

УДК 615.874

РЕАКЦИЯ АУТОФАГИИ ПРИ ПОЛНОЙ ПИЩЕВОЙ ДЕПРИВАЦИИ У ЧЕЛОВЕКА

Тхакушинов И. А., Лысенков С. П.

*Майкопский государственный технологический университет, Майкоп, Россия
E-mail: ubrawka@mail.ru*

В работе исследовали активность аутофагии у мужчин (8 человек) и женщин (20 человек) разного возраста (17–64 года) в условиях проведения оздоровительного курса при полной пищевой депривации (ПД) продолжительностью от 3 до 12 дней с неограниченным доступом к воде. Маркером аутофагии служил уровень белка беклина-1 (Beclin-1), определяемого иммуноферментным методом. Исходный уровень беклина-1 отличался высокой вариабельностью концентрации в плазме крови. Наиболее показательна реакция аутофагии проявлялась у лиц старше 60 лет увеличением концентрации маркера ($p < 0,04$). Гендерных различий выявлено не было. Активность процесса имела определенную периодичность, характеризующуюся снижением активности ниже исходного уровня в первые и на 7–10 сутки голодания и повышением активности на 4–6 и на 11–12 сутки. У лиц с активацией аутофагии выявлена достоверная отрицательная корреляционная связь с индексом массы тела.

Ключевые слова: пищевая депривация, аутофагия, Beclin-1, гендерные особенности, возраст.

ВВЕДЕНИЕ

После открытия основных механизмов аутофагии обоснованно возрос интерес к этому процессу [1]. Оказалось, что аутофагия, как основной механизм поддержания внутриклеточного гомеостаза, может нарушаться, способствуя формированию и течению различных заболеваний [2]. Основной задачей в данной проблеме является эффективный поиск путей регулирования аутофагии у человека. На заре исследования механизмов аутофагии было замечено, что этот процесс значительно активируется при недостатке энергетических субстратов. Следует отметить, что эти первые данные были получены на плесневых грибах. В последующем была показана положительная роль интервального голодания на течение сахарного диабета 2-го типа в экспериментах на животных [3]. Терапевтический эффект многие авторы связывали с активацией аутофагии. Полученные данные были автоматически экстраполированы на людей. Эти обнадеживающие результаты послужили основанием для появления различных ограничительных по калорийности диет. Однако, целенаправленных исследований активности аутофагии в условиях ограничения калорийности питания (ОКП) практически не проводилось. Актуальность такого исследования очевидна еще и потому, что Россия является одним из пионеров применения лечебного голодания в лечении больных с различной патологией [4].

Целью данного исследования явилось изучение активности аутофагии у лиц разного возраста и пола, находящихся в условиях полной пищевой депривации (ПД) различной продолжительности.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Исследование проведено на 31 обследованном (8 мужчинах и 20 женщинах) в возрасте от 17 до 64 лет. Все участники исследования проходили профилактический оздоровительный курс на базе клиники ООО «Центр здоровье» в г. Майкопе. Определение показателей состава тела (мышечной массы – М. М., тощей массы – Т. М., жировой массы – Ж. М., общей воды тела – ОБТ, внеклеточной воды – Внеч. В., внутриклеточной воды – Внут. В.) проводили импедансометрическим способом на аппарате Medi Ld (France) с помощью программного обеспечения EIS-ESTECK (США). Индекс массы тела (ИМТ) рассчитывался по коэффициенту Кетле: отношение массы тела (кг) к росту (m^2). Активность процессов аутофагии оценивали по уровню белка Beclin-1 (беклин-1). Концентрацию беклина-1 определяли методом ИФА на аппарате «CLARIOstarplus» BMG LABTECH (Germany) при помощи тест-наборов «Cloud-Clone Corp» (USA). Концентрация маркера выражалась в пг/мл. Для характеристики активности аутофагии был введен показатель «дельта-беклин-1» – разница между исходным уровнем и после ПД, выраженный в процентах. Забор крови осуществляли утром натощак при поступлении в оздоровительный центр и на 12-й день пребывания. Продолжительность полной пищевой депривации (ПД) составила от 3-х до 12 суток с последующим переходом на гипокалорийное питание (800-1200 ккал/сутки). В связи с высокой вариабельностью концентрации беклина-1, для характеристики выборки был использован межперцентильный интервал 5 %–95 %. Обследуемые были разделены на 2 возрастные группы: молодой + средний возраст до 60 лет (n=22) и пожилой возраст от 61 до 75 лет (n=6). Исследование проведено в соответствии с принципами Хельсинкской Декларации и с письменного информированного согласия всех участников эксперимента.

Анализ цифровых данных проводился с использованием программного обеспечения IBM SPSSStatistics (26.0). Для характеристики статистического ряда использовалась процентиля 5%–95 % с вычислением среднего значения, ошибки средней. Для сравнения средних значений использовали непараметрический U-критерий Манна-Уитни, параметрический t-критерий Стьюдента. В целях выявления связей между исследуемыми параметрами использовался корреляционный анализ Пирсона. Связь считалась достоверной при $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследуя уровень беклина-1 в исходном состоянии, мы получили результаты, подтверждающие наличие высокой вариабельности используемого маркера. Так, минимальные и максимальные значения составили соответственно 1,14 пг/мл и 561,16 пг/мл. В связи с этим дальнейший анализ полученных результатов проводился с использованием межперцентильного интервала 5%–95 %.

Как показал анализ полученных результатов (табл. 1) как во всей группе, так и у в группах мужчин и женщин вне зависимости от возраста отмечена тенденция к росту уровня беклина-1 после ОКП.

Таблица 1
Показатели беклина-1 в различных группах до- и после пищевой депривации (ПД) (межпроцентильный интервал 5%-95 %)

Группы	Воз.	Концентрация беклина-1, пг/мл			Достоверность, P
		М _{ср.}	Медиана	СОС	
1. До ПД (n=28)	все	50,0	27,0	10,8	P ₁₋₂ <0,1
2. После ПД (n=28)		71,0	58,5	8,4	
3. До ПД (n=22)	<60 лет	57,1	29,1	13,3	P ₃₋₄ <0,2 P ₄₋₆ <0,1
4. После ПД (n=22)		77,5	64,5	10,0	
5. До ПД (n=6)	>60 лет	22,1	18,8	5,6	P ₅₋₃ <0,2 P ₅₋₆ <0,04
6. После ПД (n=6)		47,1	38,8	9,0	
7. Мужчины до ПД (n=8)	все	33,5	21,0	15,7	P ₇₋₈ <0,1 P ₇₋₉ <0,3
8. Мужчины после ПД (n=8)		64,7	56,0	12,3	
9. Женщины до ПД (n=20)	все	56,1	33,4	13,7	P ₉₋₁₀ <0,3 P ₈₋₁₀ <0,6
10. Женщины после ПД (n=20)		73,5	58,5	10,8	
11. Отрицательная дельта (n=11)	все	-20,4	-14,0	4,6	P ₁₁₋₁₂ <0,003
Положительная дельта (n=17)		262,8	172,0	67,7	

Примечание: Воз. – возраст; СОС – среднеквадратичная ошибка средних.

При выявлении возрастных особенностей были получены данные о более выраженной реакции аутофагии у лиц старше 60 лет. В этой группе концентрация беклина-1 достоверно ($p < 0,04$) увеличивалась после ОКП. Корреляционный анализ (табл. 2) между уровнем беклина-1 и морфометрическими параметрами показал отсутствие достоверной связи как до- так и после ОКП. Отсутствие явных различий в концентрации маркера по гендерному принципу заставило нас проанализировать другой показатель, а именно «дельта-беклин-1» – разницу концентрации после ОКП и концентрации в исходном состоянии, выраженную в процентах к исходному показателю. Оказалось, что из 28 обследованных у 17 из них концентрация беклина возрастала (положительная дельта), а у 11 человек она определялась ниже исходного значения (отрицательная дельта). Различия между этими показателями

оказались высоко достоверными ($p < 0,003$). Такое распределение исследуемой группы на подгруппы позволил установить наличие отрицательной корреляционной связи ($r = -0,4$; $p < 0,05$) между индексом массы тела (ИМТ) и дельтой – беклина-1 у лиц с положительной дельтой (табл. 2).

Таблица 2

Корреляционный анализ в зависимости от направленности изменений (дельты) концентрации Beclin-1 (+/-) и дельтой исследуемых морфофизиологическими параметрами после проведения ПД

Исследуемые группы	Коэффициент корреляции							
	Состав тела после КОП							
	Вес	ИМТ	М.М.	Т.М.	Ж.М.	ОВТ	Внек. В.	Внут. В.
Положительная дельта (n=17)	-0,3	-0,4*	-0,3	-0,3	-0,2	-0,1	0,003	-0,1
Отрицательная дельта (n=11)	-0,2	-0,2	-0,2	-0,1	-0,3	-0,1	-0,2	0,1

Примечание: *достоверность – $p < 0,05$; ИМТ – индекс массы тела; М. М. – мышечная масса, Т. М. – тощая масса, Ж. М. – жировая масса, ОВТ – общая вода тела, Внек. В. – внеклеточная вода, Внут. В. – внутриклеточная вода.

Это означает, что степень активации аутофагии находилась в обратной зависимости от массы тела. При этом не было выявлено за счет какого конкретного компонента состава тела определялась корреляционная взаимосвязь. У лиц с отрицательной дельтой такая связь не достигала достоверных значений. Кроме того, исходные показатели концентрации беклина-1 не коррелировали ни с одним из исследуемых параметров тела.

Если представить полученные данные по дельте – беклина-1 (рис.), в виде графика, то можно отметить два периода, характеризующиеся значительным увеличением активности аутофагии.

Первый временной период активности аутофагии отмечен у голодавших 4–6 суток, а второй период отмечен у голодавших 11–12 суток. Интересно, что наряду с активацией процесса аутофагии отмечены периоды снижения активности аутофагии у голодавших до 3-х суток и голодавших 9–10 суток. Как видно из графика, значения дельта-беклина-1 принимали даже отрицательные значения.

Здесь уместно подчеркнуть следующий момент: обследованные находились на лечебном голодании различные сроки (от 3 до 12 суток) с последующим переходом на гипокалорийное питание. Забор крови осуществлялся утром в первый день курса лечебного голодания и на 12 сутки пребывания в оздоровительном центре. Фактически мы регистрировали остаточные эффекты аутофагии на 12 сутки при различных сроках голодания. Конечно, интереснее было бы определять

концентрацию маркера ежедневно, что повысило бы объективность и дало ответ на оптимальную продолжительность голодания. Из этических соображений (ежедневная пункция вены) такое исследование провести было затруднительно, но и полученные факты позволили сделать ряд важных заключений.

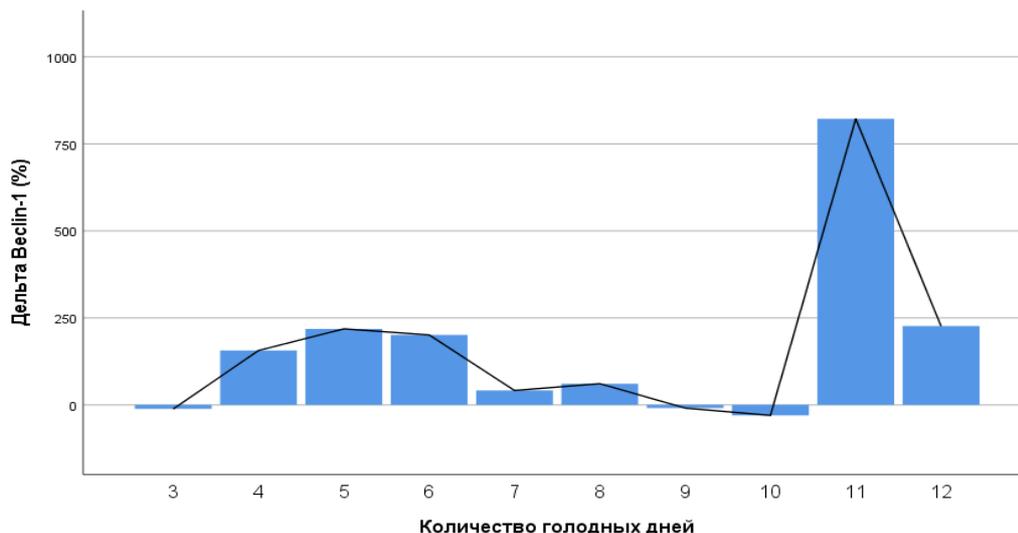


Рис. 1. Усредненная диаграмма показателей дельта-беклина-1 в зависимости от количества «голодных» дней.

Можно предположить, что в начальном периоде голодания (3 суток) организм испытывает «голодный» стресс с торможением процесса аутофагии. Этот период совпадает с I-ой стадией «пищевого возбуждения» [5]. При отсутствии поступления калорий и для обеспечения энергией собственного организма процесс аутофагии активизируется особенно на 4–6 сутки (стадия «нарастающего кетоацидоза»). Спустя это время (4–6 суток). С переходом на эндогенное питание, процесс аутофагии замедляется и даже становится менее интенсивным, чем до начала исследования. Если пациенты продолжали голодать, то аутофагия вновь активировалась (11–12 сутки) в большинстве случаев превосходя исходный уровень (III-стадия «компенсированного кетоацидоза»).

Закономерности, выявляемые при анализе активности процесса аутофагии, в определенной мере соответствуют стадиям процесса голодания, описанных А. Н. Кокосовым и его коллегами. При это надо признать, что полученные в день забора крови данные наиболее полно отражают активность аутофагии у пациентов проголодавших 11–12 дней. У проголодавших менее 11–12 дней мы фактически фиксировали отсроченные реакции аутофагии.

Одним из источников появления маркера в крови могла служить жировая масса. В литературе имеются данные о том, что мышцы обладают большими возможностями для активации процесса аутофагии и, соответственно, роста ее

биохимических маркеров [6]. Жировая масса в условиях дефицита энергетических ресурсов по активности не уступает мышечной массе [7].

Анализируя зависимость между потерями жировой массы и степенью активности аутофагии (дельта-беклин-1, %) можно отметить (Рис. 2), что активность возрастает при потере 5–20 % жировой массы. Однако, такая активация не носит закономерного характера.

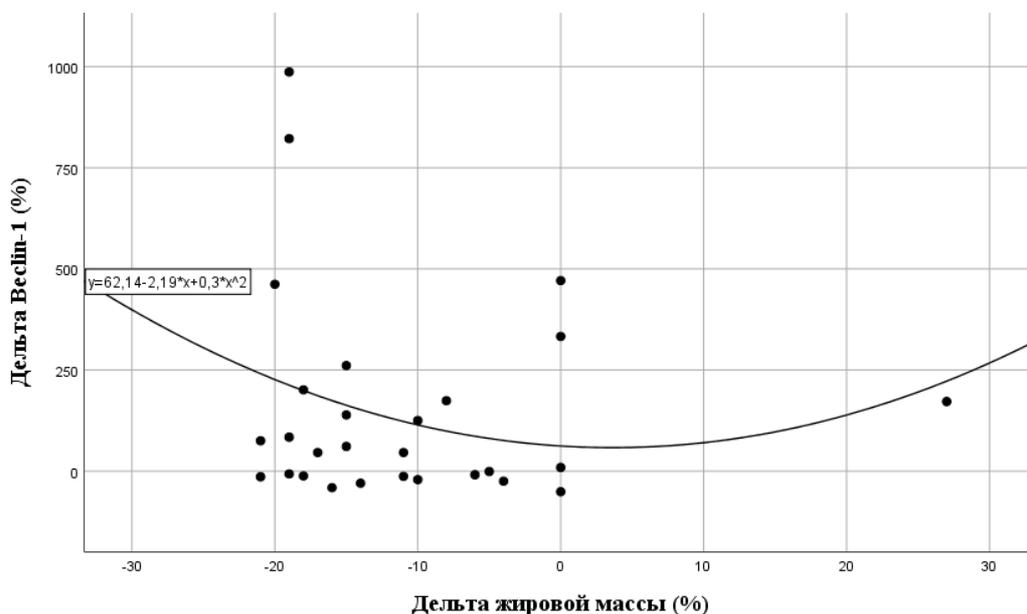


Рис. 2. Диаграмма зависимости дельты беклина-1 и дельты жировой массы.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно отметить некоторую периодичность в активности аутофагии при голодании. В первые дни на стадии пищевого возбуждения отмечено снижение активности аутофагии, по всей вероятности как следствие стрессового воздействия голодания. Активация аутофагии после 4–6 суток голодания возможно связана с переходом на эндогенное питание и получении энергии из жира, белков, расщепления гликогена, нарастающим ацидозом. В условиях дефицита углеводов сгорание жиров происходит неполноценно, что сопровождается появлением недоокисленных продуктов жирового обмена. Это может являться стимулом к активации аутофагии. Получение калорий за счет аутофагии, по-видимому, может происходить до какого-то этапа вне зависимости от потери массы тела. Об этом свидетельствует наличие отрицательной корреляционной связи между индексом массы тела и дельта-беклином-1 у лиц с положительными значениями дельты. Однако, продолжающееся накопление кетонных тел, ацетона, ацетоуксусной кислоты, оксимасляной кислоты создают условия для нарастания метаболического

ацидоза. Пик ацидоза («ацидотический криз») в большинстве случаев наступает на 6–7 сутки голодания, который, как видно из рис. 2, напротив-угнетает процесс аутофагии вплоть до 11–12 суток. По всей вероятности, производство и получение калорий из своих энергетических запасов по важности для выживания превосходит аутофагию на данном этапе исследования. Наступление ацидотического криза, по всей вероятности, является мощным триггером к переходу на эндогенное питание. К этому времени функциональные физиологические и биохимические системы поддержания кислотно-основного равновесия: дыхательная, почечная, желудочно-кишечный тракт, кожа, буферные системы крови до определенных моментов компенсируют метаболический ацидоз.

Снижение уровня кетоновых тел, начиная с 7–9-го дня, фиксируемое отдельными авторами, предшествует отмеченному нами второму пику активности аутофагии на 11–12 сутки. К этому моменту активированная секреция в желудке прекращается, а начинается спонтанная секреция, которая сопровождается появлением в желудке и кишечнике белков, ферментов, жиров и углеводов, служащих субстратами для повторного метаболизма и всасывания. К этому времени компенсируются и явления метаболического ацидоза. В поставках эндогенных субстратов принимают участие клетки крови, в частности, макрофаги и нейтрофилы, в которых отмечается усиленный аутолиз [8]. С учетом очень тесного взаимодействия процесса аутофагии и апоптоза, активация аутофагии на 11–12 сутки выглядит объяснимо. Если учесть, что аутофагия – это внутриклеточный процесс, то появление маркеров аутофагии в плазме крови могло несколько запаздывать по времени от момента компенсации метаболического ацидоза.

Однако, следует отметить, что вектор изменений активности беклина-1 может быть разнонаправленным. Так, в данном исследовании, из 28 обследованных, находящихся на голоде и гипокалорийной диете, у 17 человек концентрация беклина-1 повышалась (дельта-беклина-1 положительная), а у 11 человек уменьшалась (дельта-беклина-1 отрицательная). Направленность реакции аутофагии, предположительно, зависит от множества факторов, которые можно выявить только при широкомасштабном исследовании.

Таким образом, реакция аутофагии на полную пищевую депривацию протекает с определённой периодизацией, в большинстве случаев ее можно было оценить как положительную, т.е. с признаками активации. В течение наблюдения (12 дней) выявлялись 2 временных пика активации на 4–6 и на 11–12 сутки голодания. У пациентов, проголодавших 4–6 суток, отмечены признаки сохранившейся активности до конца наблюдения. Потерю жировой массы, которая как закономерность наблюдалась при голодании, следует отнести к независимому фактору по отношению к активности аутофагии. В подтверждение к этому, мы не выявили достоверной связи между показателями дельты беклина-1 и дельты жировой массы ($r = -0,06$; $p > 0,05$). Эти данные несколько не согласуются с данными, полученными на изолированных адипоцитах, взятых от лиц с ожирением [9]. В данных исследованиях было показано, что активность аутофагии более значима в гипертрофированных адипоцитах висцерального жира. В наших исследованиях у меньшей половины обследованных лиц уровень беклина-1 к концу наблюдения

снизился по отношению к исходному. Индивидуальная реакция на пищевую депривацию может быть различной и зависит от многих факторов, включая продолжительность пищевой депривации. В перспективе целесообразно было бы исследовать активность аутофагии на отдельных группах с различными режимами пищевой депривации.

Список литературы

1. Cao W. An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress./ Cao W., Li J., Yang K., Cao D. // Bulletin du cancer. – 2021. – 108 (3). – P. 304.
2. Kocak M. Targeting autophagy in disease: established and new strategies / Kocak M., Erdi S. E. Jorba G., Maestro I., Farrés J., Kirkin V., Martinez A., Pless O. // Autophagy. – 2021. – P. 1–23.
3. Liu H. Intermittent fasting preserves beta-cell mass in obesity-induced diabetes via the autophagy-lysosome pathway. / Liu H., Javaheri A., Godar R. J., Murphy J., Ma X., Rohatgi N., Mahadevan J., Нурс К., Saftig P., Marshall C., McDaniel M. L., Remedi M. S., Razani B., Urano F., Diwan A. // Autophagy. – 2016. – 13 (11). – P. 1952–1968.
4. Николаев Ю. С. Голодание ради здоровья. / Ю. С. Николаев, Е. И. Нилов, В. Г. Черкасов // Советская Россия. – 1988. – 239 с.
5. Кокосов А. Н. Общие вопросы разгрузочно-диетической терапии. / А. Н. Кокосов // Разгрузочно-диетическая терапия: руководство для врачей. – 2007. – С. 15–28.
6. Brandt N. Exercise and exercise training-induced increase in autophagy markers in human skeletal muscle. / N. Brandt, T. P. Gunnarsson, J. Bangsbo, H. Pilegaard // Physiological Reports. – 2018. – 6 (7)
7. Ferhat M. Autophagy in adipose tissue physiology and pathophysiology / Ferhat M., Funai K., Boudina S. // Antioxidants and redox signaling. – 2019. – 31 (6). – P. 487–501.
8. Zahid K. Role of macrophage autophagy in atherosclerosis: modulation by bioactive compounds. / Zahid K., Sufian H. B., Choudhury M., Yamasaki M., Al-Harrasi A., Moustaid-Moussa N., Rahman S. M. // The biochemical journal. – 2021. – Vol. 478, No. 7. – P. 1359–1375.
9. Kovsan J. Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. / Kovsan J., Blüher M., Tarnovscki T., Klötting N., Kirshtein B., Madar L., Shai I., Golan R., Harman-Boehm I., Schön M. R., Greenberg A. S., Elazar Z., Bashan N., Rudich A. // The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism. – 2010. – 96 (2). – P. 268–277.

AUTOPHAGY RESPONSE IN COMPLETE NUTRITIONAL DEPRIVATION IN HUMANS

Tkhakushinov I. A., Lysenkov S. P.

*Maikop State Technological University, Maikop, Russia
E-mail: u6pawka@mail.ru*

In the work on 28 patients (8 men and 20 women) aged 17 to 64 years, the activity of autophagy was studied under conditions of complete food deprivation (FD) for a duration of 3 to 12 days, followed by a transition to hypo-caloric nutrition (800–1200 kcal/day) without limiting water consumption. Beclin-1 protein (pg/ml) was used as an indicator of autophagy activity. Beclin-1 protein was determined by enzyme immunoassay on a «CLARIOstar PLUS» BMG LABTECH (Germany) using Cloud-Clone Corp (USA) test kits. Blood sampling was carried out in the morning before the start of the fasting course

and on the 12th day. To characterise the statistical series, percentiles of 5%–95 % were used with the calculation of the average value, the error of the mean. For comparison of mean values, the nonparametric Mann-Whitney U-test, parametric Student's t-test, Spearman's correlation coefficient were used, with a significance level of $p < 0.05$.

As studies have shown, regardless of the duration of food deprivation in the entire study group, a tendency to an increase in the concentration of beclin-1 was revealed, but this indicator did not reach the level of significance. A similar situation was noted in persons under 60 years of age without taking into account gender characteristics. In persons over 60 years of age, food deprivation caused a significant increase in the level of beclin-1 ($p < 0.01$) by 2.0 times.

An analysis of the gender characteristics of reactions to FD revealed a more significant increase in the level of beclin-1 in men and less pronounced in women ($p < 0.3$). However, a detailed analysis of the direction of changes in the concentration of beclin-1 from the initial values (in %) showed a multidirectional response of autophagy to FD: of all the subjects, an increase in the concentration of beclin-1 (positive delta-beclin-1) was noted in 17 people, and a decrease in 11 (negative delta-beclin-1). In the negative delta group, no correlations with body components were found. Moreover, a relationship between autophagy activity and fat content has not been established, although it has been established in a number of studies on lipocytes. However, in the group with a positive delta, a negative correlation was found between the delta-beclin-1 index and body mass index ($r = -0.4$; $p < 0.05$).

Establishment of patterns in the activity of autophagy depending on the duration of food deprivation showed a certain temporal periodicity of the activity of the process. Two time periods were established, which were characterised by an increase in autophagy activity in individuals who were starving for 4–6 days and 11–12 days, and a decrease in those who were starving for 1–3 days and 9–10 days.

It can be assumed that autophagy inhibition during the first 3 days may be associated with “hungry” stress (the stage of nutritional arousal). After this period, with the transition of the body to endogenous nutrition (4–6 days), the process of autophagy and the process of “increasing ketoacidosis” are activated in parallel. Ketoacidosis, as is known from the literature, inhibits the process of autophagy, and after the achievement and resolution of the acidotic crisis in fasted 11–12 days, an increase in autophagy activity was noted.

In the future, it would be interesting to obtain information about the duration of the effect of autophagy activation and to establish the causes and factors of inactivation of this process.

Keywords: food deprivation, autophagy, Beclin-1, gender, age.

References

1. Cao W., Li J., Yang K., Cao D. An overview of autophagy: Mechanism, regulation and research progress. *Bulletin du cancer*, **108** (3), 304 (2021).
2. Kocak M., Erdi S. E. Jorba G., Maestro I., Farrés J., Kirkin V., Martinez A., Pless O. Targeting autophagy in disease: established and new strategies, *Autophagy*, 1 (2021).
3. Liu H., Javaheri A., Godar R. J., Murphy J., Ma X., Rohatgi N., Mahadevan J., Hyrc K., Saftig P., Marshall C., McDaniel M. L., Remedi M. S., Razani B., Urano F., Diwan A. Intermittent fasting

- preserves beta-cell mass in obesity-induced diabetes via the autophagy-lysosome pathway, *Autophagy*, **13** (11), 1952 (2016).
4. Nikolaev Yu. S., Nilov E. I., Cherkasov V. G. Starvation for the sake of health, *Soviet Russia*, 239 p. (1988).
 5. Kokosov A. N. General issues of unloading and dietary therapy, *Unloading and dietary therapy: a guide for doctors*, 15 (2007).
 6. Brandt N., Gunnarsson T. P., Bangsbo J., Pilegaard H. Exercise and exercise training-induced increase in autophagy markers in human skeletal muscle, *Physiological Reports*, **6** (7) (2018).
 7. Ferhat M., Funai K., Boudina S. Autophagy in adipose tissue physiology and pathophysiology. *Antioxidants and redox signaling*, **31** (6), 487 (2019).
 8. Zahid K., Sufian H. B., Choudhury M., Yamasaki M., Al-Harrasi A., Moustaid-Moussa N., Rahman S. M. Role of macrophage autophagy in atherosclerosis: modulation by bioactive compounds. *The biochemical journal*, **478** (7), 1359 (2021).
 9. Kovsan J., Blüher M., Tarnovscki T., Klötting N., Kirshstein B., Madar L., Shai I., Golan R., Harman-Boehm I., Schön M. R., Greenberg A. S., Elazar Z., Bashan N., Rudich A. Altered autophagy in human adipose tissues in obesity. *The Journal of Clinical Endocrinology & Metabolism*, **96** (2), 268 (2010).