cardiomyopathy in mice // Diabetologia. 2016. Vol. 59, N 11. P. 2435-2447. doi: 10.1007/s00125-016-4070-9
15. *Zhu H., Tannous P., Johnstone J.L., Kong Y., Shelton J.M., Richardson J.A., Le V., Levine B., Rothermel B.A., Hill J.A.* Cardiac autophagy is a maladaptive response to hemodynamic stress // J. Clin. Invest. 2007. Vol. 117, N 7. P. 1782-1793. doi: 10.1172/JCI27523

Получено 20.10.20