

## **ВЛИЯНИЕ САХАРНОГО ДИАБЕТА НА АКТИВНОСТЬ МЕТАБОЛИЧЕСКИХ ФЕРМЕНТОВ И ЭКСПРЕССИЮ SERCA2A В КАРДИОМИОЦИТАХ И ИХ ВЗАИМОСВЯЗЬ С ИНОТРОПНЫМИ РЕАКЦИЯМИ МИОКАРДА БОЛЬНЫХ ИБС**

Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С., Ахмедов Ш.Д., Муслимова Э.Ф.,  
Будникова О.В., Репин А.Н.

*Научно-исследовательский институт кардиологии,  
Томский национальный исследовательский медицинский центр  
Российской академии наук, г. Томск*

Работа выполнена на биопсийном материале сердца пациентов с диагнозом хроническая ишемическая болезнь сердца (ИБС) и больных ИБС, сочетанной с сахарным диабетом 2 типа. Показано, что в миокарде пациентов с ИБС активность ферментов сукцинатдегидрогеназы (СДГ) и лактатдегидрогеназы (ЛДГ) была выше, чем у пациентов с сочетанной патологией. В обеих группах были пациенты как с «высоким», так и с «низким» содержанием белка SERCA2a. Кроме того, инотропная реакция миокарда пациентов в каждой группе также разделилась на 2 подгруппы. Высокое содержание SERCA2a соответствовало положительной динамике зависимости интервал-сила, а низкое – отрицательной динамике зависимости интервал-сила. Сделано заключение, что при сочетанном развитии ИБС и СД контрактильный резерв миокарда обеспечивается как направленной перестройкой энергетического метаболизма, так и сохранением более высокого уровня SERCA2a. Разная степень интенсивности экспрессии SERCA2a CP может быть связана с генетическим полиморфизмом.

*Ключевые слова:* ишемическая болезнь сердца, сахарный диабет 2 типа, лактатдегидрогеназа, сукцинатдегидрогеназа, SERCA2a, зависимость интервал-сила.

## **INFLUENCE OF DIABETES MELLITUS ON THE ACTIVITY OF METABOLIC ENZYMES AND SERCA2A EXPRESSION IN CARDIOMIOCYTES AND ITS RELATION WITH INOTROPIC REACTIONS OF THE MYOCARDIUM OF PATIENTS WITH CORONARY HEART DISEASE**

Afanasiev S.A., Kondratieva D.S., Akhmedov Sh.D., Muslimova E.F., Repin A.N.

The work was performed on the biopsy material of the heart with chronic coronary heart disease (CHD), and patients with CHD combined with type 2 diabetes mellitus. It was shown that the activity of succinate dehydrogenase (LDH) enzymes in the myocardium of patients with CHD was higher than in patients with combined pathology. Both groups had patients with both “high” and “low” SERCA2a protein. In addition, the inotropic myocardial response of patients in each group also divided into 2 subgroups. At the same time, the “high content” of the SERCA2a protein corresponded to the positive dynamics of the force-interval relationship, and the “low content” of the protein studied corresponded to the negative dynamics of the force-interval relationship (mechanical restitution). At the combined development of CHD and diabetes mellitus with a short duration of the disease, the positive dynamics of the force-interval relationship is more pronounced and corresponds to a higher level of SERCA2a expression than in the development of CHD only.

*Keywords:* dependence of force-interval, SERCA2a, coronary heart disease, type 2 diabetes mellitus, lactate dehydrogenase, succinate dehydrogenase, mitochondrial respiration.

## Введение

В настоящее время увеличилась частота сочетанного развития ишемической болезни сердца (ИБС) и сахарного диабета (СД). Сахарный диабет вносит существенный вклад в развитие расстройств энергетического метаболизма в миокарде [1, 2]. Это ведёт к усугублению нарушения процесса электромеханического сопряжения в кардиомиоцитах [3]. Хорошо известно, что обратный захват ионов кальция во время диастолы осуществляется благодаря функционированию  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азы (SERCA2a) саркоплазматического ретикулаума (СР). Эффективность работы этого белка во многом определяется доступностью энергетических субстратов [3]. Опубликованы данные о снижении экспрессии и/или активности  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азы СР как при ишемической болезни сердца [4, 5], так и при сахарном диабете [6, 7]. Однако явно недостаточно данных о сопряжении энергетического метаболизма и уровня  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортирующих белков с функциональной состоятельностью кардиомиоцитов при сочетанном развитии ИБС и сахарного диабета.

**Целью** работы было изучить активность ферментов, участвующих в энергообеспечении миокарда, уровень экспрессии  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азы СР и оценить их связь с зависимостью интервал – сила миокарда человека при ИБС, сочетанной с сахарным диабетом 2 типа.

## Материалы и методы

Работа одобрена Комитетом по биомедицинской этике НИИ кардиологии и проведена в соответствии с Хельсинской декларацией (1989). Все пациенты дали информированное согласие на проведение исследования. Сформировано 2 группы пациентов. В 1 группу включены 13 пациентов с диагнозом хроническая ишемическая болезнь сердца (ИБС), стенокардия напряжения III-IV класса по NYHA. Во 2 группу включили 23 пациента с ИБС (стенокардия напряжения III-IV класса по NYHA), ассоциированной с сахарным диабетом 2 типа (СД2). Длительность заболевания СД2 составляла на момент исследования 1-3 года, а значение гликированного гемоглобина (HbA1C) составляло 7,6%. Фракция выброса левого желудочка всей когорты пациентов была  $49,0 \pm 17,3\%$ , а средний возраст составлял  $50,6 \pm 2,4$  лет. Пациенты обеих групп получали оптимально подобранную терапию, а пациенты 2-й группы дополнительно наблюдались у эндокринолога.

В работе использовали биопсийный материал сердца (фрагмент ушка правого предсердия), который иссекали при подключении аппарата искусственного кровообращения во время плановых операций коронарного шунтирования. Из каждого фрагмента выделяли по 2 трабекулы с поперечным сечением 0,5 – 0,7 мм и длиной 5 мм, а остальная часть была использована для биохимических и гистохимических исследований. Подготовленную мышцу помещали в термостабилизированную ( $36^\circ\text{C}$ ) проточную камеру (1 мл) (Scientific Instruments GmbH, Германия). Суперфузию мышц осуществляли раствором Кребса-Хензеляита оксигенированным карбогеном ( $\text{O}_2$  – 95%,  $\text{CO}_2$  – 5%). Сократительную активность мышц регистрировали в изометрическом режиме, используя датчик Force transducer (Scientific Instruments GmbH, Германия). Оценивали напряжение, развиваемое мышцей в пересчете на площадь поперечного сечения мышцы ( $\text{мН}/\text{мм}^2$ ). Стимуляцию мышц проводили электрическими импульсами прямоугольной формы длительностью 5 мс с частотой 0,5 Гц. Перед началом исследования мышцы адаптировали к условиям перфузии в течение 60 мин. Кривые одиночного цикла сокращение-расслабление мышц записывали и обрабатывали при помощи программы “MUSCLEDATA” (Scientific Instruments GmbH, Германия).

Исследовали инотропную реакцию изолированного миокарда при выполнении теста «Post-rest». Этот тест позволяет оценить способность СР аккумулировать ионы кальция [8]. Для выполнения теста, на 4-60 секунд (периоды покоя) прекращали электрическую стимуляцию мышц [8]. Строили кривую механической релаксации как зависимость между амплитудой первого после периода покоя сокращения и длительностью этих периодов.

Определение уровня экспрессии  $\text{Ca}^{2+}$ -АТФ-азы СР (SERCA2a) проводили методом иммуноблоттинга. Белки разделяли в ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Sigma), с последующей инкубацией с первичными моноклональными антителами специфичными к белку SERCA2a (Sigma) и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma). Для детекции белков использовали BCIP/NBT (Sigma). Количество общего белка в образце определяли в ультрафиолетовом свете (280 нм) на спектрофотометре (NanoVueTM, Thermo Fisher Scientific, Финляндия).

Гистохимические исследования выполняли на срезах толщиной 10 мкм, полученных на криостате. Количественную оценку активности ферментов сукцинатдегидрогеназы (СДГ), лактатдегидрогеназы (ЛДГ) производили на микроскопе Axioskop 40 (Zeiss, Германия) в проходящем свете с длиной волны 546 нм [9]. Оптическую плотность измеряли не менее чем в 50 кардиомиоцитах каждого среза.

Результаты представлены как  $M \pm SEM$  и  $Me$  (25-й процентиль; 75-й процентиль). Для выявления в группах однородных данных использовали метод кластерного анализа. Достоверность различий оценивали по непараметрическому критерию U Манна-Уитни.

### Результаты исследований и их обсуждение

Определение активности метаболических ферментов показало, что ключевой фермент гликолиза ЛДГ был в 3 раза активнее ( $p < 0.05$ ) в миокарде пациентов 1 группы (рис.1). Активность СДГ (основной фермент аэробного синтеза АТФ цикла Кребса), также была выше в биоптатах 1 группы (в 1,8 раза,  $p < 0.05$ ). Это согласуется с представлениями о том, что при ишемических воздействиях в кардиомиоцитах повышается уровень гликолитического энергообразования, а СД, наоборот, подавляет окисление углеводов [10].

При оценке содержания SERCA2a в обеих группах были обнаружены пациенты с высоким и низким уровнем этого белка. Методом кластерного анализа мы выявили подгруппы пациентов с условно «высоким содержанием», и условно «низким содержанием» SERCA2a (рис.2). В 1 группе «высокое содержание» SERCA2a ( $15,32 \pm 1,2$  ед/мг белка) было выявлено у 7 пациентов, а «низ-

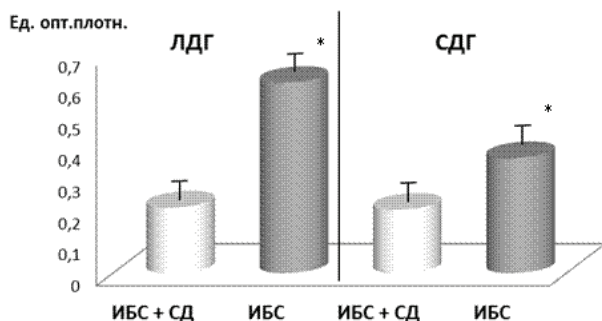


Рис. 1. Активность ферментов лактатдегидрогеназы (ЛДГ) и сукцинатдегидрогеназы (СДГ) в миокарде пациентов с ИБС и больных ИБС, ассоциированной с СД2.

Примечание: \* $p < 0,05$  – достоверность различий между группами.

кое содержание» ( $4,53 \pm 1,01$  ед/мг белка) у 6 пациентов. Во 2-й группе «высокое содержание» ( $20,87 \pm 2,22$  ед/мг белка) обнаружено у 11 пациентов, а у остальных «низкое содержание» SERCA2a ( $7,05 \pm 0,92$  ед/мг белка).

При рассмотрении подгрупп пациентов с «высоким содержанием» SERCA2a оказалось, что в миокарде пациентов 1 группы содержание SERCA2a определялось на 27% ( $p < 0,05$ ) меньше, чем у пациентов 2 группы (рис. 2). В подгруппе пациентов с «низким содержанием» SERCA2a мы не выявили значимой разницы, но имелась тенденция к более высокому содержанию SERCA2a у пациентов 2 группы.

Известно, что в диастолу SERCA2a осуществляет обратный захват  $Ca^{2+}$  в СР кардиомиоцитов. Благодаря преобладанию работы SERCA2a СР над  $Na^{+}$ - $Ca^{2+}$ -обменником сарколеммы в интактном миокарде реализуется потенцирующий эффект теста «Post-rest» [6]. Мы обнаружили, что и в 1-й и во 2-й группах, реакция на тест «Post-rest» может быть 2-х типов (рис.3). Первый тип (I тип) инотропной реакции характеризовался тем, что инотропная реакция в ответ на периоды покоя либо оставалась на уровне базовых сокращений (1 группа пациентов), либо превышал их (2-я группа пациентов). При втором типе (II тип) инотропной реакции, с увеличением длительности периодов покоя, амплитуда сокращений значительно снижалась относительно базовых сокращений. При этом I тип инотропного ответа наблюдался у пациентов с высоким уровнем SERCA2a, а II тип – с низким содержанием белка.

Поскольку в наших исследованиях I-й тип инотропной реакции на тест «Post-rest» коррелировал с более высоким содержанием SERCA2a,

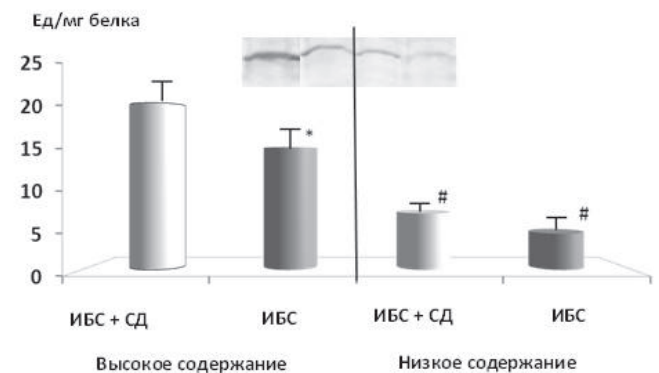


Рис. 2. Уровень SERCA2a кардиомиоцитов пациентов с ИБС и больных ИБС, ассоциированной с СД2

Примечание: \*  $p < 0,05$  – достоверность различий между группами, #  $p < 0,05$  – достоверность различий между подгруппами.

можно предположить, что кардиомиоциты этих пациентов имеют большую функциональную состоятельность  $\text{Ca}^{2+}$ -транспортирующих систем СР. Видимо, выявленное нами более высокое содержание SERCA2a позволяет, во время периода покоя, ресеквестрировать обратно в СР большее количество  $\text{Ca}^{2+}$ .

Проявление II-го типа инотропной реакции при выполнении теста «Post-rest» свидетельствует об угнетении обратного захвата  $\text{Ca}^{2+}$  в СР и об истощении этого внутриклеточного депо  $\text{Ca}^{2+}$  во время покоя. Последнее обстоятельство может быть обусловлено и нарушением функций риаудиновых рецепторов СР [11]. Сочетанная дисфункция SERCA2a и риаудиновых рецепторов СР представляется наиболее неблагоприятным состоянием. Вероятно, именно оно наблюдается при II типе инотропной реакции миокарда на тест «Post-rest».

Известно, что SERCA2a является энергозависимым ферментом [12]. По этой причине, его эффективность определяет и количество фермента, и доступность энергетического субстрата. Результаты оценки активности ключевых ферментов энергообразования указывают на то, что сочетанное развитие ИБС и СД характеризуется снижением активности процессов гликолиза и цикла Кребса, что согласуется с данными литературы [10]. Однако, по нашим данным, у пациентов с сочетанной патологией наблюдается явное преобладание функционального резерва систем, сопряженных с СР. Исходя из полученных данных можно предположить, что контрактильный резерв миокарда пациентов с сочетанной патологией сохраняется в большей степени благодаря более интенсивной экспрессии SERCA2a. Возможно, функциональ-

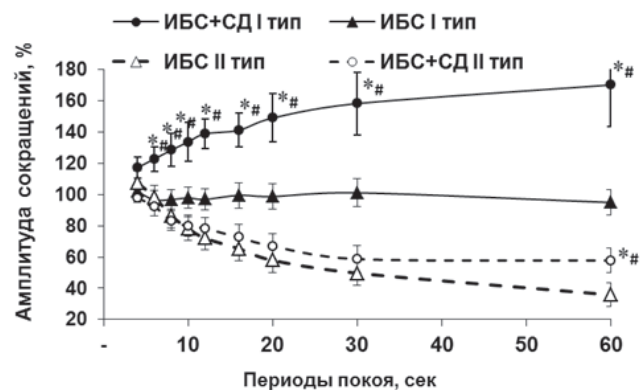


Рис. 3. Механическая реституция мышечных полосок миокарда пациентов с I и II типом инотропной реакции

Примечание: \*  $p < 0,05$  — достоверность различий между группами, #  $p < 0,05$  — достоверность различий между типами реакций.

ная активность этого белка обеспечивается благодаря энергии, синтезируемой в результате сохранения активности окислительного фосфорилирования в митохондриях. Это предположение не противоречит ранее полученным данным об активности дыхания митохондрий при экспериментальном ПИКС и сочетанном моделировании ПИКС и СД [13, 14].

Таким образом, на основании полученных данных можно заключить, что даже при сочетанном развитии ИБС и СД контрактильный резерв миокарда обеспечивается как направленной перестройкой энергетического метаболизма, так и сохранением более высокого уровня SERCA2a. Разная степень интенсивности экспрессии SERCA2a СР может быть связана с генетическим полиморфизмом.

**Исследование поддержано Российским фондом фундаментальных исследований (проект № 17-04-01450).**

#### Литература:

1. Kahn S.E., Cooper M.E., Del Prato S. Pathophysiology and treatment of type 2 diabetes: perspectives on the past, present, and future// Lancet. 2014. V.383(9922).P.1068.
2. Kolwicz S.C.Jr., Purohit S., Tian R. Cardiac metabolism and its interactions with contraction, growth, and survival of cardiomyocytes// Circ. Res. 2013. V.113(5). P.603.
3. Zima A.V., Bovo E., Mazurek S.R. et al. Ca handling during excitation-contraction coupling in heart failure// Pflugers Arch. 2014. V.466(6). P.:1129.
4. Periasamy M., Huke S. SERCA pump level is a critical determinant of  $\text{Ca}^{2+}$  homeostasis and cardiac

contractility// J. Mol. Cell Cardiol. 2001. V.33. P.1053.

5. Vangheluwe P., Wuytack F. Improving cardiac  $\text{Ca}^{2+}$  transport into the sarcoplasmic reticulum in heart failure: lessons from the ubiquitous SERCA2b  $\text{Ca}^{2+}$  pump// Biochem. Soc. Trans. 2011. V.39(3). P.781.

6. Pieske B., Sütterlin M., Schmidt-Schweda S. et al. Diminished post-rest potentiation of contractile force in human dilated cardiomyopathy. Functional evidence for alterations in intracellular  $\text{Ca}^{2+}$  handling// J. Clin. Invest. 1996. V.98(3). P.764.

7. Kranstuber A.L., Del Rio C., Biesiadecki B.J. et al. Advanced glycation end product cross-link breaker attenuates diabetes-induced cardiac dysfunction by improving sarcoplasmic reticulum calcium handling//

Front. Physiol. 2012. V.3. P.292.

8. Zhao S.M., Wang Y.L., Guo C.Y. et al. Progressive decay of Ca<sup>2+</sup> homeostasis in the development of diabetic cardiomyopathy// Cardiovasc. Diabetol. 2014. V.3. P.75.

9. Лойда З., Гроссау Р., Шиблер Т. Гистохимия ферментов (лабораторные методы), М., Мир,1982. 272 с.

10. Wang J, Song Y, Wang Q et al. Causes and characteristics of diabetic cardiomyopathy. Rev Diabet Stud. 2006 Fall;3(3):108-17.

11. Yano M., Yamamoto T., Ikeda Y., Matsuzaki M. Mechanisms of Disease: ryanodine receptor defects in heart failure and fatal arrhythmia// Nat. Clin. Pract. Cardiovasc. Med. 2006. Vol.3(1). P.43.

Cardiovasc. Med. 2006. Vol.3(1). P.43.

12. Bers D., Eisner D., Valdivia H. Sarcoplasmic Reticulum Ca<sup>2+</sup> and Heart Failure Roles of Diastolic Leak and Ca<sup>2+</sup> Transport// Circ. Res. 2003. Vol. 3. P.487.

13. Афанасьев С.А., Егорова М.В., Кондратьева Д.С. Дыхание митохондрий постинфарктного сердца крыс при окислении различных субстратов Сиб. Мед. Жур. 2010. т. 25, № 4. вып.1. с. 116-119.

14. Афанасьев С.А., Кондратьева Д.С., Егорова М.В., Попов С.В. Сравнительное исследование изменений энергетического метаболизма в кардиомиоцитах крыс при постинфарктном кардиосклерозе и сахарном диабете//Бюллетень экспериментальной биологии и медицины. 2013. Т. 156. № 8. С. 149-152.

*Информация об авторах:*

*Томский НИМЦ РАН  
634012, г. Томск, ул. Киевская 111а*

*Афанасьев Сергей Александрович – заведующий  
лаборатории молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики НИИ кардиологии Томского НИМЦ, д.м.н., профессор  
Тел.: (3822)-44-05-11*

*Кондратьева Дина Степановна – научный сотрудник лаборатории  
молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики НИИ кардиологии Томского НИМЦ, к.б.н.  
Тел.: (3822)-44-05-11*

*Ахмедов Шамиль Джаманович – ведущий научный сотрудник  
отделения сердечно-сосудистой хирургии НИИ кардиологии Томского НИМЦ, д.м.н., профессор  
Тел.: (3822)-55-81-42*

*Муслимова Эльвира Фаритовна – младший научный сотрудник лаборатории  
молекулярно-клеточной патологии и генодиагностики НИИ кардиологии Томского НИМЦ,  
Тел.: (3822)-44-05-11*

*Будникова Олеся Викторовна – аспирант лаборатории молекулярно-клеточной  
патологии и генодиагностики НИИ кардиологии Томского НИМЦ,  
Тел.: (3822)- 44-05-11*

*Репин Алексей Николаевич – заведующий отделением  
реабилитации больных сердечно-сосудистых заболеваний НИИ кардиологии Томского НИМЦ, д.м.н., профессор  
Тел.: (3822)- 56-58-31*

*Адрес для корреспонденции: dina@cardio-tomsk.ru, Кондратьевой Дине Степановне*