

<https://doi.org/10.29296/25877305-2021-09-14>

Возрастные особенности экспрессии рецепторов мелатонина в кардиомиоцитах у пациентов с дилатационной кардиомиопатией

К.П. Кравченко¹, К.Л. Козлов¹,
Д.С. Медведев^{1,2}, В.О. Полякова^{3,4}, доктор биологических наук,
профессор, профессор РАН,

Е.С. Малютина⁴, Е.В. Борисова⁵, доктор медицинских наук

¹Санкт-Петербургский институт биорегуляции и геронтологии
²Научно-исследовательский институт гигиены, профпатологии
и экологии человека Федерального медико-биологического
агентства России, Санкт-Петербург

³Санкт-Петербургский государственный педиатрический
медицинский университет Минздрава России

⁴Белгородский государственный национальный
исследовательский университет

⁵Московский областной научно-исследовательский
клинический институт им. М.Ф. Владимирского, Москва

E-mail: longtermcare.fmba@gmail.com

Для понимания патогенеза дилатационной кардиомиопатии (ДКМП) необходимо установить молекулярно-клеточные механизмы старения миокарда, в том числе связанные с мелатонином. Мелатонин оказывает влияние на сосудистый тонус, связывание гладкомышечных клеток и эндотелия сосудов с собственными рецепторами (рецептор к мелатонину типа 1 – MR1A, рецептор к мелатонину типа 2 – MR1B) и воздействует на адренергические и пептидергические (вазоинтестинальный пептид и субстанция P) окончания периваскулярных нервов, что позволяет рассматривать мелатонин как важный предиктор развития ДКМП. Молекулярные механизмы такого взаимодействия до сих пор остаются недостаточно изученными.

Цель работы – изучение MR1A и MR1B в кардиомиоцитах пациентов с ДКМП *in vitro*.

Методы. Использовались метод первичных диссоциированных клеточных культур и метод иммунофлуоресцентной конфокальной лазерной микроскопии. Для моделирования клеточного старения применяли клетки 3-го и 10-го пассажей, соответствующие «молодым» и «старым» культурам.

Результаты. На молекулярном уровне старение кардиомиоцитов сопровождалось снижением в 3 раза уровня экспрессии MR1A по сравнению со «старыми культурами» как в контрольной группе, так и в группе с ДКМП (в 1,8 раз). Кроме того, наблюдалось снижение в 2 раза экспрессии MR1A в культурах клеток, взятых от пациентов с ДКМП, в сравнении с аналогичной культурой нормальных кардиомиоцитов. Экспрессия MR1B была достоверно ниже в группе с ДКМП по сравнению с контролем на 3-м пассаже. При старении культур уровень экспрессии MR1B был достоверно ниже в 3,9 раз в группе с ДКМП по сравнению с контролем. Схожие тенденции исследованных маркеров могут свидетельствовать о том, что в патогенез ДКМП вовлечены оба рецептора мелатонина, также, возможно, вовлеченных в механизмы старения. Полученные данные позволят расширить понятие и сформировать диагностическую панель ДКМП у людей разного возраста.

Ключевые слова: гериатрия, кардиология, дилатационная кардиомиопатия, старения клеток сердца, рецепторы к мелатонину, клеточная культура, конфокальная микроскопия.

Для цитирования: Кравченко К.П., Козлов К.Л., Медведев Д.С. и др. Возрастные особенности экспрессии рецепторов мелатонина в кардиомиоцитах у пациентов с дилатационной кардиомиопатией. Врач. 2021; 32 (9): 68–71. <https://doi.org/10.29296/25877305-2021-09-14>

Хронологическое старение характеризуется изменениями межклеточной коммуникация, геномной нестабильностью, эпигенетическими изменениями, укорочением теломер, митохондриальной дисфункцией, истощением пула стволовых клеток и клеточным старением [1, 2].

Дилатационная кардиомиопатия (ДКМП) является заболеванием сердечной мышцы со структурными и функциональными нарушениями миокарда [3]. Клиническая картина определяется левосторонней или бивентрикулярной дилатацией с систолической дисфункцией миокарда при отсутствии факторов гемодинамической перегрузки (гипертонии, пороков клапанов сердца, врожденные аномалии сердца) или коронарной патологии (ИБС) [4, 5]. ДКМП – одна из основных причин сердечной недостаточности (СН), серьезность данной патологии обусловлена преимущественным поражением людей молодого возраста и тем, что она часто приводит к необходимости трансплантации сердца [6, 7]. В 2016 г. экспертами европейской рабочей группы предложено новое определение кардиомиопатии как «клинического континуума ДКМП», включающего промежуточные варианты с изменением фенотипа у носителей мутаций от субклинической формы до полного проявления признаков заболевания [8].

Причины развития ДКМП:

- инфекционные причины (как исход миокардита, либо развитие на фоне миокардита) – вирусные, бактериальные, грибковые, риккетсиозные, паразитарные (например, при болезни Чагаса);
- токсические причины – алкогольное поражение сердца, медикаментозные воздействия (антрациклины, доксорубин и др.), тяжелые металлы (кобальт, ртуть, мышьяк, свинец) [4, 9].

Регулярное употребление алкоголя ≥ 80 г/день в течение >5 лет часто приводит к дилатации и дисфункции левого желудочка (ЛЖ) [10].

Распространенность ассоциированных с возрастом заболеваний, в том числе атеросклеротических нарушений или СН, возрастает при хронологическом старении [11, 12]. Известно, что мелатонин (N-ацетил-5-метокситриптамин) – гормон, который вырабатывается в эпифизе, сетчатке и кишечнике. Он и его рецепторы играют важную роль в восприятии и контроле боли. Суточные колебания в восприятии боли описаны и у животных, и у человека. Известно, что интенсивность боли у пациентов в темное время суток снижается, а у здоровых людей в ночное время определяется пролонгированная латенция в ответ на болевую стимуляцию [13].

Выявлена важная роль клеток с маркерами старения в прогрессировании сердечно-сосудистой патологии [14]. К маркерам старения клеток относят мелатонин и его рецепторы [7, 15].

Поскольку мелатонин проникает через биологические мембраны, он может оказывать свое действие практически во всех клетках. Некоторые из его эффектов рецепторно опосредованы, другие не зависят от рецепторов [7, 16, 17]. Основные эффекты мелатонина связаны с его действием на мембранные рецепторы к мелатонину типов 1 (MR1A) и 2 (MR1B) [3], которые относятся к семейству рецепторов, связанных с G-белками. Эти рецепторы отвечают за хронобиологические эффекты и регуляцию циркадного ритма. MR1A и MR1B также представлены в периферических органах и клетках и способствуют, например, в некоторой степени иммунологическим реакциям и вазомоторному контролю. По данным литературы, уровень рецепторов мелатонина с возрастом имеет тенденцию к снижению. MR1A в большей мере ответственны за вазоконстрикцию, в то время как MR1B в основном вызывают вазодилатацию [10].

Известно, что мелатонин, MR1A и MR1B влияют на вегетативную регуляцию сердечно-сосудистой системы. С возрастом уровень экспрессии мелатонина и его рецепторов снижается, что негативно сказывается на работе сердечно-сосудистой системы. У пациентов с ИБС или СН не выявлено снижения ночной концентрации в сыворотке мелатонина, что касается пациентов с ДКМП, таких исследований не проводилось. Введение мелатонина увеличивает тонус блуждающего нерва и уменьшает уровень циркулирующего норадреналина [2].

До сих пор не изучен вопрос, обладают ли кардиомиоциты у пациентов с ДКМП преждевременным фенотипом старения или стареют как обычные клетки. В связи с этим целью исследования явилось изучение MR1A и MR1B в кардиомиоцитах пациентов с ДКМП *in vitro*.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ

Ткань миокарда человека для создания культур (диаметр 0,2 см, 4 фрагмента) была забрана от 3 пациентов (мужчины; средний возраст – $52,3 \pm 2,6$ года) с ДКМП при биопсии сердца в Клинике сердечно-сосудистой хирургии Военно-медицинской академии им. С.М. Кирова (Санкт-Петербург). Извлечение образцов ткани осуществляли в стерильных условиях на базе операционного блока. Все пациенты подписали информированное согласие. После получения материала клетки опускали в стерильную емкость, содержащую физиологический раствор. Контролем служила культура нормальных кардиомиоцитов человека (линия GirardiHeart, полученная из коллекции клеточных культур Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Культуральная среда для кардиомиоцитов состояла из 86,5% EMEM, 10% FBS, 1% NEAA, 1,5% NEPEP, 1% PES, L-глутамин. Все культуры выращивали на протяжении 3 пассажей («молодые» клеточные культуры) и 10 пассажей («старые» клеточные

культуры). 10-й пассаж был выбран в качестве «старых» культур экспериментально, так как при последующих пересевах большая часть клеток культуры вступала в апоптоз.

Для иммуноцитохимического исследования культур применяли следующие первичные моноклональные антитела: MR1A (1:150, Abcam, Великобритания) и MR1B (1:150, Abcam, Великобритания). Окрашивание препаратов проводилось по стандартному протоколу. В качестве вторичных антител для проведения иммунофлуоресцентной реакции использовали антитела, конъюгированные с флуорохромом Alexa Fluor 647 (1:1000, Abcam, Великобритания). Срезы инкубировали 30 мин при комнатной температуре в темноте. Ядра клеток докрашивали Hoechst 33258 (Sigma, США). Визуализацию результатов иммунофлуоресцентного окрашивания осуществляли с помощью конфокального микроскопа Zeiss LSM 980.

Экспрессию для маркеров оценивали по площади, равной отношению площади покрытого иммунопозитивными клетками участка к общей площади клеток, расположенных в поле зрения. Площадь экспрессии измеряли в процентном отношении.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Методом иммунофлуоресцентной лазерной конфокальной сканирующей микроскопии исследовали маркеры MR1A и MR1B в культуре клеток кардиомиоцитов при длительном пассировании, моделирующем старение *in vitro*.

На рис. 1, характеризующем «молодую» культуру, большая часть клеток флуоресцирует красным цветом, что свидетельствует о высоком уровне иммунопозитивности к MR1A, тогда как в «старых» культурах многие клетки окрашены синим цветом, что свидетельствует об отсутствии в них экспрессии.

Площадь экспрессии MR1A на 3-м пассаже составляла $12,65 \pm 1,13\%$ в контрольной группе, тогда как при ДКМП выявлено достоверное снижение экспрессии данного маркера ($5,80 \pm 1,61\%$). При анализе уровня экспрессии MR1A в «старой» культуре установлено, что при ДКМП данный показатель снижался почти в 2 раза по сравнению с «молодой» культурой и был в 1,5 раза ниже по сравнению с уровнем экспрессии в контрольной группе (рис. 2).

Уровень экспрессии MR1B в «молодой» культуре кардиомиоцитов без сердечно-сосудистых патологий составил $9,25 \pm 0,95\%$, в процессе старения этот показатель снизился до $7,83 \pm 0,74\%$. В «молодой» культуре кардиомиоцитов с ДКМП площадь экспрессии исследуемого маркера составила $3,32 \pm 2,06\%$, что в 2,85 раза меньше, чем в контрольной группе. В процессе старения кардиомиоцитов, полученных от пациентов с ДКМП, площадь экспрессии MR1A составила $1,98 \pm 0,54\%$, что в 1,6 раза ниже, чем в контрольной группе на 10-м пассаже.

Для ДКМП хорошо изучены генетические факторы развития болезни, так есть список генов-кандидатов, мутации в которых особенно характерны для семейных форм заболевания, однако имеется и приобретенная ДКМП, которая развивается из-за негенетических факторов – перенесенные заболевания и воздействие химических веществ [8, 18]. Частота выявления приобретенной ДКМП увеличивается по мере увеличения

возраста пациентов. Таким образом, можно проследить связь между развитием болезни и старением организма в целом, поэтому исследование маркеров старения кардиомиоцитов поможет установить новые молекулярные маркеры этой патологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Понимание патогенеза ДКМП на молекулярном уровне наряду с диагностическими возможностями, открывает новые перспективы не только для персонализированной медицины, но и для разработки новых лечебных стратегий в области биogerонтологии и кардиологии.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Исследование не имело финансовой поддержки.

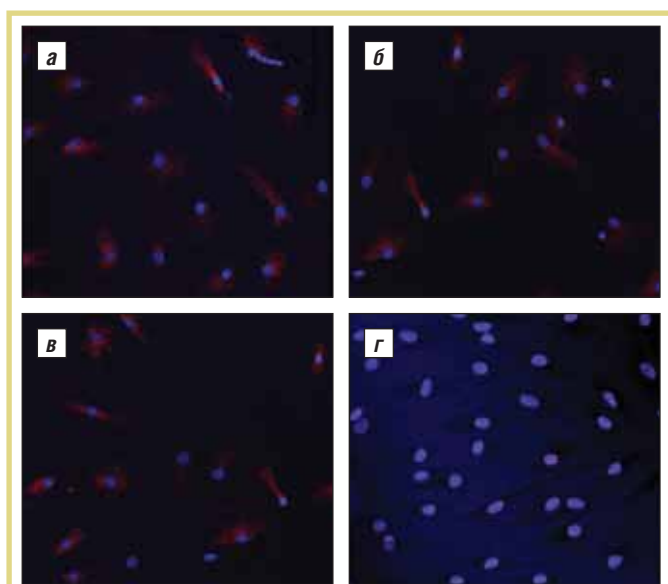


Рис. 1. Микрофотографии культуры клеток кардиомиоцитов, окрашенных с применением антител к MR1A: «молодая» культура в контроле (а) и при ДКМП (б); «старая» культура в контроле (в) и при ДКМП (г); лазерная конфокальная сканирующая микроскопия, $\times 20$
Fig. 1. Micrographs of cardiomyocyte cultures stained using anti-MR1A antibodies: young culture in control (a) and in DCM (б); old culture in control (в) and in DCM (г); laser confocal scanning microscopy, $\times 20$

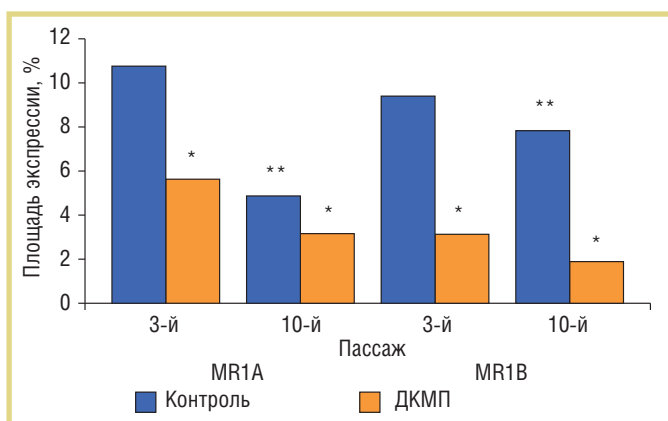


Рис. 2. Экспрессия MR1A и MR1B в культуре клеток кардиомиоцитов на разных пассажах

Примечание. * – $p < 0.05$, достоверное отличие от группы контроля;

** – $p < 0.05$, достоверное отличие от «молодой культуры».

Fig. 2. The expression of MR1A and MR1B in cardiomyocyte culture in different passages

Note. * $p < 0.05$, a significant difference from the control group; ** $p < 0.05$, a significant difference from the young culture.

Литература/Reference

- Anderson R., Lagnado A., Maggiorani D. et al. Length-independent telomere damage drives post-mitotic cardiomyocyte senescence. *EMBO J.* 2019; 38 (5): e100492. DOI: 10.15252/embj.2018100492
- Shimizu I., Minamino T. Cellular senescence in cardiac diseases. *J Cardiol.* 2019; 74 (4): 313–9. DOI: 10.1016/j.jjcc.2019.05.002
- McNally E.M., Mestroni L. Dilated Cardiomyopathy: Genetic Determinants and Mechanisms. *Circ Res.* 2017; 121 (7): 731–48. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309396
- Guzzo-Merello G., Cobo-Marcos M., Gallego-Delgado M. et al. Alcoholic cardiomyopathy. *World J Cardiol.* 2014; 6 (8): 771–81. DOI: 10.4330/wjcv.6.i8.771
- Schultheiss H.P., Fairweather D., Caforio A.L.P. et al. Dilated cardiomyopathy. *Nat Rev Dis Primers.* 2019; 9 (5): 32. DOI: 10.1038/s41572-019-0084-1
- Anderson R., Richardson G.D., Passos J.F. Mechanisms driving the ageing heart. *Exp Gerontol.* 2018; 109: 5–15. DOI: 10.1016/j.exger.2017.10.015
- Pinto Y.M., Elliott P.M., Arbustini E. et al. Proposal for a revised definition of dilated cardiomyopathy, hypokinetic non-dilated cardiomyopathy, and its implications for clinical practice: A position statement of the ESC working group on myocardial and pericardial diseases. *Eur Heart J.* 2016; 37: 1850–8. DOI: 10.1093/eurheartj/ehv727
- Weintraub R.G., Semsarian C., Macdonald P. Dilated cardiomyopathy. *Lancet.* 2017; 390 (10092): 400–14. DOI: 10.1016/S0140-6736(16)31713-5
- Elliott P., Andersson B., Arbustini E. et al. Classification of the cardiomyopathies: a position statement from the European Society of Cardiology Working Group on Myocardial and Pericardial Diseases. *Eur Heart J.* 2008; 29 (2): 270–6. DOI: 10.1093/eurheartj/ehm342
- Lopez-Otin C., Blasco M.A., Partridge L. et al. The hallmarks of aging. *Cell.* 2013; 153 (6): 1194–217. DOI: 10.1016/j.cell.2013.05.039
- Japp A.G., Gulati A., Cook S.A. et al. The Diagnosis and Evaluation of Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2016; 67 (25): 2996–3010. DOI: 10.1016/j.jacc.2016.03.590
- Merlo M., Cannata A., Gobbo M. et al. Evolving concepts in dilated cardiomyopathy. *Eur J Heart Fail.* 2018; 20 (2): 228–39. DOI: 10.1002/ejhf.1103
- Курганова Ю.М., Данилов А.Б., Горячев Д.В. Мелатонин и боль. *Журнал неврологии и психиатрии им. СС. Корсакова.* 2014; 114 (6): 31–7 [Kurganova Yu.M., Danilov A.B., Goriachev D.V. Melatonin and pain. *Zhurnal Nevrologii i Psikhiiatrii imeni S.S. Korsakova.* 2014; 114 (6): 31–7 (in Russ.)].
- Japp A.G., Gulati A., Cook S.A., et al. The Diagnosis and Evaluation of Dilated Cardiomyopathy. *J Am Coll Cardiol.* 2016; 67 (25): 2996–3010. DOI: 10.1016/j.jacc.2016.03.590
- Рапопорт С.И., Голиченков В.А. Мелатонин: теория и практика. М.: Медпрактика-М, 2009; 100 с. [Rapoport S.I., Golichenkov V.A. Melatonin: teoriya i praktika. M.: Medpraktika-M, 2009; 100 p. (in Russ.)].

16. Arendt J., Bojkowski C., Folkard S. et al. Some effects of melatonin and the control of its secretion in humans. *Ciba Found Symp.* 1985; 117: 266–83. DOI: 10.1002/9780470720981.ch16

17. Arendt J. Melatonin in humans: it's about time. *J Neuroendocrinol.* 2005; 17 (8): 537–8. DOI: 10.1111/j.1365-2826.2005.01333.x

18. Вайханская Т.Г., Сивицкая Л.Н., Курушко Т.В. и др. Дилатационная кардиомиопатия: новый взгляд на проблему. *Российский кардиологический журнал.* 2019; 4: 35–47 [Vaykhanskaya T.G., Sivitskaya L.N., Kurushko T.V. et al. Dilated cardiomyopathy: reconceptualization of the problem. *Russian Journal of Cardiology.* 2019; 4: 35–47 (in Russ.)]. DOI: 10.15829/1560-4071-2019-4-35-47

AGE-RELATED FEATURES OF MELATONIN RECEPTOR EXPRESSION IN THE CARDIOMYOCYTES OF PATIENTS WITH DILATED CARDIOMYOPATHY

K. Kravchenko¹; K. Kozlov¹; D. Medvedev^{1,2}; Professor V. Polyakova^{3,4}, Biol.D; Professor of the Russian Academy of Sciences; E. Malyutina⁴; E. Borisova⁵, MD

¹Saint Petersburg Institute of Bioregulation and Gerontology

²Research Institute of Hygiene, Occupational Diseases, and Human Ecology, Federal Biomedical Agency of Russia, Saint Petersburg

³Saint Petersburg State Pediatric Medical University, Ministry of Health of Russia

⁴Belgorod State National Research University

⁵M.F. Vladimirovsky Moscow Regional Research Clinical Institute, Moscow

To understand the pathogenesis of dilated cardiomyopathy (DCM), it is necessary to establish the molecular and cellular mechanisms of myocardial aging, including those associated with melatonin. The latter affects vascular tone, the binding of smooth muscle cells and vascular endothelium to their own receptors (melatonin receptor type 1A (MR1A), melatonin receptor 1B (MR1B)) and acts on the adrenergic and peptidergic (vasointestinal peptide and substance P) endings of perivascular nerves, which allows melatonin to be considered as an important predictor of the development of DCM. The molecular mechanisms of this interaction still remain insufficiently studied.

Objective: to study MR1A and MR1B in the cardiomyocytes of patients with DCM in vitro.

Methods. Primary dissociated cell cultures and immunofluorescence confocal laser scanning microscopy were used. Passages 3 and 10 cells corresponding to young and old cultures were applied to model cellular senescence.

Results. At the molecular level, cardiomyocyte senescence was accompanied by a 3-fold decrease in the level of MR1B expression compared to the old cultures in both the control and the DCM groups (by 1.8 times). Furthermore, there was a 2-fold decrease in MR1A expression in the cell cultures taken from patients with DCM compared with the similar culture of normal cardiomyocytes. The expression of MR1B was significantly lower in the DCM group than that in the control group in passage 3. With aging in the cultures, the level of MR1B expression was significantly lower by 3.9 times in the DCM group than that in the control group. The similar trends in the studied markers may suggest that both melatonin receptors are involved in the pathogenesis of DCM, which may also be involved in the mechanisms of aging. The findings will be able to expand the concept of DCM and to form its diagnostic panel in people of different ages.

Key words: geriatrics, cardiology, dilated cardiomyopathy, heart cellular senescence, melatonin receptors, cell culture, confocal microscopy.

For citation: Kravchenko K., Kozlov K., Medvedev D. et al. Age-related features of melatonin receptor expression in the cardiomyocytes of patients with dilated cardiomyopathy. *Vrach.* 2021; 32 (9): 68–71. <https://doi.org/10.29296/25877305-2021-09-14>

<https://doi.org/10.29296/25877305-2021-09-15>

Гериатрические аспекты микроморфологии эритроцитов периферической крови у пациентов с сахарным диабетом

Т.В. Павлова¹, доктор медицинских наук, профессор, **И.И. Поваляева²**, **Н.Б. Пилькевич¹**, доктор медицинских наук, профессор, **Л.А. Павлова¹**, доктор медицинских наук, профессор, **И.Ю. Гончаров^{1,3}**, кандидат физико-математических наук, доцент
¹Белгородский государственный национальный исследовательский университет
²Детская областная клиническая больница, Белгород
³Белгородский государственный технологический университет им. В.Г. Шухова
E-mail: pavlova@bsu.edu.ru

Изучены гериатрические аспекты морфофункциональных характеристик клеток периферической крови (эритроцитов) у 1488 пациентов (женщин – 765, возраст – 45–79 лет; мужчин – 723, возраст – 45–89 лет) с сахарным диабетом (СД) типа 1 (СД1) и 2 (СД2), а также с синдромом старческой астении (ССА). Установлено, что показатели анализа крови пациентов имели разнонаправленные изменения в зависимости от развития сопутствующих заболеваний (СД1, СД2, ССА), а также возраста и пола. Скорость оседания эритроцитов и среднее содержание гемоглобина (Hb) преваляировали во всех исследуемых группах пациентов в возрасте 45–59 лет, в группах пациентов 60–89 лет – не отличались или были незначительно снижены. Количество и средний объем эритроцитов в исследуемых группах всех возрастов был незначительно выше, чем в контрольной группе. При СД2 и ССА у пациентов в возрасте 45–59 лет показатель средней концентрации Hb был незначительно снижен, а в группе СД1, наоборот, незначительно повышен. У пациентов в возрасте 60–89 лет данный показатель при СД1 был снижен, и повышен при СД2 и ССА.

Ключевые слова: гериатрия, эндокринология, сахарный диабет, гериатрические синдромы, эритроциты атомно-силовая микроскопия.

Для цитирования: Павлова Т.В., Поваляева И.И., Пилькевич Н.Б. и др. Гериатрические аспекты микроморфологии эритроцитов периферической крови у пациентов с сахарным диабетом. *Врач.* 2021; 32 (9): 71–75. <https://doi.org/10.29296/25877305-2021-09-15>

С возрастом в организме человека происходит ряд морфофункциональных изменений [1–6]. В первую очередь, это касается эндокринной сферы [7], в том числе работы поджелудочной железы. Уже в 40–45 лет в ней начинают происходить возрастные изменения, сперва на микроскопическом уровне, а с 55–60 лет – на макроскопическом. К 80 годам масса поджелудочной железы уменьшается на 60% [4].