

Сравнительная оценка экспрессии ферментов пути синтеза керамидов *de novo* в жировой ткани сердца и сосудов пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями

Груздева О. В.^{1,2}, Дылева Ю. А.¹, Белик Е. В.¹, Учасова Е. Г.¹, Понасенко А. В.¹, Горбатовская Е. Е.¹, Фанаскова Е. В.¹, Иванов С. В.¹, Стасев А. Н.¹, Зинец М. Г.¹, Барбараш О. Л.^{1,2}

Цель. Оценить в сравнительном аспекте экспрессию ферментов биосинтеза керамидов по пути *de novo* в жировой ткани (ЖТ) сердца и сосудов пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) и приобретенными пороками сердца.

Материал и методы. В исследование включено 20 пациентов с ИБС и 18 пациентов с аортальным стенозом/недостаточностью. Биопаты подкожной, эпикардиальной, периваскулярной ЖТ (подкожная ЖТ (ПЖТ), эпикардиальная ЖТ (ЭЖТ), периваскулярная ЖТ (ПВЖТ), соответственно) получены во время оперативного вмешательства. Методом количественной ПЦР оценена экспрессия генов ферментов синтеза керамидов *de novo* (серинпальмитойлтрансферазы субъединицы C1 и C2: *SPTLC1*, *SPTLC2*; керамидсинтазы 1-6: *CERS1-6*; дигидроцерамиддесатуразы: *DEGS1*). Статистический анализ результатов проводили в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software).

Результаты. Пациенты с ИБС характеризовались более высоким уровнем мРНК *SPTLC1* в ПЖТ и ЭЖТ, *SPTLC2*, *CERS1*, продуцирующей керамиды C18, *CERS5* и *CERS6*, генерирующих керамиды C14-C16 в ЭЖТ, *CERS2* — в ПЖТ, продуцирующей длинноцепочечные керамиды C20-C24, *CERS4*, синтезирующей очень длинноцепочечные керамиды C18-C20. В ПВЖТ выявлена высокая экспрессия *CERS4* и *CERS3*, синтезирующей очень длинноцепочечные керамиды C26 и выше. Экспрессия *DEGS1* была максимальной в ПЖТ и ЭЖТ. У пациентов с пороками сердца отмечалась высокая экспрессия *CERS3* в ПВЖТ, *CERS4* в ЭЖТ и ПЖТ, *DEGS1* в ЭЖТ. Уровень мРНК *SPTLC1* в ПЖТ и ЭЖТ, *SPTLC2* в ЭЖТ, *CERS2* во всех исследуемых ЖТ, *CERS4* и 5 в ЭЖТ, *DEGS1* в ПЖТ и ЭЖТ среди пациентов с ИБС был выше, чем в группе сравнения.

Заключение. Региональные жировые депо сердца отличались по уровню экспрессии ферментов биосинтеза керамидов *de novo*. Полученные результаты свидетельствуют об активации синтеза керамидов по этому пути в адипоцитах преимущественно эпикардиальной локализации при коронарогенной патологии, что может способствовать накоплению длинноцепочечных керамидов в ЖТ этой локализации.

Ключевые слова: керамиды, серинпальмитойлтрансфераза, керамидсинтаза, дигидроцерамиддесатураза, жировая ткань, ишемическая болезнь сердца.

Отношения и деятельность. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-20007 "Керамидный профиль локальных жировых депо сердца: клиничко-патогенетическое значение и терапевтический потенциал" <https://rscf.ru/project/22-15-20007/> и средств Министерства науки и высшего образования Кузбасса.

¹ФГБНУ Научно-исследовательский институт комплексных проблем сердечно-сосудистых заболеваний, Кемерово; ²ФГБОУ ВО Кемеровский государственный медицинский университет Минздрава России, Кемерово, Россия.

Груздева О. В.* — д.м.н., доцент, профессор РАН, зав. лабораторией исследований гомеостаза отдела экспериментальной медицины; ORCID: 0000-0002-7780-829X, Дылева Ю. А. — к.м.н., с.н.с. лаборатории исследований гомеостаза отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0002-6890-3287, Белик Е. В. — к.м.н., н.с. лаборатории исследований гомеостаза отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0003-3996-3325, Учасова Е. Г. — к.м.н., с.н.с. лаборатории исследований гомеостаза отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0003-4321-8977, Понасенко А. В. — к.м.н., зав. лабораторией геномной медицины отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0002-3002-2863, Горбатовская Е. Е. — лаборант-исследователь лаборатории исследований гомеостаза отдела экспериментальной медицины, ORCID: 0000-0002-0500-2449, Фанаскова Е. В. — к.м.н., зав. трансфузиологическим кабинетом, ORCID: 0000-0003-2705-3252, Иванов С. В. — д.м.н., в.н.с. лаборатории реконструктивной хирургии мультифокального атеросклероза, ORCID: 0000-0002-9070-5527, Стасев А. Н. — к.м.н., н.с. лаборатории пороков сердца, ORCID: 0000-0003-1341-204X, Зинец М. Г. — врач-кардиохирург отделения кардиохирургии, лаборатория рентгенэндоваскулярной и реконструктивной хирургии сердца и сосудов, ORCID: 0000-0002-4761-4080, Барбараш О. Л. — д.м.н., профессор, академик РАН, директор ФГБНУ, ORCID: 0000-0002-4642-3610.

*Автор, ответственный за переписку (Corresponding author): o_gruzdeva@mail.ru

ЖТ — жировая ткань, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИМ — инфаркт миокарда, ИМТ — индекс массы тела, мРНК — микро рибонуклеиновая кислота, ПВЖТ — периваскулярная жировая ткань, ПЖТ — подкожная жировая ткань, ПЦР — полимеразная цепная реакция, РНК — рибонуклеиновая кислота, ЭЖТ — эпикардиальная жировая ткань, *CERS1-6* — гены керамидсинтазы 1-6, *DEGS1* — ген дигидроцерамиддесатуразы 1, *SPTLC1* — ген серинпальмитойлтрансферазы субъединицы C1, *SPTLC2* — ген серинпальмитойлтрансферазы субъединицы C2.

Рукопись получена 08.11.2022

Рецензия получена 24.11.2022

Принята к публикации 28.11.2022



Для цитирования: Груздева О. В., Дылева Ю. А., Белик Е. В., Учасова Е. Г., Понасенко А. В., Горбатовская Е. Е., Фанаскова Е. В., Иванов С. В., Стасев А. Н., Зинец М. Г., Барбараш О. Л. Сравнительная оценка экспрессии ферментов пути синтеза керамидов *de novo* в жировой ткани сердца и сосудов пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями. *Российский кардиологический журнал*. 2022;27(12):5281. doi:10.15829/1560-4071-2022-5281. EDN AVUPVQ

Comparative evaluation of the expression of enzymes of the ceramide *de novo* synthesis pathway in cardiac adipose tissue and blood vessels of cardiovascular patients

Gruzdeva O. V.^{1,2}, Dyleva Yu. A.¹, Belik E. V.¹, Uchasova E. G.¹, Ponasenko A. V.¹, Gorbatovskaya E. E.¹, Fanaskova E. V.¹, Ivanov S. V.¹, Stasev A. N.¹, Zinets M. G.¹, Barbarash O. L.^{1,2}

Aim. To compare the expression of enzymes of the ceramide *de novo* synthesis pathway in cardiac adipose tissue (AT) and blood vessels of patients with coronary artery disease (CAD) and acquired heart defects.

Material and methods. The study included 20 patients with CAD and 18 patients with aortic stenosis/regurgitation. Biopsies of subcutaneous, epicardial,

perivascular AT (SCAT, EAT, PVAT, respectively) were obtained during surgery. Quantitative PCR test was used to evaluate the gene expression of *de novo* ceramide synthesis enzymes (serine palmitoyltransferase C1 and C2: *SPTLC1*, *SPTLC2*; ceramide synthase 1-6: *CERS1-6*; dihydroceramide desaturase: *DEGS1*). Statistical analysis was performed using GraphPad Prism 8 (GraphPad Software).

Results. Patients with CAD were characterized by a higher level of mRNA *SPTLC1* in SCAT and EAT, *SPTLC2*, *CERS1*, producing C18 ceramides, *CERS5* and *CERS6*, generating C14-C16 ceramides in EAT, *CERS2* — in SCAT, producing long-chain ceramides C20-C24, *CERS4*, synthesizing very long-chain ceamides C18-C20. In PVAT, a high expression of *CERS4* and *CERS3*, which synthesizes very long-chain ceramides C26 and higher, was revealed. *DEGS1* expression was highest in SCAT and EAT. In patients with heart defects, there was a high expression of *CERS3* in PVAT, *CERS4* in EAT and PVAT, *DEGS1* in EAT. The mRNA level of *SPTLC1* in SCAT and EAT, *SPTLC2* in EAT, *CERS2* in all studied AT, *CERS4* and 5 in EAT, *DEGS1* in SCAT and EAT among patients with CAD was higher than in the comparison group.

Conclusion. Regional fat depots of the heart differed in the level of expression of enzymes of the ceramide *de novo* synthesis pathway. The results obtained indicate the activation of ceramide synthesis along this pathway in predominantly epicardial adipocytes in coronary pathology, which may contribute to the accumulation of long-chain ceramides in the AT of this localization.

Keywords: ceramides, serine palmitoyltransferase, ceramide synthase, dihydroceramide desaturase, adipose tissue, coronary heart disease.

Relationships and Activities. The study was carried out at the expense of the grant of the Russian Scientific Foundation No. 22-15-20007 "Ceramide profile of local fat depots of the heart: clinical and pathogenetic significance and therapeutic potential" <https://rscf.ru/project/22-15-20007/> and funds of the Ministry of Science and Higher Education of Kuzbass.

Ключевые моменты

- В сравнительном аспекте оценена экспрессия ферментов биосинтеза церамидов по пути *de novo* в подкожной, эпикардальной и периваскулярной жировой ткани пациентов с ишемической болезнью сердца и приобретенными пороками сердца.
- При коронарогенной патологии наблюдается активация биосинтеза церамидов *de novo* в адипоцитах преимущественно эпикардальной локализации, что может приводить к аккумуляции церамидов и запускать патологические процессы, ассоциированные с атеросклерозом.
- Управление биосинтезом церамидов за счет ингибирования ферментов пути *de novo* — привлекательная терапевтическая стратегия для лечения сердечно-сосудистых патологий.

Жировая ткань (ЖТ) является активным эндокринным органом, который ассоциирован с патофизиологией ишемической болезни сердца (ИБС) [1]. Особенно тесную связь с атерогенезом имеют эпикардальный и периваскулярный компартменты ЖТ [2, 3]. В настоящее время широко признано, что эти компартменты чрезвычайно активны, продуцируют широкий спектр биологически активных веществ, среди которых церамиды (сфинголипиды) занимают особенное место. Церамиды являются не только важными структурными компонентами мембран клеток, но и выполняют роль вторичного мессенджера (участвуют во внутриклеточной и межклеточ-

¹Research Institute for Complex Issues of Cardiovascular Diseases, Kemerovo;

²Kemerovo State Medical University, Kemerovo, Russia.

Gruzdeva O. V.* ORCID: 0000-0002-7780-829X, Dyleva Yu. A. ORCID: 0000-0002-6890-3287, Belik E. V. ORCID: 0000-0003-3996-3325, Uchasova E. G. ORCID: 0000-0003-4321-8977, Ponasenko A. V. ORCID: 0000-0002-3002-2863, Gorbatovskaia E. E. ORCID: 0000-0002-0500-2449, Fanaskova E. V. ORCID: 0000-0003-2705-3252, Ivanov S. V. ORCID: 0000-0002-9070-5527, Stasev A. N. ORCID: 0000-0003-1341-204X, Zinets M. G. ORCID: 0000-0002-4761-4080, Barbarash O. L. ORCID: 0000-0002-4642-3610.

*Corresponding author:

o_gruzdeva@mail.ru

Received: 08.11.2022 **Revision Received:** 24.11.2022 **Accepted:** 28.11.2022

For citation: Gruzdeva O. V., Dyleva Yu. A., Belik E. V., Uchasova E. G., Ponasenko A. V., Gorbatovskaia E. E., Fanaskova E. V., Ivanov S. V., Stasev A. N., Zinets M. G., Barbarash O. L. Comparative evaluation of the expression of enzymes of the ceramide *de novo* synthesis pathway in cardiac adipose tissue and blood vessels of cardiovascular patients. *Russian Journal of Cardiology*. 2022;27(12):5281. doi:10.15829/1560-4071-2022-5281. EDN AVUPVQ

Key messages

- The expression of enzymes of the ceramide *de novo* synthesis pathway in subcutaneous, epicardial and perivascular adipose tissue of patients with coronary artery disease and acquired heart defects was compared.
- In case of coronary pathology, activation of ceramide *de novo* synthesis in predominantly epicardial adipocytes is observed, which can lead to the accumulation of ceramides and trigger pathological processes associated with atherosclerosis.
- Controlling ceramide biosynthesis by inhibiting *de novo* pathway enzymes is an potential therapeutic strategy for the treatment of cardiovascular pathologies.

ной передаче сигналов), регулируют многие важные физиологические процессы: рост, дифференцировку, пролиферацию, миграцию, апоптоз клеток, активность киназ и фосфатаз, модулируют метаболизм глюкозы и липидов [4, 5]. За последние 20 лет интенсивные популяционные, когортные и экспериментальные, в т.ч. генетические, исследования убедительно продемонстрировали взаимосвязь церамидов и факторов сердечно-сосудистого риска (пол, возраст, артериальная гипертензия, курение, ожирение) [6-8]. В многочисленных исследованиях, носящих экспериментальный характер, показана роль церамидов в формировании атеросклеротических бляшек [9, 10]. Исследования липида плазмы человека позволили выявить определенные виды церамидов, ко-

Таблица 1

Клиническая характеристика пациентов с ИБС и пороками сердца

Параметр	Пациенты с ИБС, n=20	Пациенты с пороками, n=18	p
Мужчины, n (%)	12 (60)	10 (55,6)	0,056
Возраст, лет	64,9 (47,8; 69,5)	59,3 (43,7; 62,1)	0,071
Индекс массы тела, кг/м ²	26,4 (22,5; 30,2)	27,3 (23,4; 31,2)	0,062
Ожирение, n (%)	7 (35)	1 (5,6)	0,0001
Артериальная гипертензия, n (%)	11 (55)	4 (22,2)	0,002
Дислипидемия, n (%)	9 (45)	2 (11,1)	0,001
Курение, n (%)	10 (50)	3 (16,7)	0,0001
ИБС в анамнезе, n (%)	12 (60)	7 (38,9)	0,038
ИМ в анамнезе, n (%)	14 (70)	0	
ОНМК, n (%)	2 (10)	0	
Атеросклероз других бассейнов, n (%)	3 (15)	0	
Нет стенокардии, n (%)	1 (5)	18 (100)	0,0001
Стенокардия I ФК, n (%)	0	0	
Стенокардия II ФК, n (%)	9 (45)	0	
Стенокардия III ФК, n (%)	10 (50)	0	
Стенокардия IV ФК, n (%)	0	0	
ХСН I ФК, n (%)	8 (40)	4 (22,2)	0,055
ХСН II ФК, n (%)	3 (15)	14 (77,8)	0,002
ХСН III ФК, n (%)	0	0	0,0002
ХСН IV ФК, n (%)	0	0	
Атеросклероз одной КА, n (%)	3 (15)	0	
Атеросклероз 2-х КА, n (%)	1 (5)	0	
Атеросклероз 3-х и более КА, n (%)	16 (80)	0	
Фракция выброса, %	53,6 (46,3; 58,9)	51,6 (42,5; 55,8)	0,046
С-реактивный белок до операции, n (%)	2,68 (2,18; 3,29)	3,22 (2,65; 3,64)	0,211
Терапия в стационаре			
Аспирин, n (%)	19 (95)	0	
Клопидогрель, n (%)	3 (15)	0	
Варфарин, n (%)	0	15 (83,3)	
β-блокаторы, n (%)	18 (90)	16 (88,9)	0,091
иАПФ, n (%)	15 (75)	14 (77,8)	0,247
Статины, n (%)	20 (100)	13 (72,2)	0,059
Блокаторы Са-каналов, n (%)	15 (75)	13 (72,2)	0,166
Нитраты, n (%)	1 (5)	2 (11,1)	0,107
Диуретики, n (%)	16 (80)	17 (84,4)	0,087

Сокращения: иАПФ — ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, ИБС — ишемическая болезнь сердца, ИМ — инфаркт миокарда, ОНМК — острое нарушения мозгового кровообращения, КА — коронарная артерия, ФК — функциональный класс, ХСН — хроническая сердечная недостаточность.

которые являются независимыми предикторами будущих фатальных и нефатальных сердечно-сосудистых событий [11, 12]. Вместе с тем должного внимания проблеме аккумуляции керамидов в ЖТ сердца и сосудов при ИБС и их роли в атерогенезе не уделялось. В то время как керамиды ЖТ посредством паракринного высвобождения могут выступать в качестве атерогенных медиаторов.

Основным источником керамидов в адипоцитах является путь *de novo* [13]. Благодаря скоординированному действию ферментов (серинпальмитоилтрансферазы, 3-кетодигидросфингозинредуктазы, керамидсинтазы, дигидроцерамиддесатуразы) в ре-

зультате четырех последовательных реакций генерируется до 80% клеточных керамидов. Наличие 6 изоформ фермента керамидсинтазы (CerS1-CerS6), присоединяющей ацильную цепь жирной кислоты к каркасу сфинганина, обеспечивает большое видовое разнообразие керамидов [13]. Так CerS1, CerS5 и CerS6 присоединяют жирные кислоты с более короткой длиной углеводородной цепи (C14-C18) к сфинганину, в то время как CerS2, CerS3 и CerS4 добавляют более длинноцепочечные жирные кислоты (C18-C26 и более). Дисбаланс CerS в клетке будет приводить к увеличению определенных керамидов, нарушая гомеостаз клетки [14], однако механизмы

Таблица 2

**Праймеры, используемые для оценки
генной экспрессии ферментов синтеза церамидов**

Ген	Направленность	Sequence (5'→3')	Длина праймера
SPTLC1	Forward primer	aggaagcggctaactatggc	20
	Reverse primer	ccagaggatcagaatccctcc	22
SPTLC2	Forward primer	cgctgaagagatgggcttc	21
	Reverse primer	ccgatgtccgcttcagcat	20
CERS1	Forward primer	gcggttcagccaagggtgt	20
	Reverse primer	ttcaccaggccgttcctcag	20
CERS2	Forward primer	ggacgtgtctacgccaagc	20
	Reverse primer	atgtccaagggcagccagt	21
CERS3	Forward primer	ctcgacagatggtctcctg	20
	Reverse primer	cctgatgggatgttctcctg	22
CERS4	Forward primer	caggactgttggcagccct	20
	Reverse primer	cgttgggcttcactgcctc	20
CERS5	Forward primer	ctcaatggcctgctgctgac	20
	Reverse primer	tgctccacatcatcgca	20
CERS6	Forward primer	cggacctgaagaacacggagga	22
	Reverse primer	atggcgcacggtttgctac	20
DEGS1	Forward primer	ccactgagctggagtttct	20
	Reverse primer	caggaattgtagtgaggaggt	22

Сокращения: SPTLC1 — ген серинпальмитоилтрансферазы субъединицы C1, SPTLC2 — ген серинпальмитоилтрансферазы субъединицы C2, CERS1-6 — гены церамидсинтазы 1-6, DEGS1 — ген дигидроцерамиддесатуразы 1.

нарушения соотношений и значения этих соотношений до конца не изучены, необходимы дополнительные исследования.

На сегодняшний день недостаточно и данных, касающихся особенности экспрессии ферментов пути *de novo* в ЖТ, в особенности сердечной локализации. Работы носят в основном экспериментальный характер, и результаты зачастую противоречивы [5, 8, 15, 16]. Между тем, изменение активности ферментов синтеза в ЖТ сердца может приводить к избыточному синтезу и накоплению церамидов не только в ЖТ, но и в кардиомиоцитах. Избыточная аккумуляция церамидов, в свою очередь, может индуцировать целый ряд патологических процессов, ассоциированных с атерогенезом [17].

В связи с этим, целью исследования явилось оценить в сравнительном аспекте экспрессию ферментов биосинтеза церамидов по пути *de novo* в ЖТ сердца и сосудов пациентов с ИБС и приобретенными пороками сердца.

Материалы и методы

В исследование включено 38 пациентов, среди которых было 20 пациентов с ИБС (основная группа). Группу сравнения составили 18 пациентов с некоронарогенными патологиями сердца — дегенеративные приобретенные неревматические пороки сердца (аортальный стеноз/недостаточность) и показаниями для проведения открытой операции на клапанах сердца, сопоставимых по полу и возрасту с основной группой. Все пациенты имели показания для проведения открытого вмешательства на сердце — прямой реваскуляризации миокарда методом коронарного шунтирования или операции на клапанах сердца.

Критериями включения явились возраст пациента до 75 лет; согласие пациента на исследование. Критерии исключения: возраст пациента >75 лет; наличие сахарного диабета 1 и 2 типа в анамнезе и/или выявленного при обследовании в период госпитализации; инфаркт миокарда (ИМ); клинически значимые сопутствующие заболевания (анемия, почечная и печеночная недостаточность, онкологические и инфекционно-воспалительные заболевания в период обострения, аутоиммунные заболевания); отказ пациента от проведения исследования.

Клинико-анамнестическая характеристика представлена таблице 1. Критерии включения для пациентов группы сравнения: верифицированный приобретенный порок сердца, согласие на проведения исследования.

Среди пациентов с ИБС преобладали лица мужского пола (60%), средний возраст которых составил 64,9 (47,8; 69,5) лет, индекс массы тела (ИМТ) — 26,4 (22,5; 30,2) кг/м² (табл. 1). В анамнезе чаще фиксировались артериальная гипертензия, курение, стенокардия, отягощенная наследственность по сер-

дечно-сосудистой патологии. У 14 (70%) пациентов в анамнезе был ИМ, у 2 (10%) человек — инсульт. Пациенты с приобретенными пороками сердца были сопоставимы по полу, возрасту и ИМТ с основной группой. Средний возраст пациентов составил 59,3 (43,7; 62,1) лет. Пациенты с пороками сердца чаще страдали хронической сердечной недостаточностью II-III функционального класса и имели сниженную фракцию выброса в сравнении с группой ИБС.

В течение госпитального периода все пациенты получали стандартную медикаментозную терапию в соответствии с рекомендациями Министерства Здравоохранения РФ (2020) и Европейского общества кардиологов (2020), включая гепарин, клопидогрел, аспирин, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, β-адреноблокаторы, блокаторы кальциевых каналов, нитраты, ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы (статины). Пациенты с пороками сердца получали варфарин, β-адреноблокаторы, ингибиторы ангиотензинпревращающего фермента, ингибиторы ГМГ-КоА-редуктазы (статины), антагонисты Ca (дигидропиридиновые), нитраты, диуретики.

Биоптаты ЖТ подкожной, эпикардиальной и периваскулярной локализации (3-5 г) были получены у пациентов во время оперативного вмешательства (коронарного шунтирования или коррекции пороков сердца). Источник подкожной ЖТ (ПЖТ) — подкожная клетчатка нижнего угла средостенной раны, эпикардиальной ЖТ (ЭЖТ) — зоны ее наибольшего

Таблица 3

Экспрессия генов основных ферментов синтеза церамидов пути *de novo* в ЖТ сердца различной локализации пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями

Параметры	Ишемическая болезнь сердца, n=20			Приобретенные пороки сердца, n=18			p _m
	ПЖТ	ЭЖТ	ПВЖТ	ПЖТ	ЭЖТ	ПВЖТ	
	1	2	3	4	5	6	
<i>SPTLC1</i> , ΔCt	7,40 (6,03; 13,37)	6,45 (2,89; 9,12)	3,32 (1,58; 5,16)	3,49 (2,26; 5,01)	3,75 (2,82; 5,17)	3,45 (3,12; 5,37)	p _{m1,4} =0,00003 p _{m2,5} =0,0022
	p _k =0,012/p _{m1,3} =0,0002/p _{m2,3} =0,010			p _k =0,061			
<i>SPTLC2</i> , ΔCt	0,32 (0,21; 0,47)	0,58 (0,36; 0,72)	0,23 (0,15; 0,39)	0,18 (0,09; 0,31)	0,16 (0,08; 0,27)	0,18 (0,10; 0,34)	p _{m2,5} =0,039
	p _k =0,015/p _{m1,2} =0,012/p _{m2,3} =0,013			p _k =0,071			
<i>DEGS1</i> , ΔCt	0,49 (0,29; 0,62)	2,26 (1,92; 2,55)	0,91 (0,72; 1,32)	0,27 (0,11; 0,46)	0,51 (0,30; 1,22)	0,28 (0,14; 0,41)	p _{m1,4} =0,029 p _{m2,5} =0,035
	p _k =0,014/p _{m1,3} =0,010/p _{m2,3} =0,012			p _k =0,017/p _{m1,2} =0,014/p _{m2,3} =0,011			p _{m3,6} =0,030

Сокращения: ПВЖТ — периваскулярная жировая ткань, ПЖТ — подкожная жировая ткань, ЭЖТ — эпикардальная жировая ткань, p_k — уровень статистической значимости при сравнении трех групп методом Kruskal-Wallis, p_m — уровень статистической значимости при сравнении двух групп методом Mann-Whitney, *SPTLC1* — ген серинпальмитоилтрансферазы субъединицы C1, *SPTLC2* — ген серинпальмитоилтрансферазы субъединицы C2, *DEGS1* — ген дигидроцерамид-десатуразы 1.

присутствия — правые отделы сердца (правое предсердие и правый желудочек), периваскулярной ЖТ (ПВЖТ) — из области правой коронарной артерии. Образцы ЖТ подвергались криогенной заморозке жидким азотом с последующим хранением при температуре -150° С.

Экспрессия генов ферментов синтеза церамидов пути *de novo*

Выделение и синтез нуклеиновых кислот. Выделение рибонуклеиновой кислоты (РНК) из ЖТ проводили с помощью набора Fatty Tissue RNA Purification Kit (Norgen Biotek Corp., Канада), основным преимуществом которого является быстрое выделение и высокая степень очистки тотальной РНК из тканей с высоким содержанием липидов. Количество и чистоту выделенной РНК определяли на спектрофотометре NanoDrop 2000 (Thermo Scientific, США). Для проведения обратной транскрипции и синтеза комплементарной ДНК на основе образцов РНК использовали реагенты High-Capacity cDNA Reverse Transcription Kit with RNase Inhibitor (AB, США) и хранили при -20° С в течение 2 дней до момента постановки полимеразной цепной реакции (ПЦР).

Оценка генной экспрессии. Для измерения экспрессии генов ферментов синтеза церамидов пути *de novo* использовался метод количественной ПЦР с праймерами, синтезированными ЗАО "Евроген" (г. Москва, Россия), на амплификаторе ViiA 7 (Applied Biosystems, США). Структура праймеров представлена в таблице 2.

Для проведения ПЦР с интеркалирующим красителем SYBR Green использовали реакционную смесь мастер-микс БиоМастер UDG HS-qPCR Lo-ROX SYBR (2×) (ООО "Биолабмикс", Россия) согласно протоколу производителя. Количественная ПЦР

осуществлялась с помощью амплификатора CFX-96 Rial-Time System (Bio-Rad, США). Для расчета относительной величины экспрессии использовали метод ΔСТ (вариант метода Ливака), основанный на определении разницы между значениями СТ референсных генов и целевых значений СТ для каждого образца. Нормирование результатов ПЦР проводилось с помощью референсных генов *ACTB* (β-актин), *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназа), *B2M* (бета-2-микроглобулин).

Статистический анализ

Статистический анализ полученных результатов проводили в программе GraphPad Prism 8 (GraphPad Software). Данные представлены в виде медианы, 25-го и 75-го перцентилей. Для анализа межгрупповых различий использовали непараметрические критерии. Сравнение 3 независимых групп проводили с использованием критерия Краскела-Уоллиса с последующим попарным сравнением с применением U-критерия Манна-Уитни. Сравнение 2 независимых групп проводили с использованием U-критерия Манна-Уитни. Категориальные переменные, выраженные в процентах, сравнивали с использованием критерия хи-квадрат или точного критерия Фишера. Значения p<0,05 считались статистически значимыми.

Результаты

Для получения информации об особенностях экспрессии генов ферментов пути синтеза церамидов *de novo* в ЖТ были оценены уровни микро-РНК (мРНК) генов ферментов *SPT*, *CERS* и *DEGS1* с использованием количественной ПЦР в реальном времени. С учетом того, что *SPT* состоит как минимум из двух субъединиц, был оценен уровень экспрессии мРНК *SPTLC1* и мРНК *SPTLC2*.

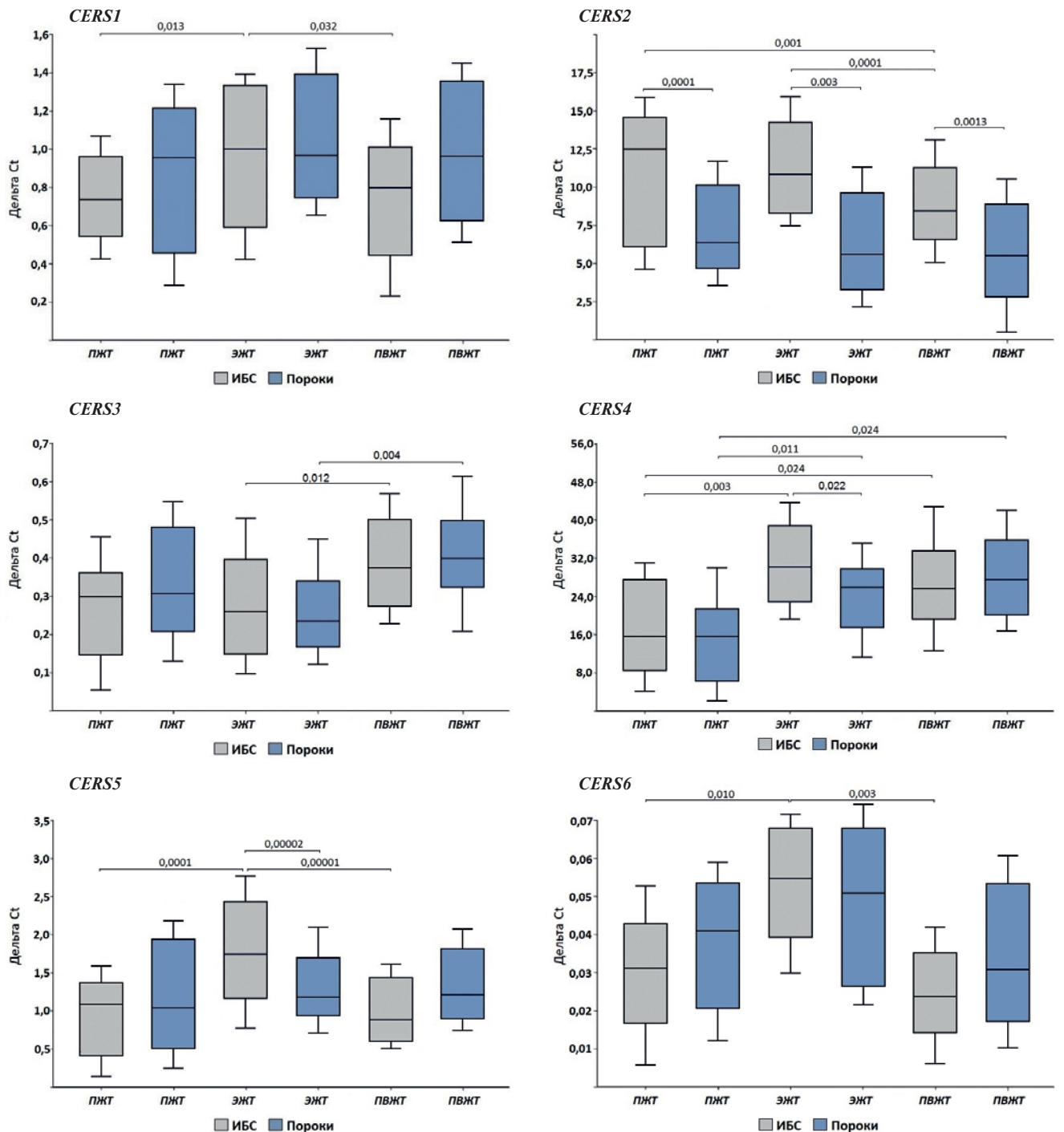


Рис. 1. Экспрессия генов церамидсинтаз в ЖТ сердца различной локализации пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями.

Сокращения: ИБС — ишемическая болезнь сердца, ПЖТ — периваскулярная жировая ткань, ПЖТ — подкожная жировая ткань, ЭЖТ — эпикардальная жировая ткань.

Среди пациентов с ИБС обнаружена более высокая экспрессия субъединицы С1 в образцах ПЖТ и ЭЖТ в сравнении с ЖТ периваскулярной локализации ($p=0,0002$, $p=0,010$, соответственно). В отличие от субъединицы С1, уровень экспрессии субъединицы С2 был выше только в образцах ЭЖТ в сравнении с ПЖТ и ПВЖТ ($p=0,012$, $p=0,013$, соответственно) (табл. 3).

Генная экспрессия церамидсинтаз в ЖТ пациентов с ИБС имела тканевые особенности. ПЖТ характеризовалась максимальной экспрессией гена *CERS2*, продуцирующей длинноцепочечные керамиды С20-С24 (рис. 1), ЭЖТ — экспрессией *CERS1*, продуцирующей керамиды С18 и высоким уровнем мРНК *CERS5*, *CERS5* и *CERS6*, генерирующих керамиды С14-С16. В ПВЖТ, аналогично ЭЖТ, выявлена

максимальная экспрессия *CERS4*, а также *CERS3*, отвечающих за синтез очень длинноцепочечных керамидов C18-C20 и C26, соответственно.

Уровень мРНК *DEGS1*, фермента завершающей стадии синтеза керамидов, был максимальным в образцах эпикардиальной и периваскулярной ЖТ в сравнении с ПЖТ ($p=0,010$, $p=0,012$, соответственно).

В группе пациентов с пороками сердца образцы ЖТ не отличались по уровню мРНК *SPTLC1*, *SPTLC2* и *CERS1*, 2, 5 и 6, в то время как отмечалась высокая экспрессия *CERS3* в периваскулярных адипоцитах ($p=0,004$) и *CERS4* в ЭЖТ ($p=0,011$) и ПВЖТ ($p=0,024$) (рис. 1). Генная экспрессия *DEGS1* в образцах ЭЖТ была максимальной в сравнении с подкожными и периваскулярными адипоцитами ($p=0,014$ и $p=0,011$, соответственно) (табл. 3).

Оценка межзолологических различий в экспрессии генов ферментов пути синтеза керамидов *de novo* в ЖТ показала, что пациенты с ИБС, в отличие от пациентов с пороками сердца, характеризовались более высокой экспрессией *SPTLC1* в ЖТ подкожной и эпикардиальной локализации ($p=0,00003$, $p=0,0022$, соответственно), *SPTLC2* в образцах ЭЖТ ($p=0,039$) (табл. 3). Среди пациентов с ИБС также отмечалась более высокая экспрессия *CERS2* в образцах всех исследуемых тканей (ПЖТ, $p=0,0001$, ЭЖТ, $p=0,003$, ПВЖТ, $p=0,0013$), *CERS4* и 5 в эпикардиальных адипоцитах ($p=0,022$, $p=0,017$) (рис. 1). Генная экспрессия *CERS6* не имела межгрупповых различий. Уровень мРНК *DEGS1* среди пациентов с ИБС был выше в адипоцитах независимо от локализации (в ПЖТ, $p=0,029$; ЭЖТ, $p=0,035$; в ПВЖТ, $p=0,030$) (табл. 3).

Таким образом, региональные жировые депо сердца отличались по уровню экспрессии ферментов биосинтеза керамидов *de novo*. Полученные результаты свидетельствуют об активации синтеза керамидов по пути *de novo* в адипоцитах преимущественно эпикардиальной локализации при коронарогенной патологии, что может способствовать накоплению длинноцепочечных керамидов в ЖТ этой локализации.

Обсуждение

Экспериментальные и клинические исследования показали связь между керамидами и развитием атеросклероза [17]. Особый интерес вызывает накопление керамидов в жировых депо сердца и сосудов, поскольку ЭЖТ и ПВЖТ локализованы в непосредственной близости к очагу атеросклеротического поражения. Первым этапом исследования явилась оценка экспрессии гена ключевого фермента синтеза керамидов *de novo* серинпальмитойлтрансферазы в ЖТ подкожной и сердечной локализации. Установлено, что у пациентов с ИБС в ЭЖТ экспрессия *SPTLC1* и *SPTLC2* превышала аналогичные

показатели в группе пороков сердца. Максимальные значения мРНК *SPTLC1* также наблюдались в группе пациентов с ИБС. Можно предположить, что при ИБС усиление экспрессии *SPT*, ключевого фермента пути синтеза керамидов *de novo* в адипоцитах ПЖТ и ЭЖТ могло быть обусловлено наличием избыточной массы тела у обследованных пациентов. Ранее проведенные клинические исследования подтверждают такую точку зрения. Так, Włachnio-Zabielska AU, et al. (2012) продемонстрировали значительное увеличение мРНК обеих субъединиц *SPT* (*SPTLC1* и *SPTLC2*) в образцах ПЖТ брюшной полости у лиц с ожирением (ИМТ >30) по сравнению с контрольной группой без ожирения (ИМТ <25). Активность фермента, оцененная с использованием радиоактивно меченного субстрата, [³H]-L-серина (Moravek Biochemicals), также была повышена [18]. Однако следует принять во внимание отсутствие различий по ИМТ с группой пациентов с пороками сердца, которые имели более низкие значения экспрессии гена *SPTLC1*. С другой стороны, ишемия/гипоксия миокарда, обусловленная атеросклерозом коронарных артерий, могла также спровоцировать усиление экспрессии *SPT* в адипоцитах. Экспериментально показано, что адаптация к хронической гипоксии регулируется дифференциальным транскрипционным профилем, включающим активацию экспрессии *SPT*, направленным на метаболическое перепрограммирование клетки. Синтез керамидов с участием жирных кислот поначалу может носить приспособительный характер, однако по мере накопления керамидов в клетке наблюдается замедление ключевых клеточных и физиологических процессов, напротив, активируется запрограммированная гибель клетки. Важным аспектом также является индуцированное гипоксией усиление провоспалительной активности ЖТ. Считается, что гипоксия, развивающаяся в областях ЖТ, приводит к выработке адипоцитами провоспалительного фактора некроза опухоли, который, в свою очередь, усиливает экспрессию *SPT* [19].

Следующим этапом анализа явилась оценка профиля экспрессии генов *CERS1-6*, кодирующих ферменты керамидсинтазы, со специфической субстратной специфичностью по отношению к жирным кислотам с разной длиной цепи. У млекопитающих длина ацильной цепи керамида колеблется от средней (12-14С), длинной (16-20С), очень длинной (22-26С) до сверхдлинной (>26С) цепи жирных кислот. Экспериментально показано, что активирование/блокировка керамидсинтаз может иметь широкий спектр функциональных и тканеспецифических эффектов [20]. Результаты настоящего исследования свидетельствуют о том, что в ЖТ подкожной, эпикардиальной и периваскулярной локализации экспрессируются все 6 ферментов керамидсинтаз независимо от наличия коронарогенной или неко-

ронарогенной нозологии. Экспрессия гена *CERS4* и *CERS2* была максимальной, а *CERS6* самой минимальной (независимо от локализации ЖТ). Наличие коронарогенной патологии (ИБС) сопровождалось наиболее высокими значениями экспрессии *CERS2* в ПЖТ, ЭЖТ, ПВЖТ, *CERS4* и 5 в ЭЖТ. Имеющиеся на сегодняшний день данные экспериментальных и клинических исследований не позволяют однозначно трактовать полученные результаты. Так, отсутствует однозначное мнение о протективной или негативной роли изученных нами церамидсинтаз. Согласно данным Kim YR, et al. (2019), ингибирование экспрессии *CERS4* улучшает метаболический профиль печени у мышей [21]. С другой стороны, *CERS4* может генерировать C20 и C22 церамиды, обладающие защитной функцией при развитии сердечной недостаточности [22]. *CERS2* синтезирует церамиды с длиной цепи C22-C24. Отличительной особенностью гена *CERS2* является его организация, характерная для гена "домашнего хозяйства" и расположение в хромосомных областях, которые реплицируются на ранних стадиях клеточного цикла [23]. В физиологии клеток, в т.ч. адипоцитов, *CERS2* имеет ключевое значение, поскольку нокаунт *CERS2* приводит к нарушению цитокинеза [24]. Гомозиготные мыши с нокаутом *CERS2* отличались высокой восприимчивостью к дезадаптивным метаболическим нарушениям при диете, вызывающей ожирение. Следует отметить, что сверхэкспрессия *CERS2* была защитной при стрессовой реакции эндоплазматического ретикулума, индуцированной пальмитатом, предположительно потому, что она предотвращала индукцию *CERS6*, приводящую к усилению липогенеза в печени [21]. Другие исследования свидетельствуют о негативной роли *CERS2*. Так, избыточная экспрессия *CERS2* (и накопление церамидов C20-C24) вызывает окислительный стресс и митохондриальную дисфункцию посредством липидной перегрузки, что в конечном итоге приводит к апоптозу кардиомиоцитов [25]. Некоторые авторы полагают, что *CERS2*-зависимое повреждение митохондрий клеток может являться объединяющим другие патологические состояния — инсулинорезистентность, окислительный стресс, усиление аутофагии и митофагии — патофизиологическим механизмом, приводящим в конечном итоге к гибели кардиомиоцитов. Показано также, что *CERS2* синергично усиливает экспрессию *CERS5*, для которой однозначно показано участие в индукции окислительного стресса и апоптоза [25]. Мыши с нулевым *CERS5* жизнеспособны, фертильны, не имеют каких-либо очевидных морфологических и фенотипических изменений при нормальном питании [26]. Однако при диете с высоким содержанием жиров потеря *CERS5* была ассоци-

рована со снижением прибавки в весе, улучшением общего состояния, уменьшением воспалительной активации белой ЖТ и снижением уровня лептина по сравнению с животными дикого типа [26].

Завершающим этапом работы была оценка экспрессии гена десатуразы, заключительного фермента пути *de novo*. Последняя стадия пути *de novo* считается не менее важной, поскольку именно церамиды, а не дигидроцерамиды, являются конечными продуктами, которые обладают разными профилями метаболической и клеточной активности. Результаты проведенного исследования свидетельствуют о более высоком уровне мРНК *DEGS1* в ЭЖТ у пациентов с ИБС. Ранее проведенные исследования не обнаружили подобных различий, более того, отмечена более высокая экспрессия *DEGS1* в образцах ЖТ подкожных адипоцитов по сравнению с адипоцитами медиастинального депо у пациентов с избыточной массой тела (ИМТ $29,4 \pm 4,9$ кг/м², n=10), направленных на плановую операцию на аортальном клапане и/или на восходящей грудной аорте [27]. Обращает на себя внимание тот факт, что у пациентов с ИБС значения уровня мРНК *DEGS1* в ПЖТ были существенно меньше, чем значения мРНК первого фермента пути *de novo* SPT. Напротив, значения мРНК *DEGS1* в ЭЖТ были сопоставимы с экспрессией фермента SPT. Возможным объяснением избыточной экспрессии десатуразы в ЭЖТ является нивелирование патологических эффектов гипоксии, некоторые исследователи рассматривают DES1 в качестве клеточных сенсоров кислорода [28].

Заключение

Таким образом, ЖТ сердца при коронарогенной патологии характеризуются активацией синтеза церамидов по пути *de novo*, преимущественно в эпикардальной локализации, что может приводить к аккумуляции церамидов, потенцируя многие патологические процессы, ассоциированные с атеросклерозом. Управление биосинтезом церамидов за счет ингибирования ферментов пути *de novo* является привлекательной терапевтической стратегией по снижению уровня церамидов не только в плазме, но и в периферических тканях, в т.ч. в сердце и сосудах, и имеет огромные перспективы для лечения широкого спектра сердечно-сосудистых патологий.

Отношения и деятельность. Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда № 22-15-20007 "Церамидный профиль локальных жировых депо сердца: клинико-патогенетическое значение и терапевтический потенциал" <https://rscf.ru/project/22-15-20007/> и средств Министерства науки и высшего образования Кузбасса.

Литература/References

- Iacobellis G. Epicardial adipose tissue in contemporary cardiology. *Nat Rev Cardiol.* 2022;19(9):593-606. doi:10.1038/s41569-022-00679-9.
- Brel NK, Gruzdeva OV, Kokov AN, et al. Relationship of coronary calcinosis and local fat deposits in patients with coronary artery disease. *Complex Issues of Cardiovascular Diseases.* 2022;11(3):51-63. (In Russ.) Брель Н.К., Груздева О.В., Коков А.Н. и др. Взаимосвязь кальциноза коронарных артерий и локальных жировых депо у пациентов с ишемической болезнью сердца. *Комплексные проблемы сердечно-сосудистых заболеваний.* 2022;11(3):51-63. doi:10.17802/2306-1278-2022-11-3-51-6.
- Gruzdeva OV, Dyleva YA, Belik EV, et al. Relationship between Epicardial and Coronary Adipose Tissue and the Expression of Adiponectin, Leptin, and Interleukin 6 in Patients with Coronary Artery Disease. *J Pers Med.* 2022;12(2):129. doi:10.3390/jpm12020129.
- Chatham JC, Young ME. Metabolic remodeling in the hypertrophic heart: fuel for thought. *Circ. Res.* 2012;111:666-8. doi:10.1161/circresaha.112.277392.
- Summers SA, Chaurasia B, Holland WL. Metabolic Messengers: Ceramides. *Nat. Metab.* 2019;1(11):1051-8. doi:10.1038/s42255-019-0134-8.
- Mielke MM, Bandaru VV, Han D, et al. Factors affecting longitudinal trajectories of plasma sphingomyelins: the Baltimore Longitudinal Study of Aging. *Aging Cell.* 2015;14(1):112-21. doi:10.1111/acel.12275.
- Middlekauff HR, William KJ, Su B, et al. Changes in lipid composition associated with electronic cigarette use. *J Transl Med.* 2020;18:379. doi:10.1186/s12967-020-02557-9.
- Turpin SM, Nicholls HT, Willmes DM, et al. Obesity-induced CerS6-dependent C16:0 ceramide production promotes weight gain and glucose intolerance. *Cell Metab.* 2014;20(4):678-86. doi:10.1016/j.cmet.2014.08.002.
- Chathoth S, Ismail MH, Alghamdi HM, et al. Insulin resistance induced by de novo pathway-generated C16-ceramide is associated with type 2 diabetes in an obese population. *Lipids Health Dis.* 2022;21:24. doi:10.1186/s12944-022-01634-w.
- Park TS, Rosebury W, Kindt EK, et al. Serine palmitoyltransferase inhibitor myriocin induces the regression of atherosclerotic plaques in hyperlipidemic ApoE-deficient mice. *Pharmacol Res.* 2008;58(1):45-51. doi:10.1016/j.phrs.2008.06.005.
- McGurk KA, Keavney BD, Nicolaou A, et al. Circulating ceramides as biomarkers of cardiovascular disease: Evidence from phenotypic and genomic studies. *Atherosclerosis.* 2021;327:18-30. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2021.04.021.
- Mantovani A, Bonapace S, Lunardi G, et al. Associations between specific plasma ceramides and severity of coronary-artery stenosis assessed by coronary angiography. *Diabetes Metab.* 2020;46(2):150-7. doi:10.1016/j.diabet.2019.07.006.
- Li Y, Talbot CL, Chaurasia B. Ceramides in Adipose Tissue. *Front. Endocrinol.* 2020;11:407. doi:10.3389/fendo.2020.00407.
- Tidhar R, Zelinik ID, Volpert G, et al. Eleven residues determine the acyl chain specificity of ceramide synthases. *J. Biol. Chem.* 2018;287:3197-206. doi:10.1074/jbc.RA118.001936.
- Shah C, Yang G, Lee I, et al. Protection from high fat diet-induced increase in ceramide in mice lacking plasminogen activator inhibitor 1. *J Biol Chem.* 2008;283(20):13538-48. doi:10.1074/jbc.M709950200.
- Chaurasia B, Kaddai VA, Lancaster GI, et al. Adipocyte Ceramides Regulate Subcutaneous Adipose Browning, Inflammation, and Metabolism. *Cell Metab.* 2016;24(6):820-34. doi:10.1016/j.cmet.2016.10.002.
- Choi RH, Tatum SM, Symons JD, et al. Ceramides and other sphingolipids as drivers of cardiovascular disease. *Nat Rev Cardiol.* 2021;18(10):701-11. doi:10.1038/s41569-021-00536-1.
- Błachnio-Zabielska AU, Baranowski M, Hirnle T, et al. Increased bioactive lipids content in human subcutaneous and epicardial fat tissue correlates with insulin resistance. *Lipids.* 2012;47(12):1131-41. doi:10.1007/s11745-012-3722-x.
- Goossens GH. The role of adipose tissue dysfunction in the pathogenesis of obesity-related insulin resistance. *Physiol Behav.* 2008;94:206-18. doi:10.1016/j.physbeh.2007.10.010.
- Ginkel C, Hartmann D, vom Dorp K, et al. Ablation of neuronal ceramide synthase 1 in mice decreases ganglioside levels and expression of myelin-associated glycoprotein in oligodendrocytes. *J Biol Chem.* 2012;287(50):41888-902. doi:10.1074/jbc.M112.413500.
- Kim YR, Lee EJ, Shin KO, et al. Hepatic triglyceride accumulation via endoplasmic reticulum stress-induced SREBP-1 activation is regulated by ceramide synthases. *Exp Mol Med.* 2019;51(11):1-16. doi:10.1038/s12276-019-0340-1.
- Goldenberg JR, Carley AN, Ji R, et al. Preservation of Acyl Coenzyme A Attenuates Pathological and Metabolic Cardiac Remodeling Through Selective Lipid Trafficking. *Circulation.* 2019;139(24):2765-77. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.119.039610.
- Laviad EL, Albee L, Pankova-Kholmyansky I, et al. Characterization of ceramide synthase 2: tissue distribution, substrate specificity, and inhibition by sphingosine 1-phosphate. *J Biol Chem.* 2008;283:5677-84. doi:10.1074/jbc.M707386200.
- Atilla-Gokcumen GE, Muro E, Relat-Goberna J, et al. Dividing cells regulate their lipid composition and localization. *Cell.* 2014;156(3):428-39. doi:10.1016/j.cell.2013.12.015.
- Law BA, Liao X, Moore KS, et al. Lipotoxic very-long-chain ceramides cause mitochondrial dysfunction, oxidative stress, and cell death in cardiomyocytes. *FASEB J.* 2018;32(3):1403-16. doi:10.1096/fj.201700300R.
- Gosejacob D, Jäger PS, Vom Dorp K, et al. Ceramide Synthase 5 Is Essential to Maintain C16:0-Ceramide Pools and Contributes to the Development of Diet-induced Obesity. *The Journal of biological chemistry.* 2016;291(13):6989-7003. doi:10.1074/jbc.M115.691212.
- Kolak M, Gertow J, Westerbacka J, et al. Expression of ceramide-metabolising enzymes in subcutaneous and intra-abdominal human adipose tissue. *Lipids Health Dis.* 2012;11:115. doi:10.1186/1476-511X-11-115.
- Devlin CM, Lahm T, Hubbard WC, et al. Dihydroceramide-based response to hypoxia. *J Biol Chem.* 2011;286(44):38069-78. doi:10.1074/jbc.M111.297994.