

СОДЕРЖАНИЕ

Том 86, выпуск 2, 2021

Использование конъюгированного с флуоресцентной меткой аптамера ARC1779 для оценки влияния H ₂ O ₂ на экзоцитоз фактора Виллебранда <i>П.П. Авдонин, С.К. Труфанов, А.А. Цитрина, Е.Ю. Рыбакова, Н.В. Гончаров, П.В. Авдонин</i>	147
Белок клото и сердечно-сосудистая система (обзор) <i>И.Н. Тюренко, В.Н. Перфилова, А.А. Нестерова, Е.Ю. Глинка</i>	158
Механизмы нарушения метаболизма L-аргинина в эндотелиальных клетках (обзор) <i>Дж.Т. Маммедова, А.В. Соколов, И.С. Фрейдлин, Э.А. Старикова</i>	175
Глюкокортикоиды в нейровоспалении гиппокампа: доктор Джекилл и мистер Хайд (обзор) <i>А.П. Большаков, Л.В. Третьякова, А.А. Квичанский, Н.В. Гуляева</i>	186
Уровень мРНК Транспортёров цинка зависит от содержания цинка и воспалительных процессов, индуцированных HIV-1 Tat в линиях клеток мышц (RD) и моноцитах (THP-1) <i>К. Аллури, С.Р. Ятхану, Н.Б. Кондапалли, Р. Хемалатха, К.М. Наир, С. Гош</i>	200
Гепатопротекторное действие нагруженных полидатином хитозановых наночастиц у крыс с сахарным диабетом: модуляция метаболизма глюкозы, окислительного стресса и биомаркеров воспалительных процессов <i>А.М. Абд Эль-Хамид, А.И. Юсеф, С.М. Абд Эль-Тваб, А.А.Г. Эль-Шахави, А. Абдель-Монеим</i>	214
Усиление растворимости и одностадийная очистка функционального димера карбоксипептидазы G2 <i>А. Ходакарами, Б. Дабирманеш, С. Асад, М. Каледи</i>	228
Роль Р-гликопротеина в ограничении проницаемости клеточных мембран при окислительном стрессе <i>А.В. Шулькин, Ю.В. Абаленихина, И.В. Черных, П.Д. Ерохина, Е.Н. Якушева</i>	236
Гуморальное воздействие В-клеточной опухоли на мультипотентные мезенхимные стромальные клетки костного мозга <i>Н.А. Петинати, А.Е. Бигильдеев, Д.В. Карпенко, Н.В. Сац, Н.М. Капранов, Ю.О. Давыдова, Е.А. Фастова, А.У. Магомедова, С.К. Кравченко, Г.П. Арапиди, М.И. Русанова, М.А. Лагарькова, Н.И. Дризе, В.Г. Савченко</i>	248
Уровни белков CRABP1 и CRABP2 не коррелируют с чувствительностью клеток рака молочной железы к ретиноевой кислоте, но коррелируют между собой, причем CRABP2 является регулятором продукции CRABP1 <i>А.Д. Еникеев, А.В. Комельков, М.Е. Аксельрод, С.А. Галецкий, С.А. Кузьмичев, Е.М. Чевкина</i>	259
Структура вирионов А-вируса картофеля по данным малоуглового рентгеновского рассеяния и комплементарных методов <i>Э.В. Штыкова, М.В. Петухов, Н.В. Федорова, А.М. Арутюнян, Е.В. Скурат, Л.В. Кордюкова, А.В. Моисеенко, А.Л. Ксенофонтов</i>	274
Опечатки	288

CONTENTS

Vol. 86, Publ. 2, 2021

The Use of Fluorescently Labeled ARC1779 Aptamer for Assessing the Effect of H ₂ O ₂ on Von Willebrand Factor Exocytosis <i>P. P. Avdonin, S. K. Trufanov, E. Yu. Rybakova, A. A. Tsitrina, N. V. Goncharov, and P. V. Avdonin</i>	147
Klotho Protein and the Cardiovascular System (Review) <i>I. N. Tyurenkov, V. N. Perfilova, A. A. Nesterova, and E. Yu. Glinka</i>	158
The Mechanisms of L-Arginine Metabolism Disorder in Endothelial Cells (Review) <i>J. T. Mammedova, A. V. Sokolov, I. S. Freidlin, and E. A. Starikova</i>	175
Glucocorticoids: Dr. Jekyll and Mr. Hyde of Hippocampal Neuroinflammation (Review) <i>A. P. Bolshakov, L. V. Tretyakova, A. A. Kvichansky, and N. V. Gulyaeva</i>	186
Levels of Zinc Transporters mRNA Depending on Zinc Status and HIV-1 Tat-Induced Inflammation in Muscle (RD) and Monocyte (THP-1) Cell Lines <i>K. Alluri, S. Reddy Yathapu, N. Babu Kondapalli, R. Hemalatha, K. M. Nair, and S. Ghosh</i>	200
Hepatoprotective Effects of Polydatin-Loaded Chitosan Nanoparticles in Diabetic Rats: Modulation of Glucose Metabolism, Oxidative Stress, and Inflammation Biomarkers <i>A. M. Abd El-Hameed, A. I. Yousef, S. M. Abd El-Twab, A. A. G. El-Shahawy, and A. Abdel-Moneim</i>	214
Enhanced Solubility and One-Step Purification of Functional Dimeric Carboxypeptidase G2 <i>A. Khodakarami, B. Dabirmanesh, S. Asad, and M. Khaledi</i>	228
P-Glycoprotein Role in Limitation of Permeability of Cell Membranes during Oxidative Stress <i>A. V. Shchulkin, Yu. V. Abalenikhina, I. V. Chernykh, P. D. Erokhina, and E. N. Yakusheva</i>	236
Humoral Effect of a B-Cell Tumor on the Bone Marrow Multipotent Mesenchymal Stromal Cells <i>N. A. Petinati, A. E. Bigildeev, D. S. Karpenko, N. V. Sats, N. M. Kapranov, Y. O. Davydova, E. A. Fastova, A. U. Magomedova, S. K. Kravchenko, G. P. Arapidi, M. I. Rusanova, M. M. Lagarkova, N. I. Drize, and V. G. Savchenko</i>	248
CRABP1 and CRABP2 Protein Levels Do Not Correlate with the Sensitivity of Breast Cancer Cells to Retinoic Acid, but Correlate with Each Other with CRABP2 Being an Upstream Regulator of CRABP1 Production <i>A. D. Enikeev, A. V. Komelkov, M. E. Axelrod, S. A. Galetsky, S. A. Kuzmichev, and E. M. Tchevkina</i>	259
Structure of Potato Virus A Virions According to Small Angle X-Ray Scattering Data and Complementary Methods <i>E. V. Shtykova, M. V. Petukhov, N. V. Fedorova, A. M. Arutyunyan, E. V. Skurat, L. V. Kordyukova, A. V. Moiseenko, and A. L. Ksenofontov</i>	274
Errata	288

УДК 576.08/612.115.35/54-39

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ КОНЬЮГИРОВАННОГО С ФЛУОРЕСЦЕНТНОЙ МЕТКОЙ АПТАМЕРА ARC1779 ДЛЯ ОЦЕНКИ ВЛИЯНИЯ H₂O₂ НА ЭКЗОЦИТОЗ ФАКТОРА ВИЛЛЕБРАНДА*

© 2021 П.П. Авдонин¹, С.К. Труфанов¹, А.А. Цитрина¹, Е.Ю. Рыбакова¹,
Н.В. Гончаров^{2,3}, П.В. Авдонин^{1**}

¹ Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334 Москва, Россия;
электронная почта: ruvavdonin@yandex.ru

² Институт эволюционной физиологии и биохимии им. И.М. Сеченова РАН, 194223 Санкт-Петербург, Россия

³ НИИ гигиены, профпатологии и экологии человека ФМБА России,
188663 пос. Кузьмоловский, Ленинградская обл., Россия

Поступила в редакцию 05.06.2020

После доработки 15.10.2020

Принята к публикации 15.10.2020

Предложен новый подход для количественного определения экспонированного на поверхности эндотелиальных клеток (ЭК) фактора Виллебранда (ФВ) с использованием аптамера ARC1779, взаимодействующего с доменом A1 в структуре ФВ. Для визуализации образующегося комплекса ФВ с аптамером к молекуле последнего была присоединена флуоресцентная метка Cy5. Культивируемые ЭК из пупочной вены человека прижизненно окрашивали конъюгатом ARC1779-Cy5, и снимали изображение с помощью флуоресцентного микроскопа. Анализ изображения проводили с помощью программы CellProfiler. Мультимерные комплексы ФВ, секретлируемые тельцами Вейбеля–Паладе, при окраске конъюгатом ARC1779-Cy5 видны под микроскопом как яркие точечные структуры округлой и неправильной формы. Число этих структур многократно увеличивается при воздействии на ЭК активаторов секреции ФВ, гистамина и тромбина. Кроме того, ARC1779-Cy5 выявляет на поверхности активированных ЭК гигантские мультимеры ФВ, развёрнутые в виде длинных нитей. Секретию ФВ в ЭК активируют вторичные мессенджеры – cAMP и Ca²⁺. Есть свидетельства, что пероксид водорода в ЭК также выполняет функцию вторичного мессенджера. Кроме того, в ЭК поступает экзогенный H₂O₂, образующийся в лейкоцитах. Задачей работы было, используя предложенный метод, определить, какое влияние H₂O₂ оказывает на экспрессию ФВ на поверхности ЭК. Показано, что пероксид водорода при концентрации 100 мкМ (ниже цитотоксической) в несколько раз увеличивает количество экспонированных на плазматической мембране точечных структур ФВ. Полученные данные свидетельствуют о роли H₂O₂ в качестве посредника, активирующего экзоцитоз телец Вейбеля–Паладе и секрецию ФВ в эндотелии сосудов при воспалении и при индукции образования эндогенных активных форм кислорода в ЭК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: фактор Виллебранда, аптамеры, пероксид водорода, эндотелиальные клетки, секреция.

DOI: 10.31857/S0320972521020019

ВВЕДЕНИЕ

Более половины всех фармакологических препаратов являются лигандами мембранных рецепторов и других белков [1, 2]. Это в абсолютном большинстве низкомолекулярные вещества природного происхождения или искусственные синтетические соединения. Почти все они не обладают полной избирательностью и,

Принятые сокращения: ФВ – фактор Виллебранда; ЭК – эндотелиальные клетки.

* Статья на английском языке опубликована в режиме Open Access (открытого доступа) на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 86, вып. 2, 2021.

** Адресат для корреспонденции.

как правило, действуют на несколько мишеней в клетках. С появлением методов генной инженерии и молекулярной иммунологии стало интенсивно развиваться новое направление в фармакологии – создание исключительно специфических лекарственных препаратов на основе гуманизированных антител. Разработаны антитела против рецепторов, компонентов системы комплемента и т.д. Присоединение к антителам маркеров и токсических компонентов позволило использовать их одновременно и как диагностический препарат, и как лекарство. Данный подход является основой для нового направления в биомедицинских исследованиях – терапии. Антитело используется как «якорь», к которому присоединяется конструкция, несущая

шая метку для визуализации патологического очага, и компонент, осуществляющий терапевтическое воздействие [3].

В 1990 г. был предложен метод SELEX (Systematic Evolution of Ligands by Exponential Enrichment) для создания аптамеров – коротких одноцепочечных олигонуклеотидов ДНК или РНК с уникальными последовательностями, способных с высоким сродством и специфичностью связываться с мишенями разного типа: белками, полисахаридами, локализованными на клеточной поверхности, с низкомолекулярными соединениями, ионами металлов и другими [4–7]. По аффинности и избирательности действия аптамеры не уступают антителам. Разработан подход для селекции аптамеров против отдельных видов клеток, включая раковые [8]. Проводятся клинические испытания аптамеров, предназначенных для лечения онкологических заболеваний и болезней крови [9, 10]. Аптамеры имеют ряд преимуществ по сравнению с антителами. Их структура воспроизводима, они термостабильны, менее иммуногенны и могут храниться в сухом виде неограниченное время [10]. Показана возможность использования аптамеров вместо антител в гистохимических исследованиях [11] и для проточной цитофлуориметрии [12].

Одной из мишеней для антител и аптамеров является фактор Виллебранда (ФВ). Это важнейший гликопротеин плазмы крови, секретруемый эндотелиальными клетками (ЭК) (в меньшей степени тромбоцитами) и обеспечивающий поддержание гемостаза. ФВ поступает в кровь из ЭК в виде популяции гигантских линейных мультимерных молекул молекулярной массой до 20 000 кДа, которые образованы из мономеров ~250 кДа, соединённых дисульфидными связями [13]. В молекуле ФВ имеются регулярно повторяющиеся структурные домены А1, обеспечивающие его взаимодействие с гликопротеином 1b на мембране тромбоцитов. Присоединение тромбоцитов к развернутым молекулам ФВ по этому домену инициирует образование тромбов в артериолах и капиллярах при их повреждении и остановку кровотечения. Избыточное образование ФВ или его повышенная активность, вызванная мутациями, приводит к патологическому тромбообразованию в микрососудах и развитию тромботических микроангиопатий. Создан фармакологический препарат «Caplacizumab» на основе наноклетки против домена А1 в молекуле ФВ [14], применяемый для лечения тромботической тромбоцитопенической пурпуры. Параллельно с этим разработан также связывающийся с А1 аптамер ARC1779, показавший эффективность при

лечении болезни Виллебранда типа 2В [15–17]. Метод SELEX усовершенствован благодаря использованию при получении библиотек олигонуклеотидов со случайными (random) последовательностями искусственного пятого нуклеотида (ExSELEX), и таким образом был синтезирован новый ещё более эффективный аптамер против ФВ [18].

Помимо применения в качестве фармпрепаратов, низкомолекулярные лиганды и антитела широко используются для проведения биологических исследований мембранных рецепторов и внутриклеточных белков. Метод иммунофлуоресцентного окрашивания антителами позволяет оценивать локализацию и уровень экспрессии белков на плазматической мембране и внутри клетки. Один из вопросов, требующих более глубокого изучения, касается механизмов регуляции секреции ФВ эндотелиальными клетками. Антитела против ФВ позволяют оценивать его экспонирование на поверхности плазматической мембраны. При этом проводится инкубация фиксированных ЭК с первичными антителами и после этого с флуоресцентно окрашенными вторичными антителами [19]. В настоящей работе нами впервые был применен подход с определением экзоцитоза ФВ с помощью флуоресцентно-меченного аптамера. С этой целью был использован аптамер ARC1779 с присоединенным к его молекуле флуоресцентным красителем Cy5. В настоящее время разработано несколько аптамеров, присоединяющихся к ФВ по домену А1 и блокирующих его взаимодействие с тромбоцитами [17, 18, 20, 21], однако пока только ARC1779 получил применение в качестве лекарственного препарата. Используя конъюгат ARC1779-Cy5, нам удалось наблюдать за раскрытием на поверхности ЭК отдельных секреторных везикул и исследовать регуляцию этого процесса непосредственно в живых клетках. Мы показали, что пероксид водорода в концентрациях, в которых он может накапливаться в сосудах, стимулирует экзоцитоз телец Вейбеля–Паладе и экспонирование ФВ на плазматической мембране ЭК.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

ЭК выделяли из пупочной вены человека по методике, описанной ранее [22], и культивировали в среде М199, содержащей 20% сыворотки эмбрионов крупного рогатого скота («Sigma-Aldrich», США) и эндотелиальную ростовую добавку, полученную из замороженных мозгов кролика (ООО «Кролинфо», д. Новая, Московская обл., Россия) по методу Masciag et al. [23].

Клетки идентифицировали по морфологическим критериям: наличию ФВ, ангиотензин-превращающего фермента и поверхностных белков CD31, CD54, CD61 [24]. ЭК культивировали в атмосфере, содержащей 5% CO₂. В работе использовали клетки 2–4 пассажей. Для снятия клеток при пассировании применяли реагент аккутазу («Sigma-Aldrich», США).

Для окрашивания ФВ использовали аптамер ARC1779 (патент US20090203766A1, «Archemix Corp.», США) с присоединённым к нему по 5'-концу красителем Cy5 (Cy5-mGm-CmGmUdGdCdAmGmUmGmCmCmUmUmCm-GmGmCdCmG-s-dTmGdCdGdGdTmGmCd-CmUdCdCmGmUdCmAmCmGmC, где «m» – 2'-Оме, «s» – фосфоротиоатная связь). В качестве контроля был взят олигонуклеотид Cy5-mGmGmCmCdAdGdCmCmUmCmUmCmCmUmGmGmUmGdGmG-s-TmCdGdCdCTmAmGdGmUdCdGmGmGdCmCmCmCmU со случайной последовательностью, но с таким же соотношением нуклеотидов, как у ARC1779. Олигонуклеотиды синтезировали в компании «ДНК-синтез», Россия.

При определении действия гистамина (100 мкМ), тромбина (1 ед./мл) или пероксида водорода (100 мкМ) на экзоцитоз ФВ выращенные в 24-луночном планшете ЭК отмывали от среды роста физиологическим солевым раствором (PSS, pH 7,4), содержащим 145 мМ NaCl, 5 мМ KCl, 10 мМ HEPES, 1 мМ MgCl₂, 1 мМ CaCl₂ и 10 мМ глюкозы. Клетки инкубировали в отсутствии или в присутствии активатора при 32–34 °С в течение 20 мин. После этого внеклеточную жидкость отбирали, и добавляли в каждую лунку по 100 мкл раствора 250 нМ ARC1779-Cy5 в среде гибридизации, содержащей 0,1 мг/мл tRNA («RocheDiagnostics», Швейцария), 1 мг/мл бычьего сывороточного альбумина (BSA, «Amresco», США), 5 мМ MgCl₂, 25 мМ глюкозы, 2,67 мМ KCl, 1,47 мМ KH₂PO₄, 136,9 мМ NaCl, 8,10 мМ Na₂HPO₄, после чего инкубировали 20 мин при 32 °С. Для окрашивания ядер в среду добавляли 1 мкг/мл Hoechst 33342 («ThermoFisher Scientific», США). По окончании инкубации клетки 2 раза промывали раствором фосфатно-солевого буфера (PBS) («ThermoFisher Scientific», США) для удаления не связавшегося ARC1779-Cy5. К клеткам добавляли 200 мкл FluoroBrite™ DMEM («ThermoFisher Scientific», США), и сразу после этого снимали изображение окрашенных клеток с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI 6000 с использованием объектива HCX PL FLUOTAR L 20,0 × 0,40 DRY, диодных осветителей с длинами волн 385 и 620 нм и фильтров A4 и TX2 («Leica», ФРГ). Расчёт об-

щей интенсивности флуоресценции и средних значений числа частиц ФВ в пересчете на число окрашенных ядер проводили после обработки мозаичных изображений с участков площадью 1,5 × 2 мм в шести контрольных и шести опытных лунках. Число клеток на участке данной площади составляло 2800–3000. Изображения анализировались с помощью программы CellProfiler [25], находящейся в открытом доступе (<http://cellprofiler.org/releases>). Более подробное описание применения этой программы для анализа изображения ЭК приведено ранее [26]. Общее количество анализируемых кадров составляло 96–128 (по 16 кадров из каждой лунки в 48-луночном планшете). Для получения приведенных в статье данных проводилось не менее трех независимых экспериментов на разных препаратах ЭК. Проводилось определение общего количества экспонированных на поверхности ЭК окрашенных ARC1779-Cy5 структур ФВ и их средней яркости (интенсивность флуоресценции в пересчете на отдельную клетку). Данные представлены в относительных единицах. Приведены средние значения ± стандартная ошибка среднего. Достоверность отличий определяли с использованием критерия Стьюдента с помощью программы Excel, а также однофакторного дисперсионного анализа с помощью программы MedCalc («MedCalc Software Ltd», Бельгия).

Для проведения иммунофлуоресцентного окрашивания клетки фиксировались 4%-ным параформальдегидом в PBS в течение 20 мин на льду, затем их аккуратно отмывали раствором, содержащим 1% BSA. В этот же раствор вносили первичные антитела против фактора Виллебранда (Rabbit anti-human vWF, «Dako», Франция, разведение 1/500 (исходная концентрация антител 3,2 мг/мл)) и инкубировали ночь при 4 °С. После инкубации клетки отмывали и вносили смесь из вторичных антител (goat anti-rabbit AlexaFluor 488 («Invitrogen», США), разведение 1/1000), флуоресцентно-меченного лектина WGA (wheat germ agglutinin AlexaFluor 488 («Invitrogen», США), разведение 1/500) и ядерного красителя Hoechst 33258 («Sigma Aldrich», США) в концентрации 1 мкг/мл и далее инкубировали 1,5 ч при комнатной температуре. По окончании инкубации клетки отмывали раствором PBS, содержащим 1% BSA, и помещали в насыщенный раствор фруктозы. Готовые препараты анализировали с помощью флуоресцентного микроскопа Leica DMI 6000 («Leica», Германия). Параметры захвата изображения настраивались по самому яркому образцу и не менялись в течение всего эксперимента. С центрального участка каждой лунки снимался мозаич-

ный кадр величиной в 25 микроскопических полей и имеющий физические размеры $1,5 \times 2$ мм. Съемка велась с использованием высокоскоростного адаптивного автофокуса. С каждого образца получали 25 изображений (по 16 кадров в изображении), содержащих 3 флуоресцентных канала с кодировкой глубины цвета 8 бит. С помощью программы CellProfiler определяли интенсивность флуоресценции окрашенного ФВ на каждом кадре в ЭК в контроле и после активации их H_2O_2 или тромбином.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

На рис. 1, *а* показаны эндотелиальные клетки, окрашенные ARC1779-Cy5 (50 нМ). Перед добавлением аптамера клетки инкубировали в течение 20 мин с индуктором секреции ФВ — гистамином. Для выявления клеточных ядер использовали Hoechst 33342. ARC1779-Cy5 окрашивает небольшие структуры, имеющие в основном округлую или неправильную форму. Для оценки специфичности окрашивания ФВ аптамером ARC1779-Cy5 в качестве отрицательного контроля был использован конъюгированный с Cy5 олигонуклеотид такой же длины и с таким же соотношением нуклеотидов как у ARC1779, но со случайной нуклеотидной последовательностью (рис. 1, *б*). Контрольный олигонуклеотид практически не связывается с живыми клетками. Одиночные крупные яркие пятна, которые видны на рис. 1, *б*, представляют собой окрашенные безъядерные фрагменты мертвых клеток.

Зависимость связывания ARC1779-Cy5 с клетками от концентрации аптамера показана на рис. 2. ЭК инкубировали с ARC1779-Cy5 в

концентрациях от 3,1 нМ до 1 мкМ. С помощью программы CellProfiler рассчитывали суммарную яркость окрашенных структур ФВ (objects) на поверхности клеток. Видно, что окрашивание аптамером ARC1779-Cy5 ФВ на мембране ЭК становится заметным, начиная с концентрации 50 нМ (рис. 2, *а*, кривая 1). Яркость окрашивания возрастает при повышении концентрации ARC1779-Cy5 до 1 мкМ. Неспецифическое связывание метки определяли при соответствующих концентрациях конъюгата контрольного олигонуклеотида с Cy5. Конъюгированный с меткой контрольный олигонуклеотид почти не окрашивает клетки при концентрациях до 100 нМ. При дальнейшем повышении его концентрации интенсивность флуоресценции начинает возрастать из-за увеличения неспецифического связывания (рис. 2, *а*, кривая 2). Изображенная на рис. 2, *а* кривая 3 представляет собой разность между интенсивностями флуоресценции ARC1779-Cy5 и контрольного олигонуклеотида и отражает специфическое взаимодействие ARC1779-Cy5 с ФВ. EC_{50} для связывания ARC1779-Cy5 с ФВ составило 287 нМ (95%-ный доверительный интервал 155–589 нМ). В экспериментах мы использовали концентрацию ARC1779-Cy5 50 нМ, при которой неспецифическое связывание метки невелико. Относительные значения яркости флуоресценции не активированных и активированных гистамином клеток после окраски их аптамером ARC1779-Cy5 или контрольным олигонуклеотидом в концентрации 50 нМ показаны на рис. 2, *б*. Видно, что гистамин не влияет на неспецифическое связывание флуоресцентной метки с ЭК. В отсутствие гистамина флуоресценция лишь незначительно превышает фоновое значение, что говорит о низком уровне экспрессии ФВ на

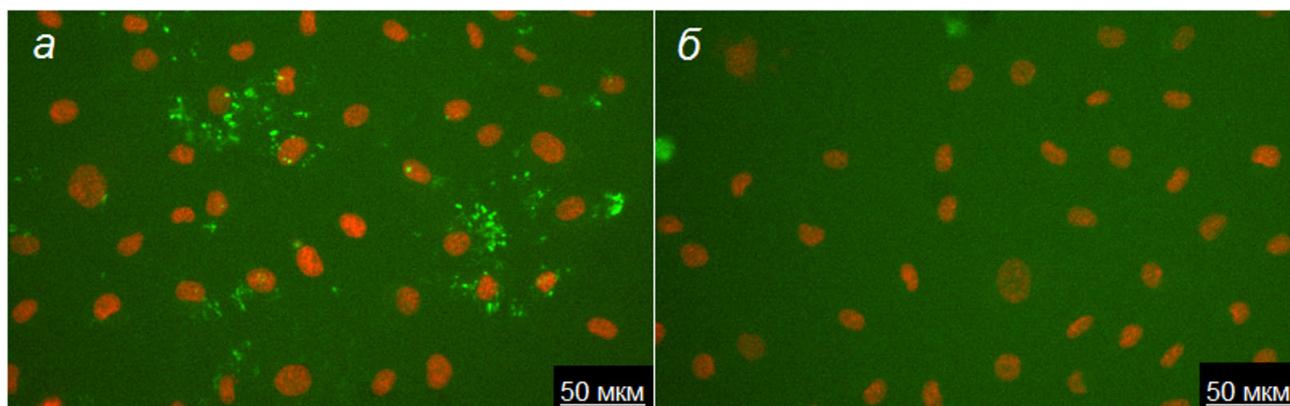


Рис. 1. Окрашивание аптамером ARC1779-Cy5 (*а*) и конъюгированным с флуоресцентной меткой Cy5 контрольным олигонуклеотидом (*б*) эндотелиальных клеток, активированных гистамином (100 мкМ). Концентрации ARC1779-Cy5 и контрольного олигонуклеотида — 50 нМ. (С цветными вариантами рис. 1–5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

плазматической мембране ЭК в отсутствии активаторов.

Второй задачей работы было изучение регуляции экзоцитоза ФВ с помощью вышеописанного экспериментального подхода. Экзоцитоз ФВ в ЭК стимулируют нейроэндокринные факторы, включая тромбин [27], вазопрессин [28], гистамин [29], серотонин [30], адреналин [31], пуриновые нуклеотиды [32], цитокины и факторы роста [33, 34]. В реализации их действия участвуют вторичные посредники – сАМР и Ca^{2+} [35]. Известно, что пероксид водорода также выполняет в ЭК функцию вторичного мессенджера [36]. Кроме того, на функционирование ЭК оказывает влияние экзогенный H_2O_2 , образующийся в нейтрофилах. Ранее нами было показано, что добавленный извне H_2O_2 проникает в эндотелиальные клетки [26]. Известным механизмом действия H_2O_2 как вторичного мессенджера является ингибирование тирозиновых протеинфосфатаз [37]. В ЭК H_2O_2 избирательно усиливает действие агонистов 5-НТ1В- и 5-НТ2В-рецепторов [38] и стимулирует двупоровые эндолизосомальные кальциевые каналы [39]. Данные о влиянии H_2O_2 на секрецию ФВ весьма противоречивы. Ранее было показано, что экзогенный супероксид-анион увеличивает секрецию ФВ во внешнюю среду культивируемыми ЭК, однако достоверного эффекта H_2O_2 , добавленного в концентрациях вплоть до 0,5 мМ, выявлено не было [40]. Напротив, в работе Yang et al. [41] приведены данные об увеличении секреции ФВ в 1,5–2 раза под влиянием 0,5 мМ H_2O_2 . В любом случае в этих исследованиях было установлено действие цитотоксической концентрации H_2O_2 . Ранее методами иммуноцитофлуориметрии и иммуноферментного анализа нами было показано, что пероксид водорода в концентрации 100 мкМ (что ниже порога цитотоксичности для культивируемых ЭК из пупочной вены) вызывает увеличение количества экспонированного на поверхности ЭК ФВ и его секрецию во внеклеточную среду [26]. В данной работе мы продолжили эти исследования, применив новый подход с использованием аптамера ARC1779, к молекуле которого присоединен флуоресцентный краситель Cy5. В отличие от иммунофлуоресцентной метки, в случае конъюгата ARC1779-Cy5 окрашивание ЭК проводилось на живых клетках. Видно, что после воздействия 100 мкМ H_2O_2 в течение 20 мин количество окрашенных ARC1779-Cy5 клеток резко возросло (рис. 3, б) по сравнению с контролем (рис. 3, а). Средняя интенсивность флуоресценции (рис. 4, а) выросла в 4,47 раза ($p < 0,01$). Среднее число окрашенных точечных структур

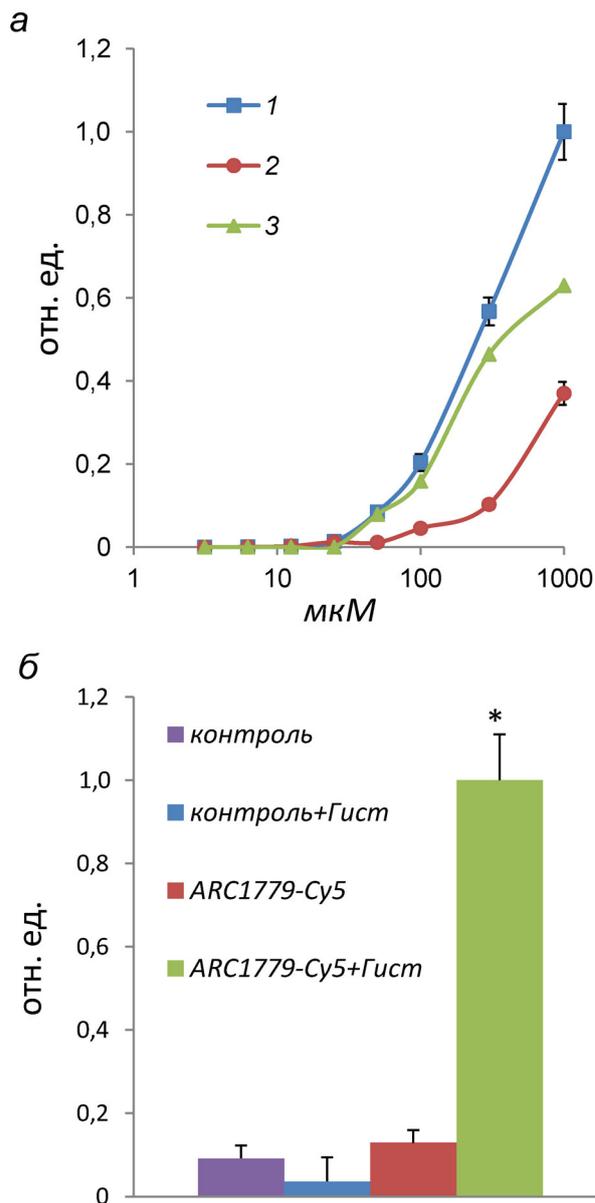


Рис. 2. а – Зависимости яркости флуоресценции ЭК от концентрации ARC1779-Cy5 (кривая 1) или конъюгата контрольного олигонуклеотида с Cy5 (кривая 2). Кривая 3 представляет собой разность между значениями на кривой 1 (общее связывание) и кривой 2 (неспецифическое связывание) и отражает взаимодействие ARC1779-Cy5 с ФВ. б – Яркость флуоресценции ЭК, окрашенных ARC1779-Cy5 (ARC1779-Cy5, ARC1779-Cy5 + Гист.) или контрольным олигонуклеотидом (контроль, контроль + Гист.) в концентрациях 50 нМ в отсутствии или в присутствии 100 мкМ гистамина (Гист.). * $p < 0,01$ – Достоверность отличия ARC1779-Cy5 + Гист. от ARC1779-Cy5 и от контролей

ФВ в пересчете на одну клетку при действии H_2O_2 составило 5,79, что в 4,3 раза превышает число структур ФВ в контроле (рис. 4, б). Степень прироста ФВ-позитивных структур практически совпадает с показателем увеличения

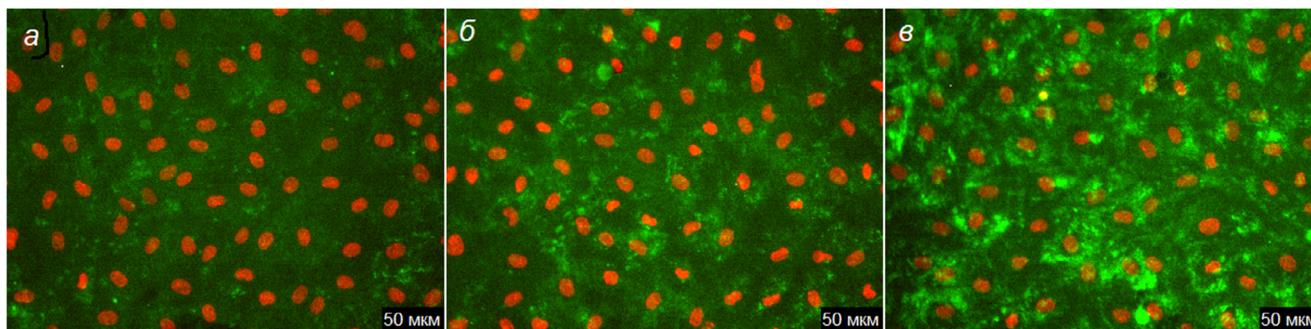


Рис. 3. Влияние H_2O_2 и тромбина на экзоцитоз ФВ в ЭК. Показаны ядра клеток и окрашенный с помощью ARC1779-Cy5 ФВ в ЭК в контроле (а), после воздействия 100 мкМ H_2O_2 (б) или 1 ед./мл тромбина (в). Концентрация ARC1779-Cy5 – 50 нМ

флуоресценции под влиянием H_2O_2 . Из этого следует, что увеличение экспонирования ФВ на поверхности ЭК под действием H_2O_2 происходит главным образом в результате увеличения количества раскрытых секреторных везикул – телец Вейбеля–Паладе. Ранее в работах исследователей из Нидерландов [19, 42] с помощью корреляционного иммунофлуоресцентного и электронно-микроскопического анализа изображения было продемонстрировано, что во время секреции ФВ происходит слияние телец Вейбеля–Паладе с образованием более крупных секреторных капсул, которые раскрываются на плазматической мембране с образованием пор диаметром 0,5–5 мкм. Размеры выявляемых нами точечных структур ФВ лежат в рамках этого диапазона. Их средние максимальный и минимальный диаметры Ферета составляют в контроле 0,97 и 0,45 мкм соответственно, а с H_2O_2 – 1,02 и 0,48 мкм соответственно.

При определении эффекта H_2O_2 методом иммуноцитофлуориметрии мы регистрировали не более чем 2× увеличение количества ФВ, экспонированного на поверхности клеток [26]. Причиной более выраженного эффекта в случае использования ARC1779-Cy5, как мы предполагаем, является исключение стадии фиксации, при которой возможно дополнительное артефактное слияние секреторных пузырьков с мембраной. При сравнении данных, приведённых на рис. 2, б и 4, а, видно, что эффект H_2O_2 на экспрессию ФВ сопоставим с эффектом 100 мкМ гистамина. В качестве положительного контроля мы использовали также тромбин. Тромбин оказывает гораздо более мощный эффект – экспрессия ФВ на плазматической мембране ЭК возрастает в 31,2 раза, а число экспонированных структур ФВ в пересчете на количество ядер (т.е. на отдельную клетку) увеличивается в 36,5 раз. Близость этих значений указывает, что, как и в случае с H_2O_2 , тромбин по-

вышает экспрессию ФВ за счёт увеличения количества раскрытых секреторных везикул. Помимо точечных структур можно видеть одиночные окрашенные нити длиной в десятки микрон, которые образуются при слиянии в виде спирали сверхкрупных мультимеров ФВ (рис. 3, в).

Имуноцитофлуоресцентный метод является стандартным подходом для определения экспрессии ФВ на поверхности ЭК. В данном исследовании для окрашивания ФВ вместо антитела был использован конъюгированный с флуоресцентной меткой Cy5 аптамер ARC1779. Принципиальным отличием предложенного подхода от иммунофлуоресцентного метода является окрашивание живых, а не фиксированных клеток. Мы провели сравнение данного метода с иммунофлуоресцентным. На рис. 5 показаны ЭК, окрашенные антителами против ФВ, в контроле и после воздействия H_2O_2 или тромбина. Был использован тот же препарат ЭК, как и в опыте с ARC1779-Cy5 (рис. 3), и такие же условия инкубации. Конечная концентрация первичных антител против ФВ составляла 40 нМ (разведение 1/500 исходного препарата IgG с концентрацией 3,2 мг/мл или 20 мкМ). Полученные изображения (рис. 5, а–в) соответствуют тем, которые были получены с помощью ARC1779-Cy5 (рис. 3). Четкость изображения при использовании антител выше, т.к. вторичные антитела дают более яркое окрашивание относительно фоновой флуоресценции, чем ARC1779-Cy5. Однако флуоресценция окрашенного ФВ при этом возрастала под действием H_2O_2 в 2 раза и тромбина – в 4 раза по отношению к контролю (рис. 5, в), в отличие от 4,5× и 31× увеличения в эксперименте с использованием ARC1779-Cy5 (рис. 4, а). В случае гистамина в опытах с окраской клеток антителами был более слабый эффект, чем при окраске ФВ аптамерами (данные не приводятся). Как уже отмечено

выше, мы предполагаем, что менее выраженный эффект агонистов на экспрессию ФВ на поверхности ЭК при иммунофлуоресцентном окрашивании объясняется тем, что во время фиксации происходит дополнительный артефактный экзоцитоз секреторных гранул. Таким образом, применение ARC1779-Cy5 позволяет исследовать более приближенные к реальности процессы регуляции экзоцитоза ФВ по сравнению с антителами, несмотря на то что получаемое с ARC1779-Cy5 изображение по контрастности уступает иммунофлуоресцентному окрашиванию.

Мы предполагаем, что можно увеличить отношение специфического окрашивания ФВ к фоновому окрашиванию, если использовать аптамеры, которые были разработаны уже после ARC1779 и проходят сейчас клинические испытания, как возможные препараты для лечения тромботической микроангиопатии. Есть данные, что аптамер TAGX-0004, в нуклеотидной последовательности которого имеется одно искусственное основание, более эффективно подавляет агрегацию тромбоцитов по сравнению с ARC1779 [17]. Пегилированный аптамер BT200 подавляет активность ФВ в плазме с IC_{50} 70 нМ [43]. Данные об эффективности этих двух аптамеров получены в тесте агрегации тромбоцитов. Тромбоциты также секретируют ФВ и связывают его на своей поверхности, поэтому конъюгат ARC1779-Cy5 может быть использован для оценки их активации методом проточной цитофлуориметрии.

С помощью ARC1779-Cy5 нам удалось выявить хорошо выраженную активацию экзоцитоза ФВ под действием H_2O_2 . В условиях *in vivo* пероксид водорода образуется эндогенно в ЭК [36], а также выделяется нейтрофилами, адгезированными на поверхности активированного эндотелия [44]. Согласно расчетам, приведенным в работе Jones [45], скорость образования H_2O_2 в организме может достигать величины 500 мкмоль/кг/мин. В результате измерений концентрации H_2O_2 в стационарных условиях в цельной крови и в плазме крови человека и крысы, проведенных в разных лабораториях, получены данные в широком диапазоне концентраций — от единиц до десятков микромолей на литр плазмы и до сотен микромолей на литр крови [46, 47], последнее — за счет высокой концентрации H_2O_2 в эритроцитах и особенно в нейтрофилах, даже с учетом разницы в количестве этих клеток. Локальная концентрация H_2O_2 вблизи эндотелия может быть значительно выше средней концентрации в плазме крови. На препарате культивируемых ЭК из пупочной вены показано, что воздействие H_2O_2 в концент-

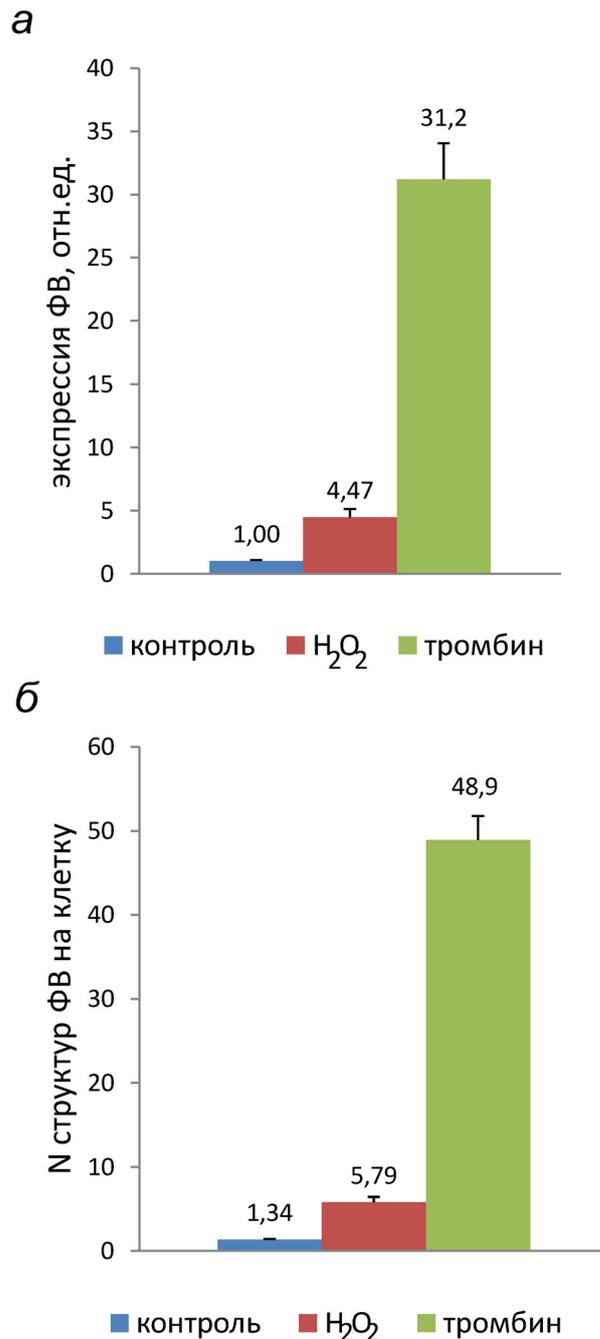


Рис. 4. Определение с помощью ARC1779-Cy5 экспрессии ФВ на поверхности ЭК (а) и среднего количества точечных структур ФВ в отдельной клетке (б) в контроле при воздействии 100 мкМ H_2O_2 или 1 ед./мл тромбина

рации до 150 мкМ не оказывает на них заметного токсического действия [48, 49]. Таким образом, используемая в настоящих экспериментах концентрация 100 мкМ не является токсичной для ЭК в культуре и соответствует физиологическим условиям. Ранее показано, что в концентрациях 50–100 мкМ H_2O_2 вызывает в ЭК поверхностную экспрессию главного комплекса

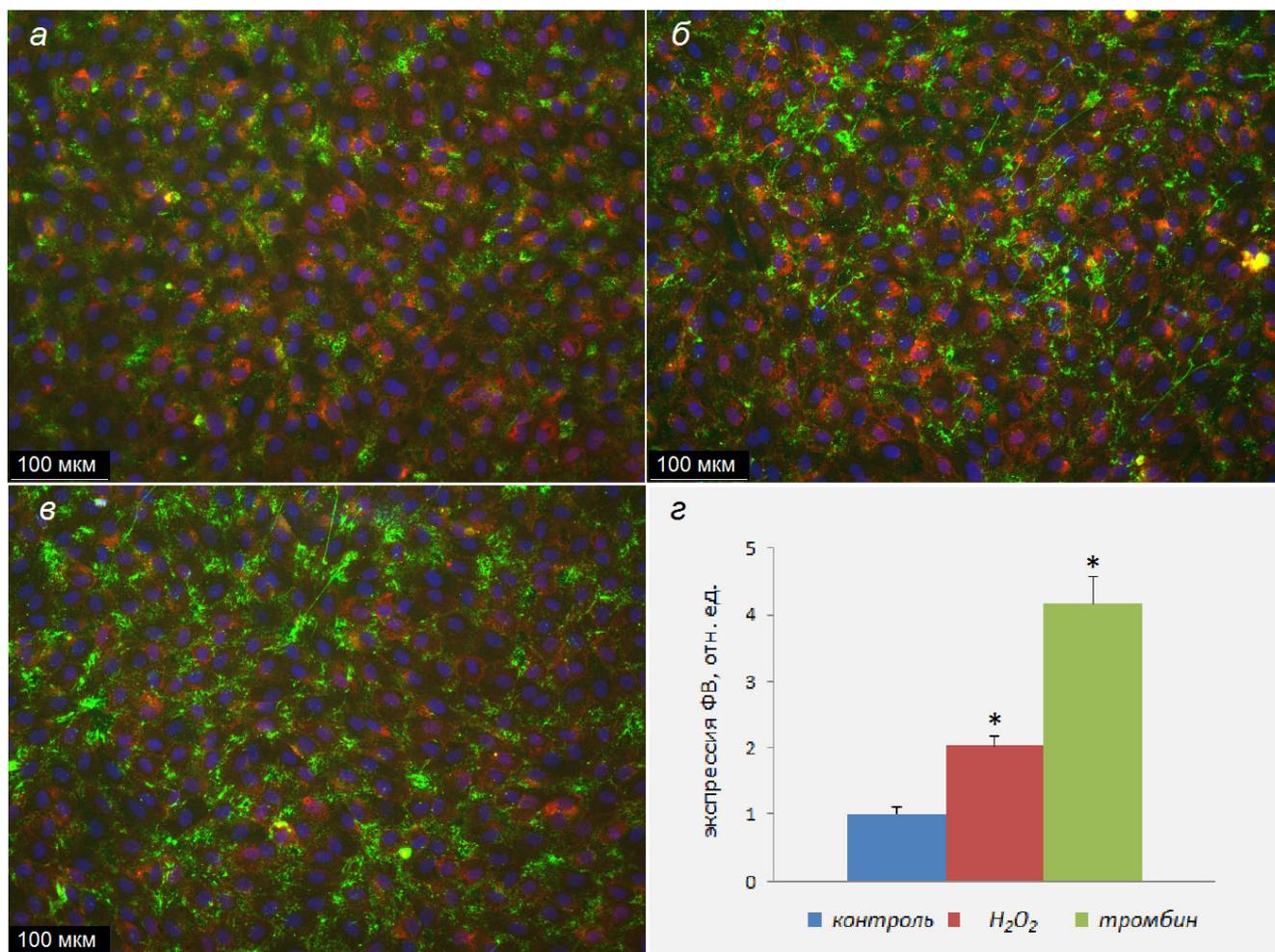


Рис. 5. Окрашивание с помощью антител ФВ на поверхности ЭК в контроле (а), при воздействии 100 мкМ H₂O₂ (б) или 1 ед./мл тромбина (в). Уровень экспрессии ФВ на поверхности ЭК, определенный иммунофлуоресцентным методом, в контроле и при активации ЭК H₂O₂ или тромбином (д). Достоверность отличия от контроля, **p* < 0,01. Для выявления границ клеток проводилась окраска лектином WGA AlexaFluor 594. Окраска в псевдоцветах – ФВ представлен зеленым, ядра – синим, лектин – пурпурным цветом

гистосовместимости, МНС1, и молекулы межклеточной адгезии, ICAM-1 [50]. Приведенные данные дополняют представления о влиянии H₂O₂ на процессы секреции в ЭК.

Полученные результаты укладываются в рамки концепции о роли H₂O₂ как вторичного мессенджера, регулирующего, в дополнение к cAMP и Ca²⁺, экзоцитоз ФВ в ЭК. В связи с этим встает вопрос: в действии каких нейроэндокринных факторов на данный процесс в ЭК принимает участие H₂O₂. Прямые данные, указывающие на участие H₂O₂ в рецептор-зависимой регуляции экзоцитоза ФВ, в литературе отсутствуют, однако есть косвенные свидетельства в пользу этой гипотезы. Известно, что рецепторы фактора роста VEGF взаимодействуют с NADPH-оксидазой NOX4, и через эти же рецеп-

торы (VEGFR2) происходит активация секреции ФВ [51]. Провоспалительные цитокины IL-6, IL-9, TNFalpha также инициируют два процесса – экзоцитоз ФВ [34] и образование активных форм кислорода, включая H₂O₂ [52]. Однако во всех этих случаях возможная связь между стимуляцией секреции ФВ и образованием H₂O₂ не исследовалась. Недавно нами было показано, что блокатор NADPH-оксидазы, VAS2870, подавляет секрецию ФВ, вызванную гистамином [53]. Таким образом, для ответа на вопрос о роли H₂O₂ в передаче сигналов агонистами на обмен ФВ требуются дальнейшие исследования. Разработанный подход прижизненного окрашивания ФВ, экспонированного на поверхности ЭК, как нам представляется, будет способствовать прогрессу в этой области.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 18-15-00417), а также в рамках госзадания № 0088-2021-0008 с использованием оборудования ЦКП ИБР им Н.К. Кольцова РАН.

Конфликт интересов. Авторы подтверждают отсутствие конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стандартам институционального и национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Langmead, C. J., and Summers, R. J. (2018) Molecular pharmacology of GPCRs, *Br. J. Pharmacol.*, **175**, 4005-4008, doi: 10.1111/bph.14474.
- Sriram, K., and Insel, P. A. (2018) G protein-coupled receptors as targets for approved drugs: how many targets and how many drugs? *Mol. Pharmacol.*, **93**, 251-258, doi: 10.1124/mol.117.111062.
- Deyev, S. M., and Lebedenko, E. N. (2015) Supramolecular agents for theranostics, *Russ. J. Bioorg. Khim.*, **41**, 481-493, doi: 10.1134/s1068162015050052.
- Ellington, A. D., and Szostak, J. W. (1990) *In vitro* selection of RNA molecules that bind specific ligands, *Nature*, **346**, 818-822, doi: 10.1038/346818a0.
- Tuerk, C., and Gold, L. (1990) Systematic evolution of ligands by exponential enrichment: RNA ligands to bacteriophage T4 DNA polymerase, *Science*, **249**, 505-510, doi: 10.1126/science.2200121.
- Wang, J., and Li, G. (2011) Aptamers against cell surface receptors: selection, modification and application, *Curr. Med. Chem.*, **18**, 4107-4116, doi: 10.2174/092986711797189628.
- Spiridonova, V. A., Novikova, T. M., Sizov, V. A., Shashkovskaya, V. S., Titaeva, E. V., Dobrovolsky, A. B., Zhariyeva, E. B., and Mazurov, A. V. (2019) DNA aptamers to thrombin exosite I. Structure-function relationships and antithrombotic effects, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1521-1528, doi: 10.1134/S0006297919120113.
- Rahimizadeh, K., Al Shamaileh, H., Fratini, M., Chakravarthy, M., Stephen, M., Shigdar, S., and Veedu, R. N. (2017) Development of cell-specific aptamers: recent advances and insight into the selection procedures, *Molecules*, **22**, 2070, doi: 10.3390/molecules22122070.
- Zhuo, Z., Yu, Y., Wang, M., Li, J., Zhang, Z., et al. (2017) Recent advances in SELEX technology and aptamer applications in biomedicine, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 2142, doi: 10.3390/ijms18102142.
- Zhang, Y., Lai, B. S., and Juhas, M. (2019) Recent advances in aptamer discovery and applications, *Molecules*, **24**, 941, doi: 10.3390/molecules24050941.
- Bauer, M., Macdonald, J., Henri, J., Duan, W., and Shigdar, S. (2016) The application of aptamers for immunohistochemistry, *Nucleic Acid Ther.*, **26**, 120-126, doi: 10.1089/nat.2015.0569.
- Zhang, P., Zhao, N., Zeng, Z., Feng, Y., Tung, C. H., Chang, C. C., and Zu, Y. (2009) Using an RNA aptamer probe for flow cytometry detection of CD30-expressing lymphoma cells, *Lab. Invest.*, **89**, 1423-1432, doi: 10.1038/labinvest.2009.113.
- Sadler, J. E. (1998) Biochemistry and genetics of von Willebrand factor, *Annu. Rev. Biochem.*, **67**, 395-424, doi: 10.1146/annurev.biochem.67.1.395.
- Duggan, S. (2018) Caplacizumab: first global approval, *Drugs*, **78**, 1639-1642, doi: 10.1007/s40265-018-0989-0.
- Bae, O. N. (2012) Targeting von Willebrand factor as a novel anti-platelet therapy; application of ARC1779, an anti-vWF aptamer, against thrombotic risk, *Arch. Pharm. Res.*, **35**, 1693-1699, doi: 10.1007/s12272-012-1000-3.
- Jilma-Stohlawetz, P., Knobl, P., Gilbert, J. C., and Jilma, B. (2012) The anti-von Willebrand factor aptamer ARC1779 increases von Willebrand factor levels and platelet counts in patients with type 2B von Willebrand disease, *Thromb. Haemost.*, **108**, 284-290, doi: 10.1160/TH11-12-0889.
- Sakai, K., Someya, T., Harada, K., Yagi, H., Matsui, T., and Matsumoto, M. (2019) Novel aptamer to von Willebrand factor A1 domain (TAGX-0004) shows total inhibition of thrombus formation superior to ARC1779 and comparable to caplacizumab, *Haematologica*, **105**, 2631-2638, doi: 10.3324/haematol.2019.235549.
- Matsunaga, K. I., Kimoto, M., and Hirao, I. (2017) High-Affinity DNA aptamer generation targeting von Willebrand factor A1-domain by genetic alphabet expansion for systematic evolution of ligands by exponential enrichment using two types of libraries composed of five different bases, *J. Am. Chem. Soc.*, **139**, 324-334, doi: 10.1021/jacs.6b10767.
- Valentijn, K. M., van Driel, L. F., Mourik, M. J., Hendriks, G. J., Arends, T. J., Koster, A. J., and Valentijn, J. A. (2010) Multigranular exocytosis of Weibel-Palade bodies in vascular endothelial cells, *Blood*, **116**, 1807-1816, doi: 10.1182/blood-2010-03-274209.
- Kovacevic, K. D., Buchtele, N., Schoergenhofer, C., Derhaschnig, U., Gelbenegger, G., Brostjan, C., Zhu, S., Gilbert, J. C., and Jilma, B. (2020) The aptamer BT200 effectively inhibits von Willebrand factor (VWF) dependent platelet function after stimulated VWF release by desmopressin or endotoxin, *Sci. Rep.*, **10**, 11180, doi: 10.1038/s41598-020-68125-9.
- Nimjee, S. M., Dornbos, D., 3rd, Pitoc, G. A., Wheeler, D. G., Layzer, J. M., et al. (2019) Preclinical development of a vWF aptamer to limit thrombosis and engender arterial recanalization of occluded vessels, *Mol. Ther.*, **27**, 1228-1241, doi: 10.1016/j.yjthe.2019.03.016.
- Goncharov, N. V., Sakharov, I., Danilov, S. M., and Sakandelidze, O. G. (1987) Use of collagenase from the hepatopancreas of the Kamchatka crab for isolating and culturing endothelial cells of the large vessels in man, *Bull. Eksp. Biol. Med.*, **104**, 376-378.
- Maciag, T., Cerundolo, J., Ilesley, S., Kelley, P. R., and Forand, R. (1979) An endothelial cell growth factor from bovine hypothalamus: identification and partial characterization, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **76**, 5674-5678, doi: 10.1073/pnas.76.11.5674.
- Kudryavtsev, I. V., Garnyuk, V. V., Nadeev, A. D., and Goncharov, N. V. (2014) Hydrogen peroxide modulates expression of surface antigens by human umbilical vein endothelial cells *in vitro*, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. A Membr. Cell Biol.*, **8**, 97-102, doi: 10.1134/S1990747813050103.
- Bray, M. A., Vokes, M. S., and Carpenter, A. E. (2015) Using CellProfiler for automatic identification and measurement of biological objects in images, *Curr. Protoc. Mol. Biol.*, **109**, 1-18, doi: 10.1002/0471142727.mb1417s109.
- Avdonin, P. V., Tsitrina, A. A., Mironova, G. Y., Avdonin, P. P., Zharkikh, I. L., Nadeev, A. D., and Goncharov, N. V. (2017) Hydrogen peroxide stimulates exocytosis of von

- Willebrand factor in human umbilical vein endothelial cells, *Biol. Bull.*, **44**, 531-537, doi: 10.1134/S106235901705003x.
27. Hattori, R., Hamilton, K. K., Fugate, R. D., McEver, R. P., and Sims, P. J. (1989) Stimulated secretion of endothelial von Willebrand factor is accompanied by rapid redistribution to the cell surface of the intracellular granule membrane protein GMP-140, *J. Biol. Chem.*, **264**, 7768-7771.
 28. Kaufmann, J. E., Oksche, A., Wollheim, C. B., Gunther, G., Rosenthal, W., and Vischer, U. M. (2000) Vasopressin-induced von Willebrand factor secretion from endothelial cells involves V2 receptors and cAMP, *J. Clin. Invest.*, **106**, 107-116, doi: 10.1172/JCI9516.
 29. Esposito, B., Gambarà, G., Lewis, A. M., Palombi, F., D'Alessio, A., et al. (2011) NAADP links histamine H1 receptors to secretion of von Willebrand factor in human endothelial cells, *Blood*, **117**, 4968-4977, doi: 10.1182/blood-2010-02-266338.
 30. Schluter, T., and Bohnensack, R. (1999) Serotonin-induced secretion of von Willebrand factor from human umbilical vein endothelial cells via the cyclic AMP-signaling systems independent of increased cytoplasmic calcium concentration, *Biochem. Pharmacol.*, **57**, 1191-1197.
 31. Vischer, U. M., and Wollheim, C. B. (1997) Epinephrine induces von Willebrand factor release from cultured endothelial cells: involvement of cyclic AMP-dependent signalling in exocytosis, *Thromb. Haemost.*, **77**, 1182-1188.
 32. Vischer, U. M., and Wollheim, C. B. (1998) Purine nucleotides induce regulated secretion of von Willebrand factor: involvement of cytosolic Ca²⁺ and cyclic adenosine monophosphate-dependent signaling in endothelial exocytosis, *Blood*, **91**, 118-127.
 33. Matsushita, K., Yamakuchi, M., Morrell, C. N., Ozaki, M., O'Rourke, B., Irani, K., and Lowenstein, C. J. (2005) Vascular endothelial growth factor regulation of Weibel-Palade-body exocytosis, *Blood*, **105**, 207-214, doi: 10.1182/blood-2004-04-1519.
 34. Bernardo, A., Ball, C., Nolasco, L., Moake, J. F., and Dong, J. F. (2004) Effects of inflammatory cytokines on the release and cleavage of the endothelial cell-derived ultralarge von Willebrand factor multimers under flow, *Blood*, **104**, 100-106, doi: 10.1182/blood-2004-01-0107.
 35. Vischer, U. M. (2006) Von Willebrand factor, endothelial dysfunction, and cardiovascular disease, *J. Thromb. Haemost.*, **4**, 1186-1193, doi: 10.1111/j.1538-7836.2006.01949.x.
 36. Breton-Romero, R., and Lamas, S. (2014) Hydrogen peroxide signaling in vascular endothelial cells, *Redox Biol.*, **2**, 529-534, doi: 10.1016/j.redox.2014.02.005.
 37. Rhee, S. G., Kang, S. W., Jeong, W., Chang, T. S., Yang, K. S., and Woo, H. A. (2005) Intracellular messenger function of hydrogen peroxide and its regulation by peroxiredoxins, *Curr. Opin. Cell Biol.*, **17**, 183-189, doi: 10.1016/j.ceb.2005.02.004.
 38. Avdonin, P. V., Nadeev, A. D., Mironova, G. Y., Zharkikh, I. L., Avdonin, P. P., and Goncharov, N. V. (2019) Enhancement by hydrogen peroxide of calcium signals in endothelial cells induced by 5-HT_{1B} and 5-HT_{2B} receptor agonists, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 1701478, doi: 10.1155/2019/1701478.
 39. Avdonin, P. V., Nadeev, A. D., Tsitrin, E. B., Tsitrina, A. A., Avdonin, P. P., Mironova, G. Y., Zharkikh, I. L., and Goncharov, N. V. (2017) Involvement of two-pore channels in hydrogen peroxide-induced increase in the level of calcium ions in the cytoplasm of human umbilical vein endothelial cells, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **474**, 209-212, doi: 10.1134/S1607672917030152.
 40. Vischer, U. M., Jornot, L., Wollheim, C. B., and Theler, J. M. (1995) Reactive oxygen intermediates induce regulated secretion of von Willebrand factor from cultured human vascular endothelial cells, *Blood*, **85**, 3164-3172.
 41. Yang, S., Zheng, Y., and Hou, X. (2019) Lipoxin A₄ restores oxidative stress-induced vascular endothelial cell injury and thrombosis-related factor expression by its receptor-mediated activation of Nrf2-HO-1 axis, *Cell. Signal.*, **60**, 146-153, doi: 10.1016/j.cellsig.2019.05.002.
 42. Mourik, M. J., Valentijn, J. A., Voorberg, J., Koster, A. J., Valentijn, K. M., and Eikenboom, J. (2013) Von Willebrand factor remodeling during exocytosis from vascular endothelial cells, *J. Thromb. Haemost.*, **11**, 2009-2019, doi: 10.1111/jth.12401.
 43. Zhu, S., Gilbert, J. C., Hatala, P., Harvey, W., Liang, Z., Gao, S., Kang, D., and Jilma, B. (2020) The development and characterization of a long acting anti-thrombotic von Willebrand factor (VWF) aptamer, *J. Thromb. Haemost.*, **18**, 1113-1123, doi: 10.1111/jth.14755.
 44. Shappell, S. B., Toman, C., Anderson, D. C., Taylor, A. A., Entman, M. L., and Smith, C. W. (1990) Mac-1 (CD11b/CD18) mediates adherence-dependent hydrogen peroxide production by human and canine neutrophils, *J. Immunol.*, **144**, 2702-2711.
 45. Jones, D. P. (2008) Radical-free biology of oxidative stress, *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.*, **295**, C849-C868, doi: 10.1152/ajpcell.00283.2008.
 46. Forman, H. J., Bernardo, A., and Davies, K. J. (2016) What is the concentration of hydrogen peroxide in blood and plasma? *Arch. Biochem. Biophys.*, **603**, 48-53, doi: 10.1016/j.abb.2016.05.005.
 47. Varma, S. D., and Devamanoharan, P. S. (1991) Hydrogen peroxide in human blood, *Free Radic. Res. Commun.*, **14**, 125-131, doi: 10.3109/10715769109094124.
 48. Nadeev, A. D., Kudryavtsev, I. V., Serebriakova, M. K., Avdonin, P. V., Zinchenko, V. P., and Goncharov, N. V. (2016) Dual proapoptotic and pronecrotic effect of hydrogen peroxide on human umbilical vein endothelial cells, *Cell Tiss. Biol.*, **10**, 145-151, doi: 10.1134/S1990519X16020097.
 49. Yang, D., Liu, X., Liu, M., Chi, H., Liu, J., and Han, H. (2015) Protective effects of quercetin and taraxasterol against H₂O₂-induced human umbilical vein endothelial cell injury *in vitro*, *Exp. Ther. Med.*, **10**, 1253-1260, doi: 10.3892/etm.2015.2713.
 50. Bradley, J. R., Johnson, D. R., and Pober, J. S. (1993) Endothelial activation by hydrogen peroxide. Selective increases of intercellular adhesion molecule-1 and major histocompatibility complex class I, *Am. J. Pathol.*, **142**, 1598-1609.
 51. Xiong, Y., Huo, Y., Chen, C., Zeng, H., Lu, X., et al. (2009) Vascular endothelial growth factor (VEGF) receptor-2 tyrosine 1175 signaling controls VEGF-induced von Willebrand factor release from endothelial cells via phospholipase C-gamma 1- and protein kinase A-dependent pathways, *J. Biol. Chem.*, **284**, 23217-23224, doi: 10.1074/jbc.M109.019679.
 52. Mo, S. J., Son, E. W., Rhee, D. K., and Pyo, S. (2003) Modulation of TNF-alpha-induced ICAM-1 expression, NO and H₂O₂ production by alginate, allicin and ascorbic acid in human endothelial cells, *Arch. Pharm. Res.*, **26**, 244-251.
 53. Avdonin, P. V., Rybakova, E. Y., Avdonin, P. P., Trufanov, S. K., Mironova, G. Y., Tsitrina, A. A., and Goncharov, N. V. (2019) VAS2870 Inhibits histamine-induced calcium signaling and vWF secretion in human umbilical vein endothelial cells, *Cells*, **8**, 196, doi: 10.3390/cells8020196.

**THE USE OF FLUORESCENTLY LABELED ARC1779 APTAMER
FOR ASSESSING THE EFFECT OF H₂O₂
ON VON WILLEBRAND FACTOR EXOCYTOSIS***

**P. P. Avdonin¹, S. K. Trufanov¹, E. Yu. Rybakova¹, A. A. Tsitrina¹,
N. V. Goncharov^{2,3}, and P. V. Avdonin^{1**}**

¹ *Koltsov Institute of Development Biology Russian Academy of Sciences,
119334 Moscow, Russia; E-mail: pvavdonin@yandex.ru*

² *Sechenov Institute of Evolutionary Physiology and Biochemistry Russian Academy of Sciences,
194223 St. Petersburg, Russia*

³ *Scientific Research Institute of Hygiene, Occupational Pathology and Human Ecology,
FMBA, 188663 Kuzmolovsky, Leningrad Region, Russia*

Here, we propose a new approach for quantitative estimation of von Willebrand factor (vWF) exposed on the surface of endothelial cells (ECs) using the ARC1779 aptamer that interacts with the vWF A1 domain. To visualize complex formation between vWF and the aptamer, the latter was conjugated with the Cy5 fluorescent label. Cultured human umbilical vein endothelial cells (HUVEC) were stained with the ARC1779-Cy5 conjugate and imaged with a fluorescence microscope. The images were analyzed with the CellProfiler software. vWF released from the Weibel–Palade bodies was observed as bright dot-like structures of round and irregular shape, the number of which increased several times after HUVEC exposure to histamine or thrombin. Staining with ARC1779-Cy5 also revealed long filamentous vWF structures on the surface of activated HUVEC. vWF secretion by ECs is activated by the second messengers cAMP and Ca²⁺. There is evidence that hydrogen peroxide also acts as a second messenger in ECs. In addition, exogenous H₂O₂ formed in leukocytes can enter ECs. The aim of our study was to determine the effect of H₂O₂ on the vWF exposure at the surface of HUVEC using the proposed method. It was shown that hydrogen peroxide at concentration 100 μM, which is lower than the cytotoxicity threshold of H₂O₂ for cultured HUVEC, increased several times the number of dot-like structures and total amount of vWF exposed on plasma membrane of HUVEC, which suggest that H₂O₂ acts as a mediator that activates exocytosis of Weibel–Palade bodies and vWF secretion in the vascular endothelium during inflammation and upon elevated generation of endogenous reactive oxygen species in ECs.

Keywords: von Willebrand factor, aptamers, hydrogen peroxide, endothelial cells, secretion

БЕЛОК КЛОТО И СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТАЯ СИСТЕМА*

Обзор

© 2021 И.Н. Тюренков¹, В.Н. Перфилова^{1**}, А.А. Нестерова², Е.Ю. Глинка³

¹ Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Волгоградский государственный медицинский университет» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 400066 Волгоград, Россия; электронная почта: vnperfilova@mail.ru; vnperfilova@gmail.com

² Федеральное государственное бюджетное образовательное учреждение высшего образования «Пятигорский медико-фармацевтический институт» – филиал «Волгоградского государственного медицинского университета» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 357500 Пятигорск, Россия

³ Keenan Research Centre, St. Michael's Hospital, Toronto, Canada

Поступила в редакцию 11.04.2020

После доработки 20.08.2020

Принята к публикации 08.09.2020

Белок клото влияет на многие метаболические процессы, играющие важную роль в развитии сердечно-сосудистых заболеваний. Он способен подавлять процессы перекисного окисления липидов, воспаление, предупреждать повреждение эндотелия, кальцификацию сосудов, повышение их ригидности, угнетать фиброзирование сердца. Уровень его экспрессии при многих заболеваниях снижается. Молекулярные механизмы, посредством которых клото осуществляет кардиопротекторное действие, основаны на его взаимодействии с рядом рецепторов и ионных каналов. Плейотропность этого белка делает его потенциальной мишенью в терапии сердечно-сосудистых заболеваний. В настоящем обзоре также приведены данные о лекарственных препаратах, стимулирующих экспрессию белка клото, и рассмотрены перспективы дальнейших исследований.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: белок клото, сердечная недостаточность, ишемическая болезнь сердца, кардиомиопатии, артериальная гипертензия.

DOI: 10.31857/S0320972521020020

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются основной причиной ранней инвалидизации и преждевременной смертности населения. В основе ССЗ лежит множество патогенетических механизмов, и их список продолжает расти. Поэтому для улучшения результатов профилактики и лечения ССЗ, минимизации их

отдаленных последствий ведется поиск терапевтически значимых мишеней, среди которых особое внимание привлекают те, что задействованы в различных патогенетических механизмах. С этой точки зрения заслуживает особого внимания многофункциональный белок клото, участвующий во многих метаболических процессах. В обзоре представлены данные, свидетельствующие о значимой роли белка клото в регуляции различных функций, сопряженных с физиологией и патологией сердечно-сосудистой системы, таких как предотвращение окислительного стресса и повреждения эндотелия, влияние на электрическую активность, ремоделирование сердца и сосудов, развитие ишемической болезни сердца, артериальной гипертензии, сердечной недостаточности и других.

СТРУКТУРА, ФУНКЦИИ И ЛОКАЛИЗАЦИЯ БЕЛКА КЛОТО

Kl (известный как α -клото или просто клото) первоначально был идентифицирован Kuro-O et al. (1997) [1] как ген мыши, продукт которого

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ИБС – ишемическая болезнь сердца; мРНК – матричная рибонуклеиновая кислота; т.п.н. – тысяч пар нуклеотидов; ХБП – хроническая болезнь почек; Akt – протеинкиназа В; eNOS – эндотелиальная NO-синтаза; FGF – фактор роста фибробластов; FGFR – рецептор фактора роста фибробластов; HUVECs – эндотелиальные клетки пупочной вены человека; IGF – инсулиноподобный фактор роста; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; NF- κ B – ядерный фактор каппа-би; NO – оксид азота; PI3K – фосфатидилинозитол-3-киназа; SOD – супероксиддисмутаза; TGF – трансформирующий фактор роста; TNF- α – фактор некроза опухолей.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM20-098, 21.12.2020.

** Адресат для корреспонденции.

препятствует старению. У человека ген клото находится на хромосомном бэнде 13q13.1, состоит из 50 т.п.н. и включает пять экзонов. Он экспрессируется в разных органах и тканях: основное количество *KL* и его продукта обнаруживается в почках и, существенно меньшее — в простате, легких, печени, скелетных мышцах, аорте, островках поджелудочной железы и мозге. Его паралог *KLБ* (β -клото) находится на 4-й хромосоме и имеет очень близкую структуру и размер. Основным источником *KLБ* в организме человека является жировая ткань. Некоторое его количество синтезируется в легких и поджелудочной железе, однако соответствующая мРНК найдена во многих тканях, в том числе в скелетных мышцах, аорте, сердце. Оба гена благодаря альтернативному сплайсингу кодируют и мембранные, и секреторируемые белки [2]. Третий член семейства клото кодируется геном *LCTL* — этот трансмембранный лактазоподобный белок (lactase-like protein) имеет альтернативные названия γ -клото или клото/лактазо-флоризингидролазоподобный белок (англ. абб. *KLPH* от *klotho/lactase-phlorizin hydrolase-related protein*). Ген *LCTL* находится на 15-й хромосоме и экспрессируется в большинстве органов примерно на одном уровне. Самое значительное его количество обнаружено в ткани яичек. При сравнении уровня экспрессии паралогов клото на первом месте оказался *KL*, а самый низкий уровень зафиксирован у *LCTL* [1, 2, 3, 4, 5]. Таким образом, в геноме млекопитающих закодировано 3 члена семейства клото, они представляют собой трансмембранные белки различной длины [6].

α - и β -клото состоят из двух внеклеточных субдоменов (*KL1* и *KL2*), каждый длиной около 450 аминокислот, а также трансмембранного и внутриклеточного доменов с карбоксильным концом. γ -Клото, в отличие от своих паралогов, состоит из 567 аминокислот и содержит только один внеклеточный домен *KL1*. Внеклеточные домены высоко гомологичны β -глюкозидазам, гидролизующим связи в сахарах, гликопротеинах и гликолипидах. Клото принадлежит к семейству гликозид-гидролаз 1, хотя необходимые для гидролазной активности остатки глутамата в его активном центре отсутствуют. Очень короткий внутриклеточный домен клото (21 аминокислота в α -клото и 24 в β -клото) исключает возможность осуществления самостоятельной передачи сигнала и не содержит PDZ-доменов или мотивов, связывающих известные адаптерные белки. В силу описанной структуры независимая рецепторная активность мембраносвязанного клото маловероятна. Насколько нам известно, поиск клото-связывающих белков с применением двугибридной системы не про-

дился. Однако внеклеточные домены клото взаимодействуют с другими рецепторными белками и образуют комплексы с лигандами, модифицируя функцию этих рецепторов. Влияние этого взаимодействия на физиологию клетки определяется типом рецептора и уровнем его экспрессии в данной ткани.

Экспериментально установлено, что α -клото связывается непосредственно с рецепторами фактора роста фибробластов *FGFR1c* и *FGFR4*, инсулиноподобного фактора роста *IGF1*, рецептором второго типа трансформирующего фактора роста *TGF- β 1*, а также с *Wnt*. В случае с *FGFR1c* и *FGFR4* клото выполняет функцию корецептора и вызывает переключение специфичности рецептора и многократное увеличение его сродства к эндокринному фактору роста фибробластов *FGF23* в противовес каноническим *FGF1–FGF20*, связывание которых с рецепторами зависит от гепарина. Структурный анализ показывает, что α -клото взаимодействует одновременно с карбоксильным концом *FGF23* и с доменом *D3 FGFR1c*, стабилизируя тройной комплекс и выполняя роль каркасного белка. Карбоксильный конец *FGF23* содержит мотив *RXXR*, который отвечает за связывание *FGF23* с димером *FGFR1c–клото*. Активность комплекса зависит от связи с гепарансульфатом, обязательным кофактором паракринной передачи сигналов *FGF*. Три остатка аспарагиновой кислоты и один остаток цистеина в молекуле α -клото координируют ион цинка. Связывание белка в комплексе меняет его конформацию и исключает возможность его ферментативной активности [7]. При взаимодействии с α -клото кардинально изменяются физиологические последствия стимуляции *FGFR1*. Сигнальный путь, активируемый связыванием канонических *FGF* в отсутствие α -клото, включает димеризацию и аутофосфорилирование рецептора, активацию его субстрата, *ERK1/2* и *Akt*, а также *Ras/MAPK* [8]. Он участвует в органогенезе, дифференцировке клеток, способствует их пролиферации и миграции, кооперируется с *TGF- β 1*, *Notch* и неканоническими сигнальными путями *Wnt* [9]. В отличие от описанного выше канонического пути тройной комплекс эндокринного *FGF23* с *FGFR1c* и α -клото контролирует гомеостаз кальция и неорганического фосфата, регулирует метаболизм витамина Д. Сигнальный механизм, активированный образованием тройного комплекса, включает каскад *Ras/MAPK*, характерный для клеток, экспрессирующих α -клото. Связывание *FGF23* с кардиомиоцитами, не синтезирующими α -клото, напротив, приводит к активации фосфолипазы *PLC γ* , кальциневрина и *NFAT* [10].

Кроме этого, описаны FGFR-независимые сигнальные пути α -клото. Взаимодействие растворимого клото с Wnt и рецептором TGF- β RII ингибирует соответствующие канонические сигнальные пути Wnt/ β -катенина и TGF- β 1/SMAD2, предотвращая развитие фиброза [11–13]. Связывание α -клото с рецептором инсулина/IGF1 предотвращает активацию его субстратов (insulin receptor substrate IRS1, IRS2) и пути PI3K/Akt [14, 15].

Помимо этого, многие эффекты α -клото обуславливаются глюкозидазной или сиалидазной активностью его внеклеточных субдоменов [16–18]. Структурные исследования показывают, что растворимый клото связывается с α 2-3-сиалил-лактозной частью ганглиозидов липидных рафтов за счет смещения петли β 6а β . Это происходит независимо от FGF23 и FGFR [18]. Удаление сиаловых кислот с гликопротеинового компонента ионных каналов влияет на присутствие и локализацию последних на мембране, интенсивность ионного транспорта [16–19]. Регуляция активности ионных каналов играет важную роль в функционировании сердечно-сосудистой системы.

Подобно своему паралогу, β -клото меняет физиологическую функцию FGFR: эндокринные FGF15/19 или FGF21 в комплексе с FGFR и β -клото регулируют уровень глюкозы, триглицеридов, холестерина. FGF19 и β -клото, связываясь с FGFR4, участвуют в гомеостазе желчных кислот. Так, у мышей, дефицитных по FGF15, β -клото или FGFR4, наблюдается повышенная экспрессия Cyp7 α 1 и увеличение синтеза желчных кислот в печени [20]. В кардиомиоцитах, экспрессирующих β -клото и FGFR1, связывание FGF21 с этим рецептором приводит к активации путей PI3K/Akt, AMPK, ERK1/2 и ROR- α и обеспечивает защиту от ишемии [21]. Структурные исследования показывают, что FGF21 связывается с обоими внеклеточными субдоменами β -клото, затем этот комплекс присоединяется к FGFR1c, и образовавшиеся тройные комплексы димеризуются [22]. Карбоксильные концы FGF21 и FGF19 связываются с одним и тем же участком β -клото [23].

Внеклеточный домен отщепляется мембранными металлопротеиназами ADAM10 и ADAM17, активность которых регулируется их фосфорилированием [18, 24, 25]. Участок между KL1 и KL2 содержит четыре аминокислоты (Lys-Lys-Arg-Lys), которые образуют потенциальный сайт для протеолиза [26]. Растворимая форма включает отщепленные при участии ADAM10 и ADAM17 три продукта – полный внеклеточный домен, содержащий KL1 и KL2, только KL1 или только KL2, функционирующие

как гуморальные факторы с плейотропной активностью или действующие локально по аутокринно-паракринному механизму. Они осуществляют передачу сигналов факторов роста, регулируют ионный гомеостаз и подавляют окислительный стресс, то есть выполняют протекторную функцию [26]. Клетки, которые способны связывать растворимый клото, должны экспрессировать один или несколько из упомянутых выше рецепторов или иметь на своей поверхности сиаловые кислоты. Форма клеточного ответа зависит от типов рецепторов, преимущественно экспрессируемых данной клеткой. Повидимому, все ткани млекопитающих содержат эти рецепторы в том или ином наборе и, соответственно, могут реагировать на гормональные сигналы, переносимые растворимым α -клото.

Существует две противоположные точки зрения на функциональные различия между растворимой и мембраносвязанной формами α -клото. Так, считается, что корцепторную функцию по отношению к FGF23 выполняет только мембраносвязанная форма [27, 28]. В этом случае его действие ограничено клото-экспрессирующими клетками. Однако в других работах признается способность растворимого клото связываться с рецепторами FGF [29]. Недавнее структурное исследование показало, что в формировании тройного комплекса участвует растворимый клото [7] и, следовательно, его гормональное действие может проявляться в любых тканях, экспрессирующих рецепторы FGF. С нашей точки зрения, вопрос о различиях между растворимой и мембраносвязанной формами клото остается открытым, поскольку пока неясны причины указанных разногласий.

Субдомены KL1 и KL2 функционально различаются, несмотря на значительное структурное сходство. Так, растворимый клото, включающий в себя полный внеклеточный домен, т. е. и KL1, и KL2, способен ингибировать сигнальные пути IGF1 и bFGF и связывать FGF23. В отличие от него, фрагмент, содержащий только KL1, не влияет на FGF23 [30]. KL2 не взаимодействует с путями IGF1 и bFGF, но необходим для функционирования FGF23 [14]. Эти различия подтверждаются структурными исследованиями [22]. Отметим, что представленные данные относятся к растворимым формам клото, и, следовательно, сигнальные пути IGF1 подвержены его гормональному действию. Он также взаимодействует с Wnt, рецепторами TGF- β 1, липидными рафтами и ионными каналами. Данные об индивидуальной роли KL1 и KL2 ограничены, а о возможности отщепления растворимой формы γ -клото можно судить только по аналогии с двумя другими формами.

Секретируемый α -клото образуется путем альтернативного сплайсинга. Этот белок имеет молекулярный вес 65 кДа, близкий к весу KL1 (70 кДа), и содержит дополнительный мотив из десяти аминокислот. Аналогично KL1 и KL2 он подавляет воспаление, препятствует клеточному старению и контролирует минеральный обмен [26, 31]. Однако некоторые авторы считают сомнительной независимую роль секретируемой формы и наличие ее в крови [32]. В недавней работе Xu и Sun [33] было показано, что короткий фрагмент α -клото, идентичный секретируемому, введенный в клетки HEK293 и IMCD (англ. абб. от inner medullary collecting duct) с помощью трансфекции, экспрессировался в них, связывался с S-формилглутатионгидролазой (FGH) и регулировал ее активность. Этот белковый комплекс находился в цитоплазме и окружал ядро. Отметим, что при всей значимости данного открытия физиологическая роль секретируемой формы α -клото остается под вопросом, поскольку естественный уровень экспрессии этой формы существенно ниже, чем в представленном исследовании. Показано, что растворимый α -клото внутри клетки связывается с шаперонами 60 и 70 или рибосомными белками. Учитывая, что они облегчают свертывание и посттрансляционную модификацию многих белков, мы уже сейчас можем говорить о его участии в регуляции трансформации и гомеостаза последних, хотя это требует дальнейшего изучения [33].

Очевидно, что для осуществления таких функций требуется присутствие α -клото в цитоплазме, возможно за счет его эндоцитоза, что также нуждается в дополнительных исследованиях. Аналогичные наблюдения растворимого α -клото нам неизвестны и сравнить свойства всех укороченных форм этого белка в одинаковых условиях мы пока не можем.

γ -Клото образует комплексы с FGFR1b, FGFR1c, FGFR2c, FGFR4 и может функционировать в качестве корцептора для FGF19 в культивируемых клетках [34]. Структурные исследования этих комплексов пока не проводились. Данные о роли γ -клото в сердечно-сосудистой системе также пока отсутствуют, но этот белок отвечает за ряд важных функций в других органах. Так, выявлено, что FGF15/19 вызывает потерю веса у мышей с ожирением, активируя термогенез в бурой жировой ткани [35]; регулирует уровень экспрессии эфрина-A3 и эфрина-A4b в развивающейся сетчатке, что определяет ее назально-темпоральную дифференцировку, необходимую для корректной передачи информации в высшие зрительные центры растущими аксонами ганглиозных клеток; контролирует

рост сетчатки, а также дифференцировку и рост хрусталика у рыбок данио [36] и кур [37]. Способность FGF15/19 передавать сигналы через комплекс γ -клото – FGFR свидетельствует о его участии в регуляции этих процессов, а экспрессия FGFR тканями сердечно-сосудистой системы создает возможности для этого взаимодействия.

АНТИОКСИДАНТНОЕ И ЭНДОТЕЛИОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ КЛОТО

Окислительный стресс лежит в основе многих патологических состояний, при которых клеточная антиоксидантная защита работает неэффективно. Это справедливо в отношении заболеваний воспалительной природы, дисфункции эндотелия, гипертонии [38], атеросклероза [39]. Антиоксидантные свойства белка α -клото продемонстрированы в многочисленных исследованиях. Выявлено, что он повышает жизнеспособность эндотелиальных клеток пуповинной вены человека (англ. абб. HUVECs от human umbilical vein endothelial cells) в условиях окислительного повреждения, вызванного H_2O_2 , способствует увеличению в них активности антиоксидантных ферментов (супероксиддисмутазы (SOD), каталазы и гемоксигеназы-1 (HO-1)) и, соответственно, инактивации реактивных кислородных радикалов. Кроме того, α -клото снижает скорость апоптоза в эндотелиальных клетках, в результате чего повышается секреция оксида азота (NO) и улучшается вазодилатирующая и антитромботическая функции эндотелия. Антиоксидантная защита осуществляется за счет активации под влиянием α -клото пути PI3K/Akt (фосфатидилинозитол-3-киназа/протеинкиназа B) и увеличения экспрессии Nrf2 (транскрипционного фактора – ключевого регулятора систем клеточной защиты, запускающего в условиях окислительного стресса экспрессию генов, кодирующих белки антиоксидантной защиты) [28].

Вопрос о взаимоотношении α -клото и сигнального пути PI3K/Akt не до конца ясен. Так, связываясь с рецепторами к инсулину и IGF-1 (insulin-like growth factor 1), клото повышает устойчивость к окислительному стрессу через ингибирование сигнального каскада инсулин (или IGF-1)/PI3K/Akt. В результате этого предотвращается фосфорилирование фактора транскрипции FOXO1 (forkhead box protein O1), он становится активным и переносится в ядро, где напрямую связывается с промотором и усиливает экспрессию гена *SOD2*, кодирующего митохон-

дриальную Mn-зависимую супероксиддисмутазу [40]. Вероятно, клото способен активировать FOXO1 не только посредством ингибирования Akt, но и подавляя активность сыворотка- и глюкокортикоид-индуцируемой киназы (англ. абб. SGK от serum- and glucocorticoid-inducible kinase), а также стимулируя c-Jun N-терминальные киназы (JNKs). SGK, как и Akt, является компонентом пути инсулин/PI3K. Вызванное ею фосфорилирование FOXO1 и FOXO3 увеличивает их ассоциацию с регуляторными белками 14-3-3, приводит к перемещению FOXO из ядра в цитоплазму, результатом чего является его транскрипционная инактивация [41]. Таким образом, и в этом случае блокада рецепторов инсулина белком α -клото должна способствовать ограничению окислительного стресса. JNK, в свою очередь, напрямую взаимодействует с FOXO. Индукция JNK способствует ядерной локализации указанных факторов транскрипции, и ее ингибирование приводит к снижению экспрессии генов-мишеней FOXO1 [42, 43]. Показано также, что стимуляция сигналов PI3K/Akt может ингибировать индуцированную стрессом и цитокинами активацию JNK [44]. Таким образом, α -клото, взаимодействуя с рецептором инсулина, ингибирует PI3K/Akt и способствует активации JNK и FOXO1. JNK также может фосфорилировать белки 14-3-3, что вызывает высвобождение и активацию связанных с ними FOXO [45]. Кроме того, JNK фосфорилирует FOXO4 в положениях Thr447 и Thr451, вызывая их перемещение в ядро и экспрессию SOD [46]. Интересно, что компонент сигнального пути Wnt β -катенин способен образовывать комплексы с FOXO1 и усиливать его транскрипционную активность [47].

Об антиоксидантном действии α -клото свидетельствует работа Yao et al. (2017) [48], в которой было показано, что предварительная инкубация с рекомбинантным белком повышала жизнеспособность HUVECs, подвергнутых действию окисленных липопротеинов низкой плотности (англ. абб. Ox-LDL от oxidized low density lipoprotein) и окислительному стрессу. Под влиянием α -клото повышалась активность цитоплазматической Cu/Zn-зависимой супероксиддисмутазы (SOD1), экспрессия PI3K, Akt, эндотелиальной NO-синтазы (eNOS) и продукция NO. При этом снижались содержание малонового диальдегида (МДА), синтез активных форм кислорода (АФК), экспрессия индуцибельной NO-синтазы (iNOS), активность Gp91(phox) (гем-связывающей субъединицы NADPH-оксидазы, генерирующей супероксиданион) и лектин-подобных рецепторов Ox-LDL. Результаты показывают, что α -клото ослабляет

окислительный стресс, индуцированный Ox-LDL в HUVECs, активируя SOD1 и синтез NO, которые нейтрализуют реактивные кислородные радикалы. Это происходит за счет активации сигнального пути PI3K/Akt/eNOS и подавления экспрессии рецепторов Ox-LDL [48]. Обращает на себя внимание очевидное противоречие: в одном случае клото активирует, а в другом – ингибирует PI3K/Akt. В данном контексте можно указать на то, что α -клото подавляет активность сигнального пути IGF1/PI3K/Akt, в результате чего повышается экспрессия SOD2. С другой стороны, клото не ингибирует PI3K/Akt при стимуляции других рецепторов, например FGFR. При этом активируются альтернативные защитные механизмы с участием Cu/Zn-SOD, eNOS, гемоксигеназы. Таким образом, можно заключить, что клото гибко регулирует несколько альтернативных антиоксидантных механизмов.

Выше мы уже упоминали, что секретируемый α -клото, содержащий KL1 и дополнительный пептидный мотив, непосредственно связывается с S-формилглутатионгидролазой (FGH), ключевым ферментом синтеза антиоксиданта глутатиона (GSH), активирует сам фермент и экспрессию его гена, влияя на транскрипционный фактор Kid3 в культивируемых клетках HEK293 и IMCD, а также в почках мыши. Функциональное взаимодействие молекулы α -клото и FGH становится возможным благодаря процессу посттрансляционной модификации первого – N-гликозилированию аминокислотного остатка аспарагина Asn285. Ингибирование гликозилирования или замена аспарагина (Asn) на аланин (Ala) в 285-м положении приводила к потере антиоксидантной активности α -клото. Можно предположить, что N-гликозилирование в 285-м сайте является ключевым механизмом, определяющим активность белка, и N-гликановые фрагменты нужны для взаимодействия с FGH [33]. Как мы уже упоминали, α -клото был обнаружен вместе с FGH в цитоплазме, где функции его практически не исследованы. Эти вопросы ожидают своего изучения.

Дальнейшие исследования сигнальных путей с участием клото помогут лучше понять механизмы, с помощью которых белок повышает устойчивость к окислительному стрессу и, в конечном итоге, подавляет старение и патологические процессы, в которых АФК играют ведущую роль [40].

Установлено, что клото связан с поддержанием целостности эндотелия, увеличением выработки эндотелиального оксида азота и улучшением эндотелий-зависимой вазодилатации. В экспериментах на HUVECs обнаружено, что ин-

кубация их с уремическим токсином индоксил-сульфатом (IS) вызывает высвобождение большого количества АФК, повышение экспрессии моноцитарного хемоаттрактантного белка 1 (англ. абб. MCP-1 от monocyte chemoattractant protein 1), снижение жизнеспособности клеток и подавление выработки оксида азота, что свидетельствует о развитии дисфункции эндотелия. При этом в клетках отмечено повышение активности p38 митоген-активируемой протеинкиназы (англ. абб. p38MAPK от p38 mitogen-activated protein kinase), обусловленное ее фосфорилированием, и ядерная транслокация провоспалительного фактора транскрипции NF-κB. Предварительная обработка белком α-клото способствует выживанию клеток и усилению синтеза NO, уменьшению накопления АФК и снижению экспрессии MCP-1, а также предотвращает активацию p38MAPK и NF-κB в HUVECs. Таким образом, α-клото предупреждает дисфункцию эндотелия, вероятно, частично за счет ингибирования накопления АФК и активности p38MAPK, а также нижестоящего участника сигнального каскада NF-κB [49, 50]. Антагонизм между α-клото и NF-κB проявляется на разных уровнях клеточных процессов, в частности, на уровне активации NF-κB и FOXO1 [51].

Циркулирующий α-клото способствует нормализации эндотелий-зависимой вазодилатации, предотвращению апоптоза и улучшению регенерации эндотелия. Он поддерживает целостность слоя эндотелиальных клеток и снижает проницаемость сосудов путем связывания с Ca²⁺ каналами TRPC1 (transient receptor potential channels) и рецепторами фактора роста эндотелия сосудов 2 (англ. абб. VEGFR-2 от receptors for vascular endothelial growth factor 2). Комплекс интернализуется в ответ на стимуляцию VEGF, регулируя таким образом приток Ca²⁺ в клетку [52, 53], в то время как α-клото ингибирует фосфорилирование рецептора VEGF [54] и предотвращает его эндоцитоз. У мышей с дефицитом клото эндотелий сосудов обладает повышенной проницаемостью из-за усиленного апоптоза, пониженной экспрессии кадгерина эндотелия сосудов и гиперактивности Ca²⁺-зависимого кальпаина/каспазы-3 [52, 53], а также, по-видимому, высокой сигнальной активности VEGF.

Растворимый α-клото обладает противовоспалительным действием, подавляя активацию NF-κB и снижая экспрессию индуцированных фактором некроза опухолей TNF-α молекул адгезии ICAM-1 и VCAM-1 в эндотелии [53]. Транскрипция α-клото при воспалительных процессах подавляется цитокином интерлейкином IL-1β при одновременном снижении активнос-

ти ERK1/2 [55]. Антагонистические взаимоотношения между α-клото и фактором транскрипции NF-κB, активирующим воспалительные реакции, детально рассмотрены в работе Нестеровой и соавт. [13]. По-видимому, системная терапия α-клото способна оказывать противовоспалительное действие [56], которое может проявляться во взаимодействии эндотелия и клеток иммунной системы. Эта тема представляет значительный научный и клинический интерес. Обобщая сказанное выше, можно утверждать, что в основе защитного действия α-клото на эндотелий лежат его антиоксидантные и противовоспалительные свойства, а также способность регулировать гомеостаз кальция.

БЕЛОК КЛОТО И ИШЕМИЧЕСКАЯ БОЛЕЗНЬ СЕРДЦА

Сегодня ученые продолжают работать над расшифровкой молекулярных основ патогенеза ССЗ, в частности ишемической болезни сердца (ИБС). Белок клото в этом смысле представляет несомненный интерес. Ряд авторов отметили зависимость между концентрацией его в плазме крови и риском развития ИБС [53, 57]. При обследовании 3555 пациентов со стабильной ИБС с фракцией выброса левого желудочка > 40%, включенных в исследование PEACE (трандолаприл против плацебо), выявлено, что низкая концентрация α-клото связана с повышенной частотой смерти от сердечно-сосудистых заболеваний или госпитализации по поводу сердечной недостаточности. После многопараметрической корректировки клинических переменных и биомаркеров (скорость клубочковой фильтрации, концентрация цистатина С, соотношение альбумина и креатинина в моче, концентрации FGF23, тропонина Т, про-натрий-уретического N-концевого пептида В-типа, С-реактивного белка) корреляция сохранялась. Комбинация низкой концентрации α-клото и высокой концентрации FGF23 повышала риск смерти или госпитализации при ИБС [58]. Это соотношение концентраций обоих белков, по-видимому, благоприятно для проявления клото-независимой активности FGF23. Представление о его самостоятельных эффектах неоднозначно. Показано, что FGF23 способствует развитию гипертрофии левого желудочка (ГЛЖ) в равной степени как у гомозиготных нокаутных *K1^{-/-}* мышей, так и у животных дикого типа [59]. Однако у гетерозиготных нокаутных мышей *K1^{+/-}* FGF23 повышается в меньшей степени, и ГЛЖ менее выражена, чем у гомозиготных. Хотя авторы объясняют это дозозависимым эффектом, мож-

но говорить и о защитном действии α -клото [59]. Кроме того, Xie et al. (2015), наоборот, считают, что дефицит последнего, а не повышенный уровень FGF23, вызывает гипертрофию сердца. У гетерозиготных мышей с хронической болезнью почек (ХБП) уровень сывороточного фосфата и FGF23 не влиял на развитие ГЛЖ, ситуация изменялась только при введении экзогенного α -клото [60]. У человека в настоящее время невозможно четко определить, что является причиной ГЛЖ — дефицит α -клото или повышение FGF23, в том числе и в связи с тем, что до сих пор нет надежных методов определения растворимого клото.

Выявлено также, что дефицит α -клото может приводить к нарушению неоваскуляризации, вызванной ишемией, сверхэкспрессии ингибитора активатора плазминогена-1, который стимулирует фиброзные процессы, ведет к дисфункции синоатриального узла и внезапной сердечной смерти [53].

Ишемия/реперфузия активирует генерацию митохондриальных АФК, окислительное повреждение и гибель кардиомиоцитов [61]. Развивающийся окислительный стресс вызывает дисфункцию эндотелия. В этой связи можно предположить, что антиоксидантные и эндотелиопротекторные эффекты α -клото играют ключевую роль в его противоишемическом действии. Есть основания полагать, что в этом случае системная терапия α -клото может дать положительный клинический эффект.

ВЛИЯНИЕ КЛОТО НА ЭЛЕКТРИЧЕСКУЮ АКТИВНОСТЬ СЕРДЦА

Клото обнаружен в пейсмекерных клетках синоатриального узла, и дефицит его у мышей сопровождается дисфункцией этого узла. Показано, что в условиях 20-ти часового стрессорного воздействия частота внезапной смерти высока и связана с блокадой или проводимости, или синусового узла. Точные молекулярные и клеточные механизмы, лежащие в основе этого феномена, остаются неизвестными. Можно предположить, что экспрессия α -клото в синоатриальном узле важна для функционирования определенных ионных каналов, влияющих на возбудимость клеток-водителей ритма [62]. К настоящему времени известно, что α -клото модулирует ионные каналы в плазматической мембране, в том числе Na^+ /фосфат-котранспортеры [63, 64], Na^+ / K^+ -АТРАЗы [65], Ca^{2+} -каналы [66], специфические калиевые каналы сердца (кодированные геном *hERG* — от англ. human ether-a-go-go related gene), способствующие электрической

активности сердца, играющие существенную роль в координации сердцебиения [67], реполяризации сердца и участвующие в возбуждении миокарда ненормальным путем на фоне гипертрофии. Это указывает на возможную положительную роль α -клото в регуляции активности сердца и на перспективы терапевтического использования этого белка.

ВОЗМОЖНАЯ РОЛЬ КЛОТО В РАЗВИТИИ АРТЕРИАЛЬНОЙ ГИПЕРТЕНЗИИ

Одним из факторов риска развития артериальной гипертензии является повышение жесткости (ригидности) артерий, отражением которого служит показатель скорости пульсовой волны [68]. У пациентов с гипертонией и повышенной жесткостью сосудов наблюдается понижение уровня циркулирующего α -клото на 45% [69]. Недостаток α -клото, вероятно, является важным фактором, который способствует возникновению артериальной ригидности, что играет существенную роль в патогенезе гипертонии, т.к. экспериментальный гаплодефицит белка у мышей ($K1^{+/-}$) вызывает значительное увеличение скорости пульсовой волны и повышение артериального давления (АД), а также сопровождается повышением уровня альдостерона. Артериальная жесткость является одним из самых ранних обнаруживаемых проявлений неблагоприятных структурных и функциональных изменений в стенке сосуда, что в значительной мере повышает риск ИБС и инсульта [69–71]. В культивируемых клетках гладких мышц аорты мышей дефицит гена *K1* вызывал повышение активности аутофагии, что приводило к увеличению экспрессии склераксиса, ключевого транскрипционного фактора синтеза коллагена, играющего существенную роль в развитии артериальной жесткости, и снижению уровня эластина [72]. Помимо этого, гаплодефицит α -клото сопровождался активацией металлопротеиназы MMP9, профиброзных факторов TGF- β 1 и TGF- β 3, RUNX2 (фактора транскрипции, регулирующего клеточный цикл в эндотелиальных клетках и остеобластах). Эти эффекты нейтрализовались хлорокином или эплереноном, антагонистом рецептора альдостерона. Изменениям на клеточном уровне соответствуют физиологические эффекты *in vivo*: увеличение скорости пульсовой волны и повышение артериального давления. Важно отметить, что α -клото подавляет экспрессию CYP11B2, ключевого фермента синтеза альдостерона в надпочечниках, на уровне факторов транскрипции [73]. Таким образом, α -клото вовлечен в

различные аспекты поддержания нормальной функции артерий и предотвращение развития артериальной гипертензии: регуляцию уровня альдостерона и жесткости сосудистой стенки. Выявление связи между дефицитом белка и повышенной жесткостью сосудов является важным открытием, поскольку оно определяет новое направление для понимания патогенеза гипертензии. Доступные в настоящее время антигипертензивные препараты в основном снижают периферическое сопротивление и не влияют на патологические процессы ремоделирования и жесткость сосудов. В этой связи α -клото может быть важным этиологическим фактором и потенциальной мишенью для ограничения ремоделирования и ригидности артерий.

РОЛЬ КЛОТО В ПАТОГЕНЕЗЕ КАРДИОМИОПАТИЙ

α -Клото продуцируется преимущественно в почках и секретируется в кровоток. Выявлено, что дефицит его при хронической болезни почек вызывает уремическую кардиомиопатию. В экспериментах на крысах с ХБП длительное введение рекомбинантного клото ослабляло ремоделирование сердца. Полученные данные позволяют считать рекомбинантный белок α -клото безопасным, эффективным и многообещающим профилактическим/терапевтическим агентом для предотвращения или замедления прогрессирования уремической кардиомиопатии [74].

Поскольку в соответствии с преобладающим мнением в патогенезе уремической кардиомиопатии существенную роль играет чрезмерное повышение уровня FGF23 и/или фосфатов в сыворотке, механизм протекторного действия α -клото предположительно может реализовываться через его взаимодействие с FGFR и FGF23. Однако недавно было выявлено, что растворимая форма белка клото ограничивает развитие гипертрофии миокарда независимым от FGF23 и фосфатов путем – он подавляет аномальную активность кальций-зависимых сигнальных механизмов в сердце [60, 75]. Показано, что различные внеклеточные стрессорные стимулы вызывают увеличение концентрации внутриклеточного кальция, способствуя его высвобождению из клеточных органелл или проникновению через плазматическую мембрану по Ca^{2+} -проницаемым катионным TRPC-каналам. Семейство TRPC включает 7 членов (TRPC1–7, TRPC2 не экспрессируется у человека). Имеющиеся данные указывают на то, что приток Ca^{2+} по каналам TRPC1, 3, 4, 5 и 6 в клетках сердца важен для передачи сигналов,

включая активацию кальмодулин-зависимой серин/треонин фосфатазы (фермента кальциневрина). Эта фосфатаза дефосфорилирует и стимулирует ядерный фактор активированных T-клеток (англ. абб. NFAT от nuclear factor of activated T cells) и NFAT-зависимую экспрессию определенных генов (например, тяжелой цепи бета-миозина), что, в свою очередь, способствует развитию патологической гипертрофии и ремоделированию сердца [76, 77]. Считается, что растворимый α -клото, циркулирующий в системном кровотоке, взаимодействует с рецептором IGF1 и предотвращает IGF1-зависимую активацию PI3K и последующий PI3K-зависимый экзоцитоз каналов TRPC6 в клетках сердца, что обуславливает его кардиопротекторный эффект [75]. При этом структурное моделирование и молекулярный докинг позволили выявить, что растворимый α -клото также может ингибировать каналы TRPC6 путем связывания с 2-3-сиалиллактозой ганглиозидов липидных рафтов. Показано, что белок взаимодействует с гликолипидами благодаря репозиционной петле $\beta 6\alpha 6$ в домене KL1 и образует стабильный комплекс. Связывание растворимого клото с липидными рафтами модулирует их организацию в мембране, подавляет передачу сигналов по пути PI3K/Akt, а также процесс экзоцитоза TRPC6. Авторы исследования считают, что липидные рафты могут быть рецепторами для растворимого α -клото [16, 18, 19], а белок таким путем обеспечивает защиту от вызванной стрессом гипертрофии сердца у мышей [18].

Было также обнаружено, что при ХБП растворимый α -клото ограничивает кальцификацию сосудов, воздействуя непосредственно на их гладкомышечные клетки и косвенно регулируя метаболизм фосфатов. *In vitro* белок подавляет Na^{+} -зависимое всасывание фосфатов и минерализацию, вызванную их высоким содержанием в клетках гладких мышц сосудов [78]. При этом существуют противоречивые результаты относительно присутствия α -клото в сосудистой сети [79]. Lindberg et al. (2013) не наблюдали влияния белка на кальцификацию аортального кольца мыши [80]. Lim et al. (2012) показали, что FGF23 снижает кальцификацию клеток гладких мышц аорты человека – и этот эффект зависит от индукции α -клото [81]. Jimbo et al. (2014) обнаружили, что FGF23 усиливал P_i -стимулированную кальцификацию (P_i – неорганический фосфат сыворотки крови) в культивируемых клетках гладких мышц сосудов человека, сверхэкспрессирующих α -клото [82]. У мышей с дефицитом белка наблюдались высокие уровни циркулирующего фосфора и кальцитриола, и развивалась медиальная кальцификация арте-

рий, практически идентичная наблюдаемой у нокаутированных по *Fgf23* мышей [83]. Однако в подавляющем большинстве работ на сегодняшний день преобладает мнение, что α -клото защищает сосуды от кальцификации. Hu et al. (2011) сообщили, что его дефицит у мышей с ХБП вызывает P_i -индуцированную кальцификацию, а растворимый α -клото может подавлять натрий-зависимое всасывание P_i и кальцификацию у крыс [78]. В работе Zhang et al. (2015) показано, что растворимая форма белка подавляла P_i -индуцированную кальцификацию мезенхимальных стволовых клеток, полученных из костного мозга человека, путем инактивации сигнального пути FGFR1/ERK [29]. Zhao et al. (2015) и Chang et al. (2016) сообщили, что α -клото ослабляет кальцификацию сосудов, причем защитная роль принадлежит как мембраносвязанной, так и растворимой формам белка. Учитывая разногласия, необходимы дальнейшие исследования в этой области [84, 85].

Следует заметить, что результаты исследований роли клото в развитии гипертрофии сердца также разнятся. В некоторых исследованиях патология у мышей при дефиците α -клото не была обнаружена [86]. Она развивалась только после стрессорных воздействий, что позволяет думать об участии белка в формировании толерантности сердца к стрессу [60].

Тем не менее Hu et al. (2015) обнаружили гипертрофию миокарда с последующим фиброзом у клото-дефицитных мышей в возрасте до 12 недель [87]. Снижение уровня α -клото было вызвано генетическим дефектом, потреблением большого количества фосфатов, старением и ХБП. Независимо от причины его дефицита степень гипертрофии и фиброза сердца положительно коррелировала с концентрацией фосфатов и была обратно пропорциональна уровню α -клото в плазме. *In vitro* белок ингибировал TGF- β 1- и ангиотензин II-индуцированную гипертрофию и фиброз кардиомиоцитов или фиброз, вызванный высоким содержанием фосфатов [87].

Причины противоречий в исследованиях необходимо выяснять. Возможно, это связано с генетическими различиями между линиями мышей, их стрессоустойчивости или иными различиями.

УЧАСТИЕ КЛОТО В ПРОЦЕССАХ РЕМОДЕЛИРОВАНИЯ СЕРДЦА И СОСУДОВ, РАЗВИТИИ СЕРДЕЧНОЙ НЕДОСТАТОЧНОСТИ

В эксперименте на крысах с сердечной недостаточностью, вызванной интраперитонеаль-

ным введением изопротеренола, показано, что трансфекция гена *K1* способствует повышению фракции выброса, скоростей сокращения и расслабления (\pm dP/dt max), а также существенно уменьшению фиброза и ремоделирования миокарда у трансфицированных животных опытной группы по сравнению с контрольной [88]. Возможно, кардиопротекторные эффекты α -клото обусловлены его участием в регуляции внутриклеточного уровня Ca^{2+} , повышение которого является одной из причин указанных выше изменений в миокарде. В работе Tang et al. (2018) показано, что α -клото влияет на активность Na^+/Ca^{2+} -обменника и Na^+/K^+ -АТФазы в клетках H9C2, обработанных изопротеренолом [89].

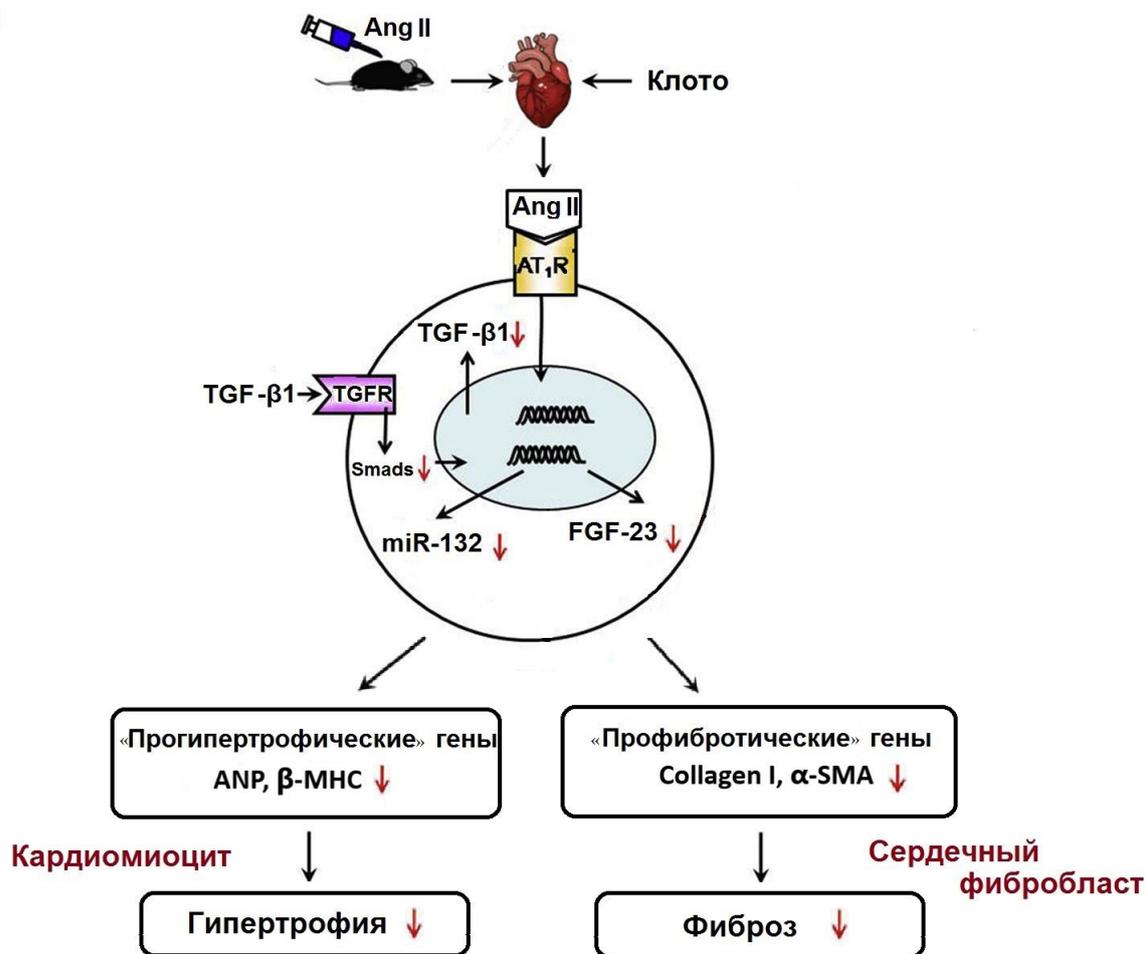
Эксперименты *in vitro* позволили обнаружить, что α -клото способен ингибировать ангиотензин II-индуцированную гипертрофию и пролиферацию кардиомиоцитов, а также фиброз в соединительнотканых клетках сердца. Названные эффекты ангиотензина II реализуются через активацию TGF- β 1-сигнального пути. TGF- β 1 секретируется моноцитами и макрофагами при их активации, а также фибробластами, эндотелиоцитами, тучными клетками и др. Существует 5 изоформ TGF, из них TGF- β 1 обладает наиболее выраженной экспрессией и существенной ролью в ремоделировании и фиброзировании сосудов и миокарда. На ранней стадии инфаркта миокарда он участвует в воспалительной реакции, в более поздние сроки — в ремоделировании левого желудочка путем активации фибробластов и гипертрофии не пораженного инфарктом участка миокарда [90]. Показана связь уровня TGF- β 1 в сыворотке крови со степенью выраженности фиброза миокарда левого предсердия у пациентов с пароксизмальной формой фибрилляции предсердий [91]. Рецидив ишемии миокарда в послеоперационном периоде ассоциирован с повышением уровня TGF- β 1 [92]. При взаимодействии TGF- β 1 с рецептором трансформирующего фактора роста β II (TGFR- β II) фосфорилируется ряд SMAD-белков (smad and mad related proteins), классический сигнальный каскад включает гетеромеризацию SMAD2/3 с участием SMAD4 и перемещение внутрь ядра, где они играют роль факторов транскрипции генов профибротических белков (*COL1A1* — коллаген I и *ACTA2* — гладкомышечный α -актин (α -SMA)) и генов прогипертрофических белков (*NPPA/ANP* — предсердный натрийуретический пептид и *MYH7* — β -форма тяжелой цепи миозина (MHC- β)).

Растворимый клото может напрямую связываться с TGFR- β II и блокировать взаимодей-

ствие с ним TGF-β1, тем самым ингибируя передачу сигналов, а также ослаблять экспрессию рецептора ангиотензина II типа 1 (англ. абб. AT1R от angiotensin II receptor type 1) [11]. Клото способен подавлять как экспрессию TGF-β1, так и TGF-β1-зависимое фосфорилирование SMAD2 и SMAD3 (канонический сигнальный путь TGF-β1) в ангиотензин II-инфузированных тканях сердца, а также ангиотензин II-стимулированных культивируемых кардиомиоцитах и фибробластах.

Кроме того, клото ингибирует экспрессию FGF23 при ангиотензин II-индуцированной гипертрофии сердца и фиброзе *in vivo* и *in vitro*. FGF23 является гормоном костного происхождения. Он играет важную роль в регуляции метаболизма фосфора в сыворотке крови, снижает его реабсорбцию в проксимальных почечных канальцах, увеличивая клиренс. Результаты

многочисленных исследований свидетельствуют о том, что высокий уровень FGF23 является клинически значимым фактором риска развития тяжелых осложнений, в том числе при сердечно-сосудистых заболеваниях, и смертности. Показана связь высокой концентрации FGF23 с массой и гипертрофией левого желудочка, а также летальностью среди больных с терминальной стадией почечной недостаточности и ишемической болезнью сердца [93]. Участие клото в подавлении этих патологических процессов может быть представлено следующим образом. Опосредованно, через снижение количества TGF-β1, α-клото ингибирует микроРНК miR-132 (рисунок адаптирован из работы Ding et al. [94]), которая подавляет фактор транскрипции FOXO3, необходимый для экспрессии атрогина-1. Этот F-box белок вызывает убиквитинирование и, следовательно, деградацию



Роль клото в развитии ангиотензин II-индуцированных гипертрофии и фиброза сердца мыши. Было обнаружено, что обработка экзогенным клото положительно влияла на ангиотензин II-индуцированное ремоделирование сердца и его дисфункцию, что частично можно объяснить его ингибирующим действием на TGF-β1/miR-132 путь. Направленными вниз стрелками обозначена отрицательная регуляция или ингибирование под действием клото. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте <https://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

кальциневрина А в кардиомиоцитах. Избыток кальциневрина А стимулирует NFAT и, как следствие, увеличение экспрессии генов про-фибротических и прогипертрофических факторов. Ингибируя miR-132, клото ограничивает развитие фиброза и гипертрофии миокарда [95].

Существенную роль в процессе ремоделирования сердца и сосудов играет также сигнальный путь Wnt. Показано, что эндотелиальные клетки эндокарда могут быть предшественниками перицитов и миоцитов, которые способны мигрировать в миокард, дифференцироваться и формировать стенку вновь образуемых сосудов миокарда. Ключевую роль в этом процессе играют Wnt/Frizzled-4, β -катенин и лиганды Wnt, синтезируемые эндотелиальными клетками [96]. Белок α -клото ингибирует этот сигнальный путь, что теоретически может снижать скорость ремоделирования. С другой стороны, профиброзная активность Wnt нейтрализуется α -клото – и суммарный результат применения белка, по-видимому, должен быть положительным, хотя это нуждается в экспериментальной проверке.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТЬ К СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫМ ЗАБОЛЕВАНИЯМ, СВЯЗАННАЯ С ПОЛИМОРФИЗМОМ KL

Сердечно-сосудистые заболевания имеют многофакторную этиологию, и генетическая предрасположенность к ним не является исключением. Перекрестные исследования показали связь между аллелем *KL-VS* гена клото и ранней ишемической болезнью сердца. Методом логистической регрессии выявлено, что *KL-VS* является независимым фактором риска коронарных заболеваний сердца, при этом модифицируемые факторы влияют на этот риск: гипертония маскирует, повышение уровня липопротеинов высокой плотности снижает, курение увеличивает [97]. Выявлена связь варианта *KL-VS* с ишемическим инсультом, причем у гомозигот по этому варианту в возрасте до 40 лет отмечен более высокий риск развития болезни по сравнению с гетерозиготами, тогда как в старшей группе (в возрасте более 40 лет) значимой ассоциации не наблюдалось [98].

Обнаружены и другие типы полиморфизма клото, которые также ассоциированы с различными отклонениями от физиологической нормы. Продемонстрировано, что однонуклеотидный полиморфизм *KL rs650439* в значительной степени связан со средней толщиной интима-

медиа и атеросклерозом сонной артерии у пациентов с гипертонической болезнью [99].

Выявлено, что полиморфизм G395A в промоторном участке гена *KL* человека может быть генетическим фактором риска развития ИБС и никак не связан с вазоспастической стенокардией [100].

Полиморфизм C1818T в 4-м экзоне *KL* ассоциирован с более высоким систолическим АД, чем референсный вариант C1818C. Возможно, это связано с влиянием C1818T на продукцию оксида азота (NO), снижение концентрации которого обнаружено у лиц старше 40 лет, носителей названного полиморфизма. Снижение биодоступности NO способствует эндотелиальной дисфункции, вазоконстрикции, тромбозу и сердечно-сосудистым заболеваниям [101, 102]. Можно предполагать, что заместительная терапия белком клото будет оказывать благоприятное воздействие при указанных патологиях.

МОДУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ КЛОТО – НОВЫЙ ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПОДХОД К ЛЕЧЕНИЮ СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

В настоящее время не существует лекарственных средств, разработанных специально для модуляции активности клото, но показано, что некоторые из уже известных усиливают его экспрессию или ограничивают снижение синтеза при патологических состояниях. Выявлено, что у крыс в условиях изопротереноловой интоксикации снижается частота сердечных сокращений (ЧСС), экспрессия клото и каналов HCN4 (hyperpolarization-activated cyclic nucleotide-gated channels – управляемых циклическими нуклеотидами гиперполяризационно-активируемых каналов). Эти интегральные белки являются неселективными лиганд-зависимыми катионными каналами в мембранах клеток сердца и головного мозга. HCN-каналы называют еще «каналами-водителями ритма», поскольку они участвуют в генерации ритмической активности клетками сердца и головного мозга [103]. Показано, что флавоноид астрагалозид IV повышает экспрессию α -клото, который, в свою очередь, увеличивает экспрессию HCN4 и I_f -каналов (funny current channels). ЧСС при этом нормализуется, что может служить основанием для поиска веществ, влияющих на экспрессию клото, с целью применения их при нарушениях ритма сердца [103].

Возможно, в механизме ангиопротекторного действия статинов (аторвастатин и питавастатин) α -клото играет существенную роль, реали-

зую защитные эффекты через инактивацию RhoA-пути (от англ. Ras homolog family member A) [104]. На культуре клеток IMCD3 продемонстрировано, что статины дозозависимо повышают экспрессию мРНК α -клото посредством ингибирования RhoA. Клото, в свою очередь, регулирует обмен кальция и защищает сосуды от кальцификации, которая способствует повышению их ригидности [104].

Установлено, что ингибиторы ангиотензин-превращающего фермента и блокаторы рецепторов ангиотензина II увеличивают экспрессию α -клото, очевидно, вследствие снижения активности ренин-ангиотензин-альдостероновой системы, которая угнетает выработку этого белка [105].

Модулирующее действие гипогликемических средств, росиглитазона и тиазолидиндиона, на экспрессию α -клото в гладкомышечных клетках сосудов (англ. абб. VSMCs от vascular smooth muscle cells) связано с тем, что они являются агонистами PPAR γ , фактора его транскрипции. Эти препараты препятствуют кальцификации тканей, по-видимому, за счет повышения уровня α -клото [106].

Сосудистая кальцификация усугубляет ишемические процессы в миокарде, является основным фактором риска сердечно-сосудистой смертности у пациентов. Поскольку α -клото играет критическую роль в ограничении кальцификации сосудов иммунодепрессантом рапамицином *in vitro* и *in vivo* через торможение mTOR [84], он может служить потенциальной мишенью для поиска лекарственных препаратов, предупреждающих патологические изменения сосудов. Наиболее известный индуктор экспрессии α -клото – витамин Д, избыточное потребление которого также сопряжено с кальцификацией сосудов и внутренних органов. Многие положительные эффекты этого витамина, вероятно, связаны с экспрессией α -клото, который, в свою очередь, регулирует уровень витамина Д и препятствует развитию его побочных эффектов [107].

Таким образом, представленные в обзоре данные позволяют считать, что вещества, повышающие экспрессию клото, могут иметь высокий терапевтический потенциал, т.к. этот белок влияет на многие процессы, играющие важную роль в развитии ССЗ: подавляет перекисное окисление липидов и развитие воспаления, предупреждает повреждение эндотелия, формирование атеросклероза, кальцификацию сосудов, угнетает фиброзирование сердца и сосудов и повышение их жесткости. Рассматривая возможность терапевтического применения клото, следует учесть и предполагаемые побочные эффек-

ты. Их можно прогнозировать на основании описанных выше сигнальных механизмов, регулируемых им. Так, потенциальная передозировка может предположительно способствовать гипотонии, гипофосфатемии, гипокальциемии, т.к. тандем клото–FGF23 способствует экскреции фосфата и кальция. И несмотря на то что в экспериментах на животных системная администрация белка не приводила ни к одному из таких эффектов, недостаточная экспрессия клото и повышенная экспрессия FGF23 действительно сопровождается гипофосфатемией и гипокальциемией. Как уже отмечено выше, гипотензивное действие клото обуславливается повышением эластичности сосудов и антагонизмом между ним и ренин-ангиотензин-альдостероновой системой. Помимо этого, взаимодействие клото с субстратами рецептора инсулина вызывает опасение в контексте возможной индукции инсулинорезистентности, что было исследовано на экспериментальной модели [108]. Установлено, что белок не принимает непосредственного участия в формировании толерантности к инсулину. В силу видовых различий доклинические эксперименты не могут дать исчерпывающего ответа на вопрос о возможных побочных эффектах у человека. Тем не менее индукторы клото, прошедшие клиническую проверку, могут дать предварительную оценку. Так, статины и витамин Д используются в клинической практике, и их длительный прием не сопровождается указанными побочными эффектами, что косвенно свидетельствует в пользу безопасности повышения экспрессии клото или его системного введения. К сожалению, росиглитазон обладает рядом нежелательных эффектов, которые, очевидно, не имеют отношения к увеличению синтеза клото [109, 110]. Таким образом, индукция экспрессии клото может иметь свои ограничения, которые не распространяются на терапевтическое использование рекомбинантного белка. Окончательный ответ могут дать клинические испытания, которые, насколько нам известно, пока не проводились.

Проблема изучения молекулярных основ патогенеза сердечно-сосудистых заболеваний на протяжении долгого времени остается чрезвычайно важной. Изучение роли взаимодействия белков в развитии патологических процессов дает большие возможности для более точного понимания как возникновения патологий сердца и сосудов, так и поиска способов и лекарственных препаратов для их лечения. Белок клото играет существенную роль в механизмах защиты от нарушения функций сердечно-сосудистой системы и развития кардиомиопатии,

сердечной недостаточности, артериальной гипертензии. Плейотропные свойства клото находят свое отражение в разнообразии и взаимодействии кардиопротекторных механизмов. Регуляция уровня белка в сыворотке крови и его экспрессии в кардиомиоцитах с помощью лекарственных препаратов может иметь важное значение для клеточного метаболизма и представлять собой перспективную мишень для лечения ССЗ.

Некоторые вопросы, требующие своего решения, мы уже указали выше — различия между мембраносвязанной и растворимой формами клото, механизмы ферментативной активности, различные функции KL1 и KL2. К этому списку следует добавить малоисследованную роль клото в цитоплазме, где он может связываться с какими-то другими партнерами, помимо шаперонов. Не исключено, что именно внутриклеточный клото влияет на экспрессию генов, самостоятельно или при участии других белков. В связи с этим возникает вопрос о возможности его интернализации, например, путем эндоцитоза рецепторных белков, взаимодействующих с ним. Из всего сказанного выше можно предположить, что клото, связываясь с каноническими рецепторами и модулируя их функцию, участвует в тонкой настройке организма в разные периоды его жизни. Например, высокая активность канонических механизмов

FGF и Wnt играет важную роль в органогенезе. В зрелом организме поддержание гомеостаза является важной задачей, которая осуществляется разными способами, например, с помощью регуляции экспрессии генов и протеолитической деградации белков. Модуляция активности существующих сигнальных механизмов при участии клото является еще одним таким способом. Потеря этой настройки сопровождается патологиями, подобно тому, как избыток FGF23 в условиях дефицита α -клото наблюдается при ИБС. Недостаточный контроль со стороны клото и высокая активность сигнальных путей Wnt, IGF1, TGF- β 1 способствует развитию фиброза и онкологических заболеваний. Можно постулировать, что физиологическое значение клото состоит в этой настройке. Роль его как потенциального регулятора-синхронизатора гомеостаза до сих пор не исследовалась. Наконец, большинство работ на эту тему посвящены α -клото, а не его паралогам β и γ , где, очевидно, существует большое количество неисследованных вопросов.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kuro-o, M., Matsumura, Y., Aizawa, H., Kawaguchi, H., Suga, T., et al. (1997) Mutation of the mouse klotho gene leads to a syndrome resembling ageing, *Nature*, **390**, 45-51, doi: 10.1038/36285.
2. Shiraki-Iida, T., Aizawa, H., Matsumura, Y., Sekine, S., Iida, A., Anazawa, H., Nagai, R., Kuro-o, M., and Nabeshima, Y. (1998) Structure of the mouse klotho gene and its two transcripts encoding membrane and secreted protein 1, *FEBS Lett.*, **424**, 6-10, doi: 10.1016/S0014-5793(98)00127-6.
3. Li, S.-A., Watanabe, M., Yamada, H., Nagai, A., Kinuta, M., and Takei, K. (2004) Immunohistochemical localization of Klotho protein in brain, kidney, and reproductive organs of mice, *Cell Struct. Funct.*, **29**, 91-99, doi: 10.1247/csf.29.91.
4. Lim, K., Groen, A., Molostvov, G., Lu, T., Lilley, K. S., Snead, D., James, S., Wilkinson, I. B., Ting, S., Hsiao, L. L., Niemstra, T. F., and Zehnder, D. (2015) α -klotho expression in human tissues, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **100**, 1308-1318, doi: 10.1210/jc.2015-1800.
5. Мельник А. А. (2017) Белок Klotho и фактор роста фибробластов FGF23 как маркеры хронической болезни почек, *Почки*, **6**, 132-138.
6. Ito, S., Fujimori, T., Hayashizaki, Y., and Nabeshima Y. (2002) Identification of a novel mouse membrane-bound family 1 glycosidase-like protein, which carries an atypical active site structure, *Biochim. Biophys. Acta*, **1576**, 341-345, doi: 10.1016/s0167-4781(02)00281-6.
7. Chen, G., Liu, Y., Goetz, R., Fu, L., Jayaraman, S., Hu, M. C., Moe, O. W., Liang, G., Li, X. and Mohammadi, M. (2018) α -Klotho is a non-enzymatic molecular scaffold for FGF23 hormone signaling, *Nature*, **553**, 461-466, doi: 10.1038/nature25451.
8. Xie, T., and Leung, P. S. (2017) Fibroblast growth factor 21: a regulator of metabolic disease and health span, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **313**, E292-E302, doi: 10.1152/ajpendo.00101.2017.
9. Katoh, M., and Nakagama, H. (2014) FGF receptors: cancer biology and therapeutics, *Med. Res. Rev.*, **34**, 280-300, doi: 10.1002/med.21288.
10. Grabner, A., Amaral, A. P., Schramm, K., Singh, S., Sloan, A., et al. (2015) Activation of cardiac Fibroblast Growth Factor Receptor 4 causes left ventricular hypertrophy, *Cell Metab.*, **22**, 1020-1032, doi: 10.1016/j.cmet.2015.09.002.
11. Doi, S., Zou, Y., Toga, O., Pastor, J. V., John, G. B., Wang, L., Shiizaki, K., Gotschall, R., Schiavi, S., Yorioka, N., Takahashi, M., Boothman, D. A., and Kuro-o, M. (2011) Klotho inhibits Transforming Growth Factor- β 1 (TGF- β 1) signaling and suppresses renal fibrosis and cancer metastasis in mice, *J. Biol. Chem.*, **286**, 8655-8665, doi: 10.1074/jbc.M110.174037.
12. Lee, J., Jeong, D. J., Kim, J., Lee, S., Park, J. H., et al. (2010) The anti-aging gene KLOTHO is a novel target for epigenetic silencing in human cervical carcinoma, *Mol. Cancer*, **9**, 109, doi: 10.1186/1476-4598-9-109.

13. Нестерова А. А., Глинка Е. Ю., Тюренков И. Н., Перфилова В. Н. (2020) Белок клото – универсальный регулятор физиологических процессов в организме, *Успехи физиол. наук*, **51**, 88-104.
14. Ligumsky, H., Rubinek, T., Merenbakh-Lamin, K., Yeheskel, A., Sertchook, R., Shahmoon, S., Aviel-Ronen, S., and Wolf, I. (2015) Tumor suppressor activity of Klotho in breast cancer is revealed by structure–function analysis, *Mol. Cancer Res.*, **13**, 1398-1407, doi: 10.1158/1541-7786.MCR-15-0141.
15. Sopjani, M., Rinnerthaler, M., Kruja, J., and Dërmaku-Sopjani, M. (2015) Intracellular signaling of the aging suppressor protein Klotho, *Curr. Mol. Med.*, **15**, 27-37, doi: 10.2174/1566524015666150114111258.
16. Dalton, G., An, S.-W., Al-Juboori, S. I., Nischan, N., Yoon, J., et al. (2017) Soluble klotho binds monosialoganglioside to regulate membrane microdomains and growth factor signaling, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 752-757, doi: 10.1073/pnas.1620301114.
17. Wolf, M. T., An, S. W., Nie, M., Bal, M. S., and Huang, C. L. (2014) Klotho up-regulates renal calcium channel transient receptor potential vanilloid 5 (TRPV5) by intra- and extracellular N-glycosylation-dependent mechanisms, *J. Biol. Chem.*, **289**, 35849-35857, doi: 10.1074/jbc.M114.616649.
18. Wright, J. D., An, S. W., Xie, J., Lim, C., and Huang, C. L. (2019) Soluble klotho regulates TRPC6 calcium signaling via lipid rafts, independent of the FGFR-FGF23 pathway, *FASEB J.*, **33**, 9182-9193, doi: 10.1096/fj.201900321R.
19. Wright, J. D., An, S.-W., Xie, J., Yoon, J., Nischan, N., Kohler, J. J., Oliver, N., Lim, C., and Huang, C. L. (2017) Modeled structural basis for the recognition of α -2-3-sialyllactose by soluble Klotho, *FASEB J.*, **31**, 3574-3586, doi: 10.1096/fj.201700043R.
20. Zhang, J., Gupte, J., Gong, Y., Weiszmann, J., Zhang, Y., Lee, K. J., Richards, W. G., and Lia, Y. (2017) Overexpression of fibroblast growth factor 21 increases bile acid biosynthesis by opposing FGF15/19 action, *EBioMedicine*, **15**, 173-183, doi: 10.1016/j.ebiom.2016.12.016.
21. Patel, V., Adya, R., Chen, J., Ramanjaneya, M., Bari, M. F., Bhudia, S. K., Hillhouse, E. W., Tan, B. K., and Randevara, H. S. (2014) Novel insights into the cardio-protective effects of FGF21 in lean and obese rat hearts, *PLoS One*, **9**, e87102, doi: 10.1371/journal.pone.0087102.
22. Lee, S., Choi, J., Mohanty, J., Sousa, L. P., Tome, F., Pardon, E., Steyaert, J., Lemmon, M. A., Lax, I., and Schlessinger, J. (2018) Structures of β -Klotho reveal a 'zip code'-like mechanism for endocrine FGF signaling, *Nature*, **553**, 501-505, doi: 10.1038/nature25010.
23. Kuzina, E. S., Ung, P. M., Mohanty, J., Tome, F., Choi, J., Pardon, E., Steyaert, J., Lax, I., Schlessinger, A., Schlessinger, J., and Lee, S. (2019) Structures of ligand-occupied β -Klotho complexes reveal a molecular mechanism underlying endocrine FGF specificity and activity, *PNAS*, **116**, 7819-7824, doi: /10.1073/pnas.1822055116.
24. Rubinek, T., Shahmoon, S., Shabtay-Orbach, A., Ben Ami, M., Levy-Shraga, Y., et al. (2016) Klotho response to treatment with growth hormone and the role of IGF-I as a mediator, *Metabolism*, **65**, 1597-1604, doi: 10.1016/j.metabol.2016.08.004.
25. Chen, C. D., Podvin, S., Gillespie, E., Leeman, S. E., and Abraham C. R. (2007) Insulin stimulates the cleavage and release of the extracellular domain of Klotho by ADAM10 and ADAM17, *Proc. Natl. Acad. Ssi. USA*, **104**, 19796-19801, doi: 10.1073/pnas.0709805104.
26. Kim, J. H., Hwang, K. H., Park, K. S., Kong, I. D., and Cha, S. K. (2015) Biological role of anti-aging protein klotho, *J. Lifestyle Med.*, **5**, 1-6, doi: 10.15280/jlm.2015.5.1.1.
27. Kuro-o, M. (2009) Klotho and aging, *Biochim. Biophys. Acta*, **1790**, 1049-1058, doi: 10.1016/j.bbagen.2009.02.005.
28. Cui, W., Leng, B., and Wang, G. (2019) Klotho protein inhibits H₂O₂-induced oxidative injury in endothelial cells via regulation of PI3K/AKT/Nrf2/HO-1 pathways, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **97**, 370-376, doi: 10.1139/cjpp-2018-0277.
29. Zhang, W., Xue, D., Hu, D., Xie, T., Tao, Y., Zhu, T., Chen, E., and Pan, Z. (2015) Secreted klotho protein attenuates osteogenic differentiation of human bone marrow mesenchymal stem cells in vitro via inactivation of the FGFR1/ERK signaling pathway, *Growth Factors*, **33**, 356-365, doi: 10.3109/08977194.2015.1108313.
30. Abramovitz, L., Rubinek, T., Ligumsky, H., Bose, S., Barshack, I., Avivi, C., Kaufman, B., and Wolf, I. (2011) KL1 internal repeat mediates Klotho tumor suppressor activities and inhibits bFGF and IGF-I signaling in pancreatic cancer, *Clin. Cancer Res.*, **17**, 4254-4266, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-10-2749.
31. Neyra, J. A., and Hu, M. C. (2017) Potential application of klotho in human chronic kidney disease, *Bone*, **100**, 41-49, doi: 10.1016/j.bone.2017.01.017.
32. Mencke, R., Harms, G., Moser, J., van Meurs, M., Diepstra, A., Leuvenink, H. G., and Hillebrands, J. L. (2017) Human alternative Klotho mRNA is a nonsense-mediated mRNA decay target inefficiently spliced in renal disease, *JCI Insight*, **2**, e94375, doi: 10.1172/jci.insight.94375.
33. Xu, Y., and Sun, Z. (2017) Regulation of S-formylglutathione hydrolase by the anti-aging gene klotho, *Oncotarget*, **8**, 88259-88275, doi: 10.18632/oncotarget.19111.
34. Tacer, K. F., Bookout, A. L., Ding, X. S., Kurosu, H., John, G. B., Wang, L., Goetz, R., Mohammadi, M., Kuro-o, M., Mangelsdorf, D. J., and Kliewer, S. A. (2010) Research resource: comprehensive expression atlas of the fibroblast growth factor system in adult mouse, *Mol. Endocrinol.*, **24**, 2050-2064, doi: 10.1210/me.2010-0142.
35. Tomlinson, E., Fu, L., John, L., Hultgren, B., Huang, X., Renz, M., Stephan, J. P., Tsai, S. P., Powell-Braxton, L., French, D., and Stewart, T. A. (2002) Transgenic mice expressing human fibroblast growth factor-19 display increased metabolic rate and decreased adiposity, *Endocrinology*, **143**, 1741-1747, doi: 10.1210/endo.143.5.8850.
36. Nakayama, Y., Miyake, A., Nakagawa, Y., Mido, T., Yoshikawa, M., Konishi, M., and Itoh, N. (2008) Fgf19 is required for zebrafish lens and retina development, *Dev. Biol.*, **313**, 752-766, doi: 10.1016/j.ydbio.2007.11.013.
37. Kurose, H., Okamoto, M., Shimizu, M., Bito, T., Marcelle, C., Noji, S., and Ohuchi, H. (2005) FGF19-FGFR4 signaling elaborates lens induction with the FGF8-L-Maf cascade in the chick embryo, *Dev. Growth Differ.*, **47**, 213-223, doi: 10.1111/j.1440-169X.2005.00795.x.
38. Dinh, Q. N., Drummond, G. R., Sobey, C. G., and Chrissobolis, S. (2014) Roles of inflammation, oxidative stress, and vascular dysfunction in hypertension, *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 406960, doi: 10.1155/2014/406960.
39. Förstermann, U., Xia, N., and Li, H. (2017) Roles of vascular oxidative stress and nitric oxide in the pathogenesis of atherosclerosis, *Circ. Res.*, **120**, 713-735, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.309326.
40. Yamamoto, M., Clark, J. D., Pastor, J. V., Gurnani, P., Nandi, A., Kurosu, H., Miyoshi, M., Ogawa, Y., Castrillon, D. H., Rosenblatt, K. P., and Kuro-o, M. (2005) Regulation of oxidative stress by the anti-aging hormone klotho, *J. Biol. Chem.*, **280**, 38029-38034, doi: 10.1074/jbc.M509039200.

41. Wang, Y., Zhou, Y., and Graves, D. T. (2014) FOXO transcription factors: their clinical significance and regulation, *Biomed. Res. Int.*, **2014**, 925350, doi: 10.1155/2014/925350.
42. Kawamori, D., Kaneto, H., Nakatani, Y., Matsuoka, T. A., Matsuhisa, M., Hori, M., and Yamasaki, Y. (2006) The forkhead transcription factor Foxo1 bridges the JNK pathway and the transcription factor PDX-1 through its intracellular translocation, *J. Biol. Chem.*, **281**, 1091-1098, doi: 10.1074/jbc.M508510200.
43. Ju, Y., Xu, T., Zhang, H., and Yu, A. (2014) FOXO1-dependent DNA damage repair is regulated by JNK in lung cancer cells, *Int. J. Oncol.*, **44**, 1284-1292, doi: 10.3892/ijo.2014.2269.
44. Zhao, H. F., Wang, J., and Tony To, S.-S. (2015) The phosphatidylinositol 3-kinase/Akt and c-Jun N-terminal kinase signaling in cancer: Alliance or contradiction? *Int. J. Oncol.*, **47**, 429-436, doi: 10.3892/ijo.2015.3052.
45. Sunayama, J., Tsuruta, F., Masuyama, N., and Gotoh, Y. (2005) JNK antagonizes Akt-mediated survival signals by phosphorylating 14-3-3, *J. Cell. Biol.*, **170**, 295-304, doi: 10.1083/jcb.200409117.
46. Essers, M. A., Weijzen, S., de Vries-Smits, A. M., Saarloos, I., de Ruiter, N. D., Bos, J. L., and Burgering, B. M. (2004) FOXO transcription factor activation by oxidative stress mediated by the small GTPase Ral and JNK, *EMBO J.*, **23**, 4802-4812, doi: 10.1038/sj.emboj.7600476.
47. Essers, M. A., de Vries-Smits, L. M., Barker, N., Polderman, P. E., Burgering, B. M., and Korswagen, H. C. (2005) Functional interaction between beta-catenin and FOXO in oxidative stress signaling, *Science*, **308**, 1181-1184, doi: 10.1126/science.1109083.
48. Yao, Y., Wang, Y., Zhang, Y., and Liu, C. (2017) Klotho ameliorates oxidized low density lipoprotein (Ox-LDL)-induced oxidative stress via regulating LOX-1 and PI3K/Akt/eNOS pathways, *Lipids Health Dis.*, **16**, 77, doi: 10.1186/s12944-017-0447-0.
49. Yang, K., Nie, L., Huang, Y., Zhang, J., Xiao, T., Guan, X., and Zhao, J. (2012) Amelioration of uremic toxin indoxyl sulfate-induced endothelial cell dysfunction by Klotho protein, *Toxicol. Lett.*, **215**, 77-83, doi: 10.1016/j.toxlet.2012.10.004.
50. Chung, C. P., Chang, Y. C., Ding, Y., Lim, K., Liu, Q., Zhu, L., Zhang, W., Lu, T. S., Molostvov, G., Zehnder, D., and Hsiao, L. L. (2017) α -Klotho expression determines nitric oxide synthesis in response to FGF23 in human aortic endothelial cells, *PLoS One*, **12**, e0176817, doi: 10.1371/journal.pone.0176817.
51. Prud'homme, G. J., Glinka, Y., Kurt, M., Liu, W., and Wang, Q. (2017) The anti-aging protein Klotho is induced by GABA therapy and exerts protective and stimulatory effects on pancreatic beta cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **493**, 1542-1547, doi: 10.1016/j.bbrc.2017.10.029.
52. Kusaba, T., Okigaki, M., Matui, A., Murakami, M., Ishikawa, K., et al. (2010) Klotho is associated with VEGF receptor-2 and the transient receptor potential canonical-1 Ca^{2+} channel to maintain endothelial integrity, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 19308-19313, doi: 10.1073/pnas.1008544107.
53. Semba, R. D., Cappola, A. R., Sun, K., Bandinelli, S., Dalal, M., Crasto, C., Guralnik, J. M., and Ferrucci, L. (2011) Plasma klotho and cardiovascular disease in adults, *J. Am. Geriatr. Soc.*, **59**, 1596-1601, doi: 10.1111/j.1532-5415.2011.03558.x.
54. Kokkinaki, M., Abu-Asab, M., Gunawardena, N., Ahern, G., Javidnia, M., Young, J., and Golestaneh, N. (2013) Klotho regulates retinal pigment epithelial functions and protects against oxidative stress, *J. Neurosci.*, **33**, 16346-16359, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0402-13.2013.
55. Zhao, Y., Meng, C., Wang, Y., Huang, H., Liu, W., Zhang, J. F., Zhao, H., Feng, B., Leung, P. S., and Xi, Y. (2016) IL-1 inhibits Klotho expression and FGF19 signaling in hepatocytes, *Physiol. Endocrinol. Metab.*, **310**, E289-300, doi: 10.1152/ajpendo.00356.2015.
56. Prud'homme, G. J., Glinka, Y., Kurt, M., Liu, W., and Wang, Q. (2020) Systemic Klotho therapy protects against insulinitis and enhances beta-cell mass in NOD mice, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **525**, 693-698, doi: 10.1016/j.bbrc.2020.02.123.
57. Navarro-González, J. F., Donate-Correa, J., Muros de Fuentes, M., Pérez-Hernández, H., Martínez-Sanz, R., and Mora-Fernández, C. (2014) Reduced Klotho is associated with the presence and severity of coronary artery disease, *Heart*, **100**, 34-40, doi: 10.1136/heartjnl-2013-304746.
58. Bergmark, B. A., Udell, J. A., Morrow, D. A., Jarolim, P., Kuder, J. F., Solomon, S. D., Pfeffer, M. A., Braunwald, E., and Sabatine, M. S. (2019) Klotho, fibroblast growth factor-23, and the renin-angiotensin system – an analysis from the PEACE trial, *Eur. J. Heart Fail.*, **21**, 462-470, doi: 10.1002/ejhf.1424.
59. Faul, C., Amaral, A. P., Oskouei, B., Hu, M. C., Sloan, A., and Isakova, T. (2011) FGF23 induces left ventricular hypertrophy, *J. Clin. Invest.*, **121**, 4393-4408, doi: 10.1172/JCI46122.
60. Xie, J., Yoon, J., An, S.-W., Kuro-o, M., and Huang, C.-L. (2015) Soluble klotho protects against uremic cardiomyopathy independently of fibroblast growth factor 23 and phosphate, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **26**, 1150-1160, doi: 10.1681/ASN.2014040325.
61. Zhou, X., Li, S., Wang, Z., Yu, L., and Jiang, H. (2015) Klotho protein: a potential therapeutic agent during myocardial ischemia and reperfusion, *Int. J. Cardiol.*, **191**, 227-228, doi: 10.1016/j.ijcard.2015.05.029.
62. Takeshita, K., Fujimori, T., Kurotaki, Y., Honjo, H., Tsujikawa, H., et al. (2004) Sinoatrial node dysfunction and early unexpected death of mice with a defect of klotho gene expression, *Circulation*, **109**, 1776-1782, doi: 10.1161/01.CIR.0000124224.48962.32.
63. Dermaku-Sopjani, M., Sopjani, M., Saxena, A., Shojaieard, M., Bogatkov, E., Alesutan, I., Eichenmüller, M., and Lang, F. (2011) Downregulation of NaPi-IIa and NaPi-IIb Na-coupled phosphate transporters by coexpression of Klotho, *Cell Physiol. Biochem.*, **28**, 251-258, doi: 10.1159/000331737.
64. Hu, M. C., Shi, M., Zhang, J., Pastor, J., Nakatani, T., and Lanske, B. (2010) Klotho: a novel phosphaturic substance acting as an autocrine enzyme in the renal proximal tubule, *FASEB J.*, **24**, 3438-3450, doi: 10.1096/fj.10-154765.
65. Sopjani, M., Alesutan, I., Dermaku-Sopjani, M., Gu, S., Zelenak, C., Munoz, C., Velic, A., Föller, M., Rosenblatt, K. P., Kuro-o, M., and Lang, F. (2011) Regulation of the Na^{+}/K^{+} -ATPase by Klotho, *FEBS Lett.*, **585**, 1759-1764, doi: 10.1016/j.febslet.2011.05.021.
66. Boros, S., Bindels, R. J., and Hoenderop, J. G. (2009) Active Ca^{2+} reabsorption in the connecting tubule, *Pflugers Arch.*, **458**, 99-109, doi: 10.1007/s00424-008-0602-6.
67. Munoz, C., Pakladok, T., Almilaji, A., Elvira, B., Seebohm, G., Voelkl, J., Föller, M., Shumilina, E., and Lang, F. (2013) Klotho sensitivity of the hERG channel, *FEBS Lett.*, **587**, 1663-1668, doi: 10.1016/j.febslet.2013.04.011.
68. Kaess, B. M., Rong, J., Larson, M. G., Hamburg, N. M., Vita, J. A., Levy, D., Benjamin, E. J., Vasan, R. S., and Mitchell, G. F. (2012) Aortic stiffness, blood pressure progression, and incident hypertension, *JAMA*, **308**, 875-881, doi: 10.1001/2012.jama.10503.

69. Cavalcante, J. L., Lima, J. A., Redheuil, A., and Al-Mallah, M. H. (2011) Aortic stiffness: current understanding and future directions, *J. Am. Coll. Cardiol.*, **57**, 1511-1522, doi: 10.1016/j.jacc.2010.12.017.
70. Gao, D., Zuo, Z., Tian, J., Ali, Q., Lin, Y., Lei, H., and Sun, Z. (2016) Activation of SIRT1 attenuates klotho deficiency-induced arterial stiffness and hypertension by enhancing AMP-activated protein kinase activity, *Hypertension*, **68**, 1191-1199, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.116.07709.
71. Mencke, R., and Hillebrands, J.-L. (2016) The Role of the anti-ageing protein klotho in vascular physiology and pathophysiology, *Nature*, **553**, 461-466, doi: 10.1016/j.arr.2016.09.001.
72. Chen, K., and Sun, Z. (2019) Autophagy plays a critical role in Klotho gene deficiency-induced arterial stiffening and hypertension, *J. Mol. Med. (Berl)*, **97**, 1615-1625, doi: 10.1007/s00109-019-01841-6.
73. Zhou, X., Chen, K., Wang, Y., Schuman, M., Lei, H., and Sun, Z. (2016) Antiaging gene Klotho regulates adrenal CYP11B2 expression and aldosterone synthesis, *JASN*, **27**, 1765-1776, doi: 10.1681/ASN.2015010093.
74. Hu, M. C., Shi, M., Gillings, N., Flores, B., Takahashi, M., Kuro-O, M., and Moe, O. W. (2017) Recombinant α -Klotho may be prophylactic and therapeutic for acute to chronic kidney disease progression and uremic cardiomyopathy, *Kidney Int.*, **91**, 1104-1114, doi: 10.1016/j.kint.2016.10.034.
75. Xie, J., Cha, S. K., An, S. W., Kuro-O, M., Birnbaumer, L., and Huang, C. L. (2012) Cardioprotection by Klotho through downregulation of TRPC6 channels in the mouse heart, *Nat. Commun.*, **3**, 123, doi: 10.1038/ncomms2240.
76. Wu, X., Eder, P., Chang, B., and Molkentin, J. D. (2010) TRPC channels are necessary mediators of pathologic cardiac hypertrophy, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **107**, 7000-7005, doi: 10.1073/pnas.1001825107.
77. Eder, P., and Molkentin, J. D. (2011) TRPC channels as effectors of cardiac hypertrophy, *Circ. Res.*, **108**, 265-272, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.110.225888.
78. Hu, M. C., Shi, M., Zhang, J., Quiñones, H., Griffith, C., Kuro-O, M., and Moe, O. W. (2011) Klotho deficiency causes vascular calcification in chronic kidney disease, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **22**, 124-136, doi: 10.1681/ASN.2009121311.
79. Yamada, S., and Giachelli, C. M. (2017) Vascular calcification in CKD-MBD: Roles for phosphate, FGF23, and Klotho, *Bone*, **100**, 87-93, doi: 10.1016/j.bone.2016.11.012.
80. Lindberg, K., Olauson, H., Amin, R., Ponnusamy, A., Goetz, R., Taylor, R. F., Mohammadi, M., Canfield, A., Kublickiene, K., and Larsson, T. E. (2013) Arterial klotho expression and FGF23 effects on vascular calcification and function, *PLoS One*, **8**, e60658, doi: 10.1371/journal.pone.0060658.
81. Lim, K., Lu, T. S., Molostvov, G., Lee, C., Lam, F. T., Zehnder, D., and Hsiao, L. L. (2012) Vascular Klotho deficiency potentiates the development of human artery calcification and mediates resistance to fibroblast growth factor 23, *Circulation*, **125**, 2243-2255, doi: 10.1161/CIRCULATIONAHA.111.053405.
82. Jimbo, R., Kawakami-Mori, F., Mu, S., Hirohama, D., Majtan, B., Shimizu, Y., Yatomi, Y., Fukumoto, S., Fujita, T., and Shimosawa, T. (2014) Fibroblast growth factor 23 accelerates phosphate-induced vascular calcification in the absence of Klotho deficiency, *Kidney Int.*, **85**, 1103-1111, doi: 10.1038/ki.2013.332.
83. Shimada, T., Kakitani, M., Yamazaki, Y., Hasegawa, H., Takeuchi, Y., Fujita, T., Fukumoto, S., Tomizuka, K., and Yamashita, T. (2004) Targeted ablation of Fgf23 demonstrates an essential physiological role of FGF23 in phosphate and vitamin D metabolism, *J. Clin. Invest.*, **113**, 561-568, doi: 10.1172/JCI19081.
84. Zhao, Y., Zhao, M. M., Cai, Y., Zheng, M. F., Sun, W. L., Zhang, S. Y., Kong, W., Gu, J., Wang, X., and Xu, M. J. (2015) Mammalian target of rapamycin signaling inhibition ameliorates vascular calcification via Klotho upregulation, *Kidney Int.*, **88**, 711-721, doi: 10.1038/ki.2015.160.
85. Chang, J. R., Guo, J., Wang, Y., Hou, Y. L., Lu, W. W., et al. (2016) Intermedin-53 attenuates vascular calcification in rats with chronic kidney disease by upregulation of α -Klotho, *Kidney Int.*, **89**, 586-600, doi: 10.1016/j.kint.2015.12.029.
86. Agarwal, I., Ide, N., Ix, J. H., Kestenbaum, B., Lanske, B., Schiller, N. B., Whooley, M. A., and Mukamal, K. J. (2014) Fibroblast growth factor-23 and cardiac structure and function, *J. Am. Heart Assoc.*, **3**, e000584, doi: 10.1161/JAHA.113.000584.
87. Hu, M. C., Shi, M., Cho, H. J., Adams-Huet, B., Paek, J., et al. (2015) Klotho and phosphate are modulators of pathologic uremic cardiac remodeling, *J. Am. Soc. Nephrol.*, **26**, 1290-1302, doi: 10.1681/ASN.2014050465.
88. Jia, Z., Wei, L., Liu, Q., Zhu, Z., Yang, J., Yang, X., Gan, S., Chen, W., and Zhang, L. (2015) Impact of transfection with recombinant adenovirus vector-mediated Klotho gene on myocardial remodeling in a rat model of heart failure, *Zhonghua Xin Xue Guan Bing Za Zhi*, **43**, 219-226.
89. Tang, G., Shen, Y., Gao, P., Song, S. S., and Si, L. Y. (2018) Klotho attenuates isoproterenol-induced hypertrophic response in H9C2 cells by activating Na^+/K^+ -ATPase and inhibiting the reverse mode of $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -exchanger, *In Vitro Cell Dev. Biol. Anim.*, **54**, 250-256, doi: 10.1007/s11626-017-0215-5.
90. Москалёв А. В., Рудой А. С., Апчел А. В., Зуева В. О., Казымова О. Э. (2016) Особенности биологии трансформирующего ростового фактора β и иммунопатология, *Вестн. ПВМА*, **54**, 206-216.
91. Заславская Е. Л., Морозов А. Н., Ионин В. А., Ма И., Нифонтов С. Е., Баранова Е. И., Яшин С. М., Шляхто Е. В. (2018) Роль трансформирующего фактора роста β 1 и галектина-3 в формировании фиброза левого предсердия у пациентов с пароксизмальной формой фибрилляции предсердий и метаболическим синдромом, *Рос. кардиол. ж.*, **154**, 60-66.
92. Корженевская К. В., Гавришева Н. А., Панов А. В., Сесь Т. П., Алугишвили М. З., Козлов В. В. (2010) Трансформирующий фактор роста- β 1 при различном клиническом течении ишемической болезни сердца после операции коронарного шунтирования, *Мед. иммунология*, **12**, 521-528.
93. Inoue, N., Maeda, R., Kavakami, H., Shokawa, T., Yamamoto, H., Ito, C., and Sasaki, H. (2009) Aortic pulse wave velocity predicts cardiovascular mortality in middle-aged and elderly Japanese men, *Circ. J.*, **73**, 549-553, doi: 10.1253/circj.cj-08-0492.
94. Ding, J., Tang, Q., Luo, B., Zhang, L., Lin, L., Han, L., Hao, M., Li, M., Yu, L., and Li, M. (2019) Klotho inhibits angiotensin II-induced cardiac hypertrophy, fibrosis, and dysfunction in mice through suppression of transforming growth factor- β 1 signaling pathway, *Eur. J. Pharmacol.*, **859**, 172549, doi: 10.1016/j.ejphar.2019.172549.
95. Ucar, A., Gupta, S. K., Fiedler, J., Eriki, E., Kardasinski, M., et al. (2012) The miRNA-212/132 family regulates both cardiac hypertrophy and cardiomyocyte autophagy, *Nat. Commun.*, **3**, 1078, doi: 10.1038/ncomms2090.
96. Chen, Q., Zhang, H., Liu, Y., Adams, S., Eilken, H., Stehling, M., Corada, M., Dejana, E., Zhou, B., and Adams, R. H. (2016) Endothelial cells are progenitors of cardiac pericytes and vascular smooth muscle cells, *Nat. Commun.*, **7**, 12422, doi: 10.1038/ncomms12422.

97. Arking, D. E., Becker, D. M., Yanek, L. R., Fallin, D., Judge, D. P., Moy, T. F., Becker, L. C., and Dietz, H. C. (2003) KLOTTHO allele status and the risk of early-onset occult coronary artery disease, *Am. J. Hum. Genet.*, **72**, 1154-1161, doi: 10.1086/375035.
98. Majumdar, V., Nagaraja, D., and Christopher, R. (2010) Association of the functional KL-VS variant of Klotho gene with early-onset ischemic stroke, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **403**, 412-416, doi: 10.1016/j.bbrc.2010.11.045.
99. Oguro, R., Kamide, K., Kokubo, Y., Shimaoka, I., Congrains, A., et al. (2010) Association of carotid atherosclerosis with genetic polymorphisms of the klotho gene in patients with hypertension, *Geriatr. Gerontol. Int.*, **10**, 311-318, doi: 10.1111/j.1447-0594.2010.00612.x.
100. Imamura, A., Okumura, K., Ogawa, Y., Murakami, R., Torigoe, M., Numaguchi, Y., and Murohara, T. (2006) Klotho gene polymorphism may be a genetic risk factor for atherosclerotic coronary artery disease but not for vasospastic angina in Japanese, *Clin. Chim. Acta.*, **371**, 66-70, doi: 10.1016/j.cca.2006.02.021.
101. Majumdar, V., Jose, D., and Christopher, R. (2011) Influence of Klotho genotypes on plasma NO(x) levels in South Indian population, *Thromb Res.*, **128**, 251-255, doi: 10.1016/j.thromres.2011.04.002.
102. Pavlatou, M. G., Remaley, A. T., and Gold, P. W. (2016) Klotho: a humeral mediator in CSF and plasma that influences longevity and susceptibility to multiple complex disorders, including depression, *Transl. Psychiatry*, **6**, e876, doi: 10.1038/tp.2016.135.
103. Qiu, X., Guo, Q., Xiong, W., Yang, X., and Tang, Y. Q. (2016) Therapeutic effect of astragaloside-IV on bradycardia is involved in up-regulating klotho expression, *Life Sci.*, **144**, 94-102, doi: 10.1016/j.lfs.2015.11.021.
104. Narumiya, H., Sasaki, S., Kuwahara, N., Irie, H., Kusaba, T., Kameyama, H., Tamagaki, K., Hatta, T., Takeda, K., and Matsubara, H. (2004) HMG-CoA reductase inhibitors up-regulate anti-aging klotho mRNA via RhoA inactivation in IMCD3 cells, *Cardiovasc. Res.*, **64**, 331-336, doi: 10.1016/j.cardiores.2004.07.011.
105. Yoon, H. E., Ghee, J. Y., Piao, S., Song, J. H., Han, D. H., Kim, S., Ohashi, N., Kobori, H., Kuro-O, M., and Yang, C. W. (2011) Angiotensin II blockade upregulates the expression of Klotho, the anti-ageing gene, in an experimental model of chronic cyclosporine nephropathy, *Nephrol. Dial. Transplant.*, **26**, 800-813, doi: 10.1093/ndt/gfq537.
106. Cheng, L., Zhang, L., Yang, J., and Hao, L. (2017) Activation of peroxisome proliferator-activated receptor γ inhibits vascular calcification by upregulating Klotho, *Exp. Ther. Med.*, **13**, 467-474, doi: 10.3892/etm.2016.3996.
107. Haussler, M. R., Whitfield, G. K., Haussler, C. A., Sabir, M. S., Khan, Z., Sandoval, R., and Jurutka, P. W. (2016) 1,25-Dihydroxyvitamin D and Klotho: A tale of two renal hormones coming of age, *Vitam. Horm.*, **100**, 165-230, doi: 10.1016/bs.vh.2015.11.005.
108. Lorenzi, O., Veyrat-Durebex, C., Wollheim, C. B., Vllemin, P., Rohner-Jeanrenaud, F., Zanchi, A., and Vischer, U. M. (2010) Evidence against a direct role of klotho in insulin resistance, *Pflugers Arch.*, **459**, 465-473, doi: 10.1007/s00424-009-0735-2.
109. Bilan, V. P., Salah, E. M., Bastacky, S., Jones, H. B., Mayers, R. M., Zinker, B., Poucher, S. M., and Tofovic, S.P. (2011) Diabetic nephropathy and long-term treatment effects of rosiglitazone and enalapril in obese ZSF1 rats, *J. Endocrinol.*, **210**, 293-308, doi: 10.1530/JOE-11-0122.
110. Dagenais, G. R., Gerstein, H. C., Holman, R., Budaj, A., Escalante, A., et al. (2008) Effects of ramipril and rosiglitazone on cardiovascular and renal outcomes in people with impaired glucose tolerance or impaired fasting glucose: results of the diabetes reduction assessment with ramipril and rosiglitazone medication (DREAM) Trial, *Diabetes Care*, **31**, 1007-1014, doi: 10.2337/dc07-1868.

KLOTTHO PROTEIN AND THE CARDIOVASCULAR SYSTEM

Review

I. N. Tyurenkov¹, V. N. Perfilova^{1*}, A. A. Nesterova², and E. Yu. Glinka³

¹ Volgograd State Medical University, 400066 Volgograd, Russia;
E-mail: vnperfilova@mail.ru; vnperfilova@gmail.com

² Pyatigorsk State Pharmaceutical Academy, 357500 Pyatigorsk, Russia

³ Keenan Research Centre, St. Michael's Hospital, Toronto, Canada

Klotho protein affects a number of metabolic pathways essential for pathogenesis of cardiovascular diseases. It inhibits lipid peroxidation and inflammation, it prevents endothelial injury and calcification of blood vessels. Klotho decreases rigidity of blood vessels and suppresses the development of heart fibrosis. Low level of its expression coincides with a number of diseases. Cardioprotective effect of klotho is based on its ability to interact with multiple receptors and ion channels. Being a pleiotropic protein, klotho may become a useful target for therapeutic intervention in the treatment of cardiovascular diseases. We list hereby pharmaceuticals that stimulate klotho expression and suggest some possible perspectives for future studies.

Keywords: klotho protein, heart failure, coronary heart disease, cardiomyopathy, arterial hypertension

УДК 616.1+577.2+576.3

МЕХАНИЗМЫ НАРУШЕНИЯ МЕТАБОЛИЗМА L-АРГИНИНА В ЭНДОТЕЛИАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ*

Обзор

© 2021 Дж.Т. Маммедова, А.В. Соколов, И.С. Фрейдлин, Э.А. Старикова**

Федеральное государственное бюджетное научное учреждение «Институт экспериментальной медицины»,
197376 Санкт-Петербург, Россия; электронная почта: starickova@yandex.ru

Поступила в редакцию 06.08.2020

После доработки 14.09.2020

Принята к публикации 14.09.2020

L-аргинин является ключевым метаболитом для продукции оксида азота эндотелиальными клетками, а также сигнальной молекулой внутриклеточного сигнального пути mTOR. Активность mTOR регулирует гомеостатические процессы в эндотелиальных клетках и связана с работой L-аргинин-метаболизирующих ферментов, эндотелиальной синтазы оксида азота и аргиназы. Нарушение метаболизма L-аргинина в эндотелиальных клетках приводит к развитию эндотелиальной дисфункции. Противоречивые результаты использования добавки L-аргинина для коррекции патологий, ассоциированных с эндотелиальной дисфункцией, указывают на неоднозначную роль аминокислоты в регуляции функций эндотелиальных клеток. Обзор посвящен анализу современных данных литературы о роли метаболизма L-аргинина в развитии эндотелиальной дисфункции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: L-аргинин, эндотелий, оксид азота, eNOS, аргиназа, mTOR.

DOI: 10.31857/S0320972521020032

ВВЕДЕНИЕ

Эндотелиальная синтаза оксида азота (eNOS) – фермент, который катализирует реакцию синтеза оксида азота (NO) из L-аргинина. Оксид азота за счет активации гуанилилциклазы и повышения уровня циклического 3',5'-гуанозинмонофосфата (цГМФ) в гладкомышечных клетках расширяет кровеносные сосуды и увели-

чивает их проницаемость [1]. NO ингибирует пролиферацию гладкомышечных клеток сосудов, процессы перекисного окисления липидов в мембранах клеток и липопротеинов крови, регулирует газотранспортные свойства крови, является ингибитором агрегации тромбоцитов и адгезии лейкоцитов к сосудистой стенке [2]. Ключевая роль NO в поддержании гомеостаза сосудов была доказана при изучении нокаутных по eNOS мышей, у которых развивалась гипертония [3], наблюдалось усиление пролиферативной активности гладкомышечных клеток сосудов в ответ на повреждение [4], повышение адгезивности лейкоцитов к эндотелию [5], гиперкоагулопатия [6], обострение атеросклероза [7], а также нарушение регуляции процессов ангиогенеза [8].

Установлено, что введение L-аргинина повышает продукцию NO эндотелиальными клетками (ЭК) [9, 10], поэтому возможность применения L-аргинина в качестве пищевой добавки для коррекции функции эндотелия изучали при разных патологиях у человека и на животных моделях [11–14]. Однако в ряде исследований было показано, что добавка L-аргинина не оказывает никакого положительного действия [15], а в некоторых случаях даже усугубляет эндотелиальную дисфункцию [16]. Это указывает на неоднозначную роль L-аргинина в регуляции функции eNOS.

Принятые сокращения: АДМА – асимметричный диметиларгинин; АСЛ – аргининосукцинатлиаза; АСС – аргининосукцинатсинтаза; АФК – активные формы кислорода; ДДАГ – диметиларгинин диметиламиногидролаза; ЛНП – липопротеины низкой плотности; НАДФ – никотинамидадениндинуклеотидфосфат; ФАД – флавинадениндинуклеотид; ФМН – флавиномононуклеотид; цГМФ – циклический 3',5'-гуанозинмонофосфат; ЭК – эндотелиальные клетки; Akt/PKB – протеинкиназа В; АМР – аденозинмонофосфат; АМРК – АМР-активируемая протеинкиназа; ВН₄ – тетрагидробиоптерин; СаМ – кальмодулин; eNOS – эндотелиальная синтаза оксида азота; Hsp90 – белок теплового шока 90; HUVECs – эндотелиальные клетки вены пупочного канатика человека; mTOR – механистическая мишень рапамицина; NO – оксид азота; PRMT – протеинаргининметилтрансфераза.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», ВМ20-252, 28.12.2020.

** Адресат для корреспонденции.

Тоническую продукцию NO обеспечивает множество процессов, напрямую зависящих от метаболизма L-аргинина. Последний не только является общим субстратом для eNOS и аргиназы, регулирующих активность друг друга [17], но и выполняет роль сигнальной молекулы в рамках внутриклеточного сигнального пути механической мишени рапамицина mTOR [18], тесно связанного с метаболизмом L-аргинина [19, 20]. Все это делает L-аргинин одним из ключевых факторов в регуляции гомеостаза сосудов. В обзоре проводится анализ данных литературы, посвященной роли нарушения метаболизма L-аргинина в развитии эндотелиальной дисфункции.

РЕГУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ eNOS

eNOS конститутивно экспрессируется в эндотелиальных клетках. Активность фермента изменяется в зависимости от скорости кровотока, коагуляции, вазоконстрикции и гипоксии и регулируется за счет фосфорилирования по аминокислотным остаткам тирозина (Y), серина (S) и треонина (T) его активирующих (S615, S633 и S1177) или ингибирующих (S114, T495 и Y656) сайтов [21].

Активация eNOS посредством Ca^{2+} -зависимого связывания кальмодулина (CaM) происходит под влиянием брадикинина, эстрадиола, фактора роста эндотелия (VEGF) [21]. Серотонин выступает активатором фермента при активации тромбоцитов и усилении процессов коагуляции [22]. Повышение концентрации внутриклеточного кальция приводит к активации CaM, который блокирует фосфорилирование ингибирующего сайта T495 eNOS, взаимодействуя с CaM-связывающим сайтом фермента. Одновременно CaM-опосредованное фосфорилирование кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы II (CaMKII) приводит к фосфорилированию активирующего сайта S1177 eNOS [23]. При изменении скорости тока крови, повышенной продукции активных форм кислорода (АФК), под влиянием ростовых факторов происходит опосредованное протеинкиназой В (Akt1) фосфорилирование eNOS по двум сайтам S615 и S1177, что усиливает продукцию NO даже при низких концентрациях внутриклеточного кальция [24]. АМР-активируемая протеинкиназа (АМРК) осуществляет фосфорилирование eNOS по S1177 при повышении концентраций аденозинмонофосфата (АМР) и внутриклеточного кальция, а также в условиях дефицита нутриентов [25]. В исследованиях на животных и на культурах ЭК было показано, что активация

sAMP-зависимой протеинкиназы А (sAMP – циклический аденозинмонофосфат) восстанавливает барьерную функцию эндотелия за счет фосфорилирования eNOS по S1177 [21, 26]. Согласно последним данным, метаболический регулятор mTOR, который интегрирует сигналы от Akt, АМРК, САМКII, также напрямую активирует eNOS путем фосфорилирования фермента по S1177 [19]. Киназы prb0src и РYК2 регулируют активность eNOS в условиях изменения кровотока, осуществляя ее фосфорилирование по Y81 и Y657, соответственно [26–28].

При изменении скорости и направления кровотока, воздействии повреждающих факторов, таких как окислительный или тепловой стресс, в ЭК происходит повышение экспрессии белка теплового шока 90 (Hsp90), основная функция которого состоит в стабилизации структуры клеточных белков. В эндотелиальных клетках Hsp90 стабилизирует структуру и поддерживает функцию eNOS, связываясь с оксигеназным доменом этого фермента. В исследовании Förstermann et al. было показано, что Hsp90 повышает сродство eNOS к L-аргину, CaM и НАДФН, что, в свою очередь, усиливает активность фермента [29].

Расположенный в Ca^{2+} /CaM-связывающем участке eNOS остаток T495 является основным сайтом, негативно регулирующим активность фермента [26]. Опосредованное протеинкиназой С (PKC), Rho-киназами [30] и АМРК [31] фосфорилирование по T495 препятствует формированию комплекса CaM–eNOS. Rho-киназы также подавляют активность eNOS опосредованно, через ингибирование CaM [32], сигнальных молекул Akt и АМРК [30, 33]. Локализация eNOS в кавеолах обуславливает возможность негативной регуляции активности фермента кавеолином-1 [33], который предотвращает связывание CaM с ферментом при низкой концентрации внутриклеточного кальция [21, 27].

Роль дефицита L-аргинина в регуляции функциональной активности eNOS. В функциональном состоянии eNOS представляет собой гомодимер, в каждом из мономеров которого выделяют два домена: оксигеназный, взаимодействующий с гемом, L-аргонином, тетрагидробиоптеринном (BH_4), и редуктазный, взаимодействующий с НАДФН-синтазой и CaM (рис. 1).

eNOS осуществляет последовательный перенос электронов с НАДФН редуктазного домена одного мономера, через ФАД и ФМН, на гем оксигеназного домена другого мономера, где с участием BH_4 и кислорода осуществляется окисление L-аргинина с образованием L-цитруллина и NO [34, 35]. Под влиянием провоспалительных факторов, окислительного стресса и в условиях

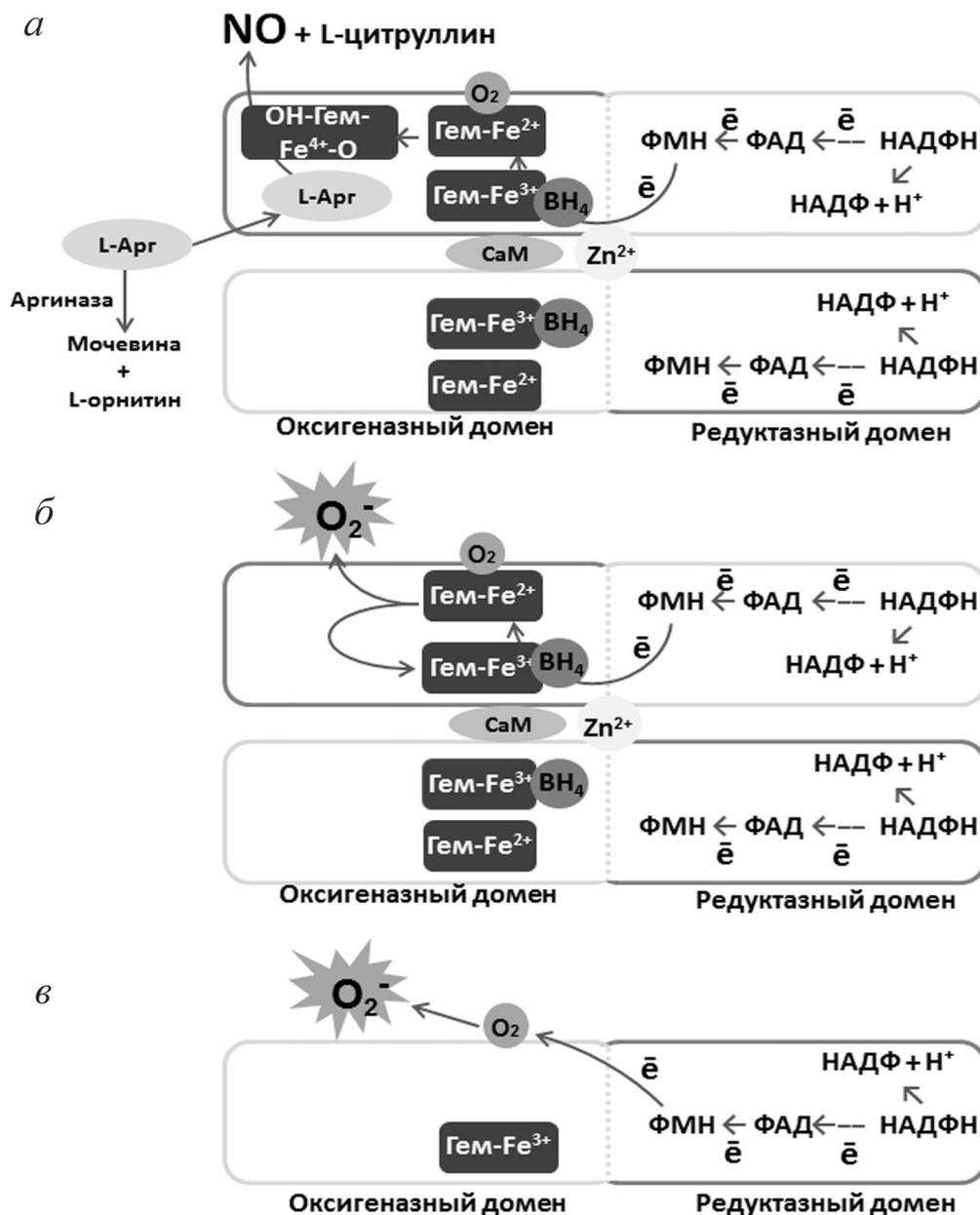


Рис. 1. Нарушение функциональной активности eNOS в условиях дефицита субстрата. *а* – Активность eNOS при достаточном количестве субстрата; *б* – активность eNOS при дефиците субстрата; *в* – активность eNOS при диссоциации фермента

снижения биодоступности L-аргинина происходит нарушение структуры eNOS [36]. Вследствие того, что транспорт электронов осуществляется в транс-положении, с редуктазного домена одной субъединицы eNOS на оксигеназный домен другой субъединицы этого фермента, разобщение субъединиц фермента приводит к разобщению процессов окисления НАДФН и снижению синтеза NO. Подавление тонической продукции NO само по себе приводит к усилению воспалительных и тромботических процес-

сов в сосудах [37]. Эти процессы усиливаются в условиях дефицита субстрата, т.к. терминальным акцептором электронов вместо L-аргинина становится кислород, и eNOS синтезирует большие количества супероксидного анион-радикала – $\cdot O_2^-$. Взаимодействие $\cdot O_2^-$ с NO приводит к образованию пероксинитрита (ONOO⁻), который окисляет BH₄ до BH₂, что, в свою очередь, становится причиной нарушения структуры eNOS и амплификации процесса. Гиперпродукция $\cdot O_2^-$ и ONOO⁻ приводит к активации ЭК,

индукции экспрессии адгезионных молекул и развитию воспаления [36]. Высокие концентрации АФК обладают цитотоксическим и мутагенным действием, вызывают старение и апоптоз ЭК, что увеличивает риски развития атеросклероза и гипертонии [38]. Таким образом, фосфорилирование диссоциированного фермента по активирующим сайтам может быть одним из факторов развития окислительного стресса, воспаления, коагуляции и нарушения регуляции тонуса сосудов – поэтому функциональная активность eNOS в условиях дефицита субстрата должна ингибироваться. Однако при патологиях, связанных с эндотелиальной дисфункцией, нередко снижение продукции NO наблюдается на фоне активации фермента [39].

Абсолютный дефицит субстрата eNOS. В ряде исследований на культурах клеток и лабораторных животных было показано, что активность eNOS зависит от концентрации внеклеточного L-аргинина [9, 10]. Синтез NO в культуре клеток вены пупочного канатика человека (HUVECs) зависел от концентрации L-аргинина в культуральной среде, т.к. в условиях дефицита L-аргинина индуцированная под влиянием основного фактора роста фибробластов bFGF продукция NO полностью ингибировалась, а при добавлении экзогенного L-аргинина происходило восстановление продукции этого метаболита [40]. В экспериментах на ЭК линии EA.hy926 было показано, что в случае частичного удаления транспортера L-аргинина CAT-1 происходило снижение продукции NO этими клетками [41]. В литературе описаны результаты исследования состояния сердечно-сосудистой системы человека с редким генетическим нарушением эндогенного метаболизма L-аргинина. В плазме данного пациента концентрация L-аргинина была снижена на 79% по сравнению с референсными значениями вследствие мутации гена *SLC7A7*, кодирующего аминокислотный транспортер y+LAT-1. Следствиями дефицита L-аргинина явились развитие ишемии миокарда, нарушение вазомоторной функции сосудов, снижение абсолютного количества тромбоцитов, повышение концентрации комплекса тромбин–антитромбин III и продуктов распада фибрина в плазме [42]. Полученные в данном исследовании результаты вызывают ряд вопросов. В частности, отсутствие аминокислотного транспортера y+LAT-1 может приводить к нарушению транспорта не только L-аргинина, но и ряда других аминокислот. Таким образом, выявленные у данного пациента изменения могли быть вызваны различными причинами. С другой стороны, ожидаемые при дефиците L-аргинина изменения у пациента не развивались [42]. Несмотря на невозможность

однозначной трактовки, это единичное наблюдение свидетельствует о важной роли L-аргинина и NO в поддержании гомеостаза сосудов.

Учитывая, что эукариотические клетки в основном находятся в микроокружении с избыточным содержанием питательных веществ, кажется маловероятной ситуация, в которой эндотелий сосудов будет испытывать дефицит одной условно заменимой аминокислоты. Тем не менее снижение концентрации L-аргинина крови, вызванное действием аргинин-метаболизирующих ферментов (аргиназ и iNOS), описано при гемолизе [43], сепсисе [44], хирургических травмах [45], легочной артериальной гипертензии [46], а также в модели болезни Альцгеймера у мышей [47] и рассматривается как одна из возможных причин развития эндотелиальной дисфункции [48].

Относительный дефицит субстрата eNOS. Замечено, что при введении добавки L-аргинина усиление продукции NO происходит на фоне достаточно высокой для обеспечения потребностей eNOS концентрации внутриклеточного L-аргинина. Это показывает, что eNOS имеет ограниченный доступ к внутриклеточному L-аргину и использует для синтеза NO преимущественно внеклеточный пул аминокислоты. Данное явление получило в литературе название «аргининовый парадокс» [41]. Для объяснения «аргининового парадокса» было выдвинуто две гипотезы, каждая из которых предполагает наличие в ЭК механизма, призванного регулировать биодоступность субстрата для eNOS [41].

Асимметричный диметиларгинин (АДМА) – эндогенный ингибитор eNOS, который ограничивает доступ фермента к L-аргину и продукцию NO, даже при достаточной концентрации аргинина в клетке [49]. АДМА подавляет активность eNOS, конкурируя с L-аргином за связывание с активным центром фермента [50] и с аминокислотным транспортером CAT, снижая поступление L-аргинина в клетку [51]. Ингибирующий эффект АДМА в отношении eNOS может преодолеваться только при относительном избытке L-аргинина [49]. Повышение концентрации АДМА наблюдается при разных патологиях (преэклампсия, диабет, гипертония), связанных с эндотелиальной дисфункцией [52, 53]. Продукция АДМА также усиливается в апоптотических и стареющих ЭК [54].

АДМА является эндогенным продуктом деградации метилированных белков. Метилирование остатков L-аргинина в белках катализирует семейство ферментов протеинаргининметилтрансфераз (PRMTs), которые используют S-аденозилметионин как источник метильных групп [55]. Повышение экспрессии генов PRMTs в ЭК

происходит под влиянием окисленных липопротеинов низкой плотности (ЛНП) [56]. Гиперпродукция NO при воспалении приводит к S-нитрозилованию цистеина в активном центре диметиларгинин диметиламиногидролазы (ДДАГ) – фермента, катализирующего деградацию АДМА до L-цитруллина и диметиламина [57]. Ингибирование ДДАГ не только тормозит катаболизм АДМА [58], но также снижает продукцию L-цитруллина, который может использоваться аргининосукцинатсинтазами (АСС) и аргининосукцинатлиазами (АСЛ) как предшественник для ресинтеза L-аргинина [59]. Колокализация eNOS в кавеолах с АСС и АСЛ облегчает доступ фермента к L-аргину, ресинтезированному из L-цитруллина. Немаловажным является тот факт, что L-цитруллин действует как сильный аллостерический ингибитор аргиназы [59].

Аргиназа катализирует реакцию гидролиза L-аргинина до мочевины и L-орнитина. Сродство eNOS к субстрату характеризуется константой Михаэлиса $K_m = 2$ мкМ, т.е. в 1000 раз выше, чем у аргиназ, для которых $K_m = 2$ мМ. Однако скорость реакции (V_{max}) аргиназ в 1000 раз больше, чем у eNOS [60]. Поэтому при дефиците внутриклеточного L-аргинина благодаря большей скорости реакции (V_{max}), осуществляемой аргиназой II, равновесие смещается в сторону продукции полиаминов, а продукция NO снижается [17, 41]. Ингибирование eNOS дополнительно усиливается промежуточным продуктом метаболизма аргиназы – спермином, который препятствует выбросу кальция из митохондрий, а также САМКП-опосредованной активации eNOS [61]. На этих данных основывается вторая, предложенная для объяснения «аргининового парадокса» гипотеза «разных внутриклеточных пулов аргинина». Предполагают, что внеклеточный пул L-аргинина в основном используется eNOS для продукции NO, в то время как внутриклеточный пул одинаково доступен и для eNOS, и для аргиназы. Поэтому при повышении активности аргиназ развивается относительный дефицит субстрата для eNOS и снижение продукции NO. Гипотеза «разных внутриклеточных пулов аргинина» объясняет и «аргининовый парадокс», и конкурентное подавление активности eNOS аргиназой [60].

Действительно, активность аргиназы и eNOS регулируется реципрокно [61]. На культуре стареющих ЭК человека и на эндотелии аорты пожилых мышей было показано, что повышение экспрессии гена, синтеза белка и активности аргиназы II приводит к диссоциации eNOS, способствует старению ЭК с усилением экспрессии адгезионных молекул. Напротив, shRNA-сайленсинг аргиназы II или разрушение

гена аргиназы II восстанавливает функцию eNOS и снижает экспрессию маркеров старения эндотелия. Повышение экспрессии гена аргиназы II в культуре «молодых» ЭК индуцирует их старение и характерный для этого состояния фенотип клеток [62].

В ЭК человека экспрессируется две изоформы аргиназ с разной локализацией в клетке. Аргиназа I является цитозольной формой, аргиназа II локализована в митохондриях и является преобладающей изоформой в ЭК [60, 63]. Активацию аргиназ индуцируют повреждающие и провоспалительные факторы – окисленные липопротеины низкой плотности, пероксинитрит [64], липополисахариды, цитокины (TNF- α , IFN- γ), 8-бromo-цГМФ, тромбин [65] и гипоксия [66]. Часто развитие эндотелиальной дисфункции сопровождается одновременным усилением активности аргиназы и продукции АДМА [26, 67]. АДМА усиливает активность аргиназы, высвобождая L-аргинин внутриклеточного пула и снижая продукцию N-гидрокси-L-аргинина – промежуточного продукта метаболизма eNOS, подавляющего активность аргиназы [61].

РОЛЬ ВНУТРИКЛЕТОЧНЫХ СЕНСОРОВ L-АРГИНИНА В РЕГУЛЯЦИИ АКТИВНОСТИ eNOS

Аминокислоты являются структурными единицами белков, поэтому их биодоступность влияет на анаболические процессы в клетках. В настоящее время ведется активный поиск и изучение сенсоров аминокислот и внутриклеточных сигнальных путей, интегрирующих и конвертирующих сигналы от этих сенсоров. Наибольший интерес представляют сенсоры в рамках сигнального пути серин/треонин-протеинкиназы mTOR, который не только регулирует процессы анаболизма, клеточный рост и пролиферацию [68], но также контролирует активность ферментов, метаболизирующих L-аргинин [19, 20]. mTOR входит в состав двух сигнальных белковых комплексов mTORC1 и mTORC2, выполняющих в клетке разные, но частично пересекающиеся функции [68]. В литературе накапливается все больше данных, доказывающих зависимость активации сигнального комплекса mTORC1 от биодоступности аминокислот [69]. В рамках mTORC1 обнаружены сигнальные сенсоры аминокислот – SLC38A9 и CASTOR1 [18, 69].

Примечательно, что если CASTOR1 является сигнальной молекулой, то SLC38A9 относится к трансцепторам, т.е. является одновременно ли-

зосомальным транспортером и рецептором L-аргинина [70]. Недавние исследования показывают, что от биодоступности L-аргинина в клетке критически зависит активность mTORC1 внутриклеточного сигнального пути, по крайней мере, в недифференцированных стволовых клетках эмбрионов человека hESC и в клетках перевиваемых линий HeLa, MEF, HEK293T, U2OS, MRC5 [18]. Направленных исследований влияния дефицита L-аргинина на регуляцию mTOR в ЭК не проводилось. В литературе описаны только косвенные данные, указывающие на возможную роль L-аргинина в регуляции mTORC1 и функциональной активности ЭК. Было показано, что дефицит L-аргинина вызывает снижение пролиферации, адгезии [71, 72], миграции ЭК [73, 74], подавление формирования капилляроподобных структур на матрикеле *in vitro* [75] и ангиогенеза *in vivo* [40, 75]. Возможность позитивной регуляции mTOR под влиянием L-аргинина указывает на важную роль аминокислоты в поддержании гомеостатических функций эндотелиальных клеток.

Вместе с тем, согласно многочисленным данным литературы, активация mTOR сопровождается множеством патологических состояний, связанных с эндотелиальной дисфункцией (таблица) [76]. Как было показано *in vitro* на культуре HUVECs и *ex vivo* в аортах стареющих крыс, активация mTOR способствует старению ЭК, нарушению структуры eNOS, усилению продукции АФК и снижению продукции NO [77]. Ингибирование этого сигнального пути, напротив, оказывает вазопротекторное действие. Этот эффект был обнаружен у пациентов при трансплантации почки. Применение специфического ингибитора mTOR рапамицина с целью иммуносупрессии снижало случаи гипертонии при данной патологии [78, 79]. Ингибирование mTORC1 *in vivo* путем введения рапамицина усиливало вазодилатацию [80, 81] за счет усиления продукции NO. Было показано, что рапамицин обладает кардиопротекторными свойствами [76] и снижает экспрессию мРНК активацион-

ных маркеров эндотелия VCAM-1 и E-селектина на HUVECs [82]. На стареющей культуре ЭК и аорте старых крыс применение рапамицина и ресвератрола восстанавливало функцию eNOS [62]. Стареющий фенотип ЭК аорты мышей C56BL/6J с индуцированным ожирением был обусловлен активацией Akt/mTOR [77]. Ингибирование Akt/mTOR рапамицином восстанавливало пролиферацию ЭК, спрутинг, активность eNOS и вазорелаксацию. *In vivo* это коррелировало с усилением процесса ангиогенеза, восстановлением тока крови и увеличением плотности капилляров после ишемии нижних конечностей [77]. Ингибирование mTORC1 рапамицином при изменении кровотока дозозависимо повышало базальный уровень экспрессии eNOS сонной артерии у мышей [77].

Примечательно, что mTORC1 активирует как eNOS, так и аргиназу, несмотря на то что эти ферменты реципрокно регулируют активность друг друга (рис. 2). Активация mTOR приводит к фосфорилированию eNOS по S1177 [19]. Это усиливает взаимодействие eNOS с Ca²⁺-связывающими белками и делает активность фермента менее зависимой от концентрации внутриклеточного Ca²⁺ [98]. Предполагают также, что комплекс Ca²⁺-кальмодулин может служить структурой, которая стабилизирует взаимодействие eNOS с mTORC1 [98]. Важно подчеркнуть, что фосфорилирование по активирующему сайту eNOS не обязательно приводит к усилению продукции NO и восстановлению функции эндотелия, напротив, фосфорилирование eNOS по S1177 в случае диссоциации фермента может повышать образование АФК, усиливать окислительный стресс и индуцировать процессы воспаления, ассоциированные со старением клеток [40].

Дополнительным фактором, усугубляющим дисфункцию eNOS, может быть формирование петли обратной положительной связи между аргиназой II и mTORC1 [99]. Гиперактивация mTOR/S6K1 приводит к повышению синтеза и стабилизации мРНК аргиназы II [99]. В недав-

Изменение активности аргинин-зависимых ферментов и продукции их метаболитов при различных патологиях и старении

Патология	Уровень ADMA	Активность аргиназы	Диссоциация eNOS	mTOR	Продукция NO	Продукция АФК
Атеросклероз	↑ [83]	↑ [84]	↑ [85]	↑ [86]	↓ [87]	↑ [87]
Ожирение	↑ [26]	↑ [88]	↑ [20]	↑ [89]	↓ [90]	↑ [90]
Диабет II типа	↑ [26]	↑ [83]	↑ [91]	↑ [18, 91]	↓ [91]	↑ [91]
Гипертензия	↑ [92]	↑ [93]	↑ [94]	↑ [95]	↓ [96]	↑ [97]
Старение	↑ [26]	↑ [92]	↑ [26]	↑ [18]	↓ [96]	↑ [97]

Примечание. В квадратных скобках указаны ссылки на соответствующую литературу.

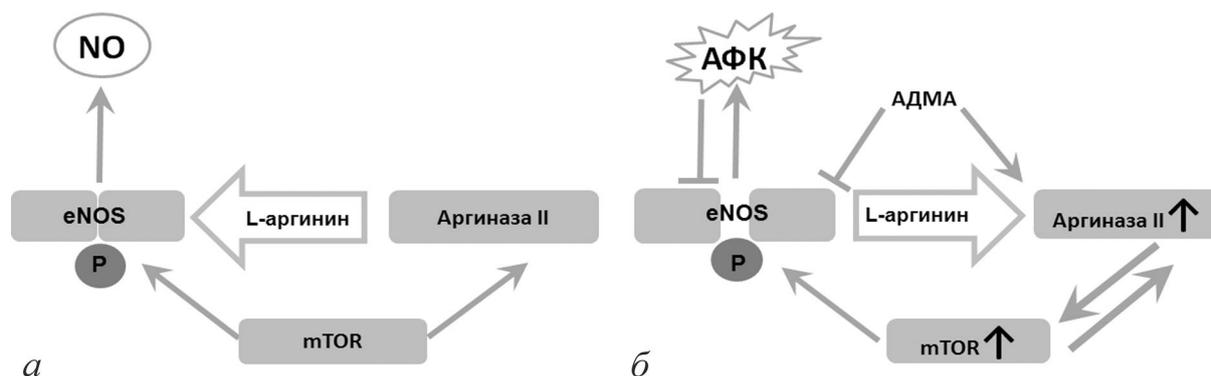


Рис. 2. Нарушение метаболизма аргинина при эндотелиальной дисфункции. *а* – В норме mTOR поддерживает баланс активности аргиназы II и eNOS; *б* – при развитии эндотелиальной дисфункции под действием провоспалительных факторов и окислительного стресса происходит усиление активности аргиназы II, формирование петли взаимной активации между аргиназой и mTOR. В совокупности с усилением продукции АДМА это приводит к созданию относительного дефицита субстрата для eNOS, диссоциации фермента и продукции АФК вместо NO. mTOR-опосредованное фосфорилирование eNOS по активационному сайту S1117 усиливает выработку АФК

них исследованиях на клетках гепатомы мыши AML12 было установлено, что аргиназа II тоже может усиливать активность mTORC1 независимо от гидролиза L-аргинина ферментом [20]. Индукция экспрессии аргиназы II в клетках гепатомы приводила к активации сигнального комплекса mTORC1 за счет его ассоциации с лизосомами, опосредованной неконвенциональным мономерным миозином первого класса (Myo1b) [20]. Было установлено, что взаимодействие Arg II–Myo1b–mTORC1–S6K1 запускает старение и апоптоз гладкомышечных клеток сосудов человека (HSMC) [20]. Аргиназа II активировала TOR/S6K1-сигнальный путь в изолированных мезентериальных артериях у мышей [77]. Предполагают, что синергизм активации аргиназы и mTOR необходим для синхронизации процессов гликолиза и активации ферментов цикла мочевины в клетке [100]. Эти данные ставят под сомнение зависимость mTOR от биодоступности аргинина в ЭК. В противном случае активация аргиназы должна приводить к ингибированию mTOR за счет создания ферментом дефицита внутриклеточного L-аргинина.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Многочисленные экспериментальные данные показывают, что нарушение баланса регуляции аргинин-метаболизирующих ферментов с преимущественной активацией аргиназ приводит к диссоциации eNOS, в результате чего фермент вместо вазопротекторного NO производит повышенное количество супероксидного анион-радикала. Этот механизм лежит в основе развития дисфункции сосудов при различных патологических состояниях и старении. Экс-

перименты, направленные на ингибирование mTOR при эндотелиальной дисфункции, демонстрируют, что этот внутриклеточный сигнальный путь является центральным узлом, ответственным за нарушение баланса метаболизма L-аргинина в ЭК. В случае гиперактивации mTORC1 формируется петля взаимной позитивной регуляции между mTORC1 и аргиназой, что в конечном итоге приводит к нарушению функции eNOS. Функциональное состояние eNOS в ЭК определяется множеством факторов, в ряду которых сигнальные молекулы, биодоступность субстрата, экспрессия молекул, регулирующих конформацию фермента. Данные, накопленные в настоящее время в этой области, в значительной степени противоречивы. Остается непонятным, как аргиназа может вызывать дефицит субстрата для eNOS, если последняя преимущественно использует внеклеточный L-аргинин. Парадоксально, что сигнальный путь mTOR может синергично активировать eNOS и аргиназу, хотя эти ферменты реципрокно регулируют активность друг друга. И еще одно противоречие состоит в том, что дефицит L-аргинина, вызванный аргиназой, подавляет активность eNOS, которая зависит от L-аргинина, но усиливает активацию аргинин-зависимого пути mTOR. Решение перечисленных вопросов необходимо для более полного понимания механизмов развития эндотелиальной дисфункции.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Freed, J. K., and Gutterman, D. D. (2017) Communication is key: mechanisms of intercellular signaling in vasodilation, *J. Cardiovasc. Pharmacol.*, **69**, 264-272, doi: 10.1097/FJC.0000000000000463.
- Tousoulis, D., Kampoli, A. M., Tentolouris, C., Papageorgiou, N., and Stefanadis, C. (2012) The role of nitric oxide on endothelial function, *Curr. Vasc. Pharmacol.*, **10**, 4-18.
- Huang, P. L., Huang, Z., Mashimo, H., Bloch, K. D., Moskowitz, M. A., et al. (1995) Hypertension in mice lacking the gene for endothelial nitric oxide synthase, *Nature*, **377**, 239-242, doi: 10.1038/377239a0.
- Moroi, M., Zhang, L., Yasuda, T., Virmani, R., Gold, H. K., Fishman, M. C., and Huang, P. L. (1998) Interaction of genetic deficiency of endothelial nitric oxide, gender, and pregnancy in vascular response to injury in mice, *J. Clin. Invest.*, **101**, 1225-1232, doi: 10.1172/JCI1293.
- Lefer, D. J., Jones, S. P., Girod, W. G., Baines, A., Grisham, M. B., et al. (1999) Leukocyte-endothelial cell interactions in nitric oxide synthase-deficient mice, *Am. J. Physiol.*, **276**, H1943-H1950, doi: 10.1152/ajpheart.1999.276.6.H1943.
- Freedman, J. E., Sauter, R., Battinelli, E. M., Ault, K., Knowles, C., Huang, P. L., and Loscalzo, J. (1999) Deficient platelet-derived nitric oxide and enhanced hemostasis in mice lacking the NOSIII gene, *Circ. Res.*, **84**, 1416-1421, doi: 10.1161/01.res.84.12.1416.
- Kuhlencordt, P. J., Gyurko, R., Han, F., Scherrer-Crosbie, M., Aretz, T. H., et al. (2001) Accelerated atherosclerosis, aortic aneurysm formation, and ischemic heart disease in apolipoprotein E/endothelial nitric oxide synthase double-knockout mice, *Circulation*, **104**, 448-454, doi: 10.1161/hc2901.091399.
- Ha, J. M., Jin, S. Y., Lee, H. S., Shin, H. K., Lee, D. H., et al. (2016) Regulation of retinal angiogenesis by endothelial nitric oxide synthase signaling pathway, *Kor. J. Physiol. Pharmacol. Official J. Kor. Physiol. Soc. Kor. Pharmacol.*, **20**, 533-538, doi: 10.4196/kjpp.2016.20.5.533.
- Zani, B. G., and Bohlen, H. G. (2005) Transport of extracellular L-arginine via cationic amino acid transporter is required during *in vivo* endothelial nitric oxide production, *Am. J. Physiol. Heart. Circ. Physiol.*, **289**, H1381-H1390.
- MacKenzie, A., and Wadsworth, R. M. (2003) Extracellular L-arginine is required for optimal NO synthesis by eNOS and iNOS in the rat mesenteric artery wall, *Br. J. Pharmacol.*, **139**, 1487-1497, doi: 10.1038/sj.bjp.0705380.
- Oludare, G. O., Jinadu, H. D., and Aro, O. O. (2018) L-arginine attenuates blood pressure and reverses the suppression of angiogenic risk factors in a rat model of preeclampsia, *Pathophysiology*, **25**, 389-395, doi: 10.1016/j.pathophys.2018.08.001.
- Mariotti, F. (2020) Arginine supplementation and cardiometabolic risk, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **23**, 29-34, doi: 10.1097/MCO.0000000000000612.
- Moretto, J., Guglielmetti, A. S., Tournier-Nappey, M., Martin, H., Prigent-Tessier, A., Marie, C., and Demougeot, C. (2017) Effects of a chronic L-arginine supplementation on the arginase pathway in aged rats, *Exp. Gerontol.*, **90**, 52-60, doi: 10.1016/j.exger.2017.01.023.
- Kabat, A., and Dhein, S. (2006) L-arginine supplementation prevents the development of endothelial dysfunction in hyperglycaemia, *Pharmacology*, **76**, 185-191.
- Rodrigues-Krause, J., Krause, M., Rocha, I., Umpierre, D., and Fayh, A. (2018) Association of L-arginine supplementation with markers of endothelial function in patients with cardiovascular or metabolic disorders: a systematic review and meta-analysis, *Nutrients*, **11**, 15, doi: 10.3390/nu11010015.
- Xiong, Y., Fru, M. F., Yu, Y., Montani, J. P., Ming, X. F., and Yang, Z. (2014) Long term exposure to L-arginine accelerates endothelial cell senescence through arginase-II and S6K1 signaling, *Aging (Albany NY)*, **6**, 369-379, doi: 10.18632/aging.100663.
- Morris, S. M., Jr. (2016) Arginine metabolism revisited, *J. Nutr.*, **146**, 2579S-2586S, doi: 10.3945/jn.115.226621.
- Saxton, R. A., and Sabatini, D. M. (2017) mTOR signaling in growth, metabolism, and disease, *Cell*, **168**, 960-976, doi: 10.1016/j.cell.2017.02.004.
- Decker, B., and Pumiglia, K. (2018) mTORc1 activity is necessary and sufficient for phosphorylation of eNOS^{S1177}, *Physiol. Rep.*, **6**, e13733, doi: 10.14814/phy2.13733.
- Yu, Y., Xiong, Y., Montani, J. P., Yang, Z., and Ming, X. F. (2018) Arginase-II activates mTORC1 through myosin-1b in vascular cell senescence and apoptosis, *Cell Death Dis.*, **9**, 313, doi: 10.1038/s41419-018-0356-9.
- Rafikov, R., Fonseca, F. V., Kumar, S., Pardo, D., Darragh, C., Elms, S., and Black, S. M. (2011) eNOS activation and NO function: structural motifs responsible for the posttranslational control of endothelial nitric oxide synthase activity, *J. Endocrinol.*, **210**, 271-284, doi: 10.1530/JOE-11-0083.
- Govers, R., and Rabelink, T. J. (2001) Cellular regulation of endothelial nitric oxide synthase, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **280**, F193-F206.
- Murthy, S., Koval, O. M., Ramiro Diaz, J. M., Kumar, S., Nuno, D., et al. (2017) Endothelial CaMKII as a regulator of eNOS activity and NO-mediated vasoreactivity, *PLoS One*, **12**, e0186311, doi: 10.1371/journal.pone.0186311.
- Lee, M. Y., Gamez-Mendez, A., Zhang, J., Zhuang, Z., Vinyard, D. J., et al. (2018) Endothelial cell autonomous role of Akt1: regulation of vascular Tone and ischemia-induced arteriogenesis, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **38**, 870-879, doi: 10.1161/ATVBAHA.118.310748.
- Cacicedo, J. M., Gauthier, M. S., Lebrasseur, N. K., Jasuja, R., Ruderman, N. B., and Ido, Y. (2011) Acute exercise activates AMPK and eNOS in the mouse aorta, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **301**, H1255-H1265, doi: 10.1152/ajpheart.01279.2010.
- Vanhoutte, P. M., Zhao, Y., Xu, A., and Leung, S. W. S. (2016) Thirty years of saying NO: sources, fate, actions, and misfortunes of the endothelium-derived vasodilator mediator, *Circ. Res. Am. Heart Assoc.*, **119**, 375-396, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.116.306531.
- Ghimire, K., Altmann, H. M., Straub, A. C., and Isenberg, J. S. (2017) Nitric oxide: what's new to NO? *Am. J. Physiology*, **312**, C254-C262, doi: 10.1152/ajpcell.00315.2016.
- Bibli, S. I., Zhou, Z., Zukunft, S., Fisslthaler, B., Andreadou, I., et al. (2017) Tyrosine phosphorylation of eNOS regulates myocardial survival after an ischaemic insult: role of PYK2, *Cardiovasc. Res.*, **113**, 926-937, doi: 10.1093/cvr/cvx058.
- Förstermann, U., and Sessa, W. C. (2012) Nitric oxide synthases: regulation and function, *Eur. Heart J.*, **33**, 829-837, 837a-837d, doi: 10.1093/eurheartj/ehr304.
- Sugimoto, M., Nakayama, M., Goto, T. M., Amano, M., Komori, K., and Kaibuchi, K. (2007) Rho-kinase phosphorylates eNOS at threonine 495 in endothelial cells, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **361**, 462-467, doi: 10.1016/j.bbrc.2007.07.030.
- Chen, Z. P., Mitchelhill, K. I., Michell, B. J., Stapleton, D., Rodriguez-Crespo, I., et al. (1999) AMP-

- activated protein kinase phosphorylation of endothelial NO synthase, *FEBS Lett.*, **443**, 285-289.
32. Greif, D. M., Sacks, D. B., and Michel, T. (2004) Calmodulin phosphorylation and modulation of endothelial nitric oxide synthase catalysis, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **101**, 1165-1170, doi: 10.1073/pnas.0306377101.
 33. Oliveira-Paula, G. H., Lacchini, R., and Tanus-Santos, J. E. (2016) Endothelial nitric oxide synthase: From biochemistry and gene structure to clinical implications of NOS3 polymorphisms, *Gene*, **575 (2 Pt 3)**, 584-599, doi: 10.1016/j.gene.2015.09.061.
 34. Gebhart, V., Reiß, K., Kollau, A., Mayer, B., and Gorren, A. (2019). Site and mechanism of uncoupling of nitric-oxide synthase: Uncoupling by monomerization and other misconceptions. Nitric oxide: biology and chemistry, **89**, 14-21. <https://doi.org/10.1016/j.niox.2019.04.007>
 35. Luo, S., Lei, H., Qin, H., and Xia, Y. (2014) Molecular mechanisms of endothelial NO synthase uncoupling. *Curr. Pharm. Des.*, **20**, 3548-3553, doi: 10.2174/13816128113196660746.
 36. Li, H., and Förstermann, U. (2017) *Nitric Oxide (Third Edition), Biology and Pathobiology*, 117-124, doi: 10.1016/B978-0-12-804273-1.00009-0.
 37. Sharma, J. N., Al-Omran, A., and Parvathy, S. S. (2007) Role of nitric oxide in inflammatory diseases, *Inflammopharmacology*, **15**, 252-259, doi: 10.1007/s10787-007-0013-x.
 38. Liang, P., Jiang, B., Li, Y., Liu, Z., Zhang, P., et al. (2018) Autophagy promotes angiogenesis via AMPK/Akt/mTOR signaling during the recovery of heat-denatured endothelial cells, *Cell Death Dis.*, **9**, 1152, doi: 10.1038/s41419-018-1194-5.
 39. Vanhoutte, P. M. (2018) Nitric oxide: from good to bad, *Ann. Vasc. Dis.*, **11**, 41-51, doi: 10.3400/avd.ra.17-00134.
 40. Park, I. S., Kang, S. W., Shin, Y. J., Chae, K. Y., Park, M. O., et al. (2003) Arginine deiminase: a potential inhibitor of angiogenesis and tumour growth, *Br. J. Cancer*, **89**, 907-914, doi: 10.1038/sj.bjc.6601181.
 41. Chen, F., Lucas, R., and Fulton, D. (2013) The subcellular compartmentalization of arginine metabolizing enzymes and their role in endothelial dysfunction, *Front Immunol.*, **4**, 184, doi: 10.3389/fimmu.2013.00184.
 42. Loscalzo, J. (2001) An experiment of nature: genetic L-arginine deficiency and NO insufficiency, *J. Clin. Invest.*, **108**, 663-664, doi: 10.1172/JCI13848.
 43. Morris, C. R., Kato, G. J., Poljakovic, M., Wang, X., Blackwelder, W. C., et al. (2005) Dysregulated arginine metabolism, hemolysis-associated pulmonary hypertension, and mortality in sickle cell disease, *JAMA*, **294**, 81-90, doi: 10.1001/jama.294.1.81.
 44. Luiking, Y. C., and Deutz, N. E. (2007) Exogenous arginine in sepsis, *Crit. Care. Med.*, **35**, 557-563, doi: 10.1097/01.CCM.0000279191.44730.A2.
 45. Pribis, J. P., Zhu, X., Vodovotz, Y., and Ochoa, J. B. (2012) Systemic arginine depletion after a murine model of surgery or trauma, *J. Parenter. Enteral. Nutr.*, **36**, 53-59, doi: 10.1177/0148607111414579.
 46. Kao, C., Wedes, S., Hsu, J., Bohren, K., Comhair, S., Jahoor, F., and Erzurum, S. (2015) Arginine metabolic endotypes in pulmonary arterial hypertension, *Pulmonary Circ.*, **5**, 124-134, doi: 10.1086/679720.
 47. Kan, M. J., Lee, J. E., Wilson, J. G., Everhart, A. L., Brown, C. M., et al. (2015) Arginine deprivation and immune suppression in a mouse model of Alzheimer's disease, *J. Neurosci.*, **35**, 5969-5982, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4668-14.2015.
 48. Morris, S. M., Jr. (2012) Arginases and arginine deficiency syndromes, *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*, **15**, 64-70, doi: 10.1097/MCO.0b013e32834d1a08.
 49. Di Franco, M., Lucchino, B., Conti, F., Valesini, G., and Spinelli, F. R. (2018) Asymmetric dimethyl arginine as a biomarker of atherosclerosis in rheumatoid arthritis, *Mediat. Inflamm.*, **2018**, 3897295, doi: 10.1155/2018/3897295.
 50. Jung, C. H., Lee, W. J., Hwang, J. Y., Lee, M. J., Seol, S. M., et al. (2012) Vaspin increases nitric oxide bioavailability through the reduction of asymmetric dimethylarginine in vascular endothelial cells, *PLoS One*, **7**, e52346, doi: 10.1371/journal.pone.0052346.
 51. Watson, C. P., Pazarentzos, E., Fidanboyulu, M., Padilla, B., Brown, R., and Thomas, S. A. (2016) The transporter and permeability interactions of asymmetric dimethylarginine (ADMA) and L-arginine with the human blood-brain barrier *in vitro*, *Brain Res.*, **1648 (Pt A)**, 232-242, doi: 10.1016/j.brainres.2016.07.026.
 52. Yokoro, M., Minami, M., Okada, S., Yano, M., Otaki, N., Ikeda, H., and Fukuo, K. (2018) Urinary sodium-to-potassium ratio and serum asymmetric dimethylarginine levels in patients with type 2 diabetes, *Hypertens. Res.*, **41**, 913-922, doi: 10.1038/s41440-018-0098-1.
 53. Gać, P., Poręba, M., Jurdzia, M., Trzmielewska, E., Gocławska, K., et al. (2020) Cardiovascular risk factors and the concentration of asymmetric dimethylarginine, *Adv. Clin. Exp. Med.*, **29**, 63-70, doi: 10.17219/acem/111808.
 54. Hou, L., Guo, J., Xu, F., Weng, X., Yue, W., and Ge, J. (2018) Cardiomyocyte dimethylarginine dimethylaminohydrolase 1 attenuates left-ventricular remodeling after acute myocardial infarction: involvement in oxidative stress and apoptosis, *Basic Res. Cardiol.*, **113**, 28, doi: 10.1007/s00395-018-0685-y.
 55. Fulton, M. D., Brown, T., and Zheng, Y. G. (2019) The biological axis of protein arginine methylation and asymmetric dimethylarginine, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 3322, doi: 10.3390/ijms20133322.
 56. Wielkoszyński, T., Zalejska-Fiolka, J., Strzelczyk, J. K., Owczarek, A. J., Cholewka, A., Furmański, M., and Stanek, A. (2018) Oxysterols increase inflammation, lipid marker levels and reflect accelerated endothelial dysfunction in experimental animals, *Mediators Inflamm.*, **2018**, 2784701, doi: 10.1155/2018/2784701.
 57. Knipp, M., Braun, O., Gehrig, P. M., Sack, R., and Vasák, M. (2003) Zn(II)-free dimethylargininase-1 (DDAH-1) is inhibited upon specific Cys-S-nitrosylation, *J. Biol. Chem.*, **278**, 3410-3416.
 58. Bollenbach, A., and Tsikas, D. (2019) Pharmacological activation of dimethylarginine dimethylaminohydrolase (DDAH) activity by inorganic nitrate and DDAH inhibition by NG-hydroxy-L-arginine, N ω ,N ω -dimethyl-L-citrulline and N ω ,N ω -dimethyl-N δ -hydroxy-L-citrulline: results and overview, *Amino Acids*, **51**, 483-494, doi: 10.1007/s00726-018-2684-6.
 59. Morita, M., Hayashi, T., Ochiai, M., Maeda, M., Yamaguchi, T., Ina, K., and Kuzuya, M. (2014) Oral supplementation with a combination of L-citrulline and L-arginine rapidly increases plasma L-arginine concentration and enhances NO bioavailability, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **454**, 53-57, doi: 10.1016/j.bbrc.2014.10.029.
 60. Elms, S., Chen, F., Wang, Y., Qian, J., Askari, B., et al. (2013) Insights into the arginine paradox: evidence against the importance of subcellular location of arginase and eNOS, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **305**, H651-666, doi: 10.1152/ajpheart.00755.2012.
 61. Koo, B. H., Won, M. H., Kim, Y. M., and Ryoo, S. (2020) p32-dependent p38 MAPK Activation by arginase II downregulation contributes to endothelial nitric oxide synthase activation in HUVECs, *Cells*, **9**, 392, doi: 10.3390/cells9020392.

62. Rajapakse, A. G., Yepuri, G., Carvas, J. M., Stein, S., Matter, C. M., et al. (2011) Hyperactive S6K1 mediates oxidative stress and endothelial dysfunction in aging: inhibition by resveratrol, *PLoS One*, **6**, e19237, doi: 10.1371/journal.pone.0019237.
63. Morris, S. M., Jr. (2009) Recent advances in arginine metabolism: roles and regulation of the arginases, *Br. J. Pharmacol.*, **157**, 922-930, doi: 10.1111/j.1476-5381.2009.00278.x.
64. Chandra, S., Romero, M. J., Shatanawi, A., Alkilany, A. M., Caldwell, R. B., and Caldwell, R. W. (2012) Oxidative species increase arginase activity in endothelial cells through the RhoA/Rho kinase pathway, *Br. J. Pharmacol.*, **165**, 506-519, doi: 10.1111/j.1476-5381.2011.01584.x.
65. Ming, X. F., Barandier, C., Viswambharan, H., Kwak, B. R., Mach, F., et al. (2004) Thrombin stimulates human endothelial arginase enzymatic activity via RhoA/ROCK pathway: implications for atherosclerotic endothelial dysfunction, *Circulation*, **110**, 3708-3714, doi: 10.1161/01.CIR.0000142867.26182.32.
66. Morris, S. M., Jr., Kepka-Lenhart, D., and Chen, L. C. (1998) Differential regulation of arginases and inducible nitric oxide synthase in murine macrophage cells, *Am. J. Physiol.*, **275**, E740-747, doi: 10.1152/ajpendo.1998.275.5.E740.
67. Chandrasekharan, U. M., Wang, Z., Wu, Y., Tang, W., Hazen, S. L., Wang, S., and Husni, M. E. (2018) Elevated levels of plasma symmetric dimethylarginine and increased arginase activity as potential indicators of cardiovascular comorbidity in rheumatoid arthritis, *Arthritis Res. Ther.*, **20**, 123, doi: 10.1186/s13075-018-1616-x.
68. Liu, G. Y., and Sabatini, D. M. (2020) mTOR at the nexus of nutrition, growth, ageing and disease, *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.*, **21**, 183-203, doi: 10.1038/s41580-019-0199-y.
69. Jung, J. W., Kim, J. E., Kim, E., and Lee, J. W. (2020) Amino acid transporters as tetraspanin TM4SF5 binding partners, *Exp. Mol. Med.*, **52**, 7-14, doi: 10.1038/s12276-019-0363-7.
70. Scalise, M., Galluccio, M., Pochini, L., Cosco, J., Trotta, M., et al. (2019) Insights into the transport side of the human SLC38A9 transporter, *Biochim. Biophys. Acta Biomembr.*, **1861**, 1558-1567, doi: 10.1016/j.bbmem.2019.07.006.
71. Starikova, E. A., Lebedeva, A. M., Burova, L. A., and Freidlin, I. S. (2012) Regulation of endothelial cells functions by ultrasonic supernatant of *Streptococcus pyogenes*, *Tsitologiya*, **1**, 49-46.
72. Starikova, E. A., Sokolov, A. V., Vlasenko, A. Y., Burova, L. A., Freidlin, I. S., and Vasilyev, V. B. (2016) Biochemical and biological activity of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* M22, *Biochem. Cell Biol.*, **94**, 129-137, doi: 10.1139/bcb-2015-0069.
73. Starikova, E. A., Mammedova, J. T., Burova, L. A., Sokolov, A. V., Vasilyev, V. B., and Freidlin, I. S. (2017) Effect of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* on cytoskeleton structure and migration activity of human endothelial cells, *Meditsinskaya Immunologiya*, **19**, 521-528, doi: 10.15789/1563-0625-2017-5-521-528.
74. Mammedova, J. T., Starikova, E. A., Burova, L. A., Malashicheva, A. B., Semenova, D. S., and Freidlin, I. S. (2017) Effect of arginine deiminase from *Streptococcus pyogenes* on proliferation and migration of human umbilical vein endothelial cells, *Tsitokiny Vospaleniye*, **3**, 48-51.
75. Beloussow, K., Wang, L., Wu, J., Ann, D., and Shen, W. C. (2002) Recombinant arginine deiminase as a potential antiangiogenic agent, *Cancer Lett.*, **183**, 155-162, doi: 10.1016/S0304-3835(01)00793-5.
76. Donato, A. J., Machin, D. R., and Lesniewski, L. A. (2018) Mechanisms of dysfunction in the aging vasculature and role in age-related disease, *Circ. Res.*, **123**, 825-848, doi: 10.1161/CIRCRESAHA.118.312563.
77. Galvan, V., and Hart, M. J. (2016) Vascular mTOR-dependent mechanisms linking the control of aging to Alzheimer's disease, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 992-1007, doi: 10.1016/j.bbadis.2015.11.010.
78. Johnson, R. W., Kreis, H., Oberbauer, R., Brattstrom, C., Claesson, K., and Eris, J. (2001) Sirolimus allows early cyclosporine withdrawal in renal transplantation resulting in improved renal function and lower blood pressure, *Transplantation*, **72**, 777-786.
79. Lebranchu, Y., Thierry, A., Toupance, O., Westeel, P. F., Etienne, I., et al. (2009) Efficacy on renal function of early conversion from cyclosporine to sirolimus 3 months after renal transplantation: concept study, *Am. J. Transplant.*, **9**, 1115-1123.
80. Carrizzo, A., Puca, A., Damato, A., Marino, M., Franco, E., et al. (2013) Resveratrol improves vascular function in patients with hypertension and dyslipidemia by modulating NO metabolism, *Hypertension*, **62**, 359-366, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.111.01009.
81. Gordish, K. L., and Beierwaltes, W. H. (2014) Resveratrol induces acute endothelium-dependent renal vasodilation mediated through nitric oxide and reactive oxygen species scavenging, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **306**, F542-550.
82. Gholizadeh, S., Visweswaran, G. R. R., Storm, G., Hennink, W. E., Kamps, J. A. A. M., and Kok, R. J. (2018) E-selectin targeted immunoliposomes for rapamycin delivery to activated endothelial cells, *Int. J. Pharm.*, **548**, 759-770, doi: 10.1016/j.ijpharm.2017.10.027.
83. Mangiacapra, F., Conte, M., Demartini, C., Muller, O., Delrue, L., et al. (2016) Relationship of asymmetric dimethylarginine (ADMA) with extent and functional severity of coronary atherosclerosis, *Int. J. Cardiol.*, **220**, 629-633, doi: 10.1016/j.ijcard.2016.06.254.
84. Mahdi, A., Kövamees, O., and Pernow, J. (2020) Improvement in endothelial function in cardiovascular disease – Is arginase the target? *Int. J. Cardiol.*, **301**, 207-214, doi: 10.1016/j.ijcard.2019.11.004.
85. Montezano, A. C., and Touyz, R. M. (2012) Reactive oxygen species and endothelial function – role of nitric oxide synthase uncoupling and Nox family nicotinamide adenine dinucleotide phosphate oxidases, *Basic Clin. Pharmacol. Toxicol.*, **110**, 87-94, doi: 10.1111/j.1742-7843.2011.00785.x.
86. Kurdi, A., De Meyer, G. R., and Martinet, W. (2016) Potential therapeutic effects of mTOR inhibition in atherosclerosis, *Br. J. Clin. Pharmacol.*, **82**, 1267-1279, doi: 10.1111/bcp.12820.
87. Marchio, P., Guerra-Ojeda, S., Vila, J. M., Aldasoro, M., Victor, V. M., and Mauricio, M. D. (2019) Targeting early atherosclerosis: a focus on oxidative stress and inflammation, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2019**, 8563845, doi: 10.1155/2019/8563845.
88. Arlouskaya, Y., Sawicka, A., Głowala, M., Giebułtowicz, J., Korytowska, N., et al. (2019) Asymmetric Dimethylarginine (ADMA) and Symmetric Dimethylarginine (SDMA) concentrations in patients with obesity and the risk of Obstructive Sleep Apnea (OSA), *J. Clin. Med.*, **8**, 897, doi: 10.3390/jcm8060897.
89. Jia, G., Aroor, A. R., Martinez-Lemus, L. A., and Sowers, J. R. (2014) Overnutrition, mTOR signaling, and cardiovascular diseases, *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Compar. Physiol.*, **307**, R1198-R1206, doi: 10.1152/ajpregu.00262.2014.
90. Oguntibeju, O. O. (2019) Type 2 diabetes mellitus, oxidative stress and inflammation: examining the links, *Int. J. Physiol. Pathophysiol. Pharmacol.*, **11**, 45-63.

91. Daiber, A., Xia, N., Steven, S., Oelze, M., Hanf, A., et al. (2019) New therapeutic implications of endothelial Nitric Oxide Synthase (eNOS) function/dysfunction in cardiovascular disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 187, doi: 10.3390/ijms20010187.
92. Sandqvist, A., Schneede, J., Kylhammar, D., Henrohn, D., Lundgren, J., et al. (2018) Plasma L-arginine levels distinguish pulmonary arterial hypertension from left ventricular systolic dysfunction, *Heart Vessels*, **33**, 255-263, doi: 10.1007/s00380-017-1055-7.
93. Rabelo, L. A., Ferreira, F. O., Nunes-Souza, V., da Fonseca, L. J., and Goulart, M. O. (2015) Arginase as a critical prooxidant mediator in the binomial endothelial dysfunction-atherosclerosis, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, **2015**, 924860, doi: 10.1155/2015/924860.
94. D'Uscio, L. V. (2011) eNOS uncoupling in pulmonary hypertension. *Cardiovasc. Res.*, **92**, 359-360, doi: 10.1093/cvr/cvr270.
95. Kumar, V., Evans, L. C., Kurth, T., Yang, C., Wollner, C., et al. (2019) Therapeutic suppression of mTOR (Mammalian Target of Rapamycin) signaling prevents and reverses salt-induced hypertension and kidney injury in dahl salt-sensitive rats, *Hypertension*, **73**, 630-639, doi: 10.1161/HYPERTENSIONAHA.118.12378.
96. Bruno, R. M., Masi, S., Taddei, M., Taddei, S., and Virdis, A. (2018) Essential hypertension and functional microvascular ageing, *High Blood Press Cardiovasc. Prev.*, **25**, 35-40, doi: 10.1007/s40292-017-0245-9.
97. Incalza, M. A., D'Oria, R., Natalicchio, A., Perrini, S., Laviola, L., and Giorgino, F. (2018) Oxidative stress and reactive oxygen species in endothelial dysfunction associated with cardiovascular and metabolic diseases. *Vascul. Pharmacol.*, **100**, 1-19, doi: 10.1016/j.vph.2017.05.005.
98. McCabe, T. J., Fulton, D., Roman, L. J., and Sessa, W. C. (2000) Enhanced electron flux and reduced calmodulin dissociation may explain "calcium-independent" eNOS activation by phosphorylation, *J. Biol. Chem.*, **275**, 6123-6128.
99. Yepuri, G., Velagapudi, S., Xiong, Y., Rajapakse, A. G., Montani, J. P., et al. (2012) Positive crosstalk between arginase-II and S6K1 in vascular endothelial inflammation and aging, *Aging Cell*, **11**, 1005-1016, doi: 10.1111/acel.12001.
100. Grandvuillemin, I., Buffat, C., Boubred, F., Lamy, E., Fromonot, J., et al. (2018) Arginase upregulation and eNOS uncoupling contribute to impaired endothelium-dependent vasodilation in a rat model of intrauterine growth restriction. *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.*, **315**, R509-R520, doi: 10.1152/ajpregu.00354.2017.

THE MECHANISMS OF L-ARGININE METABOLISM DISORDER IN ENDOTHELIAL CELLS*

Review

J. T. Mammedova, A. V. Sokolov, I. S. Freidlin, and E. A. Starikova**

*Federal State Budgetary Scientific Institution "Institute of Experimental Medicine",
197376 Saint-Petersburg; e-mail: starickova@yandex.ru*

L-arginine is a key metabolite for nitric oxide production by endothelial cells, as well as signaling molecule of the mTOR signaling pathway. mTOR supports endothelial cells homeostasis and regulates activity of the L-arginine-metabolizing enzymes, endothelial nitric oxide synthase, and arginase II. Disruption of the L-arginine metabolism in endothelial cells leads to the development of endothelial dysfunction. Conflicting results of the use of L-arginine supplement to improve endothelial function reveals a controversial role of the amino acid in the endothelial cell biology. The review is aimed at analysis of the current data on the role of L-arginine metabolism in the development of endothelial dysfunction.

Keywords: L-arginine, endothelium, nitric oxide, eNOS, arginase, mTOR

ГЛЮКОКОРТИКОИДЫ В НЕЙРОВосПАЛЕНИИ ГИППОКАМПА: ДОКТОР ДЖЕКИЛЛ И МИСТЕР ХАЙД*

Обзор

© 2021 А.П. Большаков¹, Л.В. Третьякова¹, А.А. Квичанский¹, Н.В. Гуляева^{1,2**}

¹ *Институт Высшей Нервной Деятельности и Нейрофизиологии
Российской академии наук, 117485 Москва, Россия*

² *Научно-практический психоневрологический центр имени З.П. Соловьева,
115419 Москва, Россия; электронная почта: nata_gul@mail.ru*

Поступила в редакцию 09.08.2020

После доработки 13.10.2020

Принята к публикации 13.10.2020

Глюкокортикоиды (ГК) являются важным компонентом адаптивного ответа организма на стрессогенные стимулы, типичный стрессовый ответ сопровождается подъёмом уровня ГК в крови. Противовоспалительные эффекты глюкокортикоидов широко используются в клинической практике, в то время как провоспалительные, как полагают, лежат в основе нейродегенерации. Последнее является особенно критичным для гиппокампа — области мозга, регулирующей когнитивные функции и эмоции/аффективное поведение, при этом он селективно чувствителен к нейровоспалению и нейродегенерации. Гиппокамп считается главной мишенью для ГК, поскольку он обладает самой высокой плотностью рецепторов к глюкокортикоидам, что может лежать в основе высокой чувствительности гиппокампальных клеток к сильному стрессу. В данном обзоре мы проанализировали результаты исследований про- и противовоспалительных эффектов ГК в гиппокампе на различных моделях стресса и патологий, с ним связанных. Имеющиеся данные формируют сложную, хотя и достаточно феноменологическую картину модулирующей роли ГК в нейровоспалении гиппокампа. Понимание двойственной природы эффектов, опосредованных глюкокортикоидами, а также причин и механизмов переключения может предоставить нам эффективные подходы и инструменты для предотвращения нейровоспаления в гиппокампе и, как следствие, возможность предупреждать и лечить заболевания головного мозга, как неврологические, так и психиатрические. В рамках механистической точки зрения мы предлагаем новую гипотезу, описывающую, как противовоспалительные эффекты ГК могут трансформироваться в провоспалительные. Согласно ей, долговременный подъём уровня глюкокортикоидов или их предварительное воздействие запускает накопление белка FKBP51, который подавляет активность рецепторов ГК и активирует провоспалительные каскады, что в конечном итоге приводит к усилению нейровоспаления.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: глюкокортикоиды, стрессовый ответ, гиппокамп, нейровоспаление, цитокины, кортикостерон, FKBP51.

DOI: 10.31857/S0320972521020044

ВВЕДЕНИЕ

Гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковая (ГГН) ось является основной стресс-реактивной системой организма, обеспечивающей эф-

Принятые сокращения: АКТГ — адренкортикотропный гормон; ГГН — гипоталамо-гипофизарно-надпочечниковый; ГК — глюкокортикоид; ГР — глюкокортикоидный рецептор; IL — интерлейкин; КРГ — кортикотропин-рилизинг-гормон; ЛПС — липополисахарид; МР — минералокортикоидный рецептор; TNF- α — фактор некроза опухоли α ; МСАО — окклюзия средней мозговой артерии; NF- κ B — ядерный фактор каппа В.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», ВМ20-260, 04.01.2021.

** Адресат для корреспонденции.

фективную адаптацию к условиям окружающей среды при воздействии физических или психосоциальных стрессогенных факторов. ГГН ось представляет собой комплекс положительных и отрицательных обратных связей между головным мозгом и эндокринной системой, в частности, гипоталамусом, передней долей гипофиза и надпочечниками. Паравентрикулярное ядро гипоталамуса содержит нейроэндокринные клетки, активируемые при стрессе и ответственные за синтез и высвобождение кортикотропин-рилизинг-гормона (КРГ), распознаваемого передней долей гипофиза. КРГ стимулирует секрецию адренкортикотропного гормона (АКТГ) из гипофиза в кровь. АКТГ, в свою очередь, транспортируется кровью к надпочечникам, где запускает синтез глюкокортикоидов

(ГК) корой надпочечников и их высвобождение в кровоток. Таким образом, ГК, гормоны семейства кортикостероидов, являются мессенджерами ГГН оси, её эффекторными молекулами. Кортизол является наиболее функционально активным ГК у человека, а кортикостерон — у грызунов [1]. ГГН-система включает в себя несколько отрицательных обратных связей, активация которых приводит к подавлению её активности. Кортизол/кортикостерон, вырабатываемый корой надпочечников, ингибирует как гипоталамус, так и гипофиз, снижая синтез КРГ и АКТГ, что, в свою очередь, приводит к снижению продукции ГК. Такие отрицательные обратные связи подавляют или завершают адаптационный ответ, индуцированный стрессовыми факторами. В данном обзоре мы проанализируем роль ГК в регуляции нейровоспаления, связанного со стрессом. Учитывая, что большинство экспериментальных данных было получено на грызунах, в основном речь будет идти о кортикостероне.

Считается, что помимо участия в развитии стрессового ответа, глюкокортикоиды являются также модуляторами воспаления. Воспаление — типичный ответ ткани на повреждение или инфекцию, целью которого является устранение провоспалительных факторов и/или репарация поражённой ткани. Нейровоспаление — специфическая реакция нервной системы, которая включает в себя следующие клеточные и молекулярные элементы: (а) изменение формы и паттернов экспрессии генов микроглии; (б) активация синтеза цитокинов (интерлейкинов IL-1 β , IL-6, фактора некроза опухоли TNF- α) и других паракринных воспалительных медиаторов (простагландинов, активных форм азота и кислорода); (в) привлечение клеток иммунной системы из периферического кровообращения, возможное благодаря изменению функционирования гематоэнцефалического барьера. Нейровоспалительная реакция может запускаться различными внутренними и внешними патологическими стимулами, такими как травмы, инфекции, токсические вещества и др. Однако ограниченное и контролируемое локальное нейровоспаление важно для оптимальной нейропластичности, включая нейрогенез и функционирование синапсов [2]. Это может быть исключительно важным в отношении гиппокампа — ключевой лимбической структуры, участвующей как в когнитивных, так и в эмоциональных процессах и являющейся наиболее чувствительной к стрессу. Общепринято, что неконтролируемый нейровоспалительный процесс в гиппокампе — это одно из ключевых звеньев психиатрических и неврологических заболеваний, таких

как расстройства депрессивного спектра, эпилепсия, а также постинсультные и посттравматические аффективные и когнитивные нарушения [3]. Главная гипотеза, которая объясняет развитие неконтролируемого нейровоспаления именно в гиппокампе, заключается в том, что исключительно высокая плотность рецепторов к глюкокортикоидам в клетках гиппокампа делает эту часть мозга особенно чувствительной к индуцированным стрессом изменениям уровня глюкокортикоидов, которые в зависимости от условий могут индуцировать в гиппокампе как про-, так и противовоспалительные эффекты. Экспериментальные данные, на основе которых формируются современные представления о механизмах кортикостерон-зависимой регуляции нейровоспалительных процессов, крайне противоречивы. Эти расхождения определяют необходимость систематизации и анализа информации о ГК-зависимых механизмах, модулирующих нейровоспалительные процессы в гиппокампе.

ГЛЮКОКОРТИКОИДНЫЕ РЕЦЕПТОРЫ

Глюкокортикоидный (ГР) и минералокортикоидный (МР) рецепторы — два основных типа рецепторов, связывающих кортизол/кортикостерон, они принадлежат к подсемейству 3 ядерных рецепторов группы С (NR3C). ГР кодируется геном *NR3C1*, а МР — геном *NR3C2*. У глюкокортикоидного рецептора существует две изоформы — активная (ГР α) и неактивная (ГР β). Экспрессия изоформы ГР β может повышаться в ответ на действие провоспалительных цитокинов, приводя к снижению чувствительности к ГК, лежащей в основе феномена глюкокортикоидной резистентности [4]. Следовательно, ответ клеток на ГК зависит от баланса между двумя изоформами и может играть важную роль в формировании клеточного ответа на подъём уровня глюкокортикоидов. Важно, что связывание кортикостерона с ГР не обязательно приводит к активации ГР. Было показано, что шапероны Hsp70 и Hsp90 связаны с ГР, при этом они либо инактивируют, либо активируют ГР [5, 6]. Белок FKBP51, кодируемый геном *FKBP51*, взаимодействует с комплексом ГР–Hsp90, снижая его аффинность к ГК [7]. Экспрессия FKBP51 является ГР-зависимой, и временная активация ГР может увеличивать уровень FKBP51. Связывание FKBP51 с ГР впоследствии подавляет ГР-зависимый ответ путем ингибирования транслокации комплекса ГР–белок в ядро или снижения аффинности комплекса ГР–Hsp90 к ГК [8]. Более детально особенности взаимодей-

ствия между ГР и FKBP51, а также факторы, влияющие на эти взаимодействия, описаны в обзорах [9–11]. Именно в связи с тем, что FKBP51 может выступать в качестве регулятора функции ГР, этот белок стали активно исследовать в связи с его потенциальной вовлеченностью в механизмы депрессии и посттравматического стрессового расстройства (ПТСР). Кроме того, было показано, что FKBP51 экспрессируется в нейронах гиппокампа, и его экспрессия может усиливаться вследствие стресса [12–14], а также после инъекции дексаметазона (10 мг/кг) [12], что может быть обусловлено снижением метилирования промотора гена *Fkbp5* [15]. Далее мы покажем, что FKBP51-опосредованное подавление функции ГР может быть хорошим кандидатом для объяснения кортикостерон-индуцированного прайминга нейровоспаления.

Глюкокортикоиды, помимо связывания с ГР, взаимодействуют с МР с более высокой аффинностью. Изоформы и транскрипционные варианты минералокортикоидного рецептора не полностью изучены, однако у человека и крысы было обнаружено 2 сплайс-варианта МР [16]. Функциональная значимость этих транскриптов МР и их экспрессии в различных частях мозга до сих пор неясны. Как и ГР, МР может связывать кортикостерон, однако аффинность кортикостерона к МР в несколько раз выше, чем к ГР [17]. Содержание этих рецепторов в различных структурах мозга неодинаково: изначально МР был обнаружен преимущественно в лимбических зонах, в частности, в гиппокампе, однако последующие исследования по секвенированию РНК единичных клеток показали, что большинство клеток мозга содержат мРНК МР [18–20]. Единственным исключением является микроглия, которая не экспрессирует МР. В отличие от МР, ГР обильно представлены во всём мозге, во всех областях и исследованных типах клеток.

ГР взаимодействуют с эндогенными ГК, такими как кортикостерон или кортизол, или с синтетическими аналогами ГК (дексаметазон, преднизолон и др.). ГР локализован в цитоплазме в виде мономера в комплексе с белками теплового шока. Связывание лиганда с рецептором запускает конформационные изменения в рецепторе, приводящие к формированию гомодимерного комплекса и его транслокации из цитоплазмы в ядро. Там активированный ГР связывается с элементами ответа на глюкокортикоиды (glucocorticoid response elements, GREs) и негативными GREs, обладающими палиндромной структурой. Субъединицы гомодимерного комплекса взаимодействуют с половиной их последовательности, обеспечивая высо-

кую степень связывания димера ГР. Глюкокортикоидный рецептор, связанный с ДНК, запускает сборку транскрипционных регуляторных комплексов, выступающих в роли коактиваторов или корепрессоров транскрипции [21]. Активация МР стимулирует схожие механизмы: после связывания с агонистом они формируют белковые комплексы, которые при попадании в ядро взаимодействуют с элементами ответа на гормоны (hormone response elements, HREs) и регулируют экспрессию генов. Индуцированный стрессом подъём уровня кортикостерона приводит к активации МР и ГР и накоплению этих рецепторов в ядрах клеток мозга стрессированных животных [22]. Стоит отметить, что время накопления в ядре ГР и МР после острого стресса различается между областями мозга: быстрое (в течение 10 мин) накопление МР наблюдается в префронтальной коре, а ГР – в ядрах клеток дорсального гиппокампа. Отсроченный (через 1 ч) подъём уровня МР наблюдался в обеих частях гиппокампа, в то время как уровень ГР повышался уже через 10 мин после стресса и держался высоким в течение минимум 1 ч в дорсальном гиппокампе, оставаясь на базовом уровне в вентральном гиппокампе. Во фронтальной коре наблюдалось накопление ГР только через 1 ч. Важно, что уровень кортикостерона в крови оставался высоким в течение 60 мин после 30-минутного стресса, вызванного пребыванием на приподнятой платформе [22]. На основе этих данных можно сделать несколько важных выводов. Во-первых, транслокация МР и ГР в ядро не повторяет точно динамику уровня кортикостерона в крови, а зависит от некоторых дополнительных факторов, таких как локальная концентрация кортикостерона и модификации МР и ГР. Во-вторых, механизмы, регулирующие уровень активации МР и ГР, зависят от области мозга [23], что позволяет предположить, что баланс между про- и противовоспалительной активностью ГК также может варьировать в зависимости от структуры мозга. В-третьих, стресс индуцирует долговременные изменения активности как МР, так и ГР, препятствуя точному прогнозированию локального паттерна экспрессии генов после стресса.

Касательно модификаций МР, была обнаружена их мембранная форма, опосредующая быстрые негеномные эффекты [24]. Впервые данные рецепторы были найдены в пирамидных нейронах гиппокампа. Позже было показано, что кратковременная активация МР альдостероном усиливает долговременную потенциацию в вентральном, но не в дорсальном гиппокампе [25]. До сих пор не вполне ясно, присутствуют

ли мембранные МР в других типах клеток ЦНС, кроме нейронов.

Остается также неизвестным, могут ли МР, экспрессируемые клетками головного мозга, участвовать в регуляции нейровоспаления. Насколько нам известно, на настоящий момент нет работ, в которых была бы прямо изучена роль этих рецепторов. Наиболее исследована роль МР в регуляции нейровоспаления при артериальной гипертензии и вызванных ей инсультах. Известно, что при артериальной гипертензии наблюдают ассоциированность нейровоспаления с активацией МР. У крыс со спонтанной гипертензией наблюдают повышенный уровень экспрессии МР и нейровоспаления в гиппокампе [26]. В то же время известно, что развитие воспаления у таких крыс опосредуется МР эндотелия сосудов, которые могут быть активированы альдостероном [27]. Можно предположить, что в данной модели нейровоспаление праймируется чувствительным к альдостерону эндотелием сосудов, а не клетками ЦНС, при этом увеличение экспрессии МР является следствием уже развившегося нейровоспаления. Эта гипотеза подтверждается работой *Vay-Richter et al.*, в которой показано, что системное введение альдостерона облегчает развитие нейровоспаления во фронтальной коре после системного введения бактериального липополисахарида [28]. Данный агонист МР не активен в этом отделе мозга [29], но может активировать МР в клетках эндотелия или на периферии. Предполагают, что защитная роль спиронолактона при инсультах обусловлена его действием на стенки сосудов и предотвращением миграции клеток иммунной системы в перенхиму ЦНС [30].

На нескольких мышинных моделях поражения мозга было обнаружено, что нарушение функционирования МР, в том числе в клетках иммунной системы вне мозга, оказывает защитный эффект. Показано, что нокаут МР в *LysM*-положительных клетках (миелоидного ряда) приводит к уменьшению размера зоны инфаркта и снижению интенсивности нейровоспаления в модели окклюзии среднемозговой артерии (МСаО) [31]. Микроглия является основной популяцией клеток мозга здоровых мышей, которая может быть затронута последствием данного нокаута, но микроглиоциты в мозге взрослых мышей не экспрессируют МР [20]. *Montes-Cobos et al.* показали, что аналогичный нокаут облегчает течение экспериментального аутоиммунного энцефалита у мышей. В этой же работе было показано, что данный эффект может быть не специфичен для тканей ЦНС, поскольку у таких мышей была нарушена функцио-

нальность всей иммунной системы [32]. Таким образом, в настоящее время в литературе не представлено данных, позволяющих однозначно утверждать, что МР, экспрессируемые клетками ЦНС, регулируют процессы нейровоспаления.

Также следует отметить, что ГК секретируются отдельными пиками, формируя ультрадианный ритм. У крыс существует приблизительно часовой цикл выброса кортикостерона, регулируемый активацией или ингибированием ГН оси. Сигнальная трансдукция в ответ на пики выброса кортикостерона зависит от динамического взаимодействия с ГР и МР [33]. Считается, что эффекты низких базальных концентраций эндогенных ГК опосредованы МР ввиду их более высокой аффинности. Низкоаффинные глюкокортикоидные рецепторы играют ключевую роль при высоких концентрациях эндогенных ГК (при стрессе или дневных пиках выброса) [34]. Похоже, что оптимальная функция ГК реализуется при их средних концентрациях, в то время как гипер- и гипосекреция приводит к негативным последствиям [35]. Типичным клиническим примером гиперсекреции ГК, приводящим к различным патологиям, является синдром Кушинга [36]. Это заболевание часто ассоциировано с психопатологией, причем спектр наблюдаемых у пациентов расстройств поведения охватывает патологии от тяжелой депрессии до мании [37]. Важно, что длительный подъем уровня ГК может вызывать сниженную чувствительность или резистентность рецепторов к ГК [38]. Таким образом, ГК-резистентность может быть вызвана нарушениями на различных уровнях сигнального каскада ГК: нарушение экспрессии ГР, связывания ГК с их рецептором, транслокации в ядро и кофакторной активности ГК [39]. Поскольку одним из основных эффектов ГК является подавление воспаления, развитие ГК-резистентности может приводить к усилению провоспалительного ответа.

ПРОТИВОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ

Известно, что на периферии ГК выступают в качестве противовоспалительных агентов. В большинстве случаев активация ГР и МР приводит к ингибированию активности иммунных клеток и индукции апоптоза в лимфоцитах [40]. Однако среди иммунных клеток субпопуляция лимфоцитов Th17 демонстрирует значительно большую резистентность к индуцированному глюкокортикоидами апоптозу [41]. Известно,

что эта субпопуляция лимфоцитов ответственна, в частности, за хронические воспалительные заболевания дыхательных путей [42]. В экспериментах на культурах было показано, что субпопуляция Т-супрессоров может быть значительно более чувствительной к подавляющему эффекту низких концентраций ГК, чем субпопуляция Т-хелперов (включая Th17) и Т-киллеров, а также В-клеток. Таким образом, при относительно низких концентрациях глюкокортикоиды обладают скорее иммуностимулирующим (провоспалительным) эффектом, сдвигая соотношение Т-хелпер/Т-супрессор в сторону преимущественно Т-хелперной активности. При более высоких концентрациях ГК могут иметь иммуносупрессивный эффект, причем выраженность иммуносупрессии прямо пропорциональна концентрации ГК в крови и почти линейно растёт до уровней, в 100 раз превышающих физиологический [43]. Помимо модуляции активности лимфоцитов, ГК могут ингибировать воспаление несколькими другими способами: (1) ГК ингибируют инфильтрацию иммунных клеток из крови в ткани за счёт супрессии их хемотаксиса [44]; (2) ГК ингибируют экспрессию генов цитокинов [45]; (3) ГК ингибируют экспрессию молекул адгезии [46]; (4) ГК ингибируют различные функции лейкоцитов, связанные с воспалением (эпителиальная адгезия, миграция, хемотаксис, фагоцитоз, респираторный взрыв и др.) [47]; (5) ГК подавляют экспрессию фосфолипазы А2 [48]; (6) ГК ингибируют синтез простагландинов на уровне циклооксигеназы/простагландин Е-изомеразы (цикло-оксигеназа-1 и -2) [49]; (7) ГК индуцируют экспрессию ангиотензин-превращающего фермента и эндотелина, сенсibiliзируют эпителиальные клетки к вазоконстрикторам и ингибируют продукцию вазодилаторов, что приводит к снижению притока крови к области воспаления [50].

Большинство долговременных противовоспалительных эффектов ГК может быть результатом негативного регуляторного механизма, называемого трансрепрессией: ГР, связанный с лигандом, встраивается в хроматин за счёт белок-белковых взаимодействий с ДНК-связывающими транскрипционными факторами, в первую очередь с ядерным фактором NF-κB и активирующим белком-1 (AP1), который является комплексом белков c-Fos и c-Jun. Глюкокортикоидный рецептор напрямую связывает Jun-субъединицу AP1 и p65-субъединицу NF-κB, препятствуя транскрипционной активации этих двух белков [51]. В конечном счёте это приводит к супрессии синтеза провоспалительных цитокинов.

Помимо вышеперечисленных механизмов, существуют и другие пути косвенного воздействия ГК на воспаление. Подъём ГК увеличивает уровень эндоканнабиноидов [52], которые, как известно, оказывают сложное влияние на воспаление. Во-первых, повышение уровня эндоканнабиноидов приводит к подавлению активации ГН оси и выброса ГК. Во-вторых, эндоканнабиноиды индуцируют прямые противовоспалительные эффекты, как зависимые, так и не зависимые от активации их рецепторов. В то же время эндоканнабиноиды, подавляя высвобождение определенного набора провоспалительных цитокинов (TNF-α, IL-1β), могут одновременно активировать высвобождение про- (IL-6) и противовоспалительных (IL-10) цитокинов [53]. Следовательно, повышение уровня ГК не только запускает прямое противовоспалительное действие, но и активирует систему эндоканнабиноидов, которая также помогает контролировать воспалительный ответ и подавлять острое воспаление.

Противовоспалительное действие ГК было подтверждено рядом исследований. В большинстве этих работ системный воспалительный ответ был индуцирован инъекцией бактериального липополисахарида (ЛПС). Индуцированная ЛПС продукция простагландинов в зубчатой извилине у крыс подавляется кортикостероном, высвобождаемым в ответ на ЛПС [54]. Этот результат подтверждает предшествующие исследования относительно противовоспалительной роли ГК после инъекции ЛПС. Острый иммобилизационный стресс сразу после системного введения ЛПС приводил к подавлению индуцированного ЛПС воспалительного ответа через 1–2 ч как на периферии, так и в головном мозге [55]. У адrenaлэктомированных мышей индуцированное ЛПС повышение экспрессии генов и концентрации провоспалительных цитокинов через 2–4 ч было сильнее как в периферических тканях, так и в мозге, по сравнению с ложно оперированными мышами [56]. Данные результаты говорят о том, что эндогенные ГК регулируют компоненты ответа организма на воспаление посредством ингибирования экспрессии цитокинов в периферических органах и в мозге при остром и кратковременном воздействии. Глюкокортикоиды также подавляют провоспалительный ответ на ЛПС как в периферических макрофагах, так и в микроглии, при их введении после системного действия ЛПС [57]. Противовоспалительный ответ наблюдался и после длительного (36 ч) воздействия на крыс чрезвычайно высокой дозы кортикостерона (100 мг/пеллетка, п/к). В этом исследовании кортикостерон подавлял экспрессию мРНК IL-1β и IL-1α в гипо-

таламусе и гиппокампе, однако экспрессия TNF- α в этих структурах оставалась неизменной. Эти противовоспалительные изменения парадоксальным образом сопровождалось подъемом мРНК IL-6 и в гипоталамусе, и в гиппокампе [58]. Причины несоответствия между влиянием кортикостерона на цитокины на уровне мРНК и белка до сих пор остаются неясными.

ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНОЕ ДЕЙСТВИЕ ГЛЮКОКОРТИКОИДОВ

Провоспалительные эффекты ГК были описаны в некоторых экспериментальных моделях с дискретным и хроническим применением ГК перед воздействием, запускающим воспаление. Дискретное системное введение экзогенного кортикостерона приводило к провоспалительному ответу на применение ЛПС как в периферических макрофагах печени, так и в клетках микроглии гиппокампа, если инъекция кортикостерона предшествовала (за 2 или 24 ч) введению ЛПС [57]. Гиппокампальные клетки были праймированы кортикостероном, поскольку индуцированное ЛПС увеличение экспрессии мРНК и белка TNF- α , IL-1 β и IL-6 было в таких условиях значительно выше [57]. Прайминг микроглии гиппокампа может быть индуцирован острым стрессом [59]. В микроглии, изолированной из мозга крыс через 24 ч после начала воздействия острого неизбежного стресса, был зафиксирован более сильный провоспалительный цитокиновый ответ (например, повышенная экспрессия IL-1 β) к ЛПС; при этом предварительная обработка антагонистом ГК-рецептора мифепристоном, или адреналектомия, устраняла сенсibilизацию микроглии. Таким образом, провоспалительный ответ (IL-1 β , IL-6, NF- κ B α) микроглии на иммунологические изменения, аналогично с периферическими макрофагами, может быть сенсibilизирован глюкокортикоидами, индуцированными стрессом. Прайминг нейровоспалительного ответа также наблюдался в экспериментах с локальным введением ЛПС после стресса. Внутригиппокампальная инъекция ЛПС стрессированным животным увеличивала количество реактивных клеток микроглии, а также экспрессию мРНК IL-1 β и TNF- α [60]. Согласно описанным результатам, предварительный подъем ГК приводит к преобразованию системы воспаления, действуя в качестве эндогенного сигнала опасности и подготавливая организм к дальнейшим иммунологическим угрозам.

В большинстве исследований, обсуждаемых в данном обзоре, часто анализировали только уровни ряда провоспалительных цитокинов в гиппокампе, несмотря на тот факт, что индуцированное глюкокортикоидами повышение уровня цитокинов могло быть связано со снижением экспрессии рецепторов данных цитокинов. Было показано, что подъем концентрации ГК в сыворотке крови, индуцированный иммобилизационным стрессом или терапией дексаметазоном (кратко- или долговременной), не меняет плотность рецепторов IL-1 в гиппокампе мыши в покое или после периферической инъекции ЛПС [61]. Важно, что IL-1 и IL-6 также не влияли на экспрессию глюкокортикоидных и минералокортикоидных рецепторов. В то же время экспрессия гиппокампальных ГР была значительно снижена после инъекции TNF- α [62]. Взятые вместе, эти результаты говорят о том, что уровни рецептора IL-1 в гиппокампе относительно резистентны к модулированию циркулирующими ГК, в то время как TNF- α значительно влияет на активность ГН оси в ходе иммунных/воспалительных процессов.

Признаки нейровоспаления часто наблюдаются в двух качественно разных длительных или хронических патологических состояниях. Первая группа включает состояния, не связанные с повреждением мозга, например, депрессию или инфекцию, моделированную введением ЛПС. Вторая группа ассоциирована с повреждением мозга и последующей нейродегенерацией (инсульт, черепно-мозговая травма, судороги). Важное отличие этих двух ситуаций друг от друга заключается в том, что гибель клеток, индуцированная повреждением мозга, вызывает высвобождение соответствующих молекул, которые активируют и поддерживают воспалительные каскады.

О нейровоспалении как следствии хронического стресса сообщалось несколькими научными группами, однако роль ГК в нем до сих пор является спорным вопросом. Хорошо известна позитивная корреляция между развитием нейровоспаления при депрессивных состояниях и увеличением концентрации ГК в крови пациентов с депрессивными расстройствами, а также в мозге животных в моделях депрессии [63]. Системное введение дексаметазона в течение 21 дня индуцировало депрессивноподобное поведение и глюкокортикоидную резистентность у мышей. В этом случае гиперактивация ГР приводила к понижению уровня кортикостерона, что сопровождалось снижением экспрессии мРНК ГР в гиппокампе, стриатуме и префронтальной коре, а также повышением экспрессии

FKBP51, подавляющей функциональную активность ГР [64]. Стоит отметить, что дексаметазон имеет более высокую аффинность к ГР по сравнению с кортикостероном, однако в большинстве исследований он используется в аналогичном с кортикостероном диапазоне концентраций (1–10 мг/кг) [65, 66]. Поэтому логично ожидать, что длительное лечение дексаметазоном в таких концентрациях может вызвать чрезмерную активацию опосредованного ГР-сигналинга и индуцировать глюкокортикоидную резистентность. Последняя может послужить пусковым фактором, усиливающим воспалительный ответ ввиду затухания иммуносупрессивных каскадов, связанных с ГР. К сожалению, дозозависимые эффекты дексаметазона на нейровоспаление исследуются не систематически, делая ненадежными результаты интерпретации данных, полученных при использовании дексаметазона.

Как острый, так и хронический тяжелый стресс приводили к накоплению кортикостерона в гиппокампе крыс, которое сопровождалось повышением экспрессии мРНК IL-1 β [23]. Более мягкий хронический непредсказуемый стресс также вызывал повышение экспрессии мРНК IL-1 β в гиппокампе крыс [67]. Эти исследования хотя и подтверждают участие ГК в развитии стрессового ответа при данных условиях, являются феноменологическими в отношении выявления прямой механистической взаимосвязи между подъёмом кортикостерона и усилением синтеза провоспалительных цитокинов в гиппокампе.

Попытка раскрыть взаимосвязь между системой ГК и нейровоспалением была совершена исследовательской группой, возглавляемой Sapolsky [68, 69]. Авторы использовали системное введение ЛПС после хронического стресса, чтобы оценить роль ГК в регуляции экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1 β и TNF- α . Как и ожидалось, у крыс, не подвергнутых стрессовому воздействию, ЛПС вызывал повышение уровня этих цитокинов в гиппокампе, а блокирование ГР мифепристоном потенцировало этот эффект. Однако у крыс, подвергнутых стрессу, мифепристон оказывал противоположный эффект, ослабляя индуцированный липополисахаридом подъём уровня цитокинов. Эти факты явно говорят о том, что у хронически стрессированных животных активность ГК-системы является провоспалительной [68]. Позже авторы расширили свои выводы и подвергли дальнейшему анализу взаимосвязь между хроническим подъёмом уровня кортикостерона и ответом на ЛПС [69]. В указанном исследовании уровень кортикостерона в крови адреналэкто-

мированных животных постоянно поддерживался на трёх разных уровнях: базальном, умеренно повышенном и высоком благодаря имплантации пеллеток, высвобождающих кортикостерон. Ожидалось, что во время эксперимента с ЛПС поддержание низкого базального уровня кортикостерона должно быть ассоциировано с усиленным нейровоспалением ввиду отсутствия подавляющего эффекта кортикостерона. Однако экспрессия провоспалительных цитокинов (IL-1 β и TNF- α) не отличалась от наблюдаемой у интактных животных, подвергнутых действию ЛПС. Парадоксально то, что хронически умеренный подъём кортикостерона усиливал индуцированный липополисахаридом воспалительный ответ в гиппокампе по сравнению с интактными животными, а хронически высокий уровень кортикостерона не оказывал эффекта на воспалительный ответ, индуцированный ЛПС.

Сдвиг в сторону провоспалительного действия глюкокортикоидов был также описан в работе Frank et al. (2014) [70]. Чтобы точно контролировать уровень кортикостерона, крысам была проведена адреналэктомия, после чего в питьевую воду добавляли различные концентрации кортикостерона. Обращает на себя внимание то, что «высокая» концентрация кортикостерона в данном исследовании соответствовала «умеренной» концентрации в исследовании, проведённом Munhoz et al. (2010) [69]. Добавление высоких доз кортикостерона усиливало экспрессию генов, ассоциированных с воспалением (*Iba1*, *Nlrp3*, комплекс генов MHC II) в гиппокампе. Более того, в гиппокампальной микроглии, выделенной из мозга крыс, подвергнутых воздействию высоких доз кортикостерона, была зафиксирована повышенная экспрессия провоспалительных цитокинов (IL-1 β , IL-6, TNF- α) и компонента инфламмосомы (NLRP3) в ответ на действие высокой дозы ЛПС [70].

Анализ эффектов ГК на животных моделях патологий, не ассоциированных с непосредственным повреждением мозга, наводит на мысль о том, что высокие уровни кортикостерона, наблюдаемые после действия стресса или введения ЛПС, могут приводить к трансформации действия ГК в сторону провоспалительного. Это говорит о том, что провоспалительный ответ может иметь другие контуры регуляции помимо ГК, и что длительное умеренное повышение кортикостерона может некоторым образом усилить воспалительный ответ. Примечательно, что длительное воздействие высоких доз кортикостерона не оказывало провоспалительного эффекта, из чего можно предположить су-

ществование «провоспалительного диапазона» концентраций кортикостерона.

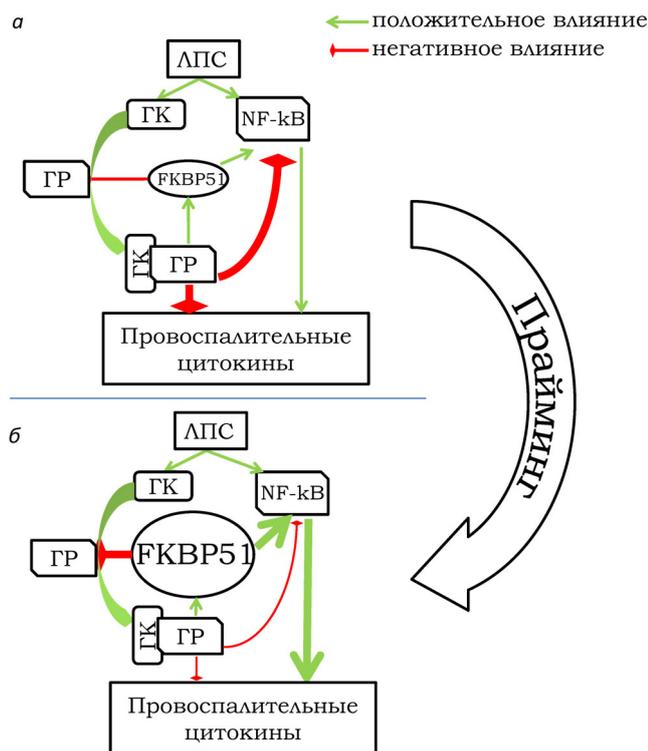
Провоспалительное действие ГК также было обнаружено в животных моделях патологий мозга, ассоциированных с прямыми повреждениями нервной ткани. Показано, что эндогенные ГК усиливают разрушение гиппокампа и запускают развитие нейровоспаления после инъекции каината. Dinkel et al. [71] обнаружили, что инъекция каината крысам с хронически повышенным уровнем кортикостерона запускала накопление клеток, способствующих развитию воспаления (гранулоцитов, моноцитов/макрофагов, микроглии) в гиппокампе. Воспалительный ответ в гиппокампе, который оценивали по уровню цитокинов IL-1 β и TNF- α , также был усилен у крыс с хронически высоким профилем ГК [71]. Дальнейший анализ эффектов ГК на индуцированный каинатом воспалительный ответ показал, что хронически высокий уровень кортикостерона увеличивал экспрессию IL-1 β [72] и ускорял накопление провоспалительного цитокина CCL2 [73] в гиппокампе. В модели эпилепсии, индуцированной литий-пилокарпином, две инъекции дексаметазона через 24 и 36 ч после эпилептического статуса подавляли нейровоспалительный ответ в гиппокампе [74]. Вероятно, чрезвычайно высокая доза дексаметазона, использованная в данном исследовании, смогла преодолеть ожидаемый провоспалительный эффект, показанный для кортикостерона в работе Munhoz et al. (2010) [69].

Индуцированный стрессом рост концентрации кортикостерона зависит от типа повреждения мозга. Так, окклюзия средней мозговой артерии может индуцировать более высокий уровень кортикостерона по сравнению с повреждением, вызванным каинатом [75]. Фокальное ишемическое повреждение неокортекса в модели МСАО запускало накопление кортикостерона и IL-1 β в гиппокампе, с большей выраженностью эффекта в вентральном гиппокампе [76]. Неонатальный провоспалительный стресс (введение ЛПС крысам) приводил к накоплению кортикостерона и IL-6 в гиппокампе половозрелых животных, в то время как IL-1 β оставался в нормальном диапазоне [77]. Однако до сих пор механизмы ГК-зависимого накопления цитокинов в гиппокампе в вышеупомянутых моделях остаются неясными. Основываясь на экспериментальных данных о провоспалительном эффекте ГК при определенных условиях, была выдвинута гипотеза о том, что отсроченное повреждение гиппокампа после МСАО может быть результатом провоспалительного действия ГК, связывающихся со своими рецепторами в гиппокампе [3, 78].

КАК ГЛЮКОКОРТИКОИДЫ СТАНОВЯТСЯ ПРОВОСПАЛИТЕЛЬНЫМИ: ГИПОТЕЗА

Выше мы упоминали, что активация ГР приводит к усилению экспрессии FKBP51, подавляющего транслокацию ГР в ядро и снижающего аффинность ГР к ГК. Белок FKBP51 обеспечивает отрицательную обратную связь в ГК-зависимых процессах. Индуцированная глюкокортикоидами активация ГР уже через 1,5 ч приводит к повышению экспрессии FKBP51 и отмене опосредованного ГР-подавления провоспалительного ответа [7]. Более того, FKBP51 косвенно потенцирует сигнальный каскад NF- κ B за счет взаимодействия с несколькими белками этого каскада, тем самым усиливая провоспалительный ответ [8]; детальные механизмы этого эффекта до сих пор исследуются [9]. Это означает, что различные факторы, запускающие воспаление, вызовут более сильный провоспалительный ответ при их применении в условиях повышенного уровня FKBP51. Таким образом, можно выдвинуть гипотезу о том, что развитие провоспалительного эффекта ГК сильно зависит от накопления FKBP51 в клетках: более высокий уровень FKBP51 будет ассоциирован с более выраженным провоспалительным действием ГК.

Вышеприведенное объяснение особенностей FKBP51 предполагает, что эффект ГК сильно зависит от их дозы и момента применения относительно фактора, индуцирующего воспаление. Мы рассмотрим некоторые варианты действия ГК и фактора, запускающего воспаление (для простоты мы используем ЛПС в качестве универсального провоспалительного стимула): (1) применение ЛПС после введения ГК; (2) введение ГК с последующим применением ЛПС через несколько часов (2–24 ч); (3) применение ЛПС во время хронического подъема уровня ГК. В первом случае ЛПС индуцирует подъем кортикостерона, оказывая противовоспалительное действие [68] (рисунок, *a*). В то же время это повышение кортикостерона должно вызывать медленное накопление FKBP51, которое в конечном итоге (спустя >1,5 ч) должно устранить опосредованное кортикостероном подавление воспаления ввиду снижения аффинности ГР к ГК. Добавление экзогенного ГК в данной ситуации будет иметь противовоспалительный эффект, т.к. это поможет преодолеть низкую аффинность ГР, индуцированную FKBP51. Второй случай – это ситуация так называемого прайминга [57], когда предварительная терапия ГК усиливает провоспалительный ответ, возникающий после инъекции ЛПС. Наиболее вероятная последовательность событий следующая: (1) ГК вызывают подавление про-



Гипотетическая схема прайминга провоспалительного ответа при действии ГК. *a* – Типичное противовоспалительное действие ГК в ответ на применение ЛПС: подъем ГК ведет к активации ГР и подавлению активности NF-κВ и других путей, запускающих экспрессию провоспалительных цитокинов; *б* – прайминг переводит сигнальную систему, связанную с ГК, в состояние с повышенным уровнем FKBP51, что способствует подавлению активности ГР, а также усилению активности NF-κВ-зависимых путей. Применение ЛПС в этом случае приводит к усиленному провоспалительному ответу (широкие стрелки) вследствие значительного FKBP51-зависимого усиления пути NF-κВ и подавления ГР-опосредованной иммуносупрессии. (С цветным вариантом рисунка можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

воспалительного ответа и усиление экспрессии FKBP51; (2) накопленный FKBP51 снимает ГК-зависимое подавление провоспалительных механизмов; (3) добавление ЛПС запускает как подъем ГК, так и повышение экспрессии провоспалительных цитокинов, однако из-за подавляющего эффекта накопленного FKBP51 воспалительный ответ оказывается сильнее (рисунок, *б*). В данном случае добавление ГК (кортикостерона или дексаметазона) в высоких дозах будет противовоспалительным, потому что высокие дозы должны преодолевать подавляющий эффект FKBP51. Третий случай очень похож на второй – единственное различие заключается в том, что ГК остаются повышенными значительный период времени во время длительного или повторяющегося стресса [23, 67],

после МСАО [76] или во время долговременной инъекции ГК [64, 69, 70]. Высоковероятно, что повышенный уровень кортикостерона приводит к накоплению FKBP51 и, как результат, снижению чувствительности ГР к кортикостерону и прекращению подавления провоспалительного ответа, опосредованного ГК. Как и в предыдущем случае, при данных условиях воздействие высокими дозами ГК должно всё ещё обладать противовоспалительным эффектом. Единственным исключением здесь может быть ситуация, когда хроническое воздействие высоких доз дексаметазона на животных приводит к глюкокортикоидной резистентности, т.е. общему снижению чувствительности всех клеток к ГК. В этом случае опосредованного глюкокортикоидами подавления воспаления также не происходит, однако механизмы могут не ограничиваться влиянием FKBP51.

Некоторые данные, по всей видимости, могут противоречить выдвинутой гипотезе в ситуации, когда адреналэктомированные животные имеют постоянный «базальный» уровень кортикостерона из имплантированных кортикостерон-содержащих пеллеток [69]. Именно поддержание «базального» уровня приводит к провоспалительному действию кортикостерона. Особенностью такой ситуации является устранение важных циркадианных и ультрадианных колебаний уровня кортикостерона, характерных для здорового организма. Данные колебания могут предотвращать накопление FKBP51 и подавление противовоспалительного эффекта ГК, в то время как поддержание постоянного уровня кортикостерона даже ночью, когда в норме он низкий, по-видимому, приводит к накоплению FKBP51 и подавлению эффектов, опосредованных ГР.

Вышеозвученная гипотеза отвергает предположение Sapolsky et al. о U-инвертированной зависимости эффектов ГК [79]. Наша гипотеза постулирует, что ГК в основном оказывают противовоспалительный эффект, однако одновременно с этим они также запускают процессы, снижающие чувствительность ГР к ГК, таким образом неизбежно приводя к погашению противовоспалительного эффекта и активации провоспалительных каскадов, которые всё еще могут быть подавлены единичным воздействием ГК в высокой дозе.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Противовоспалительные эффекты ГК широко используются в клинической практике, и в то же время считается, что провоспалительные эф-

фекты ГК лежат в основе нейродегенерации. Это особенно критично для гиппокампа, области мозга, контролирующей как когнитивные функции, так и эмоции/аффективное поведение, при этом селективно чувствительного к нейровоспалению и нейродегенерации. Избыток глюкокортикоидных и минералокортикоидных рецепторов в гиппокампе лежит в основе сложных механизмов опосредованного глюкокортикоидами контроля данных процессов. Наше понимание двойственных эффектов ГК напоминает готическую новеллу «Странный случай доктора Джекилла и мистера Хайда» Роберта Льюиса Стивенсона, впервые опубликованную в 1886 году. Хороший доктор Джекилл непредсказуемо превращается в злого мистера Хайда, а затем восстанавливает свою личность. Важным вопросом является то, когда и почему противовоспалительный доктор Джекилл становится провоспалительным мистером Хайдом, и наоборот? Понимание «Джекилл/Хайд» природы ГК, а также причин и механизмов такого перехода может предоставить нам эффективные подходы и инструменты для предотвращения нейровоспалительных событий в гиппокампе и, как результат, возможность предупредить и лечить заболевания мозга, как неврологические, так и психиатрические.

Данные, собранные в нашем обзоре, формируют сложную, хотя и достаточно феноменологическую картину о модуляторной роли ГК в нейровоспалении гиппокампа. В рамках механистической точки зрения мы предложили гипотезу, описывающую, как противовоспалительные эффекты ГК могут трансформироваться в провоспалительные. До сих пор не было представлено экспериментов, которые могли бы подтвердить или опровергнуть предложенный механизм. Большинство экспериментов относительно характеристик FKBP51 и его роли в регуляции воспаления и функций, опосредованных ГР, были проведены с использованием либо клеточных культур, либо тканей, отличных от нейрональных. Тем не менее, если наша гипотеза корректна, она может предоставить дополнительный инструмент для регуляции сигнальных путей, опосредованных ГК, особенно в случаях патологий, ассоциированных с высокими уровнями ГК, где подавление функции FKBP51 может способствовать восстановлению противовоспалительного действия ГК.

Два аспекта остались за рамками нашего обзора, хотя они могут оказать важное влияние на ГК-зависимое модулирование воспаления. Во-первых, про- и противовоспалительные эффекты ГК часто оценивают по уровню провос-

палительных цитокинов, таких как IL-1 β или TNF- α . Однако цитокиновая сеть обширна и сложна, а ГК могут иметь разноплановые эффекты, например, усиление экспрессии как про-, так и противовоспалительных цитокинов. Эффекты ГК на экспрессию противовоспалительных цитокинов всё ещё остаются практически не изученными. Единственное исследование, проведенное Frank et al. (2010), показало, что однократная предварительная инъекция кортикостерона усиливает не только экспрессию провоспалительных цитокинов после применения ЛПС, но также экспрессию противовоспалительных цитокинов в гиппокампе, таких как IL-10, IL-4 и фракталкин (CX3CL1) [57]. Данная работа указывает на необходимость измерения уровней как про-, так и противовоспалительных цитокинов, а также влияния ГК на оценку направленности и интенсивности воспалительного процесса.

Другой важный аспект, часто игнорируемый при анализе влияния стресса и подъема ГК на нейровоспаление, заключается в том, что стресс может модулировать цитокиновую систему не только непосредственно через ГК-зависимые механизмы. Например, стресс приводит к подъёму IL-6 в крови [80–82], и недавно было показано, что этот эффект является результатом активации клеток бурого жира симпатической системой [83]. Более того, индуцированная стрессом экспрессия IL-6 снижает толерантность к последующему воспалительному вызову, что ставит под сомнение исключительную роль ГК в регуляции воспалительных процессов [83]. Вышеперечисленные данные дают нам основание полагать, что и другие факторы, помимо ГК, могут быть индуцированы стрессом и определять характеристики воспалительного ответа. Дальнейшие исследования в данной области могут помочь установить и прояснить роль каждого компонента стрессового ответа в регуляции нейровоспаления.

Финансирование. Данное исследование проведено при поддержке Российского Научного Фонда (грант № 20-65-47029, провоспалительные эффекты ГК) и Российского Фонда Фундаментальных Исследований (грант № 19-315-90081, противовоспалительные эффекты ГК).

Конфликт интересов. Авторы объявили об отсутствии конфликта интересов.

Соответствие этическим нормам. Данная статья не содержит исследований с участием людей или животных, проведенных авторами.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hall, J. E. (2016) *Guyton and Hall Textbook of Medical Physiology*, 13th Edn., Saunders, Philadelphia, PA.
- Estes, M. L., and McAllister, A. K. (2014) Alterations in immune cells and mediators in the brain: it's not always neuroinflammation! *Brain Pathol.*, **24**, 623-630, doi: 10.1111/bpa.12198.
- Gulyaeva, N. V. (2019) Functional neurochemistry of the ventral and dorsal hippocampus: stress, depression, dementia and remote hippocampal damage, *Neurochem. Res.*, **44**, 1306-1322, doi: 10.1007/s11064-018-2662-0.
- Silverman, M. N., and Sternberg, E. M. (2012) Glucocorticoid regulation of inflammation and its functional correlates: from HPA axis to glucocorticoid receptor dysfunction, *Ann. N. Y. Acad. Sci.*, **1261**, 55-63, doi: 10.1111/j.1749-6632.2012.06633.x.
- Kirschke, E., Goswami, D., Southworth, D., Griffin, P. R., and Agard, D. A. (2014) Glucocorticoid receptor function regulated by coordinated action of the Hsp90 and Hsp70 chaperone cycles, *Cell*, **157**, 1685-1697, doi: 10.1016/j.cell.2014.04.038.
- Baker, J. D., Ozsan, I., Ospina, S. R., Gulick, D., and Blair, L. J. (2019) Hsp90 heterocomplexes regulate steroid hormone receptors: from stress response to psychiatric disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **20**, 79, doi: 10.3390/ijms20010079.
- Paakinaho, V., Makkonen, H., Jaaskelainen, T., and Palvimö, J. J. (2010) Glucocorticoid receptor activates poised FKBP51 locus through long-distance interactions, *Mol. Endocrinol.*, **24**, 511-525, doi: 10.1210/me.2009-0443.
- Kästle, M., Kistler, B., Lamla, T., Bretschneider, T., Lamb, D., et al. (2018) FKBP51 modulates steroid sensitivity and NFκB signalling: A novel anti-inflammatory drug target, *Eur. J. Immunol.*, **48**, 1904-1914, doi: 10.1002/eji.201847699.
- Fries, G. R., Gassen, N. C., and Rein, T. (2017) The FKBP51 glucocorticoid receptor co-chaperone: regulation, function, and implications in health and disease, *Int. J. Mol. Sci.*, **18**, 2614, doi: 10.3390/ijms18122614.
- Liberman, A. C., Budziński, M. L., Sokn, C., Gobbin, R. P., Ugo, M. B., and Arzt, E. (2020) SUMO conjugation as regulator of the glucocorticoid receptor-FKBP51 cellular response to stress, *Steroids*, **153**, 108520, doi: 10.1016/j.steroids.2019.108520.
- Merkulov, V. M., Merkulova, T. I., and Bondar, N. P. (2017) Mechanisms of brain glucocorticoid resistance in stress-induced psychopathologies, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 351-365, doi: 10.1134/S0006297917030142.
- Scharf, S. H., Liebl, C., Binder, E. B., Schmidt, M. V., and Müller, M. B. (2011) Expression and regulation of the Fkbp5 gene in the adult mouse brain, *PLoS One*, **6**, e16883, doi: 10.1371/journal.pone.0016883.
- Bourke, C. H., Raees, M. Q., Malviya, S., Bradburn, C. A., Binder, E. B., and Neigh, G. N. (2013) Glucocorticoid sensitizers Bag1 and Ppid are regulated by adolescent stress in a sex-dependent manner, *Psychoneuroendocrinology*, **38**, 84-93, doi: 10.1016/j.psyneuen.2012.05.001.
- Green, M. R., Nottrodt, R. E., Simone, J. J., and McCormick, C. M. (2016) Glucocorticoid receptor translocation and expression of relevant genes in the hippocampus of adolescent and adult male rats, *Psychoneuroendocrinology*, **37**, 32-41, doi: 10.1016/j.psyneuen.2016.07.210.
- Sawamura, T., Klengel, T., Armario, A., Jovanovic, T., Norrholm, S. D., et al. (2016) Dexamethasone treatment leads to enhanced fear extinction and dynamic Fkbp5 regulation in amygdala, *Neuropsychopharmacology*, **41**, 832-846, doi: 10.1038/npp.2015.210.
- Bloem, L. J., Guo, C., and Pratt, J. H. (1995) Identification of a splice variant of the rat and human mineralocorticoid receptor genes, *J. Steroid Biochem. Mol. Biol.*, **55**, 159-162, doi: 10.1016/0960-0760(95)00162-s.
- Young, E. A., Lopez, J. F., Murohy-Weinberg, V., Watson, S. J., and Akil, H. (2003) Mineralocorticoid receptor function in major depression, *Arch. Gen. Psychiatry*, **60**, 24-28, doi: 10.1001/archpsyc.60.1.24.
- Tasic, B., Yao, Z., Graybuck, L. T., Smith, K. A., Nguyen, T. N et al. (2018) Shared and distinct transcriptomic cell types across neocortical areas, *Nature*, **563**, 72-78, doi: 10.1038/s41586-018-0654-5.
- Saunders, A., Macosko, E. Z., Wysoker, A., Goldman, M., Krienen, F. M., et al. (2018) Molecular diversity and specializations among the cells of the adult mouse brain, *Cell*, **174**, 1015-1030, doi: 10.1016/j.cell.2018.07.028.
- Zeisel, A., Hochgerner, H., Lonnerberg, P., Johnsson, A., Memic, F., et al. (2018) Molecular architecture of the mouse nervous system, *Cell*, **174**, 999-1014, doi: 10.1016/j.cell.2018.06.021.
- Krauss, P. G. (2006) *Biochemistry of Signal Transduction and Regulation*, 3rd Edn., Completely Revised Edition, John Wiley & Sons.
- Caudal, D., Jay, T. M., and Godsil, B. P. (2014) Behavioral stress induces regionally-distinct shifts of brain mineralocorticoid and glucocorticoid receptor levels, *Front. Behav. Neurosci.*, **8**, 1-8, doi: 10.3389/fnbeh.2014.00019.
- Piskunov, A., Stepanichev, M., Tishkina, A., Novikova, M., Levshina, I., and Gulyaeva, N. (2016) Chronic combined stress induces selective and long-lasting inflammatory response evoked by changes in corticosterone accumulation and signaling in rat hippocampus, *Metab. Br. Dis.*, **31**, 445-454, doi: 10.1007/s11011-015-9785-7.
- Karst, H., Derijk, R., and De Kloet, E. R. (2007) The coming out of the brain mineralocorticoid receptor, *Trends Neurosci.*, **31**, 1-7, doi: 10.1016/j.tins.2007.10.005.
- Maggio, N., and Segal, M. (2010) Cellular basis of a rapid effect of mineralocorticosteroid receptors activation on LTP in ventral hippocampal slices, *Hippocampus*, **22**, 267-275, doi: 10.1002/hipo.20893.
- Brocca, M. E., Pietranera, L., de Kloet, E. R., and De Nicola, A. F. (2019) Mineralocorticoid receptors, neuroinflammation and hypertensive encephalopathy, *Cell. Mol. Neurobiol.*, **39**, 483-492, doi: 10.1007/s10571-018-0610-9.
- Dinh, Q. N., Young, M. J., Evans, M. A., Drummond, G. R., Sobey, C. G., and Sophocles, C. (2016) Aldosterone-induced oxidative stress and inflammation in the brain are mediated by the endothelial cell mineralocorticoid receptor, *Brain Res.*, **1637**, 146-153, doi: 10.1016/j.brainres.2016.02.034.
- Bay-Richter, C., Hallberg, L., Ventorp, F., Janelidze, S., and Brundin, L. (2012) Aldosterone synergizes with peripheral inflammation to induce brain IL-1β expression and depressive-like effects, *Cytokine*, **60**, 749-754, doi: 10.1016/j.cyto.2012.08.016.
- Joëls, M., and de Kloet, E. R. (2017) The brain mineralocorticoid receptor: A saga in three episodes, *J. Endocrinol.*, **234**, 49-66, doi: 10.1530/JOE-16-0660.
- Dinh, Q. N., Drummond, G. R., Sobey, C. G., and Chrissobolis, S. (2016) Cell-specific mineralocorticoid receptors: future therapeutic targets for stroke? *Neural*

- Regen. Res.*, **11**, 1230-1231, doi: 10.4103/1673-5374.189173.
31. Frieler, R. A., Meng, H., Duan, S. Z., Berger, S., Schütz, G., et al. (2011) Myeloid-specific deletion of the mineralocorticoid receptor reduces infarct volume and alters inflammation during cerebral ischemia, *Stroke*, **42**, 179-185, doi: 10.1161/STROKEAHA.110.598441.
 32. Montes-Cobos, E., Schweingruber, N., Xiao, L., Fischer, H. J., Reichardt, H. M., Lühder, F. (2017) Deletion of the mineralocorticoid receptor in myeloid cells attenuates central nervous system autoimmunity, *Front. Immunol.*, **8**, 1319, doi: 10.3389/fimmu.2017.01319.
 33. Lightman, S. L., Wiles, C. C., Atkinson, H. C., Henley, D. E., Russell, G. M., et al. (2008) The significance of glucocorticoid pulsatility, *Eur. J. Pharmacol.*, **583**, 255-262, doi: 10.1016/j.ejphar.2007.11.073.
 34. Pariante, C. M., and Lightman, S. L. (2008) The HPA axis in major depression: classical theories and new developments, *Trends Neurosci.*, **31**: 464-468, doi: 10.1016/j.tins.2008.06.006.
 35. De Kloet, E. R., Vreugdenhil, E., Oitzl, M. S., and Joels, M. (1998) Brain corticosteroid receptor balance in health and disease, *Endocr. Rev.*, **19**, 269-301, doi: 10.1210/edrv.19.3.0331.
 36. Sharma, S. T., and Nieman, L. K. (2011) Cushing's syndrome: all variants, detection, and treatment, *Endocrinol. Metab. Clin. N. Am.*, **40**: 379-391, doi: 10.1016/j.ecl.2011.01.006.
 37. Pereira, A. M., Tiemensma, J., and Romijn, J. A. (2010) Neuropsychiatric disorders in Cushing's syndrome, *Neuroendocrinology*, **92**: 65-70, doi: 10.1159/000314317.
 38. Rodriguez, J. M., Monsalves-Alvarez, M., Henriquez, S., Llanos, M. N., and Troncoso, R. (2016) Glucocorticoid resistance in chronic diseases, *Steroids*, **115**, 182-192, doi: 10.1016/j.steroids.2016.09.010.
 39. Vandewalle, J., Luypaert, A., De Bosscher, K., and Libert, C. (2018) Therapeutic mechanisms of glucocorticoids, *Trends Endocrinol. Metab.*, **29**, 42-54, doi: 10.1016/j.tem.2017.10.010.
 40. Cain, D. W., and Cidlowski, J. A. (2017) Immune regulation by glucocorticoids, *Nat. Rev. Immunol.*, **17**, 233-247, doi: 10.1038/nri.2017.1.
 41. Banuelos, J., Shin, S., Cao, Y., Bochner, B. S., Morales-Nebreda, L., et al. (2016) BCL-2 protects human and mouse Th17 cells from glucocorticoid-induced apoptosis, *Eur. J. Allergy Clin. Immunol.*, **71**, 640-650, doi: 10.1111/all.12840.
 42. McKinley, L., Alcorn, J. F., Peterson, A., DuPont, R. B., Kapadia, S., et al. (2008) Th17 cells mediate steroid-resistant airway inflammation and airway hyperresponsiveness in mice, *J. Immunol.*, **181**, 4089-4097, doi: 10.4049/jimmunol.181.6.4089.
 43. Banuelos, J., and Lu, N. Z. (2016) A gradient of glucocorticoid sensitivity among helper T cell cytokines, *Cytokine Growth Factor Rev.*, **31**, 27-35, doi: 10.1016/j.cytogr.2016.05.002.
 44. Spencer, R. L., Kalman, B. A., and Dhabhar, F. S. (2011) *Role of Endogenous Glucocorticoids in Immune System Function: Regulation and Counterregulation*, *Comprehensive Physiology*, Handbook of Physiology, The Endocrine System, Coping with the Environment: Neural and Endocrine Mechanisms, doi: 10.1002/cphy.cp070418.
 45. Goujon, E., Layé, S., Parnet, P., and Dantzer, R. (1997) Regulation of cytokine gene expression in the central nervous system by glucocorticoids: Mechanisms and functional consequences, *Psychoneuroendocrinology*, **22**, S75-S80, doi: 10.1016/s0306-4530(97)00009-7.
 46. Cronstein, B. N., Kimmel, S. C., Levin, R. I., Martiniuk, F., and Weissmann, G. (1992) A mechanism for the anti-inflammatory effects of corticosterone: The glucocorticoid receptor regulates leukocyte adhesion to endothelial cells and expression of endothelial-leukocyte adhesion molecule 1 and intercellular adhesion molecule 1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **89**, 9991-9995, doi: 10.1073/pnas.89.21.9991.
 47. Flower, R. J., and Rothwell, N. J. (1994) Lipocortin-1: cellular mechanisms and clinical relevance, *Trends Pharmacol. Sci.*, **15**, 71-76, doi: 10.1016/0165-6147(94)90281-X.
 48. Dolan-O'Keefe, M., and Nick, H. S. (1999) Inhibition of cytoplasmic phospholipase A2 expression by glucocorticoids in rat intestinal epithelial cells, *Gastroenterology*, **116**, 855-864, doi: 10.1016/S0016-5085(99)70068-5.
 49. Goppelt-Struebe, M., Wölter, D., and Resch, K. (1989) Glucocorticoids inhibit prostaglandin synthesis not only at the level of phospholipase A2 but also at the level of cyclooxygenase/PGE isomerase, *Br. J. Pharmacol.*, **98**, 1287-1295, doi: 10.1111/j.1476-5381.1989.tb12676.x.
 50. Perretti, M., and Ahluwalia, A. (2000) The microcirculation and inflammation: site of action for glucocorticoids, *Microcirculation*, **7**, 147-161, doi: 10.1111/j.1549-8719.2000.tb00117.x.
 51. Nissen, R. M., and Yamamoto, K. R. (2000) The glucocorticoid receptor inhibits NFκB by interfering with serine-2 phosphorylation of the RNA polymerase II carboxy-terminal domain, *Genes Dev.*, **14**, 2314-2329, doi: 10.1101/gad.827900.
 52. Hillard, C. J. (2018) Circulating endocannabinoids: from whence do they come and where are they going? *Neuropsychopharmacology*, **43**, 155-172, doi: 10.1038/npp.2017.130.
 53. Klein, T. W. (2005) Cannabinoid-based drugs as anti-inflammatory therapeutics, *Nat. Rev. Immunol.*, **5**, 400-411, doi: 10.1038/nri1602.
 54. Ma, Y., Matsuwaki, T., Yamanouchi, K., and Nishihara, M. (2017) Glucocorticoids suppress the protective effect of cyclooxygenase-2-related signaling on hippocampal neurogenesis under acute immune stress, *Mol. Neurobiol.*, **54**, 1953-1966, doi: 10.1007/s12035-016-9766-9.
 55. Goujon, E., Parnet, P., Laye, S., Combe, C., Kelley, K. W., and Dantzer, R. (1995) Stress downregulates lipopolysaccharide-induced expression of proinflammatory cytokines in the spleen, pituitary, and brain of mice, *Brain Behav. Immun.*, **9**, 292-303, doi: 10.1006/brbi.1995.1028.
 56. Goujon, E., Parnet, P., Layé, S., Combe, C., and Dantzer, R. (1996) Adrenalectomy enhances pro-inflammatory cytokines gene expression, in the spleen, pituitary and brain of mice in response to lipopolysaccharide, *Mol. Brain Res.*, **36**, 53-62, doi: 10.1016/0169-328X(95)00242-K.
 57. Frank, M. G., Miguel, Z. D., Watkins, L. R., and Maier, S. F. (2010) Prior exposure to glucocorticoids sensitizes the neuroinflammatory and peripheral inflammatory responses to *E. coli* lipopolysaccharide, *Brain Behav. Immun.*, **24**, 19-30, doi: 10.1016/j.bbi.2009.07.008.
 58. Chai, Z., Alheim, K., Lundkvist, J., Gatti, S., and Bartfai, T. (1996) Subchronic glucocorticoid pretreatment reversibly attenuates IL-1β induced fever in rats; IL-6 mRNA is elevated while IL-1α and IL-1β mRNAs are suppressed, in the CNS, *Cytokine*, **8**, 227-237, doi: 10.1006/cyto.1996.0032.
 59. Frank, M. G., Thompson, B. M., Watkins, L. R., and Maier, S. F. (2012) Glucocorticoids mediate stress-induced priming of microglial pro-inflammatory responses, *Brain*

- Behav. Immun.*, **26**, 337-345, doi: 10.1016/j.bbi.2011.10.005.
60. Espinosa-Oliva, A. M., De Pablos, R. M., Villarán, R. F., Argüelles, S., Venero, J. L., et al. (2009) Stress is critical for LPS-induced activation of microglia and damage in the rat hippocampus, *Neurobiol. Aging*, **32**, 85-102, doi: 10.1016/j.neurobiolaging.2009.01.012.
 61. Betancur, C., Lledo, A., Borrell, J., and Guaza, C. (1994) Corticosteroid regulation of IL-1 receptors in the mouse hippocampus: effects of glucocorticoid treatment, stress, and adrenalectomy, *Neuroendocrinology*, **59**, 120-128, doi: 10.1159/000126648.
 62. Betancur, C., Borrell, J., and Guaza, C. (1995) Cytokine regulation of corticosteroid receptors in the rat hippocampus: effects of interleukin-1, interleukin-6, tumor necrosis factor and lipopolysaccharide, *Neuroendocrinology*, **62**, 47-54, doi: 10.1159/000126987.
 63. Frank, M. G., Watkins, L. R., and Maier, S. F. (2015) The permissive role of glucocorticoids in neuroinflammatory priming: mechanisms and insights, *Curr. Opin. Endocrinol. Diabetes Obes.*, **22**, 300-305, doi: 10.1097/MED.000000000000168.
 64. Skupio, U., Tertilt, M., Sikora, M., Golda, S., Wawrzczak-Bargiela, A., and Przewlocki, R. (2015) Behavioral and molecular alterations in mice resulting from chronic treatment with dexamethasone: relevance to depression, *Neuroscience*, **286**, 141-150, doi: 10.1016/j.neuroscience.2014.11.035.
 65. Sigwalt, A. R., Budde, H., Helmich, I., Glaser, V., Ghisoni, K., et al. (2011) Molecular aspects involved in swimming exercise training reducing anhedonia in a rat model of depression, *Neuroscience*, **192**, 661-674, doi: 10.1016/j.neuroscience.2011.05.075.
 66. Al-Shorbagy, M. Y., El Sayeh, B. M., and Abdallah, D. M. (2012) Diverse effects of variant doses of dexamethasone in lithium-pilocarpine induced seizures in rats, *Can. J. Physiol. Pharmacol.*, **90**, 13-21, doi: 10.1139/y11-096.
 67. Stepanichev, M. Yu., Peregud, D. I., Manolova, A. O., Lazareva, N. A., Onufriev, M. V., and Gulyaeva, N. V., (2018) Mild chronic stress increases expression of genes of proinflammatory cytokines in the rat brain, *Herald Russ. Acad. Sci. Biol. Ser.*, **2**, 209-215, doi: 10.7868/S0002332918020108.
 68. Munhoz, C. D., Lepsch, L. B., Kawamoto, E. M., Malta, M. B., De Sa Lima, L., et al. (2006) Chronic unpredictable stress exacerbates lipopolysaccharide-induced activation of nuclear factor- κ B in the frontal cortex and hippocampus via glucocorticoid secretion, *J. Neurosci.*, **26**: 3813-3820, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4398-05.2006.
 69. Munhoz, C. D., Sorrells, S. F., Caso, J. R., Scavone, C., and Sapolsky, R. M. (2010) Glucocorticoids exacerbate lipopolysaccharide-induced signaling in the frontal cortex and hippocampus in a dose-dependent manner, *J. Neurosci.*, **30**, 13690-13698, doi: 10.1523/JNEUROSCI.0303-09.2010.
 70. Frank, M. G., Hershman, S. A., Weber, M. D., Watkins, L. R., and Maier, S. F. (2014) Chronic exposure to exogenous glucocorticoids primes microglia to pro-inflammatory stimuli and induces NLRP3 mRNA in the hippocampus, *Psychoneuroendocrinology*, **40**, 191-200, doi: 10.1016/j.psyneuen.2013.11.006.
 71. Dinkel, K., MacPherson, A., and Sapolsky, R. M. (2003) Novel glucocorticoid effects on acute inflammation in the CNS, *J. Neurochem.*, **84**, 705-716, doi: 10.1046/j.1471-4159.2003.01604.x.
 72. Sorrells, S. F., Caso, J. R., Munhoz, C. D., Hu, C. K., Tran, K. V., et al. (2013) Glucocorticoid signaling in myeloid cells worsens acute CNS injury and inflammation, *J. Neurosci.*, **33**, 7877-7889, doi: 10.1523/JNEUROSCI.4705-12.2013.
 73. Sorrells, S. F., Munhoz, C. D., Manley, N. C., Yen, S., and Sapolsky, R. M. (2014) Glucocorticoids increase excitotoxic injury and inflammation in the hippocampus of adult male rats, *Neuroendocrinology*, **100**, 129-140, doi: 10.1159/000367849.
 74. Vizuete, A. F. K., Hansen, F., Negri, E., Leite, M. C., De Oliveira, D. L., and Gonçalves, C. A. (2018) Effects of dexamethasone on the Li-pilocarpine model of epilepsy: protection against hippocampal inflammation and astrogliosis, *J. Neuroinflamm.*, **15**, 68, doi: 10.1186/s12974-018-1109-5.
 75. Smith-Swintosky, V. L., Pettigrew, L. C., Sapolsky, R. M., Phares, C., Craddock, S. D., et al. (1996) Metyrapone, an inhibitor of glucocorticoid production, reduces brain injury induced by focal and global ischemia and seizures, *J. Cerebr. Bl. Fl. Metab.*, **16**, 585-598, doi: 10.1097/00004647-199607000-00008.
 76. Onufriev, M. V., Freiman, S. V., Moiseeva, Y. V. Stepanichev, M. Y., et al. (2017) Accumulation of corticosterone and interleukin-1 β in the hippocampus after focal ischemic damage of the neocortex: selective vulnerability of the ventral hippocampus, *Neurochem. J.*, **11**, 236-241, doi: 10.1134/S1819712417030084.
 77. Onufriev, M. V., Freiman, S. V., Peregud, D. I., Kudryashova, I. V., Tishkina, A. O., et al. (2017) Neonatal Proinflammatory stress induces accumulation of corticosterone and Interleukin-6 in the hippocampus of juvenile rats: potential mechanism of synaptic plasticity impairments, *Biochemistry (Moscow)*, **82**, 281, doi: 10.1134/S0006297917030051.
 78. Gulyaeva, N. V. (2019) Biochemical mechanisms and translational relevance of hippocampal vulnerability to distant focal brain injury: the price of stress response, *Biochemistry (Moscow)*, **84**, 1306-1328, doi: 10.1134/S0006297919110087.
 79. Sapolsky, R. M. (2015) Stress and the brain: individual variability and the inverted-U, *Nat. Neurosci.*, **18**, 1344-1346, doi: 10.1038/nn.4109.
 80. Cheng, Y., Jope, R. S., and Beurel, E. (2015) A pre-conditioning stress accelerates increases in mouse plasma inflammatory cytokines induced by stress, *BMC Neurosci.*, **16**, 31, doi: 10.1186/s12868-015-0169-z.
 81. LeMay, L. G., Vander, A. J., and Kluger, M. J. (1990) The effects of psychological stress on plasma interleukin-6 activity in rats, *Physiol. Behav.*, **47**, 957-961, doi: 10.1016/0031-9384(90)90024-X.
 82. Maes, M., Song, C., Lin, A., De Jongh, R., Van Gastel, A., et al. (1998) The effects of psychological stress on humans: increased production of pro-inflammatory cytokines and a Th1-like response in stress-induced anxiety, *Cytokine*, **10**, 313-318, doi: 10.1006/cyto.1997.0290.
 83. Qing, H., Desrouleaux, R., Israni-Wingeret, K., Mineur, Y. S., Fogelman, N., et al. (2020) Origin and function of stress-induced IL-6 in murine models, *Cell*, **182**, 372-387, doi: 10.1016/j.cell.2020.05.054.

**GLUCOCORTICOIDS: DR. JEKYLL AND MR. HYDE
OF HIPPOCAMPAL NEUROINFLAMMATION****Review****A. P. Bolshakov¹, L. V. Tret'yakova¹, A. A. Kvichansky¹, and N. V. Gulyaeva^{1,2*}**¹ *Institute of Higher Nervous Activity and Neurophysiology, Russian Academy of Sciences, 117485 Moscow, Russia*² *Scientific and Practical Psychoneurological Center named after Z. P. Solovyev,
115419 Moscow, Russia; e-mail: nata_gul@mail.ru*

Glucocorticoids (GCs) are an important component of adaptive response of an organism to stressogenic stimuli, a typical stress response being accompanied by elevation of GC levels in blood. Anti-inflammatory effects of GCs are widely used in clinical practice, while pro-inflammatory effects of GCs are believed to underlie neurodegeneration. This is particularly critical for the hippocampus, brain region controlling both cognitive function and emotions/affective behavior, and selectively vulnerable to neuroinflammation and neurodegeneration. The hippocampus is believed to be the main target of GCs since it has the highest density of GC receptors potentially underlying high sensitivity of hippocampal cells to severe stress. In this review, we analyzed the results of studies on pro- and anti-inflammatory effects of GCs in the hippocampus in different models of stress and stress-related pathologies. The available data form a sophisticated, though often quite phenomenological, picture of a modulatory role of GCs in hippocampal neuroinflammation. Understanding the dual nature of GC-mediated effects as well as causes and mechanisms of switching can provide us with effective approaches and tools to avert hippocampal neuroinflammatory events and as a result to prevent and treat brain diseases, both neurological and psychiatric. In the framework of a mechanistic view, we propose a new hypothesis describing how the anti-inflammatory effects of GCs may transform into the pro-inflammatory ones. According to it, long-term elevation of GC level or preliminary treatment with GC triggers accumulation of FKBP51 protein that suppresses activity of GC receptors and activates pro-inflammatory cascades, which, finally, leads to enhanced neuroinflammation.

Keywords: glucocorticoids, stress response, hippocampus, neuroinflammation, cytokines, corticosterone, FKBP51

УДК 577.29:576.5

УРОВЕНЬ мРНК ТРАНСПОРТЕРОВ ЦИНКА ЗАВИСИТ ОТ СОДЕРЖАНИЯ ЦИНКА И ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ, ИНДУЦИРОВАННЫХ HIV-1 Tat В ЛИНИЯХ КЛЕТОК МЫШЦ (RD) И МОНОЦИТАХ (THP-1)*

© 2021 К. Аллури¹, С.Р. Ятхапу², Н.Б. Кондапалли³,
Р. Хемалатха³, К.М. Наир^{4**}, С. Гош^{1**}

¹ *Molecular Biology Division, ICMR-National Institute of Nutrition, 500007 Hyderabad, India; электронная почта: bihongo@yahoo.com*

² *Drug Toxicology Division, ICMR-National Institute of Nutrition, 500007 Hyderabad, India*

³ *Microbiology and Immunology Division, ICMR-National Institute of Nutrition, 500007 Hyderabad, India*

⁴ *Micronutrient Division, ICMR-National Institute of Nutrition, 500007 Hyderabad, India; электронная почта: nairthayil@gmail.com*

Поступила в редакцию 01.06.2020

После доработки 27.08.2020

Принята к публикации 15.09.2020

При недостатке цинка в моноцитах и мышечных клетках наблюдается функционально различное поведение с точки зрения системы депонирования цинка (в мышцах, в отличие от моноцитов, уровень цинка сохраняется на обычном уровне). Целью настоящей работы было изучение влияния уровня цинка и HIV-1 Tat-опосредованного воспаления на экспрессию транспортеров цинка в этих типах клеток. Уровень экспрессии транспортеров цинка (ZnTs, ZIPs и металлотионеина MT) в клетках RD и THP-1 определяли с помощью метода qRT-PCR как по отдельности, так и при совместном культивировании этих клеток. Уровни экспрессии белка ZnT1 определяли с использованием метода вестерн-блоттинга. Значительное повышение уровня мРНК белков MT и ZnT1 при добавлении цинка и снижение при дефиците цинка указывает на важную роль генов, кодирующих транспортеры цинка, в поддержании гомеостаза цинка в этих тканях. В клетках RD ZIP10 продемонстрировал обратную корреляцию с уровнем цинка, в то время как в клетках THP-1 никакой корреляции обнаружено не было. Tat-индуцированное воспаление приводило к значительному повышению уровня транскриптов MT, IL-6, ZIP7, ZIP8 и ZIP9 в клетках RD при сокультивировании, в то время как в клетках THP-1 наблюдалось повышение уровня IL-1 β и снижение уровня ZIP7 и ZIP14. Уровень цинка и HIV-1 Tat-индуцированное воспаление, по-видимому, оказывают влияние на дифференциальную экспрессию MT, ZnTs и ZIPs в мышечных клетках и в моноцитах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: транспортеры цинка, ZIP, ZnT, MT, совместное культивирование, HIV-1 Tat, THP-1, RD.

DOI: 10.31857/S0320972521020056

ВВЕДЕНИЕ

При недостатке цинка его уровень в скелетной мышце, коже и сердце не изменяется, однако снижается в кости, моноцитах, печени, яйцках и плазме крови [1, 2]. Содержание цинка в лимфоцитах, гранулоцитах и тромбоцитах при

его дефиците в течение 8–12 недель также снижается [3]. Концентрация ионов цинка не изменяется при краткосрочном незначительном дефиците цинка (12–16 мкМ), однако при продолжающемся дефиците Zn происходит снижение его концентрации в плазме крови [4]. Гомеостаз цинка поддерживается в результате коорди-

Принятые сокращения: BCR – рецептор В-клеток; DMEM – модифицированная Дульбекко среда Игла; DMSO – диметилсульфоксид; FBS – фетальная бычья сыворотка; HIV – вирус иммунодефицита человека; ИКВ – ИкВ-киназа; IL – интерлейкин; МНС – основной комплекс гистосовместимости; MT – металлотионеин; MTF – металлотранскрипционный фактор; Nef – негативный фактор экспрессии; РКВ/АКТ – протеинкиназа В; RD – клетки рабдомиосаркомы; SLC – семейство транспортеров растворенных веществ; Tat – трансаKTиватор транскрипции; TNF – фактор некротизации опухоли α ; TREN – N,N,N',N'-тетраakis-(2-пиридилметил) этилендиамин; ZIP – Zrt- и Irt-подобный белок; ZnT – транспортер цинка.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», BM20-125, 02.11.2020.

** Адресат для корреспонденции.

нированной регуляции активности транспортеров цинка, которые принадлежат к двум основным семействам: белки ZnTs (транспортеры цинка) и белки ZIPs (Zrt- и Irt-подобные белки) вместе с белком MT (металлотионеин), который представляет собой внутриклеточный цинк-связывающий белок. Белки ZnTs (ZnT1–ZnT10) кодируются семейством генов *SLC30* (solute carrier) и участвуют в высвобождении внутриклеточного Zn; в то время как белки-транспортеры ZIPs (ZIP1–ZIP14), кодируемые семейством генов *SLC39*, ведут к повышению внутриклеточной концентрации цинка.

Кроме того, экспрессия белков ZIPs изменяется с возрастом, а также регулируется посттранскрипционно. Было показано, что уровень цинка *per se* сильнее влияет на экспрессию ZIP1, ZIP2 и ZIP3 в лимфоцитах молодых людей по сравнению с пожилыми [5]. Токсичность цинка предотвращается эндоцитозом транспортера ZIP4 из плазматической мембраны или его убиквитин-опосредованной деградацией [6]. Когда цинк находится в доступности, происходит усиление трансляции ZIP5, опосредованное взаимодействием консервативной шпильки и двух перекрывающихся сайтов связывания микроРНК в 3'-нетранслируемом регионе [7].

Цинк играет незаменимую роль в развитии, созревании и функционировании НК-клеток (natural killers) и НКТ-клеток (natural killer T cells) [8]. Известно, что активация тучных клеток при аллергическом ответе замедленного типа происходит при участии белка ZnT5 [9]. Было показано, что у мышей при сепсисе/бактериальной инфекции повышается экспрессия ZIP8 в ответ на активацию NF-κB. ZIP8-опосредованный приток цинка вызывает ингибирование активности ИКК (IkB-киназы) и тем самым подавляет воспаление [10]. Аналогично известно, что ZIP9 способствует повышению уровня внутриклеточного цинка, приводя к активации протеинкиназы В (PKB/AKT), фосфорилированию киназы, регулируемой внеклеточными сигналами ERK (extracellular signal-regulated kinase), и активации рецептора В-клеток (BCR) [11]. В различных работах показано, что повышенные концентрации Zn вызывают ингибирование транскрипции вируса иммунодефицита человека (HIV-1) наряду с формированием новых инфекционных вирионов. В то же время применение Zn совместно с Зидовудином (Zidovudine, ZDV/AZT) приводит к снижению заболеваемости, вызванной оппортунистическими инфекциями, и диареи у ВИЧ-инфицированных детей [12–15]. Хорошо известно, что ВИЧ является цинк-зависимым ретровирусом, в котором Zn стимулирует вирусный фермент интегразу, таким

образом облегчая встраивание вирусной ДНК в ДНК клетки-хозяина [16, 17]. Более того, химиотерапевтическая эффективность некоторых ароматических С-нитрозосоединений основана на их способности удалять цинк из мотивов цинкового пальца нуклеокапсида HIV-1, таким образом предотвращая инфицирование вирусом [18].

Было показано, что такие белки HIV-1, как гликопротеин 120 (gp120), негативный фактор экспрессии (Nef), трансактиватор транскрипции (Tat) и регулятор экспрессии белков вириона (Rev), могут вызывать атрофию мышц, катаракту, нефропатию, поражения кожи и иммунодефицитные состояния [19, 20]. Tat-индуцированная запрограммированная гибель клеток приводит к снижению числа лимфоцитов у ВИЧ-инфицированных больных [21]. Напротив, Tat обладает также и митогенной активностью в клетках эпителия молочной железы и амниона и способствует передаче вируса от матери к ребенку [22]. Интересно, что цинк является необходимым для активности белка Tat, чье действие обязательно для репликации HIV [23]. Известно, что Tat стимулирует секрецию жидкости от серозной к люминальной стороне энтероцитов, в то время как цинк предотвращает такую активность [24].

Tat обладает ингибирующим действием в отношении основного комплекса гистосовместимости (МНС – major histocompatibility complex) I-го и II-го класса и индуцирует экспрессию провоспалительных цитокинов, таким образом модулируя иммунный ответ на инфицирование HIV-1 [25, 26]. Кроме того, значительное количество данных подтверждает, что развитию кахексии, или болезни похудения (slim disease), у больных ВИЧ/СПИД способствует ограниченный МНС-I полиомиозит, опосредованный цитотоксическим действием Т-клеток [27, 28]. Состояние кахексии в дальнейшем усугубляется действием провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкин-1β и фактор некроза опухоли TNF-α, которые секретируются ВИЧ-инфицированными моноцитами/макрофагами [29]. Возникновение атрофии скелетных мышц у больных ВИЧ/СПИД может быть вызвано изменениями циркулирующих уровней цитокинов и миостатина в крови больных [30, 31].

С учетом данных, представленных выше, целью настоящей работы было изучение влияния уровня цинка и воспаления в клетках, из которых цинк высвобождается (моноциты), и клетках, в которых депонируется (мышечные клетки). Мы предположили, что за различный ответ этих клеток на дефицит цинка и развитие воспаления ответственны транспортеры цинка. Поэтому мы провели эксперименты на ткане-

специфичных репрезентативных линиях клеток, а именно ТНР-1 (моноциты) и клетки рабдомиосаркомы (RD) мышцы человека. Был изучен ответ этих клеток на добавление экзогенного цинка, его дефицит, опосредованный действием TPEN – хелатора внутриклеточного цинка (N,N,N',N'-тетраakis-(2-пиридилметил)этилендиамин), а также воспаление, индуцированное HIV-1 Tat.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Реагенты. Реагенты для культивирования клеток, среда DMEM (Dulbecco's Modified Eagle Medium), среда RPMI-1640 (Roswell Park Memorial Institute Medium), FBS (фетальная бычья сыворотка), глутамакс, смесь антибиотиков и противогрибковых агентов, поли-L-лизин, этиловый эфир Zinquin (zinquin ethyl ester), DMSO (диметилсульфоксид) и TPEN были заказаны в компании «Sigma-Aldrich» (США). Набор пептидов ВИЧ (HIV-1 Consensus B Tat Peptide Pool; Cat:12706) был любезно предоставлен по программе Национального Института Здоровья по борьбе с ВИЧ (США).

Источники клеточных линий. Линия лейкомиических моноцитов человека ТНР-1 была любезно предоставлена институтом CSIR-ИСТ (Индия). Линия клеток RD была приобретена в ATCC (American type culture collection, США). Клетки выдерживали при 37 °С в увлажненной атмосфере с 5% CO₂, и культуральную среду сменяли один раз в два дня. Клетки ТНР-1 и RD культивировали в среде RPMI-1640 и DMEM соответственно с добавлением 10% FBS и по 1% глутамакса и смеси антибиотиков и противогрибковых средств. Клетки выдерживали в логарифмической фазе роста, эксперименты проводили после достижения состояния ~70–80%-ной конфлюэнтности. Культуральная среда, за исключением FBS, не содержала цинк.

Обработка цинком и TPEN клеток ТНР-1 и RD. Для удаления избыточного цинка из среды клетки промывали фосфатным солевым раствором PBS. Клетки ТНР-1 и RD обрабатывали 25 мкМ цинка в форме сульфата цинка в комплексе с 25 мкМ бычьего сывороточного альбумина BSA («Sigma», США) [32] или 5 мкМ TPEN (хелатор внутриклеточного цинка) для создания дефицита цинка, оцениваемого по жизнеспособности клеток (окрашивание трипановым синим) в течение 4 ч в бессывороточной среде. Затем клетки ТНР-1 фиксировали на покровных стеклах, покрытых 0,1 мг/мл поли-L-лизина. Все эксперименты выполнялись трижды как независимые повторения.

Поглощение этилового эфира Zinquin в культурах клеток RD и ТНР-1. Как было описано в предыдущем разделе, клетки инкубировали с 25 мкМ цинка в виде сульфата цинка или 5 мкМ TPEN в течение 4 ч в бессывороточной среде. Клетки промывали PBS и затем инкубировали с 10 мкМ цинк-специфичного флуоресцентного зонда этилового эфира Zinquin в течение 30 мин [33]. Флуоресцентный комплекс Zn–Zinquin визуализировали, считывая флуоресцентную эмиссию на 490 нм при возбуждении на 370 нм с использованием флуоресцентного микроскопа с фильтром GFP (EVOS FLC «Life Technologies», США).

Определение внутриклеточного цинка. Суспензию клеток (5 × 10⁶/мл) ТНР-1 и трипсинизированных клеток RD инкубировали с 10 мкМ этилового эфира Zinquin при 37 °С в течение 30 мин [34]. Клетки трижды промывали PBS и ресуспендировали в PBS. Флуоресценцию проб объемом 2 мл (5 × 10⁶ клеток/мл) в кюветах регистрировали при длине волны 490 нм при возбуждении на 370 нм с помощью спектрофлуориметра Jasco FP-6500 («Jasco», Япония).

Вестерн-блоттинг для определения уровня транспортера ZnT1. Клетки лизировали в буфере для анализа радиоиммунопреципитации RIPA, содержащем коктейль ингибиторов протеаз. Концентрацию белка в супернатанте определяли с помощью набора Micro BCA («Thermo Fisher Scientific», США). Белки (50 мкг) разделяли с помощью электрофореза в 10%-ном полиакриламидном геле в присутствии додецилсульфата натрия SDS (10% SDS-PAGE), разделенные белки переносили на нитроцеллюлозные мембраны («Bio-Rad», США). После блокировки мембран 5%-ным раствором сухого молока, мембраны инкубировали в течение ночи при 4 °С с антителами против ZnT1. Затем их промывали и инкубировали в течение 1 ч с вторичными антителами класса IgG, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP). Иммуноблоты проявляли с помощью набора ECL detection kit («Bio-Rad», США) и получали изображения с помощью системы визуализации G-box («Syngene», США). В качестве контролей количества белка при анализе клеток ТНР-1 и RD использовали β-актин и ГАФДГ (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа) соответственно.

Совместное культивирование клеток RD и ТНР-1 для определения роли HIV-1 Tat. Для определения роли Tat-индуцированного воспаления на межклеточные взаимодействия было проведено совместное культивирование клеток RD и ТНР-1. Вкратце, клетки RD были посажены с плотностью 0,9 × 10⁶/мл, через 24 ч среду

меняли на свежую DMEM. Моноциты сажали на монослой клеток RD в соотношении 1 : 1, добавляли Tat (100 нг/мл) и инкубировали в течение 8 ч [35]. Суспензию клеток THP-1 помещали на клетки RD аналогичным образом и использовали в качестве контроля для сокультивируемых клеток. После инкубации суспендированные клетки THP-1 были аспирированы и отмыты с помощью PBS. Прикрепленные клетки RD также тщательно промывались PBS для удаления суспендированных клеток THP-1. Эти снятые клетки были использованы для определения уровня экспрессии MT, ZnTs, ZIPs, IL-6 и IL-1 β с использованием метода количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR).

Количественная ПЦР в реальном времени (qRT-PCR). Тотальную РНК выделяли из клеток с помощью реагента Trizol («Life Technologies», США), следуя инструкциям производителя. Для синтеза кДНК с помощью набора Verso cDNA synthesis kit («Thermo Fisher Scientific», США) использовали 1 микрограмм РНК. qRT-PCR проводили с использованием красителя 2 \times SYBR Green («Takara Bio», Япония) и ген-специфичных праймеров (табл. S1 в Приложении) на термоциклере C1000 с оптическим модулем CFX96 («Bio-Rad», США). Все протоколы проводились дважды. Продукты амплификации ПЦР также анализировали с помощью электрофореза в агарозном геле с окрашиванием этидиум бромидом для подтверждения чистоты амплифицированного продукта ПЦР. Для нормализации результатов, полученных на клетках RD и THP-1, использовали ГАФДГ и β -актин соответственно. Продукты ПЦР всех образцов также анализировали путем определения кривой плавления для подтверждения чистоты продукта амплификации. В качестве отрицательного контроля использовали соответствующий образец мРНК без обратной транскриптазы. Относительный уровень экспрессии мРНК рассчитывали по методу $2^{-\Delta\Delta CT}$.

Окрашивание внутриклеточных цитокинов для определения TNF- α . Экспрессию цитокина TNF- α в ответ на введение пула пептидов Tat исследовали в иммунных клетках, т.е. только в клетках THP-1. Вкратце, совместно культивируемые клетки THP-1 обрабатывали Tat (100 нг/мл), затем добавляли ингибитор транспорта белков GolgiStopTM («BD Biosciences», США) и инкубировали не более 12 ч. Реакцию останавливали центрифугированием клеток и промыванием жидкостью Sheath fluid (BD FACS Flow, «BD Biosciences», США). Затем клетки ресуспендировали в 250 мкл раствора цитофикс/цитоперм в темноте при комнатной температуре в течение 20 мин. Клетки промывали

дважды промывочным буфером и инкубировали с антителами PE-Cy7 TNF- α («BD Biosciences», США) при комнатной температуре в темноте в течение 30 мин для определения уровня мембраносвязанного TNF- α . Несвязавшиеся антитела дважды отмывали буфером Perm/Wash («BD Biosciences», США) и ресуспендировали в 400 мкл промывочного буфера. Полученные с использованием проточного цитометра (BD FACS Aria-II, «BD Biosciences», США) данные анализировали с помощью программы Flow Jo 10.7 («Flow Jo», США).

МНС-I при воспалении. Совместно культивируемые клетки RD и THP-1 окрашивали препаратом anti-HLA-ABC-FITC («Miltenyi Biotec», Германия) или препаратом для изотопного контроля REA Control FITC («Miltenyi Biotec», Германия) в течение 30 мин при 4 °C в соответствии с инструкциями производителя. Клетки анализировали с помощью проточной цитометрии, как было описано выше.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Гомеостаз цинка поддерживается путем регуляции экспрессии тканеспецифичных транспортеров цинка. Тем не менее, насколько нам известно, пока не было проведено детальных исследований экспрессии генов в функционально различных тканях. В настоящей работе мы определяли уровень внутриклеточного цинка с помощью флуоресцентной микроскопии и спектрофлуориметрии. Профили экспрессии MTs, ZnTs и ZIPs анализировали с помощью количественной ПЦР в реальном времени (qRT-PCR).

Уровни внутриклеточного Zn в условиях избытка или недостатка цинка. Клетки THP-1 (рис. 1, *a–в*) и RD (рис. 1, *г–е*), культивируемые с цинком и TPEN в течение 4 ч, демонстрировали флуоресценцию этилового эфира Zinquin в сравнении с соответствующими контролями, что указывает на то, что интернализация Zinquin может быть использована для количественного определения цинка в этих клетках. Соответственно, средний уровень цинка в обеих линиях клеток был значительно ($p < 0,05$) повышен при добавлении цинка ($7,92 \pm 0,10$ нМ в клетках THP-1 и $13,5 \pm 0,44$ нМ в клетках RD) в сравнении с контролем ($1,97 \pm 0,103$ нМ в клетках THP-1 и $5,78 \pm 0,3$ нМ в клетках RD). В то же время было обнаружено существенное ($p < 0,05$) снижение уровня цинка в этих клетках после обработки TPEN ($0,94 \pm 0,06$ нМ в клетках THP-1 и $3,98 \pm 0,45$ нМ в клетках RD) в сравнении с контролем (табл. S2 в Приложении). Таким об-

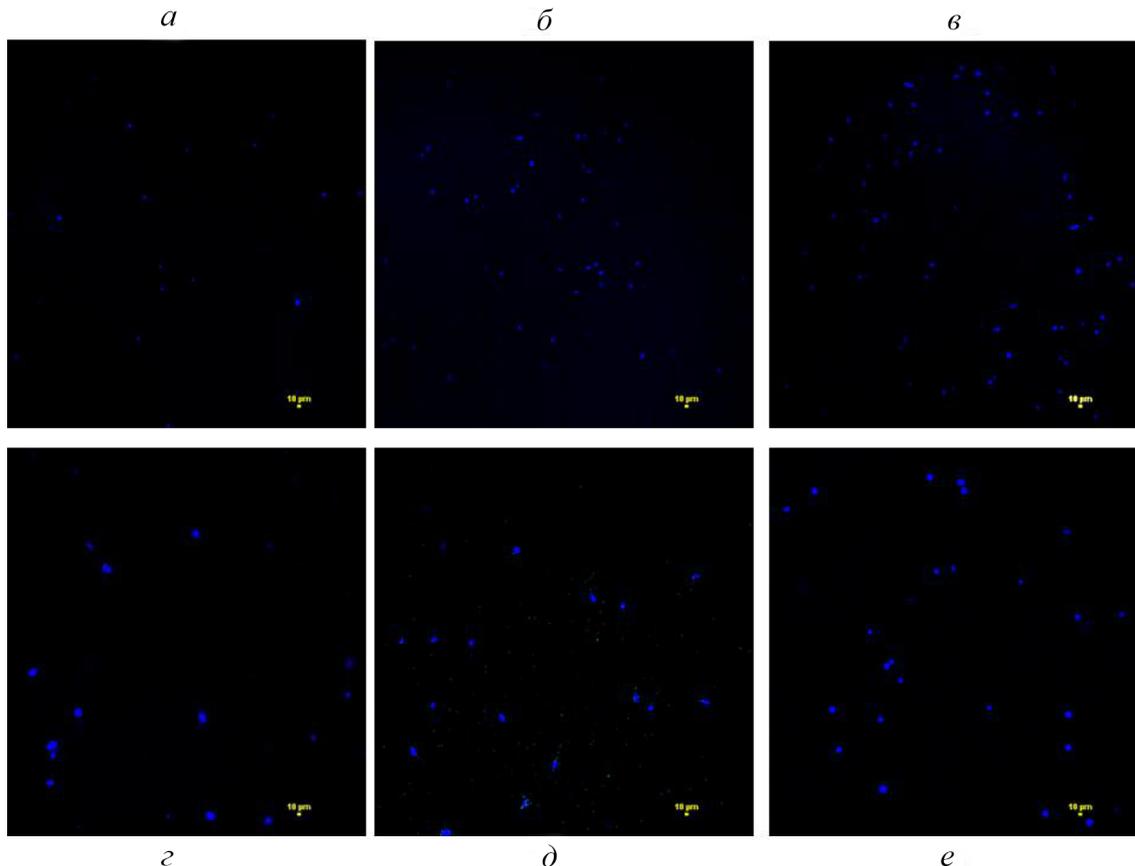


Рис. 1. Определение содержания внутриклеточного цинка в клетках RD и THP-1. Клетки обрабатывали 25 мкМ цинка или 5 мкМ TPEN в течение 4 ч. Затем клетки промывали PBS для удаления красителя вне клеток и получали изображения при λ_{ex} 359 нм/ λ_{em} 485 нм, фиксируя синюю флуоресценцию комплекса цинка и этилового эфира Zinquin. Клетки THP-1: *a* – использованные в качестве контроля не обработанные красителем; *б* – обработанные 25 мкМ цинка; *в* – обработанные 5 мкМ TPEN. Аналогично клетки RD: *г* – использованные в качестве контроля не обработанные красителем; *д* – обработанные 25 мкМ цинка; *е* – обработанные 5 мкМ TPEN; инкубировали с 10 мкМ этилового эфира Zinquin в течение 30 мин. (С цветными вариантами рис. 1, 5 и 6 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

разом, обе линии клеток THP-1 и RD реагируют на уровень цинка, и эти результаты подтверждают данные, полученные нами ранее на клетках кости [36].

Экспрессия MT, hZnTs и hZIPs в ответ на добавление цинка. Уровни экспрессии MT, hZnTs и hZIPs (h – human, белки клеток человека) в клетках THP-1 измеряли с помощью qRT-PCR при добавлении 25 мкМ цинка (ZnSO_4). Значительное ($p < 0,05$) повышение (в 22 раза) уровня мРНК металлотионеина (MT) в клетках THP-1 свидетельствует о сильном ответе на добавление цинка (рис. 2, *a*; табл. S3 в Приложении). Аналогично наблюдалось значительное ($p < 0,05$) повышение (в 2,9 раза) уровня экспрессии мРНК ZnT1 в клетках THP-1 (рис. 2, *a*). Более того, данное наблюдение было подтверждено повышенной экспрессией белка ZnT1 (рис. 3, *a*). Экспрессия ZIP9 в клетках THP-1

также значительно ($p < 0,05$) повышалась (в 1,3 раза) по сравнению с контролем при их обработке экзогенным цинком (рис. 2, *б*).

Аналогично значительное ($p < 0,05$) повышение экспрессии металлотионеина (в 25 раз) и ZnT1 (в 5,6 раза) в клетках RD указывает на их положительный ответ на избыток цинка в среде (рис. 2, *в*). Более того, методом вестерн-блоттинга было подтверждено повышение уровня белка ZnT1 в этих клетках (рис. 3, *б*). При исследовании различных белков ZIPs было обнаружено значительное снижение (в 0,3 раза) уровня экспрессии белка ZIP10 в сравнении с необработанным контролем (рис. 2, *г*).

Добавление цинка не оказало заметного влияния на экспрессию других белков ZnTs (ZnT4–ZnT7 и ZnT9) и ZIPs (ZIP1, ZIP3, ZIP6–ZIP9, ZIP13 и ZIP14). В клетках THP-1 и RD экспрессии белков ZnT2, ZnT3, ZnT8,

ZnT10, ZIP2, ZIP4, ZIP5 и ZIP12 выявлено не было.

Насколько нам известно, к настоящему моменту не опубликовано работ о кинетике экспрессии большинства транспортеров цинка в мышцах человека (преобладающий резервуар Zn) в ответ на флуктуации уровня цинка и условия воспаления. Экспрессия металлотioneина MT, цинк-запасующего белка, зависит от уровня цинка и может оказывать влияние на множество внутриклеточных процессов [37, 38]. В клетках THP-1 и RD было выявлено значительное повышение уровня MT (в 22–25 раз в клетках THP-1 и RD) в ответ на добавление цинка. Эти результаты согласуются с ранее полученными данными *in vitro* исследований касательно ответа THP-1 на избыток цинка [39].

Металлозависимый фактор транскрипции MTF играет важную роль в активации транскрипции MT и ZnT1 в ответ на металлы [40, 41]. Поэтому, как и ожидалось, в клетках THP-1 и RD при достаточности цинка значи-

тельно повышались уровни MT и ZnT1, что подтверждало полученные ранее данные *in vitro* (клетки THP-1) и *in vivo* (тонкий кишечник, печень и почки) [42–44]. Несмотря на функционально противоположные роли в поддержании гомеостаза цинка в презентруемых тканях (THP-1 – моноциты и клетки RD – мышцы), их общий способ регуляции через MTF-1-опосредованную активацию в присутствии или отсутствии цинка [40, 41] предполагает наличие общего способа оценки уровня цинка в организме в целом. Поэтому мы предположили, что ZnT1 является одним из основных транспортеров цинка, регулирующих содержание цинка в мышечных клетках и в моноцитах, что согласуется с его повсеместной экспрессией в качестве эффлюксного транспортера в плазматической мембране различных типов клеток [45]. Отсутствие реакции некоторых из белков ZnTs и ZIPs на добавление Zn может быть связано с их ролью в гомеостазе Zn. Например, ZnT4 и ZnT6 переносят Zn из внутриклеточных компартмен-

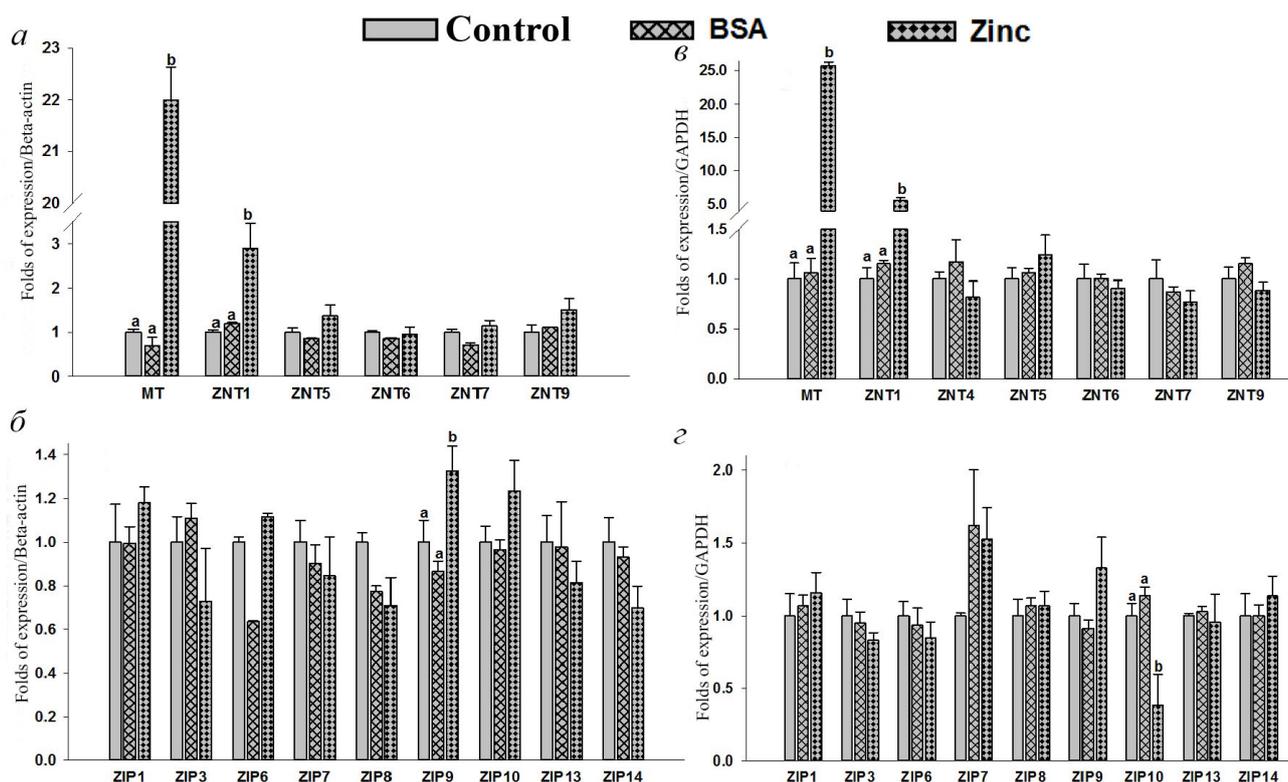


Рис. 2. Экспрессия генов транспортеров цинка в клетках THP-1 и RD. Тотальная РНК была выделена и затем синтезирована кДНК. Определение относительного количества мРНК проводили методом qPCR с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green. мРНК нормализовали относительно мРНК β -актина и ГАФДГ. Клетки THP-1: *a* – уровни мРНК MT, hZnTs; *b* – уровни мРНК hZIPs. Клетки RD: *c* – уровни мРНК MT, hZnTs; *d* – уровни мРНК hZIPs. Клетки были обработаны 25 мкМ цинка в течение 4 ч. Столбцы представляют среднее значение \pm SE трех повторов ($n = 3$) трех независимых экспериментов. Верхние индексы означают значимые различия при $p < 0,05$. Достоверность различий между обработанными и контрольными клетками анализировали с помощью метода ANOVA и последующего множественного сравнения по критерию Даннета (Dunnett's *t*-test)

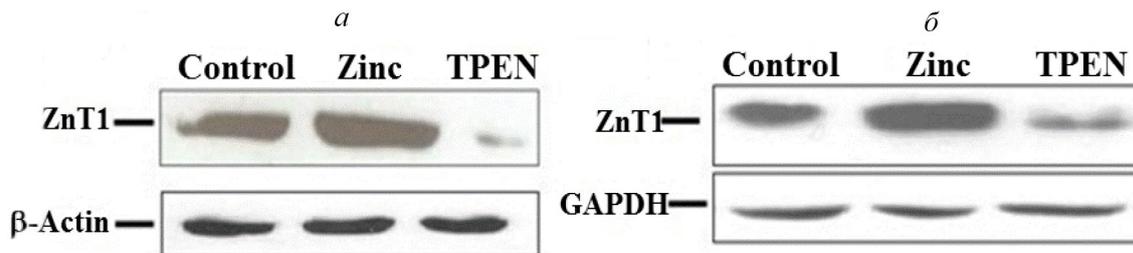


Рис. 3. Вестерн-блоттинг для определения общего уровня транспортеров ZnT1 в клетках THP-1 и RD после добавления или удаления цинка на 4 ч. *а* – Клетки THP-1; *б* – клетки RD; обрабатывали цинком или TPEN (хелатор цинка). Control – контроль, Zinc – добавление 25 мкМ цинка, TPEN – удаление цинка путем внутриклеточного хелатирования. ГАФДГ использовалась в качестве внутреннего контроля в случае клеток RD, а β-актин – для клеток THP-1 для нормализации содержания белка

тов на периферию при достаточно высокой концентрации Zn [46]. Также был показан более выраженный ответ ZIP4 на недостаток Zn в сравнении с его достаточным уровнем [46].

Кроме того, результаты настоящей работы согласуются с результатами Overbeck et al., которые наблюдали низкий уровень экспрессии белка ZnT4 и отсутствие экспрессии ZnT2, ZnT3 и ZnT8 в клетках THP-1, культивированных с сульфатом цинка [43]. В то время как никаких значительных изменений уровня мРНК ZnT5 в клетках THP-1 в присутствии цинка отмечено не было, все же было зарегистрировано снижение уровня белка [43]. Известно, что MTF-1 играет двойственную роль, активирующую или ингибирующую, в зависимости от уровня Zn. Он снижает экспрессию ZIP10 в условиях достаточности Zn и повышает её при дефиците Zn [47]. Тем не менее при добавлении цинка к клеткам экспрессия ZIP10 в клетках THP-1 существенно не изменилась, в то время как в клетках RD было зафиксировано ее снижение, что подтверждает данные работы Ryu et al. (2008) [48]. Подавление экспрессии ZIP10 в условиях достаточности Zn может быть связано с механизмом регуляции, включающим связывание MTF-1 с металл-респонсивными элементами (MRE), в ходе которого MTF-1 приостанавливает транскрипцию Pol II [46].

Влияние дефицита цинка на экспрессию MT, ZnTs и ZIPs в клетках THP-1 и RD. Элиминация внутриклеточного цинка с помощью TPEN приводила к значительному снижению экспрессии MT (в 0,55 раза), ZnT1 (в 0,13 раз), ZnT5 (в 0,58 раз) и ZnT6 (в 0,44 раз) в клетках THP-1 в сравнении с контролем (рис. 4, *а*). Уровень синтеза мРНК коррелировал с уровнем белка ZnT1, определяемым методом вестерн-блоттинга (рис. 3, *а*). Данные по снижению экспрессии MT, ZnT1, ZnT5 и ZnT6 подтверждают ранее полученные результаты на клетках THP-1 в условиях дефицита цинка [39, 49]. В то же время было по-

казано значительное повышение экспрессии ZIP9 (в 1,81 раз), ZIP10 (в 4,7 раза) и ZIP14 (~4,9 раз) и снижение экспрессии ZIP13 (в 0,3 раза) в клетках THP-1 в условиях дефицита цинка (рис. 4, *б*). В то же время недостаток Zn не оказывал заметного влияния на экспрессию ZnT4, ZnT7, ZnT9, а также ZIP1, ZIP3, ZIP6, ZIP7 и ZIP8. С другой стороны, в условиях дефицита цинка в клетках THP-1 экспрессия ZnT2, ZnT3, ZnT8, ZnT10, ZIP2, ZIP4, ZIP5 и ZIP12 не детектировалась. В случае ZIP2, полученные нами результаты противоречат ранее полученным данным о важной роли этого белка в Zn-дефицитных клетках THP-1, что может быть связано с методологическими различиями в инкубации с 5 мкМ TPEN в течение 18 ч или же с 16 мкМ TPEN в течение 4 ч для создания условий внутриклеточной недостаточности цинка [35, 39].

Аналогично в ответ на дефицит цинка клетки RD отвечали значительным снижением экспрессии MT (в 0,5 раза) и ZnT1 (в 0,3 раза) (рис. 4, *в*), что было подтверждено уровнем экспрессии белков (рис. 3, *б*). Однако в этих условиях экспрессия ZnT5, ZnT7, ZIP6, ZIP8, ZIP10, ZIP13 и ZIP14 значительно повышалась в 1,9; 1,5; 1,5; 1,4; 2,5; 1,7 и 1,6 раза соответственно по сравнению с контролем (рис. 4, *в, г*). В отличие от клеток THP-1, в условиях дефицита цинка в клетках RD повышалась экспрессия ZnT5. Тем не менее дефицит Zn не оказывал заметного влияния на паттерны экспрессии других белков ZnTs (ZnT4, ZnT6, ZnT9) и ZIPs (ZIP1, ZIP3, ZIP7). Также наблюдалось некоторое повышение экспрессии ZIP9, но оно не было статистически достоверным. Экспрессия восьми транспортеров цинка не детектировалась (ZnT2, ZnT3, ZnT8, ZnT10 и ZIP2, ZIP4, ZIP5, ZIP12). Таким образом, в клетках THP-1 и RD в условиях дефицита Zn транспортеры ZIPs экспрессируются в различной степени.

Было показано, что двойственная роль MTF-1 является причиной снижения экспрес-

сии ZIP10 при избытке цинка и повышении его экспрессии в условиях дефицита цинка [47]. Наши данные по ZIP10 в клетках THP-1 и RD согласуются с этими наблюдениями: экспрессия ZIP10 в клетках THP-1 и RD в условиях дефицита цинка повышалась в 4,7 и 2,5 раза соответственно [46, 47]. Среди разнообразных эффлюксных и инфлюксных транспортеров цинка MT, ZnT1 и ZIP10, вероятно, регулируются сходными механизмами в условиях избытка и недостатка цинка в моноцитах и мышечных клетках. При этом мы наблюдали противоположные паттерны экспрессии ZIP13 и ZIP14 в клетках THP-1 и RD в условиях дефицита цинка. С помощью нокаута генов *Zip13* и *Zip14* у мышей было показано, что эти транспортеры Zn регулируют Zn-опосредованные сигнальные пути, и поэтому аномальная их экспрессия вызывала нарушения роста и гомеостаза костей [46]. Эти данные способствуют пониманию роли MTF-1 в регуляции MT, ZnT1 и ZIPs (ZIP10, ZIP13 и ZIP14) в ответ на изменение уровня Zn в клетках THP-1 и RD.

Влияние Tat-индуцированного воспаления на MHC-I и внутриклеточный TNF- α . С помощью метода флуоресцентно-активированной сортировки клеток (FACS) в совместно культивируемых клетках THP-1 и RD оценивался эффект Tat (100 нг/мл) на MHC-I. Было обнаружено, что уровни экспрессии MHC-I в присутствии Tat остаются без изменений в обоих типах клеток по сравнению с соответствующими контрольными клетками (рис. 5). В то же время в клетках THP-1 значительно повышался уровень внутриклеточного TNF- α (~3,6 раза) в присутствии Tat (100 нг/мл) в сравнении с необработанными контрольными клетками (рис. 6).

Для понимания эффекта воспаления на транспортеры цинка мы провели совместное культивирование клеток THP-1 и мышечных клеток RD для стимулирования перекрестных связей между репрезентативными тканями и обработали их пептидами HIV-1 Tat в течение 8 ч. В предыдущих работах по изучению воспалительного ответа клеток THP-1 на обработку бел-

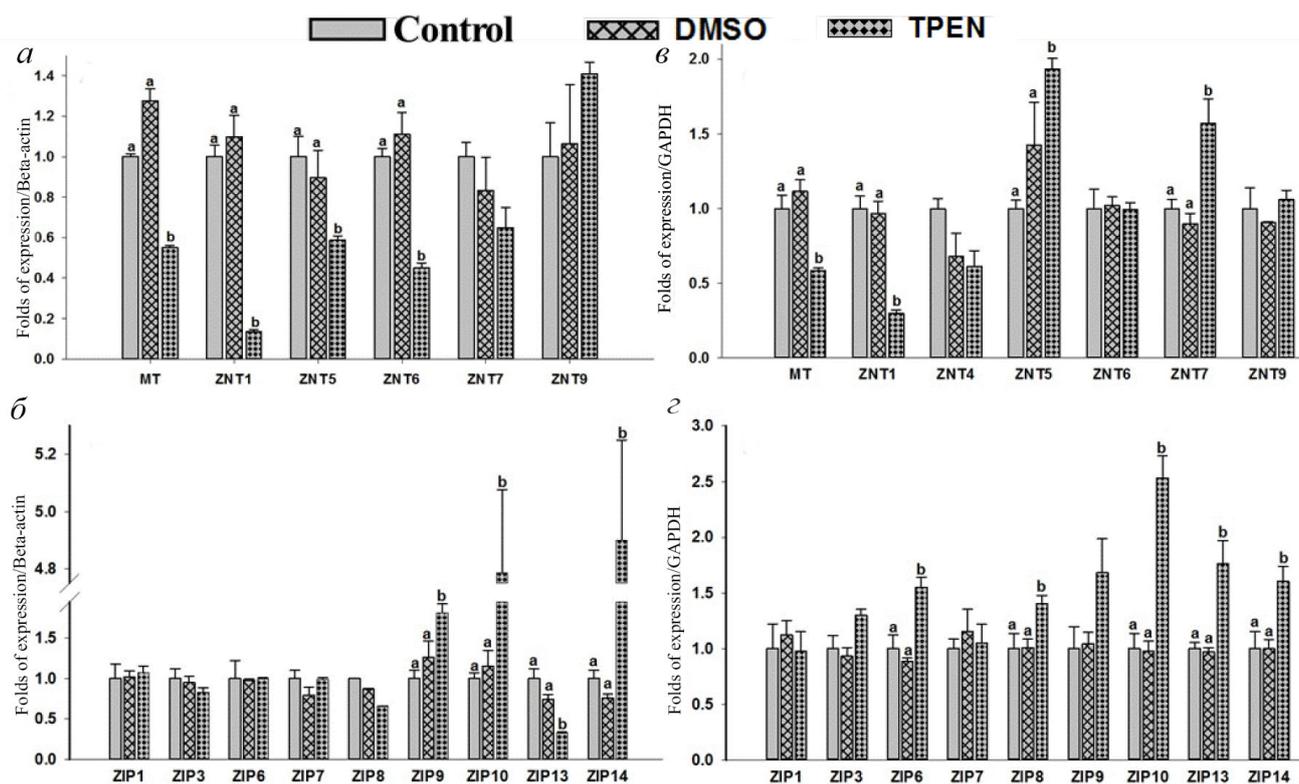


Рис. 4. Экспрессия генов транспортеров цинка в ответ на обработку TREN в клетках THP-1 и RD. Выделяли препарат тотальной РНК и синтезировали кДНК. Определение относительного количества мРНК проводили методом qPCR с использованием интеркалирующего красителя SYBR Green. мРНК нормализовали относительно мРНК β -актина и ГАФДГ. Уровни экспрессии мРНК в клетках, обработанных 5 мкМ TREN: *a* – уровни мРНК MT и hZnTs в клетках THP-1; *b* – уровни мРНК hZIPs в клетках THP-1; *c* – уровни мРНК MT и hZnTs в клетках RD; *d* – уровни мРНК hZIPs в клетках RD. Столбцы представляют среднее значение \pm SE трех повторов ($n = 3$) трех независимых экспериментов. Верхние индексы означают значимые различия при $p < 0,05$. Достоверность различий между обработанными и контрольными клетками анализировали с помощью метода ANOVA и последующего множественного сравнения по критерию Даннета (Dunnett's *t*-test)

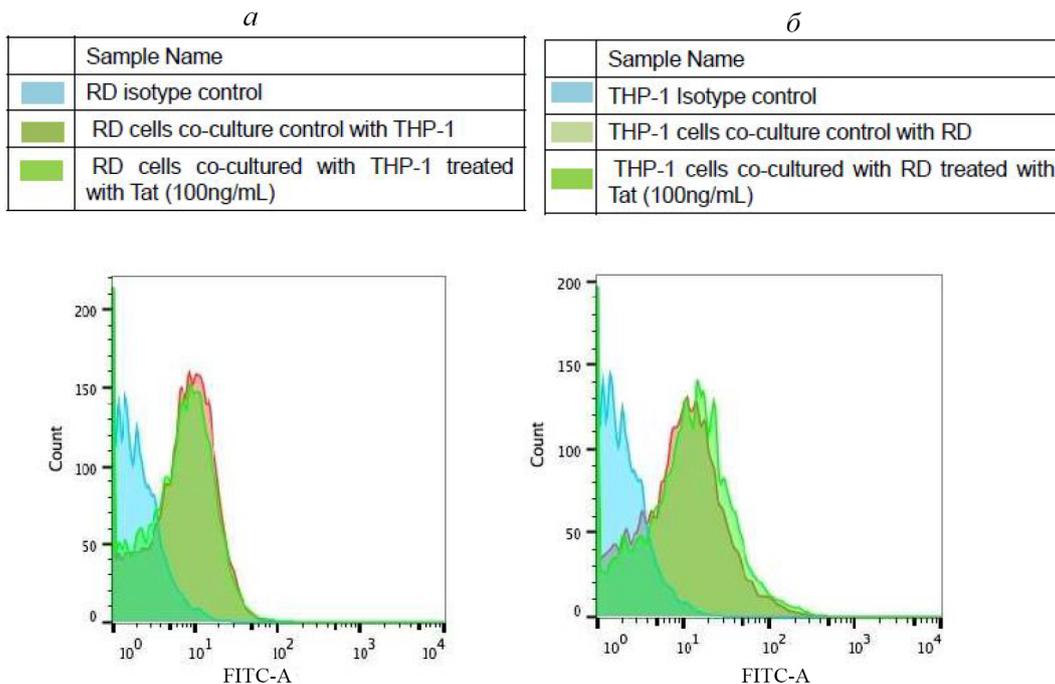


Рис. 5. Экспрессия МНС-I в обработанных Tat клетках RD и THP-1. Совместно культивируемые мышечные клетки RD (*a*) и моноциты THP-1 (*б*) были обработаны набором пептидов HIV-1 Tat в течение 8 ч, и экспрессия МНС-I оценивалась с помощью проточной цитометрии. Данные показаны на гистограмме: клетки, культивированные в обычной среде (контрольная гистограмма) с наложенной гистограммой для экспериментальных клеток, обработанных Tat (показаны различными цветами)

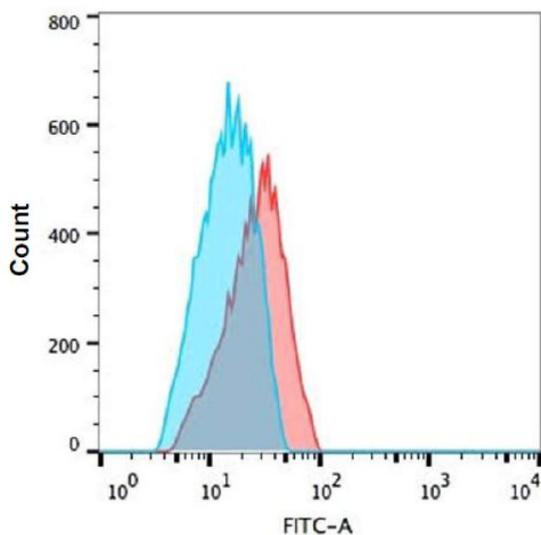


Рис. 6. Экспрессия TNF- α в обработанных Tat клетках THP-1. Совместно культивируемые клетки THP-1 обрабатывали набором пептидов Tat в концентрации 100 нг/мл в течение 8 ч. Экспрессию TNF- α определяли с помощью проточной цитометрии с окрашиванием внутриклеточного цитокина TNF- α . Данные показаны на гистограмме: контрольная гистограмма показана синим цветом; клетки, обработанные Tat, показаны красным цветом. Сдвиг означает повышение экспрессии TNF- α . Клетки, культивированные в обычной среде (контрольная гистограмма синего цвета) с наложенной гистограммой для экспериментальных клеток, обработанных Tat (показана красной линией)

ком Tat (100 нМ в течение 12 ч) было показано повышение уровня TNF- α [50]. Наши данные также демонстрируют значительное повышение уровня внутриклеточного TNF- α в совместно культивируемых клетках THP-1, подвергшихся воздействию белка Tat.

Влияние Tat на экспрессию транспортеров цинка в совместно культивируемых клетках THP-1. В клетках THP-1, культивированных совместно с клетками RD, был зарегистрирован воспалительный ответ на Tat в виде повышенного в 1,4 раза уровня IL-1 β (рис. 7, *a*). В то же время различий в уровне IL-6 в сокультивируемых THP-1 по сравнению контрольными сокультивируемыми клетками не было. В работах по изучению влияния белка Tat на макрофаги при обработке им в течение 4 ч было показано повышение уровней IL-6 и IL-1 β [51]. В настоящей работе была продемонстрирована значительная экспрессия IL-1 β в клетках THP-1, обработанных Tat; однако для IL-6 такого эффекта обнаружено не было. Tat-индуцированное воспаление приводило к значительному ($p < 0,05$) снижению (в 0,5 раза) уровня транспортеров цинка ZIP7 и ZIP14 в совместно культивируемых клетках THP-1 по сравнению с необработанными контрольными клетками (рис. 7, *б*). Эти результаты согласуются с ответом дендритных клеток (DCs)

мыши на обработку липополисахаридом (LPS), при которой происходит снижение экспрессии ZIP6 и ZIP10, в то время как экспрессия ZnT1, ZnT4 и ZnT6 повышается, вызывая снижение содержания цинка в цитозоле [52]. В сокультурированных с RD клетках ТНР-1 после обработки белком Tat наблюдалось повышение уровня ZIP9, однако оно не было статистически достоверным. При этом значительных изменений уровней MT, ZnT1, ZnT4–ZnT7, ZnT9, ZIP1, ZIP3, ZIP6, ZIP8, ZIP10 и ZIP-13 в сокультурированных с RD клетках ТНР-1, обработанных белком Tat, не наблюдалось.

Аналогично влияние Tat на экспрессию белков ZIPs (инфлюксные транспортеры цинка) предполагает значительное снижение экспрессии ZIP7 и ZIP14 в совместно культивируемых клетках ТНР-1. Эти данные согласуются с предыдущими исследованиями действия воспаления на клетки эпителия легких [53]. Напротив же, инфекция и воспаление вызывают повышение экспрессии ZIP14 посредством IL-6/IL-1 β , приводящее к возникновению гипоцинкемии в

результате транспортировки цинка в печень [54, 55]. Согласно литературным данным, стимуляция воспаления посредством LPS в дендритных клетках приводит к снижению экспрессии ZIP6 и повышению МНС-II [56]. Таким образом, полученные нами данные об отсутствии изменений уровня МНС-I могут быть обусловлены неизменным уровнем ZIP6 при воздействии Tat. Кроме того, очевидно, что дендритные клетки с повышенной экспрессией ZIP6 не способны активировать антиген-специфичные клетки CD4⁺ Th [52].

Известно, что ZIP14 локализуется на плазматической мембране и импортирует цинк в цитоплазму из внеклеточной среды. В настоящей работе было показано, что экспрессия ZIP14 в ответ на белок HIV-1 Tat снижается. Мы предполагаем, что снижение экспрессии ZIP14 может способствовать сохранению уровня сывороточного цинка, что может благоприятствовать инфицированию ВИЧ. С другой стороны, недостаточное количество цинка в клетках ТНР-1 приводит к запуску апоптоза [57, 58].

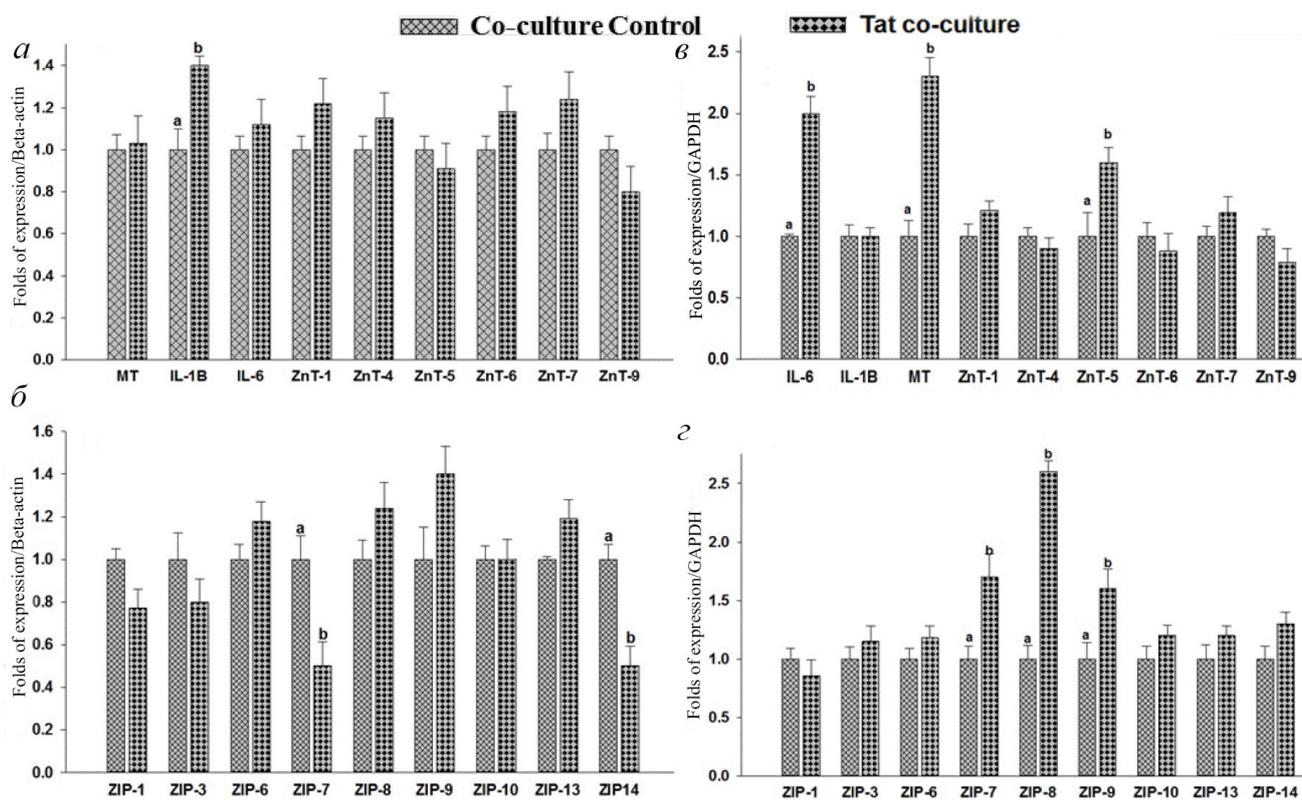


Рис. 7. Экспрессия генов в сокультурируемых клетках ТНР-1 и RD. После выделения РНК определяли относительное количество мРНК с использованием ПЦР в реальном времени с окрашиванием SYBR Green. Уровни мРНК нормализовали относительно мРНК β -актина и GAPDH. Уровни экспрессии мРНК в клетках, обработанных Tat (100 нг/мл) в течение 8 ч: *a* – уровни экспрессии белков hZnTs в клетках ТНР-1; *b* – белков hZIPs в клетках ТНР-1; *c* – белков hZnTs в клетках RD; *d* – белков hZIPs в клетках RD. Столбцы представляют среднее значение \pm SE ($n = 3$). Верхние индексы обозначают статистически достоверные различия при $p < 0,05$ с использованием парного независимого критерия

Влияние Tat на экспрессию транспортеров цинка в совместно культивированных клетках RD. В совместно культивированных с ТНР-1 клетках RD наблюдается значительное ($p < 0,05$) повышение уровня IL-6 (в 2 раза) в сравнении с необработанными контрольными клетками, что предположительно свидетельствует о провоспалительном ответе на Tat (рис. 7, в). В то же время уровни IL-1 β в совместно культивированных клетках RD, обработанных и не обработанных пептидами Tat, относительно одинаковы. Ответ металлотионеина (MT) на обработку Tat заключался в значительном повышении (в 2,3 раза) его содержания в совместно культивированных клетках RD по сравнению с контрольными необработанными клетками. Ранее было показано, что Tat-индуцированные воспалительные ответы являются тканеспецифичными, и дифференциальная экспрессия была подтверждена паттерном экспрессии IL-6: в мононуклеарных клетках периферической крови PBMCs – минимальный ответ, в ТНР-1 – слабый и в астроцитах – сильный ответ на воздействие пептидов Tat [59].

Аналогично значительно повышался уровень транспортеров цинка ZnT5 (в 1,6 раза), ZIP7 (в 1,7 раза), ZIP8 (в 2,6 раза) и ZIP9 (в 1,6 раза) в совместно культивированных клетках RD в ответ на обработку Tat (рис. 7, г). В то же время заметных изменений уровня других белков ZnTs (ZnT1, ZnT4, ZnT6, ZnT7, ZnT9) и ZIPs (ZIP1, ZIP3, ZIP6, ZIP10, ZIP13, ZIP14) в обработанных Tat клетках RD после их сокультивирования с клетками ТНР-1 зарегистрировано не было (рис. 7, в и г).

Влияние белка Tat на экспрессию белков ZIPs, инфлюксных транспортеров цинка, свидетельствует о значительном снижении экспрессии ZIP7 и ZIP14 в совместно культивированных клетках ТНР-1, в то время как в клетках RD было зафиксировано повышение экспрессии ZIP7, ZIP8 и ZIP9. Возможно, мышечные клетки дают сигнал моноцитам снижать экспрессию белков ZIPs, чтобы они могли запасти больше цинка. Однако настоящая работа ограничена отсутствием данных по транскрипционной регуляции MTF-1 и маркеров апоптоза, и потому мы не можем проверить наше предположение.

Похоже, что два функционально противоположных типа клеток, RD (мышцы) и ТНР-1 (моноциты), поддерживают гомеостаз внутрикле-

точного цинка путем скоординированной регуляции MT и транспортеров цинка и совместно действия для модуляции транзиторных изменений уровня цинка. Продемонстрировано, что ZIP10 подвергается дифференциальному регулированию в мышцах, так как его уровень снижался при избытке цинка, но оставался неизменным в клетках ТНР-1 в тех же условиях. HIV-1 Tat-опосредованное воспаление вызывало снижение экспрессии некоторых транспортеров цинка, например, ZIP7 и ZIP14, особенно в клетках ТНР-1, сокультивируемых с клетками RD, в то время как в мышечных клетках RD уровни белков ZIPs были повышены. Это может указывать на перенаправление цинка в мышцы и работать таким образом в качестве пассивного резервуара цинка. Снижение количества моноцитов у больных ВИЧ/СПИД, вероятно, опосредованно снижением уровня внутриклеточного цинка, что приводит к запуску апоптоза в моноцитах. Несмотря на то что результаты настоящей работы основаны на модели клеточных линий, это может помочь нам понять природу различных ответов клеток на уровень цинка и воспаление.

Финансирование. Выполнение данной работы проходило при поддержке грантов, предоставленных К. П. М. Наиру, и гранта, выделенного С. Гошу (5/9/1137/2014-NUT) Индийским советом по медицинским исследованиям (Indian Council of Medical Research), Индия. Авторы выражают благодарность д-ру Б. Динешу Кумару, научному сотруднику G & Head-DTRC, за совместное использование оборудования и реагентов из проекта ICMR-Taskforce № HIV/62/47/2016-ECD-II.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Благодарности. Авторы выражают благодарность CSIR – New Delhi (Индия) за финансовую поддержку, оказанную Кирану Аллури для JRF и SRF (09/484/(0050)/2012-EMR-1).

Соблюдение этических норм. В данной статье не содержатся результаты работ с участием людей или лабораторных животных, выполненных кем-либо из авторов статьи.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/bioximiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 86, вып. 2, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kambe, T., Tsuji, T., Hashimoto, A., and Isumura, N. (2015) The physiological, biochemical, and molecular roles of zinc transporters in zinc homeostasis and metabolism, *Physiol. Rev.*, **95**, 749-784.
- Jackson, M. (1989) *Physiology of Zinc: General Aspects, Zinc in Human Biology*, pp. 1-14.
- Beck, F. W., Kaplan, J., Fine, N., Handschu, W., and Prasad, A. S. (1997) Decreased expression of CD73 (ecto-5'-nucleotidase) in the CD8⁺ subset is associated with zinc deficiency in human patients, *J. Lab. Clin. Med.*, **130**, 147-156.
- Prasad, A. S. (2008) Zinc in human health: effect of zinc on immune cells, *Mol. Med.*, **14**, 353-357.
- Giacconi, R., Malavolta, M., Costarelli, L., Busco, F., Galeazzi, R., et al. (2012) Comparison of intracellular zinc signals in nonadherent lymphocytes from young-adult and elderly donors: role of zinc transporters (Zip family) and proinflammatory cytokines, *J. Nutr. Biochem.*, **23**, 1256-1263.
- Mao, X., Kim, B. E., Wang, F., Eide, D. J., and Petris, M. J. (2007) A histidine-rich cluster mediates the ubiquitination and degradation of the human zinc transporter, hZIP4, and protects against zinc cytotoxicity, *J. Biol. Chem.*, **282**, 6992-7000.
- Weaver, B. P., and Andrews, G. K. (2012) Regulation of zinc-responsive Slc39a5 (Zip5) translation is mediated by conserved elements in the 3'-untranslated region, *Biomaterials*, **25**, 319-335.
- Mocchegiani, E., Giacconi, R., Cipriano, C., and Malavolta, M. (2009) NK and NKT cells in aging and longevity: role of zinc and metallothioneins, *J. Clin. Immunol.*, **29**, 416-425.
- Nishida, K., Hasegawa, A., Nakae, S., Oboki, K., Saito, H., et al. (2009) Zinc transporter Znt5/Slc30a5 is required for the mast cell-mediated delayed-type allergic reaction but not the immediate-type reaction, *J. Exp. Med.*, **206**, 1351-1364.
- Liu, M.-J., Bao, S., Gálvez-Peralta, M., Pyle, C. J., Rudawsky, A. C., et al. (2013) The zinc transporter SLC39A8 is a negative feedback regulator of NF- κ B through zinc-mediated inhibition of IKK, *Cell Rep.*, **3**, 386.
- Taniguchi, M., Fukunaka, A., Hagihara, M., Watanabe, K., Kamino, S., Kambe, T., Enomoto, S., and Hiromura, M. (2013) Essential role of the zinc transporter ZIP9/SLC39A9 in regulating the activations of Akt and Erk in B-cell receptor signaling pathway in DT40 cells, *PLoS One*, **8**, e58022.
- Haraguchi, Y., Sakurai, H., Hussain, S., Anner, B. M., and Hoshino, H. (1999) Inhibition of HIV-1 infection by zinc group metal compounds, *Antiviral Res.*, **43**, 123-133.
- Mocchegiani, E., and Muzzioli, M. (2000) Therapeutic application of zinc in human immunodeficiency virus against opportunistic infections, *J. Nutr.*, **130**, 1424S-1431S.
- Bobat, R., Coovadia, H., Stephen, C., Naidoo, K. L., McKerrow, N., Black, R. E., and Moss, W. J. (2005) Safety and efficacy of zinc supplementation for children with HIV-1 infection in South Africa: a randomised double-blind placebo-controlled trial, *Lancet*, **366**, 1862-1867.
- Baum, M. K., Lai, S., Sales, S., Page, J. B., and Campa, A. (2010) Randomized, controlled clinical trial of zinc supplementation to prevent immunological failure in HIV-infected adults, *Clin. Infect. Dis.*, **50**, 1653-1660.
- Tang, A. M., Graham, N. M., Kirby, A. J., McCall, L. D., Willett, W. C., and Saah, A. J. (1993) dietary micronutrient intake and risk of progression to Acquired Immunodeficiency Syndrome (AIDS) in Human Immunodeficiency Virus Type 1 (HIV-1)-infected homosexual men, *Am. J. Epidemiol.*, **138**, 937-951.
- Lee, S. P., and Han, M. K. (1996) Zinc stimulates Mg²⁺-dependent 3'-processing activity of human immunodeficiency virus type 1 integrase *in vitro*, *Biochemistry*, **35**, 3837-3844.
- Rice, W. G., Schaeffer, C. A., Harten, B., Villinger, F., South, T. L., et al. (1993) Inhibition of HIV-1 infectivity by zinc-ejecting aromatic C-nitroso compounds, *Nature*, **361**, 473-475.
- Reid, W., Sadowska, M., Denaro, F., Rao, S., Foulke, J., et al. (2001) An HIV-1 transgenic rat that develops HIV-related pathology and immunologic dysfunction, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **98**, 9271-9276.
- Reid, W., Abdelwahab, S., Sadowska, M., Huso, D., Neal, A., et al. (2004) HIV-1 transgenic rats develop T cell abnormalities, *Virology*, **321**, 111-119.
- Purvis, S. F., Jacobberger, J. W., Sramkoski, R. M., Patki, A. H., and Lederman, M. M. (1995) HIV type 1 Tat protein induces apoptosis and death in Jurkat cells, *AIDS Res. Hum. Retroviruses*, **11**, 443-450.
- Bettaccini, A. A., Baj, A., Accolla, R. S., Basolo, F., and Toniolo, A. Q. (2005) Proliferative activity of extracellular HIV-1 Tat protein in human epithelial cells: expression profile of pathogenetically relevant genes, *BMC Microbiol.*, **5**, 20.
- Frankel, A. D., Brecht, D. S., and Pabo, C. O. (1988) Tat protein from human immunodeficiency virus forms a metal-linked dimer, *Science*, **240**, 70-73.
- Canani, R. B., Ruotolo, S., Buccigrossi, V., Passariello, A., Porcaro, F., Siani, M. C., and Guarino, A. (2007) Zinc fights diarrhoea in HIV-1-infected children: in-vitro evidence to link clinical data and pathophysiological mechanism, *AIDS*, **21**, 108-110.
- Li, J. C., Yim, H. C., and Lau, A. S. (2010) Role of HIV-1 Tat in AIDS pathogenesis: its effects on cytokine dysregulation and contributions to the pathogenesis of opportunistic infection, *AIDS*, **24**, 1609-1623.
- Matsui, M., Warburton, R. J., Cogswell, P. C., Baldwin, A. S., Jr., and Frelinger, J. A. (1996) Effects of HIV-1 Tat on expression of HLA class I molecules, *J. Acquir. Immune Defic. Syndr. Hum. Retrovirol.*, **11**, 233-240.
- Gherardi, R. K. (1994) Skeletal muscle involvement in HIV-infected patients, *Neuropathol. Appl. Neurobiol.*, **20**, 232-237.
- Illa, I., Nath, A., and Dalakas, M. (1991) Immunocytochemical and virological characteristics of HIV-associated inflammatory myopathies: similarities with seronegative polymyositis, *Ann. Neurol.*, **29**, 474-481.
- Belec, L., Meillet, D., Hervann, A., Gresenguet, G., and Gherardi, R. (1994) Differential elevation of circulating interleukin-1 beta, tumor necrosis factor alpha, and interleukin-6 in AIDS associated cachectic states, *Clin. Diagn. Lab. Immunol.*, **1**, 117-120.
- Llovera, M., Garcia-Martinez, C., Agell, N., Lopez-Soriano, F. J., Authier, F. J., Gherardi, R. K., and Argiles,

- J. M. (1998) Ubiquitin and proteasome gene expression is increased in skeletal muscle of slim AIDS patients, *Int. J. Mol. Med.*, **2**, 69-73.
31. Gonzalez-Cadavid, N. F., Taylor, W. E., Yarasheski, K., Sinha-Hikim, I., Ma, K., et al. (1998) Organization of the human myostatin gene and expression in healthy men and HIV-infected men with muscle wasting, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **95**, 14938-14943.
 32. Tibaduiza, E. C., and Bobilya, D. J. (1996) Zinc transport across an endothelium includes vesicular cotransport with albumin, *J. Cell. Physiol.*, **167**, 539-547.
 33. Sreenivasulu, K., Raghu, P., and Nair, K. M. (2010) Polyphenol-rich beverages enhance zinc uptake and metallothionein expression in Caco-2 cells, *J. Food Sci.*, **75**, H123-H128.
 34. Coyle, P., Zalewski, P. D., Philcox, J. C., Forbes, I. J., Ward, A. D., et al. (1994) Measurement of zinc in hepatocytes by using a fluorescent probe, zinquin: relationship to metallothionein and intracellular zinc, *Biochem. J.*, **303**, 781-786.
 35. Chen, L., Frister, A., Wang, S., Ludwig, A., Behr, H., et al. (2009) Interaction of vascular smooth muscle cells and monocytes by soluble factors synergistically enhances interleukin-6 and MCP-1 production, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **296**, H987-H996.
 36. Alluri, K., Nair, K. P., Kotturu, S. K., and Ghosh, S. (2020) Transcriptional regulation of zinc transporters in human osteogenic sarcoma (Saos-2) cells to zinc supplementation and zinc depletion, *Biol. Trace Elem. Res.*, **194**, 360-367.
 37. Davis, S. R., and Cousins, R. J. (2000) Metallothionein expression in animals: a physiological perspective on function, *J. Nutr.*, **130**, 1085-1088.
 38. Alluri, K., Nair, K. P., and Ghosh, S. (2019) Differential expression of zinc transporters in functionally contrasting tissues involved in zinc homeostasis, *Nucleosides Nucleotides Nucleic Acids*, **18**, 1-5.
 39. Cao, J., Bobo, J. A., Liuzzi, J. P., and Cousins, R. J. (2001) Effects of intracellular zinc depletion on metallothionein and ZIP2 transporter expression and apoptosis, *J. Leukoc. Biol.*, **70**, 559-566.
 40. Andrews, G. K. (2000) Regulation of metallothionein gene expression by oxidative stress and metal ions, *Biochem. Pharmacol.*, **59**, 95-104.
 41. Langmade, S. J., Ravindra, R., Daniels, P. J., and Andrews, G. K. (2000) The transcription factor MTF-1 mediates metal regulation of the mouse ZnT1 gene, *J. Biol. Chem.*, **275**, 34803-34809.
 42. Cousins, R. J., Blanchard, R. K., Popp, M. P., Liu, L., Cao, J., et al. (2003) A global view of the selectivity of zinc deprivation and excess on genes expressed in human THP-1 mononuclear cells, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **100**, 6952-6957.
 43. Overbeck, S., Uciechowski, P., Ackland, M. L., Ford, D., and Rink, L. (2008) Intracellular zinc homeostasis in leukocyte subsets is regulated by different expression of zinc exporters ZnT-1 to ZnT-9, *J. Leuk. Biol.*, **83**, 368-380.
 44. Liuzzi, J. P., Blanchard, R. K., and Cousins, R. J. (2001) Differential regulation of zinc transporter 1, 2, and 4 mRNA expression by dietary zinc in rats, *J. Nutr.*, **131**, 46-52.
 45. Palmiter, R. D., and Findley, S. D. (1995) Cloning and functional characterization of a mammalian zinc transporter that confers resistance to zinc, *EMBO J.*, **14**, 639-649.
 46. Hara, T., Takeda, T. A., Takagishi, T., Fukue, K., Kambe, T., and Fukada, T. (2017) Physiological roles of zinc transporters: molecular and genetic importance in zinc homeostasis, *J. Physiol. Sci.*, **67**, 283-301.
 47. Lichten, L. A., Ryu, M.-S., Guo, L., Embury, J., and Cousins, R. J. (2011) MTF-1-mediated repression of the zinc transporter Zip10 is alleviated by zinc restriction, *PLoS One*, **6**, e21526.
 48. Ryu, M.-S., Lichten, L. A., Liuzzi, J. P., and Cousins, R. J. (2008) Zinc transporters ZnT1 (Slc30a1), Zip8 (Slc39a8), and Zip10 (Slc39a10) in mouse red blood cells are differentially regulated during erythroid development and by dietary zinc deficiency, *J. Nutr.*, **138**, 2076-2083.
 49. Hamon, R., Homan, C. C., Tran, H. B., Mukaro, V. R., Lester, S. E., et al. (2014) Zinc and zinc transporters in macrophages and their roles in efferocytosis in COPD, *PLoS One*, **9**, e110056.
 50. Chen, P., Mayne, M., Power, C., and Nath, A. (1997) The Tat protein of HIV-1 induces Tumor Necrosis Factor- α production implications for HIV-1-associated neurological diseases, *J. Biol. Chem.*, **272**, 22385-22388.
 51. Nath, A., Conant, K., Chen, P., Scott, C., and Major, E. O. (1999) Transient exposure to HIV-1 Tat protein results in cytokine production in macrophages and astrocytes A hit and run phenomenon, *J. Biol. Chem.*, **274**, 17098-17102.
 52. Hojyo, S., and Fukada, T. J. (2016) Roles of zinc signaling in the immune system, *Immunol. Res.*, **2016**, 6762343, doi:10.1155/2016/6762343.
 53. Lang, C. J., Murgia, C., Leong, M., Tan, L.-W., Perozzi, G., et al. (2006) Anti-inflammatory effects of zinc and alterations in zinc transporter mRNA in mouse models of allergic inflammation, *Am. J. Physiol. Lung Cell. Mol. Physiol.*, **292**, L577-L584.
 54. Liuzzi, J. P., Lichten, L. A., Rivera, S., Blanchard, R. K., Aydemir, T. B., et al. (2005) Interleukin-6 regulates the zinc transporter Zip14 in liver and contributes to the hypozincemia of the acute-phase response, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **102**, 6843-6848.
 55. Lichten, L. A., Liuzzi, J. P., and Cousins, R. J. (2009) Interleukin-1 β contributes via nitric oxide to the upregulation and functional activity of the zinc transporter Zip14 (Slc39a14) in murine hepatocytes, *Am. J. Physiol. Gastroint. Liver Physiol.*, **296**, G860-G867.
 56. Kitamura, H., Morikawa, H., Kamon, H., Iguchi, M., Hojyo, S., et al. (2006) Toll-like receptor-mediated regulation of zinc homeostasis influences dendritic cell function, *Nat. Immunol.*, **7**, 971-977.
 57. Li, C. J., Friedman, D. J., Wang, C., Metelev, V., and Pardee, A. B. (1995) Induction of apoptosis in uninfected lymphocytes by HIV-1 Tat protein, *Science*, **268**, 429-431.
 58. Chen, D., Wang, M., Zhou, S., and Zhou, Q. (2002) HIV-1 Tat targets microtubules to induce apoptosis, a process promoted by the pro-apoptotic Bcl-2 relative Bim, *EMBO J.*, **21**, 6801-6810.
 59. Joshi, P. C., and Guidot, D. M. (2011) HIV-1 transgene expression in rats induces differential expression of tumor necrosis factor alpha and zinc transporters in the liver and the lung, *AIDS Res. Ther.*, **8**, 36.

LEVELS OF ZINC TRANSPORTERS mRNA DEPENDING ON ZINC STATUS AND HIV-1 TAT-INDUCED INFLAMMATION IN MUSCLE (RD) AND MONOCYTE (THP-1) CELL LINES***K. Alluri¹, S. Reddy Yathapu², N. Babu Kondapalli³,
R. Hemalatha³, K. M. Nair^{4*}, and S. Ghosh^{1**}**¹ *Molecular Biology Division, ICMR-National Institute of Nutrition, 500007 Hyderabad, India; e-mail: bihongo@yahoo.com*² *Drug Toxicology Division, ICMR-National Institute of Nutrition, 500007 Hyderabad, India*³ *Microbiology and Immunology Division, ICMR-National Institute of Nutrition, 500007 Hyderabad, India*⁴ *Micronutrient Division, ICMR-National Institute of Nutrition, 500007 Hyderabad, India; e-mail: nairthayil@gmail.com*

Monocytes and muscles demonstrate functionally contrasting behavior under conditions of zinc deficiency with relation to zinc storage system (muscle retain zinc in contrast to monocytes). We aimed to understand the effects of zinc status and HIV-1 Tat mediated inflammation on expression of zinc transporters in these types of cells. Expression of zinc transporters [ZnTs, ZIPs, and metallothionein (MT)] was quantified by qRT-PCR in RD, THP-1 cells separately and in co-cultured THP-1–RD cells. ZnT1 protein expression levels were confirmed by Western blot. Significant increase of MT and ZnT1 mRNA in response to zinc supplementation and decrease during zinc deficiency indicates significance of the genes encoding transporters in maintaining zinc homeostasis in these tissues. In the RD cells ZIP10 exhibited inverse relation to zinc status whereas no correlation was found in the THP-1 cells. Tat-induced inflammation resulted in the significant elevation of MT, IL6, ZIP7, ZIP8, ZIP9 transcripts in the co-cultured RD cells, whereas THP-1 cells demonstrated increased IL-1 β levels and reduced levels of ZIP7 and ZIP14. Zinc status and HIV-1Tat induced inflammation appear to influence differential expression of MT, ZnTs, and ZIPs in the muscle and monocyte cells.

Keywords: zinc transporters, ZIPs, ZnTs, co-culture, HIV-1 Tat, THP-1, RD

УДК 615.31+616.43

ГЕПАТОПРОТЕКТОРНОЕ ДЕЙСТВИЕ НАГРУЖЕННЫХ ПОЛИДАТИНОМ ХИТОЗАНОВЫХ НАНОЧАСТИЦ У КРЫС С САХАРНЫМ ДИАБЕТОМ: МОДУЛЯЦИЯ МЕТАБОЛИЗМА ГЛЮКОЗЫ, ОКИСЛИТЕЛЬНОГО СТРЕССА И БИОМАРКЕРОВ ВОСПАЛИТЕЛЬНЫХ ПРОЦЕССОВ*

© 2021 А.М. Абд Эль-Хамид¹, А.И. Юсеф², С.М. Абд Эль-Тваб²,
А.А.Г. Эль-Шахави³, А. Абдель-Монеим^{2**}

¹ Chemistry Department, Faculty of Science, Taibah University, 30002 Al-Madinah Al-Munawarah, Saudi Arabia

² Molecular Physiology Division, Faculty of Science, Beni-Suef University, 62511 Beni-Suef, Egypt; E-mail: adel.hassan@science.bsu.edu.eg

³ Materials Science and Nanotechnology Department, Faculty of Postgraduate Studies for Advanced Sciences (PSAS), Beni-Suef University, 62511 Beni-Suef, Egypt

Поступила в редакцию 15.06.2020

После доработки 03.09.2020

Принята к публикации 09.09.2020

Полидадин (PD – polydatin) обладает широким набором фармакологической активности, однако его действие при диабетическом поражении печени изучено мало. Целью настоящей работы было исследование возможности защитного эффекта хитозановых наночастиц, нагруженных полидаатином (PD-CSNPs – polydatin-loaded chitosan nanoparticles), или свободным полидаатином при поражениях печени, ассоциированных с диабетом. Диабет у крыс индуцировали при помощи никотинамида и стрептозоцина. Животные были разделены на шесть групп: нормальный контроль, диабетический контроль, а также крысы, получавшие перорально ежедневно в течение 4-х недель полидадин, хитозановые наночастицы с полидаатином, ненагруженные хитозановые наночастицы или метформин. Добавление в пищу полидаatina и нагруженных полидаатином хитозановых наночастиц вызывало существенное снижение уровня глюкозы в крови и перекисного окисления липидов в печени, снижение активности трансаминаз и ферментов метаболизма углеводов в сыворотке крови, в том числе сукцинатдегидрогеназы и пируваткиназы. В то же время в печени, напротив, наблюдалось повышение уровня гликогена и глутатиона, а также активность антиоксидантных ферментов, таких как супероксиддисмутаза, глутатионпероксидаза, каталаза и глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа, в сравнении с контрольными диабетическими крысами. Кроме того, значительно снижалась экспрессия мРНК фактора некроза опухолей α и интерлейкина 1β , в то время как уровни мРНК транспортера глюкозы 2 и глюкокиназы значительно повышались по сравнению с диабетическим контролем. На основании полученных результатов мы заключили, что PD-CSNPs и PD оказывали положительное воздействие при диабетическом поражении печени путем модуляции экспрессии транспортера глюкозы 2, влияющей на активность ферментов метаболизма углеводов, а также подавляли окислительный стресс и воспаление. Было показано, что PD-CSNPs являются более эффективным препаратом по сравнению со свободным PD, вероятно, благодаря более высокой биодоступности и пролонгированному высвобождению PD из наночастиц.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: диабетическое поражение печени, нагруженные полидаатином хитозановые наночастицы, ферменты метаболизма углеводов, транспортер глюкозы 2, окислительный стресс.

DOI: 10.31857/S0320972521020068

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода (reactive oxygen species); CAT – каталаза (catalase); DM – сахарный диабет (diabetes mellitus); G6PD – глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа (glucose-6-phosphate dehydrogenase); GK – глюкокиназа (glucokinase); GLUT2 – транспортер глюкозы 2 (glucose transporter 2); GPX – глутатионпероксидаза (glutathione peroxidase); GSH – восстановленный глутатион (reduced glutathione); IL- 1β – интерлейкин 1β (interleukin 1β); LPO – перекисное окисление липидов (lipid peroxidation); MDA – малоновый диальдегид (malondialdehyde); NA – никотинамид (nicotinamide); PD – полидадин (polydatin); PD-CSNPs – нагруженные полидаатином хитозановые наночастицы (polydatin-loaded chitosan nanoparticles); PK – пируваткиназа (pyruvate kinase); SDH – сукцинатдегидрогеназа (succinate dehydrogenase); SOD – супероксиддисмутаза (superoxide dismutase); STZ – стрептозотцин (streptozotocin); TNF- α – фактор некроза опухолей α (tumor necrosis factor α), TP – общий белок (total protein).

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM20-162, 02.11.2020.

** Адресат для корреспонденции.

ВВЕДЕНИЕ

Сахарный диабет (DM – diabetes mellitus) является комплексной, распространенной и серьезной проблемой, касающейся здоровья человека. Это заболевание характеризуется хронической гипергликемией, которая является результатом дефицита инсулина и/или эффектов такого дефицита [1]. Сахарный диабет ассоциирован с нарушением функций и поражениями различных органов, которые в конечном итоге приводят ко многим опасным для здоровья осложнениям и высокой заболеваемости и смертности среди больных диабетом [1, 2]. В печени, которая является одним из основных поражаемых органов, сахарный диабет вызывает долговременные метаболические дисфункции, приводящие к поражению тканей и способствующие прогрессированию различных заболеваний, таких как неалкогольная жировая болезнь печени, цирроз и гепатоцеллюлярная карцинома [3]. Среди больных диабетом широко распространено поражение печени; в частности, у 75% больных диабетом 2-го типа диагностирована неалкогольная жировая болезнь печени [4].

Неконтролируемая гипергликемия, ассоциированная с сахарным диабетом, вызывает окислительные повреждения, способствует инициации воспалительных процессов и приводит к возникновению и прогрессированию заболеваний печени [5]. Lucchesi et al. [6] показали, что гипергликемия приводит к окислительному стрессу в клетках печени, который проявляется повышением уровня активных форм кислорода (АФК) и снижением экспрессии антиоксидантных маркеров. Большое количество АФК может продуцироваться в ходе окислительного фосфорилирования в митохондриях или другими путями, такими как аутоокисление глюкозы, неферментативное гликирование, активация протеинкиназы С (абб. РКС от англ. protein kinase C), а также метаболические пути гексозамина и сорбитола [5, 7]. Воспаление может также быть важным механизмом поражения печени у больных диабетом. В диабетическом состоянии происходит повышение экспрессии фактора некроза опухолей α (абб. TNF- α от англ. tumor necrosis factor α) и его рецептора TNF-R1, что способствует повышению экспрессии индуцибельной синтазы оксида азота (абб. iNOS от англ. inducible nitric oxide synthase) и продукции в печени оксида азота [8]. Такое повышение уровня провоспалительных цитокинов усиливает негативные эффекты глюкозотоксичности и приводит к дисфункции митохондрий, окислительному стрессу и поражению печени [3, 8].

В последние десятилетия большое внимание было уделено поиску альтернативных методов лечения диабета и связанных с ним осложнений, разработке эффективных и безопасных методов лечения на основе растительных препаратов [9]. Полидадин (абб. PD от англ. polydatin), также известный как пицеид (pieceid; 3,4',5-тригидроксистильбен-3- β -D-глюкозид), был первоначально выделен из корней и корневищ травы *Polygonum cuspidatum*, произрастающей в Китае, которая традиционно используется при лечении лихорадки, боли, кашля и гипертензии. Также было показано, что PD может использоваться как мощный агент детоксикации при холестатическом поражении печени [10]. Антиоксидантное действие полидадина осуществляется путем регулирования продукции АФК и функционирования митохондрий; противовоспалительное действие PD состоит в снижении продукции провоспалительных цитокинов [11]. Применение полидадина в клинической практике ограничено, несмотря на его многообещающие фармакологические характеристики, ввиду низкой биодоступности в связи с его химической нестабильностью в водной среде при щелочных значениях pH, плохой растворимости в воде и значительного пресистемного метаболизма [12]. Несколько исследовательских групп работают над решением этой проблемы путем разработки систем доставки лекарств, которые могли бы защитить полидадин от деградации, повысить растворимость загруженного вещества в водных растворах, обеспечить направленную доставку лекарства к возможным мишеням и паттерны непрерывного высвобождения [13]. Целью настоящего исследования было изучение вероятного положительного эффекта нагруженных полидадином хитозановых наночастиц (PD-CSNPs) и свободного полидадина при поражении печени, ассоциированном с диабетом, с акцентом на модуляцию активности ферментов метаболизма углеводов и экспрессию транспортера глюкозы GLUT2, а также окислительный стресс и экспрессию провоспалительных маркеров.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Препараты и реагенты. Полидадин, никотинамид (NA) и стрептозотозин (STZ) были приобретены в «Sigma-Aldrich» (США). Метформин (MET) был получен в «Merck KGaA» (Германия). Хитозановые наночастицы с полидадином (PD-CSNPs) были синтезированы с помощью модифицированного метода ионного гелеобразования [14] и охарактеризованы по ранее опи-

санной Abdel-Moneim et al. методике [15]. Остальные реагенты и материалы были приобретены у стандартных коммерческих поставщиков.

Лабораторные животные. Крысы-самцы породы Wistar albino (весом 120–140 г) были приобретены в компании «VACSERA» (Египет). Животные содержались в хорошо проветриваемых клетках при нормальных атмосферных условиях с нормальным 12-часовым световым циклом свет/темнота. Работа с экспериментальными животными осуществлялась в соответствии с требованиями Институционального комитета по содержанию и использованию лабораторных животных (IACUC) Университета Бени-Суэфа (номер разрешения от IACUC: BSU-FS-2018-8).

Моделирование диабета с использованием никотинамида и стрептозотоцина (NA/STZ) у крыс. Стрептозотозин (50 мг/кг массы тела) растворяли в холодном цитратном буфере (pH 4,5) и немедленно интраперитонеально вводили раствор крысам, голодавшим в течение ночи, спустя 15 мин после интраперитонеальной инъекции раствора никотинамида (110 мг/кг массы тела), приготовленного в нормальном физиологическом растворе [16]. Спустя неделю после инъекции отбирали крыс для дальнейшей работы – с уровнем глюкозы в крови натощак (абб. FBG от англ. fasting blood glucose) ≥ 200 мг/дл.

Схема эксперимента. Животные были разделены на шесть групп (по 6 особей в каждой группе): нормальные контрольные крысы, контрольные крысы с диабетом (D), крысы с диабетом, получавшие полидатин (D + PD, 50 мг/кг массы тела), крысы с диабетом, получавшие нагруженные полидатином хитозановые наночастицы (D + PD-CSNPs, в количестве, эквивалентном PD 50 мг/кг массы тела), крысы с диабетом, которые получали эквивалентное количество хитозановых наночастиц без полидатина (D + CSNPs), и крысы с диабетом, которые получали перорально метформин – стандартный агент, вызывающий гипогликемию (D + MET, 100 мг/кг массы тела). Все препараты вводили крысам ежедневно с помощью желудочного зонда; размер дозы пересчитывали каждую неделю в соответствии с изменениями веса животного.

Биохимический анализ. За день до умерщвления (после 4-х недель эксперимента) из латеральной хвостовой вены голодавших в течение ночи (8–10 ч) крыс производили забор крови. Выделенная сыворотка крови была использована для спектрофотометрического определения содержания глюкозы с использованием набора компании «Spinreact» (Испания). Содержание гликогена в печени определяли по методу Seifter et al. [17].

Активность аспартаттрансаминазы (AST) и аланинтрансаминазы (ALT) в сыворотке крови определяли с помощью наборов «Biosystems Company» (Испания). Колориметрическое определение активности сукцинатдегидрогеназы (SDH) и пируваткиназы (PK) в сыворотке крови проводили с помощью наборов «BioVision» (США). Общую концентрацию белка (абб. TP от англ. total protein) и концентрацию альбумина определяли с помощью наборов от «Spinreact» (Испания) и «HUMAN» (Германия) соответственно, согласно инструкции производителя.

Ткань печени гомогенизировали (10%) в нормальном физиологическом растворе. Супернатант получали в результате центрифугирования гомогената при 3000 об/мин в течение 10 мин. Гомогенат печени использовали для определения уровня перекисного окисления липидов (LPO) (анализ уровня малонового диальдегида MDA), глюкозо-6-фосфатдегидрогеназы (G6PD), восстановленного глутатиона (GSH), а также определения активности супероксиддисмутазы (SOD), каталазы (CAT) и глутатионпероксидазы (GPx) с помощью специальных наборов «Biodiagnostic» (Египет) в соответствии с инструкциями производителя.

Количественная ПЦР. Препарат тотальной РНК из ткани печени получали с помощью набора для экстракции компании «Qiagen» (США) в соответствии с инструкциями производителя. Чистоту выделенной РНК (по соотношению A260/A280) и её концентрацию определяли с помощью двухволнового спектрофотометра («Beckman», США). Тотальную РНК (0,5–2 мкг) использовали для получения кДНК с помощью набора обратной транскрипции «High-capacity cDNA reverse transcription kit» («Fermentas», США) согласно протоколу производителя. Количественную ПЦР в реальном времени и анализ продуктов реакции проводили с использованием системы StepOne Real-Time PCR («Applied Biosystems», США) с соответствующим программным обеспечением, версия 3.1. Температура отжига праймеров была оптимизирована под использованные наборы праймеров (табл. 1). Количественное определение проводили с использованием программного обеспечения «Applied Biosystems» методом $\Delta\Delta C_t$. Значение RQ представляет собой кратность изменения по сравнению с нормальным контролем.

Гистологические исследования. Для проведения гистологического анализа брали по пять животных из каждой группы. Вкратце, небольшой кусочек печени фиксировали в 10%-ном формалине при нейтральных значениях pH в течение 24 ч. Ткань обезвоживали растворами этанола с повышающимися концентрациями (70%,

Таблица 1. Пары праймеров, использованные для проведения количественной ПЦР в реальном времени

Ген	Прямой праймер (5'→3')	Обратный праймер (5'→3')
β-актин	TGTTTGAGACCTTCAACACC	CGCTCATTGCCGATAGTGAT
GK	CAACTGGACCAAGGGCTTCAA	TGTGGCCACCGTGTTCATTC
GLUT2	CTGGAGCCCTCTTGATGGGA	CCAGTCCTGAAATTAGCCCACA
IL-1β	TGATGTCCCATTAGACAGC	GAGGTGCTGATGTACCAGTT
TNF-α	GCGACGTGGAAGCTGGCAGAAG	GGTACAACCCATCGGCTGGCA

Примечание. GK – глюкокиназа; GLUT2 – транспортер глюкозы 2; IL-1β – интерлейкин 1β; TNF-α – фактор некроза опухоли α.

95% и 100%), погружали в парафин, с помощью микротомы делали срезы толщиной 4–5 мкм и проводили окрашивание гематоксилином и эозином. С помощью светового микроскопа исследовали каждый препарат в пяти полях зрения [18].

Статистическая обработка результатов. Полученные данные анализировали с помощью программы SPSS, version 20 for Windows («SPSS Inc.», США). Для сравнения экспериментальных групп использовали метод однофакторного дисперсионного анализа ANOVA и затем метод группирования выборок с наименее значимой разницей для множественных сравнений. Различия считали достоверными при значении $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Влияние PD и PD-CSNPs на метаболизм углеводов. Одним из прямых проявлений нарушения гомеостаза углеводов является изменение активности ферментов метаболизма углеводов. На рис. 1 показано, что применение препаратов PD и PD-CSNPs снижало уровень FBG ($p < 0,001$), в то время как активность SDH и PK в сыворотке крови заметно повышалась по сравнению с контрольными диабетическими крысами. Применение PD и PD-CSNPs также вызывало повышение содержания гликогена в печени ($p < 0,001$). При этом препарат PD-CSNPs вызывал более выраженный эффект в сравнении со свободным полидаатином. Эффективность действия PD и PD-CSNPs была сравнима с положительным эффектом метформина в сравнении с диабетическими контрольными крысами (рис. 1).

Влияние PD и PD-CSNPs на активность трансаминаз и белковый профиль. Повышение активности AST и ALT в сыворотке крови является стандартным биохимическим маркером поражения печени. Мы выявили повышение

активности и AST, и ALT в сыворотке крови диабетических крыс по сравнению с нормальными контрольными крысами ($p < 0,001$). Применение PD или PD-CSNPs вызывало значительное снижение активности AST и ALT у этих крыс. Общая концентрация белка у крыс в диабетической группе была значительно снижена по сравнению с нормальным контролем ($p < 0,01$), но была значительно выше в группе крыс, получающих метформин, по сравнению с контрольными диабетическими крысами ($p < 0,05$). Концентрация сывороточного альбумина была также существенно снижена по сравнению с нормальной контрольной группой ($p < 0,01$), но значительно возрастала ($p < 0,05$) после применения PD-CSNPs или метформина (рис. 2).

Влияние PD и PD-CSNPs на окислительный стресс и антиоксидантные маркеры в печени. В сравнении с нормальными контрольными крысами было обнаружено заметное повышение ($p < 0,001$) уровня малонового диальдегида (маркера перекисного окисления липидов) у диабетических крыс. Также наблюдалось заметное снижение ($p < 0,05$) активности SOD, CAT, GPx, G6PD и уровня GSH в диабетической группе по сравнению с нормальной контрольной группой. Как и предполагалось, применение PD и PD-CSNPs вызывало повышение уровня GSH и активности SOD, GPx, CAT и G6PD параллельно со снижением продукции MDA по сравнению с диабетическими контрольными крысами. Таким образом, применение PD, PD-CSNPs и MET может значительно снизить окислительный стресс и повысить экспрессию антиоксидантных маркеров в ткани печени крыс, страдающих диабетом (табл. 2).

Влияние PD и PD-CSNPs на экспрессию GLUT2, IL-1β, TNF-α и глюкокиназы (GK). В печени контрольных крыс с диабетом экспрессия мРНК GLUT2 и GK была снижена в сравнении с нормальной контрольной группой ($p < 0,001$). Применение PD или PD-CSNPs повышало

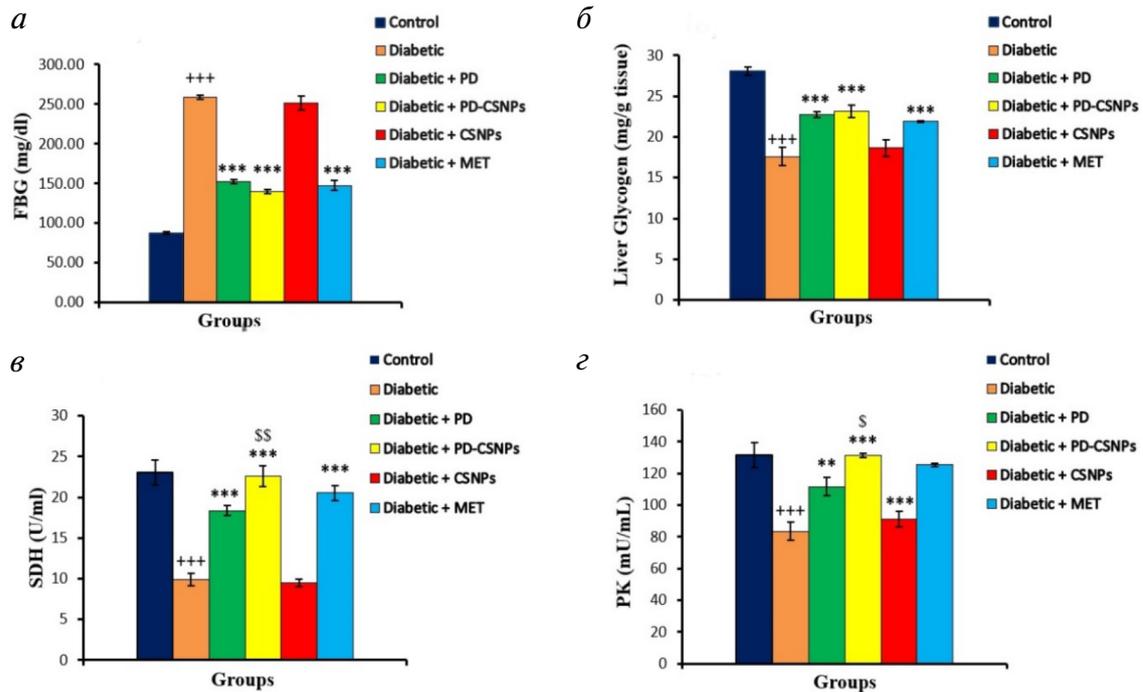


Рис. 1. Влияние PD и PD-CSNPs на уровень глюкозы натощак в сыворотке крови (а), гликогена в печени (б) и активность ключевых ферментов метаболизма углеводов, SDH (в) и PK (г). Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка. +++, $p < 0,001$ в сравнении с нормальной контрольной группой; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ в сравнении с диабетической контрольной группой; \$, $p < 0,05$; \$\$, $p < 0,01$ в сравнении с диабетическими крысами, получавшими полидатин (Diabetic + PD). (С цветными вариантами рис. 1–5 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: <http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>.)

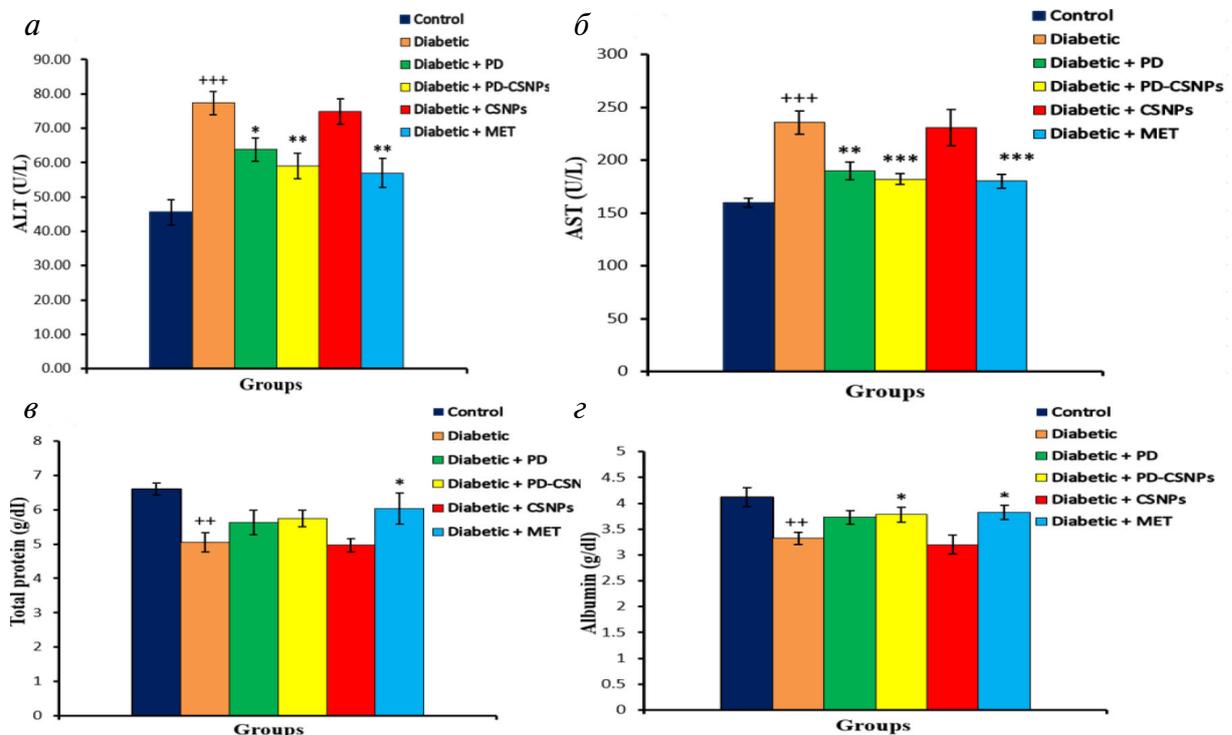


Рис. 2. Влияние PD и PD-CSNPs на ферменты печени (а – ALT, б – AST) и белковый профиль у диабетических крыс (в – общий белок, г – альбумин). Результаты представлены в виде среднего значения \pm стандартная ошибка. ++, $p < 0,01$; +++, $p < 0,001$ в сравнении с нормальной контрольной группой; *, $p < 0,05$; **, $p < 0,01$; ***, $p < 0,001$ в сравнении с диабетической контрольной группой

Таблица 2. Влияние PD и PD-CSNPs на окислительный стресс и антиоксидантные маркеры в печени диабетических крыс

Группа	Параметр	LPO (нмоль MDA/100 мг ткани)	SOD (Ед/г ткани)	CAT ($K \times 10^{-2}$)	GSH (нмоль/100 мг ткани)	GPx (мЕд/100 мг ткани)	G6PD (мЕд/мл)
Контроль		23,33 ± 0,50	14,53 ± 0,68	97,50 ± 6,82	170,24 ± 25,78	112,03 ± 2,52	15,13 ± 1,21
Диабет		39,98 ± 2,85 ⁺⁺⁺	8,24 ± 0,49 ⁺⁺⁺	56,67 ± 4,75 ⁺⁺	105,60 ± 15,88 ⁺⁺	79,52 ± 6,04 ⁺⁺⁺	6,09 ± 0,34 ⁺⁺⁺
Диабет + PD		33,01 ± 0,93*	10,46 ± 0,58*	79,78 ± 2,55*	149,82 ± 9,58*	91,40 ± 2,00*	9,65 ± 0,20**
Диабет + PD-CSNPs		30,08 ± 1,16**	11,13 ± 0,43**	85,61 ± 5,47*	167,68 ± 7,85**	95,18 ± 2,80**	13,23 ± 0,73 ^{***} \$\$
Диабет + CSNPs		38,42 ± 2,33	8,29 ± 0,53	65,30 ± 14,31	112,20 ± 14,36	83,50 ± 4,63	7,03 ± 0,28
Диабет + MET		33,16 ± 2,30*	11,02 ± 0,65**	81,86 ± 8,49*	158,63 ± 9,47*	91,53 ± 4,21*	11,49 ± 0,65 ^{***}

Примечание. Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка. ++, $p < 0,01$ и +++, $p < 0,001$ в сравнении с нормальной контрольной группой; *, $p < 0,05$ и **, $p < 0,01$ в сравнении с диабетической контрольной группой; \$\$, $p < 0,01$ в сравнении с группой «Диабет + PD».

экспрессию GLUT2 и GK относительно группы диабетического контроля ($p < 0,001$). Следует отметить, что использование PD-CSNPs вызвало более выраженный положительный эффект по сравнению с группой, получавшей свободный полидактин ($p < 0,01$) (рис. 3).

Что касается воспалительных цитокинов, то было обнаружено повышение уровня мРНК TNF- α и IL-1 β в ткани печени крыс из диабетической контрольной группы в сравнении с нормальной контрольной группой ($p < 0,001$). Применение PD или PD-CSNPs вызывало сниже-

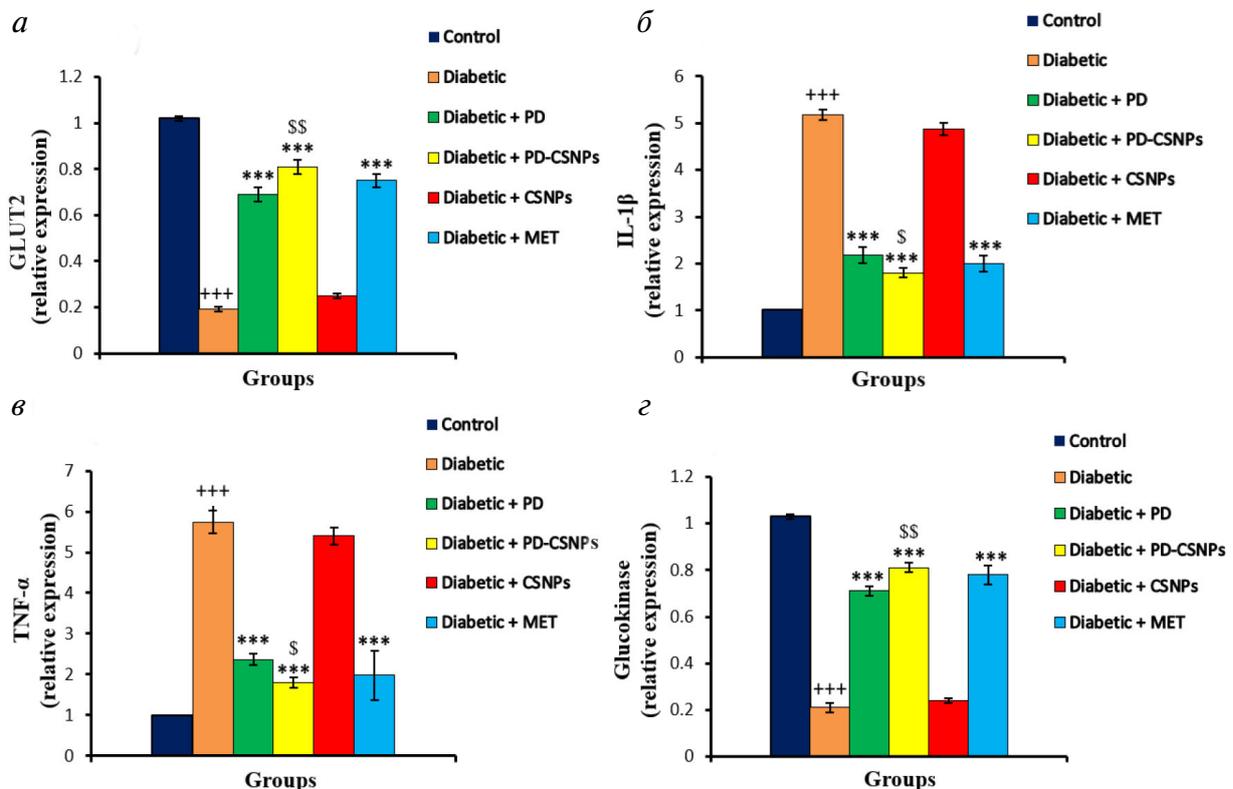


Рис. 3. Влияние PD и PD-CSNPs на экспрессию GLUT2 (а), IL-1 β (б), TNF- α (в) и GK (г). Результаты представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка. +++, $p < 0,001$ по сравнению с нормальной контрольной группой; ***, $p < 0,001$ по сравнению с диабетической группой; \$, $p < 0,05$ и \$\$, $p < 0,01$ по сравнению с диабетической группой, получавшей полидактин (Diabetic + PD)

ние экспрессии TNF- α по сравнению с диабетической контрольной группой ($p < 0,001$). Положительный эффект в группе PD-CSNPs был более значительным в сравнении с группой, получившей свободный PD ($p < 0,05$). При этом применение и PD, и PD-CSNPs приводило к заметному улучшению по сравнению с использованием MET (рис. 3).

Влияние PD и PD-CSNPs на гистологию печени. Гистологическое исследование печени нормальных контрольных крыс показало типичную структуру с центральной венной, синусоидами и гепатоцитами (рис. 4, а). Срезы печени контрольных животных с диабетом показали значительные поражения в виде жировых изменений, расширенных гиперемированных синусоидов, вакуолярную дегенерацию гепатоцитов и нали-

чие отдельных гепатоцитов с пикнотическими и кариолитическими ядрами (рис. 4, б). У диабетических крыс, получавших ненагруженные CSNPs, наблюдались жировые изменения, расширенные гиперемированные синусоиды, вакуолярная дегенерация гепатоцитов и отдельные гепатоциты с пикнотическими и кариолитическими ядрами (рис. 4, в). В то же время применение PD-CSNPs вызвало заметные улучшения в большей части печени (рис. 4, г). Использование PD-CSNPs инициировало более выраженный защитный эффект против индуцируемых диабетом гистологических аномалий в печени по сравнению с применением свободного PD (рис. 4, д). Как и ожидалось, MET также способствовал улучшению состояния ткани печени (рис. 4, е).

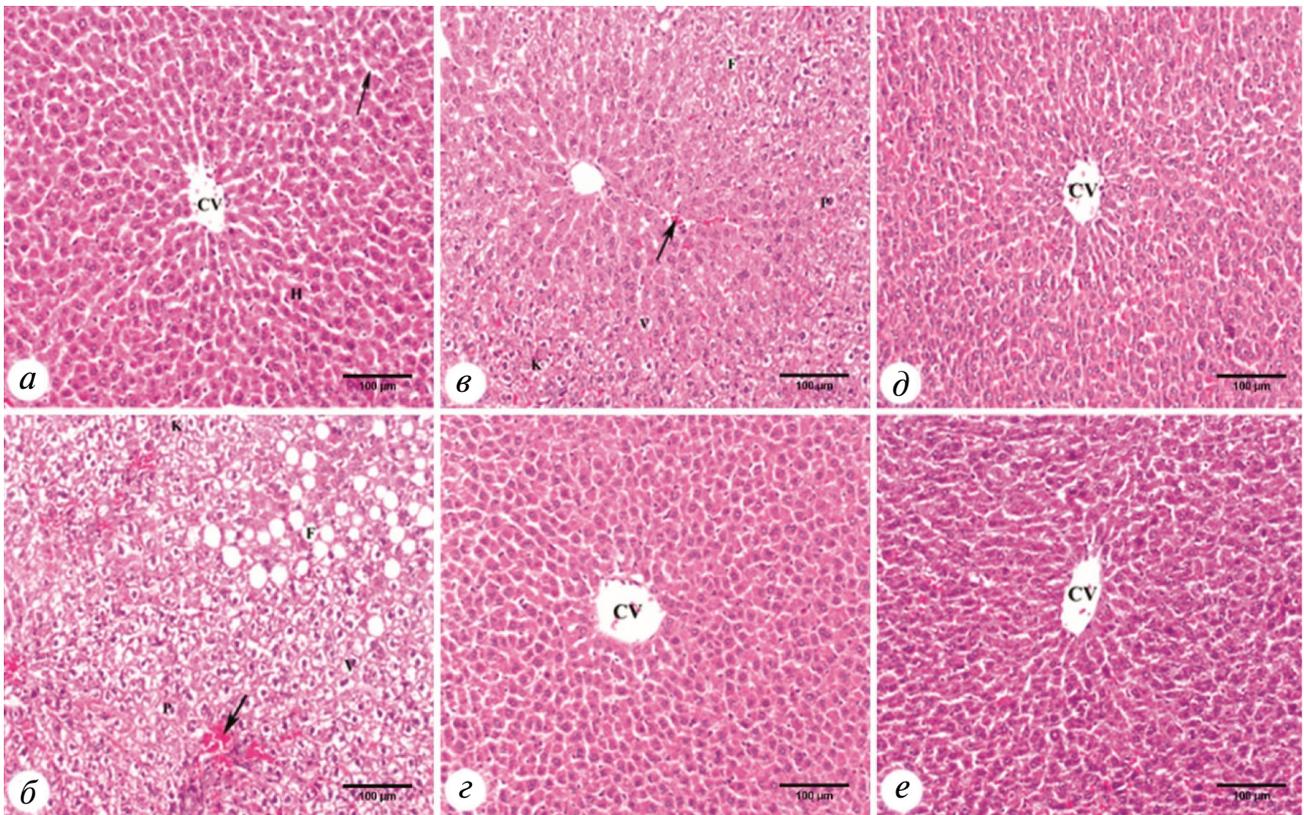


Рис. 4. Микрофотографии срезов печени, окрашенных гематоксилином и эозином: а – контрольные нормальные крысы, у которых наблюдается нормальная структура с центральной венной (CV – central vein), синусоидами (стрелка) и гепатоцитами (H); б – контрольные животные с диабетом, у которых наблюдаются жировые изменения (F), расширенные гиперемированные синусоиды (стрелка), вакуолярная дегенерация гепатоцитов (V) и отдельные гепатоциты с пикнотическими (P) и кариолитическими (K) ядрами; в – диабетические крысы, получавшие ненагруженные хитозановые наночастицы, у которых наблюдаются жировые изменения (F), расширенные гиперемированные синусоиды (стрелка), вакуолярная дегенерация гепатоцитов (V) и отдельные гепатоциты с пикнотическими (P) и кариолитическими (K) ядрами; г – диабетические крысы, которые получали нагруженные полидагином хитозановые наночастицы, у которых наблюдается заметное улучшение в ткани печени с центральной венной (CV); д – диабетические крысы, получавшие полидагин, показана центральная вена (CV) и умеренно выраженные улучшения в большинстве гепатоцитов; е – диабетическая группа животных, которые получали MET-HCl, зафиксировано улучшение состояния большинства гепатоцитов и центральной вены (CV). Единица шкалы – 100 мкм

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Печень является одним из главных органов, испытывающих воздействие хронических метаболических нарушений, ассоциированных с диабетом, которые в конечном итоге вызывают поражение печени и прогрессирование многих заболеваний, таких как неалкогольная жировая болезнь печени, цирроз и гепатоцеллюлярная карцинома [3]. Полидагин, биологически активное вещество растительного происхождения, обладает многими полезными с точки зрения терапии свойствами, включая антиоксидантную и противовоспалительную активность [11], что делает его хорошим кандидатом для смягчения поражения печени у больных диабетом. В настоящей работе показано, что пероральное введение свободного полидагина и нагруженных полидагином хитозановых наночастиц в течение 4-х недель после индукции диабета приводило к смягчению поражения печени у диабетических крыс.

Эффекты PD и PD-CSNPs как потенциальных гипогликемических агентов у крыс с диабетом оказались сходны с действием MET. Метформин может снижать уровень глюкозы в крови путем повышения чувствительности к инсулину и ускорения усвоения глюкозы [19]. Антигипергликемический эффект PD и PD-CSNPs у диабетических крыс подтверждается снижением уровня FBG в сравнении с контрольными диабетическими крысами. Ранее мы показали, что применение PD и PD-CSNPs способствовало нормализации уровня инсулина и заметному снижению уровня гликированного гемоглобина (HbA1c), а также параметров гомеостатической модели оценки резистентности к инсулину (абб. HOMA-IR от англ. homeostatic model assessment of insulin resistance) у получавших эти препараты крыс-диабетиков [15]. В сравнении с контрольными крысами, у крыс с диабетом наблюдался дефицит гликогена в печени, который значительно смягчался при применении PD и PD-CSNPs. В число факторов, приводящих к снижению содержания гликогена в печени крыс с диабетом, входит инсулиновая недостаточность, которая, в свою очередь, приводит к активации процессов глюконеогенеза и гликогенолиза [20]. Гликоген является основной внутриклеточной формой запасаения глюкозы в печени, и его уровень является прямым свидетельством активности инсулина, т.к. инсулин стимулирует гликогенсинтазу и, соответственно, депонирование гликогена [21]. Эти результаты согласуются с данными Wang et al. [22], которые наблюдали повышение содержания гликогена в печени мышей с диабетом 2-го типа после введения им полидагина.

В случае диабета 2-го типа нечувствительность к глюкозе часто ассоциируется с нарушением функционирования транспортера глюкозы 2 (GLUT2) [23]. Глюкокиназа является физиологическим сенсором глюкозы в глюкозозависимых тканях, включая поджелудочную железу и печень [24]. В настоящей работе мы показали, что экспрессия мРНК GLUT2 и GK в печени крыс с диабетом была снижена. После введения крысам препаратов PD и PD-CSNPs происходило восстановление уровня мРНК GLUT2 и GK практически до нормальных значений, более выраженный эффект наблюдался в группе PD-CSNPs. GLUT2 является основной изоформой транспортера глюкозы в печени, где он участвует в транспорте глюкозы в обоих направлениях и, таким образом, играет ключевую роль в гомеостазе глюкозы [25]. Снижение уровня GLUT2 приводит к падению глюкозозависимой секреции инсулина из-за ограниченного количества глюкозы, поступающего в β -клетки поджелудочной железы [26], и может таким образом быть одной из причин гипергликемии. В печени в ответ на высокий уровень глюкозы в плазме крови GLUT2 транспортируется из цитоплазмы на плазматическую мембрану, где он служит в качестве основного переносчика глюкозы из плазмы в гепатоциты [27]. Утрата функций глюкокиназы, помимо нарушения метаболизма углеводов, также ассоциирована с гипергликемией или гипогликемией [28], и изменения уровня глюкозы в крови находятся под влиянием экспрессии GK в печени [29]. Следовательно, восстановление уровня GLUT2 повысит усвоение глюкозы и тем самым поможет бороться с гипергликемическими состояниями. Так, у страдающих ожирением и диабетом крыс Цукура экспрессия GK в печени снижается по мере усиления тяжести заболевания. У мышей гиперэкспрессия GK в печени способствовала нормализации уровня глюкозы, в то время как дефицит GK был ассоциирован с гипергликемией [30].

Гликолиз представляет собой единственный путь катаболизма глюкозы. Потребление глюкозы с пищей является необходимым для регуляции гликолитического пути в печени [31]. Пируваткиназа (PK) является одним из скоростелимитирующих ферментов гликолиза, что также оказывает прямое влияние на скорость и направление всего метаболизма углеводов [32]. PK катализирует реакцию синтеза пирувата и АТФ путем переноса фосфатной группы с фосфоенолпирувата на ADP [33], она ускоряет процесс усвоения глюкозы и способствует гликолизу. SDH участвует в процессах как гликолиза, так и цикла трикарбоновых кислот (абб. TCA от англ.

tricarboxylic acid cycle) [34]. Активация действия SDH в электрон-транспортной цепи и ТСА могла бы способствовать усвоению глюкозы в печени [35]. В настоящей работе показано, что активность PK и SDH в сыворотке крови диабетических крыс значительно снижена. После введения крысам препаратов PD и PD-CSNPs активность этих ключевых ферментов метаболизма углеводов значительно возросла. Повышение активности PK и SDH может быть вторичным по отношению к благоприятному влиянию PD-CSNPs на уровень инсулина и приводит, как указано выше, к усилению гликолиза и усвоения глюкозы для генерирования энергии. Наши результаты согласуются с выводами Meghana et al. [36], которые показали, что применение полидатаина вызывает повышение уровня SDH в животной модели алкогольного поражения печени. Предположительно полидагин оказывает антидиабетические эффекты путем стимулирования усвоения внутриклеточной глюкозы за счет повышения экспрессии GLUT2, активации пентозофосфатного пути за счет повышения уровня SDH, а также восстанавливая гликолиз в печени путем регуляции ключевых ферментов метаболизма углеводов [37].

Для диагностики функционального состояния печени используется анализ белкового профиля [38]. В настоящей работе показано значительное снижение содержания сывороточного альбумина и общего белка в крови животных диабетической группы. Это может быть связано с повышенной скоростью конверсии аминокислот в глюкозу, глюконеогенеза, и конверсией гликогенных аминокислот в CO_2 и H_2O [39]. Также это может быть ассоциировано с нарушениями функций и структуры клеток печени, которые характеризуются низким уровнем сывороточного альбумина и общего белка [40]. Введение крысам с диабетом PD или PD-CSNPs привело к заметному повышению уровня сывороточного альбумина и общего белка, что, предположительно, опосредовано гипогликемическим эффектом полидатаина. Эти результаты согласуются с данными Ince et al. [41], где было показано, что полидагин дозозависимо восстанавливает уровень общего белка и альбумина в крови крыс, нарушенные цисплатин-индуцированной токсичностью.

Как правило, дефицит инсулина и сопутствующая гипергликемия наблюдаются в результате нарушения функционирования β -клеток, которые считаются основными посредниками в процессе стимулирования продукции АФК, сопровождающем поражение печени при сахарном диабете [42]. Согласно результатам на-

шего исследования, в печени крыс с диабетом происходит значительное увеличение концентрации малонового диальдегида, а также снижение уровня GSH и снижение активности антиоксидантных ферментов, таких как SOD, GPx, CAT и G6PD, в сравнении с нормальными контрольными крысами. Дисфункция митохондрий, вызванная гипергликемией, и стресс эндоплазматического ретикулума способствуют аккумуляции АФК, которая, в свою очередь, способствует процессу повреждения клеток и вносит вклад в развитие диабетических осложнений, приводя к появлению необратимых окислительных модификаций [43].

Основным внутриклеточным восстановителем является НАДФН. Действительно, для функционирования всей антиоксидантной системы необходим восстановитель. Глюкозо-6-фосфатдегидрогеназа является основным источником НАДФН, поэтому нарушение активности G6PD может приводить к изменению уровня НАДФН, таким образом влияя на всю антиоксидантную систему [44]. Таким образом, снижение уровня НАДФН в результате ингибирования активности G6PD делает клетки очень чувствительными к повреждающему действию окислителей. В соответствии с нашими результатами было показано, что сахарный диабет ведет к ингибированию активности G6PD у экспериментальных животных с диабетом и в культивированных эндотелиальных клетках [45]. Кроме того, у больных диабетом наблюдается пониженная активность G6PD в печени [46]. Пониженная активность G6PD приводит к снижению уровня внутриклеточного НАДФН, повышению содержания АФК в клетках, а также способствует окислительному стрессу. Более того, АФК могут инициировать перекисное окисление липидов путем окисления полиненасыщенных жирных кислот в мембранах гепатоцитов, что приводит к повышению проницаемости клеточных мембран и последующим повреждениям клеток [47], что также может вызывать повышение активности сывороточных ALT и AST.

Как и предполагалось, применение PD или PD-CSNPs у крыс с диабетом в значительной степени препятствовало окислению липидов за счет повышения уровня активности антиоксидантов и антиоксидантных ферментов (GSH, GPx, SOD, CAT и G6PD) и снижения уровня MDA в сравнении с контрольными крысами с диабетом. Zhang et al. [48] показали, что полидагин снижает окислительный стресс и замедляет процесс поражения печени через снижение уровня MDA и повышение активности SOD, GSH, GPx и CAT в печени. Повышенная активность G6PD, наблюдаемая у крыс в группах, по-

лучающих PD и PD-CSNP, объясняет повышенные уровни антиоксидантных ферментов. НАДФН, в основном производимый G6PD, является важнейшим кофактором для каталазы и субстратом глутатионредуктазы, поддерживая каталазу в активном состоянии и обеспечивая восстановление глутатиона с образованием GSH, который является основным акцептором свободных радикалов [49]. Антиоксидантная роль G6PD, являющейся основным источником НАДФН, недавно была хорошо описана в работе Leopold et al [50].

Ozer et al. [51] показали, что активность ALT и AST может быть использована в качестве маркеров поражения печени. Повышенная активность трансаминаз, выявленная в настоящей работе, является в большей степени следствием гипергликемии, приводящей к диабетическому поражению печени. Мы предполагаем, что пероральное применение PD и PD-CSNPs обеспечивает антиоксидантную защиту против перекисного окисления липидов благодаря мощной активности PD в качестве акцептора свободных радикалов [52]. Предположительно, данные препараты также оказывают гепатопротекторный эффект при ассоциированном с диабетом поражении печени, снижая активность ALT и AST у экспериментальных крыс. Эти результаты согласуются с данными Lai et al. [53], которые описали сходные эффекты полидатына.

В ряде работ было показано, что при диабете наблюдается повышение продукции некоторых провоспалительных цитокинов, таких как IL-1 β , IL-6 и TNF- α , которые способствуют воспалению и развитию гепатического стеатоза, приводящего в итоге к поражению печени [54]. В настоящей работе показано, что уровни мРНК IL-1 β и TNF- α в печени диабетических крыс были повышены, в то время как применение PD и PD-CSNPs ингибировало экспрессию этих мРНК в печени. При этом препарат PD-CSNPs показал более выраженный противовоспалительный эффект по сравнению со свободным PD. TNF- α является одним из основных цитокинов, чья экспрессия в печени значительно увеличивается у диабетических крыс, что ведет к воспалению и апоптозу клеток печени и ассоциировано с развитием окислительного стресса и гипергликемии [55, 56]. Также описан вклад IL-1 β при диабете, TNF- α – при алкогольном и вирусном гепатите, диабете и поражении печени в результате ишемии/реперфузии [57, 58]. В связи с существующей ассоциацией между хроническим воспалением и осложнениями диабета, включая поражение печени, определение терапевтических мишеней, способных снижать провоспалительный ответ, является многообещающей стратегией в борьбе с осложнениями сахарного диабета.

Насколько нам известно, данная работа является первым исследованием действия PD-CSNPs как гепатопротекторного и противовоспалительного средства, направленного против поражения печени при диабете. В ряде работ показано, что полидатын влияет на окислительный стресс и таким образом – на воспалительный ответ [59, 60]. Гепатопротекторное действие свободного PD и PD-CSNPs проявлялось в стимулировании активности ферментов метаболизма углеводов, ингибировании окислительного стресса путем повышения активности антиоксидантных ферментов и впоследствии модулировании провоспалительных цитокинов.

Гистологическое исследование показало наличие множества гистопатологических изменений в печени диабетических крыс, включая жировые изменения, расширенные гиперемизированные синусоиды, вакуолярную дегенерацию гепатоцитов, а также отдельные гепатоциты с пикнотическими и кариолитическими ядрами. Эти результаты согласуются с данными более ранних исследований, в которых отмечались отдельные гистопатологические изменения в печени диабетических крыс [61, 62]. В соответствии с результатами биохимических исследований и анализом экспрессии генов, применение PD-CSNPs и PD вызывало заметные улучшения в большинстве образцов печени диабетических крыс, подтверждая гепатопротекторное действие этих препаратов. Следует отметить, что нагруженные полидатыном хитозановые наночастицы оказывали более выраженное защитное действие по сравнению со свободным полидатыном.

Метформин является одним из широко используемых лекарств при диабете и считается препаратом первой линии при лечении диабета 2-го типа. Клинические преимущества MET в основном связаны со специфическим снижением выработки глюкозы в печени и улучшением периферической чувствительности к инсулину; поэтому печень является основной мишенью MET [63]. Однако лечение метформином часто ассоциировано с побочными эффектами со стороны желудочно-кишечного тракта, такими как тошнота, рвота, диарея, металлический привкус и дискомфорт в брюшной полости. MET также снижает абсорбцию витамина B12, что приводит к развитию анемии [64, 65]. Таким образом, существует необходимость разработки новых альтернативных препаратов растительного происхождения для лечения диабета и его осложнений с минимизацией побочных эффектов.

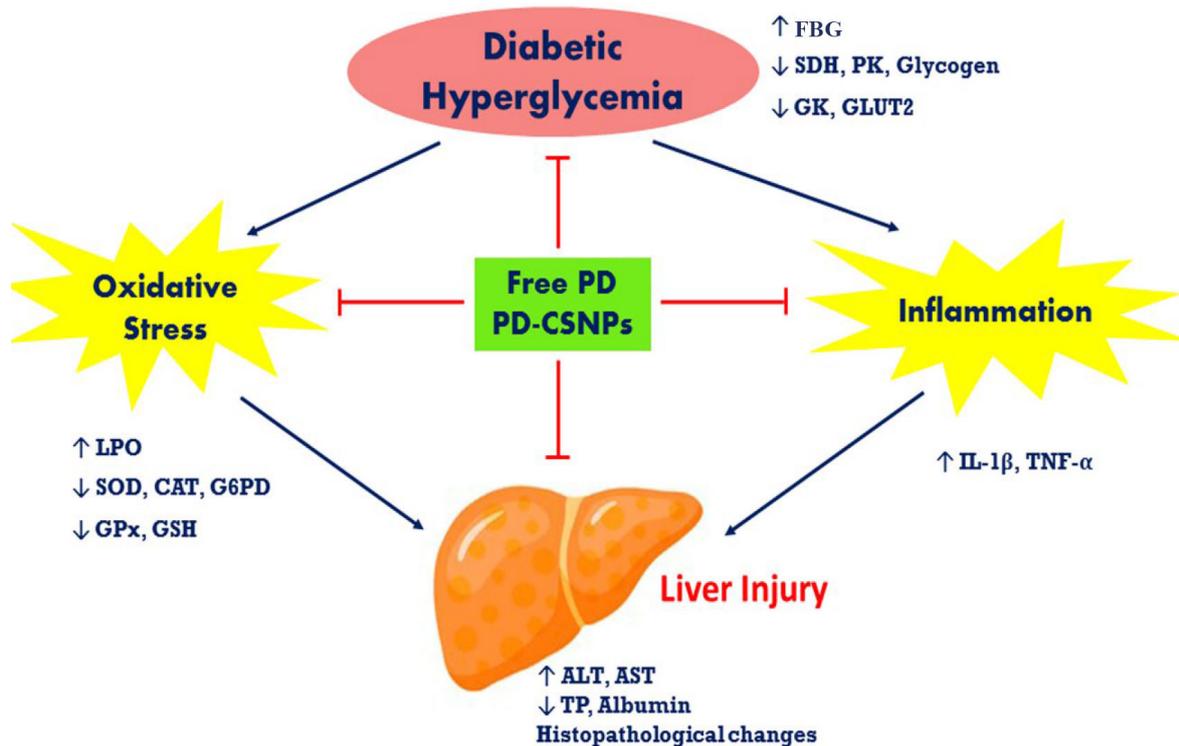


Рис. 5. Общая схема путей гепатопротекторного действия свободного PD и PD-CSNPs в печени крыс с диабетом

В связи с этим мы протестировали полидатын как потенциальное средство для лечения поражения печени, т.к. он является безопасным фитопрепаратом и обладает различными фармакологическими активностями [10, 11]. В наших предыдущих работах было продемонстрировано, что хитозановые наночастицы также безопасны и могут повысить терапевтическую эффективность полидатына, что может объясняться пролонгированным высвобождением, повышенной абсорбцией и высокой биодоступностью PD в комбинации с CSNPs [15]. Наше исследование подтвердило, что PD-CSNPs является перспективным препаратом, имеющим ряд преимуществ перед MET, особенно в случае диабетического поражения печени, вызванного окислительным стрессом. Препарат PD-CSNPs может быть адаптирован на молекулярном уровне для увеличения эффективности и минимизации побочных эффектов. Тем не менее до проведения клинических исследований необходимо провести токсикокинетические и фармакокинетические исследования нового препарата PD-CSNPs для оценки и оптимизации баланса между эффективностью и токсичностью разработанного препарата.

В настоящей работе показано, что препарат PD-CSNPs является биологически совместимым, а также имеет более выраженный защит-

ный эффект против поражения печени в сравнении со свободным PD. Также было показано, что гепатопротекторное действие PD-CSNPs у крыс с диабетом может быть связано с (1) противодиабетическим действием путем модулирования экспрессии GLUT2 и активности ферментов метаболизма углеводов; (2) модулированием окислительного стресса благодаря антиоксидантным свойствам PD; и (3) противовоспалительным действием путем снижения содержания провоспалительных цитокинов (рис. 5). Надеемся, что результаты нашей работы также будут способствовать повышению интереса к изучению терапевтической роли PD-CSNPs при других заболеваниях печени.

Финансирование. Нет (выполнение данной работы не поддерживалось каким-либо грантом).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. При работе с лабораторными животными все процедуры были выполнены в соответствии с этическими стандартами Институционального комитета по содержанию и использованию лабораторных животных (IACUC) Университета Бени-Суэфа в Египте (номер разрешения IACUC: BSU-FS-2018-8).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cho, N., Shaw, J. E., Karuranga, S., Huang, Y., da Rocha Fernandes, J. D., Ohlrogge, A. W., and Malanda, B. (2018) IDF Diabetes Atlas: global estimates of diabetes prevalence for 2017 and projections for 2045, *Diabetes Res. Clin. Pract.*, **138**, 271-281.
2. Ahlqvist, E., Van Zuydam, N. R., Groop, L. C., and McCarthy, M. I. (2015) The genetics of diabetic complications, *Nat. Rev. Nephrol.*, **11**, 277-287.
3. Bedi, O., Aggarwal, S., Trehanpati, N., Ramakrishna, G., and Krishan, P. (2019) Molecular and pathological events involved in the pathogenesis of diabetes-associated nonalcoholic fatty liver disease, *J. Clin. Exp. Hepatol.*, **9**, 607-618.
4. Angulo, P. (2002) Nonalcoholic fatty liver disease, *N. Engl. J. Med.*, **346**, 1221-1231.
5. Brownlee, M. (2001) Biochemistry and molecular cell biology of diabetic complications, *Nature*, **414**, 813-820.
6. Lucchesi, A. N., Freitas, N. T. D., Cassettari, L. L., Marques, S. F. G., and Spadella, C. T. (2013) Diabetes mellitus triggers oxidative stress in the liver of alloxan-treated rats: a mechanism for diabetic chronic liver disease, *Acta Cir. Bras.*, **28**, 502-508.
7. Kangralkar, V. A., Patil, S. D., and Bandivadekar, R. M. (2010) Oxidative stress and diabetes: a review, *Int. J. Appl. Pharm. Sci. Res.*, **1**, 38-45.
8. Ingaramo, P. I., Francés, D. E., Ronco, M. T., and Carnovale, C. E. (2013) in *Hot Topics in Endocrine and Endocrine-Related Diseases* (Fedele, M., ed.), IntechOpen, London, doi: 10.5772/53684.
9. Coman, C., Rugina, O. D., and Socaciu, C. (2012) Plants and natural compounds with antidiabetic action, *Not. Bot. Horti. Agrobot. Cluj. Napoca.*, **40**, 314-325.
10. Fanga, J., Luoa, L., Kea, Z., Liua, C., Yina, L., et al. (2019) Polydatin protects against acute cholestatic liver injury in mice via the inhibition of oxidative stress and endoplasmic reticulum stress, *J. Funct. Foods*, **55**, 175-183.
11. Ji, H., Zhang, X., Du, Y., Liu, H., Li, S., and Li, L. (2012) Polydatin modulates inflammation by decreasing NF- κ B activation and oxidative stress by increasing Gli1, Ptch1, SOD1 expression and ameliorates blood-brain barrier permeability for its neuroprotective effect in pMCAO rat brain, *Brain Res. Bull.*, **87**, 50-59.
12. Cheng, W., Li, X., Zhang, C., Chen, W., Yuan, H., and Xu, S. (2017) Preparation and *in vivo-in vitro* evaluation of polydatin-phospholipid complex with improved dissolution and bioavailability, *Int. J. Drug Dev. Res.*, **9**, 39-43.
13. Amri, A., Chaumeil, J., Sfar, S., and Charrueau, C. (2012) Administration of resveratrol: what formulation solutions to bioavailability limitations? *J. Control Release*, **158**, 182-193.
14. Nagpal, K., Singh, S., and Mishra, D. (2013) Optimization of brain targeted chitosan nanoparticles of Rivastigmine for improved efficacy and safety, *Int. J. Biol. Macromol.*, **59**, 72-83.
15. Abdel-Moneim, A., El-Shahawy, A., Yousef, A. I., Abd El-Twab, S. M., Elden, Z. E., and Taha, M. (2020) Novel polydatin-loaded chitosan nanoparticles for safe and efficient type 2 diabetes therapy: *in silico*, *in vitro* and *in vivo* approaches, *Int. J. Biol. Macromol.*, **154**, 1496-1504.
16. Masiello, P., Broca, C., Gross R., Roye, M., Manteghetti, M., Hillaire-Buys, D., Novelli, M., and Ribes, G. (1998) Experimental NIDDM: development of a new model in adult rats administered streptozotocin and nicotinamide, *Diabetes*, **47**, 224-229.
17. Seifter, S., Dayton, S., Novic, B., and Muntwyler, E. (1950) The estimation of glycogen with the anthrone reagent, *Arch. Biochem.*, **25**, 191-200.
18. Bancroft, J. D., and Gamble, M. (2002) In *Theory and Practice of Histological Techniques*, 5th Ed., Churchill Livingstone, pp. 172-175.
19. Xu, C., Liu, W., Zhang, D., Cao, X., Shi, H., and Li, X. (2018) Interactions between dietary carbohydrate and metformin: implications on energy sensing, insulin signaling pathway, glycolipid metabolism and glucose tolerance in blunt snout bream *Megalobrama amblycephala*, *Aquaculture*, **483**, 183-195.
20. Pari, L., and Murugan, P. (2005) Effect of tetrahydrocurcumin on blood glucose, plasma insulin and hepatic key enzymes in streptozotocin induced diabetic rats, *J. Basic Clin. Physiol. Pharmacol.*, **16**, 257-274.
21. Vats, V., Yadav, S., and Grover, J. (2004) Ethanolic extract of *Ocimum sanctum* leaves partially attenuates streptozotocin-induced alterations in glycogen content and carbohydrate metabolism in rats, *J. Ethnopharmacol.*, **90**, 155-160.
22. Wang, Y., Ye, J., Li, J., Chen, C., Huang, J., Liu, P., and Huang, H. (2016) Polydatin ameliorates lipid and glucose metabolism in type 2 diabetes mellitus by downregulating proprotein convertase subtilisin/kexin type 9 (PCSK9), *Cardiovasc. Diabetol.*, **15**, 19, doi: 10.1186/s12933-015-0325-x.
23. Thorens, B., Wu, Y. J., Leahy, J. L., and Weir, G. C. (1992) The loss of GLUT2 expression by glucose unresponsive beta cells of db/db mice is reversible and is induced by the diabetic environment, *J. Clin. Invest.*, **90**, 77-80.
24. Liu, D., Regenstein, J. M., Diao, Y., Qiu, J., Zhang, H., Li, J., Zhao, H., and Wang, Z. (2019) Antidiabetic effects of water-soluble Korean pine nut protein on type 2 diabetic mice, *Biomed. Pharmacother.*, **117**, 108989, doi: 10.1016/j.biopha.2019.108989.
25. Sole, S. S., and Srinivasan, B. P. (2012) Aqueous extract of tamarind seeds selectively increases glucose transporter-2, glucose transporter-4, and islets' intracellular calcium levels and stimulates β -cell proliferation resulting in improved glucose homeostasis in rats with streptozotocin-induced diabetes mellitus, *Nutr. Res.*, **32**, 626-636.
26. Weir, G. C. (1993) The relationship of diabetes, loss glucose-induced insulin secretion, and GLUT2, *J. Diabetes Complications*, **7**, 124-129.
27. Zhao, F. Q., and Keating, A. F. (2007) Expression and regulation of glucose transporter in the bovine mammary gland, *J. Dairy Sci.*, **90**, E76-E86.
28. Gloyn, A. L., Odili, S., Zelent, D., Buettger, C., Castleden, H. A. J., et al. (2005) Insights into the structure and regulation of glucokinase from a novel mutation (V62M), which causes maturity-onset diabetes of the young, *J. Biol. Chem.*, **280**, 14105-14113.
29. Zhang, Y., Wei, Z., Liu, G., Deng, K., Yang, M., et al. (2019) Synergistic effects of dietary carbohydrate and taurine on growth performance, digestive enzyme activities and glucose metabolism in juvenile turbot *Scophthalmus maximus* L., *Aquaculture*, **499**, 32-41.
30. Postic, C., Shiota, M., Niswender, K. D., Jetton, T. L., Chen, Y., et al. (1999) Dual roles for glucokinase in glucose homeostasis as determined by liver and pancreatic beta cell-specific gene knock-outs using Cre recombinase, *J. Biol. Chem.*, **274**, 305-315.
31. Li, R., Liu, H., Dong, X., Chi, S., Yang, Q., Zhang, S., and Tan, B. (2018) Molecular characterization and expression analysis of glucose transporter1 and hepatic glycolytic enzymes activities from herbivorous fish *Ctenopharyngodon idellus* in respond to a glucose load after the adaptation to dietary carbohydrate levels, *Aquaculture*, **792**, 290-299.

32. Kayne, F. J. (1973) Pyruvate kinase, in *The Enzymes*, 3rd Edn., Vol. VIII (Boyer, P. D., ed.) Academic Press, New York, pp. 353-382.
33. Gupta, V., and Bamezai, R. N. (2010) Human pyruvate kinase M2: a multifunctional protein, *Protein Sci.*, **19**, 2031-2044.
34. Oyedotun, K. S., and Lemire, B. D. (2004) The quaternary structure of the *Saccharomyces cerevisiae* succinate dehydrogenase, *J. Biol. Chem.*, **279**, 9424-9431.
35. Choudhury, H., Pandey, M., Hua, C. K., Mun, C. S., Jing, J. K., et al. (2017) An update on natural compounds in the remedy of diabetes mellitus: a systematic review, *J. Tradit. Complement. Med.*, **8**, 361-376.
36. Koneru, M., Sahu, B. D., Gudem, S., Kuncha, M., Ravuri, H. G., Kumar, J. M., Kilari, E. K., and Sistla, R. (2017) Polydatin alleviates alcohol-induced acute liver injury in mice: Relevance of matrix metalloproteinases (MMPs) and hepatic antioxidants, *Phytomedicine*, **27**, 23-32.
37. Enes, P., Panserat, S., Kaushik, S., and Oliva-Teles, A. (2009) Nutritional regulation of hepatic glucose metabolism in fish, *Fish Physiol. Biochem.*, **35**, 519-539.
38. Soji-Omoniwa, O., Muhammad, N. O., Usman, L. A., and Omoniwa, B. P. (2014) Effect of leaf essential oil of *Citrus sinensis* at different harvest time on some liver and kidney function indices of diabetic rats, *Int. J. Biol. Vet. Agric. Food Eng.*, **8**, 484-488.
39. Abdel-Moneim, A., Abd El-Twab, S. M., Ashour, M. B., and Yousef, A. I. (2016) Hepato-renal protective effects of gallic acid and p-coumaric acid in nicotinamide/streptozotocin-induced diabetic rats, *Int. J. Bioassays*, **5.6**, 4641-4649.
40. Korish, A. A., and Arafah, M. M. (2013) Camel milk ameliorates steatohepatitis, insulin resistance and lipid peroxidation in experimental non-alcoholic fatty liver disease, *BMC Complement Altern. Med.*, **13**, 264, doi: 10.1186/1472-6882-13-264.
41. Ince, S., Arslan Acaroz, D., Neuwirth, O., Demirel, H. H., et al. (2014) Protective effect of polydatin, a natural precursor of resveratrol, against cisplatin-induced toxicity in rats, *Food Chem. Toxicol.*, **72**, 147-153.
42. Schmatz, R., Perreira, L. B., Stefanello, N., Mazzanti, C., Spanevello, R., et al. (2012) Effects of resveratrol on biomarkers of oxidative stress and on the activity of delta aminolevulinic acid dehydratase in liver and kidney of streptozotocin-induced diabetic rats, *Biochimie*, **94**, 374-383.
42. Fiorentino, T. V., Prioletta, A., Zuo, P., and Folli, F. (2013) Hyperglycemia-induced oxidative stress and its role in diabetes mellitus related cardiovascular diseases, *Curr. Pharm. Des.*, **19**, 5695-5703.
44. Xu, Y., Osborne, B. W., and Stanton, R. C. (2005) Diabetes causes inhibition of glucose-6-phosphate dehydrogenase via activation of PKA, which contributes to oxidative stress in rat kidney cortex, *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.*, **289**, F1040-F1047.
45. Ullusu, N. N., Sahilli, M., Avci, A., Canbolat, O., Ozansoy, G., et al. (2003) Pentose phosphate pathway, glutathione-dependent enzymes and antioxidant defense during oxidative stress in diabetic rodent brain and peripheral organs: effects of stobadine and vitamin E, *Neurochem. Res.*, **28**, 815-823.
46. Cedola, N., Cabarrou, A., Auciello, N., Doria, I., Ponce, D. L., and Baylon, N. (1974) The liver in human diabetes. Concentration of some induced enzymes, *Acta Diabetologica*, **12**, 263-271.
47. Hosni, A. A., Abdel-Moneim, A. A., Abdel-Reheim, E. S., Mohamed, S. M., and Helmy, H. (2017) Cinnamaldehyde potentially attenuates gestational hyperglycemia in rats through modulation of PPAR γ , proinflammatory cytokines and oxidative stress, *Biomed. Pharmacother.*, **88**, 52-60.
48. Zhang, H., Yu, C. H., Jiang, Y. P., Peng, C., He, K., Tang, J. Y., and Xin, H. L. (2012) Protective effects of polydatin from *Polygonum cuspidatum* against carbon tetrachloride-induced liver injury in mice, *PLoS One*, **7**, e46574, doi: 10.1371/journal.pone.0046574.
49. Kirkman, H. N., Rolfo, M., Ferraris, A. M., and Gaetani, G. F. (1999) Mechanisms of protection of catalase by NADPH. Kinetics and stoichiometry, *J. Biol. Chem.*, **274**, 13908-13914.
50. Leopold, J. A., Zhang, Y. Y., Scribner, A. W., Stanton, R. C., and Loscalzo, J. (2003) Glucose-6-phosphate dehydrogenase overexpression decreases endothelial cell oxidant stress and increases bioavailable nitric oxide, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **23**, 411-417.
51. Ozer, J., Ratner, M., Shaw, M., Bailey, W., and Schomaker, S. (2008) The current state of serum biomarkers of hepatotoxicity, *Toxicology*, **245**, 194-205.
52. Huang, Q. H., Xu, L. Q., Liu, Y. H., Wu, J. Z., Wu, X., et al. (2017) Polydatin protects rat liver against ethanol-induced injury: involvement of CYP2E1/ROS/Nrf2 and TLR4/NF- κ B p65 pathway, *Evid. Based. Complement Alternat. Med.*, **2017**, 7953850, doi: 10.1155/2017/7953850.
53. Lai Xue, L., Wub, K., Qiu, H., Huang, B., Chen, R., Xie, W., and Jiang, Q. (2017) Polydatin exhibits the hepatoprotective effects through PPAR-a/-b signaling pathway in streptozotocin-induced diabetic mice, *J. Funct. Foods*, **36**, 341-347.
54. Perumpail, R. B. (2015) Pathogenesis of hepatocarcinogenesis in non-cirrhotic nonalcoholic fatty liver disease: potential mechanistic pathways, *World J. Gastroenterol.*, **7**, 2384-2388.
55. Ingaramo, P. I., Ronco, M. T., Francés, D. E., Monti, J. A., Pisani, G. B., et al. (2011) Tumor necrosis factor alpha pathways develops liver apoptosis in type 1 diabetes mellitus, *Mol. Immunol.*, **48**, 1397-1407.
56. Xiao, Y., Chen, L., Fan, Y., Yan, P., Li, S., and Zhou, X. (2019) The effect of boletus polysaccharides on diabetic hepatopathy in rats, *Chem. Biol. Interact.*, **308**, 61-69.
57. Ehses, J., Lacraz, G., Giroix, M., Schmidlin, F., Coulaud, J., et al. (2009) IL-1 antagonism reduces hyperglycemia and tissue inflammation in the type 2 diabetic GK rat, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **106**, 13998-14003.
58. Ding, W., and Yin, X. (2004) Dissection of the multiple mechanisms of TNF- α -induced apoptosis in liver injury, *J. Cell Mol. Med.*, **8**, 445-454.
59. Du, Q. H., Peng, C., and Zhang, H. (2013) Polydatin: a review of pharmacology and pharmacokinetics, *Pharm. Biol.*, **51**, 1347-1354.
60. Li, T., Cai, S., Zeng, Z., Zhang, J., Gao, Y., Wang, X., and Chen, Z. (2014) Protective effect of polydatin against burn-induced lung injury in rats, *Respir. Care*, **59**, 1412-1421.
61. Teoh, S. L., Latiff, A. A., and Das, S. (2009) A histological study of the structural changes in the liver of streptozotocin-induced diabetic rats treated with or without *Momordica charantia* (bitter melon), *Clin. Ter.*, **160**, 283-286.
62. Song, D., Yin, L., Wang, C., and Wen, X. (2020) Zhenqing recipe attenuates non-alcoholic fatty liver disease by regulating the SIK1/CRTC2 signaling in experimental diabetic rats, *BMC Complement. Altern. Med.*, **20**, 27, doi: 10.1186/s12906-019-2811-2.
63. Song, R. (2016) Mechanism of metformin: a tale of two sites, *Diabetes Care*, **39**, 187-189.
64. Nathan, D. M., Buse, J. B., Davidson, M. B., Ferrannini, E., Holman, R. R., Sherwin, R., Zinman, B., American Diabetes Association, and European Association for Study of Diabetes (2009) Medical management of hyperglycemia

in type 2 diabetes: a consensus algorithm for the initiation and adjustment of therapy – a consensus statement of the American Diabetes Association and the European Association for the Study of Diabetes, *Diabetes Care*, **32**, 193-203.

65. Abdel-Moneim, A, Abdel-Reheim, E. S., Semmler, M., and Addaleel, W. (2019) The impact of glycemic status and metformin administration on red blood cell indices and oxidative stress in type 2 diabetic patients, *Malays J. Med. Sci.*, **26**, 47-60.

HEPATOPROTECTIVE EFFECTS OF POLYDATIN-LOADED CHITOSAN NANOPARTICLES IN DIABETIC RATS: MODULATION OF GLUCOSE METABOLISM, OXIDATIVE STRESS, AND INFLAMMATION BIOMARKERS*

A. M. Abd El-Hameed¹, A. I. Yousef², S. M. Abd El-Twab²,
A. A. G. El-Shahawy³, and A. Abdel-Moneim^{2**}

¹ *Chemistry Department, Faculty of Science, Taibah University, 30002 Al-Madinah Al-Munawarah, Saudi Arabia*

² *Molecular Physiology Division, Faculty of Science, Beni-Suef University, 62511 Beni-Suef, Egypt; e-mail: adel.hassan@science.bsu.edu.eg*

³ *Materials Science and Nanotechnology Department, Faculty of Postgraduate Studies for Advanced Sciences (PSAS), Beni-Suef University, 62511 Beni-Suef, Egypt*

Polydatin (PD) has a broad range of pharmacological activities; however, its effects on diabetic liver damage are poorly studied. This work is aimed to explore possible protective effects of polydatin-loaded chitosan nanoparticles (PD-CSNPs) or PD against liver damage associated with diabetes. Diabetes was induced in rats using nicotine/streptozotocin treatment. Experimental rats were then divided into six groups: normal control rats, diabetic control rats, and rats orally treated with PD, PD-CSNPs, equivalent unloaded CSNPs, or metformin daily for 4 weeks. Treatment with PD and PD-CSNPs significantly reduced the blood glucose content, lipid peroxidation in the liver, and activities of serum transaminases and carbohydrate metabolism enzymes (including succinate dehydrogenase and pyruvate kinase); by contrast, liver glycogen content, glutathione concentration, and activities of antioxidant enzymes (superoxide dismutase, glutathione peroxidase, catalase, and glucose-6-phosphate dehydrogenase) were markedly increased compared with control diabetic rats. Furthermore, the expression of tumor necrosis factor α and interleukin-1 β mRNAs was significantly downregulated, while the expression of glucose transporter 2 and glucokinase mRNAs was strongly upregulated vs. control diabetic rats. We concluded that PD-CSNPs and PD ameliorate diabetic liver damage by modulating glucose transporter 2 expression, affecting the activity of carbohydrate metabolism enzymes, and suppressing oxidative stress and inflammation, while PD-CSNPs being more efficient than PD alone, probably due to higher bioavailability and prolonged release.

Keywords: diabetic liver damage, polydatin-loaded chitosan nanoparticles, carbohydrate metabolism enzymes, glucose transporter 2, oxidative stress

УДК 577.152.342

УСИЛЕНИЕ РАСТВОРИМОСТИ И ОДНОСТАДИЙНАЯ ОЧИСТКА ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ДИМЕРА КАРБОКСИПЕПТИДАЗЫ G2*

© 2021 А. Ходакарами¹, Б. Дабирманеш^{1**}, С. Асад², М. Каледи¹

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, 14115 Tehran, Iran; E-mail: dabirmanesh@modares.ac.ir

² Department of Biotechnology, College of Science, University of Tehran, 14155 Tehran, Iran

Поступила в редакцию 02.04.2020

После доработки 22.09.2020

Принята к публикации 13.10.2020

Карбоксипептидаза G2 (CPG2) является бактериальным ферментом, который катализирует переход метотрексата в его неактивные формы. Далее эти продукты в присутствии высоких доз метотрексата у пациентов с почечными нарушениями выводятся, минуя почки. В связи с возрастающим спросом на этот фермент важно было упростить процесс его продукции. С этой целью в настоящем исследовании проведена попытка выделить и очистить этот ценный фермент, используя интеин-опосредованную очистку с помощью хитин-связывающей аффинной метки. Таким образом, ген CPG2 из *Pseudomonas* sp. (штамм RS16) был оптимизирован, синтезирован и клонирован в экспрессионный вектор pTXB1. Впоследствии конструкцию трансформировали в штамм BL21 (DE3) *Escherichia coli*. Оптимальные условия для его растворимой экспрессии достигались в 2×YT среде, содержащей 1% глюкозу, 0,5 мМ IPTG через 30 ч инкубации при 25 °С. Фермент без интеина экспрессировался в форме инклюзивных телц, что указывает на необходимость интеина для солюбилизации белка. Затем экспрессированный гомодимерный белок очищали до гомогенности с помощью хитиновой аффинной колонки. Для очищенного белка были получены значения K_m и k_{cat} 6,5 мкМ и 4,57 с⁻¹ соответственно. Анализ гель-фильтрации показал, что полученный рекомбинантный белок представляет собой димер с молекулярной массой 83 kDa. Флуоресцентная спектроскопия и метод спектроскопии кругового дихроизма подтвердили наличие у CPG2 третичной и вторичной структур соответственно. Применение интеин-опосредованной системы обеспечило возможность одностадийной очистки CPG2, открыв путь к использованию карбоксипептидазы G2 в фармацевтике.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: карбоксипептидаза G2; интеин, метотрексат.

DOI: 10.31857/S032097252102007X

ВВЕДЕНИЕ

Карбоксипептидаза G2 (CPG2) является димерным цинк-зависимым металлоферментом, экзопептидазой с молекулярной массой (ММ) 83 kDa, которая превращает метотрексат (МТХ) в его неактивную форму, 4-дезоксид-4-амино-N10-метилпропионовую кислоту и глутамат, удаляя C-концевой глутамат из фолиевой кислоты и её аналогов [1, 2]. CPG2 обеспечивает непечечное удаление МТХ у пациентов с почечной недостаточностью. Эта активность сделала CPG2 ферментом, представляющим медицинский интерес. Карбоксипептидаза G2 известна

также как глюкарпидаза и продается под названием Voraxaze [3, 4].

В связи с его значимостью необходимо получить этот фермент в высокоочищенной форме, сохраняя при этом его активность и структуру. Очистка часто является основным этапом и сложным процессом в получении рекомбинантных фармацевтических белков в биомедицинских и биотехнологических исследованиях [5]. Стандартные методы требуют ряд дорогостоящих и трудоемких этапов выделения, включая разнообразные хроматографические стадии. Поэтому необходимость простой и экономически эффективной схемы очистки очевидна. К настоящему времени в коммерческих целях используются различные технологии для извлечения нужных белков из грубых биологических экстрактов с использованием простых, недорогих и одностадийных методов [6, 7].

Обратимое аффинное взаимодействие между лигандом и связывающей его мишенью широко используется при очистке биомолекул. Присутствие аффинной метки может влиять на

Принятые сокращения: КД – круговой дихроизм; ММ – молекулярная масса; МТХ – метотрексат; СВД – хитин-связывающий домен; CPG2 – карбоксипептидаза G2; IPTG – изопропил-β-D-1-тиогактопиранозид.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», BM20-099, 18.01.2021.

** Адресат для корреспонденции.

характеристики или функции белка-мишени, поэтому может возникнуть необходимость удалить метку, особенно в случае терапевтических белков. На стадии очистки для удаления метки требуется добавлять ферменты или химические соединения [8, 9]. Эти ферментативные методы могут также увеличивать затраты на процесс производства и в некоторых случаях могут привести к добавлению аминокислотных остатков к слитному белку в месте расщепления [10, 11]. Поэтому для удобного удаления меток с помощью различных способов, таких как добавление восстановителей и изменение pH или температуры в зависимости от используемой конструкции, были созданы самоотщепляющиеся интеиновые аффинные метки. Однако индукция расщепления при изменении температуры или pH *in vivo* не поддается жесткому контролю и может привести к потере продукта, в то время как восстановление тиола может нарушить структуру белков, содержащих дисульфидные связи [12–14].

Целью настоящего исследования было упрощение производства СРG2. Для этого последовательность гена карбоксипептидазы G2 *Pseudomonas* sp. (штамм RS-16) была оптимизирована, синтезирована и клонирована в экспрессионный вектор рТХВ1. Рекombинантную конструкцию трансформировали в клетки *Escherichia coli* BL21 (DE3), и подобрали оптимальные условия для ее экспрессии. Белок, кодируемый конструкцией рТХВ1–СРG2, содержал аффинную метку интеина и хитин-связывающего домена (СВД) на своем С-конце. Полученный меченый фермент был значительно более растворим, чем нативный фермент без метки. Поскольку полученный рекомбинантный белок не имел дисульфидных связей, тиол-индуцированная расщепляющая активность интеина использовалась для высвобождения СРG2 с хитиновой колонки, в то время как интеин и СВД оставались прикрепленными к сорбенту (одностадийная очистка). Были определены кинетические параметры высвобождаемого фермента. Вторичная и третичная структуры очищенного СРG2 были проанализированы с помощью кругового дихроизма (КД) и флуоресцентной спектроскопии.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Химические соединения, бактериальные штаммы и плазмиды. В исследованиях использовали следующие реактивы: дрожжевой экстракт и триптон («Liofilchem», Италия); изопропил-β-D-1-тиогалактопиранозид (IPTG, «Cinnagen»,

Иран); метотрексат и карбоксипептидаза G2 («Sigma Aldrich», USA); рестрикционные эндонуклеазы, pfu DNA полимеразы и T4 DNA лигаза («Thermo Scientific», США); молекулярно-биологические киты («GeneAll», Южная Корея); Q-Сефароза («GE Healthcare», Великобритания). В работе использовали праймеры производства «Macrogen», Корея. Интеин-опосредованная очищающая аффинная хитин-связывающая система tag была разработана компанией «New England Biolab», Великобритания. Если не указано иное, остальные реактивы производства «Merck», Германия. Все реактивы были аналитической степени чистоты.

Клонирование и конструирование рекомбинантной плазмиды рТХВ1–СРG2. Ген, кодирующий карбоксипептидазу G2, был синтезирован «GeneCust», Франция, предпочтительно на основе кодона *E. coli*. Праймеры (прямой праймер: 5'-GGTGGTTCATATGGCACTGGCACA AAAA-GCGTGAC-3'; обратный праймер: 5'-GGTGTTGCTCTCCGCATTTGCCAGCACCCAGATCCATAATCAGG-3') были созданы для амплификации и клонирования гена карбоксипептидазы G2 в рТХВ1 (внутри сайтов рестрикции NdeI and SapI). ПЦР выполняли на приборе Bio-Rad thermocycler («Bio-Rad», США). Условия проведения ПЦР включали следующие этапы: предденатурация при 95 °C в течение 5 мин; далее 30 циклов (95 °C в течение 1 мин, 59 °C в течение 1 мин и 72 °C в течение 1 мин) и достройку цепи при 72 °C в течение 10 мин. Затем продукт ПЦР наносили на 1%-ный (w/v) агарозный гель и очищали. Очищенный фрагмент расщепляли эндонуклеазами рестрикции NdeI и SapI и клонировали в дважды расщепленную плазмиду рТХВ1 («New England Biolab», Великобритания). Секвенирование ДНК («Macrogen», Южная Корея) подтвердило вставленную последовательность. Полученная конструкция (рТХВ1–СРG2) была трансформирована в *E. coli* BL21 (DE3).

Экспрессия карбоксипептидазы G2 в *E. coli*. Для подбора оптимальных условий экспрессии были протестированы варианты концентраций IPTG (0,1; 0,5 и 1 мМ), различные культуральные среды [Luria Bertani (LB), минимальная среда (M9) и триптон-дрожжевой экстракт (2xYT)], время (10, 20 и 30 ч) и температуры (25, 30 и 37 °C). Среду 2xYT (1 литр), содержащую ампициллин (100 мкг/мл), инокулировали трансформированными бактериальными клетками и инкубировали при 37 °C, 180 rpm, до значения ОП 0,5–0,6. Затем экспрессию белка индуцировали 0,5 мМ IPTG при 25 °C в течение 30 ч в присутствии 1% глюкозы. Клетки собирали центрифугированием (8000 g, 15 мин, 4 °C). Бактери-

альные осадки ресуспендировали в 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), содержащем 300 мМ NaCl, и обрабатывали ультразвуком на льду в условиях 8 импульсов по 10 с. Растворимую и нерастворимую фракции белка разделяли центрифугированием (8000 g, 30 мин, 4 °C).

Стадии очистки фермента. Колоночная хроматография с хитином. Для очистки фермента и удаления его хитин-связывающей метки и интеина аффинную хроматографию проводили на смоле, покрытой хитином, в соответствии с рекомендациями производителя. Вкратце, хитиновую колонку уравнивали 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), содержащим 500 мМ NaCl. Белок загружали в колонку и промывали 20 объемами того же буфера. Связанный белок инкубировали в 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0), содержащем 500 мМ NaCl и 50 мМ дитиотреитола (DTT), при 4 °C в течение 16–40 ч. Элюированные образцы собирали в виде фракций по 0,5 мл. SDS-PAGE (12% полиакриламид) использовали для подтверждения чистоты CPG2 и полного удаления интеина и CBD.

Колоночная хроматография на Q-Сефарозе. Для сохранения метки фермент, содержащий связанную с хитином метку и интеин, очищали на Q-Сефарозе. С этой целью исходный экстракт был нанесён на колонку с Q-Сефарозой, предварительно уравнированную 20 мМ Tris-HCl буфером (pH 8,0).

После промывания колонки тем же буфером был применён линейный градиент 0–2 М NaCl в 20 мМ Tris-HCl (pH 8,0). Связанный фермент элюировали 20 мМ Tris-HCl, содержащим 0,8 М NaCl. Затем для удаления DTT буфер заменяли на 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), используя центробежный фильтр Amicon Ultra-15 («Millipore», США; отсеечение – 10 kDa). Все стадии проводили при 4 °C. После SDS-PAGE белки окрашивали красителем Coomassie brilliant blue R-250 [15]. Концентрацию белка определяли по методу Брэдфорда [16].

Активность фермента и биохимическая характеристика. Активность карбоксипептидазы G2 измеряли с использованием МТХ в качестве субстрата. Разные концентрации субстрата (1–200 мкМ) получали разведением стократного раствора (50 мМ) буфером 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5), содержащим 50 мМ NaCl и 0,2 мМ ZnSO₄. Реакцию начинали добавлением фермента к реакционной смеси (конечный объем 300 мкл): 50 мкл очищенного рекомбинантного фермента слияния (1 мг/мл) или 10 мкл рекомбинантного или коммерческого фермента без интеина (0,4 мг/мл).

Поглощение при 320 нм (для МТХ) непрерывно регистрировали на спектрофотометре

Perkin Elmer («Perkin Elmer Inc.», США), и исходную скорость реакции определяли при помощи линейной регрессии. Данные вставлялись в уравнение Михаэлиса–Ментена, и кинетические параметры рассчитывались с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 7. Одну единицу фермента определяли как количество CPG2, необходимое для превращения 1 мкмоль субстрата в продукт за 1 мин [17, 18].

Необходимо отметить, что до определения активности лиофилизированный коммерческий фермент (0,4 мг/мл) был растворён в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5) и диализован (для отсеечения 30 kDa) против этого же буфера (50 мМ Tris-HCl) для удаления возможных неизвестных примесей.

Гель-фильтрация. Лизозим (14 kDa), овальбумин (43 kDa), бычий сывороточный альбумин (66 kDa) и альдолаза (150 kDa) использовали для построения стандартной кривой (log MM к объёму) с использованием Sephadex G-100 («GE Healthcare», США). Затем очищенный CPG2 загружали в колонку, уравнированную 50 мМ Tris-HCl, содержащим 150 мМ NaCl, и элюировали тем же буфером для определения его молекулярной массы (MM).

Структурные исследования. Флуоресцентная спектроскопия. Флуоресцентное излучение ароматических остатков CPG2 в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5) измерялось на люминесцентном спектрофотометре Perkin Elmer LS 55 («Perkin Elmer Inc.», США). Использовали длину волны возбуждения 280 нм, а эмиссионный спектр регистрировался в диапазоне 300–400 нм. Щели для возбуждения и излучения были установлены на 10 нм. Концентрация фермента составляла 30 мг/мл.

КД-спектроскопия. Спектры КД в дальнем УФ-диапазоне (200–250 нм) записывали на спектрополяриметре JASCO J-715 («JASCO», Япония). Концентрация CPG2 составляла 0,2 мг/мл в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5). Результаты выражались как молярная эллиптичность $[\theta]$ (град·см²·дмоль⁻¹) и рассчитывались по формуле $[\theta]\lambda = (\theta \times 100 \text{ MRW})/(cl)$, где c – концентрация белка в мг/мл, l – длина оптического пути света (см) и θ – измеренная эллиптичность (градусы) при длине волны λ .

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для очистки целевого белка на хитин-содержащей колонке использовали вектор рТХВ1, который содержит интеин из *Mycobacterium xenopi* и хитин-связывающий домен (CBD) на

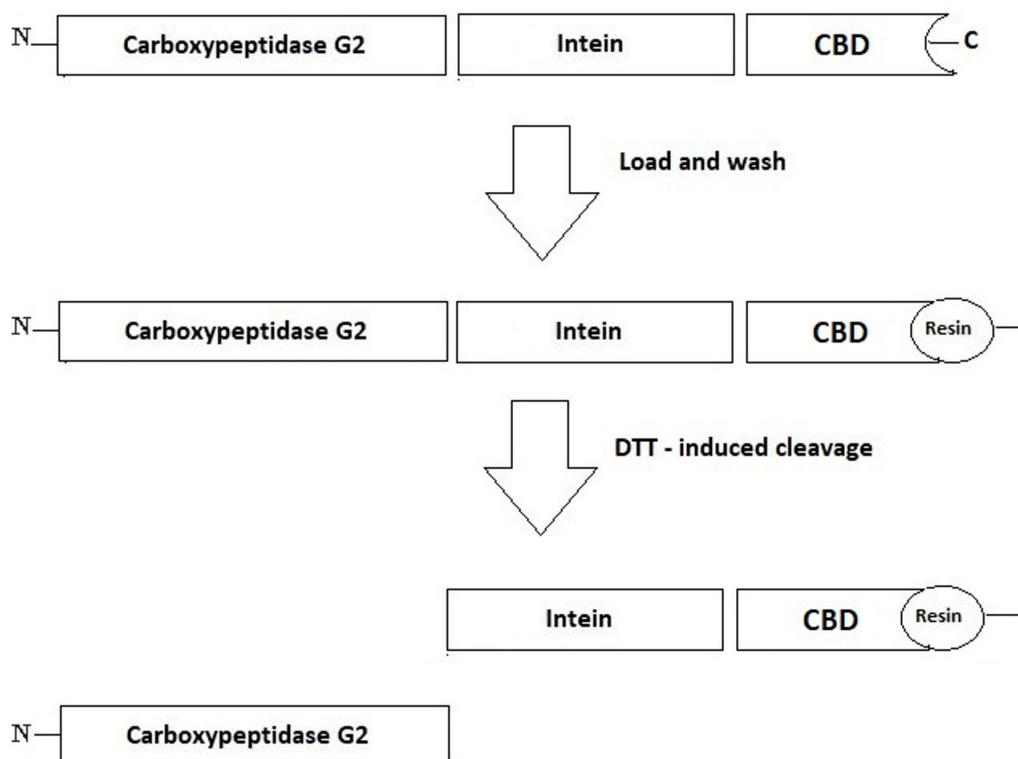


Рис. 1. Схематическое изображение конструкции гибридной карбоксипептидазы G2. Кодированная последовательность CPG2 была встроена в вектор рТХВ1. Объединённая конструкция белка состояла из трёх частей: самого фермента, интеина и С-концевого CBD для связывания со смолой, покрытой хитином, и для облегчения одностадийной очистки

С-конце. CBD — одна из лучших альтернатив гистидиновым меткам, поскольку он дешевле и его можно регенерировать большее количество раз [19, 20]. Генно-инженерный интеин из *M. xenopi* может подвергаться самоотщеплению под действием тиоловых реагентов, в результате чего высвобождается целевой белок (рис. 1). В данном случае ген карбоксипептидазы G2 был оптимизирован по кодам, синтезирован и затем вставлен в NdeI и SapI (сайты рестрикции вектора рТХВ1) для предупреждения добавления любой дополнительной аминокислоты к очищенному ферменту после самоотщепления (рис. 1). Правильное клонирование полного гена подтверждали секвенированием ДНК полученной конструкции (рТХВ–CPG2).

Впоследствии были тестированы различные условия экспрессии, включая разные питательные среды (LB, 2xYT и M9), концентрации IPTG (0,1; 0,5 и 1 мМ), температуры (16, 25 и 37 °С) и время инкубации (10, 20 и 30 ч). Наибольшая растворимость белка (~ 50%) была достигнута в среде 2xYT, содержащей 1% глюкозы, после индукции 0,5 мМ IPTG в течение 30 ч при 25 °С (рис. 2). В других условиях экспрессия белка приводила к очень низкому количеству раст-

воримого белка или к образованию телец включения. Относительное содержание растворимого CPG2 в условиях оптимальной экспрессии было количественно определено с использованием

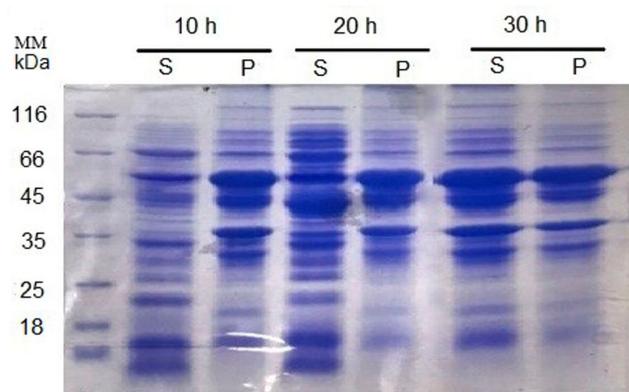


Рис. 2. SDS-PAGE анализ экспрессии карбоксипептидазы G2 в оптимальных условиях. Экспрессия в среде 2xYT, содержащей 1% глюкозы, индукция 0,5 мМ IPTG при 25 °С в течение 10, 20 и 30 ч. Оптимальные условия достигались через 30 ч при 25 °С. S — супернатант, P — осадок. (С цветными вариантами рис. 2 и 3 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте: [http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/.](http://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/))

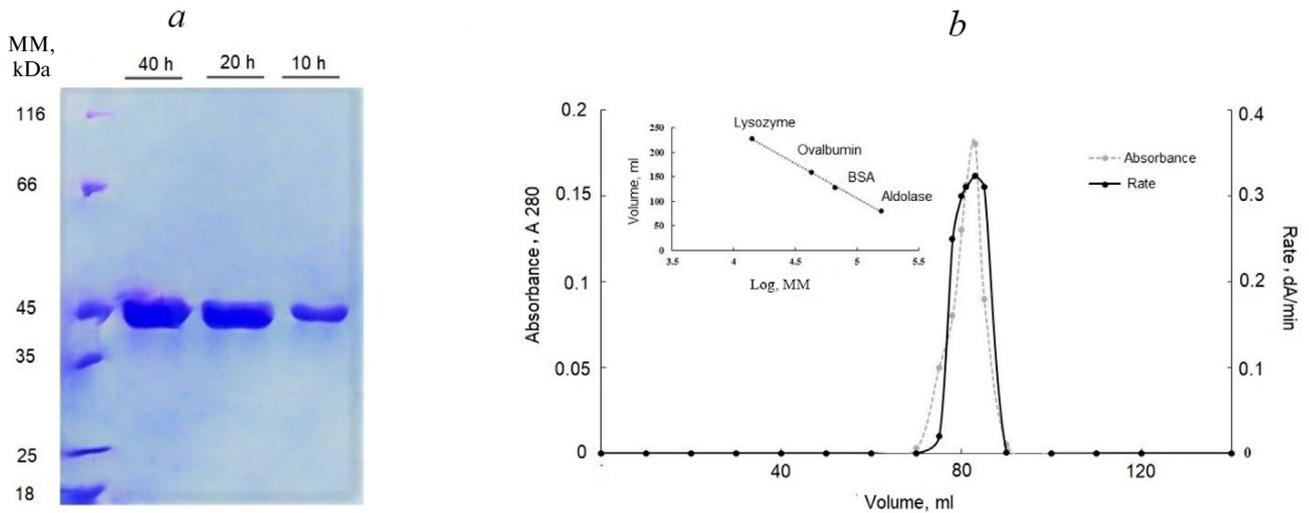


Рис. 3. *a* – SDS-PAGE для анализа реакции расщепления на колонке слитого белка CPG2 в присутствии DTT в различные моменты времени в течение 40 ч. Оптимальное время расщепления составляло 20 ч. После расщепления фермент очищали до гомогенности. *b* – Определение молекулярной массы гель-фильтрацией с использованием Sephadex G-100

программного обеспечения ImageJ (рис. 2), которое продемонстрировало равные количества CPG2 в супернатанте и в осадке. Растворимая карбоксипептидаза G2 составляла около 35% от общего количества белков в супернатанте.

Растворённый экспрессированный белок был нанесён на колонку со связанным хитином. Отщепление интеина индуцировали 50 мМ DTT в течение 10, 20, и 40 ч при 4 °С. Инкубация в течение 20 ч приводила к лучшему отщеплению, а через 40 ч степень отщепления существенно не изменялась, однако активность фермента значительно снижалась. Выход активного CPG2 составил 305 мг CPG2 на литр культуры (табл. 1). Очищенный белок дал полосу с ММ 42 kDa на SDS-PAGE (соответствует одной субъединице CPG2), что подтверждает полное удаление интеина и CBD из карбоксипептидазы G2 (рис. 3, *a*).

Молекулярную массу фермента определяли гель-фильтрацией на Sephadex G-100. Стандарты белков использовали для построения калибровочной кривой зависимости логарифма моле-

кулярной массы от объема элюирования. Результаты показали наличие активной фракции (в объеме 110 мл), соответствующей ММ 83 kDa, что указывает на присутствие димерного белка (рис. 3, *b*).

Кинетические параметры очищенного фермента с меткой CBD и без нее рассчитывали с использованием уравнения Михаэлиса–Ментен. Значения K_m и k_{cat} для очищенного фермента были определены как $6,5 \pm 0,3$ мкМ и $4,57 \pm 0,23$ с⁻¹ соответственно, что существенно не отличалось от значений k_{cat} и K_m коммерчески доступного CPG2 из *Pseudomonas* sp. («Sigma»), использованного в качестве контроля (табл. 2). Хотя для получения очищенного фермента за одну стадию применялись очень большая метка и DTT, проверка активности и гель-фильтрация показали, что фермент сохранил свою димерную структуру и восстановил свою активность после расщепления на колонке. Значение K_m для очищенного фермента с интеином и хитин-связывающим доменом составляло ~47 мМ, а k_{cat} состав-

Таблица 1. Очистка растворимого CPG2 из 1 литра культуры

Этапы	Общий белок (мг)	Общая активность (ед.)	Удельная активность (ед./мг)	Целевой гибридный белок (мг)	Целевой белок (мг)
Частицы (CPG2 с меткой)	~ 800	ND	ND	585	–
Супернатант (растворимый CPG2 с меткой)	1000	90	0,09	360	–
Колонка с хитин-связанным доменом (растворимый CPG2 без метки)	305	1020	3,34	–	305

Таблица 2. Кинетические параметры, полученные для CPG2

Фермент	K_m (мкМ)	k_{cat} (s^{-1})	k_{cat}/K_m
CPG2 (контроль)	$6,3 \pm 0,3$	$4,34 \pm 0,22$	0,68
CPG2 (без интеина)	$6,5 \pm 0,3$	$4,57 \pm 0,23$	0,70
CPG2 (с интеином)	$47,8 \pm 2,4$	$0,47 \pm 0,01$	0,01

ляло $0,47 s^{-1}$. По-видимому, присутствие метки из-за ее большого размера значительно снижает каталитическую эффективность.

Чтобы убедиться в отсутствии структурных изменений в растворимой карбоксипептидазе G2, изучались также её вторичная и третичная структуры с использованием КД в дальнем УФ-диапазоне и флуоресцентной спектроскопии. Спектр КД в дальнем УФ-диапазоне полученного рекомбинантного фермента был подобен спектру контрольного CPG2, показывая отрицательные пики, соответствующие структурам α -спирали и β -листа (рис. 4, *a*), о которых ранее сообщалось для карбоксипептидазы G2 [21]. Спектр флуоресценции рекомбинантной карбоксипептидазы G2 также не отличался от контрольного (рис. 4, *b*).

Наши предыдущие исследования показали, что интеин можно использовать для очистки тетрамерного фермента (уриказы) [22]. Как и в текущих исследованиях, функциональных и структурных различий по сравнению с контролем не наблюдалось [22]. Кислые и основные факторы роста фибробластов человека, человеческий α -1-антитрипсин и цекропин (противо-

микробный) также экспрессировались с использованием этой интеиновой системы [23–25].

Ранее CPG2 из *Pseudomonas* sp. (штамм RS16) был очищен с использованием трех стадий очистки, включающих хроматографии на SP-Sephadex, DEAE-Sephadex и затем с иммобилизованной на Sepharose Procion red H-8BN [26]. В другом исследовании Minton et al. [27] этот фермент экспрессировался в *E. coli* с очень низким выходом. Чтобы улучшить его экспрессию, Goda et al. [2] экспрессировали синтетический ген с оптимизированными кодонами в виде телец включения, которые требовали рефолдинга, что могло снизить выход активного белка. В том же исследовании His-метка использовалась для одностадийной очистки с использованием колонки Ni-NTA, но метка оставалась неотщепленной [2]. Недавно Jeyharan et al. [28] сообщили о производстве растворимого белка (250 мг/литр) с использованием His-метки для простой очистки. В их исследовании метка была удалена протеазой TEV, что потребовало дополнительной стадии очистки на колонке Ni-NTA с последующей хроматографией на Superdex 75-GL. Протеаза TEV – дорогой фермент; кроме того, расщепление TEV оставляет лишний остаток, который может не подходить для терапевтических белков [28].

В текущем исследовании очистка CPG2 была упрощена до одной стадии с использованием самоотщепляющегося интеина без добавления аминокислот. К настоящему времени в ряде исследований сообщалось об очистке белков с помощью интеинов, но уникальность характеристик каждого белка может привести к разным результатам. Таким образом, каждый белок требует

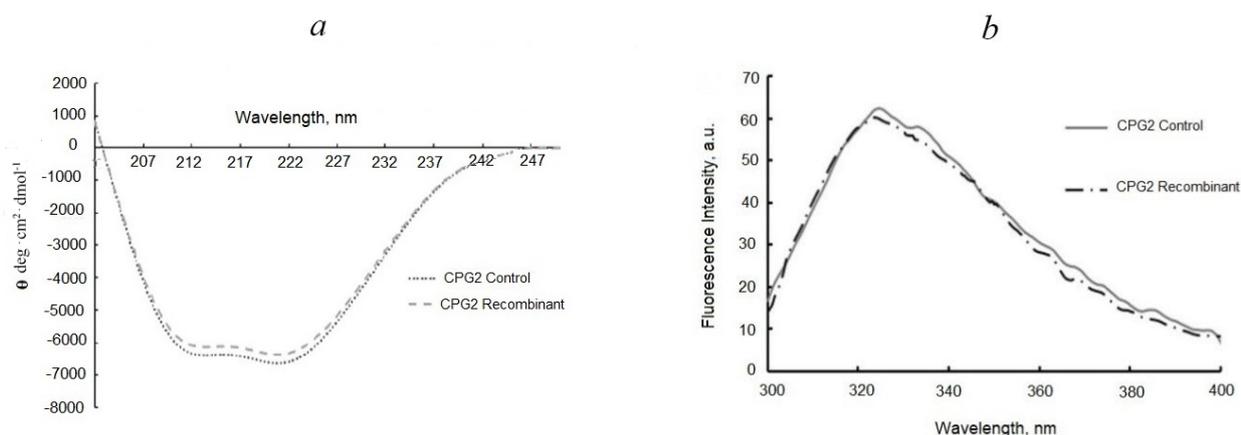


Рис. 4. Структурный анализ карбоксипептидазы G2. *a* – Спектры КД рекомбинантного и контрольного ферментов CPG2 карбоксипептидазы G2 (0,2 мг/мл) в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5). *b* – Флуоресценция очищенного и контрольного ферментов CPG2. Длина волны возбуждения составляла 280 нм, и регистрировали излучение в диапазоне 300–400 нм. Концентрация фермента составляла 60 мкг/мл в 50 мМ Tris-HCl (pH 7,5)

независимой оценки. В данной работе соответствующий выход растворимого фермента (305 мг/литр) был достигнут при оптимальных условиях культивирования, и никаких структурных и функциональных изменений не произошло. Другой ключевой аспект — способность этой метки увеличивать растворимую экспрессию карбоксипептидазы G2. Прогноз ccSOL omics был использован для расчёта показателя способности к растворению и для идентификации растворимых фрагментов в белке. Эта программа предсказывает результаты эндогенной и гетерологической экспрессии белков *E. coli* на основе их гидрофобности и гидрофильности, а также склонности к образованию β -листных и α -спиральных структур [29, 30]. Вероятность того, что CPG2, слитый с интеином и CBD, будет экспрессироваться в растворимой форме была рассчитана как ~60%, что было больше, чем общая оценка, полученная для одного фермента (35%). ccSOL omics также идентифицировал больше нерастворимых областей в первичной последовательности карбоксипептидазы G2 по сравнению с фрагментом интеина. Ранее мы клонировали ген, кодирующий карбоксипептидазу G2 (без метки), в вектор pET28, и исследовали его экспрессию в различных условиях, однако только небольшое количество белка было найдено в растворимой фракции (неопубликованные данные). Этот результат, согласующийся с другими нашими экспериментальными данными, также подтвердил способность интеина увеличивать растворимость CPG2.

Насколько нам известно, хотя эта коммерческая система саморасщепляющегося интеина

использовалась для очистки ряда белков, в данном исследовании впервые оценивается ее влияние на растворимость белка. В целом нам удалось повысить растворимость экспрессированного CPG2 и очистить его с помощью одностадийной процедуры, опосредованной интеином. Примечательно, что фермент сохранил свою активность и гомодимерную структуру после процесса экспрессии и очистки. Наш результат вселяет надежду на то, что использование интеинов для очистки мультимерных белков может стать перспективным вариантом. Тем не менее представляется необходимым проведение дополнительных исследований для улучшения самостоятельной системы интеина или в сочетании её с другими системами для крупномасштабной очистки таких терапевтических ферментов, особенно мультимерных белков.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Иранского национального института развития медицинских исследований (NIMAD, проект № 940711).

Благодарности. Мы благодарны исследовательскому совету Университета Tarbiat Modares, проф. Khosro Khajeh за поддержку в этом исследовании.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов в какой-либо сфере деятельности.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Rowsell, S., Paupit, R. A., Tucker, A. D., Melton, R. G., Blow, D. M., and Brick, P. (1997) Crystal structure of carboxypeptidase G2, a bacterial enzyme with applications in cancer therapy, *Structure*, **5**, 337-347, doi: 10.1016/S0969-2126(97)00191-3.
2. Goda, S. K., Rashidi, F. A. B., Fakhro, A. A., and Al-Obaidli, A. (2009) Functional overexpression and purification of a codon optimized synthetic glucaripidase (Carboxypeptidase G2) in *Escherichia coli*, *Protein J.*, **28**, 435-442, doi: 10.1016/J.ENZMICTEC.2016.08.001.
3. Ramsey, L. B., Balis, F. M., O'Brien, M. M., Schmiegelow, K., Pauley, J. L., et al. (2018) Consensus guideline for use of glucaripidase in patients with high-dose methotrexate induced acute kidney injury and delayed methotrexate clearance, *Oncologist*, **23**, 52-61.
4. Rattu, M. A., Shah, N., Lee, J. M., Pham, A. Q., and Marzella, N. (2013) Glucaripidase (voraxaze), a carboxypeptidase enzyme for methotrexate toxicity, *P T*, **38**, 732-744.
5. Wingfield, P. T. (2015) Overview of the purification of recombinant proteins, *Curr. Protoc. Protein Sci.*, **80**, 6.1.1-6.1.35, doi: 10.1002/0471140864.ps0601s80.
6. Rosano, G. L., and Ceccarelli, E. A. (2014) Recombinant protein expression in *Escherichia coli*: advances and challenges, *Front. Microbiol.*, **5**, 172, doi: 10.3389/fmicb.2014.00172.
7. Goh, H. C., Sobota, R. M., Ghadessy, F. J., and Nirantar, S. (2017) Going native: Complete removal of protein purification affinity tags by simple modification of existing tags and proteases, *Protein Expr. Purif.*, **129**, 18-24, doi: 10.1016/J.PEP.2016.09.001.
8. Li, Y. (2011) Self-cleaving fusion tags for recombinant protein production, *Biotechnol. Lett.*, **33**, 869-881, doi: 10.1007/s10529-011-0533-8.
9. Fan, Y., Miozzi, J. M., Stimple, S. D., Han, T. C., and Wood, D. W. (2018) Column-free purification methods for recombinant proteins using self-cleaving aggregating tags, *Polymers (Basel)*, **10**, 468, doi: 10.3390/polym10050468.
10. Wu, W. Y., Mee, C., Califano, F., Banki, R., and Wood, D. W. (2006) Recombinant protein purification by self-cleaving aggregation tag, *Nat. Protoc.*, **1**, 2257-2262, doi: 10.1038/nprot.2006.314.
11. Arnau, J., Lauritzen, C., Petersen, G. E., and Pedersen, J. (2006) Current strategies for the use of affinity tags and tag

- removal for the purification of recombinant proteins, *Protein Expr. Purif.*, **48**, 1-13, doi: 10.1016/J.PEP.2005.12.002.
12. Belfort, M., Stoddard, B. L., Wood, D. W., and Derbyshire, V. (2006). *Homing endonucleases and inteins*, Springer Science & Business Media.
 13. Banki, R., and Wood, D. W. (2005) Inteins and affinity resin substitutes for protein purification and scale up, *Microb. Cell Fact.*, **4**, 1-6, doi: 10.1186/1475-2859-4-32.
 14. Lahiry, A., Fan, Y., Stimple, S. D., Raith, M., and Wood, D. W. (2018) Inteins as tools for tagless and traceless protein purification, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **93**, 1827-1835, doi: 10.1002/jctb.5415.
 15. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680.
 16. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254.
 17. Rashidi, F. B., AlQhatani, A. D., Bashraheel, S. S., Shaabani S., Groves, M. R. et al. (2018) Isolation and molecular characterization of novel glucaripidases: enzymes to improve the antibody directed enzyme pro-drug therapy for cancer treatment, *PLoS One*, **13**, e0196254, doi: 10.1371/journal.pone.0196254.
 18. AlQahtani, A. D., Al-Mansoori, L., Bashraheel, S. S., Rashidi, F. B., Al-Yafei, A., et al. (2019) Production of "biobetter" glucaripidase variants to improve drug detoxification and antibody directed enzyme prodrug therapy for cancer treatment, *Eur. J. Pharm. Sci.*, **127**, 79-91, doi: 10.1016/J.EJPS.2018.10.014.
 19. Wang, L., Kang, J. H., Kim, K. H., and Leeb, E. K. (2009) Expression of intein-tagged fusion protein and its applications in downstream processing, *J. Chem. Technol. Biotechnol.*, **85**, 11-18, doi: 10.1002/jctb.2277.
 20. Fong, B. A., Wu, W. Y., and Wood, D. W. (2010) The potential role of self-cleaving purification tags in commercial-scale processes, *Trends Biotechnol.*, **28**, 272-279, doi: 10.1016/j.tibtech.2010.02.003.
 21. Yachnin, B. J., and Khare, S. D. (2017) Engineering carboxypeptidase G2 circular permutations for the design of an autoinhibited enzyme, *Protein Eng. Des.*, **30**, 321-331, doi: 10.1093/protein/gzx005.
 22. Alishah, K., Asad, S., Khajeh, K., and Akbari, N. (2016) Utilizing intein-mediated protein cleaving for purification of uricase, a multimeric enzyme, *Enzyme Microb. Technol.*, **93-94**, 92-98, doi: 10.1016/J.Enzmictec.2016.08.001.
 23. Wood, D. W., Derbyshire, V., Wu, W., Chartrain, M., Belfort, M., and Belfort, G. (2000) Optimized single-step affinity purification with a self-cleaving intein applied to human acidic fibroblast growth factor, *Biotechnol. Prog.*, **16**, 1055-1063, doi: 10.1021/bp0000858.
 24. Sharma, S. S., Chong, S., and Harcum, S. W. (2006) Intein-mediated protein purification of fusion proteins expressed under high-cell density conditions in *E. coli*, *J. Biotechnol.*, **125**, 48-56, doi: 10.1016/j.jbiotec.2006.01.018.
 25. Díaz, M., Venturini, E., Marchetti, S., Arenas, G., and Marshall, S. H. (2012) Intein-mediated expression of cecropin in *Escherichia coli*, *Electron. J. Biotechnol.*, **15**, doi: 10.2225/vol15-issue2-fulltext-2.
 26. Sherwood, R. F., Melton, R. G., Alwan, S. M., and Hughes, P. (1985) Purification and properties of carboxypeptidase G2 from *Pseudomonas* sp. strain RS-16, *Eur. J. Biochem.*, **148**, 447-453, doi: 10.1111/j.1432-1033.1985.tb08860.x.
 27. Minton, N. P., Atkinson, T., and Sherwood, R. F. (1983) Molecular cloning of the *Pseudomonas* carboxypeptidase G2 gene and its expression in *Escherichia coli* and *Pseudomonas putida*, *J. Bacteriol.*, **156**, 1222-1227.
 28. Jeyaharan, D., Aston, P., Garcia-Perez, A., Schouten, J., Davis, P., and Dixon, A. M. (2016) Soluble expression, purification and functional characterisation of carboxypeptidase G2 and its individual domains, *Protein Expr. Purif.*, **127**, 44-52, doi: 10.1016/J.PEP.2016.06.015.
 29. Agostini, F., Cirillo, D., Livi, C. M., DelliPonti, R., and Tartaglia, G. G. (2014) ccSOL omics: a webserver for solubility prediction of endogenous and heterologous expression in *Escherichia coli*, *Bioinformatics*, **30**, 2975-2977, doi: 10.1093/bioinformatics/btu420.
 30. Hebditch, M., Carballo-Amador, M. A., Charonis, S., Curtis, R., and Warwicker, J. (2017) Protein-Sol: a web tool for predicting protein solubility from sequence, *Bioinformatics*, **33**, 3098-3100, doi: 10.1093/bioinformatics/btx345.

ENHANCED SOLUBILITY AND ONE-STEP PURIFICATION OF FUNCTIONAL DIMERIC CARBOXYPEPTIDASE G2*

A. Khodakarami¹, B. Dabirmanesh^{1**}, S. Asad², and M. Khaledi¹

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Biological Sciences, Tarbiat Modares University, 14115 Tehran, Iran; E-mail: dabirmanesh@modares.ac.ir

² Department of Biotechnology, College of Science, University of Tehran, 14155 Tehran, Iran

Carboxypeptidase G2 is a bacterial enzyme that catalyzes methotrexate conversion to its inactive forms which are then eliminated via a non-renal pathway in patients with renal disorders during a high-dose methotrexate administration. Due to the increasing demand of this enzyme, it was of interest to simplify its production process. For this reason, we developed a method for production and one-step purification of this enzyme using an intein-mediated system with a chitin-binding affinity tag. The carboxypeptidase G2 gene from *Pseudomonas* RS16 was optimized, synthesized, cloned into the pTXB1 expression vector and finally transformed into *Escherichia coli* BL21 (DE3) cells. The optimal condition for the enzyme soluble expression was achieved in 2×YT medium containing 1% glucose at 25°C for 30 h with 0.5 mM IPTG. The enzyme without intein was expressed as inclusion bodies indicating the importance of intein for the protein solubility. The expressed homodimer protein was purified to homogeneity on a chitin affinity column. The K_m and k_{cat} values of 6.5 μM and 4.57 s⁻¹, respectively, were obtained for the purified enzyme. Gel filtration analysis indicated that the resulting recombinant protein was a dimer of 83 kDa. Fluorescence and circular dichroism spectroscopy confirmed the enzyme tertiary and secondary structures, respectively. The use of intein-mediated system provided the possibility of the one-step carboxypeptidase G2 purification, paving the way to the application of this enzyme in pharmaceuticals.

Keywords: carboxypeptidase G2, intein, methotrexate

УДК 57.021

РОЛЬ Р-ГЛИКОПРОТЕИНА В ОГРАНИЧЕНИИ ПРОНИЦАЕМОСТИ КЛЕТОЧНЫХ МЕМБРАН ПРИ ОКИСЛИТЕЛЬНОМ СТРЕССЕ*

© 2021 А.В. Шулькин**, Ю.В. Абаленихина, И.В. Черных,
П.Д. Ерохина, Е.Н. Якушева

Рязанский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, 390026 Рязань, Россия;
электронная почта: alekseyskulkin@rambler.ru

Поступила в редакцию 15.07.2020

После доработки 03.09.2020

Принята к публикации 09.09.2020

Р-гликопротеин является одним из наиболее клинически значимых представителей ABC-транспортёров в силу участия в транспорте биобиотиков и ксенобиотиков через цитоплазматическую мембрану. Известно, что активность и экспрессия Р-гликопротеина может изменяться под воздействием различных химических веществ, факторов внешней среды, патологических процессов. В настоящем исследовании была изучена роль Р-гликопротеина в ограничении проницаемости цитоплазматических мембран в условиях окислительного стресса. Клетки аденокарциномы ободочной кишки человека (Caco-2), гиперэкспрессирующие данный белок-транспортёр, культивировали с пероксидом водорода в питательной среде в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 72 ч. Транспорт субстрата Р-гликопротеина фексофенадина через мембрану клеток оценивали в специальных трансвелл-системах. Количество белка-транспортёра и транскрипционного фактора Nrf2 анализировали методом иммуноферментного анализа (ИФА). Концентрацию белковых SH-групп, продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных белков определяли спектрофотометрически. По результатам исследования пероксид водорода в концентрациях 0,1–5 мкМ не оказывал достоверного влияния на изучаемые показатели, однако в концентрации 10 мкМ вызывал снижение уровня белковых SH-групп, что сопровождалось повышением количества Nrf2. Последний, в свою очередь, увеличивал содержание и активность белка-транспортёра Р-гликопротеина, сдерживающего растущую проницаемость клеточной мембраны. Увеличение концентрации прооксиданта до 50 мкМ вызывало усиление окислительного стресса, что проявлялось снижением уровня SH-групп, повышением концентрации продуктов перекисного окисления липидов, карбонильных производных белков и снижением содержания Р-гликопротеина, что в итоге приводило к значительному повышению проницаемости цитоплазматической мембраны. Таким образом, транспортная и защитная роль Р-гликопротеина, заключающаяся в ограничении проницаемости клеточной мембраны, зависит от выраженности окислительного стресса и реализуется только при незначительных повреждениях мембран.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: Р-гликопротеин, Nrf2, окислительный стресс, проницаемость биологической мембраны, цитотоксичность пероксида водорода, окислительное повреждение липидов и белков, восстановленные тиолы.

DOI: 10.31857/S0320972521020081

ВВЕДЕНИЕ

ABC-транспортёры (англ. абб. ABC от ATP-Binding Cassette) – это АТР-зависимые белки-транспортёры, обеспечивающие энергозависимый перенос веществ через цитоплазматические мембраны. ABC-транспортёры выявлены в трех доменах (надцарствах) биологических видов – бактериях, археях и эукариотах, а также в

некоторых гигантских вирусах [1]. Геном человека включает 49 генов ABC-транспортёров, объединенных в семь подсемейств (обозначаемых латинскими буквами А–G). Известно, что нарушение функционирования 18 транспортёров связано с развитием заболеваний (например, нарушение ABCG7 вызывает муковисцидоз, ABCB11 – прогрессирующий семейный внутрипеченочный холестаз, и т.д.), а 20 из них

Принятые сокращения: АФК – активные формы кислорода; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ИФА – иммуноферментный анализ; клетки линии Caco-2 – клетки аденокарциномы ободочной кишки человека; ОП – оптическая плотность; ПОЛ – продукты перекисного окисления липидов; DTNB – 5,5'-дителибис(2-нитробензойная кислота); МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид; Nrf2 – транскрипционный фактор NF-E2-related factor 2; Р-gp – Р-гликопротеин.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ20-223, 18.01.2021.

** Адресат для корреспонденции.

вовлечены в транспорт лекарственных веществ [2]. ABC-транспортёры имеют общую структурную организацию: каждая молекула переносчика состоит из двух трансмембранных доменов, которые образуют транспортный канал и обеспечивают распознавание и связывание субстратов, а также двух нуклеотид-связывающих доменов, которые гидролизуют АТР [3, 4].

Самым изученным белком из суперсемейства ABC-транспортёров является Р-гликопротеин (он же – белок множественной лекарственной устойчивости 1, Р-gr, ABCB1-белок, MDR1) [5, 6]. Р-gr представляет собой крупный трансмембранный гликопротеин с молекулярной массой 170 кДа (из них 150 кДа приходится на пептидную часть). Р-gr обладает широкой субстратной специфичностью. Его субстратами являются преимущественно липофильные вещества с молекулярной массой 330–4000 Да, относящиеся к следующим фармакологическим группам: противоопухолевые, гипотензивные и антигистаминные препараты, сердечные гликозиды, антиагреганты, антикоагулянты, стероидные и тиреоидные гормоны, антибиотики, ингибиторы ВИЧ-протеиназы, иммунодепрессанты и др. [7].

Впервые Р-gr был выделен Juliano and Ling в 1976 г. из цитоплазматической мембраны клеток яичника китайского хомячка, отобранных по устойчивости к колхицину и демонстрирующих перекрестную резистентность к широкому спектру амфифильных веществ [8]. В дальнейшем этот белок-транспортёр был обнаружен в энтероцитах кишечника, гепатоцитах, эпителиальных клетках почечных канальцев, эндотелиальных клетках гистогематических барьеров. Поэтому в настоящее время принято считать, что Р-gr играет важную роль в развитии резистентности опухолей к химиотерапии [9], а также в транспорте эндогенных и экзогенных веществ [10].

Активность и экспрессия Р-gr могут изменяться под воздействием различных химических веществ, факторов внешней среды и патологических процессов [11]. Например, рифампицин и гипоксия могут активировать функционирование белка-транспортёра, а циклоспорин и верапамил его ингибируют [7], что, в свою очередь, влияет на проникновение субстратов белка-транспортёра внутрь клеток через цитоплазматическую мембрану (повышает или снижает соответственно).

Одним из факторов, влияющих на проницаемость цитоплазматической мембраны, является гиперпродукция активных форм кислорода (АФК). АФК при взаимодействии с цитоплазматической мембраной клеток вызывают активацию

перекисного окисления липидов (ПОЛ), что приводит к образованию пор, уменьшению толщины бислоя, нарушению текучести и, в конечном счете, повышению ее проницаемости [12].

С другой стороны, гиперпродукция АФК и развитие окислительного стресса увеличивают экспрессию редокс-чувствительного транскрипционного фактора Nrf2 (англ. NF-E2-related factor 2) [13], который, в свою очередь, может повысить экспрессию Р-gr [14], ограничивающего проницаемость мембраны для субстратов.

Таким образом, при гиперпродукции АФК проницаемость цитоплазматической мембраны для субстратов Р-gr может как повыситься (за счет разрушения мембраны), так и понизиться (за счет повышения активности белка-транспортёра), что на данный момент не изучено и послужило целью настоящего исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Культивирование клеток линии Сасо-2. Исследование выполнено на линии клеток аденокарциномы ободочной кишки человека (Сасо-2) (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37 °С и 5%-ном содержании CO₂ в инкубаторе WS-189С («World Science», Корея) в среде DMEM с высоким содержанием глюкозы (4 500 мг/л), также содержащей L-глутамин (4 мМ), 15% бычьей сыворотки, 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (все составляющие производств «Sigma-Aldrich», Германия). После достижения 70–90% конфлюентности клетки снимали с флакона добавлением раствора трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», Германия) и высевали: в 96-луночный планшет («Corning», США) – для оценки цитотоксичности пероксида водорода; в 6-луночные планшеты («Corning», США) – для оценки влияния пероксида водорода на количество Р-gr, Nrf2 и концентрацию продуктов перекисного окисления липидов, карбонильных производных белков и содержания белковых тиоловых SH-групп; в специальные трансвелл-системы (12 мм Transwell® планшеты с поликарбонатной мембранной вставкой с порами 0,4 мкм, «Corning», США) – для оценки влияния пероксида водорода на проницаемость клеточных мембран для субстрата Р-gr [15]. Клетки линии Сасо-2 культивировали в течение 21 сут, поскольку на данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в клетки, подобные энтероцитам тонкого кишеч-

ника, гиперэкспрессирующие Р-гр. Смену культуральной среды проводили раз в два дня, а на последней неделе – каждый день.

Окислительный стресс моделировали добавлением в культуральную среду пероксида водорода H_2O_2 («Sigma-Aldrich», Германия) в конечных концентрациях 0,1; 0,5; 1; 5; 10 и 50 мкМ и инкубацией в течение 72 ч. Смену среды проводили каждые 24 ч. На каждый эксперимент было выполнено по 3 повторения.

Тест на выживаемость (цитотоксический тест). Клетки засеивали в 96-луночный планшет из расчета 10^4 клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 сут., затем добавляли культуральную среду с H_2O_2 . После окончания инкубации в каждую лунку добавляли по 20 мкл 0,5%-ного раствора 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенил-2Н-тетразолиум бромид (МТТ) и инкубировали еще в течение 2 ч, затем раствор с МТТ удаляли и добавляли 200 мкл 1%-ного раствора диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия) [16]. Поглощение измеряли через 10 мин при 530 нм на иммуноферментном планшетном анализаторе Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США)[16].

Выживаемость клеток Сасо-2 в присутствии пероксида водорода рассчитывали по формуле: $(ОП \text{ опытных лунок} - ОП \text{ среды}) / (ОП \text{ контрольных лунок} - ОП \text{ среды}) \times 100\%$, где ОП – оптическая плотность.

Приготовление клеточных лизатов для анализа. Клетки засеивали в 6-луночные планшеты из расчета 10^5 клеток на каждую лунку и культивировали в течение 21 сут., затем добавляли культуральную среду с H_2O_2 . После окончания экспозиции клетки снимали с лунок раствором трипсин-ЭДТА (0,25% трипсина и 0,2% ЭДТА, «Sigma-Aldrich», Германия).

Часть клеток (2×10^6) трехкратно промывали фосфатным буфером рН 7,4 («ПанЭко», Россия), лизировали трехкратным циклом замораживания-размораживания в 200 мкл буфера при $-20^\circ C$ и использовали для проведения ИФА.

Вторую часть клеток (1×10^6) промывали изотоническим раствором NaCl («Медпро», Россия), добавляли 150 мкл лизирующего буфера (50 мМ рН 7,4 Tris-HCl, 150 мМ KCl, 0,5% тритон X-100, смесь ингибиторов протеиназ (4-(2-аминоэтилбензенсульфонил) флуорида гидрохлорид (AEBSF) 2 мМ, апротинин 0,3 мкМ, бестатин 130 мкМ, ЭДТА 1мМ, транс-эпоксисукцинил-L-лейциламидо(4-гуанидино)бутан (E-64) 14 мкМ, лейпептин 1 мкМ, «Sigma-Aldrich», Германия)), встряхивали на шейкере и инкубировали на льду в течение 10 мин. Затем центрифугировали в течение 10 мин при 5000 g (СМ-50, «Eppendorf», Герма-

ния). Цитоплазматическую (экстраядерную) фракцию переносили в отдельные пробирки и использовали для определения концентрации тиоловых (SH-) групп.

Аналогичным образом лизировали клетки, которые параллельно инкубировали в 6-луночных планшетах для определения концентрации продуктов ПОЛ и карбонильных производных белков, из расчета на 3×10^6 клеток – 450 мкл лизирующего буфера [17].

Анализ содержания Р-гр и Nrf2 в клетках линии Сасо-2. В лизате клеток методом ИФА определяли количество Р-гр и Nrf2 коммерческими наборами (Human Permeability glycoprotein ELISA Kit и Human Nuclear factor erythroid 2-related factor 2 ELISA Kit соответственно; «Blue gene», Китай). Светопоглощение измеряли при 450 нм на иммуноферментном планшетном анализаторе Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США). Количество белка в пробах анализировали методом Бредфорда (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, «ThermoFisher», США).

Определение концентрации белковых тиоловых (SH-) групп. Концентрацию белковых тиоловых групп определяли по разнице между уровнем общих и низкомолекулярных SH-групп. Анализ содержания общих SH-групп в лизате клеток проводили по методу Элмана с 5,5'-дитиобис(2-нитро)-бензойной кислотой (DTNB) в неденатурирующих условиях [18]. К 100 мкл образца добавляли 100 мкл 2 мМ DTNB («Serva», Германия) в 1 М Tris-HCl буфере (рН 8,0) и 1000 мкл дистиллированной воды. После 30-мин экспозиции количественно оценивали содержание 5-тио-2-нитробензойной кислоты при 412 нм на Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США). Концентрацию SH-групп рассчитывали исходя из коэффициента экстинкции $\epsilon_{412} = 13,6 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ [19]. Для определения содержания низкомолекулярных SH-групп пробу предварительно смешивали с охлажденной 5%-ной трихлоруксусной кислотой («Химмед», Россия), инкубировали на льду 15 мин, затем центрифугировали при 11 000 g (СМ-50, «Eppendorf», Германия) 5 мин при $4^\circ C$. Полученный супернатант нейтрализовали с помощью 1%-ного NaOH («Химмед», Россия) и использовали для определения низкомолекулярных SH-групп по реакции с DTNB.

Определение концентрации продуктов перекисного окисления липидов и карбонильных производных белков. В лизате клеток с помощью коммерческих наборов определяли концентрацию продуктов перекисного окисления липидов (ПОЛ) («Elabscience», Китай) и карбонильных производных белков («Sigma-Aldrich», Германия).

Метод определения продуктов ПОЛ – малонового диальдегида и 4-гидрокси-олефинов (4-гидрокси-2-ноненаля и 4-гидрокси-2-гексеналя) – основан на их взаимодействии с 1-метил-2-фенилиндолом с образованием стабильного хромофора, который имеет максимум поглощения при 586 нм [20].

Метод определения карбонильных производных белков основан на их взаимодействии с 2,4-динитрофенилгидразином с образованием 2,4-динитрофенилгидразонов, которые регистрировали при длине волны 375 нм. Концентрацию карбонильных производных белков рассчитывали исходя из коэффициента экстинкции $\epsilon_{375} = 22 \text{ мМ}^{-1}\text{см}^{-1}$ [21].

Анализ выполняли на иммуноферментном планшетном анализаторе Stat Fax 2100 («Awareness Technology», США).

Оценка транспорта субстрата Р-гликопротеина (фексофенадина) через мембрану клеток линии Сасо-2. Оценку проникновения субстрата Р-gp через билипидную мембрану клеток линии Сасо-2 оценивали в специальных трансвелл-системах (рис. 1). Трансвелл-система представлена двумя камерами: апикальной и базолатеральной. Дно апикальной камеры является полупроницаемой мембраной, на которую высевали клетки линии Сасо-2 с плотностью $10^5/\text{см}^2$ и культивировали в течение 21 сут.

Целостность клеточного монослоя оценивали по величине трансэпителиального сопротивления, которое определяли с помощью вольтметра Millicell ERS-2 («Millipore», США). Условием для выполнения транспортных экспериментов было значение выше $500 \text{ мОм} \times \text{см}^2$. В лунки трансвелл-системы добавляли культуральную среду с H_2O_2 в тестируемых концентрациях. После окончания инкубации культуральную среду заменяли на транспортную среду, представляющую собой раствор Хэнкса («Sigma-Aldrich», Германия) с 25 мМ HEPES

(«Sigma-Aldrich», Германия) и 1% диметилсульфоксида («ПанЭко», Россия). Затем добавляли субстрат Р-gp – фексофенадин («Sigma-Aldrich», Германия) – в апикальную камеру в конечной концентрации 150 мкМ [22]. Через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из базолатеральной камеры-реципиента для определения концентрации субстрата (*a-b* транспорт, обусловленный пассивной диффузией против функционирования Р-gp). В аналогичных трансвелл-системах оценивали транспорт фексофенадина из базолатеральной камеры в апикальную (*b-a* транспорт, обусловленный пассивной диффузией и функционированием Р-gp). Для этого субстрат в той же концентрации добавляли в базолатеральную камеру, а затем через 1, 2 и 3 ч забирали образцы из апикальной камеры для определения концентрации фексофенадина.

Транспорт маркерного субстрата рассчитывали по формуле [23]:

$$P_{app} = \frac{dQ}{dt} \times \frac{1}{(A \times C_0)},$$

где P_{app} – коэффициент кажущейся проницаемости (см/с), dQ/dt – изменение количества субстрата в камере-реципиенте за время инкубации (мкМ \times мл/с), A – площадь полупроницаемой мембраны лунки в трансвелл-системе (см²), C_0 – начальная концентрация субстрата в камере-доноре (мкМ).

Определение концентрации фексофенадина. Концентрацию фексофенадина в транспортной среде определяли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии (ВЭЖХ) с УФ-детектированием при длине волны 220 нм. Исследование выполнялось на ВЭЖХ системе «Стайер» (Россия) по оригинальной методике [24]. Полученная проба транспортной среды (50 мкл), содержащая фексофенадин, разводи-

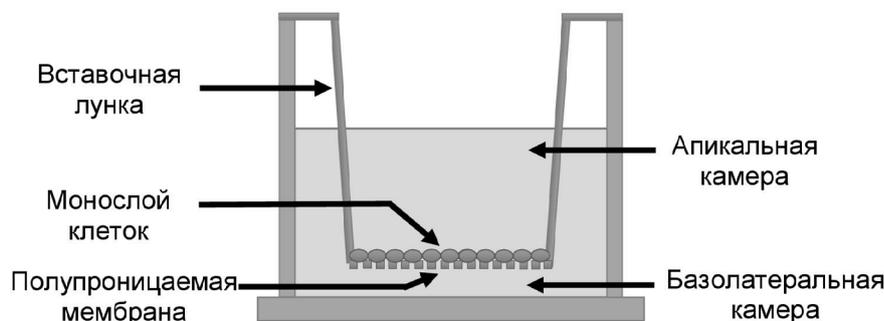


Рис. 1. Структура трансвелл-системы. Данная система представлена двумя камерами: апикальной и базолатеральной. Дно апикальной камеры является полупроницаемой мембраной, на которую высевали клетки линии Сасо-2 с плотностью $10^5/\text{см}^2$

лась в 150 мкл подвижной фазы, и 100 мкл полученного раствора вводились в хроматограф.

При анализе использовалась хроматографическая колонка Synergi 4 μm Polar-RP 80 \AA (250 \times 4,6) («Phenomenex», США). Температура разделения – 45 °С, скорость потока – 1 мл/мин. Состав подвижной фазы: 128 мл ацетонитрила («PanReac AppliChem», Испания), 267,4 мл воды деионизированной, 6,33 мл кислоты уксусной ледяной («PanReac AppliChem», Испания) с добавлением триэтиламина («PanReac AppliChem», Испания) до pH 6,7. Время удерживания фексофенадина в данных условиях составляло 12,8 мин. Количественное определение проводилось методом абсолютной калибровки по площади пиков. Аналитический диапазон методики составлял 1,2–57,4 мкМ.

Статистический анализ. Полученные результаты анализировали с помощью программ «StatSoft Statistica 13.0» (США, номер лицензии JPZ8111521319AR25ACD-W) и Microsoft Excel for Mac ver. 16.24 (ID02984-001-000001). Результаты представлены в виде $M \pm SD$. Для оценки статистической значимости различий использовали дисперсионный анализ (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью критерия Ньюмена–Кейлса. Статистически значимыми

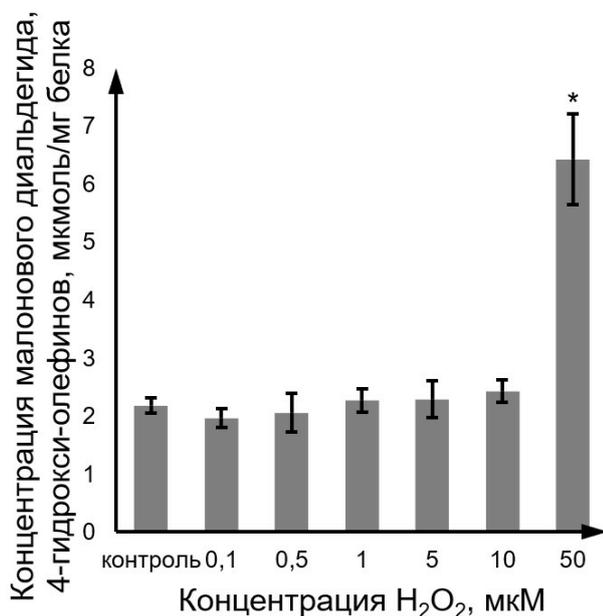


Рис. 2. Изменение концентрации продуктов перекисного окисления липидов (малонового диальдегида и 4-гидрокси-олефинов) при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 72 ч. Количественное определение продуктов ПОЛ проводили в лизате клеток Сасо-2 ($M \pm SD$, $n = 3$) фотометрическим методом с использованием коммерческого набора «Elabscience», Китай. * – Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$

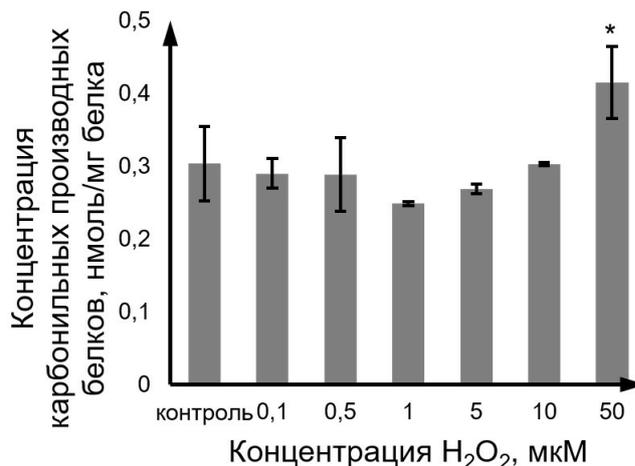


Рис. 3. Изменение концентрации карбонильных производных белков при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 72 ч. Количественное определение карбонилированных белков проводили в лизате клеток Сасо-2 ($M \pm SD$, $n = 3$) фотометрическим методом с использованием коммерческого набора «Sigma-Aldrich», Германия. * – Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$

считали различия при $p < 0,05$. Корреляционный анализ проводили с помощью критерия Пирсона.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Окислительное повреждение липидов и белков клеток линии Сасо-2 под действием H₂O₂. Окислительное повреждение липидов оценивали по уровню продуктов перекисного окисления (малонового диальдегида и 4-гидрокси-олефинов), белков – по концентрации белковых тиоловых (SH-) групп и содержанию карбонильных производных белков. H₂O₂ в концентрациях 0,1–10 мкМ достоверно не влиял на уровень продуктов ПОЛ, а в концентрации 50 мкМ повышал данный показатель на 194,9% ($p = 0,0002$) по сравнению с контролем (рис. 2).

Аналогичным образом содержание карбонильных производных белков в лизате клеток Сасо-2 повышалось только при концентрации H₂O₂ 50 мкМ – на 36,5% ($p = 0,001$) (рис. 3).

В то же время уровень белковых тиоловых (SH-) групп при воздействии H₂O₂ в концентрации 10 мкМ уменьшался на 52,4% ($p = 0,021$) и при концентрации 50 мкМ – на 38,1% ($p = 0,022$) по сравнению с контролем. При концентрации пероксида водорода 0,1; 0,5; 1 и 5 мкМ уровень восстановленных тиолов не изменялся относительно значений контрольной группы (рис. 4).

Таким образом, установлено, что H₂O₂ на клетках линии Сасо-2 вызывает повреждение

липидов и белков в концентрации от 50 мкМ, при этом окисление белковых SH-групп, играющих регуляторную роль, происходит уже при концентрации прооксиданта 10 мкМ.

Цитотоксическое действие H_2O_2 на клетки линии Сасо-2. Цитотоксическое действие H_2O_2 оценивалось в ходе МТТ-теста. В интактной группе клеток выживаемость клеток составила 100%, при действии пероксида водорода в концентрациях 0,1–10 мкМ – статистически значимо не отличалась от значений группы контроля и составила $87,6 \pm 9,3\%$. При концентрации H_2O_2 50 мкМ выживаемость клеток снижалась до $58,8 \pm 11,5\%$ ($p = 0,02$). В совокупности с описанными выше результатами эти данные свидетельствуют о том, что H_2O_2 вызывает повреждение и гибель клеток только при развитии выраженного окислительного стресса, проявляющегося повреждением липидов и белков.

Влияние H_2O_2 на количество P-гp и Nrf2. Количество Nrf2 в клетках линии Сасо-2 повышалось по сравнению с контролем под действием H_2O_2 в концентрациях 10 мкМ и 50 мкМ на 302,5% ($p = 0,02$) и 237,5% ($p = 0,03$) соответственно, а при остальных концентрациях прооксиданта – достоверно не изменялось (рис. 5)

Показано, что в диапазоне концентраций H_2O_2 от 0,1 до 50 мкМ уровень Nrf2 был обратно пропорционален содержанию белковых тиоловых (SH-) групп (рис. 6), что согласуется с классическими представлениями о механизме регуляции Nrf2 [25].

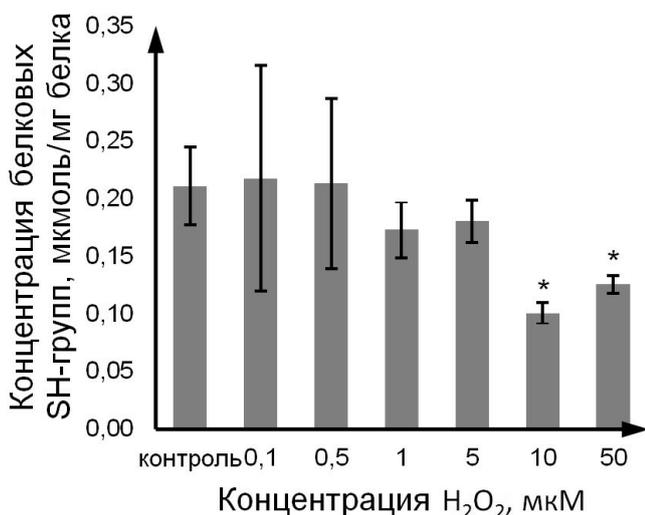


Рис. 4. Изменение концентрации белковых SH-групп при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 72 ч. Количественное определение тиоловых (SH-) групп проводили фотометрическим методом по реакции с DTNB («Serva», Германия) в лизате клеток Сасо-2 ($M \pm SD$, $n = 3$). * – Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$

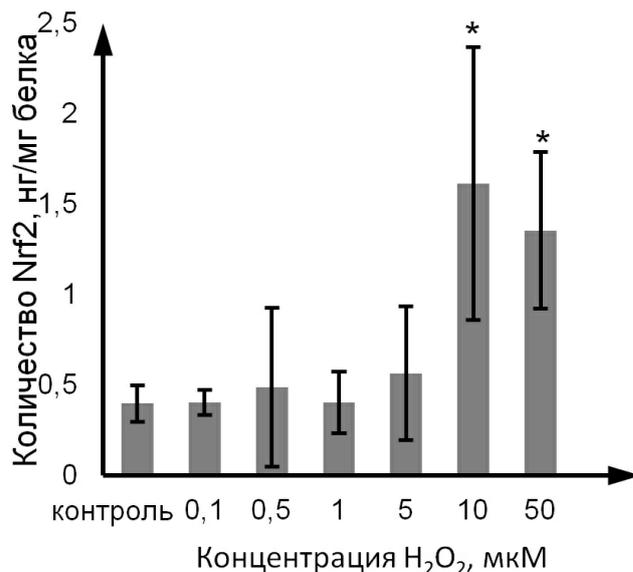


Рис. 5. Изменение количества Nrf2 при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 72 ч. Количество Nrf2 определяли в лизате клеток Сасо-2 ($M \pm SD$, $n = 3$) с помощью ИФА. * – Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$

Количество P-гp в клетках линии Сасо-2, оцененное методом ИФА, составило 110,8 нг/мг белка или 23,5 нг/ 10^6 клеток. H_2O_2 в концентрациях 0,1; 0,5; 1; 5 мкМ не влиял на количество белка-транспортера. В концентрации 10 мкМ пероксид водорода повышал содержание P-гp на 68,9% ($p = 0,01$), а в концентрации 50 мкМ – снижал его на 65,8% ($p = 0,01$) по сравнению с показателями контроля (рис. 7)

Анализ результатов выявил, что уровень P-гp в лизате клеток Сасо-2 был прямо пропорционален содержанию Nrf2 в экспериментах с H_2O_2 в диапазоне концентраций от 0,1 до 10 мкМ (рис. 8).

Таким образом, окислительный стресс и окисление SH-групп повышает уровень транскрипционного фактора Nrf2, который, в свою очередь, увеличивает количество белка-транспортера P-гp. Усиление окислительного стресса приводит к снижению количества P-гp, несмотря на сохраняющийся повышенный уровень Nrf2.

Влияние H_2O_2 на транспорт субстрата P-гp (фексофенадина) через билипидную мембрану клеток линии Сасо-2. Коэффициент кажущейся проницаемости Рарр *b-a* фексофенадина, характеризующий его транспорт из базолатеральной камеры в апикальную за счет пассивной диффузии и функционирования P-гp, составил $3,08 \times 10^{-6} \pm \pm 0,94 \times 10^{-6}$ см/с, коэффициент кажущейся проницаемости Рарр *a-b*, оценивающий транспорт из апикальной камеры в базолатеральную

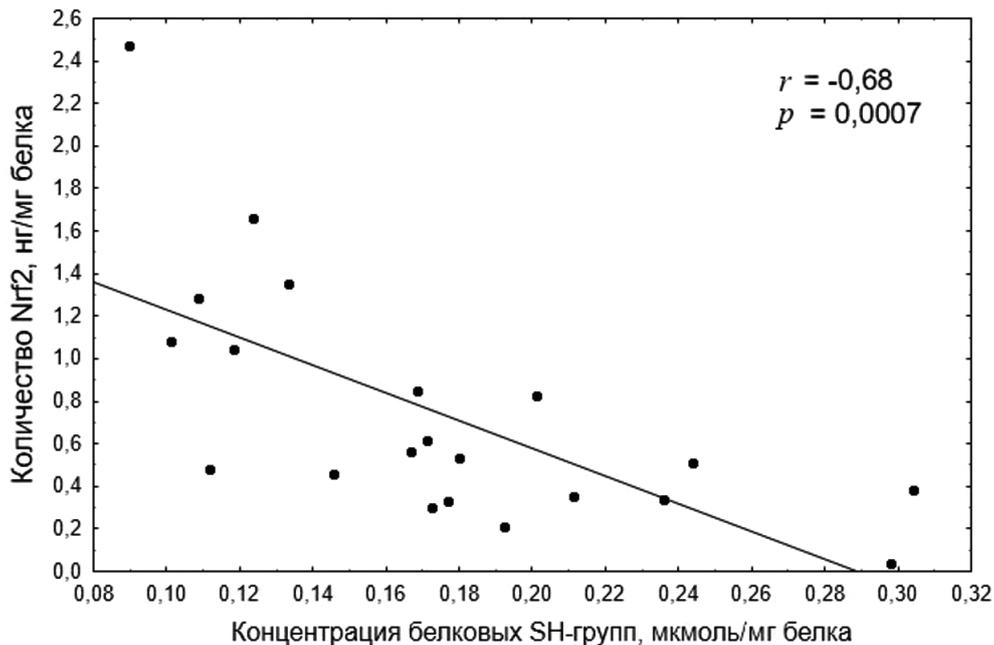


Рис. 6. Корреляционная зависимость между концентрацией SH-групп (мкмоль/мг белка) и количеством Nrf2 (нг/мг белка) при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 72 ч. Коэффициент корреляции $r = -0,68$, $p = 0,0007$, что свидетельствует об обратной зависимости между концентрацией восстановленных тиолов и количеством транскрипционного фактора Nrf2

за счет пассивной диффузии против функции Р-гр, составил $1,13 \times 10^{-6} \pm 0,6 \times 10^{-6}$ см/с. Из представленных данных видно, что транспорт, обусловленный функционированием Р-гр, почти в 3 раза выше транспорта, происходящего за

счет пассивной диффузии против работы белка-транспортера ($p = 0,013$) (таблица).

H_2O_2 в концентрациях 0,1–5 мкМ достоверно не влиял на транспорт субстрата Р-гр фексофенадина из апикальной камеры в базальную и в обратном направлении. При этом сохранялось превышение транспорта, осуществляемого Р-гр пассивной диффузией, над транспортом пассивной диффузией против работы изучаемого белка-транспортера ($p < 0,05$), что характеризует стабильное состояние его функциональной активности и проницаемости мембраны.

В концентрации 10 мкМ H_2O_2 вызывал повышение коэффициента кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$ фексофенадина по сравнению с контролем на 98,1% ($p = 0,056$) и не влиял на коэффициент кажущейся проницаемости $P_{app} a-b$. Данные результаты свидетельствуют о том, что транспорт фексофенадина, обусловленный Р-гр, повышается, при этом транспорт субстрата пассивной диффузией против функционирования белка-транспортера достоверно не изменяется.

При увеличении концентрации H_2O_2 до 50 мкМ происходило повышение коэффициента кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$ фексофенадина на 260,7% ($p = 0,001$) и увеличение коэффициента кажущейся проницаемости $P_{app} a-b$ на 1029,2% ($p = 0,001$) по сравнению с контролем (таблица). При этом коэффициент кажу-

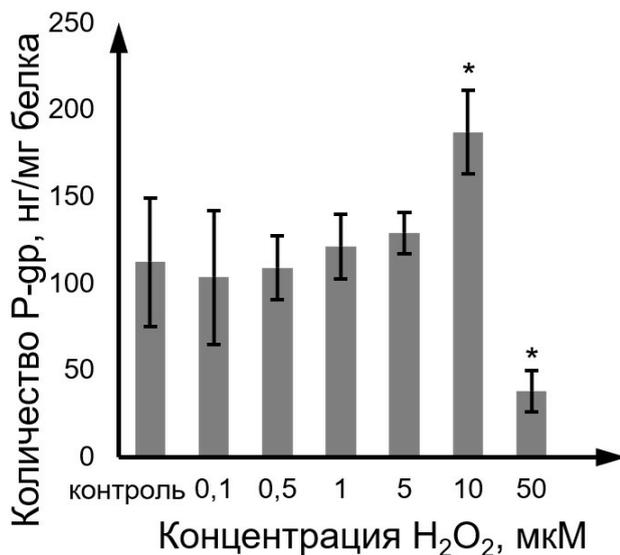


Рис. 7. Изменение количества Р-гр при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1–50 мкМ в течение 72 ч. Количество Р-гр определяли в лизате клеток Сасо-2 ($M \pm SD$, $n = 3$) с помощью ИФА. * – Достоверное отличие от контроля, $p < 0,05$

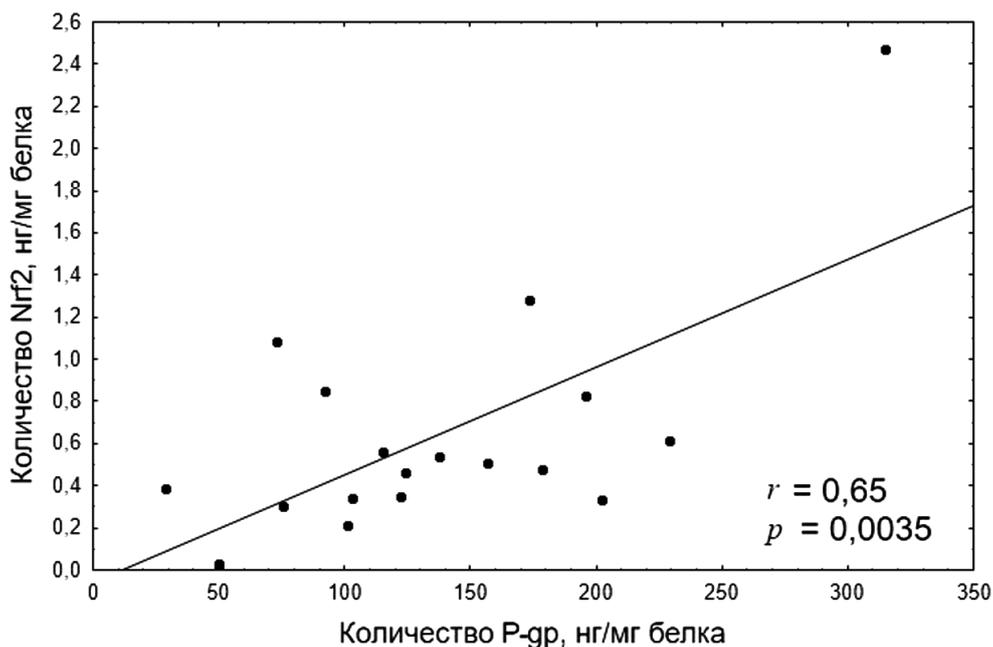


Рис. 8. Корреляционная зависимость между количеством Nrf2 (нг/мг белка) и P-gr (нг/мг белка) при индукции окислительного стресса пероксидом водорода в концентрациях 0,1–10 мкМ в течение 72 ч. Коэффициент корреляции $r = 0,65$, $p = 0,0035$, что свидетельствует о прямой зависимости между количеством транскрипционного фактора Nrf2 и уровнем P-gr при условии целостности цитоплазматической мембраны

щейся проницаемости P-гр *b-a* (обусловленный P-гр и пассивной диффузией) выравнивался с коэффициентом кажущейся проницаемости P-гр *a-b* (обусловленным пассивной диффу-

зией против функции белка-транспортера) ($p > 0,05$).

Влияние H_2O_2 на транспорт субстрата P-гр (фексофенадина) через билипидную мембрану клеток Caco-2 ($M \pm SD$, $n = 3$)

Таким образом, показано, что H_2O_2 в концентрации 10 мкМ повышает активность P-гр в клетках линии Caco-2. При более высокой концентрации H_2O_2 происходит повреждение как клеточной мембраны, так и белка-транспортера P-гр, что следует из данных по количеству белка-транспортера в лизате клеток – это приводит к существенному повышению проницаемости клеточной мембраны в обоих направлениях.

Серии эксперимента	P-гр <i>b-a</i> , $\times 10^{-6}$ см/с	P-гр <i>a-b</i> , $\times 10^{-6}$ см/с
Контроль	$3,08 \pm 0,94$	$1,13 \pm 0,6$
0,1 мкМ H_2O_2	$3,02 \pm 0,85$	$1,23 \pm 0,59$
0,5 мкМ H_2O_2	$3,19 \pm 0,53$	$1,32 \pm 0,26$
1 мкМ H_2O_2	$3,73 \pm 1,29$	$1,79 \pm 0,14$
5 мкМ H_2O_2	$3,37 \pm 0,41$	$1,18 \pm 0,45$
10 мкМ H_2O_2	* $6,10 \pm 0,82$	$2,64 \pm 1,44$
50 мкМ H_2O_2	** $11,11 \pm 2,96$	** $12,76 \pm 3,39$

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Примечание. Клетки Caco-2 после экспозиции с пероксидом водорода (72 ч) инкубировали в транспортной среде с добавлением фексофенадина (150 мкМ) в апикальную или базолатеральную камеры соответствующих трансвелл-систем. Забирали образцы через 1, 2 и 3 ч из противоположной камеры-реципиента: базолатеральной (*a-b* транспорт) и апикальной камеры (*b-a* транспорт) для определения концентрации фексофенадина. Концентрацию фексофенадина в транспортной среде определяли методом ВЭЖХ с УФ-детектированием. * – Отличие от контроля, $p = 0,056$, ** – достоверное отличие от контроля, $p < 0,001$.

P-гр – АТФ-зависимый белок-транспортер, обеспечивающий эффлюкс экзогенных и эндогенных веществ из клеток в межклеточное пространство и биологические жидкости. В опухолевых клетках P-гр способствует их защите от цитостатиков, в кишечнике – препятствует абсорбции биобиотиков и ксенобиотиков, в эндотелии гематоэнцефалического барьера – проникновению субстратов в ткань мозга, в печени и почках – выводит вещества в желчь и мочу [6]. Некоторые лекарственные вещества и условия среды могут изменять скорость синтеза и активность P-гр. Например, показано, что Nrf2 может стимулировать синтез белка-транспортера при окислительном повреждении гепатоцитов [26],

нервных клеток [27], клеток гематоэнцефалического барьера [28] и карциномы легкого A549 [14], что приводит к повышению активности Р-гр и соответственно снижает проницаемость мембраны для его субстратов.

В настоящем исследовании в опытах *in vitro* на линии клеток Сасо-2 оценивалось количество Р-гр и проницаемость его субстрата фексофенадина через билипидную мембрану при окислительном стрессе разной степени выраженности, вызванном H_2O_2 . Период распада пероксида водорода составляет от миллисекунд до секунд, что позволяет ему проникать в клетку сквозь мембрану и оказывать внутриклеточное воздействие. Проникновение пероксида водорода сквозь клеточную мембрану может также осуществляться с участием аквапоринов [29]. H_2O_2 является стабильным и малореактивным агентом, вследствие чего может действовать как вторичный внутриклеточный посредник [30]. Неконтролируемое взаимодействие пероксида водорода с переходными металлами (Fe^{2+} или Cu^+) по реакции Фентона приводит к образованию АФК [31]. В свою очередь, активные формы кислорода могут быть нейтрализованы антиоксидантными системами или накапливаться в клетках, вызывая окислительный стресс, что приводит к повреждению белков, липидов, ДНК, мутагенезу и гибели клеток. В условиях окислительного стресса наиболее чувствительными к повреждению являются серосодержащие аминокислотные остатки (метионин и цистеин), что имеет регуляторное значение [32, 33].

На изменение соотношения восстановленных и окисленных SH-групп в белках реагирует Nrf2 — редокс-чувствительный транскрипционный фактор. Его экспрессия повышается при развитии окислительного стресса и направлена на защиту клетки от воздействия свободных радикалов [13, 34]. В нормальных условиях данный транскрипционный фактор находится в комплексе с белком-репрессором Keap1, их связывание регулируется рядом протеинкиназ. Keap1, с одной стороны, способствует убиквитинированию и протеосомальной деградации Nrf2 (необходимым условием для этого процесса является наличие двух остатков цистеина в молекуле Keap1), а с другой — предотвращает его проникновение из цитоплазмы в ядро [35]. После активации комплекс Keap1–Nrf2 диссоциирует, и Nrf2 транслоцируется в ядро, где связывается с элементами антиоксидантного ответа (англ. абб. ARE) и активирует транскрипцию защитных ферментов [35].

В то же время окислительный стресс приводит к повышению проницаемости билипидной

мембраны [36]. Соотношение характера структурного и функционального повреждения мембраны при разной степени выраженности окислительного стресса недостаточно изучено. Насколько нам известно, ранее исследований, в которых анализировались бы количественные и функциональные параметры мембранного транспортера Р-гр при развитии окислительного стресса, не проводилось.

В ходе данной работы было показано, что развитие окислительного стресса, вызванного H_2O_2 в концентрации 10 мкМ, приводило к окислению белковых SH-групп, что вызывало повышение количества Nrf2. Данный транскрипционный фактор стимулировал увеличение содержания и активности Р-гр, что проявлялось в повышении транспорта субстрата белка-транспортера из базолатеральной камеры трансвелл-системы в апикальную (за счет пассивной диффузии и функционирования Р-гр). Логично было ожидать, что транспорт фексофенадина из апикальной камеры в базолатеральную (за счет пассивной диффузии против работы белка-транспортера) при этом снизится. Однако в нашем исследовании данный показатель не изменялся. Скорее всего, это связано с тем, что при воздействии H_2O_2 в концентрации 10 мкМ увеличивается проницаемость билипидной мембраны, но повышение активности Р-гр нивелирует данное нарушение.

Увеличение концентрации H_2O_2 до 50 мкМ усиливало окислительный стресс, вызывало накопление малонового диальдегида и 4-гидроксиолефинов (4-гидрокси-2-ноненаля и 4-гидрокси-2-гексеналя), карбонильных производных белков, а также снижало количество Р-гр, при этом уровень Nrf2 оставался повышенным, что, скорее всего, связано с локализацией изучаемых белков. Р-гр находится преимущественно в цитоплазматической мембране, подверженной воздействию H_2O_2 в первую очередь, а Nrf2 — в цитоплазме и ядре [37], более защищенных от воздействия прооксиданта в инкубационной среде.

Снижение количества Р-гр и повреждение билипидной мембраны в условиях окислительного стресса (концентрация H_2O_2 50 мкМ) приводило к повышению транспорта субстрата белка-транспортера фексофенадина через цитоплазматическую мембрану как из базолатеральной камеры в апикальную, так и наоборот — из апикальной в базолатеральную. Причем значение коэффициента кажущейся проницаемости $P_{app} b-a$ соответствовало коэффициенту кажущейся проницаемости $P_{app} a-b$. Биохимические изменения при воздействии H_2O_2 в концентрациях 50 мкМ сопровождались существенным по-

вышением гибели клеток по результатам МТТ-теста.

Полученные результаты могут иметь важное практическое значение. Например, считается, что P-gp в гематоэнцефалическом барьере является одним из ключевых факторов, ограничивающих проникновение лекарственных веществ-субстратов в головной мозг, снижая тем самым эффективность терапии церебральных заболеваний (острого нарушения мозгового кровообращения, эпилепсии), а его ингибирование рассматривается в качестве терапевтической мишени при лечении данных патологий [38, 39].

В нашем исследовании показано, что развитие выраженного окислительного стресса (которое наблюдается и при данных неврологических заболеваниях) приводит к повреждению билипидных мембран и P-gp, что сопровождается повышением проницаемости цитоплазматических мембран. То есть в условиях патологии защитная роль P-gp сохраняется только при компенсированном окислительном стрессе, что говорит в пользу того, что данный белок-транспортер с большой вероятностью не стоит рассматривать в качестве перспективной мишени для терапевтического воздействия.

Таким образом, увеличение количества Nrf2 при окислительном стрессе стимулирует повышение содержания P-gp, что сдерживает растущую проницаемость клеточной мембраны. Усиление окислительного стресса вызывает повреждение мембран и белка-транспортера P-gp, что приводит к значительному повышению проницаемости цитоплазматической мембраны в обоих направлениях. Таким образом, транспортная и защитная роль P-gp, заключающаяся в ограничении проницаемости клеточной мембраны, зависит от выраженности окислительного стресса и реализуется только при незначительных повреждениях мембран.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке гранта Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук МК-1856.2020.7.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Davidson, A. L. (2008) Structure, function, and evolution of bacterial ATP-binding cassette systems, *Microbiol. Mol. Biol. Rev.*, **72**, 317-364, doi: 10.1128/MMBR.00031-07.
- Vasilioiu, V., Vasilioiu, K., and Nebert, D. W. (2009) Human ATP-binding cassette (ABC) transporter family, *Hum. Genomics*, **3**, 281-290, doi: 10.1186/1479-7364-3-3-281.
- Licht, A., and Schneider, E. (2011) ATP binding cassette systems: Structures, mechanisms, and functions, *Cent. Eur. J. Biol.*, **6**, 785-801, doi: 10.2478/s11535-011-0054-4.
- Esser, L., Zhou, F., Pluchino, K. M., Shiloach, J., Ma, J., et al. (2017) Structures of the multidrug transporter P-glycoprotein reveal asymmetric ATP binding and the mechanism of polyspecificity, *J. Biol. Chem.*, **292**, 446-461, doi: 10.1074/jbc.M116.755884.
- Sharom, F. J. (2011) The P-glycoprotein multidrug transporter, *Essays Biochem.*, **50**, 161-178, doi: 10.1042/bse0500161.
- Якушева Е. Н., Титов Д. С. (2018) Структура и функционирование белка множественной лекарственной устойчивости 1, *Биохимия*, **8**, 1148-1172, doi: 10.1134/S0320972518080043.
- Кукес В. Г., Грачев С. В., Сычев Д. А., Раменская Г. В. (2008) Метаболизм лекарственных средств. Научные основы персонализированной медицины: руководство для врачей?, *Гэотар-Медиа*, Москва, 304 с.
- Juliano, R. L., and Ling, V. (1976) A surface glycoprotein modulating drug permeability in Chinese hamster ovary cell mutants, *Biochem. Biophys. Acta*, **455**, 155-162, doi: 10.1016/0005-2736(76)90160-7.
- Pokharel, D., Roseblade, A., Oenarto, V., Lu, J. F., and Bebawy, M. (2017) Proteins regulating the intercellular transfer and function of P-glycoprotein in multidrug-resistant cancer, *Ecancermedicalscience*, **11**, e768, doi: 10.3332/ecancer.2017.768.
- Borst, P., and Schinkel, A. H. (2013) P-glycoprotein ABCB1: a major player in drug handling by mammals, *J. Clin. Invest.*, **23**, 4131-4133, doi: 10.1172/JCI70430.
- Yano, K., Tomono, T., and Ogihara, T. (2018) Advances in studies of P-glycoprotein and its expression regulators, *Biol. Pharm. Bull.*, **41**, 11-19, doi: 10.1248/bpb.b17-00725.
- Van der Paal, J., Neyts, E. C., Verlack, C. C. W., and Bogaerts, A. (2016) Effect of lipid peroxidation on membrane permeability of cancer and normal cells subjected to oxidative stress, *Chem. Sci.*, **7**, 489-498, doi: 10.1039/C5SC02311D.
- Raghunath, A., Sundarraj, K., Nagarajan, R., Arfuso, F., Bian, J., Kumar, A. P., Sethi, G., and Perumala, E. (2018) Antioxidant response elements: Discovery, classes, regulation and potential applications, *Redox. Biol.*, **17**, 297-314, doi: 10.1016/j.redox.2018.05.002.
- Wu, B., Li, H. X., Lian, J., Guo, Y. J., Tang, Y. H., Chang, Z. J., Hu, L. F., Zhao, G. J., Hong, G. L., and Lu, Z. Q. (2019) Nrf2 overexpression protects against paraquat induced A549 cell injury primarily by upregulating P glycoprotein and reducing intracellular paraquat accumulation,

- Exp. Ther. Med.*, **17**, 1240-1247, doi: 10.3892/etm.2018.7044.
15. Якушева Е. Н., Щулькин А. В., Черных И. В., Попова Н. М., Котлярова А. А., Слепнев А. А. (2019) Метод анализа принадлежности лекарственных веществ к субстратам и ингибиторам белка-транспортера гликопротеина-P *in vitro*, *Обзоры по клинической фармакологии и лекарственной терапии*, **17**, 71-78, doi: 10.7816/RCF17171-78.
 16. Tolosa, L., Donato, M. T., and Gómez-Lechón, M. J. (2015) General cytotoxicity assessment by means of the MTT assay, *Methods Mol. Biol.*, **1250**, 333-348, doi: 10.1007/978-1-4939-2074-7_26.
 17. Tinnikov, A. A., and Samuels, H. H. (2013) A novel cell lysis approach reveals that caspase-2 rapidly translocates from the nucleus to the cytoplasm in response to apoptotic stimuli, *PLoS One*, **8**, e61085, doi: 10.1371/journal.pone.0061085.
 18. Boschi-Muller, S., Azza, S., Sanglier-Cianferani, S., Talfournier, F., Dorsselaar, A. V., and Branlant, G. (2000) A sulfenic acid enzyme intermediate is involved in the catalytic mechanism of peptide methionine sulfoxide reductase from *Escherichia coli*, *J. Biol. Chem.*, **275**, 35908-35913, doi: 10.1074/jbc.M006137200.
 19. Ellman, L. G. (1959) Tissue sulfhydryl groups, *Arch. Biochem. Biophys.*, **82**, 70-77, doi: 10.1016/0003-9861(59)90090-6.
 20. Gérard-Monnier, D., Erdelmeier, I., Régnard, K., Moze-Henry, N., Yadan, J. C., Chaudière, J. (1998) Reactions of 1-methyl-2-phenylindole with malondialdehyde and 4-hydroxyalkenals. Analytical applications to a colorimetric assay of lipid peroxidation, *Chem. Res. Toxicol.*, **11**, 1176-1183, doi: 10.1021/tx9701790.
 21. Weber, D., Davies, M. J., and Grunea, T. (2015) Determination of protein carbonyls in plasma, cell extracts, tissue homogenates, isolated proteins: focus on sample preparation and derivatization conditions, *Redox Biol.*, **5**, 367-380, doi: 10.1016/j.redox.2015.06.005.
 22. Petri, N., Tannergren, C., Rungstad, D., and Lennernäs, H. (2004) Transport characteristics of fexofenadine in the Caco-2 cell model, *Pharmac. Res.*, **21**, 1398-1404, doi: 10.1023/B:PHAM.0000036913.90332.b1.
 23. Elsby, R., Surry, D. D., Smith, V. N., and Gray, A. J. (2008) Validation and application of Caco-2 assays for the *in vitro* evaluation of development candidate drugs as substrates or inhibitors of P-glycoprotein to support regulatory submissions, *Xenobiotica*, **38**, 1140-1164, doi: 10.1080/00498250802050880.
 24. Ерохина П. Д., Абаленихина Ю. В., Щулькин А. В., Черных И. В., Попова Н. М., Слепнев А. А., Якушева Е. Н. (2020) Изучение влияния прогестерона на активность гликопротеина-P *in vitro*, *Российский медико-биологический вестник имени академика И.П. Павлова*, **28**, 135-142, doi: 10.23888/PAVLOVJ2020282135-142.
 25. Lennicke, C., Rahn, J., Lichtenfels, R., Wessjohann, L. A., and Seliger, B. (2015) Hydrogen peroxide – production, fate and role in redox signaling of tumor cells, *Cell Commun. Signal.*, **13**, e39, doi: 10.1186/s12964-015-0118-6.
 26. Thakkar, N., Slizgi, J. R., and Brouwer, K. L. R. (2017) Effect of liver disease on hepatic transporter expression and function, *J. Pharm. Sci.*, **106**, 2282-2294, doi: 10.1016/j.xphs.2017.04.053.
 27. Grewal, G. K., Kukal, S., Kanojia, N., Saso, L., Kukreti, Sh., and Kukreti, R. (2017) Effect of oxidative stress on ABC transporters: contribution to epilepsy pharmacoresistance, *Molecules*, **22**, e365, doi: 10.3390/molecules22030365.
 28. Aryal, M., Fischer, K., Gentile, C., Gitto, S., Zhang, Y.-Z., and McDannold, N. (2017) Effects on P-glycoprotein expression after blood-brain barrier disruption using focused ultrasound and microbubbles, *PLoS One*, **3**, e0166061, doi: 10.1371/journal.pone.0166061.
 29. Rodrigues, O., Reshetnyak, G., Grondin, A., Saijo, Y., Leonhardt, N., Maurel Ch., and Verdoucq, L. (2017) Aquaporins facilitate hydrogen peroxide entry into guard cells to mediate ABA- and pathogen-triggered stomatal closure, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **114**, 9200-9205, doi: 10.1073/pnas.1704754114.
 30. Sies, H. (2017) Hydrogen peroxide as a central redox signaling molecule in physiological oxidative stress: oxidative eustress, *Redox Biol.*, **11**, 613-619, doi: 10.1016/j.redox.2016.12.035.
 31. Smirnoff, N., and Arnaud, D. (2019) Hydrogen peroxide metabolism and functions in plants, *New Phytol.*, **2**, 1197-1214, doi: 10.1111/nph.15488.
 32. Vogelsang, L., and Dietz, K.-J. (2020) Regulatory thiol oxidation in chloroplast metabolism, oxidative stress response and environmental signaling in plants, *Biochem. J.*, **477**, 1865-1878, doi: 10.1042/BCJ20190124.
 33. Poole, L.B. (2015) The basics of thiols and cysteines in redox biology and chemistry, *Free Radic. Biol. Med.*, **1**, 148-157, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2014.11.013.
 34. Kang, K. A., and Hyun, J. W. (2017) Oxidative stress, Nrf2, and epigenetic modification contribute to anticancer drug resistance, *Toxicol. Res.*, **33**, 1-5, doi: 10.5487/TR.2017.33.1.001.
 35. Wen, Zh., Liu, W., Li, X., Chen, W., Liu, J., Wen, Zh., and Liu, Zh. (2019) A protective role of the NRF2-Keap1 pathway in maintaining intestinal barrier function, *Oxid. Med. Cell. Longev.*, e1759149, doi: 10.1155/2019/1759149.
 36. Itri, R., Junqueira, H. C., Mertins, O., and Baptista, M. S. (2014) Membrane changes under oxidative stress: the impact of oxidized lipids, *Biophys. Rev.*, **6**, 47-61, doi: 10.1007/s12551-013-0128-9.
 37. Yoon, D. S., Choi, Y., and Lee, J. W. (2016) Cellular localization of NRF2 determines the self-renewal and osteogenic differentiation potential of human MSCs via the P53-SIRT1 axis, *Cell Death Dis.*, **7**, e2093, doi: 10.1038/cddis.2016.3.
 38. Fromm, M. F. (2004) Importance of P-glycoprotein at blood-tissue barriers, *Trends Pharmacol. Sci.*, **25**, 423-429, doi: 10.1016/j.tips.2004.06.002.
 39. Wang, G.-X., Wang, D.-W., Liu, Y., and Ma, Y.-H. (2016) Intractable epilepsy and the P-glycoprotein hypothesis, *Int. J. Neurosci.*, **126**, 385-392, doi: 10.3109/00207454.2015.1038710.

P-GLYCOPROTEIN ROLE IN LIMITATION OF PERMEABILITY OF CELL MEMBRANES DURING OXIDATIVE STRESS***A. V. Shchulkin****, Yu. V. Abalenikhina, I. V. Chernykh, P. D. Erokhina, and E. N. Yakusheva*Ryazan State Medical University, 390026 Ryazan, Russia; E-mail: alekseyschulkin@rambler.ru*

P-Glycoprotein (P-gp) is one of the most clinically significant representatives of the ABC transporter superfamily due to its participation in the transport of biotic components and xenobiotics across the plasma membrane. It is known that various chemicals, environmental factors, and pathological processes can affect P-gp activity and expression. In this study, we investigated the role of P-gp in limiting the cell membrane permeability during oxidative stress. Human adenocarcinoma colon cells (Caco-2) overexpressing P-gp were cultured for 72 h in the medium containing hydrogen peroxide (0.1-50 μM). The transport of the P-gp substrate fexofenadine was evaluated in a special Transwell system. The amounts of P-gp and Nrf2 transcription factor were analyzed by the enzyme-linked immunosorbent assay. The concentration of SH-groups in proteins and the contents of lipid peroxidation products and protein carbonyl derivatives were determined spectrophotometrically. Hydrogen peroxide at a concentration of 0.1-5 μM did not significantly affect the studied parameters, while incubation with 10 μM H_2O_2 decreased in the level of SH groups in cell lysates and increased in the amount of Nrf2 in the cell lysates. Nrf2, in its turn, mediated an increase in the content and activity of the P-gp transporter, thus limiting the increasing permeability of the cell membrane. Hydrogen peroxide at a concentration of 50 μM promoted oxidative stress, which was manifested as a decrease in the content of SH-groups, increase in the concentration of lipid peroxidation products and protein carbonyl derivatives, and decrease in the P-gp level, which led to a significantly increased permeability of the plasma membrane. These results show that the transport and protective roles of P-gp, in particular, reduction of the cell membrane permeability, are affected by the intensity of oxidative stress and can be manifested only if the extent of membrane damage is insignificant.

Keywords: P-glycoprotein (P-gp), Nrf2, oxidative stress, permeability of biological membranes, hydrogen peroxide cytotoxicity, oxidative damage of lipids and proteins, reduced thiols

УДК 571.27

ГУМОРАЛЬНОЕ ВОЗДЕЙСТВИЕ В-КЛЕТОЧНОЙ ОПУХОЛИ НА МУЛЬТИПОТЕНТНЫЕ МЕЗЕНХИМНЫЕ СТРОМАЛЬНЫЕ КЛЕТКИ КОСТНОГО МОЗГА*

© 2021 Н.А. Петинати^{1**}, А.Е. Бигильдеев¹, Д.В. Карпенко¹, Н.В. Сац¹, Н.М. Капранов¹, Ю.О. Давыдова¹, Е.А. Фастова¹, А.У. Магомедова¹, С.К. Кравченко¹, Г.П. Арапиди^{2,3,4}, М.И. Русанова⁵, М.А. Лагарькова², Н.И. Дризе¹, В.Г. Савченко¹

¹ Национальный медицинский исследовательский центр гематологии Минздрава России, 125167 Москва, Россия; электронная почта: loel@mail.ru

² Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА России, 119435 Москва, Россия

³ Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997 Москва, Россия

⁴ Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), 141700 Долгопрудный, Московская обл., Россия

⁵ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 30.07.2020

После доработки 14.09.2020

Принята к публикации 14.09.2020

У больных диффузной В-клеточной крупноклеточной лимфомой (ДВККЛ) без вовлечения костного мозга изменены свойства костномозговых мультипотентных мезенхимных стромальных клеток (МСК). Было предположено, что в плазме больных содержатся растворимые факторы, влияющие на свойства МСК и их активацию у пациентов. Проверка этой гипотезы стала целью данного исследования. Для анализа цитокинов и хемокинов в плазме был использован набор Bio-Plex Pro Human Cytokine Panel, экспрессию генов в МСК оценивали ПЦР в реальном времени. Сравнительный анализ концентрации цитокинов в плазме больных, до и через месяц после окончания лечения, и здоровых доноров выявил достоверные отличия в концентрации 14 из 27 изученных цитокинов. В плазме больных нарушены взаимосвязи между уровнями секретируемых цитокинов, т.е. происходит нарушение регуляции иммунного ответа. Некоторые связи восстанавливаются после окончания лечения. Культивирование МСК здоровых доноров в присутствии плазмы пациентов приводит к изменениям их свойств, подобным изменениям, наблюдаемым в МСК больных. Впервые показано, что у пациентов с ДВККЛ без вовлечения костного мозга предшественники стромального микроокружения – МСК – изменяются из-за гуморального эффекта опухоли и реакции организма на нее. Комплексный анализ выявил, что при достижении ремиссии у пациентов с ДВККЛ состав цитокинов плазмы частично нормализуется, но не достигает уровня здоровых доноров. Обнаружение нового аспекта влияния В-клеточной опухоли на организм может позволить выявить общие закономерности гуморального влияния различных опухолей на стромальные клетки костного мозга.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ДВККЛ, МСК, цитокины и хемокины, секреция.

DOI: 10.31857/S0320972521020093

ВВЕДЕНИЕ

Диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома (ДВККЛ) – гетерогенная группа заболеваний, различающаяся по гистологическим, иммуногистохимическим и молекулярным ха-

рактеристикам [1]. При ДВККЛ только у 10–25% больных с помощью гистологического или молекулярного методов исследования выявляется поражение костного мозга (КМ) [2]. Считается, что у остальных пациентов с ДВККЛ КМ не вовлечен в опухолевой процесс. Стро-

Принятые сокращения: ДВККЛ – диффузная В-клеточная крупноклеточная лимфома; КМ – костный мозг; КОЕф – колониеобразующая единица фибробластов; МСК – мультипотентные мезенхимные стромальные клетки; ОУЭ – относительный уровень экспрессии; СУФ – средний уровень флуоресценции; IFN- γ – интерферон гамма; IL – интерлейкин; TNF α – фактор некроза опухолей.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry>, в рубрике «Papers in Press», BM20-242, 21.01.2021.

** Адресат для корреспонденции.

мальные клетки-предшественницы КМ у больных ДВККЛ без вовлечения КМ изменены [3]. Такие изменения нельзя отнести к взаимодействию с опухолевыми клетками, как это происходит при лейкозах [4, 5]. Многие опухоли секретируют цитокины и хемокины [6, 7], более того, наличие опухоли в организме может быть рассмотрено как воспалительный процесс [8, 9]. Воспаление связано с релизом множества факторов, которые могут активировать клетки стромального микроокружения КМ, в частности мультипотентные мезенхимные стромальные клетки (МСК), участвующие в регуляции кроветворения [10]. Активированные интерлейкином-1 (IL-1), фактором некроза опухоли альфа (TNF α) и интерфероном гамма (IFN- γ) МСК секретируют ингибиторы и активаторы воспалительного процесса [11]. Ранее было показано, что у больных ДВККЛ без поражения КМ суммарная клеточная продукция МСК, полученных из КМ за 4 пассажа, выше, чем у доноров соответствующего возраста [3]. В МСК этих больных повышена экспрессия *FGFb*, *FGFR2*, *IL-6*, *IL-8* и других генов. Нами было предположено, что в плазме больных содержатся растворимые факторы, скорее всего, это провоспалительные цитокины и хемокины, влияющие на свойства МСК и их активацию у пациентов. Проверка этой гипотезы стала целью данного исследования.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Пациенты. В работе исследовали МСК 35 больных с ДВККЛ без вовлечения костного мозга. Перед забором крови и КМ пациенты и доноры подписали информированное согласие. Характеристики всех пациентов, вошедших в исследование, представлены в табл. 1 в Приложении. Состав цитокинов и хемокинов изучали в плазме крови у 9 больных ДВККЛ до начала и через месяц после окончания лечения. В качестве контроля использовали плазму от 5 здоровых доноров (1 муж., 4 жен.) в возрасте 34–67 лет. У всех больных после комплексного лечения была достигнута ремиссия заболевания, подтвержденная данными ПЭТ-КТ. Данные об этих пациентах представлены в таблице.

Анализ цитокинов и хемокинов. Для анализа цитокинов и хемокинов в плазме был использован набор Bio-Plex Pro Human Cytokine Panel, 27-Plex («BioRad», США) для определения концентрации IL-1 β , IL-1Ra, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8, IL-9, IL-10, IL-12 (p70), IL-13, IL-15, IL-17, *FGFb*, Eotaxin, G-CSF, GM-CSF, IFN- γ , IP-10, MCP-1 (MCAF), MIP-1 α , MIP-1 β , PDGF-bb, RANTES, TNF α , VEGF согласно рекомендациям производителя. Обнаружение флуоресцентных шариков проводили на системе Bio-Plex 200 («BioRad», США). Все экс-

Характеристики пациентов с ДВККЛ (КОЕф и МСК до и через месяц после окончания лечения)

№	Возраст	Пол м/ж	Проведенное лечение	До лечения		Через месяц после окончания лечения	
				КОЕф на 10 ⁶ клеток КМ	Продукция МСК за 3 пассажа, (×10 ⁶)	КОЕф на 10 ⁶ клеток КМ	Продукция МСК за 3 пассажа, (×10 ⁶)
1	30	м	R-(DA)-ЕРОСН (6 циклов)	3	13,9	6,0	9,30
2	60	ж	предфаза, R-NHL BFM-90 (6 циклов) + auto HSCT	20	7,6	4,0	7,00
3	68	ж	R-СНОР-21 (6 циклов)	4	6,2	3,0	4,10
4	60	ж	R-(DA)-ЕРОСН (6 циклов) + R-DHAP(2 цикла)	7	6,5	1,0	8,00
5	63	ж	R-СНОР-21 (6 циклов)	3	21,3	2,0	22,40
6	38	ж	R-(DA)-ЕРОСН + auto HSCT	4	16,9	12,0	7,30
7	48	ж	R-СНОР-21 (4 цикла)	3	7,1	1,0	17,00
8	61	ж	R-(DA)-ЕРОСН (5 циклов) + DHAP (1 цикл)	7	4,7	58,0	4,47
9	70	ж	R-СНОР-21 (6 циклов)	2	4	58,0	16,0

Примечание. R-(DA)-ЕРОСН, R-NHL BFM-90, R-СНОР-21 – названия комплексных циклов химиотерапии; auto HSCT – аутотрансплантация гемопоэтических клеток.

перименты проводили в трех независимых повторах.

Определение концентрации КОЕф в костном мозге пациентов и характеристики МСК. Анализ концентрации колониеобразующих единиц фибробластов (КОЕф) в КМ больных и МСК проводили, как описано ранее [3].

Действие плазмы пациентов на МСК здоровых доноров. Для анализа действия плазмы больных ДВККЛ на МСК из КМ здоровых доноров были использованы 10 образцов МСК (4 муж. и 6 жен. в возрасте 14–50 лет, медиана возраста 33 года). МСК доноров культивировали 10 дней в бессывороточной среде StemPro («Gibco», Нидерланды) в присутствии 10% плазмы от 5 здоровых доноров и плазмы 9 больных ДВККЛ до начала и через месяц после окончания лечения. Каждый образец плазмы добавляли в отдельную ячейку с МСК. В МСК доноров, обработанных плазмой больных, исследовали суммарную клеточную продукцию, анализировали экспрессию поверхностных маркеров (средний уровень флуоресценции (СУФ) и относительный уровень экспрессии (ОУЭ)) некоторых генов.

Анализ поверхностных антигенов МСК. Определение уровня экспрессии антигенов на МСК производили методом проточной цитометрии. После снятия МСК со дна флакона их дважды отмывали раствором CellWash («BD Biosciences», США) и после этого 2×10^4 клеток инкубировали 20 мин в темноте с моноклональными антителами: анти-HLA-ABC, мечеными флуоресцеином изотиоцианатом (FITC) («Biolegend», США); анти-CD90, мечеными фикоэритрином (PE) («BD Pharmingen», США); анти-CD73, мечеными PE («BD Pharmingen», США); анти-CD105, мечеными FITC («Biolegend», США); анти-CD54, мечеными аллофикоцианином (APC) («Biolegend», США); анти-CD146, мечеными PE («BD Pharmingen», США). Анализ проводили с использованием проточного цитометра FACSCanto II («BD Biosciences», США), данные анализировали с помощью программы FACSDiva («BD Biosciences», США).

Популяцию МСК определяли сначала по параметрам прямого и бокового светорассеяния, а также по экспрессии на поверхности клеток антигена CD90. В данной популяции клеток оценивали средний уровень флуоресценции (MFI/СУФ) по каналам, соответствующим APC, FITC и PE.

Анализ экспрессии генов в МСК. Определение уровня экспрессии генов проводили методом обратной транскрипции с последующей полимеразной цепной реакцией в режиме реального времени (модификация Taq-Man) на приборе Abiprism 7500 («Applied Biosystems», США).

Для выделения РНК был использован TRIzol («Life Technologies», США) в соответствии с рекомендациями производителя. Для построения первых цепей ДНК после гибридизации мРНК со смесью (поли-Т)-праймеров и случайных гексамеров использовали обратную транскриптазу M-MLV («Promega», Франция) в соответствии с рекомендациями производителя. Для нормализации образцов использовали гены «домашнего хозяйства» *BACT* (бета-актин) и *GAPDH* (глицеральдегид-3-фосфат дегидрогеназа), относительный уровень экспрессии генов рассчитывали методом $\Delta\Delta Ct$ [12]. Ген-специфические праймеры и зонды были разработаны авторами и синтезированы («Syntol R & D», Россия) (табл. 2 в Приложении).

Статистическая обработка результатов. Графическая обработка результатов выполнена с использованием программы GraphPad Prism 8 (www.graphpad.com). Когда была подтверждена нормальность распределения, сравнение образцов проводилось с использованием критерия Стьюдента, в противном случае использовались тесты Манна–Уитни – для непарных образцов или критерий Вилкоксона – для парных образцов, различия при $p < 0,05$ считались значимыми. Взаимосвязи между изменениями концентрации различных цитокинов в плазме пациентов определяли по критерию корреляции Пирсона. Коэффициент корреляции анализировали с использованием программы GraphPad Prism 8, $R > 0,7$ или $R < -0,7$ при $p < 0,05$ считали значимой сильной корреляцией.

Был проведен комплексный анализ различий между цитокинами в 3-х изученных группах. Анализ основан на определении расстояний между точками в многомерном пространстве исследуемых параметров. Колебания и значимость различий для каждого изменения были рассчитаны индивидуально. Расчеты по комплексному анализу различий между образцами представлены в Приложении.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Концентрация цитокинов в плазме больных ДВККЛ. Сравнительный анализ концентрации цитокинов в плазме больных (до и через месяц после окончания лечения) и здоровых доноров выявил достоверные отличия в концентрациях 14 из 27 изученных цитокинов (рис. 1; табл. 3 в Приложении). Концентрация некоторых цитокинов была достоверно повышена в плазме первичных больных по сравнению с плазмой доноров. Так, концентрация в плазме IL-2 была в 1,5 раза выше, чем у доноров, IL-6 – в 8,5 раза,

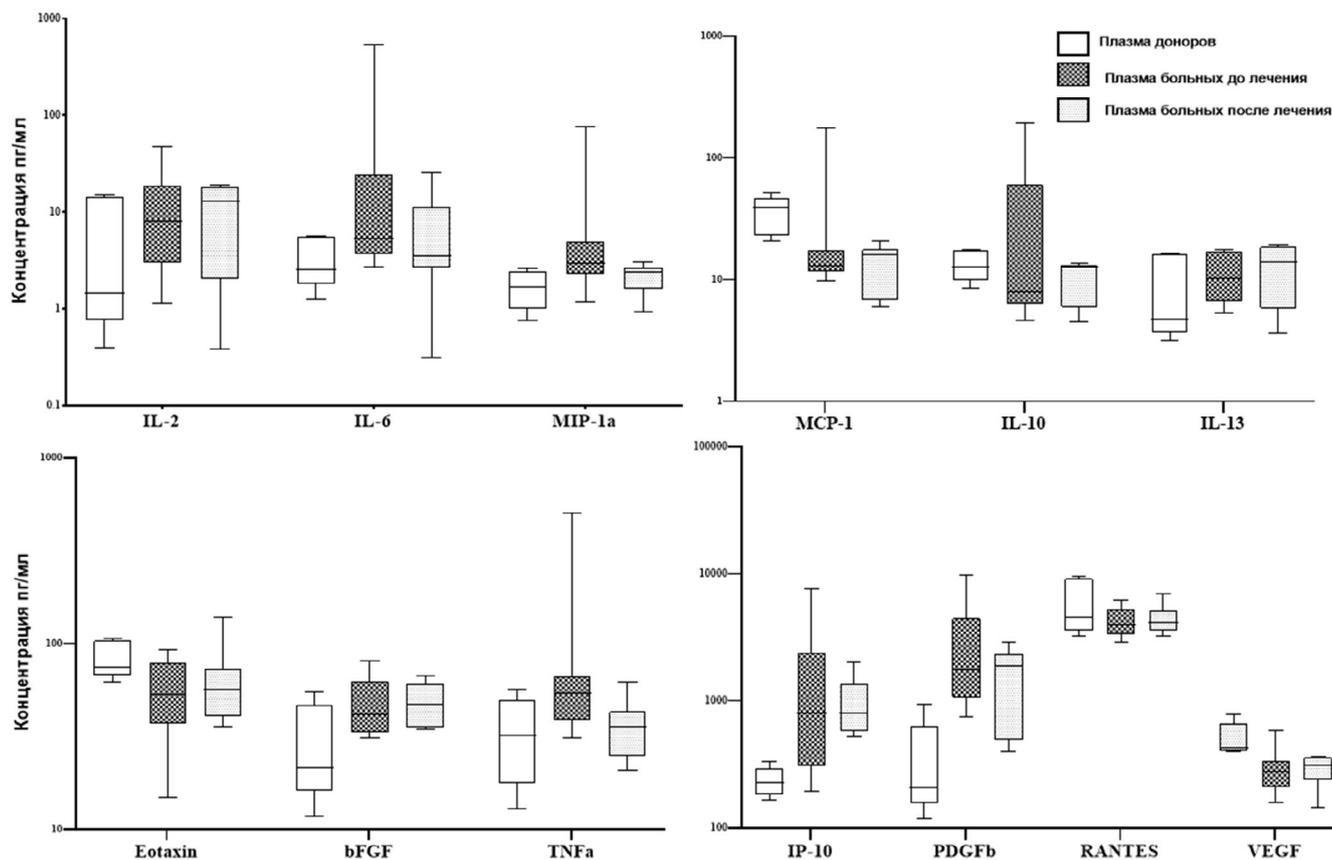


Рис. 1. Достоверные различия в уровне цитокинов и факторов роста в плазме доноров и пациентов с ДВККЛ до и после лечения. На прямоугольниках горизонтальная линия представляет медиану, длина прямоугольника представляет межквартильный диапазон, а вертикальные линии простираются до минимальных и максимальных значений. На рисунке показаны только цитокины, концентрация которых в плазме доноров и пациентов значительно отличается ($p < 0,05$). Плазма у 9 пациентов была исследована до и через месяц после окончания лечения. В качестве контроля использовали плазму от 5 здоровых доноров (1 муж. и 4 жен.) в возрасте 34–67 лет

IL-10 – в 5 раз, Eotaxin – в 1,5 раза, FGFB – в 1,5 раза, IP-10 – в 2,5 раза, MIP-1 α – в 10 раз, MIP-1 β – в 3 раза, PDGF-bb – в 3,5 раза, RANTES – в 2 раза, TNF α – в 4 раза и VEGF – в 1,2 раза выше, чем у доноров. После окончания лечения концентрация большинства провоспалительных цитокинов и хемокинов, повышенная по сравнению с донорами в плазме больных ДВККЛ в дебюте заболевания, нормализуется (IL-1 α , IL-6, IL-8, IL-10, GM-CSF, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF α) (см. табл. 3 в Приложении). Хемокины и цитокины, связанные с параметрами роста МСК, а также участвующие в процессах иммуномодуляции, изменяются значительно медленнее и не нормализуются через месяц после окончания терапии (IL-2, Eotaxin, FGFB, IP-10, MCP-1, PDGF-bb, RANTES, VEGF).

Относительный уровень экспрессии генов в МСК пациентов с ДВККЛ. Поскольку было показано, что МСК пациентов с ДВККЛ изменены, мы изучили относительный уровень

экспрессии генов, которые могли способствовать изменениям цитокинов в плазме крови пациентов. Сравнивали экспрессию генов в МСК из костного мозга первичных пациентов, пациентов после лечения и здоровых доноров. Уровень экспрессии *IL-6*, *FGFB* и *FGFR2* был повышен в МСК первичных пациентов по сравнению с МСК доноров (рис. 2). Принимая во внимание, что относительный уровень экспрессии *VEGF* и генов рецепторов *FGFR1* и *PDGFRb* были выше в МСК доноров, чем в МСК пациентов, а после окончания лечения восстановился только уровень экспрессии *VEGF*, можно говорить о различном влиянии химиотерапевтических препаратов на экспрессию генов, регулирующих поддержание и дифференцировку МСК.

Корреляционные связи между цитокинами в плазме больных ДВККЛ. Анализировали корреляцию между цитокинами в плазме больных и здоровых доноров. Изменение корреляции свидетельствует о нарушении взаимосвязи между

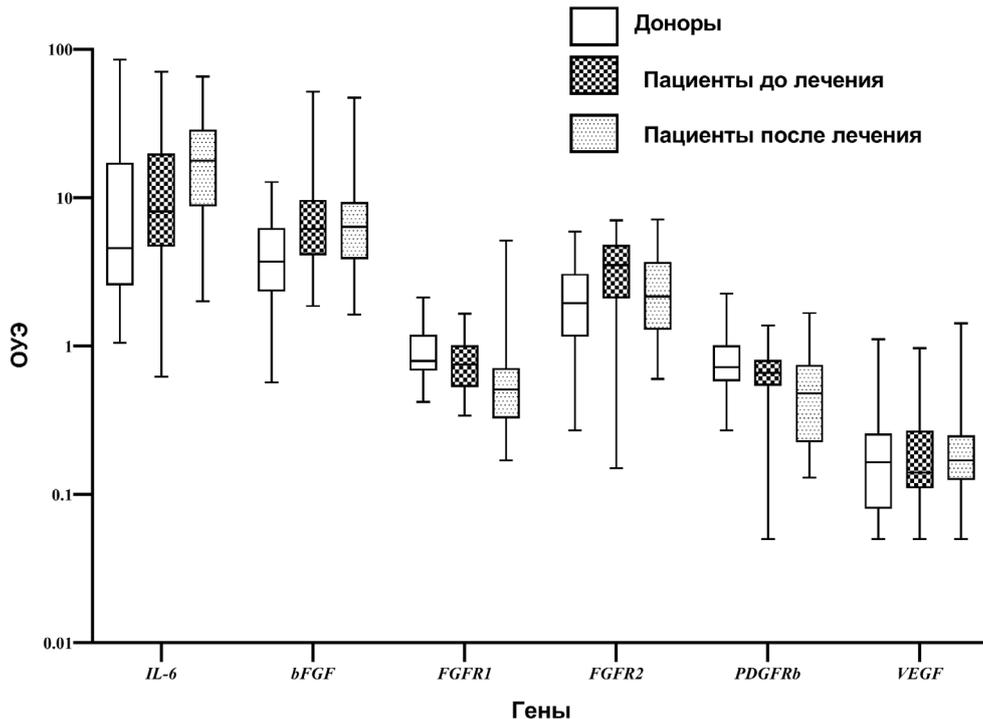


Рис. 2. Относительный уровень экспрессии генов в МСК здоровых доноров и пациентов с ДВККЛ до и после лечения. На графиках в прямоугольниках горизонтальная линия представляет медиану, длина рамки представляет интервал между четвертями, а вертикальные линии доходят до минимальных и максимальных значений. Были проанализированы МСК от 30 здоровых доноров и 29 пациентов с ДВККЛ

этим цитокинами, иными словами, об изменении регуляции иммунного ответа. В анализ были включены только достоверные тесные взаимосвязи ($R > 0,7$ и $R < -0,7$, $p < 0,05$). Корреляции между концентрациями цитокинов в плазме здоровых доноров отличаются от таковых в плазме больных как до, так и после окончания лечения (табл. 4 в Приложении).

В плазме доноров тесно связаны концентрации: **IL-6** с IL-9, IL-10, IL-13 и FGFb; **IL-9** с IL-10, IL-13, IL-15, IL-17, GM-CSF и VEGF; **IL-12** с IL-1b и IL-10; **IL-7** с IL-4; **MIP-1 α** с IL-5 и GM-CSF; **GM-CSF** с Eotaxin; **TNF α** с PDGF-bb. Перечисленные комбинации цитокинов не имеют взаимосвязи в плазме больных до и после лечения.

Корреляции присутствуют у всех доноров и больных: **IL-1Ra** с IL-1b; **IL-2** с IL-5, IL-6, IFN- γ и FGFb; **IL-4** с IL-1Ra; **IL-5** с IL-12, IL-13, IL-15, IL-17, GM-CSF и FGFb; **IL-6** с IFN- γ ; **IL-8** с IFN- γ и MIP-1 α ; **IL-12** с IL-13 и FGFb; **IL-13** с FGFb; **IL-17** с FGFb; **TNF α** с MIP-1 β .

Корреляции у доноров и больных до лечения обнаруживались между: **IL-1Ra** с IFN- γ ; **IL-4** с IL-1b, IL-2, FGFb и IFN- γ ; **IL-6** с MIP-1 α ; **IL-10** с IL-15 и FGFb; **TNF α** с MCP-1 и с RANTES; **RANTES** с MIP-1 β — и все они отсутствовали после лечения.

Корреляции только у больных до лечения, которые не обнаруживались ни у доноров, ни у больных после лечения: **IL-2** с IL-1Ra; **IL-8** с IL-6; **IL-15** с IL-7; **IL-17** с IL-4; **G-CSF** с IL-17, IL-2, IL-6, IL-8 и IFN- γ ; **MCP-1** с G-CSF, IL-6, IL-1Ra, G-CSF, IFN- γ , IL-17, IL-2 и MIP-1 α ; **PDGF-bb** с Eotaxin; **RANTES** с Eotaxin, IL-13, MIP-1 α и PDGF-bb; **TNF α** с IFN- γ , IL-17, IL-2, IL-6 и IL-1b; **VEGF** с G-CSF, IL-17, IL-1b, IL-1Ra, IL-4, MIP-1 α , MIP-1 β , TNF α .

Корреляции у больных до и после лечения, которых нет у доноров: **MCP-1** с IL-1b, IL-1Ra, IL-2; **G-CSF** с IL-1Ra и IL-4; **GM-CSF** с IL-2; **IL-15** с IL-13; **IL-17** с IL-1Ra; **IL-17** с IL-2, **IL-8** с IL-2; **MIP-1 α** с G-CSF, IL-1b и IL-4; **MIP-1 β** с IL-1Ra; **TNF α** с IL-1Ra, IL-4 и MIP-1 α ; **VEGF** с FGFb, IL-2, IL-5, IL-6 и IL-8.

Корреляции у доноров и больных после лечения: **IL-2** с IL-7, IL-10, IL-12 и IL-13; **IL-5** с IFN- γ ; **IL-6** с IL-12 и GM-CSF; **IL-7** с IL-10, IL-17 и IFN- γ ; **IL-8** с FGFb; **IL-10** с IL-13 и IL-17; **IL-12** с IFN- γ ; **IL-13** с VEGF; **IFN- γ** с FGFb.

Помимо анализа корреляций цитокинов и хемокинов между собой в плазме больных ДВККЛ был проведен анализ корреляций между экспрессией генов в МСК 5 больных и концентрацией цитокинов в плазме этих пациентов (таблица, пациенты №№ 3–7; табл. 5 в При-

ложении). Оказалось, что концентрация IL-1b, IL-2, IL-4, IL-5 ($p = 0,041$ с *BMP2*), IL-10, IL-15 ($p = 0,02$ с *BMP2*), VEGF ($p = 0,021$ с *BMP2*) и *FGFb* ($p = 0,024$ с *BMP2*) тесно положительно коррелируют с экспрессией *BMP2* и *SOX9*. Кроме того, с *BMP2* тесно коррелируют IL-8, IL-9, IL-12, IL-13, IL-17, GM-CSF и MCP-1 ($p = 0,024$). IL-4 и IL-7 тесно коррелируют с *FGFR1*, *FGFR2*, *VEGF*.

Обратная корреляция выявлена между концентрацией IL-6 в плазме пациентов и экспрессией генов *MMP2*, *SPP1*, *ICAM1* и *SMURF*. Eotaxin имеет обратную сильную взаимосвязь с экспрессией *IL-6*, *SOX9* ($p = 0,015$). G-CSF имеет обратную сильную корреляцию с экспрессией *ICAM1* ($p = 0,033$) и *SMURF*. *SMURF*, в свою очередь, обратно коррелирует с концентрацией в плазме IP-10, MIP-1 α и RANTES. MIP-1 β обратно коррелирует с *FGFb* ($p = 0,025$) и *IL-8* ($p = 0,02$). Концентрация RANTES в плазме обратно коррелирует с экспрессией *FGFR2* ($R = -0,958$, $p = 0,01$) (табл. 5 в Приложении). Других тесных взаимосвязей между концентрацией цитокинов и хемокинов в плазме и экспрессией генов выявлено не было.

Концентрация КОЕф в костном мозге больных ДВККЛ до начала лечения тесно коррелирует с концентрацией в плазме следующих цитокинов: IL-1Ra ($R = 0,717$, $p > 0,05$), IL-6 ($R = 0,956$, $p = 0,022$), IL-8 ($R = 0,717$, $p > 0,05$), G-CSF ($R = 0,717$, $p > 0,05$), MIP-1 α ($R = 0,717$, $p > 0,05$), VEGF ($R = 0,717$, $p > 0,05$), однако достоверная корреляция КОЕф выявлена только с IL-6. После окончания лечения какие-либо положительные корреляции концентрации цитокинов в плазме и КОЕф отсутствуют.

На основании этих изменений в плазме больных ДВККЛ было предположено, что плазма больных будет действовать на МСК здоровых доноров.

Действие плазмы больных ДВККЛ на МСК здоровых доноров. Культивирование МСК доноров в присутствии плазмы доноров и больных ДВККЛ (до и через месяц после окончания лечения) выявило достоверные изменения в суммарной клеточной продукции МСК за 2 исследованных пассажа (3 и 4 пассажа). Оказалось, что культивирование МСК доноров в присутствии плазмы больных до лечения снижает клеточную продукцию, а плазма больных после окончания лечения повышает ее (рис. 3, а).

Количество клеток в культурах МСК, обработанных плазмой доноров, прямо коррелирует с концентрацией GM-CSF в плазме доноров ($R = 0,708$, $p = 0,018$). Не обнаруживается корреляций между количеством клеток в культурах МСК доноров, обработанных плазмой

больных до начала лечения, и цитокинами в плазме этих больных ДВККЛ. Количество клеток в культурах МСК доноров, культивированных в присутствии плазмы больных после окончания лечения, имеет только обратную, но не достоверную корреляцию с IL-2 ($R = -0,729$), IP-10 ($R = -0,742$), MCP-1 ($R = -0,801$) и RANTES ($R = -0,814$).

Анализ поверхностных маркеров МСК доноров после культивирования в присутствии плазмы здоровых доноров и больных ДВККЛ показал, что процент МСК, экспрессирующих на поверхности CD54 (ICAM1), повышается почти в 2 раза при культивировании в присутствии плазмы больных по сравнению с клетками, культивированными с плазмой доноров ($p = 0,0032$) (рис. 3, б). Одновременно увеличивается и ОУЭ CD54 на МСК, обработанных плазмой больных (рис. 3, в). ОУЭ гена *ICAM1* повышается в МСК, обработанных плазмой больных в дебюте заболевания, и остается повышенным после лечения. ICAM1 – молекула адгезии, обеспечивающая взаимодействие МСК с лимфоцитами, и ее повышение указывает на активацию МСК, обработанных плазмой больных. СУФ CD105 (ENG) и CD146 (M α СAM) снижены в МСК, которые культивировали с плазмой больных. СУФ CD274 (PD-L1) повышается на МСК при добавлении плазмы больных в дебюте и еще больше возрастает при добавлении плазмы больных после лечения.

При анализе относительного уровня экспрессии генов выяснилось, что в МСК, обработанных плазмой больных, снижается экспрессия *IL-1b*, *IL-8*, *SDF1* и *LIF* (рис. 3, в). Экспрессия *SDF1* после лечения повышается до уровня, соответствующего МСК, обработанных плазмой доноров.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Цитокины и хемокины секретируются в кровь различными тканями. В норме все факторы, регулирующие кроветворение, секретируются различными органами, например GM-CSF и G-CSF секретируются легкими, мышцами, эндотелием мочевого пузыря, лимфоцитами [13]. IL-6 продуцируется гладкомышечными клетками, эндотелием сосудов, макрофагами [14]. Хемокины также продуцируются большим количеством тканей и опухолевыми клетками [6]. Стромальные клетки костного мозга, в том числе МСК, участвуют в секреции цитокинов и хемокинов, регулирующих кроветворение и иммунный ответ [11]. Концентрация цитокинов в крови очень невелика, но может возрас-

тять во много раз в зависимости от запроса организма. Баланс цитокинов и их взаимосвязи могут изменяться при патологии. Исследование плазмы больных ДВККЛ показало достоверное увеличение концентрации по крайней мере 14 цитокинов из 27 изученных по сравнению с донорами. Концентрация некоторых из них нормализуется после достижения ремиссии и окончания лечения. Однако другие цитокины, такие как FGFb, Eotaxin, VEGF и RANTES, остаются повышенными. Мы также наблюдали аналогичные изменения в экспрессии FGFb в МСК пациентов, что указывает на вклад МСК в повышение концентрации этого фактора в плазме пациентов.

Комплексный анализ различий между всеми изученными цитокинами, хемокинами и корреляциями между ними выявил четкое разделение здоровых доноров и пациентов до и после лечения (рис. 4).

Выявленные изменения могут быть связаны с секрецией опухолевыми клетками или реакцией тканей организма, включая МСК, на наличие опухоли или терапии. Комплексный анализ показывает, что при достижении ремиссии у пациентов с ДВККЛ состав цитокинов плазмы нормализуется, но не достигает уровня здоровых доноров. Не только баланс цитокинов в плазме крови, но и изменения в строении костного мозга остаются частично нарушенными, вероятно, в какой-то степени из-за курсов химиотерапии.

Взаимосвязь между цитокинами имеет большое значение для регуляции кроветворения и воспаления. В плазме здоровых доноров выявлены нормальные для организма корреляции, обеспечивающие созревание кроветворных клеток [15]. Некоторые из этих взаимосвязей сохраняются и у больных ДВККЛ – это корреляции факторов, участвующих в созревании мегакарио-

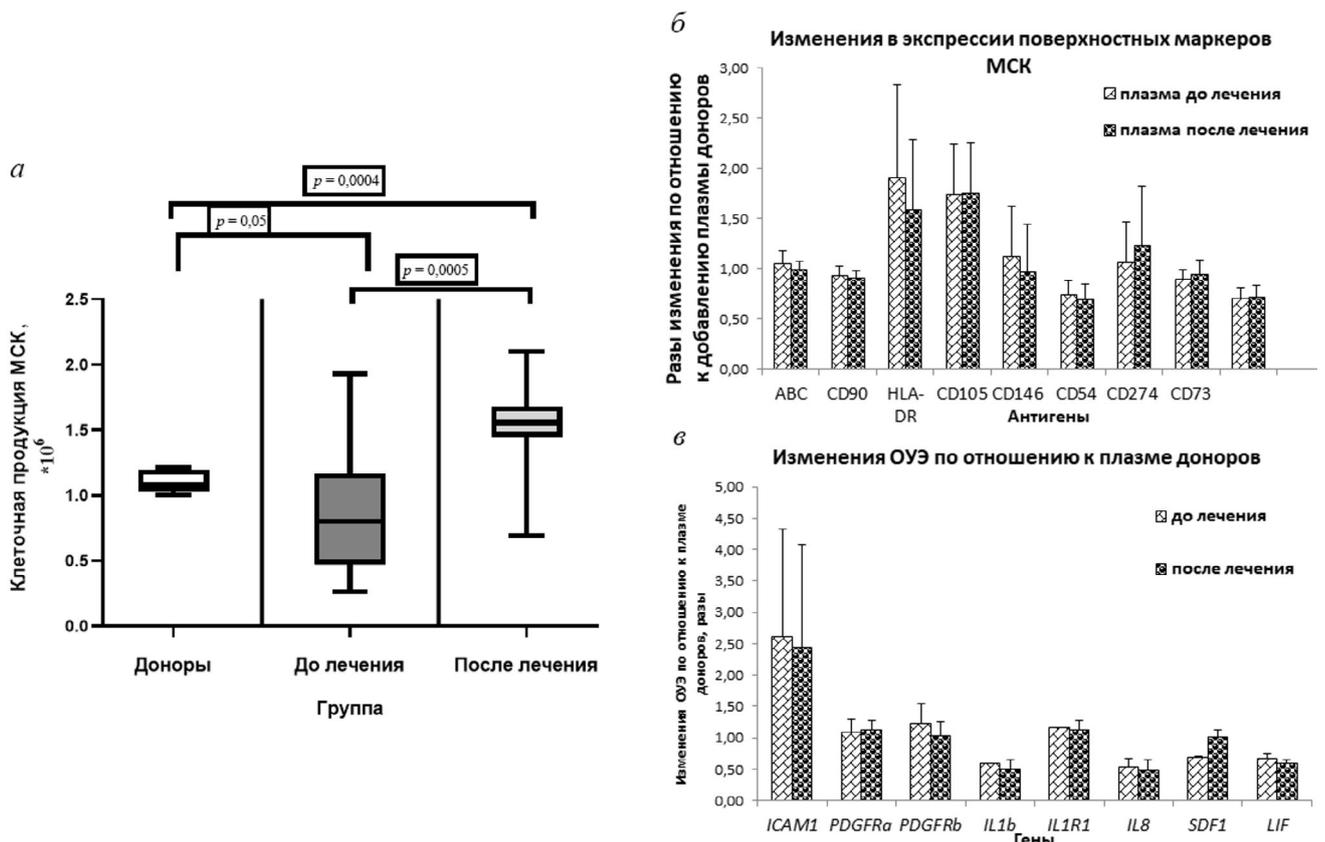


Рис. 3. Влияние плазмы пациентов ДВККЛ на МСК здоровых доноров. *а* – Тотальная клеточная продукция МСК здоровых доноров в присутствии плазмы здоровых доноров и пациентов до и после лечения. На графиках в прямоугольниках горизонтальная линия представляет медиану, длина рамки представляет интервал между четвертями, а вертикальные линии доходят до минимальных и максимальных значений. *б* – Изменения в экспрессии поверхностных маркеров на донорских МСК, культивируемых в присутствии плазмы пациентов, по сравнению с культивированием с плазмой доноров. *в* – Изменения в экспрессии генов в МСК доноров, культивированных в присутствии плазмы пациентов, по сравнению с культивированием в плазме доноров. Были проанализированы МСК от 10 здоровых доноров, культивируемых в присутствии плазмы доноров (5 образцов) и плазмы пациентов с ДВККЛ до (21 образец) и после (18 образец) лечения

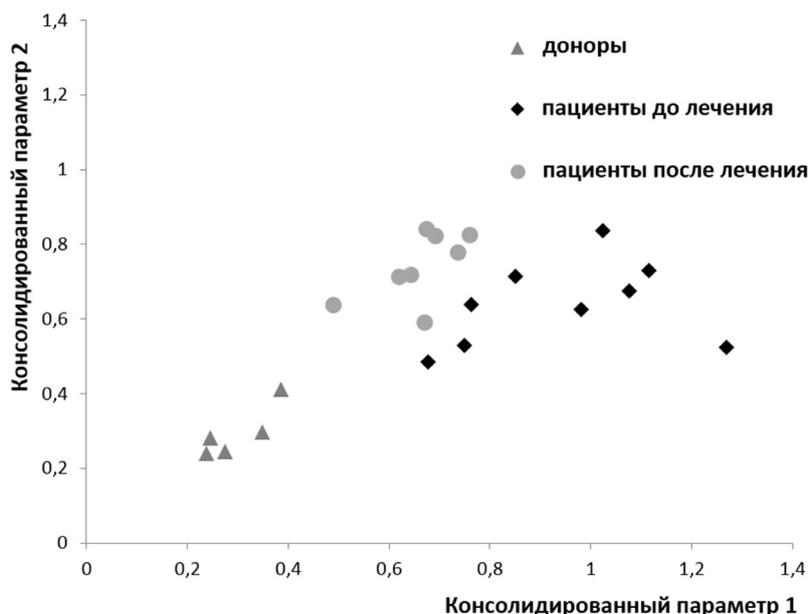


Рис. 4. Комплексный анализ хемокинов и цитокинов здоровых доноров и больных ДВККЛ. Все данные по хемокинам и цитокинам проецируют здоровых доноров и пациентов с ДВККЛ до и после лечения на ось консолидированных параметров. Точка на диаграмме показывает, во сколько раз образец ближе к группе доноров, чем к группе пациентов до лечения (ось абсцисс) или после лечения (ось ординат). Расчет расстояния в многомерном пространстве между образцом и группой представлен в Приложении

цитов, дендритных клеток, некоторых субпопуляций Т- и В-лимфоцитов.

В дебюте заболевания возникают изменения, которые, вероятнее всего, связаны с присутствием опухоли в организме. Наблюдается повышение факторов воспаления, увеличивающих продукцию и созревание нейтрофилов и макрофагов, таких как IL-6, IL-17, G-CSF, MCP-1 и MIP-1 α . Уровень большинства из этих факторов в дебюте заболевания коррелирует между собой.

Регуляция врожденного иммунитета эффекторными и регуляторными В-клетками связана с экспрессией IL-12 и IFN- γ (эффекторные клетки) и IL-10 (регуляторные клетки) [10]. В плазме больных нет корреляции между IL-12, IFN- γ и IL-10 в дебюте заболевания. После окончания лечения между этими цитокинами возникает связь высокой тесноты, что говорит о том, что у больных в дебюте заболевания нарушен механизм врожденного иммунитета, который восстанавливается после окончания лечения.

В регуляции адаптивного иммунитета принимают участие IL-4, IL-2 и IL-13, секретируемые эффекторными В-клетками, и IL-10, секретируемый регуляторными В-клетками. У пациентов до лечения коррелирует секреция IL-2 и IL-4, остальные не связаны. Однако после окончания лечения возникает корреляция между IL-2, IL-12 и IL-10, что указывает на восстановле-

ние функций В-клеток, участвующих в адаптивном иммунном ответе. Уровень IL-10 повышен в плазме больных до лечения (рис. 1). Подобное повышение выявлено в мышинных моделях красной волчанки [16]. После окончания лечения уровень IL-10 нормализуется. Известно, что цитокиновый профиль, секретируемый В-клетками, может быть изменен при различных заболеваниях, в некоторых случаях он нормализуется при лечении больных ритуксимабом [17].

Происходящие у больных ДВККЛ без поражения костного мозга изменения затрагивают не только кроветворные клетки и цитокины, но и другие ткани, в том числе стромальное микроокружение костного мозга. У больных в плазме крови до начала лечения значительно повышены уровни IL-6 и MIP-1 α , которые после окончания лечения снижаются до нормальных значений. Эти цитокины участвуют в остром воспалительном процессе (acute inflammatory state). Их концентрация в плазме коррелирует с концентрацией КОЕф в костном мозге, что указывает на ответ стромальных предшественников на воспалительный процесс в организме. При достижении ремиссии корреляции исчезают, вероятнее всего, за счет того, что вне опухолевого и воспалительного процессов концентрация КОЕф регулируется другими факторами. IL-10 секретируется клетками ДВККЛ [18]. Концентрация IL-8, MIP-1 α и IL-10 повышена в различных жидкостях, связанных с опухолью, и в пери-

туморальной области (peritumoral tissue) [6]. Показано, что концентрация L-8, IP-10, MCP-1, MIP-1 β , IL-6, IL-12p40/p70, MIP-1 α , IFN- α , G-CSF и IL-2R снижается после удаления опухоли головного мозга в перитуморальной области [19]. То есть показанные в нашей работе повышение и корреляция этих факторов в плазме больных ДВККЛ указывают на то, что опухоль может вносить значительный вклад в секрецию этих цитокинов и хемокинов.

Свойства МСК больных ДВККЛ изменены – суммарная клеточная продукция, иммунофенотип и экспрессия многих генов [3]. В настоящей работе были проанализированы связи между концентрацией цитокинов в плазме больных и экспрессией некоторых генов в МСК этих больных в дебюте заболевания. Обнаружены прямые корреляции между экспрессией генов, связанных с пролиферацией, дифференцировкой и образованием сосудов, в МСК с провоспалительными цитокинами и GM-CSF, повышенными в плазме этих больных. Это объясняет изменения свойств МСК из костного мозга этих пациентов. Выявлено ингибирующее действие повышения IL-6, G-CSF, RANTES, MIP-1 α и MIP-1 β в плазме больных на гены, участвующие в дифференцировке МСК и адгезии лимфоцитов к стромальным клеткам. Так как МСК – один из главных компонентов ниши для стволовых кроветворных клеток – активно изучается изменение их характеристик при заболеваниях с вовлечением костного мозга [20]. Однако даже без прямого контакта опухолевых клеток с костным мозгом в МСК происходят значительные изменения. Более того, можно считать, что существует петля обратной связи между концентрацией цитокинов в плазме и секрецией цитокинов МСК [21]. Ранее показано, что в секрете МСК больных ДВККЛ без вовлечения костного мозга, по сравнению с секретом МСК здоровых доноров, повышена концентрация белков IL-6, IL-8, MCP-1, TNF α , ICAM1 и M-CSF [22]. Таким образом, МСК из костного мозга больных ДВККЛ также вносят свой вклад в изменение концентрации и баланса цитокинов в плазме больных в дебюте заболевания.

Исходя из полученных нами результатов, решено было изучить влияние плазмы больных ДВККЛ на МСК здоровых доноров. Показано, что добавление плазмы больных в дебюте заболевания достоверно снижает суммарную клеточную продукцию МСК здоровых доноров, тогда как добавление плазмы больных после окончания лечения повышает ее в 2 раза (рис. 3, а). Кроме суммарной клеточной продукции, изменяются также и поверхностные маркеры МСК. При добавлении плазмы боль-

ных в дебюте заболевания повышается способность МСК к адгезии лимфоцитов за счет повышения экспрессии ICAM1 как на уровне РНК (рис. 3, в), так и на уровне белка. При этом в плазме больных до и после окончания лечения есть факторы, которые повышают способность МСК ингибировать активацию лимфоцитов (PD-L1). Одновременно у этих МСК уменьшается способность регулировать стволовые кроветворные клетки и клетки эндотелия за счет снижения ENG и MCAM (рис. 3, б). Повышение экспрессии HLA-DR на МСК здоровых доноров при добавлении в среду культивирования плазмы больных может быть связано с активацией этих клеток.

Все цитокины, экспрессия которых снижается в МСК, культивированных с плазмой больных, участвуют в регуляции кроветворных клеток и иммунном ответе. Экспрессия SDF1, в отличие от остальных цитокинов, повышается до уровня, соответствующего МСК, обработанных плазмой доноров после лечения (рис. 3, в). Эти данные указывают на то, что нормализуется способность МСК регулировать миграцию кроветворных клеток в костном мозге, а также на то, что происходящие при ДВККЛ изменения в МСК могут быть обратимы.

Таким образом, в плазме крови пациентов с ДВККЛ изменена концентрация провоспалительных и регулирующих кроветворение цитокинов. Баланс между этими цитокинами нарушен в дебюте заболевания и частично восстанавливается после окончания лечения. Очевидно, что наличие В-клеточной опухоли в организме влияет на все ткани, включая строму костного мозга. Показано, что это влияние осуществляется, как минимум, частично через растворимые факторы. МСК, не контактирующие напрямую с опухолью, изменяют не только свои свойства, но и экспрессируемые и секретлируемые ими факторы, внося свой вклад в изменение цитокинового профиля крови. Культивирование МСК здоровых доноров в присутствии плазмы больных ДВККЛ приводит к изменениям, подобным наблюдаемым в МСК больных. Совокупность полученных данных свидетельствует о влиянии опухолевого процесса на стромальное микроокружение костного мозга у больных ДВККЛ независимо от межклеточного контакта МСК с опухолевыми клетками. Результаты работы демонстрируют гуморальную регуляцию стромы костного мозга опухолевыми клетками напрямую или опосредованно.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фунда-

ментальных исследований (грант № 17-04-00170).

Благодарности. Авторы благодарят О. Пшеничникову за продуктивное обсуждение материалов работы.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований, не одобренных этическим комитетом ФГБУ НМИЦ Гематологии Минздрава России. Все процедуры, выполненные в исследовании с участием людей, соответствуют этическим стан-

дартам институционального и/или национального комитета по исследовательской этике и Хельсинкской декларации 1964 года и ее последующим изменениям или сопоставимым нормам этики. От каждого из включенных в исследование участников было получено информированное добровольное согласие.

Дополнительные материалы. Приложение к статье на английском языке опубликовано на сайте журнала «Biochemistry» (Moscow) (<http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya/>) и на сайте издательства Springer (<https://link.springer.com/journal/10541>), том 86, вып. 2, 2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Beltran, B. E., Quiñones, P., Morales, D., Malaga, J. M., Chavez, J. C., et al. (2018) Response and survival benefit with chemoimmunotherapy in Epstein–Barr virus-positive diffuse large B-cell lymphoma, *Hematol. Oncol.*, **36**, 93–97, doi: 10.1002/hon.2449.
2. Swerdlow, S. H., World Health Organization, International Agency for Research on Cancer (2017) in *WHO Classification of Tumours of Haematopoietic and Lymphoid Tissues* (Swerdlow, S. H., Campo, E., Harris, N. L., Jaffe, E. S., Pileri, S. A., Stein, H., and Thiele, J., eds) Vol. 2, Revised 4th Edn., International Agency for Research on Cancer, Lyon.
3. Fastova, E. A., Magomedova, A. U., Petinati, N. A., Sats, N. V., Kapranov, N. M., Davydova, Yu. O., Drize, N. I., Kravchenko, S. K., and Savchenko, V. G. (2019) Bone marrow multipotent mesenchymal stromal cells in patients with diffuse large B-cell lymphoma, *Bull. Exp. Biol. Med.*, **167**, 150–153, doi: 10.1007/s10517-019-04480-6.
4. Chen, Q., Yuan, Y., and Chen, T. (2014) Morphology, differentiation and adhesion molecule expression changes of bone marrow mesenchymal stem cells from acute myeloid leukemia patients, *Mol. Med. Rep.*, **9**, 293–298, doi: 10.3892/mmr.2013.1789.
5. Shipounova, I. N., Petrova, T. V., Svinareva, D. A., Momotuk, K. S., Mikhailova, E. A., and Drize, N. I. (2009) Alterations in hematopoietic microenvironment in patients with aplastic anemia, *Clin. Transl. Sci.*, **2**, 67–74, doi: 10.1111/j.1752-8062.2008.00074.x.
6. Kotyza, J. (2017) Chemokines in tumor proximal fluids, *Biomed. Pap. Med. Fac. Univ. Palacky. Olomouc Czech Repub.*, **161**, 41–49, doi: 10.5507/bp.2016.062.
7. Vilgelm, A. E., and Richmond, A. (2019) Chemokines modulate immune surveillance in tumorigenesis, metastasis, and response to immunotherapy, *Front. Immunol.*, **10**, 333, doi: 10.3389/fimmu.2019.00333.
8. Mantovani, A., Allavena, P., Sica, A., and Balkwill, F. (2008) Cancer-related inflammation, *Nature*, **454**, 436–444, doi: 10.1038/nature07205.
9. Okrój, M., Potempa, J. (2019) Complement activation as a helping hand for inflammophilic pathogens and cancer, *Front. Immunol.*, **9**, 3125, doi: 10.3389/fimmu.2018.03125.
10. Lund, F. E. (2008) Cytokine-producing B lymphocyte-key regulators of immunity, *Curr. Opin. Immunol.*, **20**, 332–338, doi: 10.1016/j.coi.2008.03.003.
11. Munir, H., Ward, L. S. C., and McGettrick, H. M. (2018) Mesenchymal stem cells as endogenous regulators of inflammation, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **1060**, 73–98, doi: 10.1007/978-3-319-78127-3_5.
12. Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, *Nat. Protoc.*, **3**, 1101–1108, doi: 10.1038/nprot.2008.73.
13. Metcalf, D. (2008) Hematopoietic cytokines, *Blood*, **111**, 485–491, doi: 10.1182/blood-2007-03-079681.
14. Metcalf, D., Willson, T. A., Hilton, D. J., Di Rago, L., and Mifsud, S. (1995) Production of hematopoietic regulatory factors in cultures of adult and fetal mouse organs: measurement by specific bioassays, *Leukemia*, **9**, 1556–1564.
15. Lyman, G. H., and Dale, D. C. (2010) *Introduction to the Hematopoietic Growth Factors*, Springer, Boston, MA, pp. 3–10.
16. Lenert, P., Brummel, R., Field, E. H., and Ashman, R. F. (2005) TLR-9 activation of marginal zone B cells in lupus mice regulates immunity through increased IL-10 production, *J. Clin. Immunol.*, **25**, 29–40, doi: 10.1007/s10875-005-0355-6.
17. Ma, N., Zhang, Y., Liu, Q., Wang, Z., Liu, X., et al. (2017) B cell activating factor (BAFF) selects IL-10-B cells over IL-10+B cells during inflammatory responses, *Mol. Immunol.*, **85**, 18–26, doi: 10.1016/j.molimm.2017.02.002.
18. Li, L., Zhang, J., Chen, J., Xu-Monette, Z. Y., Miao, Y., et al. (2018) B-cell receptor-mediated NFATc1 activation induces IL-10/STAT3/PD-L1 signaling in diffuse large B-cell lymphoma, *Blood*, **132**, 1805–1817, doi: 10.1182/blood-2018-03-841015.
19. Portnow, J., Badie, B., Liu, X., Frankel, P., Mi, S., Chen, M., and Synold, T. W. (2014) A pilot microdialysis study in brain tumor patients to assess changes in intracerebral cytokine levels after craniotomy and in response to treatment with a targeted anti-cancer agent, *J. Neurooncol.*, **118**, 169–177, doi: 10.1007/s11060-014-1415-4.
20. Cheng, H., Sun, G., and Cheng, T. (2018) Hematopoiesis and microenvironment in hematological malignancies, *Cell Regen.*, **7**, 22–26, doi: 10.1016/j.cr.2018.08.002.
21. Zhong, W., Zhu, Z., Xu, X., Zhang, H., Xiong, H., et al. (2019) Human bone marrow-derived mesenchymal stem cells promote the growth and drug-resistance of diffuse large B-cell lymphoma by secreting IL-6 and elevating IL-17A levels, *J. Exp. Clin. Cancer Res.*, **38**, 73, doi: 10.1186/s13046-019-1081-7.
22. Petinati, N. A., Sats, N., Drize, N. J., Malyants, I., Shender, V., Grigorieva, T., Arapidi, G., Lagarkova, M., Fastova, E. A., Magomedova, A., Kravchenko, S., and Savchenko, V. (2019) Alterations in secretome and transcriptome of bone marrow derived MSCs in patients with diffuse large B-cell lymphoma without bone marrow involvement, *Blood*, **134**, 1514–1514, doi: 10.1182/blood-2019-122431.

HUMORAL EFFECT OF A B-CELL TUMOR ON THE BONE MARROW MULTIPOTENT MESENCHYMAL STROMAL CELLS*

N. A. Petinati^{1**}, A. E. Bigildeev¹, D. S. Karpenko¹, N. V. Sats¹, N. M. Kapranov¹,
Y. O. Davydova¹, E. A. Fastova¹, A. U. Magomedova¹, S. K. Kravchenko¹, G. P. Arapidi^{2,3,4},
M. I. Rusanova⁵, M. M. Lagarkova², N. I. Drize¹, and V. G. Savchenko¹

¹ National Research Center for Hematology, Ministry of Health, 125167 Moscow, Russia; E-mail: loel@mail.ru

² Federal Research and Clinical Center of Physical-Chemical Medicine,
Federal Medical Biological Agency, 119435 Moscow, Russia

³ Shemyakin–Ovchinnikov Institute of Bioorganic Chemistry, Russian Academy of Sciences, 117997 Moscow, Russia

⁴ Moscow Institute of Physics and Technology (State University), 141700 Dolgoprudny, Moscow Region, Russia

⁵ Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

The properties of bone marrow (BM)-derived multipotent mesenchymal stromal cells (MSCs) are altered in the patients with the diffuse large B cell lymphoma (DLBCL) without BM involvement. It was suggested that plasma from the patients contains soluble factors that affect MSCs. Plasma and BM-derived MSCs from the DLBCL patients at the onset of the disease and one month after the end of treatment were studied. Concentration of the plasma cytokines and gene expression in the MSCs were evaluated by the Bio-Plex Pro Human Cytokine Panel kit to measure 27 analytes and real-time PCR. Plasma and MSCs from the healthy donors were used as controls. Analysis of cytokines in the plasma from healthy donors and patients before and one month after the end of treatment revealed significant differences in the concentration of 14 out of 27 cytokines. Correlations between the levels of secreted cytokines were altered in the plasma from patients indicating that the immune response regulation was disturbed. Cultivation of the MSCs from the healthy donors in the medium supplemented with the plasma from patients led to the changes in the MSC properties, similar to those observed in the MSCs from patients. The BM-derived MSCs were shown to participate in the humoral changes occurring in the DLBCL patients. For the first time, it was shown that the precursors of the stromal microenvironment – multipotent mesenchymal stromal cells – are altered in the patients with DLBCL without bone marrow involvement due to the humoral effect of the tumor and the response of organism to it. Comprehensive analysis of the results shows that, when remission is achieved in the patients with DLBCL, composition of the plasma cytokines normalizes, but does not reach the level observed in the healthy donors. The discovery of a new aspect of the effect of the tumor B-cells on the organism could help to reveal general regularities of the humoral effect of various tumors on the bone marrow stromal cells.

Keywords: DLBCL, MSCs, cytokines, chemokines, secretion

УДК 576.52, 576.54

УРОВНИ БЕЛКОВ CRABP1 И CRABP2 НЕ КОРРЕЛИРУЮТ С ЧУВСТВИТЕЛЬНОСТЬЮ КЛЕТОК РАКА МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ К РЕТИНОВОЙ КИСЛОТЕ, НО КОРРЕЛИРУЮТ МЕЖДУ СОБОЙ, ПРИЧЕМ CRABP2 ЯВЛЯЕТСЯ РЕГУЛЯТОРОМ ПРОДУКЦИИ CRABP1*

© 2021 А.Д. Еникеев, А.В. Комельков**, М.Е. Аксельрод, С.А. Галецкий, С.А. Кузьмичев, Е.М. Чевкина

ФГБУ «НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина» Минздрава России,
115478 Москва, Россия; электронная почта: komelkov@gmail.com

Поступила в редакцию 17.08.2020

После доработки 30.09.2020

Принята к публикации 30.09.2020

Белки, связывающие ретиноевую кислоту (РК), CRABP1 и CRABP2 являются молекулярными шаперонами, обеспечивающими реализацию внутриклеточной активности РК, важнейшего стимулятора клеточной дифференцировки, обладающего опухоль-супрессорной активностью. Одной из основных функций CRABP2 является доставка и передача ретиноевой кислоты ядерным рецепторам RAR/RXR, что приводит к активации транскрипции широкого спектра ретиноид-респонсивных генов. Функции CRABP1 менее изучены, но связаны, по-видимому, с удержанием ретиноевой кислоты в цитоплазме и ограничением ее активности в отношении регуляции транскрипции генов, что предполагает участие данного белка в формировании РК-резистентности. Также малоизвестны и механизмы, регулирующие активность CRABP1. Впервые проведенное в данной работе сравнение уровней CRABP1 в линиях опухолевых клеток различного происхождения показало отсутствие этого белка в клетках опухолей, считающихся РК-резистентными, и его выраженную продукцию в РК-чувствительных клетках. Вместе с тем анализ, проведенный на панели клеточных линий рака молочной железы с различным уровнем РК-чувствительности, показал отсутствие корреляции продукции белка CRABP1 с чувствительностью клеток к ретиноевой кислоте. При этом впервые обнаружена корреляция продукции белков CRABP1 и CRABP2 во всех исследованных типах клеток, вне зависимости от их происхождения и РК-чувствительности/резистентности. Более того, впервые показано, что нокаут гена *CRABP2* приводит к подавлению продукции белка CRABP1 как в РК-чувствительных, так и в РК-резистентных клетках. Обнаруженная нами CRABP2-зависимая регуляция уровня CRABP1 является новым механизмом внутриклеточной ретиноевой сигнальной системы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: ретиноевая кислота, ATRA, CRABP1, CRABP2, пролиферация, регуляция экспрессии.

DOI: 10.31857/S032097252102010X

ВВЕДЕНИЕ

Ретиноевая кислота (РК) является одним из наиболее активных внутриклеточных метаболитов

Принятые сокращения: НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого; РК – ретиноевая кислота; РМЖ – рак молочной железы; ATRA – полностью транс-ретиноевая кислота (all-trans retinoic acid); CRABP1 и CRABP2 – белки, связывающие ретиноевую кислоту, 1 и 2 (cellular retinoic acid-binding proteins 1 and 2); FABP5 – белок, связывающий жирные кислоты (fatty acid-binding protein); GFP – зеленый флуоресцентный белок (green fluorescent protein); PPAR – рецепторы, активируемые пролифераторами пероксисом (peroxisome proliferator-activated receptors); RAR – рецептор ретиноевой кислоты (retinoic acid receptor).

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biochemistry> в рубрике «Papers in Press», BM20-267, 25.01.2021.

** Адресат для корреспонденции.

тов ретинола (витамина А). Функциональная активность РК связана с регуляцией транскрипции более пяти сотен генов, в промоторной области которых имеются ретиноид-респонсивные элементы (RARE). Она реализуется с помощью ядерных рецепторов РК, прежде всего белков RAR (RAR α , β и γ) и RXR, которые функционируют в качестве транскрипционных факторов в составе гетеродимеров, а также рецептора PPAR β/δ , также образующего гетеродимер с RXR [1]. За счет способности контролировать транскрипционную активность ряда генов РК регулирует важнейшие биологические процессы, связанные с дифференцировкой клеток, ремоделированием тканей и иммунным ответом. В большинстве клеток РК стимулирует дифференцировку или апоптоз и даже является негативным регулятором пролиферации, в связи с чем ее принято считать опухолевым супрес-

сором. В этой связи предпринимаются активные попытки разработки препаратов для терапии опухолей на основе РК и ее синтетических аналогов, однако до сих пор применение ретиноидов в клинической практике ограничено (за исключением острого промиелоцитарного лейкоза) прежде всего быстрым приобретением злокачественными клетками устойчивости к терапии на основе производных или синтетических ретиноидов [2].

Реализация функциональной активности РК во многом определяется ее доставкой к ядерным рецепторам. За внутриклеточный транспорт гидрофобных молекул РК к рецепторам отвечают представители семейства липид-связывающих белков, прежде всего два белка, связывающих РК, CRABP1 и CRABP2 (cellular retinoic acid-binding proteins 1 and 2), а также представитель семейства белков, связывающих жирные кислоты, FABP5 (fatty acid-binding protein 5) [3]. Согласно некоторым данным, белки CRABP в целом (или как минимум CRABP2) обеспечивают взаимодействие РК с рецепторами RAR/RXR, в то время как FABP5 доставляет РК к рецептору PPAR β/δ . Предполагается, что взаимодействие РК с разными ядерными рецепторами приводит к противоположному эффекту на клетки: CRABP2-зависимая активация RAR/RXR способствует стимуляции дифференцировки и реализации проапоптотической и антипролиферативной активности РК, в то время как опосредуемое FABP5 взаимодействие РК с PPAR β/δ способствует активации транскрипции генов, ответственных за выживание, пролиферацию и ангиогенез [4]. Аффинность РК к белкам CRABP выше, чем к FABP5 [5], кроме того, в большинстве клеток соотношение уровня экспрессии белков CRABP2/FABP5 и RAR/PPAR β/δ сдвинуто в сторону CRABP–RAR пути, что определяет опухоль-супрессорную функцию РК в большинстве типов тканей [6]. Существуют данные, указывающие на то, что увеличение соотношения FABP5/CRABP2 коррелирует с устойчивостью клеток к РК [7, 8]. В связи с описанной функцией CRABP2 его принято считать опухольным супрессором. Более того, для него показана активность в цитоплазме в отсутствие РК, не связанная с активацией ее рецепторов, которая также способствует остановке клеточного цикла и стабилизации транскриптов проапоптотических генов [9, 10]. При этом в некоторых типах опухолей CRABP2 играет, по-видимому, опухоль-промоторную роль [11, 12], однако механизмы такой активности остаются малоизвестными. Косвенно на участие FABP5 в РК-резистентности указывают и результаты исследования рака молочной железы

(РМЖ), которые показали, что FABP5 преимущественно экспрессируется в ER-негативных (абб. ER от англ. estrogen negative) и трижды-негативных опухолях, которые обычно демонстрируют РК-резистентность [8]. Наибольшей аффинностью к РК среди РК-связывающих белков обладает белок CRABP1 [13], однако о его функциональном значении известно очень мало, а данные о его роли в трансформации клеток и опухолевой прогрессии еще более противоречивы.

Предположительно, связывание CRABP1 с РК приводит к удержанию ее в цитоплазме [14], ограничению активности (включая доступ РК к белку CRABP2 по конкурентному механизму [15]), и даже может способствовать метаболизму РК [16–18]. В соответствии с этим можно сделать предположение о роли CRABP1 в приобретении клетками устойчивости к РК. Однако за исключением единственной работы, где показано увеличение экспрессии CRABP1 в ER/PR-негативных (абб. PR от англ. progesterone negative) опухолях молочной железы [15], исследований о связи данного белка с чувствительностью к РК нам не известно. По другим данным, CRABP1 обладает схожими с CRABP2 функциями – он также направляет РК к рецепторам RAR, однако не взаимодействует с ними напрямую, передаче РК рецептору предшествует диссоциация комплекса РК–CRABP1 [13]. В этой связи остается непонятной функция этого белка в ядре, хотя он, как и CRABP2, имеет сигнал ядерной локализации, а присутствие CRABP1 в ядре подтверждается как нашими предшествующими исследованиями [19], так и данными литературы [20].

О возможной взаиморегуляции белков CRABP в настоящее время ничего не известно, хотя ее наличие кажется достаточно вероятным, учитывая то, что оба белка обеспечивают реализацию сходных РК-регулируемых процессов и сами, в свою очередь, являются продуктами экспрессии ретиноид-зависимых генов. На такую возможность указывают и полученные нами ранее данные [21].

Тем не менее среди достаточно многочисленных исследований РК-связывающих белков, за исключением цитируемой выше работы по изучению функций CRABP1/2 при раке молочной железы [15] и нашей работы, выполненной на образцах немелкоклеточного рака легкого [21], практически отсутствуют исследования, в которых анализировались бы одновременно белки CRABP1 и CRABP2.

В данной работе мы впервые исследовали экспрессию обоих гомологов CRABP на широкой панели клеточных линий и проанализирова-

ли их возможную связь с чувствительностью/резистентностью клеток к РК. Мы не выявили строгой ассоциации между продукцией исследуемых белков и РК-чувствительностью, хотя большинство РК-чувствительных линий характеризовалось высоким уровнем CRABP1/2, а на более РК-резистентных линиях демонстрировали отсутствие указанных белков. При этом была обнаружена корреляция между продукцией CRABP1 и CRABP2 — все линии, в которых экспрессируется CRABP1, характеризуются высоким уровнем продукции CRABP2, в то время как во всех линиях клеток с низким уровнем или отсутствием CRABP2 продукция CRABP1 не регистрируется. Более того, впервые было показано, что экспрессия белков CRABP имеет функциональную связь, в которой CRABP2 является регулятором продукции CRABP1.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Клеточные линии. Были использованы следующие линии клеток из коллекции ATCC: немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) — A549, H1299, H460; глиобластомы — LN229 и U87; рака яичника — OVCAR-8, SK-OV-3, EFO-21; нейробластомы — SK-N-AS, SH-SY-5Y, IMR-32; рака молочной железы (РМЖ) — MCF7, T47D, SKBR3, HCC1954, MDA-MB-453, HCC1937, MDA-MB-468, MDA-MB-231, HBL100. Для получения псевдоретровирусных частиц использовались линии эпителиальных клеток 293FT («Invitrogen», США) и GP293 («Clontech», США). Клетки культивировали в среде DMEM («ПанЭко», Россия), содержащей 0,294 мг/мл L-глутамин, 10% эмбриональной телячьей сыворотки («PAA Laboratories», Канада), 0,1 мг/мл стрептомицина, 100 ед/мл пенициллина при 37 °C и 5% CO₂. Клетки MCF10A эпителия молочной железы культивировали в среде DMEM/F-12 («Gibco», США), содержащей 5% лошадиной сыворотки («Gibco», США), 20 нг/мл ростового фактора EGF («Thermo Fisher Scientific», США), 0,5 мг/мл гидрокортизона («Sigma-Aldrich», США), 100 нг/мл холерного токсина («Sigma-Aldrich», США) и 10 мкг/мл инсулина («Sigma-Aldrich», США). Отсутствие контаминации микоплазмой проверяли стандартными методами, ПЦР и окрашиванием Hoechst 33342 («Thermo Fisher Scientific», США).

Анализ чувствительности клеток к ретиноевой кислоте. Полностью транс-ретиноевую кислоту (абб. ATRA от англ. all-trans retinoic acid) растворяли в ДМСО для приготовления стокового раствора с концентрацией 10 мМ. Клетки выса-

живали в количестве 50–300 тысяч на 60-мм чашки Петри («SPL Life Sciences», США) в зависимости от клеточной линии и культивировали в течение 5 сут в присутствии ATRA в диапазоне концентраций 0,1–100 мкМ. Снимали клетки 0,25%-ным раствором трипсин-ЭДТА, смешивали с красителем трипановый синий в соотношении 1 : 1 и подсчитывали в камере Горяева. В качестве контроля для каждой линии использовали клетки, культивируемые параллельно в течение того же времени в среде без ATRA, содержащей ДМСО в соответствующей концентрации. Количество живых клеток в контроле для каждой линии брали за 100%.

Получение производных линий клеток с гиперэкспрессией экзогенного CRABP1. Молекулярное клонирование и ретровирусную инфекцию проводили по описанной ранее методике [22]. Кодированная последовательность *CRABP1* была амплифицирована с помощью ПЦР с использованием праймеров к последовательностям, фланкирующим кодирующую область мРНК *CRABP1*:

CRABP1 cloning F: 5' ATTCTCGAGCCACCATGC-
CCAACCTTC 3' и

CRABP1 cloning R: 5' ACAGGATCCCTGCCTT-
CACTCTCGG 3'

(сайты рестрикции выделены курсивом, комплементарные мРНК последовательности подчеркнуты). Матрицей для ПЦР служила кДНК, синтезированная с мРНК, выделенной из ткани рака легкого человека. Амплификацию проводили в присутствии высокоточной полимеразы PFX («Invitrogen», США) согласно протоколу производителя. Кодированная последовательность была клонирована в ретровирусный вектор pLXSN («Clontech», США) по сайтам рестрикции XhoI и BamHI. Проверку осуществляли с помощью рестрикции полученных конструкторов, а также методом ПЦР с помощью следующих праймеров:

pLXSN F: 5' CCCTTGAACCTCCTCGTTTCG 3' и
pLXSN R: 5' TTTCCACACCTGGTTGCTGA 3',

подобранных к участкам вектора, фланкирующим вставку. Соответствие последовательности *CRABP1* человека подтверждали с помощью секвенирования. Псевдоретровирусные частицы получали с помощью трансфекции клеток GP293. Для трансфекции брали 2 мкг ДНК смеси pLXSN-CRABP1 и pVSV-G («Clontech», США) в эквимольном соотношении. Трансфекцию проводили с использованием липофектамина 2000 («Invitrogen», США) согласно про-

токолу производителя. По достижении 20–30% конфлюэнтности клеток добавляли 24, 48 и 72-часовые инокуляты вируса, смешанные со средой в соотношении 1 : 1, с добавлением 8 мкг/мл полибрена («Sigma-Aldrich», США). Селекцию проводили на G418 («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 1000 мкг/мл в течение 8–9 дней. Для контрольных экспериментов получали производные тех же линий, в которые трансдуцировали не содержащий вставки вектор pLXSN.

Получение производных линий клеток с нокдауном CRABP2. Предшественники малых шпилечных РНК (shRNA) к кодирующей последовательности CRABP2 были клонированы в лентивирусный вектор pLKO.1 puro («Addgene», США) по сайтам рестрикции AgeI и EcoRI. Последовательности:

sh1CRABP2: 5' CCGGGAAATGGGAGAGTGGAATAACTCGAGTTATTCTCACTCTCCCA-TTCTTTTGG 3' (TRCN0000021371),

sh2CRABP2: 5' CCGGCGAGGAATTGCTCAAA-GTGCTCTCGAGAGCACTTTGAGCAATTCCT-CGTTTTTGG 3' (TRCN0000021370)

(смысловая и антисмысловая последовательности подчеркнуты). Результаты проверяли с помощью ПЦП с использованием праймеров pLKO.1-seq standart и с помощью секвенирования (ID последовательности AN002814.2, Homo sapiens retinoic acid-binding protein II (CRABP-II) gene, complete cds, доступна по адресу <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/nucleotide/AN002814.2>).

Для получения псевдоретровирусных частиц использовали клетки 293FT при 70% конфлюэнтности. Для трансфекции брали 2 мкг ДНК смеси векторов pLKO.1 puro, pVSVG («Clontech», США) и pCMV delta R8.2 («Addgene», США) в эквимольном соотношении. Трансфекцию проводили с использованием липофектамина 2000 («Invitrogen», США), согласно протоколу производителя. По достижении 20–30% конфлюэнтности клеток добавляли 24, 48 и 72-часовые инокуляты вируса, смешанные со средой в соотношении 1 : 1, с добавлением 8 мкг/мл полибрена («Sigma-Aldrich», США). Селекцию проводили на пурамицине («Sigma-Aldrich», США) в концентрации 1–2 мкг/мл в зависимости от клеточной линии в течение 4–5 дней. Для контрольных экспериментов получали производные тех же линий, экспрессирующие shRNA к зеленому флуоресцентному белку (shGFP).

Иммуноблоттинг. Иммуноблоттинг проводили по описанной ранее методике [22]. Клетки

лизировали в буфере RIPA (50 mM Tris-HCl (pH 7,5), 150 mM NaCl, 0,5% DoX, 1% NP-40, 0,1% SDS, 2 mM ЭДТА) с добавлением смеси ингибиторов протеаз Complete Protease Inhibitor Cocktail («Roche», Швейцария). Концентрацию белка определяли методом Бредфорда с помощью набора Bradford Assay Kit («Bio-Rad», США). Белок в количестве 15 мкг разделяли в 15%-ном полиакриламидном геле, переносили на PVDF мембрану («Millipore», США). Мембрану инкубировали в блокирующем растворе 5%-ного BSA («PAA Laboratories GmbH», Австрия) в буфере TBS, содержащем 0,1% TWEEN 20 («Sigma-Aldrich», США). Затем мембрану инкубировали первичными антителами к CRABP1 («Sigma-Aldrich», США, HPA17203; 1 : 1000) или CRABP2 («Sigma-Aldrich», США, HPA004135; 1 : 500) 12 ч при +4 °C. В качестве контроля нанесения белка использовали антитела к β-актину («Abcam», Великобритания, ab8227; 1 : 5000). После стандартной отмывки мембрану инкубировали со вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена («Cell Signaling Technology», США, 29902; 1 : 65 000) 1 ч при комнатной температуре. После отмывки мембрану проявляли с помощью реагента ECL (Enhanced Chemiluminescence, «Millipore», США). Хемилюминесцентную реакцию регистрировали на приборе Kodak Gel Logic 2200 Imaging System с последующей обработкой с помощью программы Carestream Molecular Imaging Software SE ver. 5.0.1.27.

Статистический анализ. Все данные были получены в результате трех независимых экспериментов. Данные представлены в виде среднего ± стандартного отклонения (SD). Для расчетов и построения графиков была использована программа GraphPad Prism 8.3 (GraphPad Software, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Продукция CRABP1 и CRABP2 коррелирует в клеточных линиях различного происхождения. Ранее в процессе изучения РК-связывающих белков мы обнаружили высокую вариабельность уровней CRABP (в особенности CRABP1) в линиях опухолевых клеток различного происхождения. Учитывая данные литературы о возможной роли CRABP1 в качестве внутриклеточного регулятора биодоступности РК, мы предположили, что этот белок может быть вовлечен в формирование РК-резистентности. В этой связи мы сравнили продукцию белков CRABP в различных типах опухолевых клеток. По резуль-

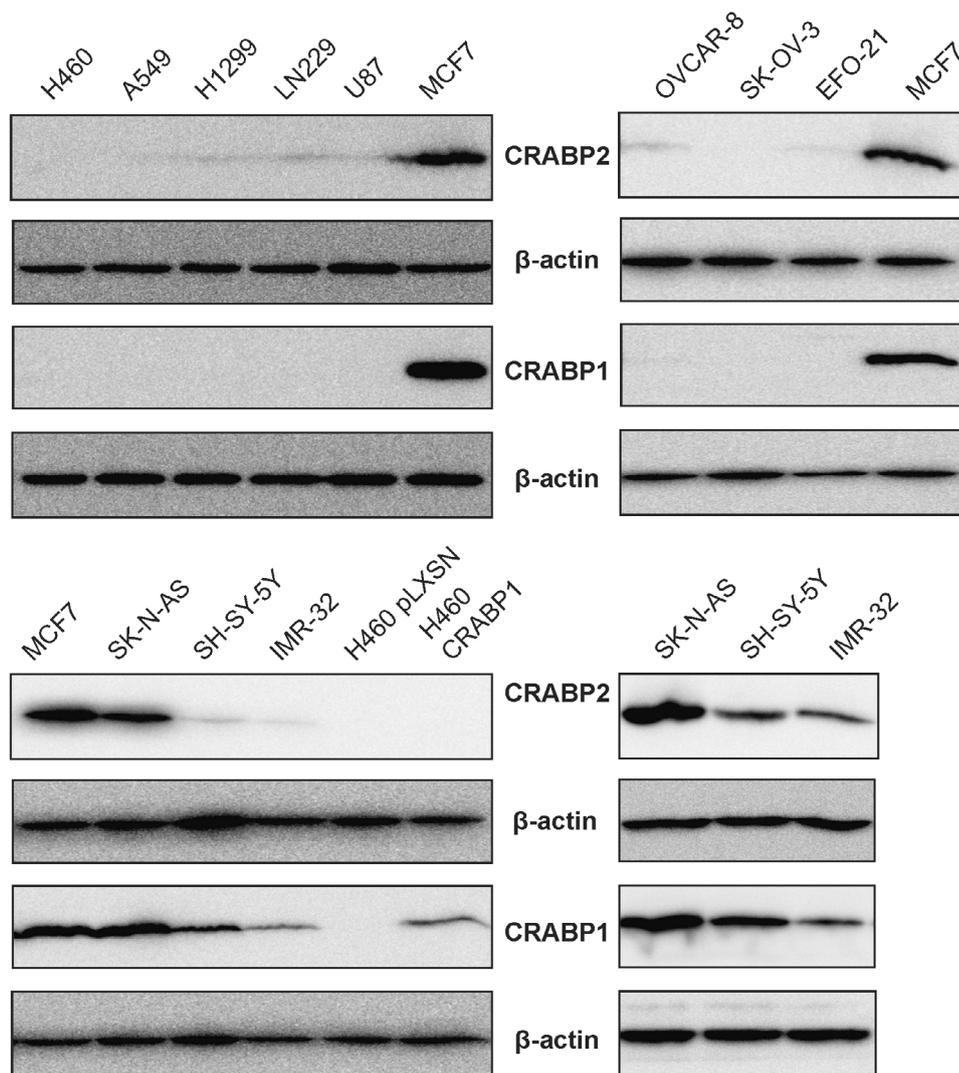


Рис. 1. Сравнение продукции белков CRABP1 и CRABP2 методом иммуноблоттинга в линиях опухолевых клеток различного происхождения: НМРЛ (H1299, A549, H460), рака яичника (OVCAR-8, SC-OV-3, EFO-21), глиобластомы (LN229, U87), нейробластомы (IMR-32, SK-N-AS, SH-SY-5Y). В качестве положительного контроля экспрессии CRABP1 использована линия РМЖ MCF7. В качестве контроля специфичности антител в отношении белков CRABP1 и CRABP2 использованы производные сублинии H460 с гиперэкспрессией CRABP1 (H460 CRABP1) и экспрессией вектора без вставки (H460 pLXSN). Результаты по линиям нейробластомы приведены в нижней части рисунка дважды – совместно с клетками MCF7 (слева) и в отсутствие MCF7 (справа) во избежание нивелирования («маскировки») различий в экспрессии белков CRABP1 и CRABP2 между линиями при той же экспозиции мембраны в присутствии сильного сигнала от MCF7

татам анализа во всех линиях клеток НМРЛ (A549, H1299, H460), рака яичников (SK-OV-3, OVCAR-8, EFO-21) и глиобластомы (LN229, U87) мы наблюдали отсутствие белка CRABP1, в то время как во всех исследованных линиях нейробластомы (SK-N-AS, SH-SY-5Y, IMR-32) этот белок регистрировался на достаточно высоком уровне (рис. 1). В связи с тем, что в ряде клеточных линий белок CRABP1 не регистрировался, мы использовали линию MCF7 РМЖ в качестве положительного контроля наличия сигнала. Мы также обнаружили, что во всех

клетках с экспрессией CRABP1 вне зависимости от их происхождения наблюдался высокий уровень CRABP2, в то время как в клетках с отсутствием экспрессии CRABP1 уровень CRABP2 был заметно снижен или белок не регистрировался. Для подтверждения специфичности работы используемых антител в отношении этих двух белков на рис. 1 представлены результаты анализа CRABP1 и CRABP2 в клетках исходной линии H460 в отсутствие эндогенной экспрессии CRABP1 и в ее производной сублинии с экспрессией экзогенного CRABP1 (H460

CRABP1), а также в контрольной линии, экспрессирующей вектор без вставки (H460 pLXSN). Как видно на рисунке, во всех производных сублиниях экспрессия белка CRABP2 не регистрировалась вне зависимости от экспрессии CRABP1, что подтверждает специфичность антител.

По данным литературы, НМРЛ, рак яичника и глиобластомы считаются в целом РК-резистентными, а нейробластомы — РК-чувствительными типами опухолей. Таким образом, наше предположение о связи РК-чувствительности клеток с экспрессией CRABP1 подтверждалось. На основании полученных данных мы также предположили наличие регуляторной связи между белками CRABP1 и CRABP2. Однако обе гипотезы необходимо было проверить, желательнее с использованием клеточных линий сходного происхождения, но различающихся по чувствительности к РК.

Сравнение чувствительности к ретиноевой кислоте различных линий клеток рака молочной железы. Для проверки указанных гипотез была выбрана экспериментальная модель РМЖ. Во-первых, выбор обуславливался большим пулом преคลินิกеских данных, свидетельствующих о перспективах использования РК в качестве агента для профилактики и лечения данного типа опухолей [23–25]. Во-вторых, РМЖ является гетерогенным типом опухолей, как по происхождению, так и по молекулярным характеристикам, к которым относятся прежде всего экспрессия рецепторов эстрогена и прогестерона, а также статус HER2/neu. По данным литературы, чувствительность этих опухолей к РК также сильно варьирует [26, 27]. Различаются и данные в отношении уровня чувствительности к РК разных линий клеток РМЖ. Важно отметить, что в разных работах для оценки РК-чувствительности применяются различные подходы и методы оценки, а также значения концентрации РК. Поэтому на первом этапе необходимо было сравнить чувствительность к РК широкой панели клеточных линий РМЖ в единой серии экспериментов, выбрать условия и критерий (пороговое значение РК) для разделения линий на РК-чувствительные и РК-резистентные. В исследование включили 9 линий РМЖ, а также линию MCF10A, полученную из эпителия молочной железы, которая стандартно используется в качестве условно нормальной (нетуморогенной) линии клеток. Чувствительность к полностью транс-ретиноевой кислоте (наиболее распространенная в клетках и биологически активная изоформа РК) анализировали методом оценки динамики пролиферации. Для этого клетки каждой линии культивировали в

течение 5 сут в стандартной среде (контроль) и в среде с АТРА в различных концентрациях, после чего проводили подсчет живых клеток. Диапазон концентраций АТРА варьировал от 0,1 до 100 мкМ. По результатам титрования АТРА и анализа количества живых клеток были выбраны пороговые концентрации АТРА и критерии, позволяющие разделить линии клеток на РК-чувствительные и РК-резистентные. РК-чувствительными считали линии, показавшие снижение пролиферации в два и более раза при инкубации с АТРА в концентрации до 10 мкМ. К этой группе относились линии MCF7, T47D, SKBR3 и HCC1954 (рис. 2, а). При этом чувствительность отдельных линий внутри группы варьировала — так, наиболее чувствительными оказались линии SKBR3 и T47D, которые продемонстрировали двукратное снижение пролиферации по сравнению с контролем даже при концентрации АТРА 0,1 мкМ. В то же время динамика пролиферации клеток в группе РК-резистентных линий (MDA-MB-453, MDA-MB-468, MDA-MB-231, HCC1937, HBL100, а также MCF10A) при добавлении 10 мкМ АТРА не менялась (рис. 2, б). Более того, количество живых клеток в этой группе линий не снижалось и при инкубации с АТРА в концентрации 20 мкМ. Тем не менее в группе РК-резистентных клеток можно было выделить линии, динамика пролиферации которых не менялась по сравнению с контролем даже при инкубации с 50 мкМ АТРА (HBL100, MDA-MB-231), и линии, для которых было характерно снижение пролиферации при данных условиях (MDA-MB-453, MDA-MB-468, HCC1937, MCF10A).

Это означает, что чувствительность к РК варьирует в достаточно широком диапазоне, однако порогом можно считать интервал концентраций 1–10 мкМ, при котором пролиферация РК-чувствительных клеток снижается в два и более раза по сравнению с контролем, в то время как пролиферация РК-резистентных клеток либо не меняется, либо начинает снижаться лишь при 50 мкМ АТРА — то есть, при концентрациях РК, значительно превышающих физиологические значения.

Продукция белков CRABP1 и CRABP2 в клетках РМЖ связана между собой, причем CRABP2 является регулятором CRABP1. Далее мы провели анализ продукции РК-связывающих белков CRABP1 и CRABP2 в РК-чувствительных и РК-резистентных линиях РМЖ. По результатам анализа мы не обнаружили достоверной ассоциации между экспрессией CRABP1 и РК-чувствительностью. Так, в РК-чувствительной линии SKBR3 продукция CRABP1 отсут-

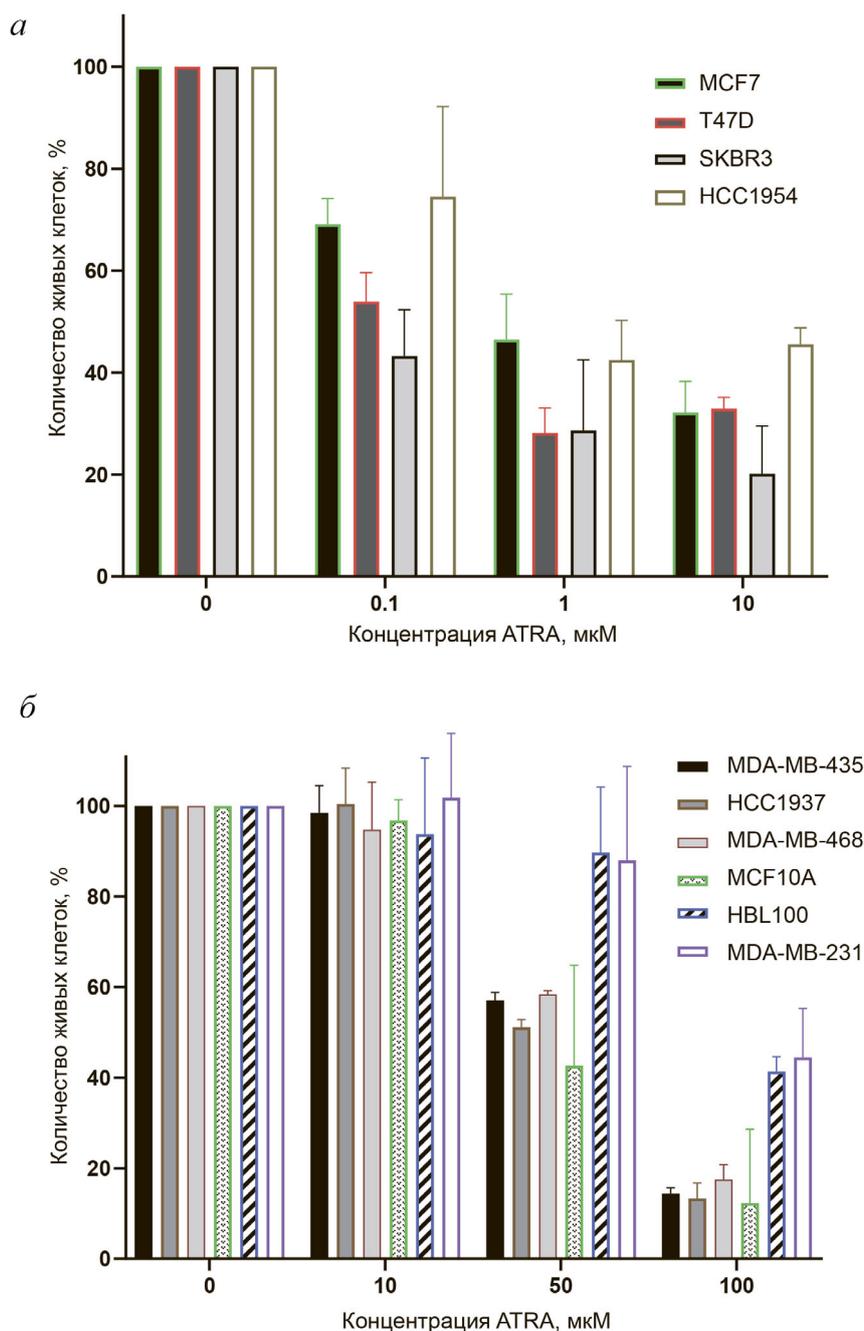
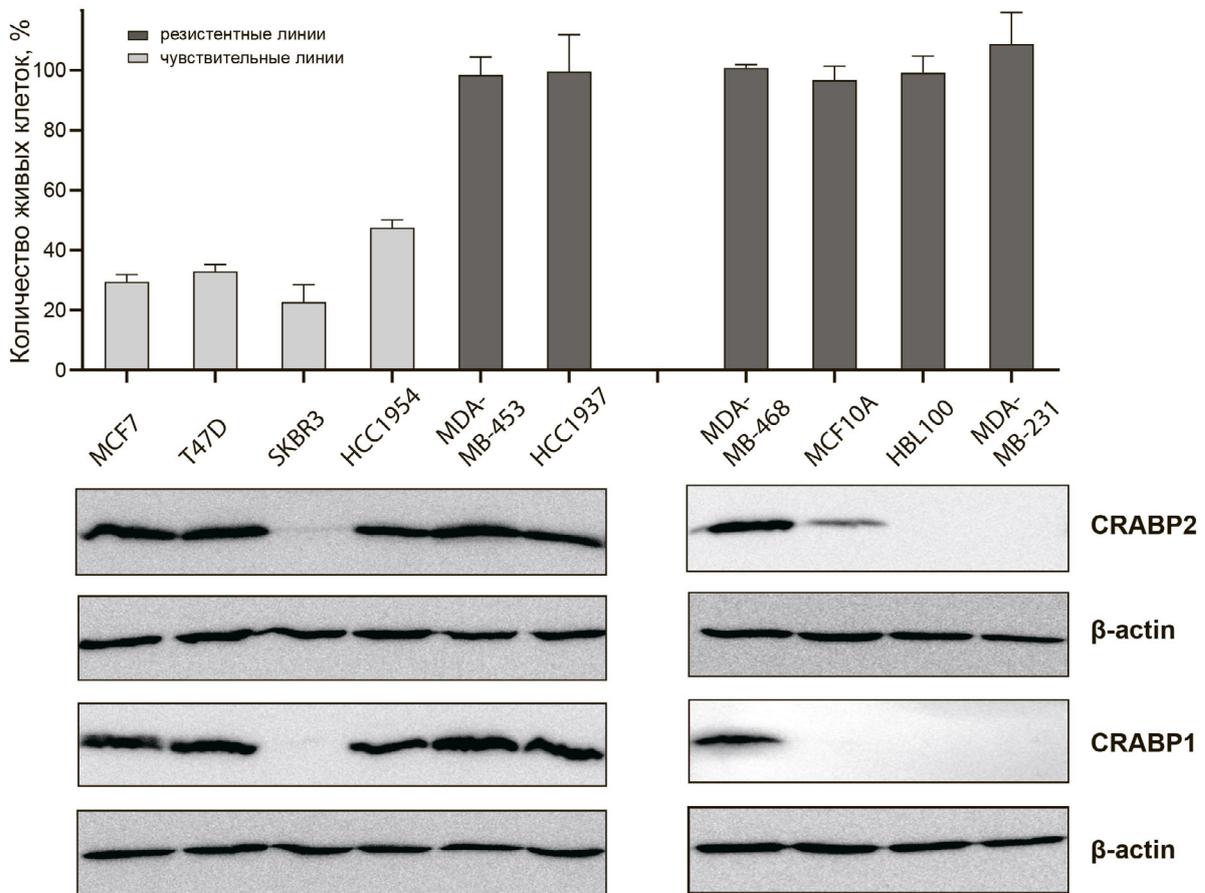


Рис. 2. Сравнение динамики пролиферации клеток РМЖ при инкубации с АТРА. Указан процент живых клеток после 5 сут культивирования в присутствии АТРА в различных концентрациях по сравнению с контролем. Контроль: за 100% взято количество живых клеток каждой линии после культивирования в течение того же времени в стандартной среде DMEM с добавлением ДМСО в концентрациях, соответствующих таковым при разведении АТРА. *а* – РК-чувствительные линии демонстрировали снижение пролиферации (падение $\geq 50\%$ по сравнению с контролем) при концентрации АТРА 0,1–10 мкМ; *б* – РК-резистентные линии демонстрировали снижение пролиферации при концентрации АТРА от 50 мкМ и выше. Диаграммы построены на основании средних значений для трех независимых повторов эксперимента

ствовала, а в РК-резистентных линиях MDA-MB-453, MDA-MB-468 и HCC1937 регистрировался высокий уровень данного белка (рис. 3, *а*).

Тем не менее стоит отметить, что в наиболее устойчивых линиях MDA-MB-231 и HBL100, пролиферация которых значительно не снижалась даже при концентрации АТРА 50 мкМ, продук-

а



б

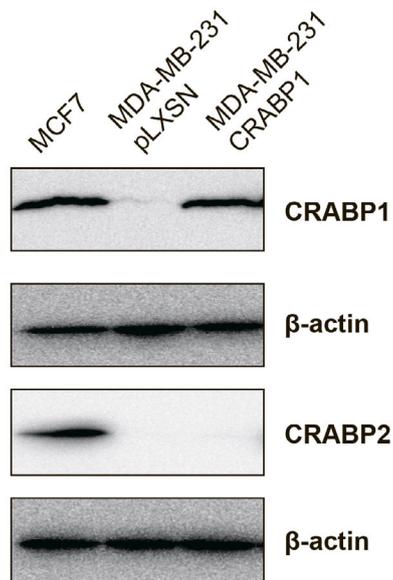


Рис. 3. Сравнение продукции белков CRABP1 и CRABP2 в линиях РМЖ с различной РК-чувствительностью. *а* – Процент живых клеток каждой линии по сравнению с соответствующим контролем (взят за 100%) при инкубации с АТРА в концентрации 10 мкМ и результаты иммуноблоттинга тех же линий; *б* – для подтверждения специфичности антител в отношении белков CRABP1 и CRABP2 приведены данные полученных производных сублиний клеток MDA-MB-231 с гиперэкспрессией CRABP1 (MDA-MB-231 CRABP1) и экспрессией вектора без вставки (MDA-MB-231 pLXSN)

ция CRABP1 отсутствовала. Таким образом, для клеток РМЖ РК-чувствительность либо не связана с экспрессией CRABP1, либо определяется совокупностью факторов, в числе которых может быть статус рецепторов ER, PR, HER2/neu и другие характеристики. В то же время полученные данные на линиях клеток РМЖ подтвердили нашу гипотезу о корреляции уровня белков CRABP1 и CRABP2. Так, во всех без исключения линиях с выраженной экспрессией CRABP2 продукция CRABP1 также была представлена на высоком уровне; в линиях, где продукция CRABP2 значительно снижена, CRABP1 почти не детектировался; в линиях с отсутствием CRABP2 также не детектировался и CRABP1. Мы провели дополнительную проверку специфичности работы антител, для чего трансдуцировали кодирующую последовательность *CRABP1* в линию MDA-MB-231, где отсутствовала эндогенная экспрессия данного белка. Как видно на рис. 3, б, гиперэкспрессия CRABP1 в производной сублинии MDA-MB-231-CRABP1 хорошо детектируется антителами к данному белку, но не сопровождается увеличением экспрессии CRABP2, что свидетельствует, в частности, об избирательности антител в отношении данных белков.

С учетом результатов анализа белков CRABP в клетках отличного от РМЖ происхождения, полученные результаты свидетельствуют об универсальности обнаруженной нами корреляции между экспрессией белков CRABP1 и CRABP2, что предполагает наличие регуляторной зависимости между данными белками. Важно отметить, что отсутствие CRABP1 наблюдалось при снижении CRABP2, но не наоборот — не было примеров сниженной продукции CRABP1 и отсутствия CRABP2. Также важно, что гиперэкспрессия CRABP1 в обоих случаях (в линиях H460 и MDA-MB-231) не приводила к изменению экспрессии CRABP2. Поэтому мы предположили, что в данной паре белков CRABP2, вероятно, является регулятором CRABP1.

Для проверки этого предположения мы подавили эндогенную экспрессию CRABP2 в 4-х линиях РМЖ с различным уровнем РК-чувствительности: РК-чувствительных линиях MCF7 и T47D и РК-резистентных линиях MDA-MB-453 и MDA-MB-468. Нокдаун проводили методом РНК-интерференции с помощью экспрессии предшественников малых шпилечных РНК (shRNA) к гену *CRABP2*. Две последовательности shRNA (*sh1CRABP2* и *sh2CRABP2*) были клонированы в вектор pLKO.1 puro и трансдуцированы в клетки методом лентивирусной инфекции с последующим отбором произ-

водных сублиний на пурамицине. Эффективность обеих шпилечных конструкций оказалась высокой. По данным денситометрического анализа результатов иммуоблоттинга, снижение продукции CRABP2 по сравнению с контрольными линиями, экспрессирующими последовательности shRNA к зеленому флуоресцентному белку (shGFP), в разных линиях варьировала от 1,6 до 10 раз для *sh1CRABP2* и от 2,5 до 10 раз для *sh2CRABP2* (рис. 4). Анализ продукции белка CRABP1 в производных сублиниях показал значительное снижение во всех клетках с нокдауном гена *CRABP2* (рис. 4) по сравнению с соответствующими контролями. Это означает, что уровень CRABP1 регулируется белком CRABP2.

Таким образом, мы впервые выявили наличие строгой корреляции между экспрессией белков CRABP1 и CRABP2 и показали механизм, при котором белок CRABP2 является вышестоящим регулятором (upstream regulator) экспрессии CRABP1. Универсальность обнаруженного феномена свидетельствует о его биологической значимости. CRABP2-зависимая регуляция продукции CRABP1 является дополнительным механизмом реализации внутриклеточной активности ретиноевой кислоты.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Формирование РК-резистентности является одним из основных ограничений применения РК в клинической практике, несмотря на то, что активная разработка ее и других натуральных или синтетических ретиноидов в качестве противоопухолевых препаратов ведется уже в течение долгого времени [28]. Механизмы приобретения устойчивости к РК до сих пор остаются не до конца понятными. Одним из кандидатов на роль «посредника» в формировании РК-резистентности может быть белок CRABP1. Такое предположение основано как на его возможном участии в ограничении биодоступности РК в клетке за счет удержания ее в цитоплазме или даже стимуляции ее катаболизма цитохромом Cyp26A1 [18], так и на данных о метилировании гена *CRABP1* в ряде опухолей [29–33], которые считаются преимущественно РК-резистентными. В то же время по нашим данным, в клетках нейробластомы (классический пример РК-чувствительных опухолей) CRABP1 экспрессируется на высоком уровне, причем его продукция коррелирует с уровнем дифференцировки тканей нейробластомы [34]. Предположительно, CRABP1 может предохранять такие РК-чувствительные клетки от избытка РК. В то же время для ряда опухолей нами [22] и другими авто-

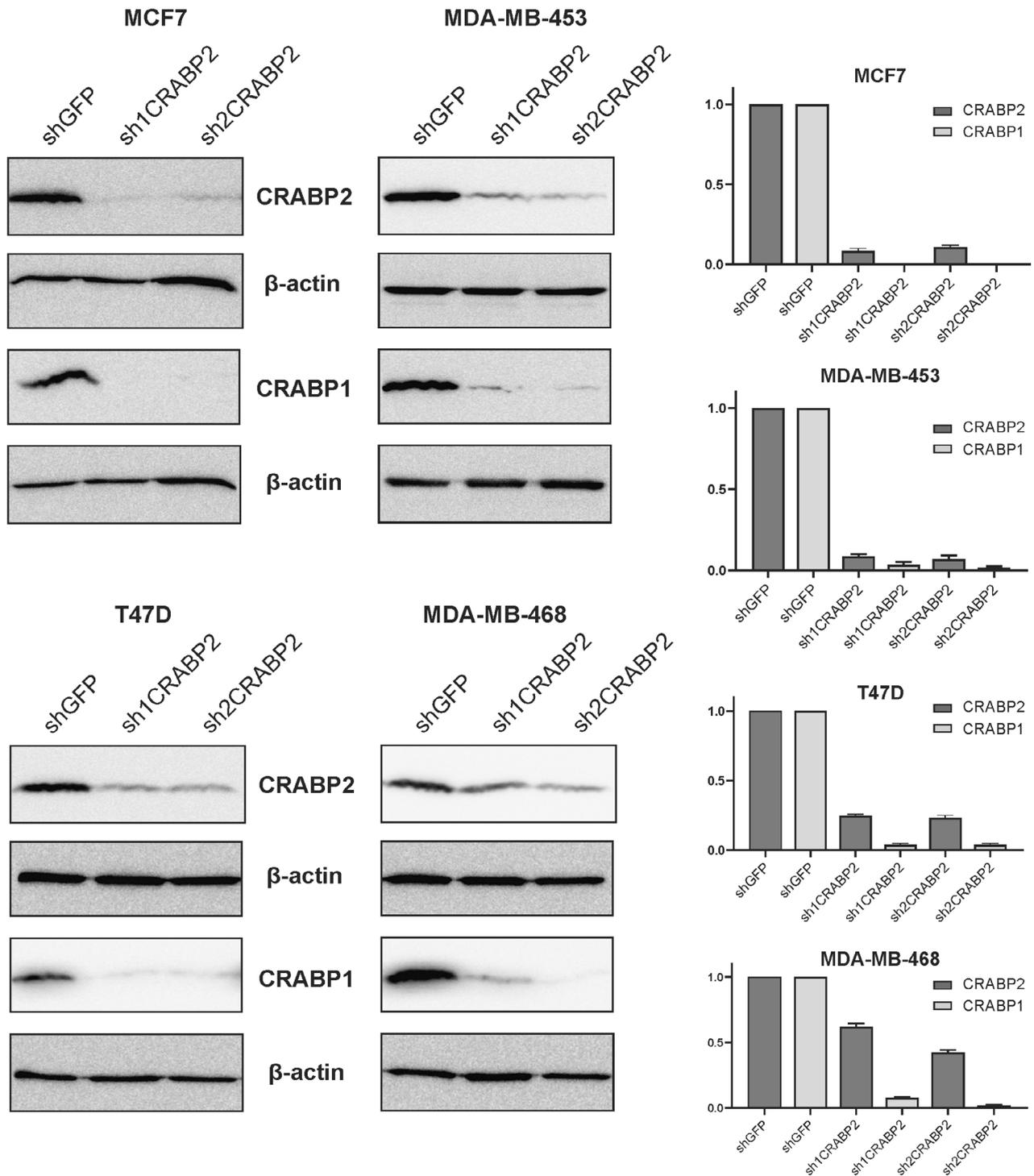


Рис. 4. Влияние нокдауна *CRABP2* на продукцию *CRABP1* в линиях РМЖ. Для анализа использованы производные РК-чувствительных (MCF7, T47D) и РК-резистентных (MDA-MB-453, MDA-MB-468) линий РМЖ, экспрессирующих последовательности малых шпилечных РНК к мРНК *CRABP2* (*sh1CRABP2* и *sh2CRABP2*). В качестве контролей использованы те же линии, экспрессирующие малые шпилечные РНК к зеленому флуоресцентному белку (*shGFP*). Диаграммы построены на основании данных денситометрического подсчета результатов трех независимых повторов эксперимента

рами [11, 12, 35, 36] показана опухоль-промоторная роль *CRABP1*, которая может быть связана с конкурентным ограничением передачи РК белку *CRABP2*, основному «проводнику»

опухоль-супрессорной активности РК, которая осуществляется за счет ее доставки к ядерным рецепторам RAR/RXR и дальнейшей активации транскрипции проапоптотических, пролиффе-

ренцировочных и антипролиферативных генов (рис. 5, а). Иными словами, как опухоль-промоторная, так и опухоль-супрессорная (как в случае нейробластомы) роль CRABP1 может быть связана с его функцией ограничения активности РК. Возможно, именно разной чувствительностью конкретных опухолевых клеток к РК объясняются существенные противоречия в литературных данных относительно функционального значения CRABP1 (опухоль-промоторная или опухоль-супрессорная роль) в канцерогенезе. Косвенным подтверждением участия CRABP1 в формировании РК-резистентности могут служить и данные исследования, в котором была показана связь между экспрессией CRABP1 и рецептор-негативным статусом РМЖ [15], который, в свою очередь, часто связан с РК-резистентностью данного типа опухолей [37–39]. Мы предположили, что CRABP1 может способствовать приобретению РК-резистентности изначально РК-чувствительных клеток, ограничивая активность РК в отношении регуляции транскрипции РК-зависимых генов. В РК-резистентных клетках такие ограничения становятся «ненужными», что может приводить к метилированию гена *CRABP1*. В нашей работе мы впервые провели сравнение экспрессии CRABP1 в клеточных линиях опухолей различного происхождения и обнаружили, что в линиях клеток опухолей, считающихся РК-резистентными (три линии НМРЛ, две линии глиобластомы, три линии рака яичников), продукция CRABP1 отсутствует, в то время как в РК-чувствительных клетках (все три линии нейробластомы) данный белок детектируется на достаточно высоком уровне. РМЖ является крайне гетерогенным типом опухолей, как по морфологии, так и по молекулярным характеристикам, включая чувствительность к РК. Для того, чтобы понять, действительно ли существует прямая корреляция между экспрессией CRABP1 и РК-чувствительностью, мы провели анализ влияния РК на динамику пролиферации 9-ти линий РМЖ и обнаружили широкий спектр реакции на АТРА, при этом линии хорошо разделялись на те, у которых значительно (в 2 и более раз) снижалась пролиферация уже при концентрации АТРА 1–10 мкМ (РК-чувствительные), и те, пролиферация которых не менялась при концентрации АТРА 10–20 мкМ (РК-резистентные). Сравнение продукции CRABP1 в этих линиях не выявило корреляции с чувствительностью к РК, хотя следует отметить, что в максимально РК-резистентных линиях, пролиферация которых не менялась при инкубации с АТРА даже в концентрации 50 мкМ, продукция CRABP1 отсутствовала.

РК-чувствительные клетки РМЖ были CRABP1-позитивными за исключением линии SKBR3. Такие неоднозначные результаты не позволяют сделать четкий вывод об участии CRABP1 в формировании устойчивости клеток к РК прежде всего потому, что механизмов РК-резистентности может быть много, о чем свидетельствуют и данные литературы [40]. Также важно учитывать упомянутую гетерогенность рака молочной железы, развитие резистентности которого к РК может проходить по разным молекулярным сценариям [41].

Наиболее интересным результатом данного исследования можно считать обнаруженную 100%-ную корреляцию между экспрессией CRABP2 и CRABP1. Следует подчеркнуть, что этот феномен был подтвержден на всех типах опухолевых клеток вне зависимости от их происхождения и РК-чувствительности, что свидетельствует о его биологической значимости. На основании полученных данных мы предположили, что продукция белков CRABP1 и CRABP2 является функционально связанной, причем вышестоящим регулятором является, по-видимому, CRABP2. Ранее исследований этого вопроса не проводилось. Данные единственной работы, в которой анализировались уровни экспрессии и функциональное значение обоих белков CRABP, свидетельствуют скорее о «конкуренстных взаимоотношениях» между белками CRABP1 и CRABP2. Авторы статьи предполагают, что CRABP1 ограничивает функцию CRABP2 в отношении реализации ядерной активности РК за счет удержания ее в цитоплазме [15]. Однако речь идет о функциональной конкуренции, а не о регуляции количества белка. В этом контексте представляют интерес наши ранее опубликованные данные о корреляции между экспрессией CRABP1 и CRABP2 в образцах тканей аденокарциномы легкого. Корреляция была обнаружена нами как на уровне мРНК, так и на уровне белковой продукции, причем максимальное значение коэффициента корреляции Спирмена было характерно для высоко- или умеренно дифференцированных опухолей, в то время как в низкодифференцированных опухолях корреляция отсутствовала [21]. Эти данные косвенно указывают на регуляторную связь между белками CRABP1 и CRABP2 и предполагают наличие некоего регуляторного механизма, который, по-видимому, утрачивается в ходе опухолевой прогрессии и дедифференцировки клеток.

Настоящее исследование подтвердило наличие такой регуляции, а также показало, что CRABP2 является регулятором продукции CRABP1. Как может осуществляться CRABP2-

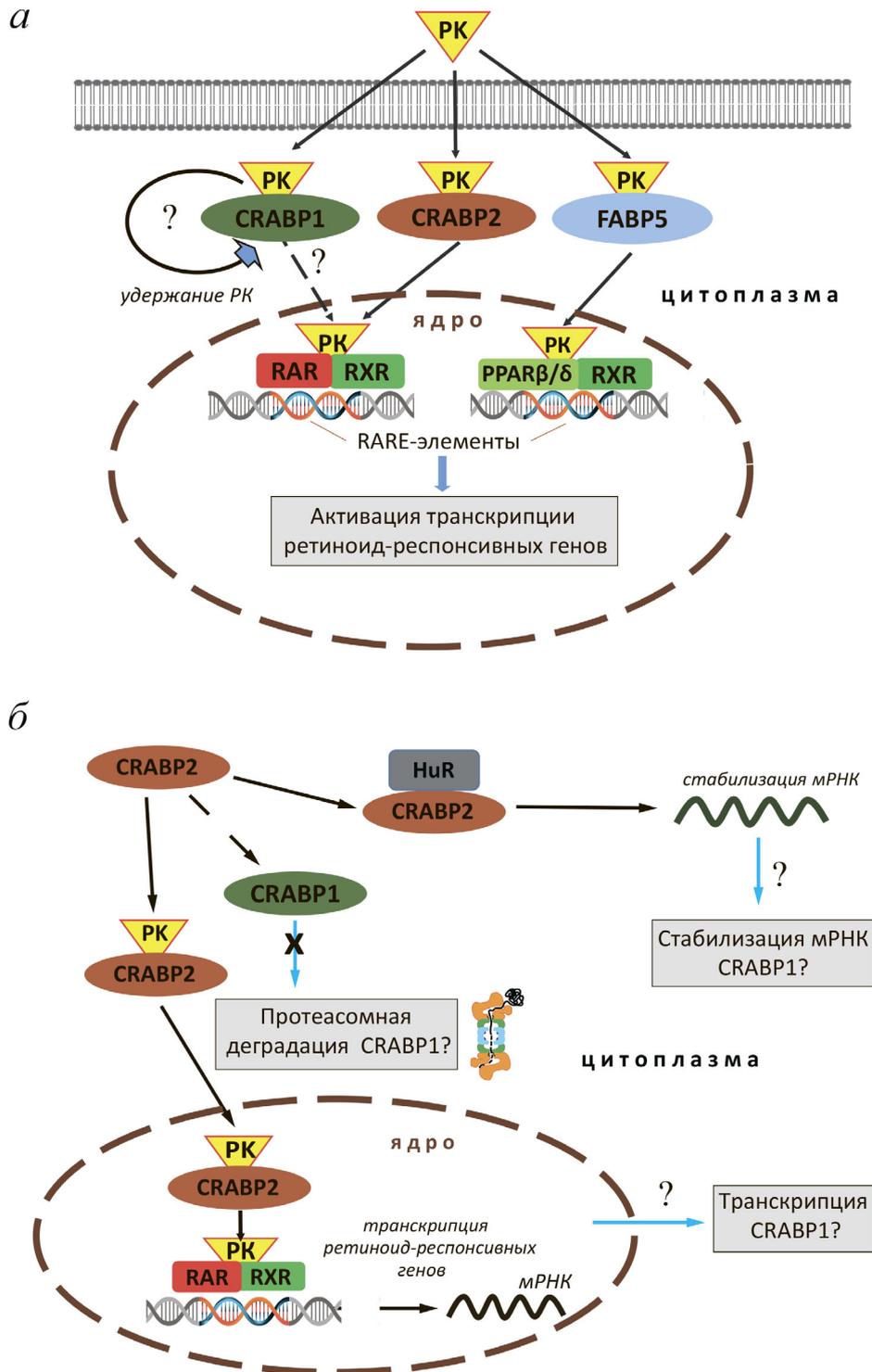


Рис. 5. Возможные механизмы влияния CRABP2 на внутриклеточный уровень белка CRABP1. *а* – Схема реализации функциональной активности PK. Белок CRABP2 обеспечивает транспортировку PK в ядро и передачу ее ядерным рецепторам RAR. Белок FABP5 осуществляет доставку PK к ядерному рецептору PPAR β/δ . Формирование комплекса PK с рецепторами в составе гетеродимеров с RXR стимулирует взаимодействие с RARE в промоторах генов, привлечение коактиваторов и активацию транскрипции. Сходная активность, предположительно, имеется и у белка CRABP1, однако, в отличие от CRABP2, он не образует комплекса с рецепторами PK – предполагается, что передаче PK ядерным рецепторам в этом случае предшествует диссоциация комплекса PK–CRABP1; *б* – гипотетическая схема CRABP2-зависимой регуляции продукции CRABP1. Такая регуляция может реализовываться с помощью CRABP2-зависимой активации транскрипции *CRABP1*, CRABP2-зависимой стабилизации мРНК CRABP1 при участии представителей группы Nu-белков (например, HuR), а также возможной негативной регуляции протеолитической деградации CRABP1

зависимая регуляция белка CRABP1? Можно предположить несколько сценариев (рис. 5, б).

Первый вариант предполагает прямую регуляцию экспрессии, когда CRABP2-зависимая доставка РК к ядерным рецепторам приводит к активации транскрипции *CRABP1*, в промоторе которого имеется РК-респонсивный элемент. Помимо трансактивации транскрипции можно предположить наличие механизма CRABP2-зависимой стабилизации транскриптов *CRABP1*. Эта гипотеза основана на показанной в нескольких работах активности CRABP2, не связанной с РК и реализуемой с помощью взаимодействия с представителями группы Ну-белков, относящихся к семейству ELAV (embryonic lethal abnormal vision) РНК-связывающих белков. Основная их функция связана с посттранскрипционной регуляцией экспрессии генов и стабилизацией транскриптов мРНК и некоторых других типов РНК (например, микроРНК) [42]. CRABP2, по-видимому, имеет несколько мишеней из этой группы белков, в частности, белки НуD и НуB [9, 10, 43]. Взаимодействие CRABP2 с Ну-белками приводит к их активации и как результат – к повышению продукции целого ряда регуляторных и сигнальных белков. Интересно, что НуR, в свою очередь, способствует транспортировке CRABP2 в ядро, стимулируя таким образом его активность в отношении дос-

тавки РК к ядерным рецепторам. Можно также предположить, что CRABP2-зависимая регуляция происходит не на уровне транскрипции или посттранскрипционной регуляции мРНК, а реализуется за счет протеолитической деградации CRABP1, активируемой в отсутствие CRABP2. Механизмы регуляции, реализуемые по этому сценарию, показаны для функционально связанных или родственных белков. Характерным примером могут служить белки флотиллин-1 и флотиллин-2, для которых неоднократно показано, что подавление одного из гомологов приводит к снижению уровня другого [44–46]. Все вышеперечисленные возможные механизмы будут исследоваться нами в дальнейшем и способствовать пониманию фундаментальных процессов реализации внутриклеточной активности ретиноевой кислоты.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 19-015-00027А).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Connolly, R. M., Nguyen, N. K., and Sukumar, S. (2013) Molecular pathways: current role and future directions of the retinoic acid pathway in cancer prevention and treatment, *Clin. Cancer Res.*, **19**, 1651-1959, doi: 10.1158/1078-0432.CCR-12-3175.
- Schenk, T., Stengel, S., and Zelent, A. (2014) Unlocking the potential of retinoic acid in anticancer therapy, *Br. J. Cancer*, **111**, 2039-2045, doi: 10.1038/bjc.2014.412.
- Chevkina, E. M., and Favorskaya, I. A. (2015) CRABP proteins – relatives or namesakers? [in Russian], *Uspekhi Mol. Onkol.*, **2**, 6-16, doi: 10.17650/2313-805X.2015.2.2.6-16.
- Tchevkina, E. M. (2017) Retinoic acid binding proteins and cancer: similarity or polarity? *Cancer Ther. Oncol. Int. J.*, **8**, 555733, doi: 10.19080/ctoj.2017.08.555733.
- Sussman, F., and De Lera, A. R. (2005) Ligand recognition by RAR and RXR receptors: binding and selectivity, *J. Med. Chem.*, **48**, 6212-6219, doi: 10.1021/jm050285w.
- Schug, T. T., Berry, D. C., Shaw, N. S., Travis, S. N., and Noy, N. (2007) Opposing effects of retinoic acid on cell growth result from alternate activation of two different nuclear receptors, *Cell*, **129**, 723-733, doi: 10.1016/j.cell.2007.02.050.
- Schug, T. T., Berry, D. C., Toshkov, I. A., Cheng, L., Nikitin, A. Y., and Noy, N. (2008) Overcoming retinoic acid-resistance of mammary carcinomas by diverting retinoic acid from PPAR β / δ to RAR, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **105**, 7546-7551, doi: 10.1073/pnas.0709981105.
- Liu, R. Z., Graham, K., Glubrecht, D. D., Germain, D. R., Mackey, J. R., and Godbout, R. (2011) Association of FABP5 expression with poor survival in triple-negative breast cancer: implication for retinoic acid therapy, *Am. J. Pathol.*, **178**, 997-1008, doi: 10.1016/j.ajpath.2010.11.075.
- Vreeland, A. C., Levi, L., Zhang, W., Berry, D. C., and Noy, N. (2014) Cellular retinoic acid-binding protein 2 inhibits tumor growth by two distinct mechanisms, *J. Biol. Chem.*, **289**, 34065-34073, doi: 10.1074/jbc.M114.604041.
- Vreeland, A. C., Yu, S., Levi, L., de Barros Rossetto, D., and Noy, N. (2014) Transcript stabilization by the RNA-binding protein HuR is regulated by cellular retinoic acid-binding protein 2, *Mol. Cell. Biol.*, **34**, 2135-2146, doi: 10.1128/mcb.00281-14.
- Mallikarjuna, K., Sundaram, C. S., Sharma, Y., Deepa, P. R., Khetan, V., et al. (2010) Comparative proteomic analysis of differentially expressed proteins in primary retinoblastoma tumors, *Proteom. Clin. Appl.*, **4**, 449-463, doi: 10.1002/prca.200900069.
- Liu, R. Z., Li, S., Garcia, E., Glubrecht, D. D., Yin Poon, H., et al. (2016) Association between cytoplasmic CRABP2, altered retinoic acid signaling, and poor prognosis in glioblastoma, *Glia*, **64**, 963-976, doi: 10.1002/glia.22976.
- Dong, D., Ruuska, S. E., Levinthal, D. J., and Noy, N. (1999) Distinct roles for cellular retinoic acid-binding proteins I and II in regulating signaling by retinoic acid, *J. Biol. Chem.*, **274**, 23695-23698, doi: 10.1074/jbc.274.34.23695.
- Blaese, M. A., Santo-Hoeltje, L., and Rodemann, H. P. (2003) CRABP I expression and the mediation of the sensitivity of human tumour cells to retinoic acid and irradiation.

- tion, *Int. J. Radiat. Biol.*, **79**, 981-991, doi: 10.1080/09553000310001632949.
15. Liu, R. Z., Garcia, E., Glubrecht, D. D., Poon, H. Y., Mackey, J. R., and Godbout, R. (2015) CRABP1 is associated with a poor prognosis in breast cancer: adding to the complexity of breast cancer cell response to retinoic acid, *Mol. Cancer*, **14**, 129, doi: 10.1186/s12943-015-0380-7.
 16. Fiorella, P. D., and Napoli, J. L. (1991) Expression of cellular retinoic acid binding protein (CRABP) in *Escherichia coli*. Characterization and evidence that holo-CRABP is a substrate in retinoic acid metabolism, *J. Biol. Chem.*, **266**, 16572-16579.
 17. Boylan, J. F., and Gudas, L. J. (1992) The level of CRABP-I expression influences the amounts and types of all-trans-retinoic acid metabolites in F9 teratocarcinoma stem cells, *J. Biol. Chem.*, **267**, 21486-21491.
 18. Won, J. Y., Nam, E. C., Yoo, S. J., Kwon, H. J., Um, S. J., et al. (2004) The effect of cellular retinoic acid binding protein-I expression on the CYP26-mediated catabolism of all-trans retinoic acid and cell proliferation in head and neck squamous cell carcinoma, *Metab. Clin. Exp.*, **53**, 1007-1012, doi: 10.1016/j.metabol.2003.12.015.
 19. Delektorskaya, V. V., Komel'kov, A. V., Zborovskaya, I. B., Enikeev, A. D., Safronova, V. M., and Chevkina, E. M. (2017) Nuclear localization of cellular retinoic acid-binding protein I (Crabp1) is associated with malignancy level in lung neuroendocrine tumors [in Russian], *Voprosy Onkologii*, **63**, 886-893.
 20. Gaub, M. P., Lutz, Y., Ghyselinck, N. B., Scheuer, I., Pfister, V., et al. (1998) Nuclear detection of cellular retinoic acid binding proteins I and II with new antibodies, *J. Histochem. Cytochem.*, **46**, 1103-1111, doi: 10.1177/002215549804601002.
 21. Favorskaya, I., Kainov, Y., Chemeris, G., Komelkov, A., Zborovskaya, I., and Tchekina, E. (2014) Expression and clinical significance of CRABP1 and CRABP2 in non-small cell lung cancer, *Tumor Biol.*, **35**, 10295-10300, doi: 10.1007/s13277-014-2348-4.
 22. Kainov, Y., Favorskaya, I., Delektorskaya, V., Chemeris, G., Komelkov, A., et al. (2014) CRABP1 provides high malignancy of transformed mesenchymal cells and contributes to the pathogenesis of mesenchymal and neuroendocrine tumors, *Cell Cycle*, **13**, 1530-1539, doi: 10.4161/cc.28475.
 23. Rossetti, S., and Sacchi, N. (2019) 3D mammary epithelial cell models: a goldmine of dcis biomarkers and morphogenetic mechanisms, *Cancers*, **11**, 130, doi: 10.3390/cancers11020130.
 24. Garattini, E., Bolis, M., Garattini, S. K., Fratelli, M., Centritto, F., et al. (2014) Retinoids and breast cancer: from basic studies to the clinic and back again, *Cancer Treat. Rev.*, **40**, 739-749, doi: 10.1016/j.ctrv.2014.01.001.
 25. Coyle, K. M., Dean, C. A., Thomas, M. L., Vidovic, D., Giacomantonio, C. A., et al. (2018) DNA methylation predicts the response of triple-negative breast cancers to all-trans retinoic acid, *Cancers*, **10**, 397, doi: 10.3390/cancers10110397.
 26. Centritto, F., Paroni, G., Bolis, M., Garattini, S. K., Kurosaki, M., et al. (2015) Cellular and molecular determinants of all-trans retinoic acid sensitivity in breast cancer: luminal phenotype and RAR α expression, *EMBO Mol. Med.*, **7**, 950-972, doi: 10.15252/emmm.201404670.
 27. Bolis, M., Garattini, E., Paroni, G., Zanetti, A., Kurosaki, M., et al. (2017) Network-guided modeling allows tumor-type independent prediction of sensitivity to all-trans-retinoic acid, *Ann. Oncology*, **28**, 611-621, doi: 10.1093/annonc/mdw660.
 28. Coyle, K. M., Sultan, M., Thomas, M. L., Vaghar-Kashani, A., and Marcato, P. (2013) Retinoid signaling in cancer and its promise for therapy, *J. Carcinogen. Mutagen.*, doi: 10.4172/2157-2518.s7-006.
 29. Miyake, T., Ueda, Y., Matsuzaki, S., Miyatake, T., Yoshino, K., et al. (2011) CRABP1-reduced expression is associated with poorer prognosis in serous and clear cell ovarian adenocarcinoma, *J. Cancer Res. Clin. Oncol.*, **137**, 715-722, doi: 10.1007/s00432-010-0930-8.
 30. Tanaka, K., Imoto, I., Inoue, J., Kozaki, K., Tsuda, H., et al. (2007) Frequent methylation-associated silencing of a candidate tumor-suppressor, CRABP1, in esophageal squamous-cell carcinoma, *Oncogene*, **26**, 6456-6468, doi: 10.1038/sj.onc.1210459.
 31. Lind, G. E., Kleivi, K., Meling, G. I., Teixeira, M. R., Thiis-Evensen, E., et al. (2006) ADAMTS1, CRABP1, and NR3C1 identified as epigenetically deregulated genes in colorectal tumorigenesis, *Cell. Oncol.*, **28**, 259-272, doi: 10.1155/2006/949506.
 32. Wu, Q., Lothe, R. A., Ahlquist, T., Silins, I., Tropé, C. G., et al. (2007) DNA methylation profiling of ovarian carcinomas and their *in vitro* models identifies HOXA9, HOXB5, SCGB3A1, and CRABP1 as novel targets, *Mol. Cancer*, **6**, 42, doi: 10.1186/1476-4598-6-45.
 33. Wang, F., Yang, Y., Fu, Z., Xu, N., Chen, F., et al. (2014) Differential DNA methylation status between breast carcinomatous and normal tissues, *Biomed. Pharmacother.*, **68**, 699-707, doi: 10.1016/j.biopha.2014.07.014.
 34. Stroganova, A. M., Chemeris, G. Yu., Chevkina, E. M., Senderovich, A., Karseladze, A. I. (2016) CRABP protein I and its role in the process of differentiation neuroblastoma, *Vestnik RONTs im. N. N. Blokhina*, **27**, 157-163.
 35. Bertucci, F., Houlgatte, R., Benziane, A., Granjeaud, S., Adélaïde, J., et al. (2000) Gene expression profiling of primary breast carcinomas using arrays of candidate genes, *Hum. Mol. Genet.*, **9**, 2981-2991, doi: 10.1093/hmg/9.20.2981.
 36. Tsibris, J. C. M., Segars, J., Coppola, D., Mane, S., Wilbanks, G. D., et al. (2002) Insights from gene arrays on the development and growth regulation of uterine leiomyomata, *Fertil. Steril.*, **78**, 114-121, doi: 10.1016/S0015-0282(02)03191-6.
 37. Fontana, J. A. (1992) Responses to retinoic acid of tamoxifen-sensitive and -resistant sublines of human breast cancer cell line MCF-7, *Cancer Res.*, **52**, 6164-6167.
 38. Fontana, J. A. (1987) Interaction of retinoids and tamoxifen on the inhibition of human mammary carcinoma cell proliferation, *Pathobiology*, **55**, 136-144, doi: 10.1159/000163409.
 39. Van der Leede, B. J. M., Folkers, G. E., van den Brink, C. E., van der Saag, P. T., and van der Burg, B. (1995) Retinoic acid receptor α 1 isoform is induced by estradiol and confers retinoic acid sensitivity in human breast cancer cells, *Mol. Cell. Endocrinol.*, **109**, 77-86, doi: 10.1016/0303-7207(95)03487-R.
 40. Chlapek, P., Slavikova, V., Mazanek, P., Sterba, J., and Veselska, R. (2018) Why differentiation therapy sometimes fails: Molecular mechanisms of resistance to retinoids, *Int. J. Mol. Sci.*, **19**, 132, doi: 10.3390/ijms19010132.
 41. Tari, A. M., Lim, S. J., Hung, M. C., Esteva, F. J., and Lopez-Berestein, G. (2002) Her2/neu induces all-trans retinoic acid (ATRA) resistance in breast cancer cells, *Oncogene*, **21**, 5224-5232, doi: 10.1038/sj.onc.1205660.
 42. Wang, J., Guo, Y., Chu, H., Guan, Y., Bi, J., and Wang, B. (2013) Multiple functions of the RNA-binding protein HuR in cancer progression, treatment responses and prognosis, *Int. J. Mol. Sci.*, **14**, 10015-10041, doi: 10.3390/ijms140510015.
 43. Gupta, A., Williams, B. R. G., Hanash, S. M., and Rawwas, J. (2006) Cellular retinoic acid-binding protein II is a direct transcriptional target of MycN in neuroblas-

- toma, *Cancer Res.*, **66**, 8100-8108, doi: 10.1158/0008-5472.CAN-05-4519.
44. Babuke, T., Ruonala, M., Meister, M., Amaddii, M., Genzler, C., Esposito, A., and Tikkanen, R. (2009) Hetero-oligomerization of reggie-1/flotillin-2 and reggie-2/flotillin-1 is required for their endocytosis, *Cell. Signal.*, **21**, 1287-1297, doi: 10.1016/j.cellsig.2009.03.012.
45. Frick, M., Bright, N. A., Riento, K., Bray, A., Merrified, C., and Nichols, B. J. (2007) Coassembly of flotillins induces formation of membrane microdomains, membrane curvature, and vesicle budding, *Curr. Biol.*, **17**, 1151-1156, doi: 10.1016/j.cub.2007.05.078.
46. Solis, G. P., Hoegg, M., Munderloh, C., Schrock, Y., Malaga-Trillo, E., Rivera-Milla, E., and Stuermer, C. A. O. (2007) Reggie/flotillin proteins are organized into stable tetramers in membrane microdomains, *Biochem. J.*, **403**, 313-322, doi: 10.1042/BJ20061686.

CRABP1 AND CRABP2 PROTEIN LEVELS DO NOT CORRELATE WITH THE SENSITIVITY OF BREAST CANCER CELLS TO RETINOIC ACID, BUT CORRELATE WITH EACH OTHER WITH CRABP2 BEING AN UPSTREAM REGULATOR OF CRABP1 PRODUCTION*

A. D. Enikeev, A. V. Komelkov, M. E. Axelrod, S. A. Galetsky, S. A. Kuzmichev, and E. M. Tchevkina**

Blokhin National Medical Research Center of Oncology, 115478 Moscow, Russia; E-mail: komelkov@gmail.com

Retinoic acid (RA) binding proteins, CRABP1 and CRABP2, are molecular chaperones that mediate intracellular activity of RA, the key promoter of cell differentiation with tumor suppressor activity. One of the main functions of CRABP2 is delivery and transfer of RA to the nuclear receptors RAR/RXR, which leads to activation of the transcription of a wide range of retinoid-responsive genes. The functions of CRABP1 are less studied but are apparently associated with sequestration of RA in cytoplasm and limitation of its transcriptional activity, suggesting involvement of this protein in the development of RA resistance. The mechanisms regulating activity of CRABP1 are also poorly understood. Comparison of the CRABP1 level in tumor cell lines of various origins, performed for the first time here, showed absence of the CRABP1 protein in the cell lines of tumors considered to be RA-resistant, and pronounced production of this protein in the RA-sensitive cells. However, analysis carried out with a panel of breast cancer cell lines with different levels of RA-sensitivity showed that there was no correlation between the production of CRABP1 protein and the sensitivity of the cells to RA. At the same time, we found strong correlation between the expression of CRABP1 and CRABP2 proteins in all studied cell types, regardless of their origin and RA-sensitivity/resistance. Moreover, suppression of the CRABP1 level in both RA-sensitive and RA-resistant cells was shown in the cells with cells with knockdown of *CRABP2* gene. The revealed CRABP2-dependent regulation of CRABP1 production is a new mechanism of the intracellular retinoic signaling system.

Keywords: retinoic acid, retinoic acid binding proteins, ATRA, CRABP1, CRABP2, proliferation, expression regulation

УДК 578.32;578.865;539.26

СТРУКТУРА ВИРИОНОВ А-ВИРУСА КАРТОФЕЛЯ ПО ДАННЫМ МАЛОУГЛОВОГО РЕНТГЕНОВСКОГО РАССЕЯНИЯ И КОМПЛЕМЕНТАРНЫХ МЕТОДОВ*

© 2021 Э.В. Штыкова¹, М.В. Петухов¹, Н.В. Федорова², А.М. Арутюнян²,
Е.В. Скурат³, Л.В. Кордюкова², А.В. Моисеенко³, А.Л. Ксенофонтов^{2**}

¹ Институт кристаллографии им. А.В. Шубникова Федерального научно-исследовательского центра
«Кристаллография и фотоника» Российской академии наук, 119333 Москва, Россия;
электронная почта: shtykova@ns.crys.ras.ru

² НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет
им. М.В. Ломоносова, 119991 Москва, Россия; электронная почта: ksefon@belozersky.msu.ru

³ Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова,
биологический факультет, 119991 Москва, Россия

Поступила в редакцию 26.08.2020

После доработки 27.09.2020

Принята к публикации 27.09.2020

Белки оболочки вирионов А-вируса картофеля содержат на своей поверхности частично неупорядоченные *N*-концевые домены, структурные и функциональные характеристики которых важны для понимания механизма инфицирования растений этим вирусом. В настоящей работе исследованы свойства и строение интактных А-вирусов картофеля и частично деградированных трипсином вирионов (АВКΔ32) с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния и комплементарных методов. Было показано, что при удалении 32 *N*-концевых аминокислот белка оболочки вирион не разрушается и остается компактным, но изменяется шаг спиральной упаковки его белковой оболочки. Для определения природы этих изменений по данным малоуглового рентгеновского рассеяния, было проведено *ab initio*, в том числе многофазное, моделирование геометрическими телами (спиралями) и восстановление структуры А-вируса картофеля в растворе с использованием доступных структур атомного разрешения, схожего с белками оболочки А-вируса картофеля – белка потивируса Y-вируса картофеля. В результате впервые была получена структура низкого разрешения нитевидного А-вируса картофеля, интактного и частично деградированного, в условиях, близких к естественным. Дополнительные исследования показали, что спектры кругового дихроизма в дальнем УФ образцов А-вируса картофеля и АВКΔ32 значительно различались по амплитуде и по положению основного отрицательного максимума. Степень термической денатурации данных образцов в диапазоне температур 20–55 °С также была различной. Данные просвечивающей электронной микроскопии показали, что вирионы АВКΔ32 представляли собой преимущественно палочковидные частицы, в отличие от гибких, характерных для интактного вируса, что хорошо коррелирует с результатами малоуглового рассеяния. В целом, проведенный структурный анализ свидетельствует о значении *N*-концевых доменов белка оболочки для выполнения жизненно важных функций А-вируса картофеля, что следует учитывать для выработки стратегии по борьбе с этими растительными патогенами.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: потивирусы, белок оболочки, А-вирус картофеля, *N*-концевые неупорядоченные домены, малоугловое рентгеновское рассеяние, структурное моделирование.

DOI: 10.31857/S0320972521020111

ВВЕДЕНИЕ

Потивирусы представляют собой экономически важную группу вирусов растений, приносящих значительный урон сельскому хозяйству. Гибкие нитевидные вирионы потивирусов имеют спиральную симметрию со средней длиной

частиц 700 нм и диаметром 11–14 нм. С помощью различных предсказательных и экспериментальных подходов было обнаружено, что белок оболочки (БО) А-вируса картофеля (АВК), типичного представителя потивирусов, имел значительное содержание неупорядоченных участков [1]. Позднее методом криоэлектрон-

Принятые сокращения: АВК – А-вирус картофеля; БО – белок оболочки; МУРР – малоугловое рентгеновское рассеяние; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия.

* Первоначально английский вариант рукописи опубликован на сайте «Biochemistry» (Moscow) <http://protein.bio.msu.ru/biokhimiya>, в рубрике «Papers in Press», ВМ20-293, 11.01.2021.

** Адресат для корреспонденции.

ной микроскопии это было прямо подтверждено для других представителей потивирусов: вируса мозаики арбуза (ВМА) [2], Y-вируса картофеля (YVK) [3] и вируса мозаики турнепса (ВМТу) [4]. Было показано, что неупорядоченные фрагменты N-концевых доменов БО потивирусов расположены на поверхности вирионов и взаимодействуют с соседними субъединицами. В настоящее время общепринята концепция, что неструктурированные области белковой молекулы играют ключевую роль в различных биохимических процессах [5]. Ранее мы наблюдали участие N-доменов белка АВК в процессе сборки вирусоподобных частиц (ВПЧ): было показано, что субъединицы этого белка не существуют в индивидуальном виде в растворе, а часть его неупорядоченных сегментов трансформируется в β -структуры [6, 7]. Мягкая трипсиновая обработка интактных вирионов потивирусов приводит к образованию устойчивых деградированных частиц, лишенных N-концевого домена [8]. Для выяснения роли N-доменов потивирусов в ряде работ изучали процесс сборки ВПЧ из укороченных мутантных БО. Обнаружили, что для некоторых представителей потивирусов удаление 20–50 N-концевых остатков препятствовало процессу сборки ВПЧ [9, 10], тогда как для белка YVK этого не происходит [3]. В то же время у БО вируса гравировки табака (ВГТ) сборка нарушалась лишь при удалении 120 аминокислотных остатков [11]. Показана также роль N-доменов потивирусов в межклеточном транспорте вирионов и в процессе переноса их тлями [10].

В настоящее время отсутствует структура АВК высокого разрешения. В данной работе мы впервые детально охарактеризовали структуру вириона АВК, выполнив моделирование интактных и деградированных трипсином вирионов по данным синхротронного малоуглового рентгеновского рассеяния (МУРР). Этот структурный метод с разрешением порядка 1–2 нм, то есть метод низкого разрешения, используется для изучения строения биологических макромолекул в растворе, в условиях близких к естественным [12]. В последние десятилетия МУРР активно развивался благодаря появлению новых методов анализа и интерпретации данных малоуглового рассеяния и компьютерного моделирования структуры [13]. Ранее нами с помощью МУРР были охарактеризованы вирусоподобные частицы АВК, собранные из выделенного свободного белка, и изучена их структура и диссоциация в различных водно-солевых растворах [7, 8]. Недавно данным методом мы исследовали и определили структуры с низким разрешением палочковидного спирального ви-

риона вируса табачной мозаики (ВТМ) и стабильных реполимеров БО ВТМ, так называемых «стопок дисков» [14]. В настоящей работе обнаруженные нами различия в структурных характеристиках интактных АВК и частично деградированных вирионов АВК Δ 32 были соотношены с найденными различиями их оптических свойств. Полученные результаты свидетельствуют не только о значении N-концевых доменов БО для выполнения жизненно важных функций АВК, но могут также способствовать выработке стратегии по борьбе с вирусными заболеваниями растений, поскольку разупорядоченная N-концевая область белка оболочки является возможной мишенью для дезактивации вируса.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Получение препаратов интактных и деградированных вирионов АВК. Изолят В11 вириона АВК очищен, как описано ранее [8]. Коротко, молодые растения *N. benthamiana* были заражены препаратом вируса АВК. На 18–21 день после заражения листья с вирусными симптомами были гомогенизированы в блендере Waring в трех объемах 50 мМ фосфатного буфера pH 7,8 с добавлением 0,01%-ного β -меркаптоэтанола. После низкоскоростного центрифугирования (НСЦ) (8 000 g, 8 °C, 20 мин) супернатант перемешивали в течение 1 ч при 4 °C с Тритоном X-100 (1% по объему); после НСЦ к супернатанту добавляли 1/5 объема хлороформа. Водную фазу отделяли НСЦ в тех же условиях. К смеси добавляли полиэтиленгликоль 6000 до 5% с добавлением 1,2% NaCl, смесь перемешивали при температуре 4 °C в течение 1,5 ч. Осадок осаждали с помощью НСЦ (12 000 g, 8 °C, 20 мин). Осадок, содержащий вирус, растворяли в 50 мМ фосфатном буфере pH 7,8 с добавлением 0,1 мМ фенилметилсульфонил фторида. Далее препарат подвергали высокоскоростному центрифугированию на ультрацентрифуге (100 000 g, 5 °C, 1,5 ч). Осадок вируса ресуспендировали в 50 мМ фосфатном буфере при pH 7,8.

Для получения деградированных вирионов АВК Δ 32 препарат интактного вируса обрабатывали трипсином в соотношении фермент/субстрат 1 : 500, 15 мин инкубировали при комнатной температуре, для остановки реакции добавляли фенилметилсульфонил фторид до концентрации 1 мМ. Контроль чистоты образцов осуществляли с помощью электрофореза с додецилсульфатом натрия (SDS) по методу Лэммли [15], используя 15%-ный полиакриламидный

гель (ПААГ) в Mini-PROTEAN 3 Cell («Bio-Rad», США). Гели окрашивали 0,22%-ным Ку-масси G-250 («Serva», Германия).

Определение концентрации препаратов. Концентрацию определяли на спектрофотометре UV-2600 («Hitachi», Япония), используя спектры поглощения в УФ-диапазоне 240–340 нм. В связи с большим вкладом рассеяния в поглощение вирионов (30–40%), истинные спектры поглощения (E) суспензий частиц вычисляли по методу экстраполяции [16] в области 320–338 нм. Коэффициенты поглощения препаратов вируса принимали равными $E_{260}^{0,1\%} = 2,4$.

Измерение спектров кругового дихроизма. Спектры кругового дихроизма (КД) измеряли в 5 мМ фосфатном буфере pH 7,8 при 20 °C в 1–2 мм кюветах на дихрографе Chirascan («Applied Photophysics», Англия). Концентрация образцов составляла 50–100 мкг/мл. Спектры КД записывали на скорости 0,5–1,0 нм/с в диапазоне 185–250 нм с вычетом базовой линии. Измеренные спектры обрабатывали с использованием стандартного пакета программного обеспечения, поставляемого с прибором. Величины КД выражали в величинах молярной эллиптичности $[\Theta]$ ($[\Theta] = 3\,300 \times \Delta\epsilon$). $\Delta\epsilon$ – Молярный коэффициент дихроичного поглощения для препаратов белка, рассчитывали на моль аминокислотных остатков. Расчет проводили по формуле $\Delta\epsilon = \Delta D / (c \times l)$, где ΔD – измеренная величина дихроизма, c – концентрация белка (в молях аминокислотных остатков), l – длина оптического пути в сантиметрах. Среднюю молярную массу аминокислотного остатка принимали равной 110 г/моль. Для термического анализа каждый препарат нагревали в кюветном отделении дихрографа от 20 до 70 °C со скоростью 1 °C в минуту. Регистрацию каждого нового спектра начинали после увеличения температуры на 5 °C. Измеренные спектры обрабатывали как описано выше.

Просвечивающая электронная микроскопия. Исследования проводились с помощью электронного микроскопа JEM-2100, 200 кВ («JEOL», Япония), оснащенного источником электронов LaB6 на оборудовании Уникальной научной установки «3D-ЭМС» МГУ (идентификатор RFMEFI61919X0014). Снимки были сделаны с помощью CCD-камеры Gatan Ultrascan 1000XP 2k («Gatan», США) при параллельном освещении и расфокусировке в диапазоне 1–2 мкм. Изображения были получены и обработаны с помощью программного обеспечения Gatan DigitalMicrograph.

Эксперимент и анализ данных МУРР. Исследования структуры белка с помощью малоуглового рентгеновского рассеяния были проведены

на синхротроне Petra III («DESY», Германия) на линии P12. Эта линия оснащена оборудованием для автоматической смены образцов и двумерным детектором Pilatus 2M («DECTRIS», Швейцария). Интенсивность рассеяния $I(s)$ была измерена в области значений волновых векторов $0,08 < s < 7 \text{ нм}^{-1}$, где $s = (4\pi \sin \theta) / \lambda$ – вектор рассеяния, 2θ – угол рассеяния, $\lambda = 0,124 \text{ нм}$ – длина волны излучения [17]. Для каждого образца было снято по 50 экспериментальных кривых рассеяния для контроля возможных радиационных повреждений. Радиационного повреждения обнаружено не было.

Измерения проводили в 15 мМ фосфатном буфере pH 7,8 с 0,05 М NaCl при температуре 10 °C при нескольких различных концентрациях в диапазоне 2,0–5,0 мг/мл для учета возможной концентрационной зависимости. Зависимость кривых МУРР от концентрации измеряемых образцов не наблюдалась.

Первичная обработка кривых рассеяния была проведена с использованием программы PRIMUS [18]. С помощью этой программы было проведено усреднение экспериментальных кривых рассеяния от образцов и соответствующего буфера, с последующим вычитанием рассеяния буфера из кривых образцов МУРР. Далее для структурного анализа и моделирования использовалась наиболее информативная часть малоугловых кривых в интервале волновых векторов $0,08 < s < 2,7 \text{ нм}^{-1}$.

Оценка неоднозначности восстановления формы для заданного профиля рассеяния проводилась с помощью программы AMBIMETER [19].

Анализ брэгговских пиков на кривых малоуглового рассеяния выполняли с помощью программы PEAK [18]. Размер области кристалличности L определялся из полуширины максимума интенсивности первого брэгговского пика в угол $2\theta_1$:

$$L = \frac{\lambda}{\beta_s \cos \theta_1}, \quad (1)$$

и степень разупорядочения в образце Δ/d_1 определялась как:

$$\Delta/d_1 = \frac{1}{\pi} \cdot \sqrt{\frac{\beta_s \cdot d_1}{\lambda}}, \quad (2)$$

где $d_1 = 2\pi/s_1$ – период структуры, межплоскостное расстояние, β_s – полная ширина на полувысоте максимума интенсивности рассеяния (в радианах), наблюдаемого на угле рассеяния $2\theta_1$, соответствующего волновому вектору s_1 , а Δ – среднеквадратичное отклонение от расстояния

между ближайшими регулярно упакованными структурными мотивами.

Для построения функций распределения по расстояниям $p(r)$, которые необходимы для восстановления формы вириона в растворе по данным МУРР, использовалась компьютерная программа GNOM [20]. Функции распределения по расстояниям $p(r)$ определяются с помощью косвенного Фурье-преобразования интенсивности рассеяния в соответствии с интегральным уравнением:

$$p(r) = \frac{1}{2\pi^2} \int_0^\infty srI(s)\sin(sr)ds, \quad (3)$$

где $I(s)$ – интенсивность рассеяния, при этом максимальный размер частицы (D_{max}) находится из условия $p(r) = 0$ при $r > D_{max}$.

Ab initio метод восстановления формы низкого разрешения вириона АВК и был реализован с помощью программы DAMMIN [21], которая использует алгоритм имитации отжига путем минимизации невязки χ^2 с экспериментальными данными

$$\chi^2 = \frac{1}{N-1} \sum_j \left[\frac{I_{exp}(s_j) - cI_{calc}(s_j)}{\sigma(s_j)} \right]^2, \quad (4)$$

где N – число экспериментальных точек, $I_{exp}(s_j)$ и $\sigma(s_j)$ – экспериментальные интенсивности и их ошибки, $I_{calc}(s_j)$ – интенсивность, вычисленная от модели, c – шкалирующий множитель.

В более универсальном подходе *ab initio* модель вируса была получена путем одновременного построения как общей формы, так и структуры отдельных компонентов вириона (белок и РНК). Построение двухкомпонентной (двухфазной) модели проводилось путем приближения кривой МУРР от вирусной частицы с использованием программы MONSA [21]. Программа представляет частицу как коллекцию $N \gg 1$ плотно упакованных шариков внутри объема поиска, заданного пользователем. Для описания общей и внутренней структуры сложной частицы каждый шарик может быть назначен либо принадлежащим растворителю (индекс = 0), либо одной из компонент (в нашем случае индекс = 1 соответствует белку оболочки, индекс = 2 соответствует вирусной РНК). Комплекс между белком и РНК поэтому представлен в низком разрешении двумя «фазами», а структура описывается строкой длиной N , содержащей фазовый индекс для каждого шарика (0, 1 или 2).

Моделирование жесткими телами структуры вирионов АВК проводилось с помощью программы MASSHA [22]. Единичным элементом

моделирования служил фрагмент УВКΔ43 У-вируса картофеля (PDB ID: 6HXX), поскольку первичная последовательность БО АВК и УВК имеют значительное сходство – 64% идентичных и 91% подобных аминокислотных остатков (со схожими физико-химическими свойствами), за исключением N -концевых фрагментов. Теоретическая интенсивность рассеяния построенных моделей рассчитывалась программой CRY SOL [23].

Выравнивание аминокислотных последовательностей. Выравнивание последовательностей представителей рода потивирусов выполнено на сервере ExPASy с использованием алгоритма LALIGN [24]. Количественную оценку сходства последовательностей проводили попарным выравниванием структуры «коровой части» без N -концевых 30–32 остатков.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Электрофоретический анализ препаратов. Белок оболочки АВК обладает аномально низкой электрофоретической подвижностью [1], соответствующей примерно 35 кДа (рис. 1, дорожки 2–4), в то время как его молекулярная масса (M) составляет 30,4 кДа. Возможным объяснением этого феномена является наличие в структуре белка неупорядоченных сегментов. Мягкая обработка трипсином интактных вирионов (в соотношении фермент/субстрат 1 : 500, 15 мин инкубации) приводила к исчезновению полосы исходного белка, и основная доля частиц в этом случае (около 95% общей массы) приходилась

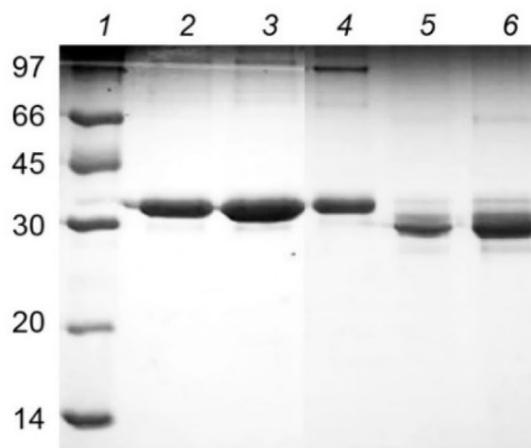


Рис. 1. Электрофоретический анализ интактных вирионов (дорожки 2–4) АВК и продуктов ограниченного трипсинолиза (дорожки 5, 6). Были использованы аликвоты по 1 мкг (4, 5), 5 мкг (2) и 10 мкг (3, 6) на полосу. Молекулярная масса указана рядом с контрольными белками (дорожка 1)

на полосу с $M \sim 27$ кДа (рис. 1, дорожки 5 и 6), что по своему значению соответствует молекулярной массе БО с укороченными N -концевыми фрагментами. Недавно с помощью масс-спектрологии было показано почти полное исчезновение пика $m/z = 30,4$ кДа (исходный БО) и появление мажорного пика 27,12 кДа, соответствующего белку без 32 N -концевых остатков (АВКΔ32) [8]. То есть деградированный трипсином белок АВКΔ32 относительно контрольных белков действительно имеет электрофоретическую подвижность, соответствующую молекулярной массе вириона с укороченными N -последовательностями, что косвенным образом подтверждает их удаление.

Анализ вторичной структуры вирионов по КД-спектрам. Изменения во вторичной структуре белка оболочки АВК после обработки трипсином отслеживались по спектрам кругового дихроизма. Спектр КД препарата интактных вирионов АВК в дальнем УФ характеризуется отрицательным максимумом $[\theta]_{\max}$ при 203 нм (рис. 2, а, кривая 2), хотя известно, что для большинства растительных вирусов этот максимум расположен ~ 208 нм. Предположительно, эта аномалия объясняется необычно высоким содержанием разупорядоченных фрагментов в БО [1]. Насколько нам известно, АВК – это единственный растительный вирус с таким смещением главного отрицательного максимума КД-спектра в дальнем УФ-спектре. В препарате деградированных трипсином вирионов АВКΔ32 мы обнаружили некоторое смещение отрицательного максимума $[\theta]_{\max}$ в сторону к 205 нм, и интенсивность этого максимума была значи-

тельно ниже, чем в спектре интактных вирионов ($-10\ 600^\circ$ и $-25\ 000^\circ$ соответственно). Предположительно, с удалением N -доменов в БО АВКΔ32 снижается содержание неупорядоченных сегментов (рис. 2, а, кривая 1).

Степень термической денатурации также различалась для интактного и деградированного трипсином вирионов АВК (рис. 2, б). Ранее было показано, что плавление интактных вирионов АВК происходит при температуре $T_{\text{пл}} \approx 55^\circ\text{C}$ [1]. В данной работе следили за изменением интенсивности отрицательных максимумов $[\theta]_{\max}$ при нагревании. Для препаратов АВК в диапазоне $20\text{--}55^\circ\text{C}$ наблюдали постепенный рост интенсивности $[\theta]_{\max}$ до $-45\ 000^\circ$ и $-29\ 600^\circ$ у интактного и деградированного АВКΔ32 соответственно (рис. 2, б). Вероятно, белок оболочки АВКΔ32 денатурировал при нагревании в меньшей степени, и вирусные частицы были более упорядоченными, чем интактные вирионы.

Анализ данных МУРР и структурное моделирование. Экспериментальные кривые малоуглового рассеяния от интактных вирионов и от деградированных трипсином вирионов АВКΔ32, представленные на рис. 3 (кривые 1 и 2 соответственно), характеризуются двумя основными особенностями: во-первых, хорошо выраженной зависимостью рассеяния от формы вирионов и, во-вторых, присутствием на каждой кривой малоуглового рассеяния брэгговского пика в области s от $1,5$ до $2,0\ \text{nm}^{-1}$.

Форма вирионов определяется по начальной части кривых МУРР на интервале волновых векторов s от $0,08$ до $1,25\ \text{nm}^{-1}$. В этой области

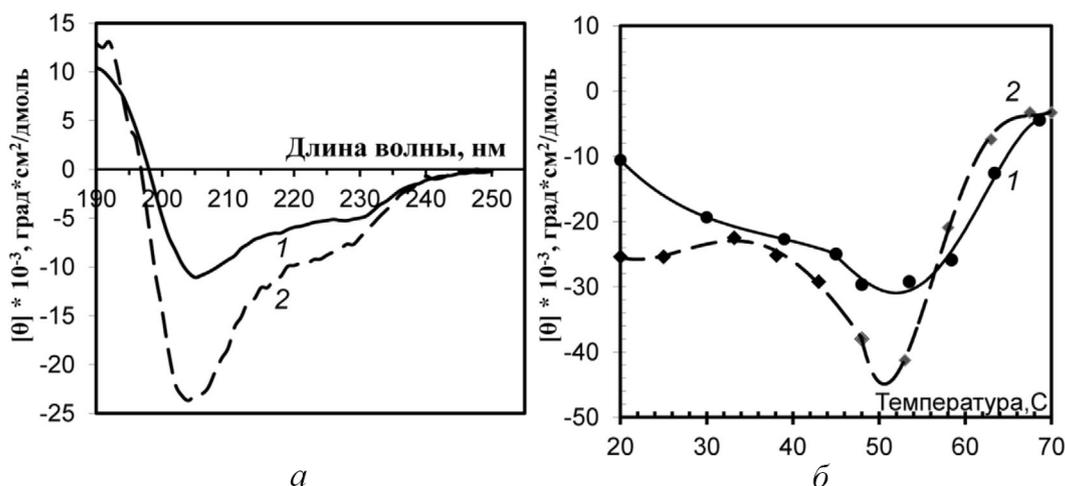


Рис. 2. а – Спектры кругового дихроизма препаратов, деградированных трипсином (1) и интактных (2) вирионов АВК; б – термическая денатурация препаратов АВК, деградированных трипсином (1) и интактных (2), по данным КД-спектров. Приведена температурная зависимость интенсивности отрицательных максимумов $[\theta]_{\max}$

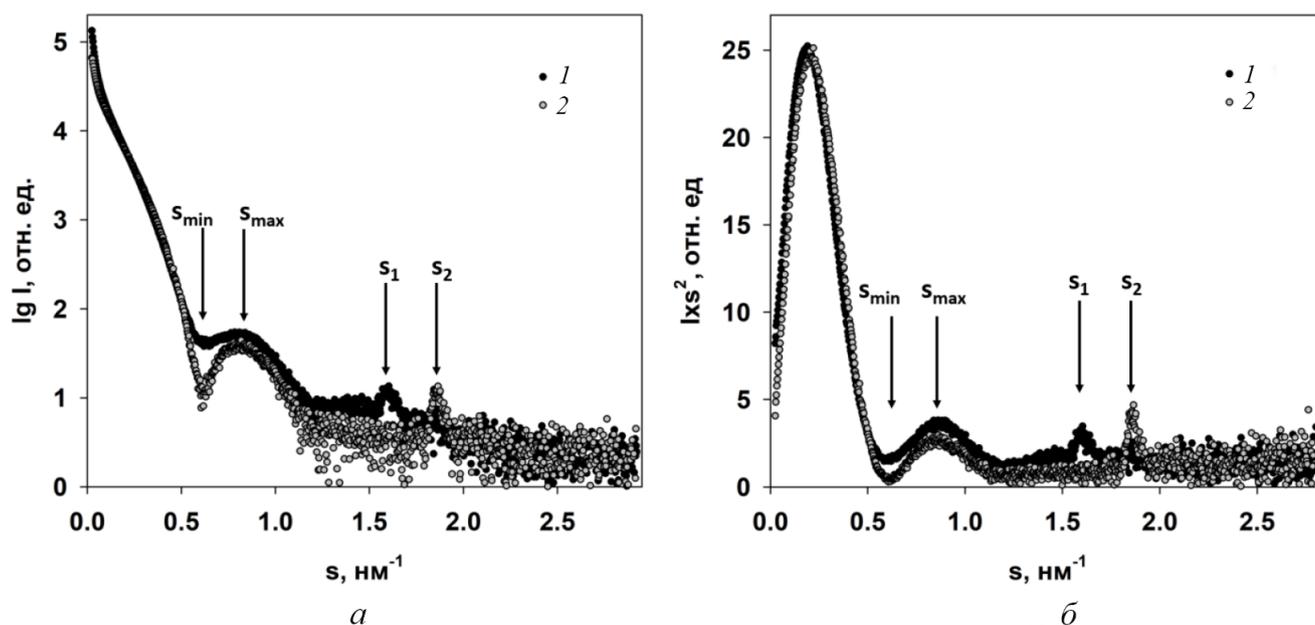


Рис. 3. *а* – Экспериментальные кривые МУРП от intactных (1) и деградированных АВКΔ32 (2) вирионов; *б* – графики Кратки для intactных (1) и деградированных АВКΔ32 (2) вирионов

положение минимума ($s_{min} = 0,61 \pm 0,01 \text{ nm}^{-1}$) и максимума ($s_{max} = 0,81 \pm 0,01 \text{ nm}^{-1}$) обеих кривых совпадает, что свидетельствует о схожести форм intactных вирионов и вирионов АВКΔ32. Однако для intactных вирионов кривая МУРП несколько более сглажена, то есть минимум и максимум менее выражены по сравнению с кривой рассеяния от АВКΔ32. Это объясняется влиянием на кривые МУРП структурного полиморфизма и/или большей полидисперсностью intactных вирионов [25].

В самых малых углах, на интервале волновых векторов s от $0,08$ до $0,25 \text{ nm}^{-1}$, также наблюдается некоторое расхождение кривых МУРП: intactные вирионы имеют несколько большую амплитуду интенсивности рассеяния, что говорит о большем количестве рассеивающего вещества и косвенно подтверждает наличие N -концевых доменов в БО intactных вирионов и отсутствие таковых у АВКΔ32. И, наконец, важным отличием профилей рассеяния является различное положение брэгговских пиков на кривых МУРП от АВК и от АВКΔ32 (рис. 3).

Появление брэгговских пиков свидетельствует об определенном упорядочении в образце. Поскольку рассеяние Брэгга характерно для кристаллов, упорядоченные области называются квази-кристаллическими, и их структурные характеристики определяются из уравнений (1) и (2) (см. «Материалы и методы»). Рассчитанные по этим уравнениям период структуры $d = 2\pi/s$, размеры области кристалличности L и степень разупорядочения в образце Δ/d представлены в таблице.

Из таблицы следует, что вирион с 32 удаленными аминокислотными остатками, АВКΔ32, заметно более структурирован: у него больший размер упорядоченных областей L и меньшая степень разупорядочения Δ/d . Для анализа структуры также важно, что период d , то есть расстояние между периодически повторяющимися элементами структуры, уменьшился на $0,5 \text{ nm}$ при удалении 32 аминокислотных остатков из N -концевых доменов БО. Эти изменения относятся к малым, межмолекулярным размерам, то есть к изменениям внутри белковой обо-

Структурные характеристики intactных вирионов и вирионов АВКΔ32

Образец	$s, \text{ nm}^{-1}$	$d, \text{ nm}$	$L, \text{ nm}$	$\Delta/d, \text{ nm}$
Intactный вирион	$1,60 \pm 0,02$	$3,92 \pm 0,02$	125 ± 10	$0,06 \pm 0,01$
АВКΔ32	$1,86 \pm 0,01$	$3,37 \pm 0,01$	180 ± 5	$0,04 \pm 0,01$

лочки, и не могут быть интерпретированы как взаимодействие между самими вирионами, например, при образовании упорядоченных кластеров этих крупных частиц. В этом случае период системы d был бы не меньше диаметра вирионов даже при самой плотной упаковке. Кроме того, при измерении МУРР не наблюдались ни концентрационные зависимости, ни появление пика структурного фактора в самых малых углах, что подтверждает отсутствие межчастичного взаимодействия и формирования кластеров [26].

О том, что при удалении N -концевых доменов БО не происходит разрушение вириона и в основном сохраняется внешняя форма, но имеют место внутренние перестройки в белковой оболочке, свидетельствуют также кривые МУРР в координатах Кратки (рис. 3, б). Они демонстрируют почти полное совпадение профилей рассеяния и имеют характерный колоколообразный вид, что указывает на компактность и структурированность образцов в целом [12], и в то же время из-за сдвига брэгговских пиков эти кривые отражают различия в квази-кристаллической структуре, то есть изменения на молекулярном уровне.

Определить форму вирионов АВК и АВКΔ32 с разрешением 1–2 нм можно, используя *ab initio* протокол и программу DAMMIN [21]. Построенные с этой целью функции распределения по расстояниям $p(r)$ представлены на рис. 4, б.

Поскольку известно, что вирионы АВК представляют собой длинные гибкие нити,

функции распределения по расстояниям $p(r)$ были рассчитаны, во-первых, для *ab initio* определения формы вирионов в целом, а во-вторых, для анализа размеров их поперечного сечения. Последнее необходимо в связи с возможным изменением диаметра нитей при удалении 32 аминокислот из N -концевой области БО, предположительно находящихся на внешней поверхности вириона. Режим анализа поперечного сечения для удлиненных частиц доступен в качестве одной из опций программы GNOM [20].

Как видно из рис. 4, б, функции распределения по расстояниям $p(r)$, отражающие общую форму вирионов, характерны для удлиненных рассеивающих объектов с поперечным сечением порядка 10–16 нм [27]. Более точный анализ распределения по размерам поперечного сечения (рис. 4, б, вставка) показывает, что максимальный размер поперечного сечения интактного вириона может достигать 18 нм, в то время как для АВКΔ32 он не превышает 16 нм. Максимум $p(r)$ для АВК расположен на $R = 6$ нм, то есть в основном диаметр интактного вириона равен 12 нм, а для АВКΔ32 $R = 5,4$ нм и, таким образом, диаметр вириона действительно становится несколько меньше после удаления 32 N -концевых аминокислот.

Восстановленные с помощью программы DAMMIN структуры низкого разрешения АВК и АВКΔ32 представлены на рис. 4, в, пронумерованы 1 и 2 соответственно. Поскольку вирионы представляют собой длинные цилиндры (нити), поиск решений проводился в цилиндричес-

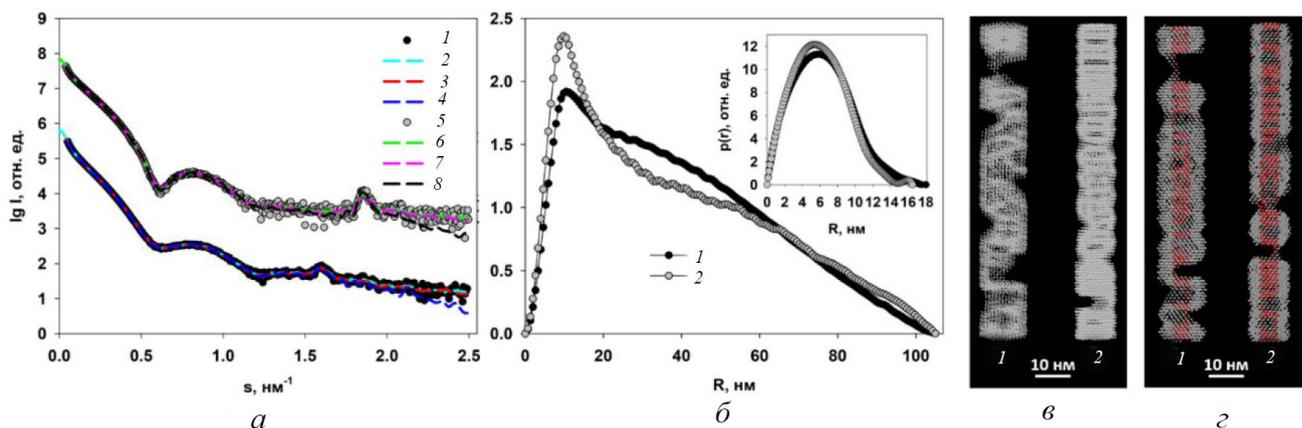


Рис. 4. а – Экспериментальные кривые рассеяния (1 и 5); кривые, рассчитанные программой GNOM от функций распределения по расстояниям $p(r)$ (2 и б); кривые рассеяния от форм, восстановленных *ab initio* программой DAMMIN (3 и 7); кривые рассеяния от форм, восстановленных *ab initio* программой MONSA (4 и 8) для АВК и АВКΔ32 соответственно. Группы кривых рассеяния для АВК и АВКΔ32 смещены по вертикали для лучшей визуализации; б – функции распределения по расстояниям для АВК (1) и АВКΔ32 (2). Вставка: функции распределения по расстояниям $p(r)$ в режиме анализа поперечного сечения для АВК (1) и АВКΔ32 (2); в – восстановленные программой DAMMIN формы вирионов АВК (1) и АВКΔ32 (2); г – восстановленные программой MONSA формы вирионов АВК (1) и АВКΔ32 (2). Белковая оболочка показана серыми виртуальными атомами (шариками), вирусная РНК – красными. (С цветными вариантами рис. 4, 5 и 7 можно ознакомиться в электронной версии статьи на сайте <https://sciencejournals.ru/journal/biokhsm/>)

кой области с длиной цилиндров $D_{max} = 105$ нм (рис. 4, б, основная панель) и диаметрами, полученными при анализе размеров поперечного сечения нитей вирионов (рис. 4, б, вставка). Кривые рассеяния от моделей (рис. 4, а, кривые 3 и 7) демонстрируют хорошее совпадение с экспериментальными данными с $\chi^2 = 2,3$ для АВК и 1,8 – для частично деградированного вириона. В структуре АВКΔ32 заметна определенная периодичность, в то время как интактный вирион менее упорядочен, и на его общую форму оказывает существенное влияние гибкость нитей.

В более универсальном подходе, *ab initio* модель вируса была получена путем одновременного построения как общей формы, так и структуры отдельных компонентов вируса, то есть белка и РНК. Двухфазная модель, разграничивающая белковую и РНК-части, была построена программой MONSA [21]. В качестве объема поиска были использованы два цилиндра. Первый, для моделирования РНК, представлял собой внутренний сплошной цилиндр с радиусом 3,2 нм и длиной 105 нм как для АВК, так и для частично деградированного вириона. Второй цилиндр являлся объемом поиска для восстановления структуры белковой оболочки и был полым и внешним по отношению к первому цилиндру с внешним радиусом 8,0 нм для интактного вириона и 7,0 нм – для АВКΔ32, в соответствии с результатами анализа поперечного сечения. Внутренний радиус второго цилиндра был равен 3,5 нм для обоих вирионов. В процессе моделирования виртуальные атомы (шарики) во внешнем цилиндре могли принимать фазовые индексы 1 и 0 (т.е. белок или растворитель), а во внутреннем 2 и 0 (т.е. РНК или растворитель). Таким образом, была обеспечена разумность модели, где белок оболочки оказывался на внешней поверхности, а РНК в глубине. Построенные двухфазные модели, показанные на рис. 4, з, аппроксимируются искаженными цилиндрами соответствующих размеров и хорошо согласуются с моделями, построенными программой DAMMIN. Искажения полученных форм (неидеальность) свидетельствуют как о влиянии гибкости вирионов, так и о частичной разупорядоченности структуры в целом и белков оболочки в частности. Характерно, что шарики, моделирующие РНК, простираются вдоль всей оси цилиндра, что соответствует известным представлениям о структуре вируса. Двухфазные модели хорошо приближают экспериментальные кривые МУРР (рис. 4, а, кривые 4 и 8) с $\chi^2 = 3,4$. Следует отметить, что брэгговские пики в районе $s = 1,6$ и $1,9 \text{ нм}^{-1}$ также очень хорошо воспроизведены. Присутствие

брэгговских пиков отражает регулярную спиральную упаковку белков оболочки, которая присутствует в полученных моделях. При этом периодичность структуры вирионов более заметна для АВКΔ32.

Поскольку в МУРР решение обратных задач, то есть определение трехмерной структуры рассеивающего объекта по одномерной кривой интенсивности рассеяния, является принципиально неоднозначным, необходима оценка ширины коридора возможных решений. Это производится с помощью программы AMBIMETER [19]. Этот инструмент быстро определяет степень неоднозначности произвольного профиля рассеяния от монодисперсного раствора однородных частиц и основан на обширной библиотеке диаграмм рассеяния от каркасов формы (шаблонов), задающих многообразие топологий структуры частиц низкого разрешения. Количество шаблонов, похожих на заданные экспериментальные данные МУРР, обеспечивают меру неоднозначности, связанной с этими данными, и логарифм этого значения выражается в виде количественной оценки в программе AMBIMETER. Как правило, оценка ниже 1,5 предполагает, что найдено уникальное, то есть практически единственное решение, а оценка выше 2,5 говорит о неоднозначном восстановлении формы.

В настоящей работе для АВКΔ32 нашлась только одна совместимая топология, что свидетельствует об узком интервале близких форм структур низкого разрешения. В случае с интактным АВК совместимыми оказались 88 каркасов формы, и соответствующая оценка неоднозначности составляет 1,9, что говорит о возможной неоднозначности восстановления формы этого образца, обусловленной гибкостью интактного вириона.

В целом, *ab initio* восстановление формы вирионов по данным малоуглового рассеяния продемонстрировало заметные изменения в структуре вириона после удаления 32 аминокислот *N*-концевых доменов белка оболочки. Эти изменения касаются как размера поперечного сечения нитей вириона, так и периодичности структуры БО. Уменьшение периода d предположительно связано с уменьшением шага спиральной упаковки белка в оболочке вируса.

Для того, чтобы проверить правильность этого предположения было проведено моделирование структуры АВК и АВКΔ32 геометрическими телами. Для этого были построены шариковые модели спиральных тел, внешние размеры которых определялись из анализа функций распределений по расстояниям $p(r)$. От полу-

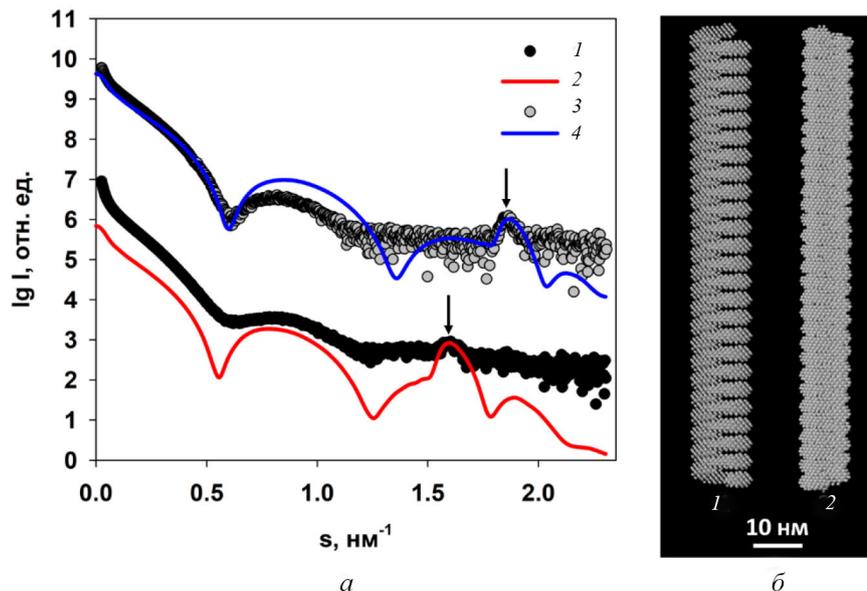


Рис. 5. Моделирование строения intactного и частично деградированного вирионов: *a* – экспериментальные кривые МУРР (1 и 3) и рассеяние от спиральных тел (2 и 4) для АВК и АВК Δ 32 соответственно. Стрелками показаны моделируемые брэгговские пики; *б* – спиральные модели, имитирующие intactный вирион (1) и АВК Δ 32 (2)

ченных спиралей были рассчитаны интенсивности малоуглового рассеяния и проведено сравнение с экспериментальными данными МУРР от АВК и АВК Δ 32 (рис. 5, *a*).

Моделирование геометрическими телами представляет собой метод грубого приближения, который не может учитывать все особенности реальных структур, подвижность и гибкость их отдельных фрагментов, но позволяет построить модели выделенных, особенно важных для анализа элементов. В данном случае требовалось доказать, что брэгговские пики на экспериментальных кривых рассеяния отражают шаг спиральной упаковки белка в оболочке вируса. Для этого расстояние между витками модельных спиралей было задано в соответствии с характеристическим периодом $d = 2\pi/s$, то есть $d = 3,9$ нм для intactного вириона и $d = 3,4$ нм для частично деградированного (таблица). Толщина нитей спиралей была выбрана равной 3,4 нм в предположении, что эта величина не может быть больше шага спирали для АВК Δ 32. Небольшие изменения в меньшую сторону не влияли на результат моделирования. Как видно из рис. 5, *a*, максимумы интенсивности рассеяния от модельных структур хорошо описывают брэгговские пики на экспериментальных данных. Отсюда можно сделать вывод, что при удалении 32 аминокислот *N*-концевого домена АВК действительно происходит изменение шага спирали белковой оболочки – спираль сжимается, и вирион в целом становится более

жестким и поэтому лучше аппроксимируется цилиндрической формой (рис. 4).

Из полученных результатов можно также сделать предположение о том, что *N*-концевой домен частично расположен между витками спиральной упаковки белка оболочки, осуществляя взаимодействие с соседними белковыми субъединицами и удерживая витки спирали на определенном расстоянии друг от друга. С другой стороны, часть белковой цепи *N*-концевого домена выступает над поверхностью вируса, о чем свидетельствует больший диаметр intactного вириона по сравнению с частично деградированным. Важно отметить, что неструктурированные области белковых молекул являются гибким связующим звеном при взаимодействии между различными белками и другими компонентами клеток [5]. В то же время межклеточный транспорт необходимых веществ для жизнедеятельности растений происходит через плазмодесмы – и через эти же плазмодесмы в клетки могут проникать растительные патогены, несмотря на свои большие размеры. Для этого вирусы избирательно используют, например, некоторые миозины клеток [28]. Поэтому можно предположить, что разупорядоченные, гибкие фрагменты *N*-концевого домена АВК могут служить инструментом связывания с определенными клеточными белками для обеспечения межклеточного транспорта. В таком случае прямое воздействие на эти фрагменты вириона соответствующими агентами может привести к дезактивации патогена.

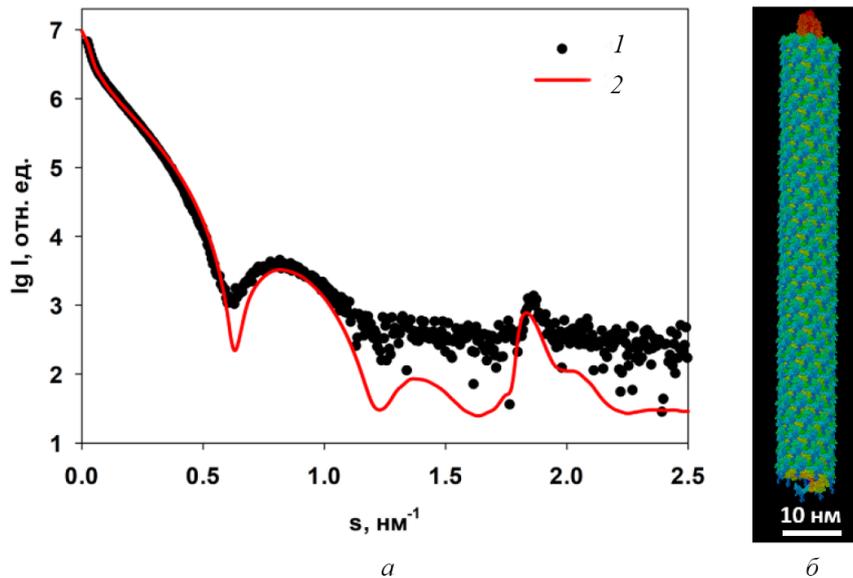
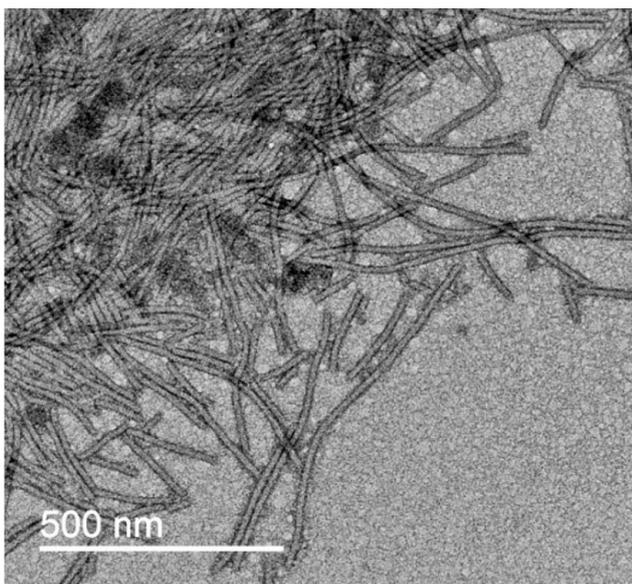
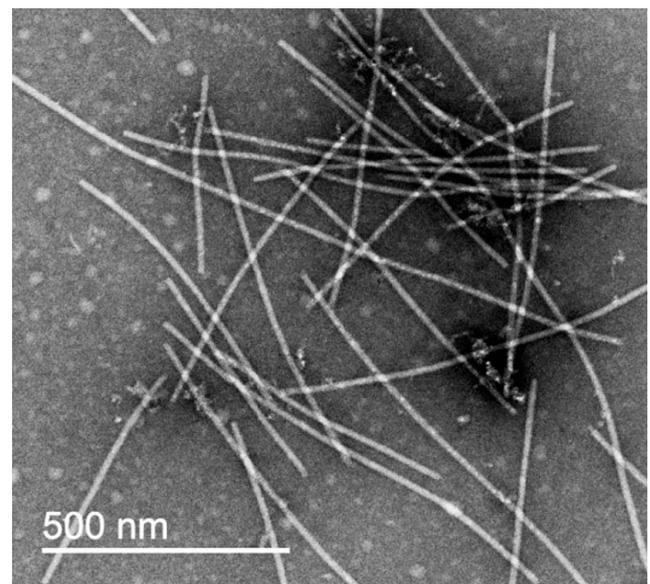


Рис. 7. Результат моделирования строения белковой оболочки А-вируса картофеля с использованием структурных блоков высокого разрешения БО УВК (PDB ID: 6HXX): *a* – (1) экспериментальная кривая малоуглового рассеяния от АВКΔ32; (2) рассчитанный программой CRY SOL профиль рассеяния от полученной структурной модели; *б* – структурная модель белковой оболочки, имитирующая А-вирус картофеля



a



б

Рис. 8. Результаты электронной микроскопии интактных (*a*) и деградированных АВКΔ32 (*б*) вирионов

экспериментальной и модельной кривых демонстрирует некоторое расхождение кривых рассеяния как в интервале $0,08 < s < 1,2 \text{ nm}^{-1}$, так и небольшой сдвиг брэгговского пика с максимумом на $s = 1,9 \text{ nm}^{-1}$ ($d = 3,4 \text{ nm}$) в сторону больших размеров с $s = 1,8 \text{ nm}^{-1}$ ($d = 3,5 \text{ nm}$). Эти

отклонения свидетельствуют о различии структур белковых оболочек вирионов АВК и УВК, несмотря на то, что они являются ближайшими гомологами. При этом следует учесть, что полученная модель более близка не к интактному вириону АВК, а к его частично деградирован-

ной форме. Кроме того, расхождение между экспериментальной и модельной кривой $\chi^2 \sim 25$ (рис. 7) отражает неидеальность реальной структуры этого вириона по сравнению с его жесткой моделью на атомном уровне, не способной изменять свою конформацию. В то же время биологические измерения в малоугловом рассеянии происходят в растворе, где рассеивающие частицы сохраняют свои основные свойства, в том числе гибкость.

Тем не менее полученная модельная форма АВК высокого разрешения показывает несомненное структурное сходство белковых оболочек двух разных потивирусов.

Основной вывод этой части работы состоит в том, что обработка трипсином и частичная деградация АВК привела к изменению шага спиральной упаковки белковой оболочки: после удаления 32 аминокислот расстояние между витками спирали уменьшилось с 3,9 нм до 3,4 нм. Такое сжатие спирали неизбежно должно было привести к изменению гибкости частично деградированного вириона: сжатая пружина всегда значительно более жесткая, чем свободная спираль. Подтверждение этому выводу было найдено с помощью просвечивающей электронной микроскопии.

Электронно-микроскопический анализ вирионов АВК. Согласно данным ПЭМ, интактные вирионы представляли собой типичные гибкие нитевидные частицы (рис. 8, а), тогда как деградированные трипсином вирионы АВКΔ32 в основном представляли собой палочковидные частицы с меньшим диаметром (рис. 8, б), похожие на «сухие спагетти». С помощью комплекта «Gatan» (DigitalMicrograph software) диаметры этих частиц были измерены и оказались равными $14,4 \pm 0,2$ нм и $12,1 \pm 0,3$ нм, для интактных и деградированных вирионов соответственно, что также косвенно указывало на удаление *N*-концевых остатков с поверхности вирионов АВК.

В целом, полученные методом ПЭМ данные хорошо коррелируют с результатами малоугло-

вого рассеяния с учетом разного состояния вирусов при измерениях малоуглового рассеяния и ПЭМ: в МУРР вирионы находятся в растворе, то есть в состоянии, наиболее близком к естественному, в то время как для исследования с помощью электронной микроскопии образцы вирионов были высушены на подложке.

Впервые структура низкого разрешения нитевидного растительного вируса АВК, интактного и частично деградированного, была получена в условиях, близких к естественным. Результаты малоуглового рассеяния показали, что удаление 32 *N*-концевых аминокислот привело к изменению шага спиральной упаковки белковой оболочки. Дополнительные исследования показали, что деградированные трипсином вирионы имели более упорядоченную структуру и представляли собой преимущественно палочковидные частицы меньшего диаметра в сравнении с гибкими частицами интактного вируса, что хорошо коррелировало с результатами МУРР. В целом, проведенный структурный анализ свидетельствует о значении *N*-концевых доменов белка оболочки для выполнения жизненно важных функций АВК, что следует учитывать для выработки стратегии по борьбе с этими растительными патогенами.

Финансирование. Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (грант № 18-04-00525а) и Министерства науки и высшего образования РФ: в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН в части проведения экспериментов МУРР; в рамках соглашения №075-15-2019-1653 в части экспериментов ПЭМ.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ksenofontov, A. L., Paalme, V., Arutyunyan, A. M., Semenyuk, P. I., Fedorova, N. V., et al. (2013) Partially disordered structure in intravirus coat protein of potyvirus potato virus A, *PLoS One*, **8**, e67830, doi: 10.1371/journal.pone.0067830.
2. Zamora, M., Mendez-Lopez, E., Agirrezabala, X., Cuesta, R., Lavin, J. L., Sanchez-Pina, M. A., Aranda, M. A., and Valle, M. (2017) Potyvirus virion structure shows conserved protein fold and RNA binding site in ssRNA viruses, *Sci. Adv.*, **3**, eaao2182, doi: 10.1126/sciadv.aao2182.
3. Kezar, A., Kavcic, L., Polak, M., Novacek, J., Gutierrez-Aguirre, I., et al. (2019) Structural basis for the multitasking nature of the potato virus Y coat protein, *Sci. Adv.*, **5**, eaaw3808, doi: 10.1126/sciadv.aaw3808.
4. Cuesta, R., Yuste-Calvo, C., Gil-Carton, D., Sanchez, F., Ponz, F., and Valle, M. (2019) Structure of Turnip mosaic

- virus and its viral-like particles, *Sci. Rep.*, **9**, 15396, doi: 10.1038/s41598-019-51823-4.
5. Uversky, V. N. (2013) Unusual biophysics of intrinsically disordered proteins, *Biochim. Biophys. Acta*, **1834**, 932-951, doi: 10.1016/j.bbapap.2012.12.008.
 6. Ksenofontov, A. L., Parshina, E. Y., Fedorova, N. V., Arutyunyan, A. M., Rumvolt, R., Paalme, V., Baratova, L. A., Jarvekulg, L., and Dobrov, E. N. (2016) Heating-induced transition of Potyvirus Potato Virus A coat protein into beta-structure, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **34**, 250-258, doi: 10.1080/07391102.2015.1022604.
 7. Ksenofontov, A. L., Dobrov, E. N., Fedorova, N. V., Arutyunyan, A. M., Golanikov, A. E., Järvekülg, L., and Shtykova, E. V. (2018) Structure of Potato Virus A coat protein particles and their dissociation, *Mol. Biol. (Mosk.)*, **52**, 1055-1065, doi: 10.1134/S0026898418060101.
 8. Ksenofontov, A. L., Dobrov, E. N., Fedorova, N. V., Serebryakova, M. V., Prusov, A. N., Baratova, L. A., Paalme, V., Jarvekulg, L., and Shtykova, E. V. (2018) Isolated Potato Virus A coat protein possesses unusual properties and forms different short virus-like particles, *J. Biomol. Struct. Dyn.*, **36**, 1-11, doi: 10.1080/07391102.2017.1333457.
 9. Anindya, R., and Savithri, H. S. (2003) Surface-exposed amino- and carboxy-terminal residues are crucial for the initiation of assembly in Pepper vein banding virus: a flexuous rod-shaped virus, *Virology*, **316**, 325-336, doi: 10.1016/S0042-6822(03)00593-2.
 10. Tatineni, S., McMechan, A. J., and Hein, G. L. (2018) Wheat streak mosaic virus coat protein is a determinant for vector transmission by the wheat curl mite, *Virology*, **514**, 42-49, doi: 10.1016/j.virol.2017.10.018.
 11. Voloudakis, A. E., Malpica, C. A., Aleman-Verdaguer, M. E., Stark, D. M., Fauquet, C. M., and Beachy, R. N. (2004) Structural characterization of Tobacco etch virus coat protein mutants, *Arch. Virol.*, **149**, 699-712, doi: 10.1007/s00705-003-0247-x.
 12. Svergun, D. I., Koch, M. H. J., Timmins, P. A., and May, R. P. (2013) Small angle x-ray and neutron scattering from solutions of biological macromolecules, First Ed., *Oxford University Press*, Oxford, doi: 10.1093/acprof:oso/9780199639533.001.0001.
 13. Franke, D., Petoukhov, M. V., Konarev, P. V., Panjkovich, A., Tuukkanen, A., et al. (2017) ATSAS 2.8: a comprehensive data analysis suite for small-angle scattering from macromolecular solutions, *J. Appl. Crystallogr.*, **50**, 1212-1225, doi: 10.1107/S1600576717007786.
 14. Ksenofontov, A. L., Petoukhov, M. V., Prusov, A. N., Fedorova, N. V., and Shtykova, E. V. (2020) Characterization of tobacco mosaic virus virions and repolymerized coat protein aggregates in solution by small-angle x-ray scattering, *Biochemistry (Mosc.)*, **85**, 310-317, doi: 10.1134/s0006297920030062.
 15. Laemmli, U. K. (1970) Cleavage of structural proteins during the assembly of the head of bacteriophage T4, *Nature*, **227**, 680-685, doi: 10.1038/227680a0.
 16. Ksenofontov, A. L., Kozlovskii, V. S., Kordiukova, L. V., Radiukhin, V. A., Timofeeva, A. V., and Dobrov, E. N. (2006) Determination of concentration and aggregate size in influenza virus preparations using the true UV-absorption spectra, *Mol. Biol.*, **40**, 152-158, doi: 10.1134/S0026893306010201.
 17. Blanchet, C. E., Spilotros, A., Schwemmer, F., Graewert, M. A., Kikhney, A., et al. (2015) Versatile sample environments and automation for biological solution X-ray scattering experiments at the P12 beamline (PETRA III, DESY), *J. Appl. Crystallogr.*, **48**, 431-443, doi: 10.1107/S160057671500254X.
 18. Konarev, P. V., Volkov, V. V., Sokolova, A. V., Koch, M. H. J., and Svergun, D. I. (2003) PRIMUS: a Windows PC-based system for small-angle scattering data analysis, *J. Appl. Crystallogr.*, **36**, 1277-1282, doi: 10.1107/s0021889803012779.
 19. Petoukhov, M. V., and Svergun, D. I. (2015) Ambiguity assessment of small-angle scattering curves from monodisperse systems, *Acta Crystallogr. D Biol. Crystallogr.*, **71**, 1051-1058, doi: 10.1107/s1399004715002576.
 20. Svergun, D. I. (1992) Determination of the regularization parameter in indirect-transform methods using perceptual criteria, *J. Appl. Crystallogr.*, **25**, 495-503, doi: 10.1107/s0021889892001663.
 21. Svergun, D. I. (1999) Restoring low resolution structure of biological macromolecules from solution scattering using simulated annealing, *Biophys. J.*, **76**, 2879-2886, doi: 10.1016/S0006-3495(99)77443-6.
 22. Konarev, P. V., Petoukhov, M. V., and Svergun, D. I. (2001) MASSHA— a graphics system for rigid-body modelling of macromolecular complexes against solution scattering data, *J. Appl. Crystallogr.*, **34**, 527-532, doi: 10.1107/s0021889801006100.
 23. Svergun, D., Barberato, C., and Koch, M. H. J. (1995) CRY SOL — a program to evaluate x-ray solution scattering of biological macromolecules from atomic coordinates, *J. Appl. Crystallogr.*, **28**, 768-773, doi: 10.1107/s0021889895007047.
 24. Artimo, P., Jonnalagedda, M., Arnold, K., Baratin, D., Csardi, G., et al. (2012) ExPASy: SIB bioinformatics resource portal, *Nucleic Acids Res.*, **40**, W597-603, doi: 10.1093/nar/gks400.
 25. Shtykova, E. V. (2015) Shape determination of polydisperse and polymorphic nanoobjects from small-angle X-ray scattering data (computer simulation). *Nanotechnol. Russia*, **10**, 408-419, doi: 10.1134/S1995078015030155.
 26. Tardieu, A. (1994) Neutron and synchrotron radiation for condensed matter studies. Applications to Soft Condensed Matter and Biology, vol III (Les editions de Physique (France)) (Berlin: Springer) pp 145-160.
 27. Feigin, L. A., and Svergun, D. I. (1987) Structure analysis by small-angle x-ray and neutron scattering, Plenum Press, New York, p. 335.
 28. Amari, K., Lerich, A., Schmitt-Keichinger, C., Dolja, V. V., and Ritzenthaler, C. (2011) Tubule-guided cell-to-cell movement of a plant virus requires class XI myosin motors, *PLoS Pathog.*, **7**, e1002327, doi: 10.1371/journal.ppat.1002327.

STRUCTURE OF POTATO VIRUS A VIRIONS ACCORDING TO SMALL ANGLE X-RAY SCATTERING DATA AND COMPLEMENTARY METHODS*

**E. V. Shtykova¹, M. V. Petukhov¹, N. V. Fedorova², A. M. Arutyunyan², E. V. Skurat³,
L. V. Kordyukova², A. V. Moiseenko³, and A. L. Ksenofontov^{2**}**

¹ *Shubnikov Institute of Crystallography of Federal Scientific Research Centre «Crystallography and Photonics», Russian Academy of Sciences, 119333 Moscow, Russia; E-mail: shtykova@ns.crys.ras.ru*

² *Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia; E-mail: ksenofon@belozersky.msu.ru*

³ *Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119991 Moscow, Russia*

Potato virus A (PVA) protein coat contains on its surface partially unstructured N-terminal domain of the viral coat protein (CP), whose structural and functional characteristics are important for understanding the mechanism of plant infection with this virus. In this work, we investigated the properties and the structure of intact PVA and partially trypsinized PVA Δ 32 virions using small-angle X-ray scattering (SAXS) and complimentary methods. It was shown that after the removal of 32 N-terminal amino acids of the CP, the virion did not disintegrate and remained compact, but the helical pitch of the CP packing changed. To determine the nature of these changes, we performed *ab initio* modeling, including the multiphase procedure, with the geometric bodies (helices) and restoration of the PVA structure in solution using available high-resolution structures of the homologous CP from the PVY potyvirus, based on the SAXS data. As a result, for the first time, a low-resolution structure of the filamentous PVA virus, both intact and partially degraded, was elucidated under conditions close to natural. The far-UV circular dichroism spectra of the PVA and PVA Δ 32 samples differed significantly in the amplitude and position of the main negative maximum. The extent of thermal denaturation of these samples in the temperature range of 20-55°C was also different. The data of transmission electron microscopy showed that the PVA Δ 32 virions were mostly rod-shaped, in contrast to the flexible filamentous particles typical of the intact virus, which correlated well with the SAXS results. In general, structural analysis indicates an importance of the CP N-terminal domain for the vital functions of PVA, which can be used to develop a strategy for combating this plant pathogen.

Keywords: potyviruses, coat protein, potato virus A, N-terminal disordered domains, small-angle X-ray scattering, structural modeling

ОПЕЧАТКИ, ЗАМЕЧЕННЫЕ В ЖУРНАЛЕ «БИОХИМИЯ», том 85, вып. 10, 2020

Страница	Столбец	Строка	Напечатано	Следует читать
1358	правый	27 сверху, раздел «Финансирование»	Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (19-015-0023).	Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФИ (19-015-00233).