

М.Ю. Колесник

Особенности экспрессии регуляторного белка тайтина и коллагена I типа в миокарде спонтанно гипертензивных крыс с экспериментальным сахарным диабетом

Запорожский государственный медицинский университет

Ключевые слова: тайтин, коллаген I типа, миокард, экспериментальный сахарный диабет, спонтанно гипертензивные крысы.

Исследованы возможные патогенетические механизмы формирования диастолической дисфункции при сочетании артериальной гипертензии и сахарного диабета. На модели спонтанно гипертензивных крыс с экспериментальным сахарным диабетом изучены морфологические основы повышенной миокардиальной жесткости. Проанализирован уровень экспрессии кардиального тайтина, который контролирует эластичность миокарда, и его ассоциации с выраженностью фиброза. Установлено, что при развитии сахарного диабета удельное содержание тайтина снижается на 27% по сравнению с интактными гипертензивными животными. Указанные изменения ассоциированы с прогрессированием миокардиального фиброза, что подтверждалось увеличением экспрессии коллагена I типа в 2,5 раза.

Особливості експресії регуляторного білка тайтину та коллагену I типу в міокарді спонтанно гіпертензивних щурів з експериментальним цукровим діабетом

М.Ю. Колесник

Досліджено можливі патогенетичні механізми формування діастолічної дисфункції в умовах поєднання артеріальної гіпертензії та цукрового діабету. На моделі спонтанно гіпертензивних щурів з експериментальним цукровим діабетом вивчено морфологічні основи підвищеної міокардіальної жорсткості. Проаналізовано рівень експресії кардиального тайтину, що регулює пружність міокарда, та його асоціації з вираженістю фіброзу. Встановлено, що при розвитку цукрового діабету питомий вміст тайтину знижується на 27% порівняно з інтактними гіпертензивними щурами. Зазначені зміни асоційовані з прогресуванням міокардіального фіброзу, що підтверджено збільшенням у 2,5 рази рівнем експресії коллагену I типу.

Ключові слова: тайтин, коллаген I типу, міокард, експериментальний цукровий діабет, спонтанно гіпертензивні щури.

Патологія. – 2013. – №2 (28). – С. 31–35

Peculiarities of the expression of regulatory protein titin and collagen I in myocardium of spontaneously hypertensive rats with experimental diabetes mellitus

M.Yu. Kolesnik

Possible pathogenetic mechanisms of diastolic dysfunction formation in arterial hypertension with concomitant diabetes mellitus were investigated. The morphological basis of increased myocardial stiffness was studied on the model of spontaneously hypertensive rats with experimental diabetes mellitus. The expression of cardiac titin as myocardial elastic properties regulator and its association with level of cardiac fibrosis were examined. It was found that total titin content was reduced by 27% compared with intact hypertensive rats. These changes were associated with the progression of cardiac fibrosis, which was confirmed by 2,5-fold increased level of collagen I expression.

Key words: titin, collagen I, myocardium, experimental diabetes mellitus, spontaneously hypertensive rats.

Pathologia. 2013; №2 (28): 31–35

Сочетание артериальной гипертензии и сахарного диабета является одним из наиболее распространенных и неблагоприятных патологических состояний. По данным Фремингемского исследования, артериальная гипертензия в 5 раз увеличивает смертность больных сахарным диабетом [1]. Исследования последних лет показали, что интегральным признаком поражения миокарда при данных заболеваниях считается прогрессирующее формирование диастолической дисфункции [2]. Поиск морфологической основы ее развития является актуальной задачей фундаментальных исследований. Значительная часть проведенных ранее работ посвящена изучению миокардиального фиброза и ремоделированию экстрацеллюлярного матрикса, приводящего к повышению жесткости миокарда и нарушению диастолического наполнения левого желудочка. Этот

процесс характеризуется избыточным образованием и нарушением деградации коллагена, преимущественно I и III типа. В значительно меньшей степени исследованы нарушения упруго-эластических свойств миокарда, происходящих параллельно развитию фиброза.

Известно, что развитие гипертрофии является адаптивным ответом миокарда на повышенную постнагрузку. Происходящие при этом активация генетического аппарата клетки и синтез новых сократительных белков остаются не до конца изученными процессами. В настоящее время считается, что основным механическим сенсором, регулирующим адаптационный ответ миокарда, является гигантский белок тайтин [3]. Молекулы тайтина, перекрывая расстояние от M-линии до Z-диска, формируют третью филаментную (наряду с актином и миозином) систему в миофибриллах. В организме млекопитающих

он является наиболее крупным белком и имеет массу более 3 МДа. В миокарде тайтин представлен двумя изоформами – N2BA и N2B (в соотношении 30:70 в норме) [4]. Последние характеризуются различной степенью упругости, при этом их соотношение может меняться при патологических состояниях. На данный момент изоформный состав тайтина изучен не до конца. В частности, не открыты изоформы с массой более 3700 кДа, хотя ген тайтина может кодировать белок с большей массой [5].

Предметом немногочисленных исследований, посвященных изучению тайтина, являлся анализ соотношения изоформ белка при различных патологических состояниях у экспериментальных животных и больных. Практически отсутствуют данные об особенностях экспрессии и функционирования тайтина в зависимости от состояния экстрацеллюлярного матрикса. При этом существует мнение, что повышенная миокардиальная жесткость при диастолической дисфункции является результатом координированных изменений содержания тайтина и коллагена [6]. В доступной научной литературе не нашли данных, характеризующих взаимоотношение тайтина и коллагена при сочетании сахарного диабета и артериальной гипертензии как в клинике, так и в эксперименте.

Цель работы

Исследование механизмов формирования повышенной миокардиальной жесткости у крыс со спонтанной артериальной гипертензией и экспериментальным сахарным диабетом на основании изучения экспрессии тайтина и коллагена I типа.

Материалы и методы исследования

В работе использовали спонтанно гипертензивных крыс-самцов линии SHR массой 220–300 г (n=20), а также нормотензивных крыс-самцов линии Вистар массой 220–270 г (n=10). Крысы линии SHR предоставлены научно-исследовательской лабораторией кафедры фармакологии Национального медицинского университета им. А.А. Богомольца (зав. – член-корр. НАН и НАМН Украины, профессор И.С. Чекман). Все манипуляции осуществляли в соответствии с «Положениям про використання тварин у біомедичних дослідженнях», которые согласованы с «Европейской конвенцией по защите позвоночных животных, используемых для экспериментальных и научных целей». Исследования проведены на базе Центральной научно-исследовательской лаборатории Запорожского государственного медицинского университета (зав. – профессор А.В. Абрамов).

В первую (контрольную) группу включены интактные нормотензивные крысы-самцы линии Вистар (n=10). Вторая группа состояла из 10 интактных спонтанно гипертензивных крыс линии SHR. Третья (экспериментальная) группа представлена животными SHR (n=10), которым моделировали сахарный диабет путем однократного внутрибрюшинного введения стрептозотоцина в дозе 50 мг/кг, разведенного ex tempore в 1 мл 0,1 М цитратного буфера (рН 4,5) после 12-часового голодания.

Далее каждое животное размещали в отдельной клетке при свободном доступе к воде и пище. В течение первых суток эксперимента крысам выпаивали 20% раствор глюкозы, в течение вторых – 10% [10].

На 20 день исследования у крыс всех групп измеряли систолическое артериальное давление (САД) методом плетизмографии при помощи прибора Transonic Animal Research Flowmeter T-106 Series (Transonic Systems Inc., США). Измерение проводили трижды с усреднением полученных результатов.

Левый желудочек контрольных (интактных) и экспериментальных животных извлекали после одномоментной декапитации, фиксировали в жидкости Буэна и после стандартной гистологической обработки пропитывали и заливали в парапласт (MkCormick, США). На ротационном микротоме Microm-325 (Microm Corp., Германия) получали серийные срезы из различных отделов левого желудочка толщиной 5 мкм. Срезы депарафинировали и демаскировали в РТ-модуле (Thermo Scientific, США) в цитратном буферном растворе (Thermo Scientific, США). Для обнаружения коллагена I типа и тайтина гистологические срезы инкубировали с мышиными моноклональными антителами (Abcam, США, кат. № ab90395 и ab7034 соответственно) в разведении 1:1000 во влажной камере (T=+4°C, 24 часа). Затем проводили инкубацию с овечьими антителами к IgG мыши, конъюгированными с FITC (Sigma Chemical, США), в разведении 1:64 во влажной камере (T= +37°C, 45 мин.) и заключали в смесь «глицерин/фосфатный буфер» (9:1).

Изучение срезов проводили в ультрафиолетовом спектре возбуждения с помощью светофильтра 38HE с высокой эмиссией (Carl Zeiss, Германия) на микроскопе AxioImager-M2 (Carl Zeiss, Германия). Изображение, получаемое с помощью 16-битной видеокамеры AxioCam-5HRm (Carl Zeiss, Германия), записывали в виде компьютерного файла для последующей обработки системой цифрового анализа изображения AxioVision 4.8.2 (Carl Zeiss, Германия).

При анализе срезов с иммунным окрашиванием к тайтину и коллагену в автоматическом режиме выделялись зоны со статистически значимой флуоресценцией, для которых вычисляли следующие параметры:

1. Удельная площадь иммунореактивного материала (%), отражающая интенсивность экспрессии исследуемых белков в миокарде;
2. Интенсивность флуоресценции иммунореактивного материала, отражающая концентрацию ($E_{иф}$) исследуемых белков в миокарде;
3. Удельное содержание ($E_{иф}/мм^2$) исследуемых белков в миокарде.

Исследованию подвергали не менее 100 полей зрения в каждой серии.

Статистическую обработку данных производили с помощью пакета программ Statistica 6.0 («StatSoft», США, № лицензии AXXR712D833214FAN5). Данные описательной статистики представлены в виде среднего арифметического и стандартной ошибки среднего.

Содержание тайтина и коллагена I типа в миокарде желудочков крыс

Параметр	Нормотензивные крысы	Крысы линии SHR	Крысы линии SHR с СД
Тайтин			
Удельная площадь белка, %	14,4±0,23	17,8±0,13*‡	14,7±0,14
Концентрация белка в миокарде, E _{ио}	0,19±0,01	0,24±0,008*‡	0,21±0,01
Удельное содержание белка в миокарде, E _{ио} /мм ²	27879±1389	42620±1425*‡	31128±1338
Коллаген I типа			
Удельная площадь белка, %	0,8±0,06	1,08±0,05*	1,12±0,05*
Концентрация белка в миокарде, E _{ио}	0,34±0,02	0,45±0,01*‡	1,1±0,01*§
Удельное содержание белка в миокарде, E _{ио} /мм ²	2461±261	5050±326*‡	12468±638*§
Соотношение удельного содержания тайтина и коллагена	11,3±0,6	8,4±0,54*‡	2,5±0,21*§

Примечания: данные представлены в виде «средняя±стандартная ошибка средней»; отличия статистически значимы при $p < 0,05$ по отношению к группе нормотензивных животных (*), крысам линии SHR (§), крысам SHR с СД (‡). СД – сахарный диабет; SHR – спонтанно гипертензивные крысы.

Сравнительный анализ в группах проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с использованием критерия Ньюмена-Кейлса для множественных сравнений. Статистически значимыми считали отличия при $p < 0,05$.

Результаты и их обсуждение

Уровень САД у нормотензивных крыс составил 126±3 мм рт. ст., а у крыс линии SHR – 155±5 мм рт. ст. ($p < 0,05$). Известно, что гипертрофия сердца у спонтанно гипертензивных крыс характеризуется значительным уменьшением численности кардиомиоцитов в левом желудочке. Морфологические исследования гипертрофированного миокарда показали, что в одной и той же клетке одни миофибриллярные пучки могут находиться в состоянии сокращения, другие – в состоянии расслабления [7]. Пучки миофибрилл могут располагаться под прямым углом друг к другу, что свидетельствует о нарушении пространственной ориентации саркомера (рис. 1).

У крыс линии SHR отмечали достоверное увеличение удельной площади, концентрации и удельного содержания тайтина в миокарде по сравнению с нормотензивными животными (рис. 2). В то же время, в группе со спонтанной гипертензией и экспериментальным сахарным диабетом анализируемые параметры достоверно не отличались по отношению к нормотензивным крысам, а удельное содержание тайтина у крыс линии SHR с моделированным диабетом было на 27% ниже, чем у интактных животных со спонтанной гипертензией (табл. 1).

Ранее мы отметили достоверное снижение ядерно-цитоплазматического коэффициента и плотности ядер кардиомиоцитов с параллельным уменьшением в них концентрации РНК у крыс со спонтанной гипертензией и экспериментальным сахарным диабетом [8]. Нарушение биосинтеза РНК у гипертензивных животных с диабе-

том, вероятно, является отражением энергодефицита, возникающего в результате системной митохондриальной дисфункции [9]. Снижение содержания тайтина в проведенном исследовании подтверждает факт нарушения биосинтеза белка у животных со спонтанной гипертензией при моделировании у них диабета.

Следует подчеркнуть, что существующие исследования белка тайтина немногочисленны и носят противоречивый характер. Во многом это обусловлено методологическими сложностями его детекции, а также широкой вариабельностью его экспрессии в разных фрагментах миокарда (предсердия или желудочки, субэндокардиальный или субэпикардиальный слой и т.д.). При этом изоформный состав тайтина значительно изменяется в процессе онтогенеза [5]. Так, в гипертрофированном сердце спонтанно гипертензивных крыс (SHR) обнаружено уменьшение содержания растяжимой N2BA-изоформы тайтина [10], однако авторы исследования не приводят данных об общем содержании этого белка. При гипертрофической кардиомиопатии у человека не обнаружено изменений в содержании и изоформном составе тайтина по сравнению со здоровыми лицами [11]. Обнаружены противоположно направленные изменения в содержании N2BA- и N2B-изоформ тайтина при развитии дилатационной кардиомиопатии у человека и собаки [12,13].

В проведенном исследовании у животных линии SHR с экспериментальным диабетом отмечали наибольшую выраженность фиброза, оцениваемую по содержанию коллагена I типа. Его удельное содержание было в 5 раз больше значения у нормотензивных животных и в 2,5 раза, чем у спонтанно гипертензивных крыс без диабета. Рассчитали коэффициент, отражающий соотношение удельного содержания тайтина и коллагена I типа. Его анализ показал, что даже на фоне относительного повы-

шения тайтина у животных со спонтанной гипертензией миокардиальная жесткость повышается вследствие избыточного развития фиброза, что можно рассматривать как адаптивную реакцию. В то же время, у животных линии SHR с экспериментальным диабетом отмечается снижение общего уровня тайтина на фоне прогрессирующего увеличения содержания коллагена.

Взаимоотношения между коллагеном и тайтином представляют большой интерес для изучения миокардиальной жесткости при артериальной гипертензии. Считается, что тайтин контролирует растяжение миофибрилл в физиологических пределах, а коллаген препятствует избыточному растяжению миокарда. При этом существуют противоположные мнения о влиянии фиброза на состояние и изоформный состав тайтина. В недавнем исследовании С. Chung и соавт. обнаружили, что у экспериментальных мышей с генетически дефектным тайтином повышение миокардиальной жесткости происходит независимо от выраженности фиброза, который оценивали по уровню экспрессии коллагена [14]. Авторы пришли к выводу, что для повышения миокардиальной жесткости и формирования диастолической дисфункции может быть достаточным изолированное нарушение функционирования тайтина. Ряд исследователей придерживается мнения, что изменение тайтина является ответной реакцией на состояние внеклеточного матрикса. В частности, в исследовании Makarenko I. et al. отмечено сниженное содержание тайтина и преобладание более растяжимой N2BA-изфоморы белка при ишемической кардиомиопатии, что авторы оценили как ответ на избыточное накопление коллагена и десмина [4].

Наличие сахарного диабета является мощным фактором прогрессирования миокардиального фиброза, что нашло подтверждение в настоящем исследовании. В качестве индукторов этого процесса рассматривают гипергликемию, накопление конечных продуктов гликозилирования, значительную активацию ренин-ангиотензиновой системы, а также матриксных металлопротеиназ и тканевых факторов роста [15]. По данным нашего исследования, избыточный фиброз ассоциируется со снижением общего содержания тайтина, обеспечивающего упруго-эластические свойства миокарда. Ранее M. Ge и соавт. отмечали снижение экспрессии мРНК тайтина у нормотензивных крыс линии Sprague-Dawley со стрептозотоцин-индуцированным диабетом [16]. В клиническом аспекте указанные изменения тайтина и коллагена могут лежать в основе перехода от диастолической дисфункции к диастолической сердечной недостаточности. В частности, Kim H. и соавт. установили противоположно направленные изменения в изоформном составе тайтина у пациентов с систолическим и диастолическим вариантом сердечной недостаточности [17]. Дальнейшие исследования в этом направлении помогут установить патогенетические механизмы формирования диастолической дисфункции в рамках сочетанной диабетической и гипертензивной кардиомиопатии.

Выводы

При моделировании сахарного диабета у спонтанно гипертензивных крыс отмечено достоверное снижение удельного содержания тайтина в миокарде на 27%.

Снижение содержания тайтина у крыс линии SHR с экспериментальным диабетом ассоциируется с избыточным накоплением коллагена I типа.

Перспективой дальнейших исследований является оценка влияния ростовых факторов на характер кардиального ремоделирования у животных со спонтанной гипертензией и экспериментальным сахарным диабетом.

Список литературы

1. Cardiovascular outcomes in Framingham participants with diabetes. The importance of blood pressure/ G. Chen, F. A. McAlister, R.L. Walker et al. // *Hypertension*. – 2011. – Vol. 57. – P. 891–897.
2. Effect of diabetes and hypertension on left ventricular diastolic function in a high-risk population without evidence of heart disease/ C. Russo, Z. Jin, Sh. Homma et al. // *Eur. J. Heart. Fail.* – 2010. – Vol. 12 (5). – P. 454–461.
3. *Капелько В.И.* Диастолическая дисфункция / В.И. Капелько // *Кардиология*. – 2011. – №1. – С. 79–90.
4. Passive stiffness changes caused by upregulation of compliant titin isoforms in human dilated cardiomyopathy hearts / I. Makarenko, C. Opitz, M. Leake et al. // *Circul. Res.* – 2004. – Vol. 95. – P. 708–716.
5. *Вихлянцева И.М.* Новые изоформы тайтина (коннектина) и их функциональная роль в поперечно-полосатых мышцах млекопитающих: факты и предположения / И.М. Вихлянцева, З.А. Поддубная // *Успехи биологической химии*. – 2013. – Т. 52. – С. 239–280.
6. *Hamdani N.* Myocardial titin and collagen in cardiac diastolic dysfunction: partners in crime / N. Hamdani, W. Paulus // *Circulation*. – 2013. – Vol. 128. – P. 5–8.
7. *Лушниковая И.Л.* Морфологическая и стереологическая характеристика ремоделирования миокарда стареющих спонтанно-гипертензивных крыс SHR / И.Л. Лушниковая, Л.М. Непомнящих // *Бюллет. эксперимент. биол. и мед.* – 2003. – №135. – С. 208–214.
8. *Колесник М.Ю.* Морфологические изменения кардиомиоцитов при развитии митохондриальной дисфункции у спонтанно гипертензивных крыс на фоне экспериментального сахарного диабета / М.Ю. Колесник // *Морфология*. – 2013. – Т. 7, №1. – С. 44–48.
9. *Колесник М.Ю.* Особенности функционирования митохондрий миокарда у крыс со спонтанной гипертензией (SHR) на фоне экспериментального сахарного диабета и атеросклероза / М.Ю. Колесник, И.Ф. Беленичев, Г.В. Дзяк, И.С. Чекман // *Запорожский медицинский журнал*. – 2012. – №2. – С. 26–31.
10. Titin isoform expression in normal and hypertensive myocardium / C. Warren, M. Jordan, K. Roos et al. // *Cardiovasc. Res.* – 2003. – Vol. 59 (1). – P. 86–94.
11. Normal passive viscoelasticity but abnormal myofibrillar force generation in human hypertrophic cardiomyopathy / A. Hoskins, A. Jacques, S. Bardswell et al. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* – 2010. – Vol. 49 (5). – P. 737–745.
12. Altered titin expression, myocardial stiffness, and left ventricular function in patients with dilated cardiomyopathy / S.F. Nagueh, G. Shah, Y. Wu et al. // *Circulation*. – 2004. – Vol. 110 (2). – P. 155–162.

13. Titin isoforms, extracellular matrix and global chamber remodeling in experimental dilated cardiomyopathy: functional implications and mechanistic insights / W.A. Jaber, C. Maniu, J. Krysiak et al. // *Circ. Heart Fail.* – 2008. – Vol. 1 (3). – P. 192–199.
14. Shortening of the Elastic Tandem Immunoglobulin Segment of Titin Leads to Diastolic Dysfunction / C. Chung, K. Hutchinson, M. Methawasin et al. // *Circul.* – 2013. – Vol. 128. – P. 19–28.
15. *Ran C.R.* Fibrosis in diabetes complications: pathogenic mechanisms and circulating and urinary markers / C.R. Ran, S.M. Twigg // *Vasc. Health Risk Manag.* – 2008. – Vol. 4 (3). – P. 575–596.
16. The effect of gypenosides on cardiac function and expression of cytoskeletal genes of myocardium in diabetic cardiomyopathy rats / M. Ge, S. Ma, L. Tao et al. // *Am. J. Chin. Med.* – 2009. – Vol. 37 (6). – P. 1059–1068.
17. Assessment of left ventricular rotation and torsion with two-dimensional speckle tracking echocardiography / H.K. Kim, D.W. Sohn, S.E. Lee et al. // *J. Am. Soc. Echocardiogr.* – 2007. – Vol. 20. – P. 45–53.

Сведения об авторе:

Колесник М. Ю., к. мед. н., ассистент каф. семейной медицины и терапии ФПО ЗГМУ.

Надійшла в редакцію 06.08.2013 р.

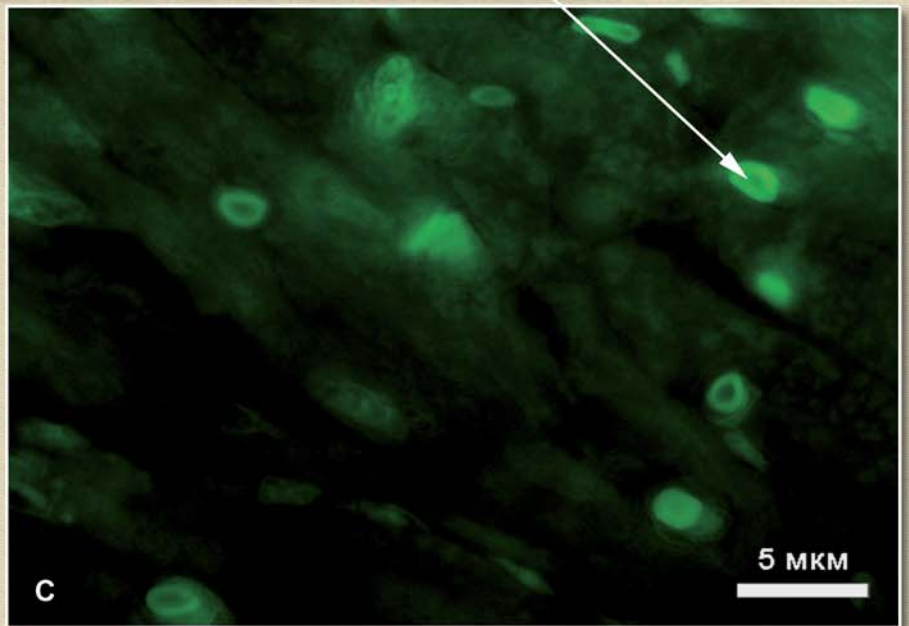
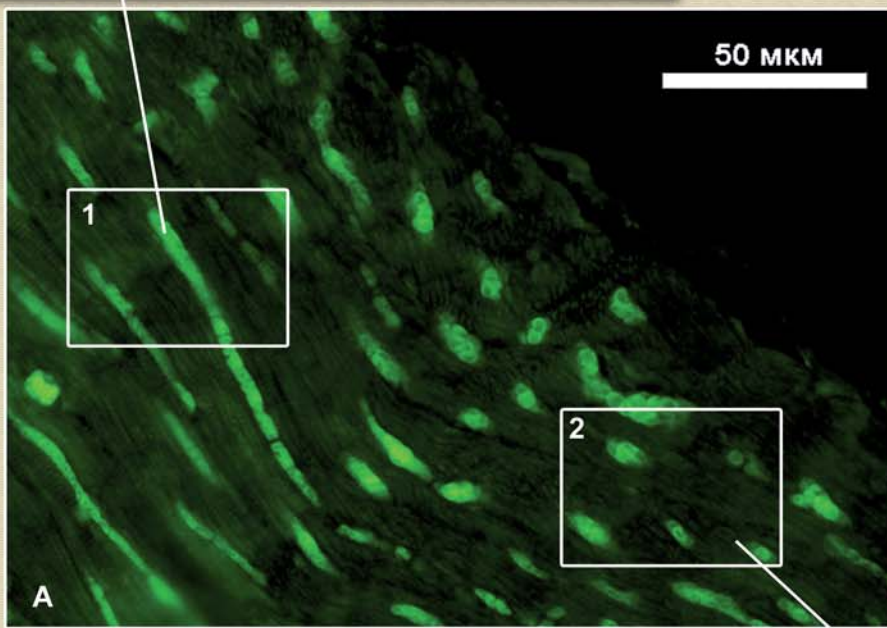
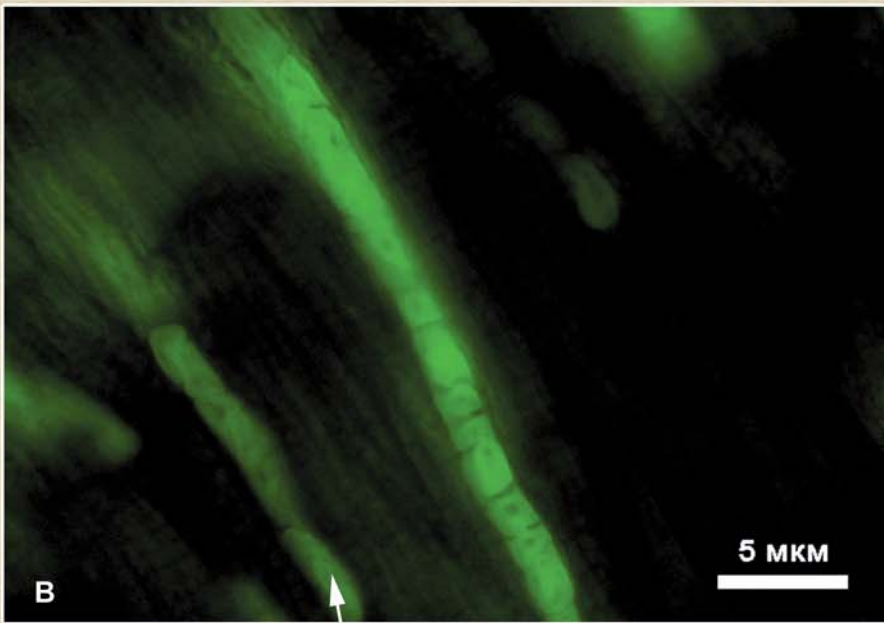


Рис. 1. Миокард крысы линии SHR с продольным (А1, В) и поперечным (А2, С) расположением волокон. Реакция непрямо́й иммунофлюоресценции с мышинными моноклональными антителами к коллагену 1-го типа (Авсап, США). Объектив с ув. 20х (А) и 63х (В, С).

(Рис. 1 к статье М.Ю. Колесника «Особенности экспрессии регуляторного белка тайтина и коллагена I типа в миокарде спонтанно гипертензивных крыс с экспериментальным сахарным диабетом» с. 31–35)

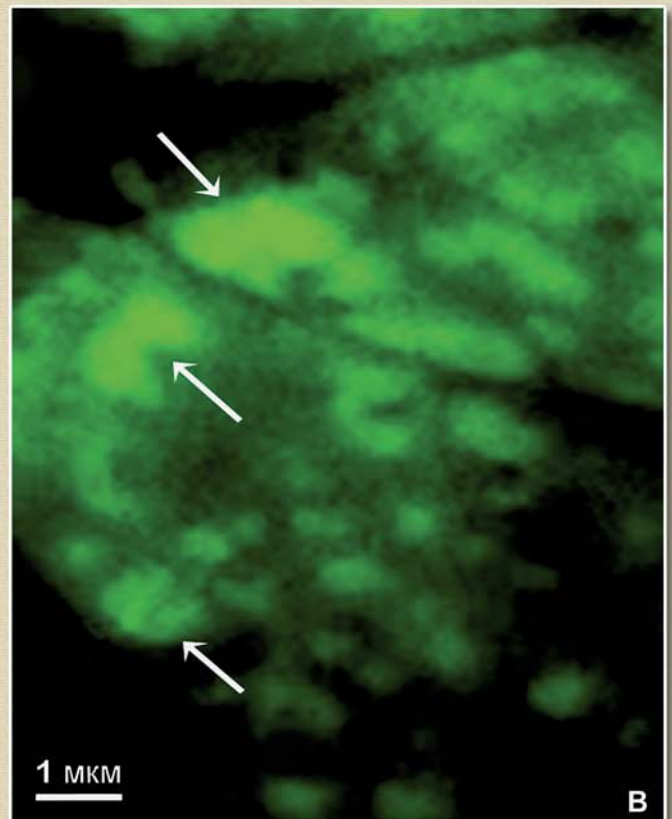
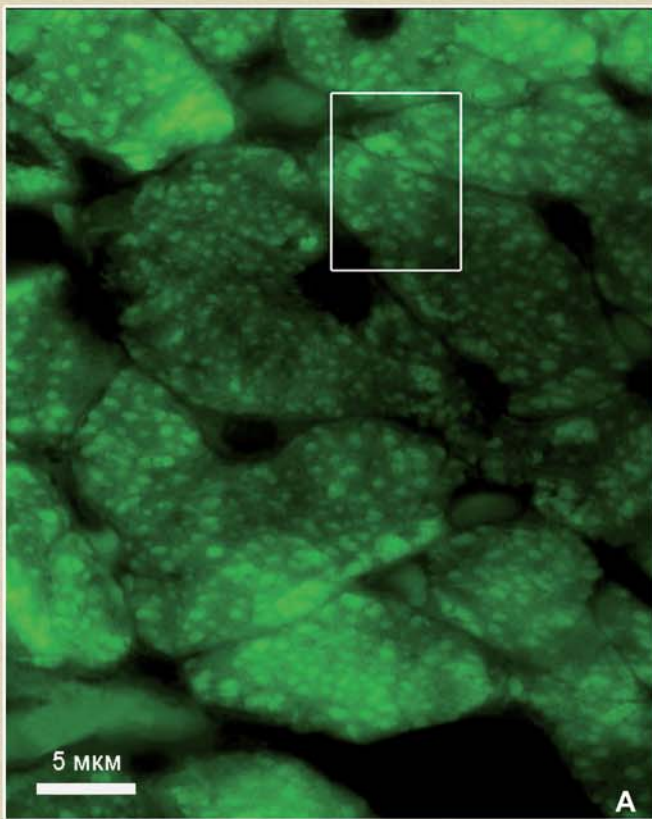


Рис. 2. Миокард крысы линии SHR. Реакция непрямої иммунофлюоресценції з мишиними моноклональними антителами к тайтину (Abscam, США). Об'єктив с ув. 63х (А), збільшений фрагмент в рамке (В).

(Рис. 2 к статье М.Ю. Колесника «Особенности экспрессии регуляторного белка тайтина и коллагена I типа в миокарде спонтанно гипертензивных крыс с экспериментальным сахарным диабетом» с. 31–35)

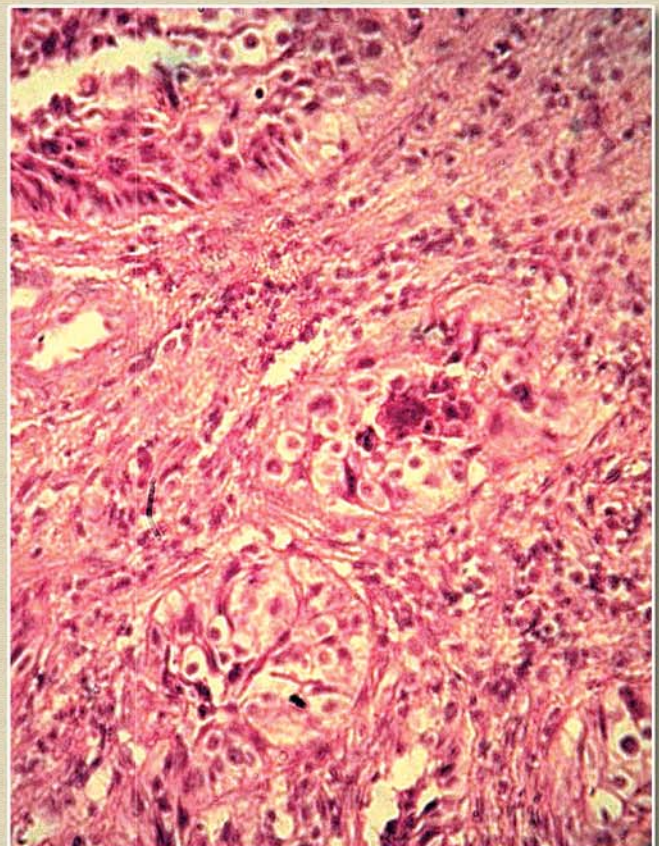
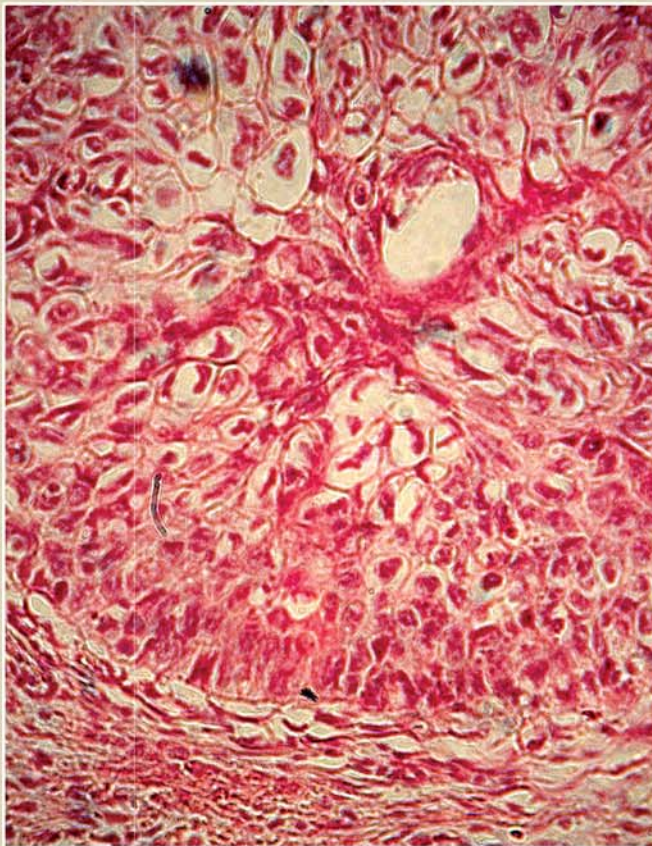


Рис. 1. Плоскоклетинний незроговілий рак шийки матки. Балонна дегенерація з каріопікнозом ракових клітин поверхневої зони. Стан після ППТ по 2 Гр до сумарної дози 30 Гр із потенціюванням цисплатином 40 мг/м² щотижня. Заб.: гематоксиліном та еозином. Зб.: ок. 10; об. 20.

Рис. 2. Плоскоклетинний незроговілий РШМ. Поодинокі променеві цитомегали. Стан після ППТ по 2 Гр до сумарної дози 30 Гр із потенціюванням цисплатином 40 мг/м² щотижня. Заб.: гематоксиліном та еозином. Зб.: ок. 10; об. 20.

(Рис. 1,2 до статті А.Є. Крижанівської, Е.О. Кіндратів, І.О. Михайлюка «Патоморфоз раку шийки матки ІІВ стадії при передопераційній променевої терапії» с. 36–39)