

ВПЛИВ N-АЦЕТИЛЦИСТЕЇНУ ТА ЛОЗАРТАНУ НА МОДУЛЮВАННЯ ЦИТОПРОТЕКТОРНОЇ АУТОФАГІЇ В МІОКАРДІ ЩУРІВ ПРИ ЕКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМУ ЦУКРОВОМУ ДІАБЕТІ 1 ТИПУ (ЗА ДАНИМИ ЕЛЕКТРОННОЇ МІКРОСКОПІЇ)

Ситник І.М., Стеченко Л.О., Кривошеєва О.І., Натрус Л.В., Хайтович М.В.

Національний медичний університет імені О.О. Богомольця, м. Київ, Україна

Мета роботи. Вивчити особливості аутофагії за стрептозотоцин-індукованого ЦД 1 типу та її зміни при застосуванні різних фармакологічних схем N-ацетилцистеїну та лозартану.

Матеріали та методи. Цукровий діабет 1 типу (ЦД1) моделювали введенням щурам стрептозотоцину (STZ) у дозі 50 мг/кг. Дослідні тварини були розподілені на 5 груп: контроль (група інтактних щурів); ЦД1 (група модельних тварин із STZ ЦД1, які отримували 0,9% фізіологічний розчин); NAC (група діабетичних щурів, які отримували N-ацетилцистеїн у дозі 1,5 г/кг per os); LOS (група діабетичних щурів, які отримували лозартан у дозі 20 мг/кг per os); NAC+LOS (група діабетичних тварин, які отримували комбінацію N-ацетилцистеїну та лозартану). Матеріалом для електронномікроскопічних досліджень були ділянки міокарду лівого шлуночка серця.

Результати. В кардіоміоцитах щурів із STZ ЦД1 встановлено структурні зміни метаболічного характеру (зміни у мітохондріях ендоплазматичній сітці, лізосомах та аутофагосомах). У дослідній групі NAC встановлено ультраструктурні ознаки активації білоксинтетичних процесів в кардіоміоцитах направлених на новоутворення міофібрил на тлі гіпертрофії органел метаболічного плану; активувалися процеси аутофагії. У групі LOS на ряду зі зменшенням кількості аутофагосом відмічались більш суттєві uszkodження у енергетичному та скоротливому апараті кардіоміоцитів: деструкція мітохондрій, перескорочення міофібрил та їх локальний лізис, білкова дистрофія, локальний парцеальний некроз цитоплазми кардіоміоцитів. У групі NAC+LOS також значно зменшувалася кількість аутофагосом і відмічались дистрофічні зміни в кардіоміоцитах та порушення гемомікроциркуляторного русла.

Висновки. За даними електронномікроскопічного дослідження, NAC виявив більшу ефективність у відновленні аутофаготичної цитопротекторної системи, що пояснюється його модулюючим впливом на мішень оксидативний стрес-аутофагія, що може стати новою терапевтичною стратегією у пошуку селективних кардіопротекторних лікарських засобів для пацієнтів із діабетичною кардіоміопатією.

Ключові слова: цукровий діабет 1 типу, стрептозотоцин, N-ацетилцистеїн, лозартан, кардіоміоцити, аутофагія.

Вступ. Серцево-судинні ускладнення часто є причиною смертності серед пацієнтів із цукровим діабетом (ЦД). Так, гостра гіперглікемія пов'язана із госпітальною летальністю, серцевою недостатністю та кардіогенним шоком [1].

В останню декаду активно вивчається роль мікромолекулярних процесів у розвитку серцевої патології; активно ведуться пошуки нових мішеней, які підвищують активність аутофагії у кардіоміоцитах, що дозволяє досліджувати потенційні селективні кардіопротекторні лікарські засоби [2-7], в т.ч і при ЦД [8-16].

Аутофагія (з грец. – «самопідання») – це внутрішньоклітинний катаболічний процес деградації (що зберігається еволюційно в еукаріот), при якому такий цитоплазматичний вміст як неправильно конформовані білки та зруйновані органели поглинаються двомембранними аутофагосомами та руйнуються в лізосомах при взаємодії із аутофагосомами. Загалом, аутофагія розгляда-

ється як неселективна деградаційна система, на відміну від убіквітин-протеасомної системи UPS [1, 17, 18].

Авторами дослідження [1] було встановлено, що на молекулярному рівні, ЦД ініціює апоптоз міокардіоцитів, знижуючи кардіальну аутофагію, що і зумовлює розвиток діабетичної кардіоміопатії (ДК). Відомо, що гіперглікеміє-індукований оксидативний стрес (ОС) призводить до формування пошкоджених клітинних білків, які повинні елімінуватися через убіквітин-протеасомний (UPS) шлях або аутофагію. При порушенні даних механізмів, підвищується ризик погіршення серцевої функції та навіть летальності [8]. Це вказує на ключову роль ОС у регуляції аутофагії і можливості застосування препаратів із антиоксидантною дією для модулювання кардіопротекторної аутофагії з метою профілактики та корекції ДК.

Значну увагу привертає на себе антиоксидантний препарат N-ацетилцистеїн (NAC). В експерименті на

моделі ішемії/реперфузії, NAC значно знижував індукований ОС та кардіальний апоптоз, запобігаючи пост-ішемічній аутофагії при ЦД [19]. Нашими попередніми дослідженнями було встановлено позитивний вплив N-ацетилцистеїну та лозартану на серцевий ритм, шлуночкову скорочувальну активність та ознаки гіпертрофії у щурів на ранній стадії ДК [20]. Проте, залишається невирішеним питання, чи будуть NAC та LOS виявляти кардіопротекторний вплив через механізми активації аутофагії у щурів на моделі ДК.

Мета роботи. Вивчити особливості аутофагії за стрептозотозин-індукованого ЦД 1 типу та її зміни при застосуванні різних фармакологічних схем N-ацетилцистеїну та лозартану.

Матеріали та методи. Дослідження проведені на 54 щурах-самцях лінії Wistar масою 220-250 г. Щури вирощувались і утримувались у віварії Національного медичного університету імені О.О. Богомольця. Усі маніпуляції були проведені відповідно до Закону України № 3447-IV «Про захист тварин від жорстокого поводження» та згідно з «Директивою Європейського Союзу 2010/10/63 EU про захист хребетних тварин, що використовуються для експериментальних та інших наукових цілей» [21].

Цукровий діабет 1 типу моделювали введенням стрептозотозину (STZ) (Sigma, США) у дозі 50 мг/кг у цитратному буферному розчині (рН 4,5) одноразово інтраперитоніально відповідно до методичних рекомендацій [22]. Через 72 год після ін'єкції STZ, дослідним щурам вимірювали рівень глюкози крові хвостової вени використовуючи глюкометр Accu-Chek Performa Nano (Roche Diagnostics, Німеччина). В експерименті досліджували щурів із рівнем глюкози більше 15 ммоль/л.

Дослідні тварини були розподілені на 5 груп: контроль (n=6; група інтактних щурів); ЦД1 (n=7; група модельних тварин із стрептозотозинним ЦД1, які отримували 0,9% фізіологічний розчин); NAC (n=8; група діабетичних щурів, які отримували N-ацетилцистеїн (Фарма-старт) у дозі 1,5 г/кг per os); LOS (n=7; група діабетичних щурів, які отримували лозартан (Zentiva) у дозі 20мг/кг per os); NAC+LOS (n=6; група діабетичних тварин, які отримували комбінацію N-ацетилцистеїну та лозартану). Досліджувані лікарські засоби (ЛЗ) експериментальним тваринам вводили через 1 тиждень після індукції ЦД протягом 5 тижнів.

Матеріалом для електронномікроскопічних досліджень були ділянки міокарду лівого шлуночка серця. Фрагменти міокарду фіксували 1% розчином чотириокису осмію на веронал-ацетатному буфері за Колфільдом. Зневоднювали у спиртах 70%, 80%, 90%, 100% зростаючої концентрації та ацетоні. Заливали у суміш епону та аралдиту, згідно із загальноприйнятою методикою [23].

Напівтонкі та ультратонкі зрізи з блоків отримували на ультратомі LKB (Швеція). Напівтонкі зрізи забарвлювали метиленовим синім та за Науат [24] Ультратонкі зрізи контрастували 2% насиченим розчином ураніацетату та цитратом свинцю. Препарати досліджували

під електронним мікроскопом Сумського ВО «Selmi» ПЕМ-125К.

Результати та їх обговорення. Через 5 тижнів з моменту моделювання ЦД1 електронномікроскопічне дослідження показало, що у лівому шлуночку міокарда щурів в цілому зберігається ультраструктурна організація кардіоміоцитів. Мітохондрії різних розмірів, більшість гіпертрофовані і сягають 5-9 мкм, а найменші 0,2 мкм (рис.1А,Б; 2А,Б). Практично у всіх клітинах мітохондрії тісно контактують з лізосомами, кількість яких збільшена, порівняно з групою контролю. Мітохондрії у зоні цитолізу мають зруйновані зовнішні і внутрішні мембрани. У частині кардіоміоцитів наявний підсарколемальний набряк, де спостерігається збільшення кількості аутофагосом, які проникають у міжклітинний простір через локально ушкоджену сарколему (рис.1А,Б). Натомість у ендотеліоцитах відмічається локальний лізис цитоплазматичної мембрани, як апікальної так і базальної поверхні з виходом формених елементів крові, що підтверджується їх периваскулярним розміщенням (рис.1).

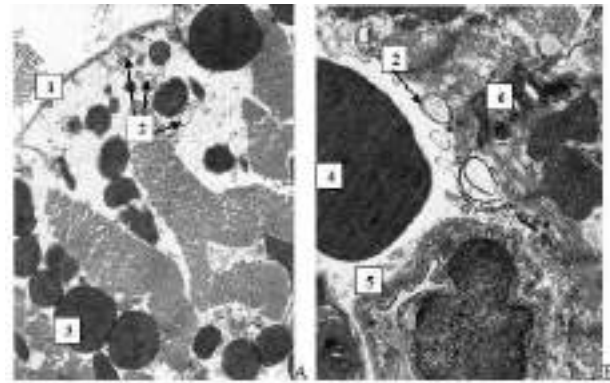


Рис.1 Фрагменти міокарда лівого шлуночка щурів через 5 тижнів моделювання ЦД1: підсарколемальний набряк (1), аутофагосоми (2), мітохондрії (3), еритроцит у периваскулярному просторі (4), просвіт капіляра (5), контакт двох кардіоміоцитів (6). Зб. А - x 14000; Б - x18000

У периваскулярному просторі також виявляються скупчення колагенових волокон, що є результатом активації фібробластів і, очевидно, є свідченням склерозування міокарду (рис.3А). У ендотелії судин гемомікроциркуляторного русла визначається підвищена кількість мікропіноцитозних пухирців, функція яких полягає у трансендотеліальному переносі речовин, що може свідчити про розвиток компенсаторно-приспосувальних процесів у цей термін спостереження.

Окрім того, для ендотелію характерний шокостан, тобто ущільнення ядра та цитоплазми, що може розглядатися як передаптозний (рис.4Б). Просвіт кровоносних капілярів обтурується форменими елементами крові: лімфоцитами та гемолізованими еритроцитами, що є опосередкованим свідченням ішемії (рис.3 В,Г).

При застосуванні NAC у щурів з ЦД1 зберігалась гетерогенність структурної організації міокарда, що виявлялась у наявності кардіоміоцитів з різним ступенем

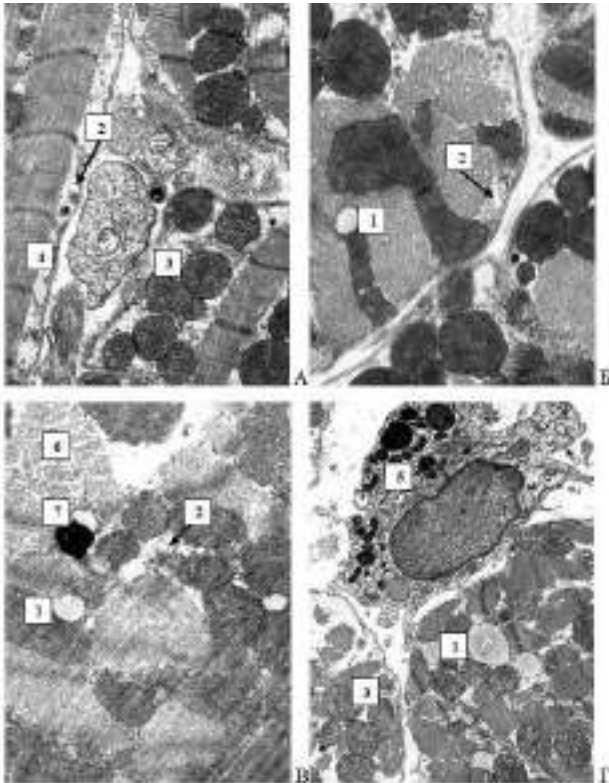


Рис.2. Фрагменти міокарда лівого шлуночка щурів через 5 тижнів моделювання ЦДІ: жиrowі включення (1), аутофагосоми (2), мітохондрії (3), секвестри цитоплазми та аутофагосоми у периваскулярному просторі (4), макрофаг (5), лізіс міофібрил (6) у оточенні аутофагосом та лізосами (7). Зб. А, Г – $\times 18000$; Б – $\times 14000$; В – $\times 10000$

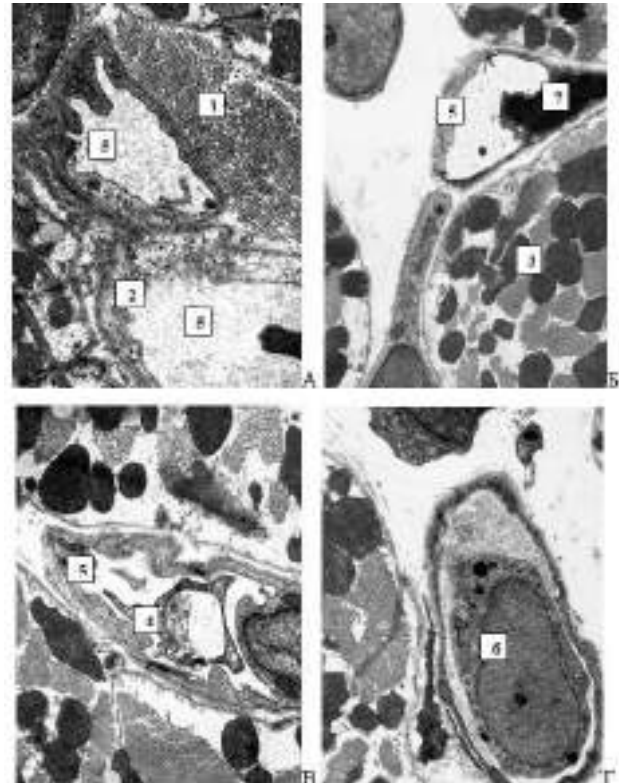


Рис.3. Фрагменти міокарда лівого шлуночка щурів через 5 тижнів моделювання ЦДІ: колагенові волокна (1), локальний лізіс плазмолемми ендотеліоцита (2), мітохондрії (3), гемолізований еритроцит (4), просвіт капіляра (5), лімфоцит у просвіті капіляра (6), шоківий ендотеліоцит (7). Зб. А – $\times 14000$; Б, В, Г – $\times 12000$.

проходження. Разом з тим, слід зазначити, що ступінь змін, порівняно із нелікованими тваринами групи ЦДІ значно зменшувалися. Перед усім, це стосувалося, скоротливого та енергетичного апаратів кардіоміоцитів. Практично не визначалось перескорочення міофібрил. Більшість кардіоміоцитів містили міофібрили організовані у чітко структуровані саркомери (рис.4 А,Б).

На відміну від міокарда щурів групи ЦДІ, які не отримували корекцію, де переважали процеси перескорочення, ультраструктура саркомерів у групі НАС відповідає такій контрольній групі. Після курсу НАС у міокарді частіше траплялись кардіоміоцити з ознаками дилатації міофібрил. При цьому кількість мітохондрій значно збільшувалась, особливо у місцях репарації міофібрил, де спостерігались скупчення рибосом, безпосередньо на міофіламентах, як білок синтезуючі органили, у супроводі мітохондрій, що забезпечують ці процеси енергією (рис. 5 А, Б). Разом з тим частина мітохондрій була гіпертрофована, що вказує на перебіг компенсаторно-приспосувальних процесів на тлі репаративних.

Структурна організація енергетичного апарату кардіоміоцитів зазнає позитивних змін на фоні НАС. Так, спостерігалось зменшення електронної щільності матриксу мітохондрій, краще візуалізувались їх кристи порівняно з групою ЦДІ (рис 4, 5). Морфологічною ознакою розвитку компенсаторних процесів є поява як

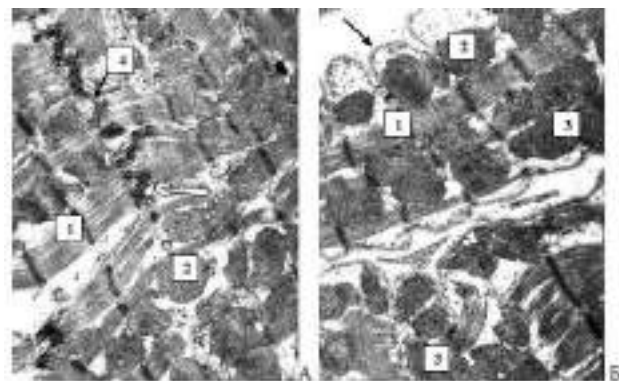


Рис.4. Фрагменти міокарда лівого шлуночка щурів з ЦДІ, які отримували N-ацетицистеїн: міофібрили (1), мітохондрії (2), гіпертрофована мітохондрія (3), сарколема (!), вставний диск (4). Зб. А, Б – $\times 14000$

дрібних, юних мітохондрій, так і їх гіпертрофованих форм, що досягають довжини 8-12мкм. Разом з тим спостерігались гігантські форми мітохондрій з частково лізованими мембранами та деструкцією крист (рис 6 А). Звертає на себе увагу значна кількість аутофагосом у групі тварин, які отримували НАС, що свідчить про активацію з одного боку аутолітичних процесів, а з

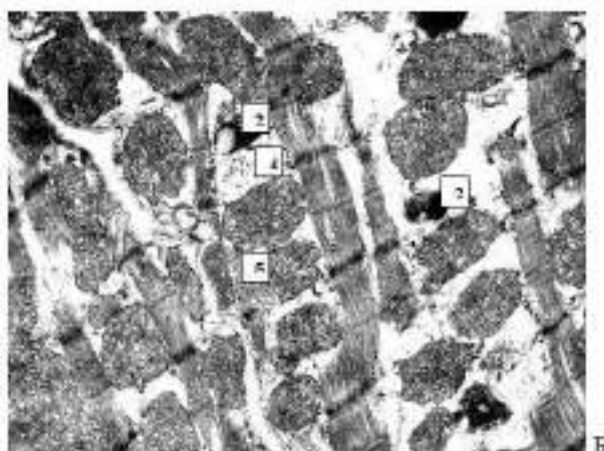
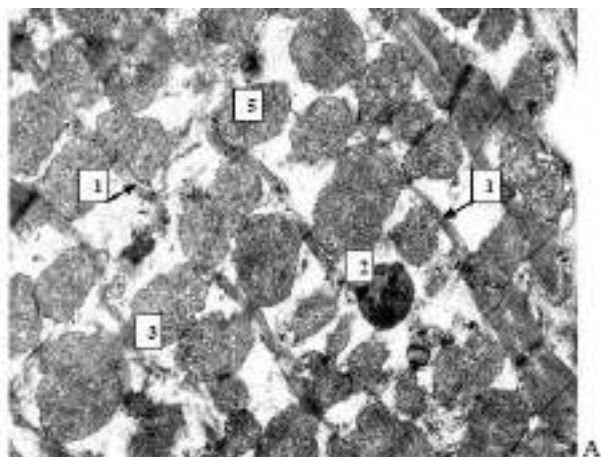


Рис.5. Фрагменти міокарда лівого шлуночка щурів з ЦДІ, які отримували *N*-ацетилицтеїн: міофібрили (1), лізосома (2), рибосома (3), аутофагосома (4), мітохондрія (5). Зб. А,Б - $\times 18000$

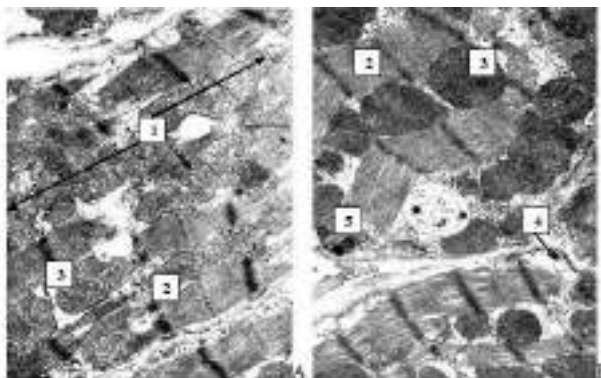


Рис.6. Фрагменти міокарда лівого шлуночка щурів з ЦДІ, які отримували *N*-ацетилицтеїн: гіпертрофована мітохондрія (1), міофібрили (2), мітохондрії (3), аутофагосома (4), лізосома (5). Зб. А,Б - $\times 14000$.

іншого підтримання клітинного гомеостазу та елімінації небажаних (порушених, аберантних) внутрішньоклітинних білків (рис 6 Б).

При застосуванні НАС відзначалися компенсаторно-приспосувальні процеси і в кровоносному руслі, більшість ендотеліальних клітин гемокапілярів містять

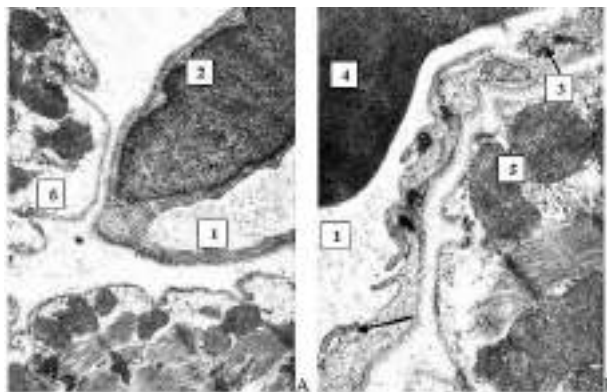


Рис.7. Фрагменти міокарда лівого шлуночка щурів з ЦДІ, які отримували *N*-ацетилицтеїн: просвіт судини (1), ядро ендотеліоцита (2), везикули (3), міжендотеліальний контакт (3), еритроцит (4), мітохондрії (5), підсарколемальний набряк (6). Зб. А - $\times 12000$; Б - $\times 18000$.

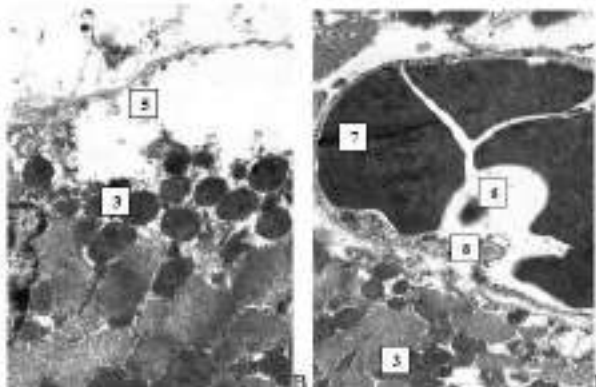
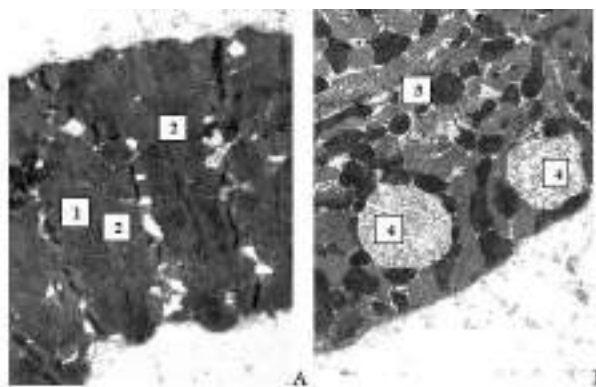


Рис.8. Фрагменти міокарда лівого шлуночка щурів з цукровим діабетом, які отримували лозартан: міофібрили (1), каналіці гладенької ендоплазматичної сітки (2), мітохондрії (3), парціальний некроз цитоплазми (4), підсарколемальний набряк (5), просвіт капіляра(6), еритроцит у просвіті капіляра (7), ендотеліоцит (8). Зб. А,Б, Г - $\times 12000$; В - $\times 14000$.

ядра з рівномірно розподіленим еухроматином, у цитоплазмі цих клітин виявляється значна кількість мікропіноцитозних везикул, що свідчить про активність метаболічних процесів. Спостерігаються ендотеліоцити, які мають значно стоншену цитоплазму, що пов'язана з підсиленням трансендотеліального переносу речовин (рис 7 А, Б).

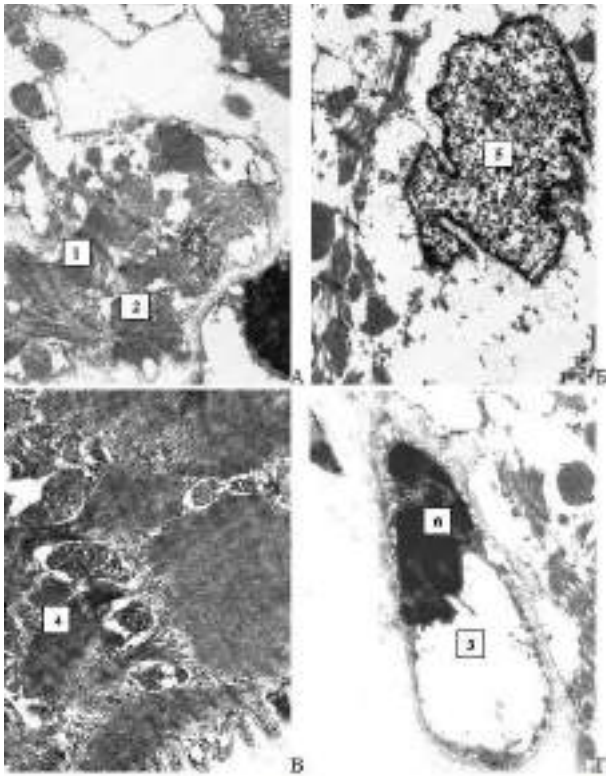


Рис.9. Фрагменти міокарда лівого шлуночка щурів з ЦДІ, які отримували

N-ацетилцистейн та лозартан: контрактура міофібрил (1), мітохондрії (2), просвіт капіляра (3), гофрована сарколема (4), ядро кардіоміоцита (5), шоковий ендотеліоцит (6). Зб. А,Б,В,Г – $\times 14000$

Електронномікроскопічне дослідження міокарда щурів з ЦДІ при застосуванні LOS показало, значні зміни, як в кардіоміоцитах, так і в гемомікроциркуляторному руслі. В частині кардіоміоцитів спостерігається значне перекорочення міофібрил, серед яких трапляються поодинокі мітохондрії та розширені каналці гладенької ендоплазматичної сітки в зоні триад (рис. 8 А). В іншій частині визначаються прояви парціального некрозу цитоплазми з накопиченням білкових конгломератів та підсарколемальний набряк (рис. 8 Б,В). Мітохондрії переважно середнього розміру з гомогенізованим матриксом підвищеної електронної щільності, в яких не чітко виявляються кристи, а в деяких органелах пошкоджена зовнішня і внутрішня мембрана (рис.8Б,В). В кровоносних судинах гемомікроциркуляторного русла значно стоншене ендотеліальне вистелення, в клітинах якого відсутні мікропіноцитозні пухирці, що свідчить про порушення трансендотеліального транспорту речовин. У деяких із судин просвіт обтурований форменими елементами крові, що свідчить про наявність ішемії (рис. 8 Г).

При сумісному застосуванні NAC та LOS в міокарді щурів з ЦДІ відмічається виражений набряк в кардіоміоцитах, як підсарколемальний, так і парануклеарний, в зоні якого пошкодженні енергетичний і скоротливий апарати клітин. Відмічається лізис міофібрил, деяких

мітохондрій та контактів між клітинами (вставних дисків) (рис. 9 А, Б). З іншого боку, спостерігаються кардіоміоцити підвищеної електронної щільності за рахунок перекорочення міофібрил. Структурна організація останніх порушена, не виявляються саркомери, як за рахунок перекорочення, так і за рахунок лізису міофібрил. Сарколема таких клітин має гофрований вигляд. Практично у всіх клітинах мітохондрії мають електронощільний гомогенізований матрикс, в якому не визначаються структуровані кристи, а в органелах де частково вони є - спостерігається лізис зовнішньої та внутрішньої мембран (рис. 9 А, Б, В). Крім внутрішньоклітинного набряку, виявляється переваскулярний набряк, результатом якого, очевидно, є ушкодження кровоносних капілярів. У внутрішньому вистеленні останніх спостерігаються «шокові» клітини з електронощільним хроматином, які характеризують передапоптозний стан ендотеліоцитів. При цьому ендотелій, окрім того, що він значно стоншений, у ньому визначаються ділянки локального лізису, як люменальної, так і базальної мембран (рис. 9 Г).

Таким чином, нами було відмічено, що в кардіоміоцитах щурів із експериментальним ЦДІ зміни структури носять переважно метаболічний характер, на що вказують зокрема зміни у мітохондріях ендоплазматичної сітки, лізисах та аутофагосомах. Як відомо, мітохондрії є найбільш критичною мішенню для пошкодження в умовах ОС. Доведено, що при цьому активується мітофагія – спеціалізована форма аутофагії, що відповідає за елімінацію мітохондрій [18, 25]. На сьогоднішній день, роль аутофагії при серцевій недостатності мало вивчена. Цікаво, що аутофагія може мати захисний вплив на кардіоміоцити за фізіологічних умов, так і навпаки, може викликати їх прогресуючу деструкцію за патологічних станів [18, 26]. Згідно сучасних уявлень, аутофагія є відповіддю на клітинний стрес до процесу апоптозу [27]. Так, в експерименті було показано, що посилення процесу аутофагії є вирішальним у механізмі ішемії/реперфузії при ЦД на ряду із ОС [19].

Активно обговорюється роль ініціації аутофаготичної активності, що асоціюється із кардіопротекцією (в т.ч. при ДК) в ряду експериментальних робіт [8-14]

Застосування NAC як препарату антиоксидантної дії, дозволило встановити ультраструктурні ознаки активації білоксинтетичних процесів в кардіоміоцитах направлених на новоутворення міофібрил на тлі гіпертрофії органел метаболічного плану. При цьому виявлялась активація аутофагально-лізосомальної системи та всі ознаки посилення трансендотеліального переносу речовин на протипагу парацелюлярному транспорту, що здійснюються через міжендотеліальні контакти, які в даному випадку ущільнені. Автори дослідження [19] навпаки, вказують на те, що 4-х тижневе застосування NAC сприяло зменшенню надмірної аутофагії у діабетичних тварин із міокардіальною ішемією/реперфузією разом із зменшенням рівнів 15-F2t-IsoP, IL-6, TNF-5 та апоптозу. Такі відмінності можна пояснити тим, що аутофаготична активність підвищується при гіпоксії/реоксигенації та ішемії/реперфузії міокарда [26, 28].

Не менш важливим механізмом в активації аутофагії є вплив на ренін-ангіотензин-альдостеронову систему. Так, на моделях *in vitro* та *in vivo*, було встановлено, що ангіотензин II (АГ II) відіграє ключову роль у розвитку серцевого ремоделювання, пов'язаного зі змінами аутофагії. При цьому, фармакологічна корекція з пептидом АГ-(1-7) протидіяла надмірній АГ II -індукованій аутофагії та ОС [6]. У наших дослідженнях отримана протилежна тенденція. Застосування антагоністу рецепторів до АГ II – LOS у щурів з ЦДІ асоціювалось із суттєвим зменшенням кількості аутофагосом порівняно з групою тварин, які отримували НАС. При цьому спостерігалось більш суттєве ушкодження у енергетичному та скоротливому апараті кардіоміоцитів, що проявлялись в деструкції мітохондрій, перескороченні міофібрил їх локальному лізису, білковій дистрофії, локальному парцеальному некрозу цитоплазми кардіоміоцитів.

При сумісному застосуванні препаратів НАС та LOS також відмічались дистрофічні зміни в кардіоміоцитах та порушення гемомікроциркуляторного русла, при цьому суттєво зменшувалась кількість аутофагосом.

Висновки. Таким чином, на початковому етапі розвитку ДК, підвищена регуляція аутофагії виявляє протекторний ефект на міокард. Більш виражені зміни в кардіоміоцитах спричинюють мітохондріальну дисфункцію, акумуляцію пошкоджених мітохондрій та інших клітинних структур, які ініціюють клітинну смерть.

Отже, за даними електронномікроскопічного дослідження, НАС виявив більшу ефективність у відновленні аутофаготичної цитопротекторної системи, що пояснюється його модулюючим впливом на мішень ОС-аутофагія, що може стати новою терапевтичною стратегією у пошуку селективних кардіопротекторних лікарських засобів для пацієнтів із ДК.

ЛІТЕРАТУРА

1. *Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases* / Y. Mei, M. D. Thompson, R. A. Cohen [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta* 1852. – 2015. – Vol. 2015. – P. 243–251. – Режим доступу: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.005>
2. *Repetitive stimulation of autophagy-lysosome machinery by intermittent fasting preconditions the myocardium to ischemia/reperfusion injury* / R. J. Godar, X. Ma, H. Liu [et al.] // *Autophagy*. – 2015. – Vol. 11, N 9. – P. 1537–1560.
3. *Role of TFEB mediated autophagy, oxidative stress, inflammation, and cell death in endotoxin induced myocardial toxicity of young and aged mice* / F. Li, F. Lang, H. Zhang [et al.] // *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*. – 2016. – Режим доступу: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5380319>
4. *Tubulin hyperacetylation is adaptive in cardiac proteotoxicity by promoting autophagy* / P. M. McLendon, B. S. Ferguson, H. Osinska [et al.] // *PNAS*. – 2014. – Vol. 111, N 48. – P. E5178–E5186. – Режим доступу: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1415589111
5. *STAT1 deficiency in the heart protects against myocardial infarction by enhancing autophagy* / J. McCormick, N. Suleman, T. M. Scarabelli [et al.] // *J. Cell. Mol. Med.* – 2012. – Vol. 16, N 2. – P. 386–393.
6. *Mas receptor mediates cardioprotection of angiotensin - (1-7) against Angiotensin II-induced cardiomyocyte autophagy and cardiac remodeling through inhibition of oxidative stress* / Li Lin, Xuebo Liu, Jianfeng Xu [et al.] // *J. Cell. Mol. Med.* – 2016. – Vol. 20, N 1. – P. 48–57.
7. *Acute consumption of a high-fat diet prior to ischemia-reperfusion results in cardioprotection through NFκB-dependent regulation of autophagic pathways* / L. Haar, X. Ren, Y. Liu [et al.] // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2014. – N 307. – P. H1705–H1713.
8. *Adams B. Partial inhibition of the ubiquitin-proteasome system ameliorates cardiac dysfunction following ischemia-reperfusion in the*

presence of high glucose / B. Adams, R. F. Mapanga, M. F. Essop // *Cardiovasc Diabetol*. – 2015. – N 14. – P. 94–109.

9. *Early administration of trimetazidine attenuates diabetic cardiomyopathy in rats by alleviating fibrosis, reducing apoptosis and enhancing autophagy* / L. Zhang, W. Ding, Zh. Wang [et al.] // *J Transl Med*. – 2016. – N 14. – P. 109–121.

10. *Hemeoxygenase-1 prevents cardiac dysfunction in streptozotocin-diabetic mice by reducing inflammation, oxidative stress, apoptosis and enhancing autophagy* / Y. Zhao, L. Zhang, Y. Qiao [et al.] // *PLoS ONE*. – 2013. – N 8(9). – e75927. – Режим доступу: <http://doi:10.1371/journal.pone.0075927>

11. *MST1 coordinately regulates autophagy and apoptosis in diabetic cardiomyopathy in mice* / M. Zhang, L. Zhang, J. Hu [et al.] // *Diabetologia*. – 2016. – doi:10.1007/s00125016-4070-9. – Режим доступу: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00125-016-4070-9>

12. *Rho-Kinase inhibitor fasudil suppresses high glucose-induced H9c2 cell apoptosis through activation of autophagy* / H. Gao, F. Hou, R. Dong. [et al.] // *Cardiovasc Ther*. – 2016. – doi: 10.1111/1755-5922.12206. [Epub ahead of print]. – Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27333569>

13. *ZLN005 protects cardiomyocytes against high glucose-induced cytotoxicity by promoting SIRT1 expression and autophagy* / W. Li, X. Li, B. Wang, Y. Chen [et al.] // *Exp Cell Res*. – 2016. – N 345(1). – P. 25–36. – doi: 10.1016/j.yexcr.2016.05.012. [Epub 2016 May 18]. – Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27208585>

14. *Turan B. Resveratrol and diabetic cardiac function: focus on recent in vitro and in vivo studies* / B. Turan, E. Tuncay, G. Vassort // *J Bioenerg Biomembr*. – 2012. – N 44(2). – P. 281–296. – doi: 10.1007/s10863-012-9429-0. – Режим доступу: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22437738>

15. *Mitochondrial JNK activation triggers autophagy and apoptosis and aggravates myocardial injury following ischemia/reperfusion* / J. Xu, X. Qin, X. Cai [et al.] // *Biochimica et Biophysica Acta* 1852. – 2015. – P. 262–270. – Режим доступу: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.012>

16. *Autophagy is involved in the cardioprotection effect of remote limb ischemic preconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury in normal mice, but not diabetic mice* / Han Zh., Cao J., Song D., Tian L., Chen K., Wang Y. [et al.] // *PLoS ONE*. – 2014. – N 9(1). – e86838. – doi:10.1371/journal.pone.0086838

17. *Danrui C. Cullin-RING ligases in regulation of autophagy* / C. Danrui, X. Xiufang, Zh. Yongchao // *Cell Div*. – 2016. – N 11. – P. 1–8. – DOI 10.1186/s13008-016-0022-5

18. *Gottlieb R.A. Autophagy: an affair of the heart* / R.A. Gottlieb, R.M. Mentzer // *Heart Fail Rev*. – 2013. – N 18. – P. 575–584.

19. *N-acetylcysteine attenuates diabetic myocardial ischemia reperfusion injury through inhibiting excessive autophagy* / S. Wang, C. Wang, F. Yan [et al.] // *Mediators of Inflammation*. – 2017. – Vol. 2017. – P. 1–10. – Article ID 9257291.

20. *Ситник І.М. Вплив N-ацетилцистеїну та лозартану на ранні електрокардіографічні зміни у щурів із стрептозоточином цукровим діабетом 1 типу* / І.М. Ситник, М.В. Хайтович, Н.П. Черновол // *Український науково-медичний молодіжний журнал*. – 2016. – N 3 (46). – С. 5–11.

21. *Council Directive 2010/63/EU of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes* // *Official Journal of the European Communities*. – 2010. – L 276. – P. 33–79.

22. *Low-Dose Streptozotocin Induction Protocol (Mouse)* / *The University of Michigan Medical Center*, Frank Brosius, 2003 -Edited by RAM 04/09/03. – 3p.

23. *Каруну В.Я. Електронна мікроскопія* / В.Я. Каруну. – Киев: Вища школа, 1984. – 208с.

24. *Hayat M.A. Principles and techniques of electron microscopy: biological applications* / M.A. Hayat. – Cambridge: Cambridge University Press, 2000. – 543 p.

25. *Moyzis A.G. Mending a broken heart: the role of mitophagy in cardioprotection* / A.G. Moyzis, J. Sadoshima, E.B. Gustafsson // *Am J Physiol Heart Circ Physiol*. – 2015. – Vol. 308. – P. H183–H192.

26. *Pharmacological modulation of autophagy to protect cardiomyocytes according to the time windows of ischaemia/reperfusion* / X. Qiulin, L. Xixian, L. Yongkang [et al.] // *British Journal of Pharmacology*. – 2015. – N 172. – P. 3072–3085.

27. *Анализ кардіопротекторного впливу небиволола на ультраструктуру міокарда при регенеративно-пластическій серцевій недостатності у крыс* / Кротова Ю.Н., Хлопонин Д.П., Хлопонин П.А., Архимова Т.В. // *Биомедицина*. – 2012. – N 1. – С. 86–92.

28. Meng-Qing M. A 6 hour therapeutic window, optimal for interventions targeting AMPK synergism and apoptosis antagonism, for cardioprotection against myocardial ischemic injury: an experimental study on rats / M. Meng-Qing, A.T. Bisharad, L. Xian-He// *Am J Cardiovasc Dis.* – 2015. – N 5(1). – P.63-71.

REFERENCES

1. Mei, Y., Thompson, M. D., Cohen, R. A., Tong, X.Y. (2015). *Autophagy and oxidative stress in cardiovascular diseases.* *Biochimica et Biophysica Acta* 1852, 2015, 243–251. Retrieved from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.005>
2. Godar, R.J., Ma, X., Liu, H., Murphy, J.T., Weinheimer, C.J., Kovacs, A. et al. (2015). Repetitive stimulation of autophagy-lysosome machinery by intermittent fasting preconditions the myocardium to ischemia/reperfusion injury. *Autophagy*, 2015; 11(9), 1537–1560.
3. Li, F., Lang, F., Zhang, H., Xu, L., Wang, Y., Hao, E. (2016). Role of TFEB mediated autophagy, oxidative stress, inflammation, and cell death in endotoxin induced myocardial toxicity of young and aged mice. *Oxidative Medicine and Cellular Longevity*, 2016. Retrieved from: <http://dx.doi.org/10.1155/2016/5380319>
4. McLendon, P.M., Ferguson, B.S., Osinska, H., Bhuiyana, Sh., James, J., McKinsey, T.A. et al. (2014). Tubulin hyperacetylation is adaptive in cardiac proteotoxicity by promoting autophagy. *PNAS*, 111(48), E5178–E5186. Retrieved from: www.pnas.org/cgi/doi/10.1073/pnas.1415589111
5. McCormick, J., Suleman, N., Scarabelli, T.M., Knight, R.A., Latchman, D.S., Stephanou, A. et al. (2012). *STAT1 deficiency in the heart protects against myocardial infarction by enhancing autophagy.* *J. Cell. Mol. Med.*, 16(2), 386–393.
6. Li, L., Xuebo, L., Jianfeng, X., Liqing, W., Jun, R., Junbo, G. et al. (2016). Mas receptor mediates cardioprotection of angiotensin - (1-7) against Angiotensin II-induced cardiomyocyte autophagy and cardiac remodeling through inhibition of oxidative stress. *J. Cell. Mol. Med.*, 20(1), 48–57.
7. Haar, L., Ren, X., Liu, Y., Koch, S.E., Goines, J., Tranter, M. et al. (2014). Acute consumption of a high-fat diet prior to ischemia-reperfusion results in cardioprotection through NFκB-dependent regulation of autophagic pathways. *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 307, H1705–H1713.
8. Adams, B., Mapanga, R. F., Essop, M.F. (2015). Partial inhibition of the ubiquitin–proteasome system ameliorates cardiac dysfunction following ischemia–reperfusion in the presence of high glucose. *Cardiovasc Diabetol*, 14, 94–109.
9. Zhang, L., Ding, W., Wang, Zh., Tang, M., Wang, F., Li, Y. et al. (2016). Early administration of trimetazidine attenuates diabetic cardiomyopathy in rats by alleviating fibrosis, reducing apoptosis and enhancing autophagy. *J Transl Med*, 14, 109–121.
10. Zhao, Y., Zhang, L., Qiao, Y., Zhou, X., Wu, G., Wang, L. et al. (2013). Hemeoxygenase-1 prevents cardiac dysfunction in streptozotocin-diabetic mice by reducing inflammation, oxidative stress, apoptosis and enhancing autophagy. *PLoS ONE*, 8(9), e75927. Retrieved from: <http://doi:10.1371/journal.pone.0075927>
11. Zhang, M., Zhang, L., Hu, J., Jie, L., Tingting, W., Yu, D. et al. (2016). MST1 coordinately regulates autophagy and apoptosis in diabetic cardiomyopathy in mice. *Diabetologia*. -doi:10.1007/s00125016-4070-9. Retrieved from: <http://link.springer.com/article/10.1007%2Fs00125-016-4070-9>
12. Gao, H., Hou, F., Dong, R., Wang, Z., Zhao, C., Tang, W., Wu, Y. (2016). Rho-Kinase inhibitor fasudil suppresses high glucose-induced H9c2 cell apoptosis through activation of autophagy. *Cardiovasc Ther*, 2016. doi: 10.1111/1755-5922.12206. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27333569>
13. Li, W., Li, X., Wang, B., Chen, Y., Xiao, A., Zeng, D. et al. (2016). ZLN005 protects cardiomyocytes against high glucose-induced cytotoxicity by promoting SIRT1 expression and autophagy. *Exp Cell Res*, 345(1), 25–36. doi: 10.1016/j.yexcr.2016.05.012. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27208585>
14. Turan, B., Tuncay, E., Vassort, G. (2012). Resveratrol and diabetic cardiac function: focus on recent in vitro and in vivo studies. *J Bioenerg Biomembr*, 44(2), 281–96. doi: 10.1007/s10863-012-9429-0. Retrieved from: <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/22437738>
15. Xu, J., Qin, X., Cai, X., Yang, L., Xing, Y., Li, J. et al. (2015). Mitochondrial JNK activation triggers autophagy and apoptosis and aggravates myocardial injury following ischemia/reperfusion. *Biochimica et Biophysica Acta* 1852, 2015, 262–270. Retrieved from: <http://dx.doi.org/10.1016/j.bbadis.2014.05.012>
16. Han, Zh., Cao, J., Song, D., Tian, L., Chen, K., Wang, Y. et al. (2014). Autophagy is involved in the cardioprotection effect of remote limb ischemic preconditioning on myocardial ischemia/reperfusion injury in normal mice, but not diabetic mice. *PLoS ONE*, 9(1), e86838. doi:10.1371/journal.pone.0086838
17. Danrui, C., Xiufang, X., Yongchao, Zh. (2016). Cullin-RING ligases in regulation of autophagy. *Cell Div*, 11 (8). DOI 10.1186/s13008-016-0022-5
18. Gottlieb, R.A., Mentzer, R.M. (2013). *Autophagy: an affair of the heart.* *Heart Fail Rev.*, 18, 575–584.
19. Wang, S., Wang, C., Yan, F. et al. (2017). N-acetylcysteine attenuates diabetic myocardial ischemia reperfusion injury through inhibiting excessive autophagy. *Mediators of Inflammation*, 2017, Article ID 9257291.
20. Sytnyk, I.M., Khaitovych, M.V., Chernovol, N.P. (2016). Vplyv N-atsetylsysteinu ta losartanu na ranni elektrokardiografichni zminy u shchuriv iz streptozototsynovym tsukrovym diabetom 1 typu. *Ukrainskyi naukovo-medychnyi molodizhnyi zhurnal*, 3 (46), 5–11.
21. Council Directive 2010/63/EU of 22 September 2010 on the protection of animals used for scientific purposes. (2010). *Official Journal of the European Communities*, 276, 33–79.
22. Animal Models of Diabetic Complications Consortium (AMDCC) Protocols. (2003). Low-Dose Streptozotocin Induction Protocol (Mouse), The University of Michigan Medical Center.
23. Karupu, V.Ya. (1984). *Elektronnaia mykroskopiya.* Kyev: Vyscha shkola.
24. Hayat, M.A. (2000). Principles and techniques of electron microscopy: biological applications. Cambridge: Cambridge University Press.
25. Moyzis, A.G., Sadoshima, J., Gustafsson, E.B. (2015). *Mending a broken heart: the role of mitophagy in cardioprotection.* *Am J Physiol Heart Circ Physiol*, 308, H183–H192.
26. Qiulin, X., Xixian, L., Yongkang, L., Liang, Sh., Jingwen, Zh., Shiping, C. et al. (2015). Pharmacological modulation of autophagy to protect cardiomyocytes according to the time windows of ischaemia/reperfusion. *British Journal of Pharmacology*, 172, 3072–3085.
27. Krotova, Yu.N., Khloponyn, D.P., Khloponyn, P.A., Arkhypova, T.V. (2012). *Analiz kardyoprotekturnoho vliyannya nebyvolola na ultrastrukturu myokarda pry reparatorno-plastycheskoi serdechnoi nedostatochnosti u krysa.* *Byomeditsyna*, 1, 86–92.
28. Meng-Qing, M., Bisharad, A.T., Xian-He, L. (2015). A 6 hour therapeutic window, optimal for interventions targeting AMPK synergism and apoptosis antagonism, for cardioprotection against myocardial ischemic injury: an experimental study on rats. *Am J Cardiovasc Dis*, 5(1), 63–71.

ВЛИЯНИЕ N-АЦЕТИЛЦИСТЕИНА И ЛОЗАРТАНА НА МОДУЛИРОВАНИЕ ЦИТОПРОТЕКТОРНОЙ АУТОФАГИИ В МИОКАРДЕ КРЫС ПРИ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОМ САХАРНОМ ДИАБЕТЕ 1 ТИПА (ПО ДАННЫМ ЭЛЕКТРОННОЙ МИКРОСКОПИИ)

Сытник И.Н., Стеченко Л.А., Кривошеева Е.И.,
Натрус Л.В., Хайтович Н.В.

Национальный медицинский университет имени
А.А. Богомольца, г. Киев, Украина

Цель работы. Изучить особенности аутофагии при стрептозотокцин-индуцированном СД 1 типа и ее изменения при применении различных фармакологических схем N-ацетилцистеина и лозартана.

Материалы и методы. Сахарный диабет 1 типа (СД1) моделировали введением крысам стрептозотокцина (STZ) в дозе 50 мг/кг. Опытные животные были распределены на 5 групп: контроль (группа интактных крыс); СД1 (группа модельных животных со STZ СД1, получавших 0,9% физиологический раствор); NAC (группа диабетических крыс, получавших N-ацетилцистеин в дозе 1,5 г/кг *per os*); LOS (группа диабетических крыс, получавших лозартан в дозе 20 мг/кг *per os*); NAC+LOS (группа диабетических животных, получавших комбинацию N-ацетилцистеина и лозартана). Материалом для электронномикроскопических исследований были участки миокарда левого желудочка сердца.

Результаты. В миокардиоцитах крыс со STZ СД1 установлено структурные изменения метаболического характера (изменения в митохондриях эндоплазматической сетке, лизосомах и аутофагосомах). В опытной группе NAC установлены ультраструктурные признаки активации белоксинтетических процессов в миокардиоцитах направленных на новообразование миофибрилл на фоне гипертрофии органелл метаболического плана; активировались процессы аутофагии. В группе LOS наряду с уменьшением количества аутофагосом отмечались более существенные повреждения в энергетическом и сократительном аппарате кардиомиоцитов: деструкция митохондрий, пересокращение миофибрилл и их локальный лизис, белковая дистрофия, локальный парцельный некроз цитоплазмы кардиомиоцитов. В группе NAC+LOS также значительно уменьшалось количество аутофагосом и отмечались дистрофические изменения в миокардиоцитах и нарушения гемомикроциркуляторного русла.

Выводы. По данным электронномикроскопического исследования, NAC проявил большую эффективность в восстановлении аутофаготической цитопротекторной системы, что объясняется его модулирующим воздействием на мишень окислительный стресс-аутофагия, что может стать новой терапевтической стратегией в поиске селективных кардиопротекторных лекарственных средств для пациентов с диабетической кардиомиопатией.

Ключевые слова: сахарный диабет 1 типа, стрептозотокцин, N-ацетилцистеин, лозартан, кардиомиоциты, аутофагия.

INFLUENCE OF N-ACETYLCYSTEINE AND LOSARTAN ON MODULATION OF CYTOPROTECTIVE AUTOPHAGY IN MYOCARDIUM OF RATS WITH EXPERIMENTAL TYPE 1 DIABETES MELLITUS (FOR ELECTRONIC MICROSCOPY EXPLANATION)

I.M. Sytnyk, L.O. Stechenko, O.I. Krivosheeva L.V. Natrus,
M.V. Khaitovych

Bogomolets National Medical University, Kyiv, Ukraine

The purpose of the research work is to study the features of the autophagy in case of the streptozotocin-induced type 1 diabetes mellitus and its changes in the application of different pharmacological schemes, such as N-acetylcysteine (NAC) and losartan (LOS).

Materials and methods. Type 1 diabetes mellitus (DM1) was induced by intraperitoneal injection of streptozotocin (STZ) at the dose of 50 mg/kg. Animals were randomly divided into 5 groups: Control (intact rats); DM1 (untreated diabetic control rats supplemented with 0.9% normal saline *per os*); NAC (diabetic rats treated with N-acetylcysteine at a dose 1.5g/kg *per os*); LOS (diabetic rats treated with losartan at a dose 20mg/kg *per os* as reference drug); NAC+LOS (diabetic rats treated with combination of NAC and LOS *per os*). The portions of the left ventricle myocardium were the material of the electromicroscopical research studies.

Results. Metabolic type structural changes (changes in mitochondria of endoplasmatic reticulum, lysosome and autophagosome) were found out in the cardiac cells of rats with the STZ DM1. In the NAC experimental group, ultrastructural features of upregulation of the protein secretion in the cardiac cells were found out and directed against newly created myofibrilla in the setting of the hypertrophy of the metabolic type cell organelle; the autophagy processes started to work. In the LOS experimental group, major contraction damages of cardiomyocytes were found out along with decreasing number of autophagosomes: disorganization of mitochondria, anastalsis of myofibrilla and its localized lysis, albuminous degeneration, localized fractional necrosis of cardiomyocytes' cytoplasm. In the NAC+LOS experimental group, the number of the autophagosome also considerably decreased; the cardiomyocytes' burned-out changes and disruption of microcirculation were found out.

Summary. Due to the data of the electromicroscopical research study, NAC was found out as more effective restitution of the autophagy cytoprotective system, it was caused by its modulating action on oxidative stress-autophagy target that can become a new treatment strategy in searching of selective cardioprotective drugs for the patients with diabetic cardiomyopathy.

Key words: type 1 diabetes mellitus, streptozotocin, N-acetylcysteine, losartan, cardiomyocytes, autophagy.