

ЭКСПРЕССИЯ ГЕНОВ, АССОЦИИРОВАННЫХ С ПРОЦЕССОМ АУТОФАГИИ, В МИОКАРДЕ ПАЦИЕНТОВ С ГИПЕРТРОФИЧЕСКОЙ КАРДИОМИОПАТИЕЙ РАЗЛИЧНОЙ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ ЭТИОЛОГИИ

Сухарева К. С., Михалева А. И., Гурщенков А. В., Зайцев В. В.,
Козырева А. А., Андреева С. Е., Гаврилова Л. С.,
Моисеева О. М., Костарева А. А., Гребенник В. К., Гордеев М. Л.

Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр имени
В. А. Алмазова» Министерства здравоохранения Российской
Федерации, Санкт-Петербург, Россия

Контактная информация:
Сухарева Ксения Сергеевна,
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова»
Минздрава России,
ул. Аккуратова, д. 2, Санкт-Петербург,
Россия, 197341.
E-mail: sukhareva_ks@almazovcentre.ru

Статья поступила в редакцию 11.12.2023
и принята к печати 03.01.2024.

Резюме

Наиболее часто встречающийся вид кардиомиопатии у пациентов — гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП), определяемая по утолщению стенки левого желудочка. Одной из наиболее частых причин развития данного вида патологии являются мутации в генах саркомерных белков. Однако имеется большой процент пациентов, у которых не удается установить четкую причину развития ГКМП вследствие отсутствия мутаций причинных генов. Формирование выраженной гипертрофии миокарда стимулировало изучение внутриклеточных процессов поддержания гомеостаза, в частности аутофагии. Будучи одним из основных механизмов контроля качества белка в мышечных клетках, нарушение процесса аутофагии присутствовало при наличии мутаций саркомерных белков. Именно поэтому в данной работе мы сфокусировались на изучении изменения экспрессии основных маркеров, связанных с процессом аутофагии в образцах ткани миокарда, полученных от лиц с диагностированной ГКМП. Исследуемая группа пациентов была разделена на несколько подгрупп для сравнения полученных результатов в зависимости от найденной мутации. Было выявлено, что экспрессия маркеров аутофагии и гомеостаз митохондрий у пациентов с ГКМП, ассоциированной с наличием саркомерных мутаций, отличались от экспрессии данных генов относительно группы сравнения. В то время как в образцах от пациентов с мутациями в генах Z-диска, а также в генах, кодирующих лизосомальные ферменты, изменений экспрессии исследуемых маркеров процесса аутофагии обнаружено не было.

Ключевые слова: аутофагия, гипертрофическая кардиомиопатия, гомеостаз, протеостаз, саркомер, Z-диск.

Для цитирования: Сухарева К.С., Михалева А.И., Гурщенков А.В. и др. Экспрессия генов, ассоциированных с процессом аутофагии, в миокарде пациентов с гипертрофической кардиомиопатией различной генетической этиологии. Трансляционная медицина. 2024; 11(2): 170-180. DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-2-170-180. EDN: OMYQZC

GENE EXPRESSION ASSOCIATED WITH THE AUTOPHAGY PROCESS IN PATIENT'S MYOCARDIUM WITH HYPERTROPHIC CARDIOMYOPATHY OF VARIOUS GENETIC ETIOLOGY

Ksenia S. Sukhareva, Anna I. Mikhaleva,
Aleksandr V. Gurshchenkov, Vadim V. Zaitsev,
Aleksandra A. Kozyreva, Sofiia E. Andreeva, Lidiia S. Gavrilova,
Olga M. Moiseeva, Anna A. Kostareva, Vadim K. Grebennik,
Mikhail L. Gordeev

Corresponding author:

Ksenia S. Sukhareva,
Almazov National Medical Research Centre,
Akkuratova str., 2, Saint Petersburg, Russia,
197341.
E-mail: sukhareva_ks@almazovcentre.ru

Almazov National Medical Research Centre, Saint Petersburg, Russia

Received 11 December 2023; accepted
03 January 2024.

Abstract

The most common type of cardiomyopathy is hypertrophic cardiomyopathy (HCM), determined by wall thickening of the left ventricle. Most often the reason of this type of cardiomyopathy are mutations in genes encoding sarcomere proteins. However, in most cases it is not possible to establish a clear cause of the development of HCMP due to the absence of mutations of causal genes. The development of pronounced myocardial hypertrophy stimulated investigation of intracellular processes of maintaining homeostasis, in particular autophagy. Being one of the main mechanisms of protein quality control in muscle cells, at the impairment of autophagy was previously discussed in the presence of sarcomere proteins mutations. This work is focused on studying expression changes among main biochemical markers associated with the autophagy process in myocardial tissue samples obtained from patients with diagnosed HCMP. The study group of patients was divided into several subgroups to compare the results obtained depending on the mutation found. It was found that the expression of autophagy markers and mitochondrial homeostasis in patients with HCMP associated with the presence of sarcomere mutations differed from the expression of these genes relative to the comparison group. While in the samples from patients with Z-disk genes mutations, as well as in the genes encoding lysosomal enzymes, no expression changes of the studied autophagy markers were found.

Key words: autophagy, homeostasis, hypertrophic cardiomyopathy, proteostasis, sarcomere, Z-disk.

For citation: Sukhareva KS, Mikhaleva AI, Gurshchenkov AV, et al. Gene expression associated with the autophagy process in patient's myocardium with hypertrophic cardiomyopathy of various genetic etiology. Translational Medicine. 2024; 11(2): 170-180. (In Rus.) DOI: 10.18705/2311-4495-2024-11-2-170-180. EDN: OMYQZC

Список сокращений: ГКМП — гипертрофическая кардиомиопатия, МДЦ — мышечная дистрофия Дюшенна, СД1 — миотоническая дистрофия I типа, DRM — десмин-зависимая кардиомиопатия, MDC1A — врожденная мышечная дистрофия 1 типа, MFM — миофибриллярная миопатия, UPS — убиквитин протеасомная система, XLMTM — X-сцепленная миотубулярная миопатия.

Введение

Гипертрофическая кардиомиопатия (ГКМП) — наиболее часто встречающаяся кардиомиопатия (EURObservational Research Program of the European Society of Cardiology, 2015), определяемая по наличию выраженного утолщения стенки левого желудочка (с или без гипертрофии правого желудочка) или увеличению массы миокарда, не объ-

ясняемая исключительно условиями повышенной нагрузки (2023 ESC Guidelines for the management of cardiomyopathies). Наиболее частой причиной развития ГКМП являются патогенные варианты генов саркомерных белков (*MYBPC3*, *MYH7*, *TNNT2*, *TNNI3*, *TPM1*, *MYL3*), однако четкий генотип-специфический фенотип удается установить лишь для небольшой части причинных генов (<https://doi.org/10.1093/cvr/cvu014>, Modelling of Genetic Cardiac Diseases By Chandra Prajapati and Katriina Aalto-Setälä, DOI: 10.5772/intechopen.84965). Поиск факторов, модулирующих формирование выраженной гипертрофии миокарда левого желудочка, привел к изучению роли множества внутриклеточных процессов, принимающих участие в транскрипционной и посттранскрипционной регуляции экспрессии генов в ответ на наследственные и средовые факторы. Одним из таких внутриклеточных процессов является молекулярный контроль миокардиального протеостаза и контроль качества белков, для которого неоднократно была показана роль в развитии врожденной и приобретенной патологии миокарда. Во внутриклеточной системе контроля качества белков выделяют два основных пути: убиквитин-протеасомный путь и аутофагия [1]. Оба пути белковой деградации, убиквитин-протеасомная система (UPS) и аутофагия-лизосомальный протеолиз, являются взаимозависимыми, и нарушение одного пути приводит к нарушению другого [2, 3]. Так, нарушение регуляции UPS вызывает мышечную атрофию при врожденной мышечной дистрофии 1 типа (MDC1A) и мышечной дистрофии Дюшенна (МДД), сопровождающуюся накоплением неправильно свернутых белковых агрегатов [3–5]. При некоторых типах нервно-мышечных патологий, например, MDC1A, миотонической дистрофии I типа (СД1), аутофагия чрезмерно активирована, что приводит к уменьшению мышечной массы. В то время как при других заболеваниях, таких как X-сцепленная миотубулярная миопатия (XLMTM), миофибриллярная миопатия (MFM) и болезнь Данона, интенсивность процесса аутофагии может быть недостаточной для утилизации белковых агрегатов, таким образом, белковые включения накапливаются внутри клеток и инициируют развитие гипертрофии или псевдогипертрофии вследствие накопления недеградированных белковых масс [6–12].

Считается, что аутофагия в мышечных клетках является одним из основных механизмов регуляции метаболизма кардиомиоцитов, активирующихся в ответ на нагрузку и повреждение. Нормальное протекание процесса аутофагии является неотъемлемым условием для обеспечения струк-

турной стабильности мышечных волокон путем поддержания белкового гомеостаза. Однако в условиях стресса — во время голодания, в моменты высокой энергетической потребности или гемодинамической нагрузки — оптимальная скорость процесса аутофагии становится решающей для защиты клеток от повреждения, а нарушение регуляции аутофагии в миокарде может являться одной из ключевых причин развития патологий [13]. Обычно чрезмерная или недостаточная эффективность скорости процесса деградации белка за счет аутофагии в клетках сердца вызвана мутациями или отклонениями в структурных генах и белках мышечных волокон, а не прямым вмешательством в процесс аутофагии или его регуляции [6, 14].

В настоящее время одним из наиболее изучаемых видов кардиомиопатий, ассоциированных с накоплением белковых агрегатов, является десмин-зависимая кардиомиопатия (DRM). Однако включения белковых агрегатов также были описаны при кардиомиопатиях, вызванных мутациями в генах *FLNC* и *ZASP* [15, 16]. Наибольшее количество экспериментов по изучению роли аутофагии в патогенезе наследственных заболеваний миокарда было проведено с использованием трансгенных животных моделей с мутациями в гене *CRYAB*. Изменение динамики процесса аутофагии, экспрессирующей мутацию *CryabR120G*, было показано на кардиомиоцитах крысы. В этих кардиомиоцитах ключевые белки аутофагии, такие как ATG10, Beclin-1 и ATG5, экспрессировались на более низких уровнях, чем в контрольных образцах дикого типа [17], а стимуляция процесса аутофагии путем воздействия на экспрессию *Atg7* приводила к снижению содержания агрегатов и предотвращению гипертрофии и фиброза тканей миокарда [18].

Показано, что при развитии ГКМП вследствие мутаций в генах *MYBPC3* или *MYH7* в биопсийном материале миокарда пациентов обнаруживается увеличенное число аутофагических вакуолей и более высокий уровень LC3-II [19]. В то же время отсутствуют детальные данные об изменении в системе протеостаза миокарда у больных с ГКМП вследствие несаркомерных мутаций, а экспрессионных данных об изменении динамики процесса аутофагии при развитии ГКМП в зависимости от генетической этиологии заболевания в доступной литературе не встречается. В связи с этим целью данного исследования являлась оценка экспрессионного профиля ключевых генов, ассоциированных с процессом аутофагии в миокарде лиц с гипертрофической кардиомиопатией различной генетической этиологии.

Материалы и методы*Сбор материала пациентов*

Данная работа проводилась с использованием биопсийного материала миокарда пациентов с диагностированной гипертрофической кардиомиопатией ($n = 58$). Основные клинические и эхокардиографические характеристики исследуемой группы пациентов представлены в таблице 1.

Образцы тканей были получены из межжелудочковой перегородки. На основе данных генетического тестирования пациенты были разделены на две группы: лица с ГКМП без мутаций в генах (Mut-, $n = 35$), лица с ГКМП с выявленной мутацией (Mut+, $n = 23$). В то же время вторая группа пациентов была разделена еще на 2 группы: больные, у которых была выявленная мутация в генах, кодирующих саркомерные белки (*MYL1*, *MYBPC3*, *MYOM0*, *TNNC3*, *MYH7*, *MYL3* — SarcMut+), и пациенты, у кото-

рых выявленная мутация не относится к генам, кодирующим саркомерные белки (*ALPK3*, *LDB3*, *FLNC*, *ACTN1*, *FHOD3*, *GLA*, *PRKAG1*, *FHL1*, *TTR*, *SOS1* — SarcMut-). В дополнение, группа пациентов с несаркомерными мутациями была также разделена на две подгруппы: лица, у которых была выявлена мутация в генах, кодирующих белки Z-диска (*ALPK3*, *FLNC*, *ACTN1*, *FHOD* — Z-disk+), и группа пациентов, у которых выявленная мутация не относится к саркомерным генам или к генам Z-диска (*GLA*, *PRKAG1*, *TTR*, *SOS1* — Z-disk-) (рис. 1).

Выделение РНК из образцов миокарда

Выделение тотальной РНК из образцов тканей миокарда пациентов проводили с использованием набора для выделения РНК Extract RNA (Evrogen, Россия) согласно протоколу производителя. Для гомогенизации образцы ткани миокарда инкуби-

Таблица 1. Основные клинические и эхокардиографические характеристики исследуемой группы пациентов

Table 1. The main clinical and echocardiographic characteristics of studied group of patients

	Возраст*, лет	Возраст постановки диагноза, лет	ФВ Симпсон, %	Толщина стенки ЛЖ макс., мм	ИОЛП, мл/м ³	ИКДО, мл/м ³	РСДЛА, мм рт. ст.	Максимальный градиент ВТЛЖ, мм рт. ст.
Среднее (стандартное отклонение)	58.5 (±10.7)	52.1 (±12.3)	66.2 (±7.4)	21.5 (±4.4)	51.8 (±17.7)	54.8 (±17.7)	29.3 (±12.3)	100 (± 48.8)
Р, Шапиро-Уилк	0.060	0.005	0.539	0.002	< 0.001	0.037	< 0.001	< 0.001
	Пол	АГ	СД	ХСН	ИБС	ФП	Инсульт	Диастолическая дисфункция
Количество (%)	Женщины — 34 (59)	49 (84)	11 (19)	II ФК — 48 (83) III ФК — 9 (16)	20 (34)	19 (33)	8 (14)	1 тип — 31 (53) 2 тип — 18 (31) 3 тип — 4 (7) Нет — 5 (9)

Примечания: * — на момент исследования; АГ — артериальная гипертензия; ВТЛЖ — выносящий тракт левого желудочка; ИБС — ишемическая болезнь сердца; ИОЛП — индекс объема левого предсердия; ИКДО — индекс конечного диастолического объема; ЛЖ — левый желудочек; РСДЛА — расчетное систолическое давление в легочной артерии; СД — сахарный диабет; ФВ — фракция выброса; ФК — функциональный класс; ФП — фибрилляция предсердий; ХСН — хроническая сердечная недостаточность.

Note: * — at the time of the study; AH — arterial hypertension; OTLV — the outflow tract of the left ventricle; CHD — coronary heart disease; ILAV — index of left atrium volume; IFDV — index of final diastolic volume; LV — left ventricle; CSPPA — calculated systolic pressure in the pulmonary artery; DM — diabetes mellitus; EF — ejection fraction; FC — functional class; AF — atrial fibrillation; CHF — chronic heart failure.

ровали в растворе Extract RNA с использованием металлических шариков. Для лучшего эффекта гомогенизации образцы помещали в шейкер. Для лучшего преципитирования РНК, после добавления изопропанола образцы инкубировали в течение ночи при температуре -20°C . Концентрацию и качество выделенной РНК оценивали с помощью NanoDrop OneC (Thermo Fisher Scientific) и в 1 % агроном-геле.

Обратная транскрипция и ПЦР-РВ

Комплементарную ДНК (кДНК) синтезировали с использованием случайных праймеров и набора для обратной транскрипции MMLV (Evrogen, Россия). Смесь из 1 мкг РНК, 20 мкм случайных праймеров и воды, не содержащей РНКазы, инкубировали в течение 2 минут при 70°C . Пятикратный раствор буфера для первой цепи, 10 мм dNTP, 20 мм DTT и воды, не содержащей РНКазы, добавляли к предыдущей реакции и смешивали с 1 мкл (100 ед/мкл) обратной транскриптазы MMLV. Реакция синтеза включала следующие стадии: 10 минут при 25°C , 1 час при 37°C , 10 минут при 70°C . Экспрессию генов количественно определяли с помощью ПЦР-РВ с использованием qPCR mix-HS SYBR+ROX (Evrogen, Россия) в системе 7500 Real-TimePCRSytem (LifeTechnologies, США) с использованием 100 нМ специфичных прямых и обратных праймеров для генов-мишеней. Последовательности для праймеров приведены в таблице 2.

Условия для проведения ПЦР-РВ были следующими: 95°C в течение 5 минут, затем 45 циклов при 95°C в течение 15 секунд и 60°C в течение 1 минуты. Для получения кривых плавления конечных продуктов ПЦР была проведена заключительная стадия нагрева от 65°C до 95°C . Уровень экспрессии GAPDH использовали для нормализации изменений в экспрессии представляющих интерес генов. Для относительной количественной оценки экспрессии генов рассчитывали $RQ = 2(-\Delta\Delta Ct)$ и использовали для сравнения экспрессии генов в исследуемых образцах. Для разработки праймеров, специфичных для конкретной цели, был использован инструмент Primer-BLAST (табл. 2).

Статистический анализ

Относительная количественная оценка экспрессии генов рассчитывалась по формуле: $RQ = 2(-\Delta\Delta Ct)$. Нормировка экспрессии генов производилась на GAPDH для всех исследуемых образцов. Для статистической обработки данных и построения графиков использовалась программа GraphPad. Различия экспрессии генов между группами пациентов без обнаруженных мутаций (Mut-) и пациентов, у которых была выявлена какая-либо мутация (Mut+), проводилось относительно образцов пациентов без мутаций (Mut-). Дополнительный анализ экспрессии генов в образцах с мутациями для всех групп (SarcMut+, Z-disk-, Z-disk+) проводился относительно группы образцов, в ко-

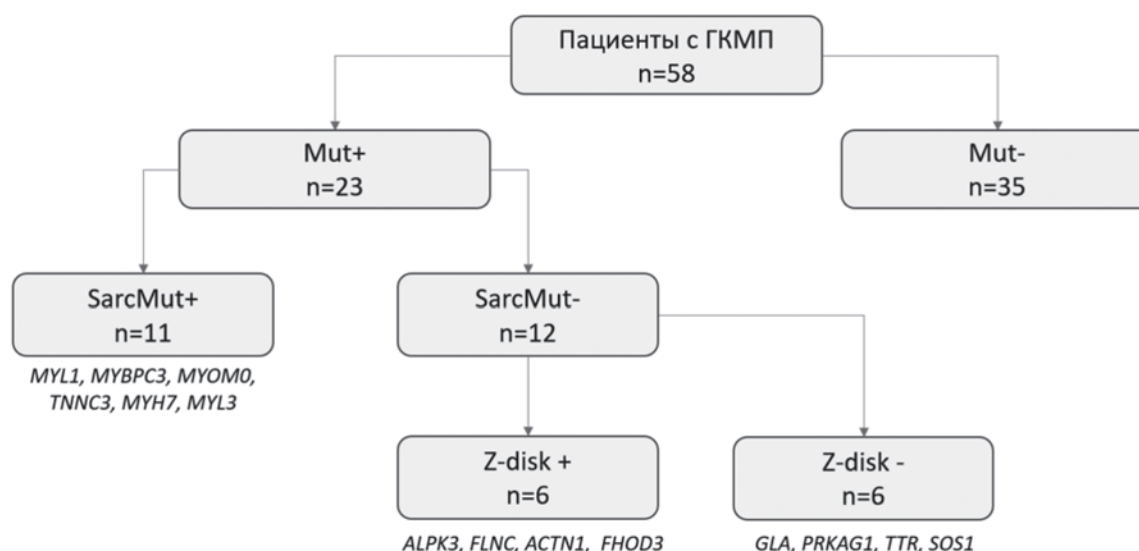


Рис. 1. Схема разделения пациентов на группы

Figure 1. The scheme of dividing patients into groups

Таблица 2. Гены и последовательность праймеров, используемых в работе

Table 2. Genes and primers sequences used in the study

Название гена	Последовательность прямого праймера	Последовательность обратного праймера
VPS37B	AGGAAGACACTGAGAACATGGC	CTCGATTTTCACCCGTCGCA
ATG7	GCATCCAGAAGGGGGCTATG	GATCAAGAACCTGGTGAGGCA
NBR1	ACTTGGGCTGATATCGAAGCTA	CCTTGACTGTTGATGGATACCTCT
MFN2	TCAACCTGAGACAGGACAGAAG	AGCAGGGACATTGCGTTTTT
DYNLL2	GCTGCCTATATCAAGAAGGAATTTG	GCTTTGTCTCGTGTGTGACG
PINK1	GTACCAGTGCACCAGGAGAAG	GAGGAACCTGCCGAGATGT
GAPDH	GGATCTGACGTGCCGCCTG	GAAGGTGGAAGAGTGGGAGTT

торых были обнаружены мутации несаркомерных генов (SarcMut-). Полученные результаты представлены в виде среднего значения для всех проведенных экспериментов, $\pm$ SD. Достоверность различий между группами оценивали с помощью непараметрического критерия Манна-Уитни. Различия считались значимыми при уровне $P < 0,05$.

Результаты

Для оценки роли процесса аутофагии в патогенезе гипертрофической кардиомиопатии использовали количественное измерение экспрессии основных генов, участвующих в регуляции процесса аутофагии: *ATG7*, *PINK1*, *MFN2*, *VPS37B*, *NBR1* и *DYNLL2*.

По результатам оценки экспрессии генов мы не выявили достоверных различий ни для одной из анализируемых групп образцов в профиле экспрессии *VPS37B*, *NBR1*, *DYNLL2* (рис. 2, Г, Д, Е). Значимое различие экспрессии *ATG7* было выявлено между группами пациентов без мутаций (Mut-) и с мутациями (Mut+) (рис. 2 А). Увеличение в два раза экспрессии *ATG7* наблюдалось у группы больных с обнаруженными мутациями (Mut+) относительно пациентов без мутаций (Mut-). Также мы детектировали, что повышение экспрессии *PINK1* у пациентов с обнаруженной мутацией (Mut+) в сравнении с пациентами, у которых мутации не были найдены (Mut-), является достоверным (рис. 2 Б). Схожая с *PINK1* динамика увеличения экспрессии в два раза у больных с му-

тацией (Mut+) относительно образцов без мутации (Mut-) была выявлена при оценке экспрессии *MFN2* (рис. 2 В).

Далее при более детальном сравнении групп пациентов, у которых были обнаружены мутации, не было выявлено никаких значимых различий в экспрессии *ATG7*, *PINK1*, *VPS37B*, *NBR1* и *DYNLL2* генов при анализе групп пациентов с мутациями в генах, не относящихся к саркомерным (SarcMut-), с саркомерными мутациями (SarcMut+), с мутациями в генах, кодирующих белки Z-диска (Z-disk+), и мутациями в генах, не относящихся ни к саркомерным генам, ни к генам Z-диска (Z-disk-) (рис. 3 А, Б, Г, Д, Е). Однако достоверное различие в экспрессии было выявлено при анализе *MFN2* (рис. 3 В). Экспрессия *MFN2* была ниже в два раза и более у группы пациентов с мутациями в генах, не относящихся к саркомерным (SarcMut-), и у группы пациентов с мутациями в генах, не относящихся ни к саркомерным генам, ни к генам Z-диска (Z-disk-), при сравнении с группой пациентов с саркомерными мутациями (SarcMut+), соответственно.

Обсуждение

В данном исследовании мы оценивали экспрессию генов, ассоциированных с процессами аутофагии, в миокарде пациентов с ГКМП различной генетической этиологии. При анализе генетической этиологии заболевания нами рассматривались такие группы, как пациенты с наличием и отсутствием причинных мутаций, пациенты с причин-

ной мутацией в саркомерных и несаркомерных генах, а также пациенты с мутациями в генах белков Z-дисков и без таковых. Нами было показано, что основными генами, ассоциированными с аутофагией и меняющими свою экспрессию при ГКМП, являются гены *ATG7*, *PINK1* и *MFN2*, в то время как для генов *VPS37B*, *NBR1*, *DYNLL2* не было детектировано достоверных изменений профиля экспрессии в зависимости от этиологического характера заболевания. При детальном анализе было выявлено, что повышение экспрессии генов, регулирующих процесс аутофагии (*ATG7*, *PINK1*

и *MFN2*), наиболее выражено в группе генотип-положительных пациентов по сравнению с больными без детектированных причинных мутаций.

В настоящее время нет однозначных данных о влиянии мутаций саркомерных белков на процесс аутофагии. Однако первые исследования о вкладе процесса аутофагии в развитие гипертрофической кардиомиопатии у людей и животных моделей с мутациями в таких генах, как *MYBPC3*, *MYH7*, *MYOM1*, показали, что в тканях и клетках происходит накопление белка LC3-II, а также аутофагических вакуолей, что является одним из

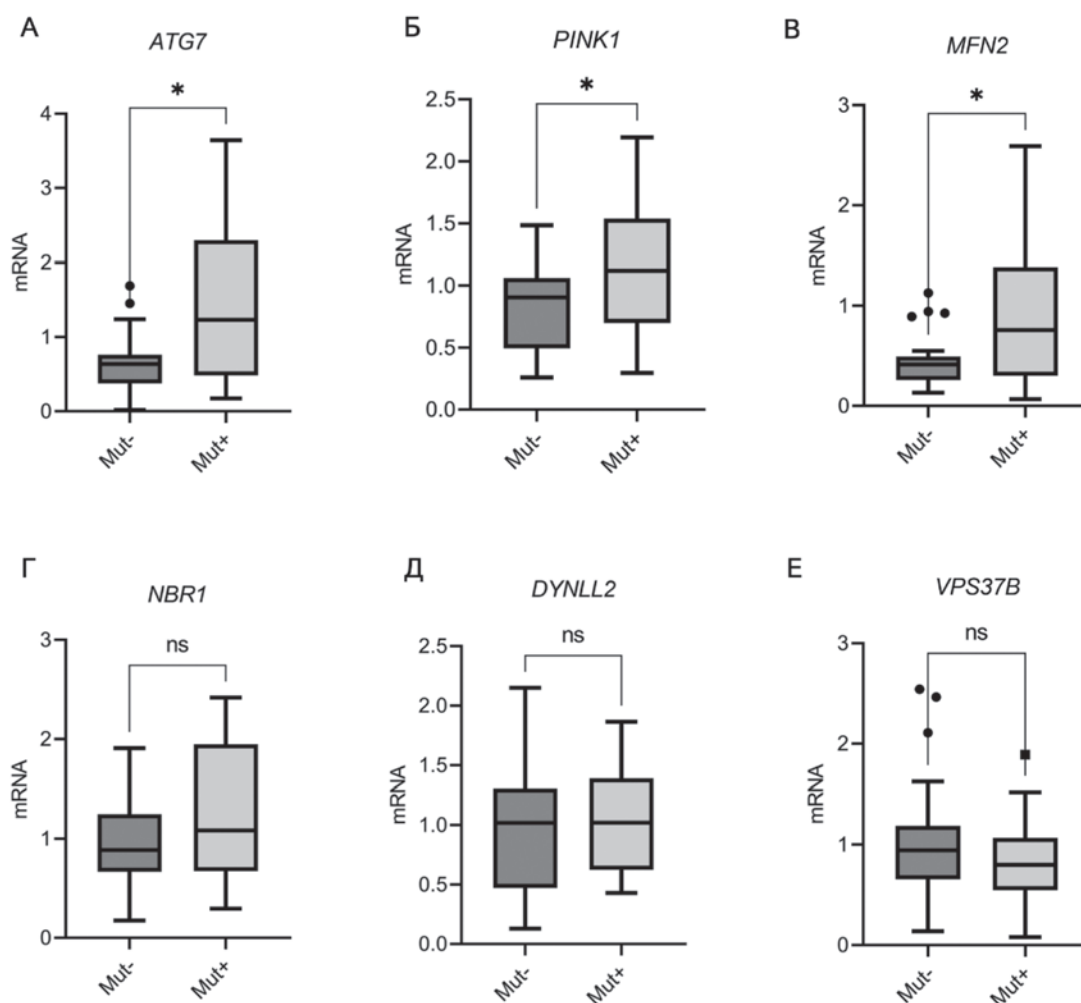


Рис. 2. Анализ экспрессии генов РВ-ПЦР в миокарде пациентов с ГКМП

А — уровень экспрессии *ATG7*; Б — уровень экспрессии *PINK1*; В — уровень экспрессии *MFN2*; Г — уровень экспрессии *NBR1*; Д — уровень экспрессии *DYNLL2*; Е — уровень экспрессии *VPS37B*. * < 0,05. Относительные уровни мРНК были рассчитаны как $(-\Delta\Delta Ct)^2$. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SD.

Figure 2. RT-PCR gene expression analysis in the myocardium of patients with HCMF

А — *ATG7* expression level; Б — *PINK1* expression level; В — *MFN2* expression level; Д — *NBR1* expression level; Е — *DYNLL2* expression level; F — *VPS37B* expression level. * < 0.05. Relative mRNA levels were calculated as $(-\Delta\Delta Ct)^2$. The data is presented as an average value of $\pm$ SD.

неоспоримых показателей активации образования аутофагосом в клетках, а, следовательно, и процесса аутофагии [13, 20].

Однако в то же время происходит и снижение регуляции многих факторов, участвующих в процессах слияния аутофагосом с лизосомой и последующей деградации, что указывает на нарушение процесса аутофагии. Таким образом, невозможно с уверенностью говорить об увеличении скорости и активации аутофагии, а скорее, лишь о нарушении нормального уровня и динамики данного процесса при ГКМП вследствие мутаций в генах

саркомерных белков. Данные, полученные в ходе нашего исследования, показывают, что у пациентов с обнаруженными мутациями активируется один из ключевых генов, отвечающих за процесс образования и созревания аутофагосом: *ATG7*, а также гены *PINK1* и *MFN2*, участвующие в процессе митофагии и контроля качества митохондрий.

При наследственной патологии миокарда нарушение процесса аутофагии показано также и для причинных мутаций в таких генах, как *FLNC*, *ALPK3*, *FHOD3* [21–23]. Так, взаимодействие *FLNC* с белком *BAG3*, являющимся одним из ключевых

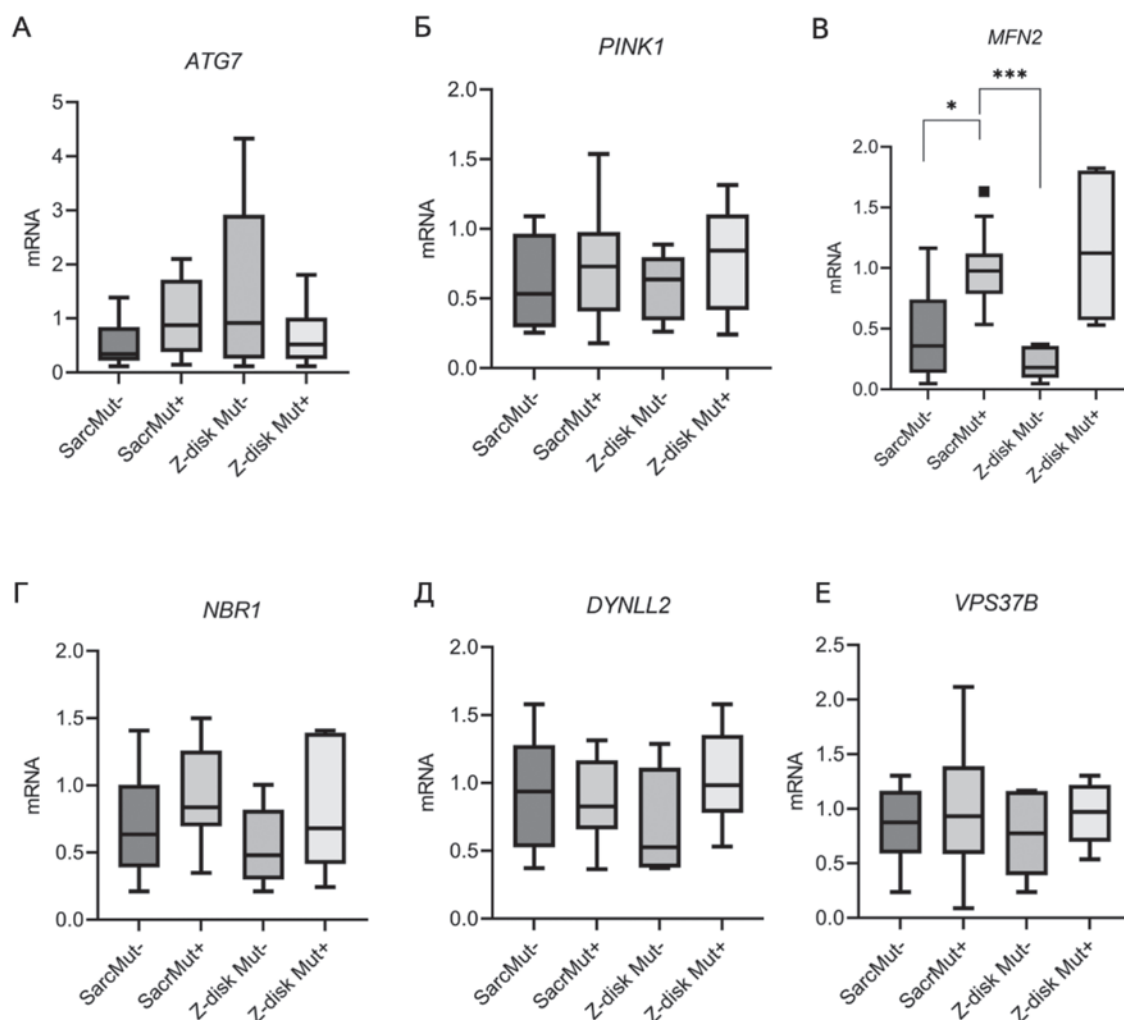


Рис. 3. Анализ экспрессии генов РВ-ПЦР в миокарде пациентов с ГКМП

А — уровень экспрессии *ATG7*; Б — уровень экспрессии *PINK1*; В — уровень экспрессии *MFN2*; Г — уровень экспрессии *NBR1*; Д — уровень экспрессии *DYNLL2*; Е — уровень экспрессии *VPS37B*. * < 0,05. Относительные уровни мРНК были рассчитаны как $(-\Delta\Delta Ct)^2$. Данные представлены в виде среднего значения $\pm$ SD.

Figure 3. RT-PCR gene expression analysis in the myocardium of patients with HCMP divided into groups depending on the detected mutation

А — *ATG7* expression level; Б — *PINK1* expression level; В — *MFN2* expression level; Д — *NBR1* expression level; Е — *DYNLL2* expression level; F — *VPS37B* expression level. * < 0.05. Relative mRNA levels were calculated as $(-\Delta\Delta Ct)^2$. The data is presented as an average value of $\pm$ SD.

шаперонов шаперон-ассистированной аутофагии (CASA) — специфичного для мышечных тканей вида аутофагии, — вызывает накопление в клетке агрегатов белков, что является сигналом для более активной регуляции процесса аутофагии и накопления в клетках аутофагосом [22, 24]. Данных о нарушении процесса аутофагии из-за наличия мутаций в таких генах, как *ALPK3*, *FHOD3*, нет, однако, известно, что специфическая для мышечных клеток изоформа формина (*FHOD3*) и альфа-киназа 3 (*ALPK3*) взаимодействуют с белком p62 (SQSTM). Таким образом, существует предположение, что при нарушении структуры формина и альфа-киназы происходит нарушение процесса аутофагии [21, 23].

Хорошо известно о нарушении регуляции процесса аутофагии в патогенезе таких заболеваний, как болезнь Данона, болезнь Фабри, транстиретиновый амилоидоз, наследственные варианты поражения сердца с накоплением гликогена. В основе развития перечисленных заболеваний лежат мутации в генах *LAPM2*, *GLA*, *TTR*, *PRKG2* [25, 26]. Одним из проявлений данных заболеваний может являться гипертрофическая кардиомиопатия, что и наблюдается в ряде случаев среди обследованных нами пациентов (группа с вариантами в генах *GLA*, *PRKAG1*, *TTR*). Однако при этих патологиях нарушения деградации внутриклеточных компонентов в основном обусловлены процессами, связанными с лизосомами: нарушением транспорта утилизируемых органелл в лизосомы, нарушением слияния аутофагосом с лизосомами и т. д. Наши данные подтверждают, что изменение экспрессии *ATG7* происходит, вероятнее всего, в рамках универсального процесса гипертрофии и не зависит от триггера и генетической этиологии заболевания. Повышенная экспрессия *ATG7*, который участвует в регуляции созревания аутофагосомы, в образцах генотип-положительных пациентов может быть вызвана увеличенной потребностью клетки в белковой деградации, а, следовательно, росте количества формируемых аутофагосом. Сходным образом мы не обнаружили и изменений в экспрессии ключевых ассоциированных с аутофагией генов и при ГКМП, ассоциированных с мутациями в Z-диск-ассоциированных генах. В то же время нами было показано повышение экспрессии *MFN2* — гена, во многом определяющего динамику митохондриального пула и структуру митохондрий в клетке, при этом изменение его экспрессии при ГКМП может косвенно быть связано с изменением процесса митофагии — частного случая аутофагии. Повышенный уровень экспрессии *PINK1* у генотип-положительных па-

циентов также свидетельствует об усилении регуляции процесса формирования аутофагосом для митофагии. В то же время в образцах пациентов с кардиомиопатиями на фоне Z-диск-ассоциированных мутаций было зарегистрировано относительное повышение экспрессии *MFN2*, хоть и не достигающее значений достоверности, что может косвенно свидетельствовать о значимом вовлечении процессов слияния/деградации митохондрий в патогенез ГКМП, ассоциированных с патологией белков Z-диска.

Таким образом, признаки изменения контроля протеостаза и митохондриального гомеостаза в большей степени наблюдаются в миокарде генотип-положительных пациентов с ГКМП и, в особенности, в случаях причинных мутаций в саркомерных генах. В миокарде лиц с мутациями в генах белков Z-дисков, а также в генах лизосомальных ферментов среди исследованных нами генов специфического изменения экспрессии в генах, ассоциированных с процессом аутофагии, обнаружено не было.

Конфликт интересов / Conflict of interest

Авторы заявили об отсутствии потенциально-го конфликта интересов. / The authors declare no conflict of interest.

Финансирование / Funding

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 20-15-00271П). / The work was carried out with the financial support of the Russian Science Foundation (project No. 20-15-00271 P).

Список литературы / References

1. Devi S, Kim JJ, Singh AP, et al. Proteotoxicity: A Fatal Consequence of Environmental Pollutants-Induced Impairments in Protein Clearance Machinery. *J Pers Med*. 2021;11(2):69. DOI: 10.3390/jpm11020069.
2. Schreiber A, Peter M. Substrate recognition in selective autophagy and the ubiquitin-proteasome system. *Biochim Biophys Acta*. 2014;1843(1):163–81. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2013.03.019.
3. Castets P, Frank S, Sinnreich M, Ruegg MA. “Get the Balance Right”: Pathological Significance of Autophagy Perturbation in Neuromuscular Disorders. *J Neuromuscul Dis*. 2016;3(2):127–55. DOI: 10.3233/JND-160153
4. Bonuccelli G, Sotgia F, Schubert W, et al. Proteasome inhibitor (MG-132) treatment of mdx mice rescues the expression and membrane localization of dystrophin and dystrophin-associated proteins. *Am J Pathol*. 2003;163(4):1663–75. DOI: 10.1016/S0002-9440(10)63523-7.

5. Bodine SC, Baehr LM. Skeletal muscle atrophy and the E3 ubiquitin ligases MuRF1 and MAFbx/atrogin-1. *Am J Physiol Endocrinol Metab.* 2014;307(6):E469–84. DOI: 10.1152/ajpendo.00204.2014.
6. Tannous P, Zhu H, Johnstone JL, et al. Autophagy is an adaptive response in desmin-related cardiomyopathy. *Proc Natl Acad Sci U S A.* 2008;105(28):9745–9750. DOI: 10.1073/pnas.0706802105.
7. Carmignac V, Svensson M, Korner Z, et al. Autophagy is increased in laminin alpha2 chain-deficient muscle and its inhibition improves muscle morphology in a mouse model of MDC1A. *Hum Mol Genet.* 2011;20(24):4891–902. DOI: 10.1093/hmg/ddr427.
8. Gawlik KI, Durbeej M. Skeletal muscle laminin and MDC1A: pathogenesis and treatment strategies. *Skeletal Muscle.* 2011;1(1):9. DOI: 10.1186/2044-5040-1-9.
9. Malicdan MC, Nishino I. Autophagy in lysosomal myopathies. *Brain Pathol.* 2012;22(1):82–88. DOI: 10.1111/j.1750-3639.2011.00543.x.
10. Al-Qusairi L, Prokic I, Amoasii L, et al. Lack of myotubularin (MTM1) leads to muscle hypotrophy through unbalanced regulation of the autophagy and ubiquitin-proteasome pathways. *FASEB J.* 2013;27(8):3384–94. DOI: 10.1096/fj.12-220947.
11. Claeys KG, Fardeau M. Myofibrillar myopathies. *Handb Clin Neurol.* 2013;113:1337–42. DOI: 10.1016/B978-0-444-59565-2.00005-8.
12. Fetalvero KM, Yu Y, Goetschkes M, et al. Defective autophagy and mTORC1 signaling in myotubularin null mice. *Mol Cell Biol.* 2013;33(1):98–110. DOI: 10.1128/MCB.01075-12.
13. Zech ATL, Singh SR, Schlossarek S, Carrier L. Autophagy in cardiomyopathies. *Biochim Biophys Acta Mol Cell Res.* 2020;1867(3):118432. DOI: 10.1016/j.bbamcr.2019.01.013.
14. Sandri M, Robbins J. Proteotoxicity: an underappreciated pathology in cardiac disease. *J Mol Cell Cardiol.* 2014;71:3–10. DOI: 10.1016/j.yjmcc.2013.12.015.
15. Verdonschot JAJ, Vanhoutte EK, Claes GRE, et al. A mutation update for the FLNC gene in myopathies and cardiomyopathies. *Hum Mutat.* 2020;41(6):1091–1111. DOI: 10.1002/humu.24004.
16. Cassandrini D, Merlini L, Pilla F, et al. Protein aggregates and autophagy involvement in a family with a mutation in Z-band alternatively spliced PDZ-motif protein. *Neuromuscul Disord.* 2021;31(1):44–51. DOI: 10.1016/j.nmd.2020.11.008.
17. Bhuiyan MS, Pattison JS, Osinska H, et al. Enhanced autophagy ameliorates cardiac proteinopathy. *J Clin Invest.* 2013;123(12):5284–97. DOI: 10.1172/JCI70877.
18. Pattison JS, Osinska H, Robbins J. Atg7 induces basal autophagy and rescues autophagic deficiency in CryABR120G cardiomyocytes. *Circ Res.* 2011;109(2):151–60. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.110.237339.
19. Song L, Su M, Wang S, et al. MiR-451 is decreased in hypertrophic cardiomyopathy and regulates autophagy by targeting TSC1. *J Cell Mol Med.* 2014;18(11):2266–2274. DOI: 10.1111/jcmm.12380.
20. Singh SR, Zech ATL, Geertz B, et al. Activation of Autophagy Ameliorates Cardiomyopathy in *Myhpc3*-Targeted Knockin Mice. *Circ Heart Fail.* 2017;10(10). DOI: 10.1161/CIRCHEARTFAILURE.117.004140.
21. Iskratsch T, Lange S, Dwyer J, et al. Formin follows function: a muscle-specific isoform of FHOD3 is regulated by CK2 phosphorylation and promotes myofibril maintenance. *Journal of Cell Biology.* 2010;191(6):1159–72. DOI: 10.1083/jcb.201005060.
22. Ruparel AA, Oorschot V, Ramm G, Bryson-Richardson RJ. FLNC myofibrillar myopathy results from impaired autophagy and protein insufficiency. *Hum Mol Genet.* 2016;25(11):2131–2142. DOI: 10.1093/hmg/ddw080.
23. McNamara JW, Parker BL, Voges HK, et al. Alpha kinase 3 signaling at the M-band maintains sarcomere integrity and proteostasis in striated muscle. *Nature Cardiovascular Research.* 2023;2(2):159–173. DOI: <https://doi.org/10.1038/s44161-023-00219-9>.
24. Kumar V, Kumar P, Chauhan L, et al. Novel combination of FLNC (c.5707G>A; p. Glu1903Lys) and BAG3 (c.610G>A; p.Gly204Arg) genetic variant expressing restrictive cardiomyopathy phenotype in an adolescent girl. *J Genet.* 2022;101:54.
25. Teixeira CA, Almeida Mdo R, Saraiva MJ. Impairment of autophagy by TTR V30M aggregates: in vivo reversal by TUDCA and curcumin. *Clin Sci (Lond).* 2016;130(18):1665–75. DOI: 10.1042/CS20160075.
26. Yanagisawa H, Hossain MA, Miyajima T, et al. Dysregulated DNA methylation of GLA gene was associated with dysfunction of autophagy. *Mol Genet Metab.* 2019;126(4):460–465. DOI: 10.1016/j.ymgme.2019.03.003.

Информация об авторах:

Сухарева Ксения Сергеевна, PhD, младший научный сотрудник НИЛ молекулярной кардиологии и генетики Института молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Михалева Анна Игоревна, аспирант ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Гурщенков Александр Викторович, к.м.н., врач — сердечно-сосудистый хирург ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Зайцев Вадим Витальевич, ассистент ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Козырева Александра Анатольевна, к.б.н., старший научный сотрудник НИЛ молекулярной кардиологии и генетики Института молекулярной биологии и генетики, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Андреева София Евгеньевна, аспирант ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Гаврилова Лидия Сергеевна, студент-магистр
ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Моисеева Ольга Михайловна, д.м.н., директор Ин-
ститута сердца и сосудов, ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Ал-
мазова» Минздрава России;

Костарева Анна Александровна, д.м.н., директор
Института молекулярной биологии и генетики, ФГБУ
«НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Гребенник Вадим Константинович, заведующий
отделением сердечно-сосудистой хирургии № 3, ФГБУ
«НМИЦ им. В. А. Алмазова» Минздрава России;

Гордеев Михаил Леонидович, д.м.н., профессор,
главный кардиохирург ФГБУ «НМИЦ им. В. А. Алма-
зова» Минздрава России.

Authors information:

Ksenia S. Sukhareva, PhD, Almazov National Medical
Research Centre;

Anna I. Mikhaleva, postgraduate, Almazov National
Medical Research Centre;

Aleksandr V. Gurshchenkov, MD, PhD, Associate
Professor, Department of Cardiovascular Surgery, Almazov
National Medical Research Centre;

Vadim V. Zaitsev, MD, Assistant of the Department of
Cardiology, Almazov National Medical Research Centre;

Aleksandra A. Kozyreva, PhD, Almazov National
Medical Research Centre;

Sofia E. Andreeva, MD, Postgraduate Student in
Cardiology, Department of Cardiology, Almazov National
Medical Research Centre;

Lidiia S. Gavrilova, magister, Almazov National
Medical Research Centre;

Olga M. Moiseeva, MD, PhD, DSc, Chief Researcher,
Non-Coronary Heart Disease Research Department,
Almazov National Medical Research Centre;

Anna A. Kostareva, MD, PhD, DSc, Director Institute
of Molecular Biology and Genetics, Almazov National
Medical Research Centre;

Vadim K. Grebennik, Almazov National Medical
Research Centre;

Mikhail L. Gordeev, MD, PhD, DSc, Chief Researcher
research department of Cardiothoracic surgery, Almazov
National Medical Research Centre.