№6 (XI) | ЛИСТОПАД ГРУДЕНЬ | 2022

Емпагліфлозин пригнічує запалення макрофагів через сигнальний шлях AMPK та відіграє роль при атеросклерозі

Чжи Фу, Хуалін Цзю, Фуюн Ву, Цзань Ту, Цзяо Донг, Хуацзян Цзи, Хуацзян Цзи, Жень Као

https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2022.07.048

Резюме

Мета. *В останні роки деякі авторитетні клінічні дослідження продемонстрували, що інгібітор НЗКТГ-2 може знизити серцево-судинний ризик у пацієнтів з діабетом, що може означати, що інгібітор НЗКТГ-2 може мати також інші ефекти, крім зниження рівня глюкози в крові. У цьому дослідженні ми вивчали вплив емпагліфлозину на атеросклероз судин після усунення впливу діабету.*

Методи. *Взаємодію між інгібітором НЗКТГ-2 і сигнальним шляхом AMPK (аденозин S′-монофосфат-активованої протеїнкінази) щодо зменшення атеросклерозу вивчали як на мишах зі спонтанним атеросклерозом in vivo, так і на моделі запалення макрофагів, індукованого окисленими ліпопротеїнами низької щільності (окс-ЛПНЩ) in vitro. В експерименті in vivo ділянки стовбура аорти та аортального клапана фарбували олійним червоним, а рівень факторів запалення в ураженій тканині оцінювали за допомогою імуногістохімії. Далі збирали сироватки для виявлення рівнів факторів запалення. В експерименті in vitro відібрали лінію клітин RAW264.7 і використали окс-ЛПНЩ для індукції вивільнення прозапальних факторів, після чого додавали різні дози емпагліфлозину. Вимірювали фагоцитоз макрофагів до окс-ЛПНЩ та експресію факторів запалення на рівнях білка та РНК.*

Результати. *Емпагліфлозин зменшував площу атеросклеротичних бляшок та інфільтрацію макрофагів в атеросклеротичні бляшки, знижував експресію факторів запалення в місцевих бляшкових тканинах та сироватці крові мишей APOE$^{-/-}$, яких годували кормом з високим вмістом жирів. Емпагліфлозин може підвищувати рівень експресії білка p-AMPK, на який впливає окс-ЛПНЩ, у клітинах та знижувати рівень генної експресії факторів запалення та рівень експресії білка NF-κB, таким чином діючи проти атеросклерозу.*

Висновки. *Емпагліфлозин покращує енергетичний метаболізм і зменшує експресію факторів запалення шляхом активації AMPK. Оскільки емпагліфлозин пригнічує прогресування атеросклерозу, він може використовуватись для профілактики серцево-судинних захворювань.*

Ключові слова: *атеросклеротичний, емпагліфлозин, p-AMPK, макрофаг, запалення*

Чжи Фу (Jie Fu)
Серцево-судинне відділення, лікарня Тайхе, Хубейський медичний університет (Shiyan 442000, Hubei, China)

Хуалін Цзю (Hualin Xu)
Серцево-судинне відділення, лікарня Тайхе, Хубейський медичний університет (Shiyan 442000, Hubei, China)

Фуюн Ву (Fuyun Wu)
Серцево-судинне відділення, лікарня Тайхе, Хубейський медичний університет (Shiyan 442000, Hubei, China)

Цзань Ту (Qiang Tu)
Серцево-судинне відділення, лікарня Тайхе, Хубейський медичний університет (Shiyan 442000, Hubei, China)

Цзяо Донг (Xiao Dong)
Серцево-судинне відділення, лікарня Тайхе, Хубейський медичний університет (Shiyan 442000, Hubei, China)

Хуацзян Цзи (Huaqiang Xie)
Серцево-судинне відділення, лікарня Тайхе, Хубейський медичний університет (Shiyan 442000, Hubei, China)

Жень Као (Zheng Cao)
Серцево-судинне відділення, лікарня Тайхе, Хубейський медичний університет (Shiyan 442000, Hubei, China)

Вступ

Атеросклеротичні серцево-судинні захворювання є провідною причиною смерті в більшості регіонів світу [1]. Ліпідознижувальна терапія залишається наріжним каменем лікування атеросклеротичних захворювань. У настановах Американського коледжу кардіологів/Американської асоціації кардіологів за 2019 р. рекомендується універсальне використання статинів для всіх категорій пацієнтів в групі високого ризику [2]. Однак продовжує існувати багато залишкових серцево-судинних ризиків навіть при стандартній медикаментозній терапії, що обмежує лікування для деяких пацієнтів [3]. Кілька досліджень показали, що статини підвищують ризик діабету у деяких пацієнтів. Коли статини знижують рівень холестерину, вони також знижують рівень коензиму Q10 [4]. Тому пошук лікування атеросклеротичних захворювань досі не завершений.

Атеросклероз — це хронічний запальний процес, що залучає кілька типів клітин і цитокінів [5]. При атеросклерозі макрофаги в тканинах є ключовими виконавцями секреції цитокінів [6]. Підвищена інфільтрація макрофагів у навколишніх тканинах стимулює місцеві запальні реакції, які призводять до підвищення рівнів фактора некрозу пухлини-α (TNF-α), інтерлейкіну-β (IL-1β) та інтерлейкіну-6 (IL-6) [7]. Ці прозапальні фактори можуть прискорювати процес атеросклерозу. Відповідно, втручання в запальний процес у кровоносних судинах може сприяти затримці прогресування атеросклерозу, що дозволить досягти мети лікування. В даний час не схвалено протизапальні види терапії для боротьби з атеросклерозом.

Клінічне випробування Empa-REG OUTCOME показало, що додавання інгібітора натрій-залежного транспортера глюкози 2 типу (НЗКТГ-2) емпагліфлозину до глюкозознижувальної терапії знижувало смертність від серцево-судинних захворювань на 38 % у групі лікування (5,9 % у групі плацебо; що відповідає зниженню відносного ризику на 38 %) [8].

Це означає, що емпагліфлозин може мати також інші ефекти, крім зниження рівня глюкози в крові. AMPK (аденозин 5'-монофосфат-активована протеїнкіназа) є ключовою молекулою в регуляції біоенергетичного метаболізму та відіграє центральну роль у вивченні цукрового діабету та інших захворювань, пов'язаних з метаболізмом [9]. Це датчик енергії, необхідний для контролю запалення макрофагів. За останнє десятиліття швидко накопичувалися свідчення того, що AMPK є ключовим регулятором метаболічних шляхів, які контролюють запалення [10, 11, 12, 13]. Емпагліфлозин як гіпоглікемічний засіб бере участь у процесі енергетичного метаболізму і теоретично має регуляторний вплив на AMPK, а також відіграє протизапальну роль, що заслуговує на подальше дослідження.

Метою цього дослідження було вивчити вплив інгібітора НЗКТГ-2 емпагліфлозину на атеросклероз у мишей APOE$^{-/-}$ без діабету та дослідити потенційний механізм дії лікарського засобу на сигнальний шлях AMPK на клітинному рівні.

Матеріали та методи

Годування та лікування тварин

10 мишей C57BL/6 J та 33 миші APOE$^{-/-}$ віком 6 тижнів були надані компанією Beijing Vitong Lihua Company. Миші APOE$^{-/-}$ отримували корм з високим вмістом жирів (D12108C), а миші C57BL/6 J — звичайний корм. Модель створювали протягом 8 тижнів, масу тіла та рівень глюкози в крові натще визначали щотижня. Через 8 тижнів 3 миші APOE$^{-/-}$ випадковим чином відібрали для фарбування аортальних судин олійним червоним, щоб перевірити успішність моделювання. 30 мишей APOE$^{-/-}$ випадковим чином розділили на 3 групи: модельну групу, групу низької дози і групу високої дози. Препарат вводили через зонд. Дозу препарату розраховували згідно з інструкцією щодо оральної дози препарату відповідно до співвідношення площі поверхні миші та людини. Емпагліфлозин (Boehringer Inheim Shanghai) вводили в дозі 1,3 мг/кг/д у групі низької дози та в дозі 3,2 мг/кг/д у групі високої дози. Модельній групі вводили аналогічний об'єм нормального фізіологічного розчину через зонд, цикл дозування становив 8 тижнів. Усі тварини отримували гуманний догляд допомогу. Всі дослідницькі програми були схвалені Комітетом з догляду за тваринами Хубейського медичного університету перед впровадженням, згідно з Настановами щодо

поводження з лабораторними тваринами Хубейського медичного університету.

Вимірювання атеросклеротичних уражень

Після цього, використовуючи анестезію шляхом передозування 3 % пентобарбіталу натрію у вигляді внутрішньоочеревинної ін'єкції, мишей умертвили і перфузували 2 % полімерами метанолу для очищення аорти. Взяли серце та аорту, вилучали з одного боку осі малої кривизни, що розділяє аорту, судинну тканину фарбували олійним червоним О. Серце піддавали резекції приблизно на 0,5 см нижче рівня лівого та правого передсердь, а корінь аорти заморожували для подальшого фарбування олійним червоним. Програмне забезпечення Image J використовували для мапування та аналізу зони атеросклеротичного ураження повної довжини аорти та поперечного зрізу судин кореня аорти.

Імунофлуоресцентне фарбування

Після парафінування тканини очищали деіонізованою водою, повністю просочували зрізи буфером для відновлення антигену. Тканину обводили пером Super PAP Pen. У коло додавали гасник спонтанної флуоресценції на 5 хвилин. Кола інкубували з 3 % BSA протягом 30 хвилин. Далі тканину рівномірно покривали первинними антитілами до CD68 кролика (1 мкг/мл) при температурі 4 °C протягом ночі. Після промивання та висушування зрізів наступного дня козячі антитіла до IgG кроликів (Abcam (Cy3®) AB97075 1:100) додавали як вторинні антитіла та інкубували при кімнатній температурі протягом 50 хвилин. В коло додавали відповідну кількість розчину барвника DAPI. Інкубували при кімнатній температурі протягом 10 хвилин. Нарешті планшет закривали гашеним антифлуоресцентним запечатувальним агентом. Зображення оглядали та отримували під флуоресцентним мікроскопом у темній камері.

Імуногістохімія тканин

Поперечний зріз судин аорти брали для імуногістохімічного дослідження. Тканину розрізали в парафіні та депарафінували, для відновлення антигену використовували відповідний розчин лимонної кислоти, а 3 % BSA використовували для запечатування при кімнатній температурі протягом 30 хвилин. Первинні антитіла розподіляли, та антитіла до IL-6 (1:50, Wuhan Proteintech, 66,146-1-IG), IL-1β (1:50, Wuhan Proteintech, 66,737-1-IG) і NF-κB (1200, Wuhan Proteintech, 66,535-1-IG) інкубували при температурі 4 °C протягом ночі. Потім антитіла інкубували з відповідними вторинними антитілами, що зв'язують пероксидазу хрону, і фарбували DAB (Servicebio G1211). Потім планшети витримували з гематоксиліном протягом 3 хвилин, далі зневоднювали та запечатували. Зображення робили під мікроскопом, і результати кількісно визначали за допомогою програмного забезпечення Image Pro Plus версії 5.1 (Media Cybernetics, Inc.).

ELISA

Вилучене серце розсікали; кров (приблизно 0,7 мл ± 0,15 мл) відбирали шприцом на 1 мл при прямому огляді серця. Переносили у стерильну пробірку EP і залишали при кімнатній температурі протягом 1 години, потім зразки крові центрифугували при температурі 4 °C при 3000 об/хв протягом10 хвилин. Відбирали супернатант (250-350 мкл) і зберігали окремо в холодильнику при температурі -80 °C. Рівні сироваткових факторів запалення IL-6 та IL-1β вимірювали за допомогою набору Assaypro® Sandwich ELISA згідно з інструкціями виробника.

Культивування та обробка клітин

Лінію клітин RAW264.7 отримали з банку клітин ATCC. Лінію культивували в повному середовищі DMEM з високим вмістом глюкози, що містило 10% фетальної бичачої сироватки та 1 % пеніциліну/стрептоміцину. Клітини засівали в 6-лункові планшети. Коли ступінь злиття клітин досягав 60–70 %, додавали емпагліфлозин у вказаній концентрації та інкубували з окс-ЛПНЩ (80 нг/мл) протягом 24 годин. Інгібітор AMPK (Сполуку C) використовували для попередньої обробки клітин за 30 хвилин до додавання емпагліфлозину та окс-ЛПНЩ. Підтримували середовище інкубатора та постійну температуру 37 °C із 5 % CO^2.

Визначення проліфераційної здатності клітин

Клітини RAW264.7 на логарифмічних стадіях інокулювали у 96-лункові культуральні планшети та поміщали в інкубатор з 5 %

CO^2 при температурі 37 °C на 24 години. Коли щільність клітин досягала 60 %, безсироваткове середовище залишали без підживлення на 4 годин для синхронізації клітинного циклу. Потім додавали безсироваткове середовище DMEM, що містило емпагліфлозин в різних концентраціях, і інкубували протягом 24 годин. Для кожної концентрації відводили по 3 лунки. Після обробки в кожну лунку додавали 10 мкл CCK-8 і культивували при температурі 37 °C протягом 0–4 годин. Значення поглинання вимірювали при довжині хвилі 450 нм за допомогою зчитувального пристрою для мікропланшетів, а контрольна довжина хвилі становила 630 нм. Гістограму здатності клітин до проліферації будували за допомогою програмного забезпечення GraphPad Prism 8.0.2 і розраховували IC50.

Вимірювання поглинальної здатності макрофагів

Макрофаги засівали в конфокальні чашки 1 х 104/мл і обробляли, як описано для культурування клітин і обробки. Після відсутності підживлення сироватки протягом ночі до всіх зразків, крім групи негативного контролю, додавали 40 мкг/мл мічених Dil окислених ліпопротеїнів низької щільності (Guangzhou Yiyuan), захищали від інкубації на світлі протягом 3 годин, потім тричі промивали PBS, фіксували 4 % параформальдегідом протягом 5 хвилин, знову тричі промивали PBS та фарбували DAPI протягом 10 хвилин, потім оглядали клітини за допомогою конфокального мікроскопу.

Вестерн-блоттинг

Клітинні білки екстрагували з клітин RAW264.7 з використанням лізату RIPA (Beyotime) відповідно до інструкцій. Білки виділяли за допомогою 10% BIS-Tris гелю (Beyotime) методом SDS-PAGE і переносили на мембрану з ПВДФ (Thermo Fischer Science). Мембрану закривали блокуючим буфером (5 % знежиреного молока, розчиненого в трьох буферах, що містили TBS плюс 0,1 % Твіну 20) протягом 2 годин, а потім інкубували з первинними антитілами при температурі 4 °C протягом ночі. Сигнали імуногенезу були посилені вторинними козячими антитілами до IgG кроликів або щурів (Santa Cruz Biotechnology), міченими HRP. Сигнали білків виявляли за допомогою хемілюмінесцентного набору ECL (BL523A, BioSharp) на системі візуалізації Bio Rad ChemiDoc XRS+ (США). Експеримент повторювали >3 разів з певною кількістю маси.

Співвідношення розведення первинних антитіл були такими: антитіла до SGLT-2 (1:1000, Biyuntian, Cambridge, UK-AB204017), антитіла до AMPK (1:500, Wuhan Proteintech, 10929-2-AP) і антитіла до фосфорилювання AMPK (1:1000, Cell Signating-#2535).

Екстрагування РНК і ПЛР

РНК екстрагували з використанням TRIzol (Vazyme) відповідно до інструкцій виробника. Набір HIScript ii 1st Strand cDNA Synthesis Kit (Nanjing Novizan R211-02 100RXN) використовували для зворотної транскрипції.

кДНК ампліфікували за допомогою системи Bio-Rad T100 Thermal Cyler. У кількісному методі для фотографування цільової смуги використовували гелевий сканер, а рівень β-актину використовували як стандарт для порівняння (табл. 1).

Аналіз даних

Непарний t-критерій Стьюдента використовували для аналізу суттєвих відмінностей між двома групами.

Однонаправлений дисперсійний аналіз і корекцію Бонферонi використовували для визначення відмінностей між двома групами (програмне забезпечення GraphPad Prism версія 5.0; GraphPad Prism, США). Дані виражали як середнє значення ± стандартне відхилення (СВ). Після статистичної обробки різниця була статистично значущою, якщо P становило < 0,05. 95 % довірчий інтервал відображав рівень впевненості.

Результати

Використання емпагліфлозину зменшувало тяжкість атеросклерозу та інфільтрацію макрофагів у атеросклеротичних бляшках

Мишей $APOE^{-/-}$ годували кормом з високим вмістом жирів для індукування моделі атеросклерозу. Після успішного моделювання вводили емпагліфлозин для спостереження за терапевтичним ефектом препарату in vivo. Результати показали, що кількість

№6 (XI) | ЛИСТОПАД ГРУДЕНЬ | 2022

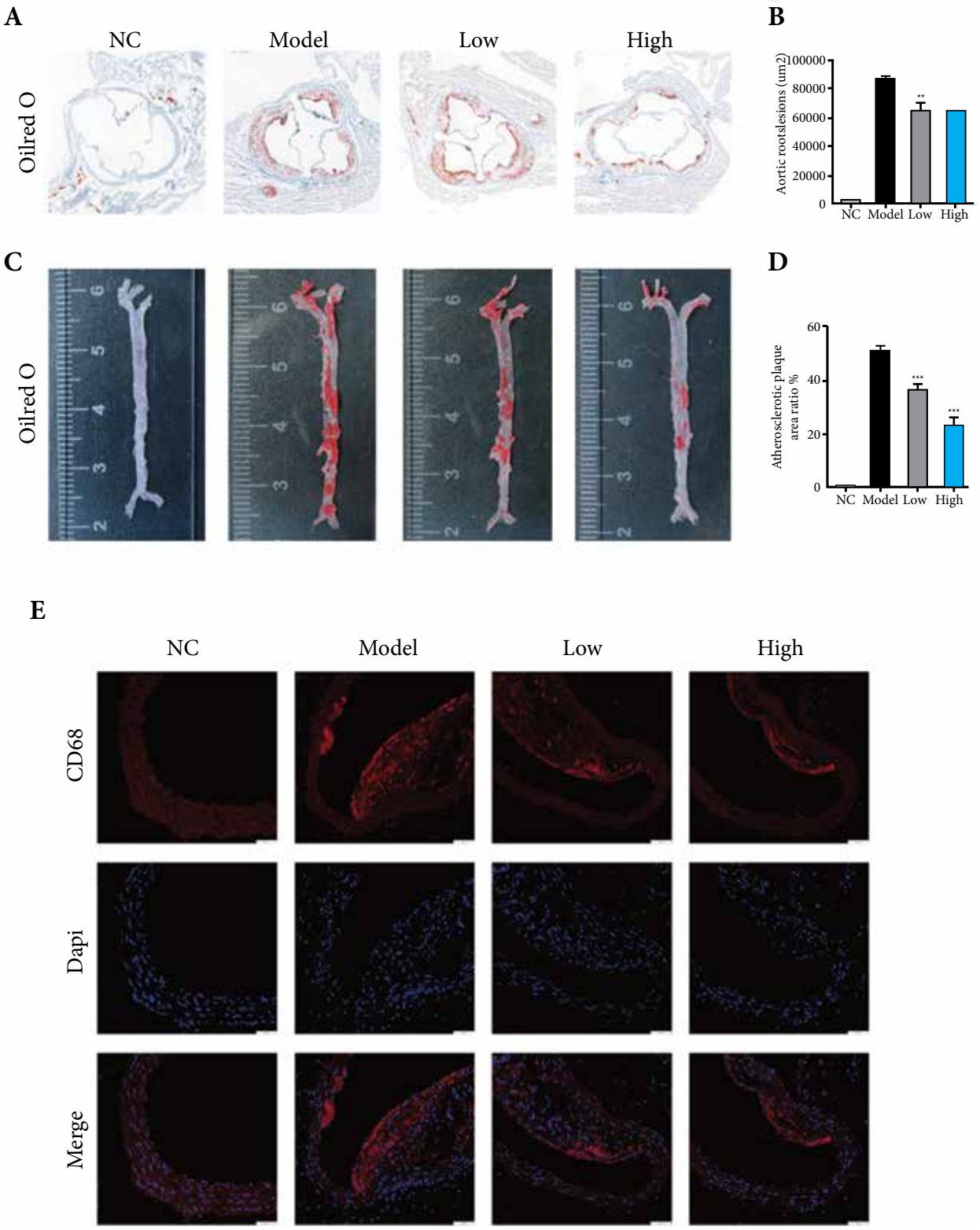

Рис. 1. *Емпагліфлозин може зменшувати атеросклеротичні бляшки та інфільтрацію макрофагів у бляшках. A. Фарбування кореня аорти олійним червоним (білий), судинна тканина (червоний), атеросклеротичні бляшки. B. Ділянка з наявними бляшками. C. Фарбування аорти олійним червоним по всій довжині (білий), судинна тканина (червоний), атеросклеротичні бляшки. D. Частка ділянки з бляшками. E. Флуоресцентне фарбування макрофагів CD68 у бляшках*

Примітки: темно-червона — судинна тканина; червоний — макрофаги. *p < 0,05, **p < 0,01, ***p < 0,001.

Таблиця 1. *Послідовності праймера*

Послідовності праймера	
IL-1β, спрямування вперед GCAACTGTTCCTGAACTCAACT	Зворотне спрямування ATCTTTTGGGGTCCGTCAACT
IL-6, спрямування вперед TAGTCCTTCCTACCCCAATTTCC	Зворотне спрямування TTGGTCCTTAGCCACTCCTTC
TNF-α, спрямування вперед CCCTCACACTCAGATCATCTTCT	Зворотне спрямування GCTACGACGTGGGCTACAG
MCP-1, спрямування вперед TTCTTCGATTTGGGTCTCCTTG	Зворотне спрямування GTGCAGCTCTTGTCGGTGAA
B-актин, спрямування вперед GGCTGTATTCCCCTCCATCG	Зворотне спрямування CCAGTTGGTAACAATGCCATGT

бляшок в стовбурі аорти та аортальному клапані зменшувалась після введення емпагліфлозину, причому площа бляшок зменшувалась при збільшенні дози препарату (Рис. 1A-D). Щоб дослідити інфільтрацію макрофагів у стінки судин, було проведене імунофлюоресцентне фарбування специфічного маркера макрофагів моноцитів CD68 у судинних поперечних патологічних зрізах атеросклеротичних бляшок.

Було виявлено, що червона флуоресценція в бляшках на стінках стовбура артерії була значно посилена порівняно з групою НК. Після введення емпагліфлозину червона флуоресценція в бляшках була послаблена порівняно з модельною групою, а інтенсивність флуоресценції в бляшках була додатково знижена в групі високої дози (Рис. 1E).

Використання емпагліфлозину знижувало рівень бляшок на аорті та рівні запальних цитокінів у сироватці мишей APOE$^{-/-}$, яких годували кормом з високим вмістом жирів

Рівні NF-kB, IL-6 та IL-1β у кожній групі тканин с бляшками виявляли за допомогою імуногістохімії. Позитивна експресія вищевказаних антитіл до факторів запалення була виявлена в атеросклеротичних бляшках модельної групи мишей. Після введення емпагліфлозину експресія NF-κB, IL-6 та IL-1β у бляшках була знижена порівняно з модельною групою та залежно від дози (Рис. 2A, B, C). Позитивна площа була статистично значущою при використанні програмного забезпечення Image J (Рис. 2D, E, F). Для того щоб зрозуміти вплив емпагліфлозину на сироваткові запальні цитокіни, встановлювали рівні запальних цитокінів у сироватці крові мишей. Було виявлено, що рівні запальних цитокінів IL-6 та IL-1β у сироватках модельної групи були значно вищими, ніж у нормальній контрольній групі. Рівні IL-6 та IL-1β у сироватці мишей, які отримували емпагліфлозин, були нижчими, ніж у тварин модельної групи, а рівні вищевказаних факторів запалення ще більше знижувалися при збільшенні дози препарату, причому дані були статистично значущими (Рис. 2G, H).

Використання емпагліфлозину може зменшувати масу тіла у мишей APOE$^{-/-}$, яких годували кормом з високим вмістом жирів

Під час експерименту щотижня реєстрували рівень глюкози в крові натще та масу тіла мишей вранці. Було виявлено, що маса тіла в модельній групі була загалом вищою, ніж у контрольній групі ($P < 0{,}05$), але значущої різниці між групою високої та низької дози не було ($P > 0{,}05$). Це означає, що препарат може сприяти зменшенню маси тіла мишей, яких годували кормом з високим вмістом жирів (Рис. 3A, B). У той же час дані щодо рівнів глюкози в крові мишей не виявили суттєвої різниці між групою лікування та контрольною групою (Рис. 3C, D) ($P > 0{,}05$). Це означає, що емпагліфлозин може не мати суттєвого впливу на рівень глюкози в крові у пацієнтів без діабету, збільшуючи сферу застосування препарату.

Вплив емпагліфлозину на активність макрофагів і ступінь утворення пінистих клітин

Метод Вестерн-блоттингу виявив експресію антитіл до НЗКТГ2, і результати показали наявність рецепторів НЗКТГ2 на макро-

№6 (XI) | ЛИСТОПАД ГРУДЕНЬ | 2022

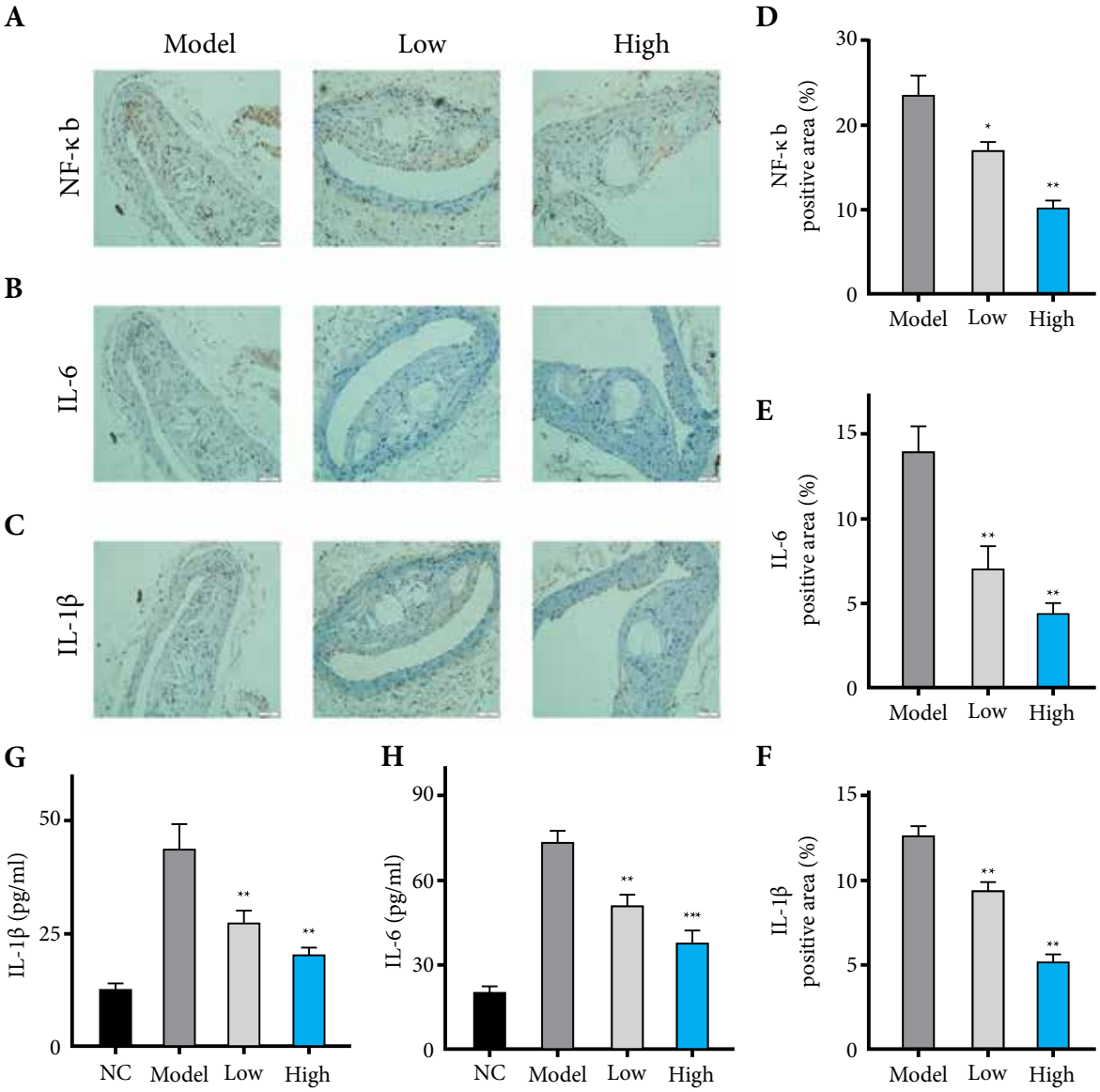

Рис. 2. *Емпагліфлозин знижує рівні факторів запалення в атеросклеротичних бляшках, а також у сироватці крові. A. Імуногістохімія судинного поперечного зрізу NF-κB. B. Імуногістохімія судинного поперечного зрізу IL-6. C. Імуногістохімія судинного поперечного зрізу IL-1β. D, E, F. Частка позитивної площі відповідних антитіл. G. Рівень IL-1β у сироватці крові. H. Рівень IL-6 у сироватці крові*

Примітки: *p <0,05, **p <0,01, ***p <0,001.

фагах, причому емпагліфлозин не впливав на експресію білкових рецепторів (Рис. 4A). Вплив емпагліфлозину на життєздатність клітин визначали за допомогою вдосконаленого набору CCK-8. Результати показали, що емпагліфлозин пригнічує життєздатність клітин починаючи з концентрації 10 мкМ. Емпагліфлозин у концентраціях нижче 10 мкМ не мав значного впливу на життєздатність клітин RAW264.7 (Рис. 4B). Тому в наступних експериментах клітини RAW264.7 індукували шляхом додавання 1 мкМ або 5 мкМ емпагліфлозину в якості низької та високої дози відповідно. Фагоцитоз окс-ЛПНЩ макрофагами з утворенням пінистих клітин є ключовим в утворенні атеросклеротичних бляшок. Як наслідок, мічений Dil окс-ЛПНЩ (Guangzhou Yiyuan) обрали для оцінки фагоцитозу окс-ЛПНЩ макрофагами. Як показано на рисунку 4C, червона флуоресценція в групі, якій вводили емпагліфлозин, була слабшою, ніж у групі стимуляції Dil окс-ЛПНЩ, залежно від дози.

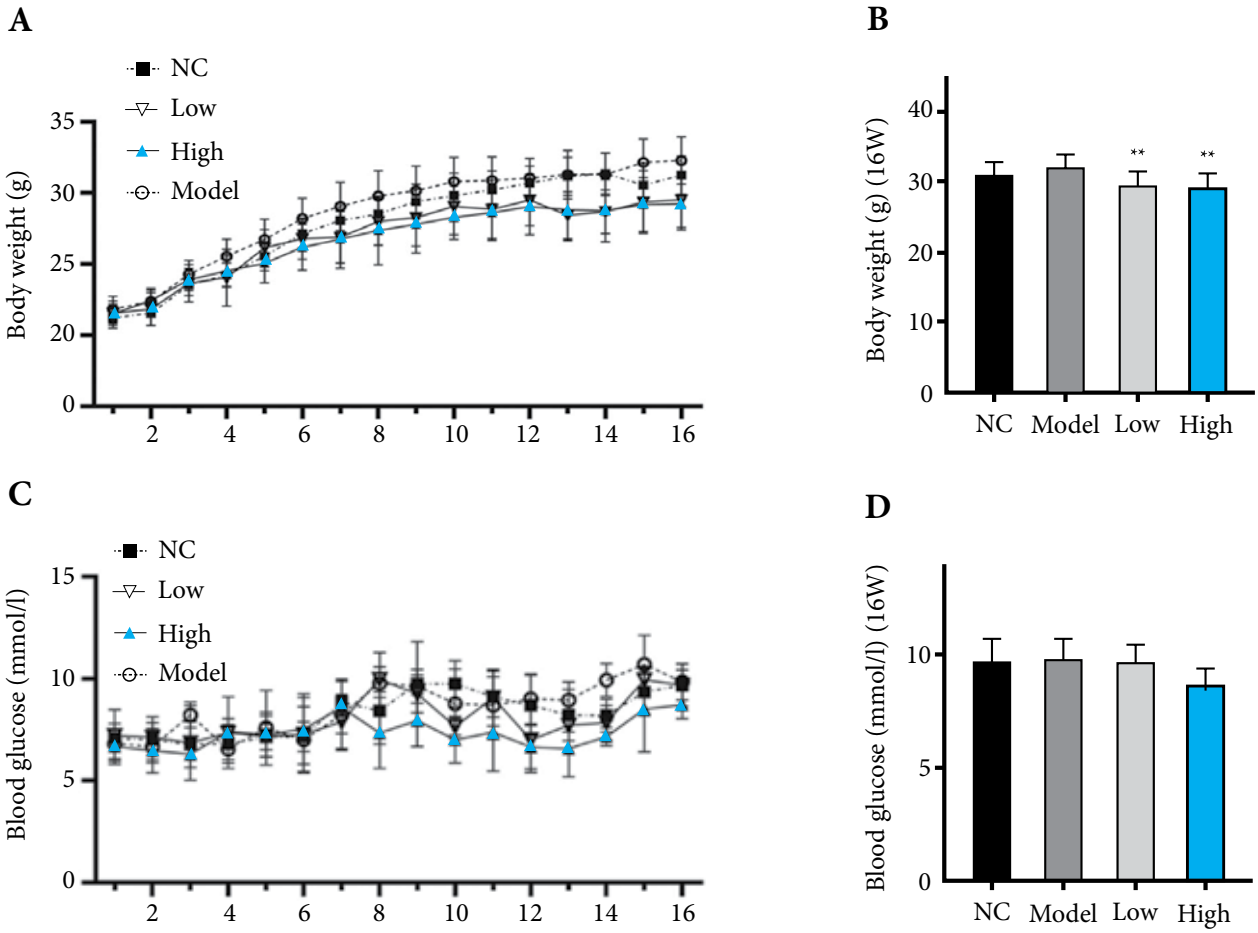

Рис. 3. *Емпагліфлозин зменшував масу тіла мишей APOE -/- і незначною мірою впливав на рівень глюкози в крові. A. Дані щодо маси тіла мишей. B. Дані щодо маси тіла 16-тижневих мишей. C. Дані щодо рівнів глюкози в крові мишей. D. Дані щодо рівнів глюкози в крові 16-тижневих мишей.*

Примітки: *p <0,05, **p <0,01.

Емпагліфлозин може знижувати експресію мРНК IL-6, IL-1β, TNF-α та MCP-1 у макрофагах

Ми дослідили вплив емпагліфлозину на експресію мРНК кількох запальних цитокінів у макрофагах, оброблених емпагліфлозином на генному рівні. Рівні експресії мРНК IL-6, IL-1β, TNF-α та MCP-1 у модельній групі були значно підвищеними. Після обробки емпагліфлозином рівні експресії мРНК IL-6, IL-1β, TNF-α та MCP-1 у групі низької та високої доз були значно нижчими, ніж у контрольній групі, залежно від дози (Рис. 5A-D). Ці результати вказують на те, що емпагліфлозин може пригнічувати експресію мРНК IL-6, IL-1β, TNF-α та MCP-1 у макрофагах і відігравати протизапальну роль.

Емпагліфлозин сприяє експресії p-AMPK у макрофагах на рівні білка

Під час експерименту ми виявили, що рівень експресії білків p-AMPK у макрофагах, оброблених окс-ЛПНЩ (модельна група), був знижений порівняно з групою НК і демонстрував тенденцію до зниження при збільшенні дози окс-ЛПНЩ. При концентрації окс-ЛПНЩ, що досягала 80 нг/мл, спостерігалася найменша білкова експресія p-AMPK (Рис. 6A). Макрофаги безпосередньо обробляли емпагліфлозином, після чого виявили, що експресія p-AMPK була збільшена, тоді як експресія t-AMPK була відносно знижена (Рис. 6B). Фосфорилювання AMPK у макрофагах, стимульованих окс-ЛПНЩ, відновлювалось після введення емпагліфлозину. (Рис. 6C), а експресія p-AMPK була вищою в групі

№6 (XI) | листопад грудень | 2022

високої дози. Після додавання Сполуки С до макрофагів рівень p-AMPK був істотно зменшений (Рис. 6D), а активація p-AMPK емпагліфлозином також значно пригнічувалась. Експресія білка NF-kB у макрофагах була значно знижена після обробки емпагліфлозином, але значущої різниці між групами високої та низької дози не було (Рис. 6E). Після введення Сполуки С протизапальний ефект емпагліфлозину послаблювався, а рівень експресії білка NF-kB підвищувався (Рис. 6F).

Обговорення

Ще кілька років тому більшість людей вважали атеросклероз порушенням ліпідного обміну, оскільки холестерин накопичується в бляшках. Пізніше було виявлено, що запалення може бути загальним станом, що спричиняє багато факторів ризику, таких як регуляція рівнів ліпопротеїнів низької щільності та ліпопротеїнів при високих рівнів тригліцеридів, і може індукувати зміну поведінки клітин стінки артерії, підвищуючи рівень лейкоцитів, а потім обумовлювати накопичення імунних клітин у цих складних ураженнях і поширення хвороби та її ускладнень [14]. Таким чином, був досягнутий консенсус, що атеросклероз є багатофакторним захворюванням, при якому взаємодіють порушення ліпідного обміну та запальні процеси. Все більше і більше даних вказують на те, що запалення судин також відіграє важливу роль у виникненні, розвитку та нестабільності атеросклеротичних бляшок, а запальний процес є головним тригером ендотеліальної дисфункції, судинного окисного стресу та атеросклерозу [5, 15].

Хронічне запалення може призвести до дисфункції ендотелію судин і структурних змін, коли ліпопротеїни низької щільності (ЛПНЩ) проникають в ендотелій кровоносних судин і накопичуються в підшкірному просторі [16]. ЛПНЩ, що накопичуються в інтимі, легко окислюються реакційноздатними оксидами (ROS), та окислені ліпопротеїни низької щільності (окс-ЛПНЩ) утворюються в інтимі кровоносних судин [17]. Макрофаги інтерналізують окс-ЛПНЩ через рецептори CD36 і SCR-A, сприяючи утворенню пінистих клітин і зрештою спричиняючи утворення атеросклеротичних бляшок [18]. Існують переконливі докази того, що окислення ЛПНЩ є центральним фактором атерогенезу та що окс-ЛПНЩ, на відміну від ЛПНЩ, стійкий до лізосомальних ферментів у макрофагах, що призводить до накопичення окс-ЛПНЩ у макрофагах і подальшого утворення пінистих клітин [19]. Дисфункція макрофагів лежить в основі патогенезу атеросклерозу. Вплив окисних ліпідів, кристалів холестерину та медіаторів запалення на моноцити призводить до формування атипового статусу активації макрофагів [20]. Ми виявляли рецептори НЗКТГ-2 на макрофагах, але емпагліфлозин не впливав на експресію білків рецепторів. Також можливо, що емпагліфлозин не впливав безпосередньо на кількість рецепторів, але змінював функцію рецепторів НЗКТГ-2 на макрофагах. Під час експериментів in vitro ми вибрали окс-ЛПНЩ для обробки макрофагів мишей, щоб симулювати місцеву запальну реакцію судинного атеросклерозу. Під час експериментів in vivo ми відібрали поточну модель атеросклерозу у дорослих мишей APOE$^{-/-}$, який годували кормом з високим вмістом жирів, щоб індукувати утворення атеросклеротичних бляшок.

Незважаючи на існування деяких ефективних стратегій лікування атеросклеротичних захворювань в клінічній практиці, у пацієнтів все ще залишається багато факторів серцево-судинного ризику навіть при стандартній медикаментозній терапії. У клініці ми виявили, що статини підвищують ризик діабету у деяких пацієнтів. Нещодавні дослідження показали, що інгібітори НЗКТГ-2 можуть покращувати запальний статус і відігравати антиоксидантну роль у пацієнтів з цукровим діабетом 2-го типу [21]. Andreadou et al. виявили, що інгібітор НЗКТГ-2 може сприяти захисту серцево-судинної системи, що може бути пов'язано з інгібуванням окисного стресу [22]. Han et al. повідомили, що доброякісні ефекти емпагліфлозину при атеросклерозі у мишей APOE$^{-/-}$ не були пов'язані з досягненням гомеостазу глюкози, оскільки в групі, яка отримувала глімепірид, спостерігався подібний контроль глікемії, але не покращення атерогенезу [23]. Попередні дослідження виявили, що інгібітори НЗКТГ-2

змінюють запальні відповіді, впливаючи на окисний стрес, гемодинаміку, спричинене гіперглікемією вироблення цитокінів, активацію RAAS, функцію імунної системи та пов'язане з ожирінням запалення через різноманітні молекулярні шляхи [24]. Багато досліджень довели, що інгібітори НЗКТГ-2 можуть знижувати серцево-судинний ризик у пацієнтів з діабетом [13, 25]. Однак в цьому дослідженні ми виключили фактори діабету та просто вивчали, чи здатні інгібітори НЗКТГ-2 полегшувати атеросклероз, регулюючи запальні реакції в організмі.

AMPK є центральним ферментом клітинного енергетичного балансу та метаболізму, що здійснює функції захисту серця та антиоксидантного впливу, таким чином, сприяючи здоров'ю судин [26]. AMPK залучається при запаленні макрофагів, спричинених метаболізмом, і регулює мітохондріальний обмін, тобто має критичну роль при визначенні запального стану макрофагів [27]. Численні дослідження підтверджують, що AMPK діє як ключовий регулятор метаболічних шляхів, що контролюють запалення [28, 29]. Активація AMPK у макрофагах може відігравати важливу роль у зменшенні атеросклерозу. У цьому дослідженні ми спробували вивчити вплив інгібітора НЗКТГ-2 на регуляцію запалення макрофагів, але необхідні подальші дослідження для дослідження прямого чи непрямого впливу інгібітора НЗКТГ-2 на активність AMPK.

Висновки

На закінчення, введення емпагліфлозину зменшувало кількість атеросклеротичних бляшок у мишей APOE$^{-/-}$, пригнічувало експресію NF-κB і прозапальних цитокінів IL-1β та IL-6 у місці ураження, одночасно зменшуючи інфільтрацію макрофагів у атеросклеротичні бляшки. Препарат також може знижувати рівень факторів запалення в сироватці крові мишей і обумовлювати зменшення їх маси тіла. Емпагліфлозин пригнічує експресію мРНК IL-6, IL-1β, TNF-α та MCP-1 у макрофагах на генному рівні. Він здатний відновлювати індуковану окс-ЛПНЩ низьку експресію білків p-AMPK у макрофагах, а також зменшувати експресію білків NF-κB у макрофагах. При введенні Сполуки C протизапальний ефект емпагліфлозину послаблювався, а рівень експресії білків NF-κB підвищувався.

Наші результати демонструють потенційні терапевтичні ефекти емпагліфлозину на прогресування атеросклерозу. Протизапальна дія цього препарату відбувається через регуляцію сигналізації AMPK, а потім пригнічення сигнального шляху NF-κB. Ці дані дозволяють переосмислити варіанти лікування атеросклеротичних захворювань. Оцінка клінічної ефективності та безпеки емпагліфлозину при цілеспрямованому лікуванні атеросклерозу все ще потребує підтверджуючих даних масштабних досліджень на тваринах і доклінічних досліджень.

Внески авторів

Чжи Фу: Розробка концепції, розробка методики, дослідження, формальний аналіз, ресурси, написання — оригінальний проект.
Хуалін Цзю: Контроль даних, написання — оригінальний проект.
Фуюн Ву: Візуалізація, дослідження.
Цзань Ту: Ресурси, нагляд.
Цзяо Донг: Програмне забезпечення, перевірка.
Хуацзян Цзи: Візуалізація, написання — перегляд та редагування.
Жень Као: Розробка концепції, отримання фінансування, адміністрування проекту, нагляд, написання — перегляд та редагування.

Додаток А. Додаткові дані

Додаткові дані до цієї статті можна знайти онлайн за посиланням:
https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2022.07.048.

Для кореспонденції: Cardiovascular Department, Taihe Hospital, Hubei University of Medicine, Shiyan 442000, Hubei, China. E-mail: caozheng908@163.com (Z. Cao).
https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2022.07.048

Вперше опубліковано: Jie Fu, Hualin Xu, Fuyun Wu, Qiang Tu, Xiao Dong, Huaqiang Xie, Zheng Cao. Empagliflozin inhibits macrophage inflammation through AMPK signaling pathway and plays an anti-atherosclerosis role. International Journal of Cardiology. – 2022. – 367. – 56-62. https://doi.org/10.1016/j.ijcard.2022.07.048. Стаття надана для друку компанією Boehringer Ingelheim.

№6 (XI) | ЛИСТОПАД ГРУДЕНЬ | 2022

Література

1. P. Libby, J.E. Buring, L. Badimon, G.K. Hansson, J. Deanfield, M.S. Bittencourt, L. Tokgozoglu, E.F. Lewis, Atherosclerosis, Nat. Rev. Dis. Primers 5 (1) (2019) 56.
2. D.K. Arnett, R.S. Blumenthal, M.A. Albert, A.B. Buroker, Z.D. Goldberger, E. J. Hahn, C.D. Himmelfarb, A. Khera, D. Lloyd-Jones, J.W. McEvoy, E.D. Michos, M. D. Miedema, D. Munoz, S.C. Smith Jr., S.S. Virani, K.A. Williams Jr., J. Yeboah, B. Ziaeian, 2019 ACC/AHA guideline on the primary prevention of cardiovascular disease: a report of the American College of Cardiology/American Heart Association task force on clinical practice guidelines, J. Am. Coll. Cardiol. 74 (10) (2019) e177–e232.
3. R. Collins, C. Reith, J. Emberson, J. Armitage, C. Baigent, L. Blackwell, R. Blumenthal, J. Danesh, G.D. Smith, D. DeMets, S. Evans, M. Law, S. MacMahon, S. Martin, B. Neal, N. Poulter, D. Preiss, P. Ridker, I. Roberts, A. Rodgers, P. Sandercock, K. Schulz, P. Sever, J. Simes, L. Smeeth, N. Wald, S. Yusuf, R. Peto, Interpretation of the evidence for the efficacy and safety of statin therapy, Lancet 388 (10059) (2016) 2532–2561.
4. R. Kraft, A. Kahn, J.L. Medina-Franco, M.L. Orlowski, C. Baynes, F. Lopez-Vallejo, K. Barnard, G.M. Maggiora, L.L. Restifo, A cell-based fascin bioassay identifies compounds with potential anti-metastasis or cognition-enhancing functions, Dis. Model. Mech. 6 (1) (2013) 217–235.
5. P. Libby, J. Loscalzo, P.M. Ridker, M.E. Farkouh, P.Y. Hsue, V. Fuster, A.A. Hasan, S. Amar, Inflammation, immunity, and infection in atherothrombosis: JACC review topic of the week, J. Am. Coll. Cardiol. 72 (17) (2018) 2071–2081.
6. K.J. Moore, S. Koplev, E.A. Fisher, I. Tabas, J.L.M. Bjorkegren, A.C. Doran, J. C. Kovacic, Macrophage trafficking, inflammatory resolution, and genomics in atherosclerosis: JACC macrophage in CVD series (part 2), J. Am. Coll. Cardiol. 72 (18) (2018) 2181–2197.
7. J.W. Williams, C. Giannarelli, A. Rahman, G.J. Randolph, J.C. Kovacic, Macrophage biology, classification, and phenotype in cardiovascular disease, J. Am. Coll. Cardiol. 72 (18) (2018) 2166–2180.
8. B. Zinman, C. Wanner, J.M. Lachin, D. Fitchett, E. Bluhmki, S. Hantel, M. Mattheus, T. Devins, O.E. Johansen, H.J. Woerle, U.C. Broedl, S.E. Inzucchi, E.-R. O. Investigators, Empagliflozin, cardiovascular outcomes, and mortality in type 2 diabetes, N. Engl. J. Med. 373 (22) (2015) 2117–2128.
9. M. Packer, SGLT2 inhibitors produce cardiorenal benefits by promoting adaptive cellular reprogramming to induce a state of fasting mimicry: a paradigm shift in understanding their mechanism of action, Diabetes Care 43 (3) (2020) 508–511.
10. Q. Lu, X. Li, J. Liu, X. Sun, T. Rousselle, D. Ren, N. Tong, J. Li, AMPK is associated with the beneficial effects of antidiabetic agents on cardiovascular diseases, Biosci. Rep. 39 (2) (2019).
11. G.R. Steinberg, J.D. Schertzer, AMPK promotes macrophage fatty acid oxidative metabolism to mitigate inflammation: implications for diabetes and cardiovascular disease, Immunol. Cell Biol. 92 (4) (2014) 340–345.
12. Z. Yang, B.B. Kahn, H. Shi, B.Z. Xue, Macrophage alpha1 AMP-activated protein kinase (alpha1AMPK) antagonizes fatty acid-induced inflammation through SIRT1, J. Biol. Chem. 285 (25) (2010) 19051–19059.
13. M.R. Cowie, M. Fisher, SGLT2 inhibitors: mechanisms of cardiovascular benefit beyond glycaemic control, Nat. Rev. Cardiol. 17 (12) (2020) 761–772.
14. O. Soehnlein, P. Libby, Targeting inflammation in atherosclerosis - from experimental insights to the clinic, Nat. Rev. Drug Discov. (2021).
15. P. K. Shah, Inflammation, infection and atherosclerosis, Trends. Cardiovasc. Med. 29 (8) (2019) 468–472.
16. A. Gistera, G. K. Hansson, The immunology of atherosclerosis, Nat. Rev. Nephrol. 13 (6) (2017) 368–380.
17. H. N. Siti, Y. Kamisah, J. Kamsiah, The role of oxidative stress, antioxidants and vascular inflammation in cardiovascular disease (a review), Vasc. Pharmacol. 71 (2015) 40–56.
18. L. Zheng, T. Wu, C. Zeng, X. Li, X. Li, D. Wen, T. Ji, T. Lan, L. Xing, J. Li, X. He, L. Wang, SAP deficiency mitigated atherosclerotic lesions in ApoE(–/–) mice, Atherosclerosis 244 (2016) 179–187.
19. Z. Hoseini, F. Sepahvand, B. Rashidi, A. Sahebkar, A. Masoudifar, H. Mirzaei, NLRP3 inflammasome: its regulation and involvement in atherosclerosis, J. Cell. Physiol. 233 (3) (2018) 2116–2132.
20. C. Cochain, E. Vafadarnejad, P. Arampatzi, J. Pelisek, H. Winkels, K. Ley, D. Wolf, A.E. Saliba, A. Zernecke, Single-cell RNA-Seq reveals the transcriptional landscape and heterogeneity of aortic macrophages in murine atherosclerosis, Circ. Res. 122 (12) (2018) 1661–1674.
21. F. Iannantuoni, M.M. de Aranzazu, N. Diaz-Morales, R. Falcon, C. Banuls, Z. Abad- Jimenez, V.M. Victor, A. Hernandez-Mijares, S. Rovira-Llopis, The SGLT2 inhibitor Empagliflozin ameliorates the inflammatory profile in type 2 diabetic patients and promotes an antioxidant response in leukocytes, J. Clin. Med. 8 (11) (2019).
22. I. Andreadou, P. Efentakis, E. Balafas, G. Togliatto, C.H. Davos, A. Varela, C. A. Dimitriou, P.E. Nikolaou, E. Maratou, V. Lambadiari, I. Ikonomidis, N. Kostomitsopoulos, M.F. Brizzi, G. Dimitriadis, E.K. Iliodromitis, Empagliflozin limits myocardial infarction in vivo and cell death in vitro: role of STAT3, mitochondria, and redox aspects, Front. Physiol. 8 (2017) 1077.
23. J. H. Han, T. J. Oh, G. Lee, H. J. Maeng, D. H. Lee, K. M. Kim, S. H. Choi, H. C. Jang, H. S. Lee, K. S. Park, Y. B. Kim, S. Lim, The beneficial effects of empagliflozin, an SGLT2 inhibitor, on atherosclerosis in ApoE (–/–) mice fed a western diet, Diabetologia 60 (2) (2017) 364–376.
24. C. N. Koyani, I. Plastira, H. Sourij, S. Hallstrom, A. Schmidt, P. P. Rainer, H. Bugger, S. Frank, E. Malle, D. von Lewinski, Empagliflozin protects heart from inflammation and energy depletion via AMPK activation, Pharmacol. Res. 158 (2020), 104870.
25. H. Yanai, H. Katsuyama, H. Hamasaki, H. Adachi, S. Moriyama, R. Yoshikawa, A. Sako, Sodium-glucose cotransporter 2 inhibitors: possible anti-atherosclerotic effects beyond glucose lowering, J. Clin. Med. Res. 8 (1) (2016) 10–14.
26. T. Jansen, M. Kvandova, A. Daiber, P. Stamm, K. Frenis, E. Schulz, T. Munzel, S. Kroller-Schon, The AMP-activated protein kinase plays a role in antioxidant defense and regulation of vascular inflammation, Antioxidants (Basel) 9 (6) (2020).
27. Y. Jiang, H. Du, X. Liu, X. Fu, X. Li, Q. Cao, Artemisinin alleviates atherosclerotic lesion by reducing macrophage inflammation via regulation of AMPK/NF-kappaB/ NLRP3 inflammasomes pathway, J. Drug Target. 28 (1) (2020) 70–79.
28. H.W. Jeong, K.C. Hsu, J.W. Lee, M. Ham, J.Y. Huh, H.J. Shin, W.S. Kim, J.B. Kim, Berberine suppresses proinflammatory responses through AMPK activation in macrophages, Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab. 296 (4) (2009) E955–E964.
29. G. Ji, Y. Zhang, Q. Yang, S. Cheng, J. Hao, X. Zhao, Z. Jiang, Genistein suppresses LPS-induced inflammatory response through inhibiting NF-kappaB following AMP kinase activation in RAW 264.7 macrophages, PLoS One 7 (12) (2012), e53101.

Empagliflozin inhibits macrophage inflammation through AMPK signaling pathway and plays an anti-atherosclerosis role

Jie Fu, Hualin Xu, Fuyun Wu, Qiang Tu, Xiao Dong, Huaqiang Xie, Zheng Cao

Abstract

Objective

In recent years, some authoritative clinical studies have found that SGLT2 inhibitorcan reduce cardiovascular risk in patients with diabetes, which may imply that SGLT2 inhibitor can play a role beyond lowering blood glucose. In this study, we explored the effect of empagliflozin on vascular atherosclerosis after removing the effect of diabetes.

Methods

The interaction between SGLT2 inhibitor and the AMPK(Adenosine 5'-monophosphate-activated protein kinase) signal pathway to attenuate atherosclerosis was studied in both spontaneously atherosclerotic mice in vivo and oxidized low-density lipoprotein(ox-LDL) induced macrophage inflammation model in vitro. In vivo experiment the aorta tree and aortic valve area were stained with oil red, and the level of inflammatory factors in the diseased tissue was evaluated by immunohistochemistry. Meanwhile, serum was collected to detect the levels of inflammatory factors. In vitro experiment, the RAW264.7 cell line was selected and ox-LDL was used to induce the release of proinflammatory factors, and different doses of empagliflozin were added. The phagocytosis of macrophages to ox-LDL density lipoprotein, and the expression of inflammatory factors at the protein and RNA levels were measured.

Results

Empagliflozin reduced the area of atherosclerotic plaque and macrophage infiltration in atherosclerotic plaques, decreased the expression of inflammatory factors in local plaque tissues and serum of APOE−/− mice fed with high-fat diet. Empagliflozin can improve the protein expression level of p-AMPK affected by ox-LDL in cell and reduce the gene expression level of inflammatory factors and protein expression level of NF-κB, thus playing an anti-atherosclerosis role.

Conclusions

Empagliflozin improves energy metabolism and reduces the expression of inflammatory factors by activating AMPK. As empagliflozin inhibits atherosclerosis progression, it may be of use in prevention of cardiovascular diseases.

Key words: Atherosclerotic, Empagliflozin, p-AMPK, Macrophage, Inflammation.