На правах рукописи

Алимкина Оксана Владимировна

Исследование влияния агониста дельта-опиоидных рецепторов гексапептида YdAGFLR на ацетилирование и секрецию белка HMGB1 в условиях воспалительного повреждения легких

1.5.4. Биохимия

Автореферат
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва – 2026

Работа выполнена на базе Федерального государственного бюджетного учреждения науки «Научный центр биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства»

Научный руководитель: **Помыткин Игорь Анатольевич,**
доктор биологических наук,
главный научный сотрудник НОРЦ Клеточные технологии ФГАОУ ВО Российский университет дружбы народов имени Патриса Лумумбы

Официальные оппоненты: **Тропская Наталия Сергеевна**,
доктор биологических наук, доцент,
главный научный сотрудник ГБУЗ города Москвы «Научно-исследовательский институт скорой помощи им. Н. В. Склифосовского Департамента здравоохранения города Москвы»

Кузиков Алексей Владимирович
доктор биологических наук, доцент, заведующий кафедрой биохимии Института биомедицины (МБФ) ФГАОУ ВО «Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н.И. Пирогова» Министерства здравоохранения Российской Федерации

Ведущая организация: ФГБНУ «Федеральный научно-клинический центр реаниматологии и реабилитологии»

Защита состоится 22 декабря 2026 г. в 13.00 на заседании диссертационного совета 24.1.108.03 при ФГБУН Федеральном исследовательском центре проблем химической физики и медицинской химии Российской академии наук по адресу: 142432, Московская область, г. Черноголовка, Северный проезд, д.1, зал заседаний Ученого совета.

С диссертацией и авторефератом можно ознакомиться в библиотеке и на официальном сайте ФИЦ ПХФ и МХ РАН https://icp-ras.ru/. Текст автореферата размещен на официальном сайте Высшей аттестационной комиссии по адресу https://vak.gisnauka.ru/.

Автореферат разослан «____» _____ 2026 г.

Ученый секретарь
диссертационного совета 24.1.108.03
кандидат биологических наук Л.В. Аникина

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность темы исследования

Белок бокс 1 группы высокой подвижности (HMGB1 от англ. High-Mobility Group Box 1) – негистоновый ядерный белок, играющий роль незаменимого ДНК-шаперона и регулятора транскрипции [Kang et al., 2014], который в условиях воспаления активно секретируется иммунными клетками, а также клетками эпителия и эндотелия во внеклеточное пространство, где инициирует позднее воспаление через взаимодействие с рецепторами распознавания паттернов (PRR) врожденной иммунной системы. Внеклеточный HMGB1 играет роль позднего медиатора летального воспаления при сепсисе [Wang et al., 1999; Wang et al., 2001], вызывает развитие тяжелой вирусной пневмонии у пациентов, инфицированных H1N1 [Ito et al., 2011]. При коронавирусном заболевании 2019 года (COVID-19) [Grigorov et al., 2023] уровни внеклеточного HMGB1 положительно коррелируют с уровнями D-димера [Vicentino et al., 2023], тяжестью заболевания [Štros et al., 2022], более высоким баллом по шкале последовательной органной недостаточности (SOFA) (>10), наличием септического шока или острого повреждения почек [Sivakorn et al., 2021], риском перехода на искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) и риском смерти [Chen, Huang et al., 2020; Chen, Long et al., 2020], а также предсказывают смертность с точностью, сопоставимой с оценкой шкалы SOFA и оценкой риска шкалы COVID-GRAM [Sivakorn et al., 2021]. Поэтому внеклеточный HMGB1 рассматривается как терапевтическая мишень для лечения COVID-19. Гипероксия и механический стресс при ИВЛ повышают уровни внеклеточного HMGB1 и ведут к возникновению вентилятор-ассоциированной пневмонии [van Zoelen et al., 2013]. С учетом распространенности сепсиса как основной причины смерти пациентов в отделениях реанимации во всем мире [Angus et al., 2013], а также жизнеугрожающего характера тяжелых пневмоний, поиск средств, снижающих уровни внеклеточного HMGB1, имеет высокую актуальность.

Степень разработанности темы исследования

Основным экспериментальным подходом к снижению уровней внеклеточного HMGB1, в рамках которого, однако, до сих пор не зарегистрировано

ни одного лекарственного средства, является связывание HMGB1 в неактивные комплексы с моноклональными антителами и малыми молекулами [Wang et al., 1999; Xue et al., 2021]. Еще одним подходом является снижение активной секреции HMGB1 клетками, известный механизм которой включает ацетилирование HMGB1, его транслокацию в цитоплазму и последующий выход во внеклеточное пространство [Bonaldi et al., 2003; Lu et al., 2014; Wang et al., 2019]. Обратная реакция деацетилирования HMGB1 гистоновыми деацетилазами, преимущественно сиртуином 1 (SIRT1) [Rabadi et al., 2015; Kim et al. 2016; Qi et al., 2017], препятствует активной секреции HMGB1. Поэтому активация SIRT1 рассматривается как перспективный подход к лечению воспалительных заболеваний и сепсиса, а аллостерические активаторы SIRT1 разрабатываются и изучаются на моделях воспаления, но также пока не вышли в клиническую практику [Sinclair et al., 2014; Opal et al., 2016]. Альтернативой является активация некоторых внутриклеточных сигнальных путей. В частности, активация α7 никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (α7nAChR) снижает активную секрецию HMGB1 альвеолярными макрофагами [Sitapara et al., 2020], а также снижает смертность в мышиной модели вентилятор-ассоциированной пневмонии [Gauthier et al., 2023]. Активация периферических δ-опиоидных рецепторов экспериментальным пептидным агонистом YdAGFdL (DADLE) снижает уровни HMGB1 в сыворотке и повышает выживаемость крыс в модели сепсиса, вызванного перевязкой и перфорацией слепой кишки [Tang et al., 2011]. Механизм действия DADLE на внеклеточные уровни HMGB1 неизвестен, однако сам факт снижения HMGB1 при сепсисе под действием DADLE создает предпосылки для исследования влияния других пептидных агонистов δ-опиоидных рецепторов на ацетилирование и секрецию белка HMGB1 в условиях воспалительных заболеваний. Гексапептид YdAGFLR был выбран в настоящей работе как клинически доказанный селективный агонист δ-опиоидных рецепторов с превосходным профилем безопасности [Yarigin, 1990; Булгаков, 2016], раствор которого для ингаляций разрешен Минздравом России для лечения пневмонии

COVID-19, которая характеризуется повышенными уровнями внеклеточного HMGB1.

Цель и задачи исследования

Цель исследования – изучить влияние селективного агониста дельта-опиоидных рецепторов гексапептида YdAGFLR на ацетилирование и секрецию белка HMGB1 на модели острого воспаления легких.

Задачи исследования:

1. Изучить влияние гексапептида YdAGFLR на выживаемость мышей линии C57BL/6Y в условиях летального острого воспаления легких и острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС).
2. Подобрать условия моделирования нелетального острого воспаления легких на мышах линии C57BL/6Y для решения задач исследования ацетилирования и секреции белка HMGB1 in vivo.
3. Изучить влияние гексапептида YdAGFLR на динамику клеточного состава в жидкости бронхоальвеолярного смыва (БАЛЖ) мышей линии C57BL/6Y в условиях моделирования нелетального острого воспаления легких.
4. Изучить влияние гексапептида YdAGFLR на уровни внеклеточного HMGB1 в легких мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких.
5. Изучить влияние гексапептида YdAGFLR на ацетилирование HMGB1 в легких и БАЛЖ мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких.
6. Изучить влияние гексапептида YdAGFLR на транскрипцию *Sirt1* и *Hmgb1* в легких мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких.
7. Изучить влияние налоксона, неселективного антагониста опиоидных рецепторов, на эффекты гексапептида YdAGFLR на транскрипцию *Sirt1* в легких мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких.

Научная новизна

В настоящем исследовании впервые показано, что терапевтический агонист δ-опиоидных рецепторов – гексапептид YdAGFLR повышает выживаемость животных в условиях моделирования летального острого воспаления легких и ОРДС. Впервые показано, что YdAGFLR значимо снижает уровни внеклеточного

HMGB1, известного медиатора летального воспаления, в условиях моделирования острого воспаления легких, и это снижение связано с понижением соотношения ацетилированных форм HMGB1 к неацетилированным. Впервые показано, что эффект YdAGFLR связан с повышением транскрипции гистоновой деацетилазы SIRT1, для которой ацетилированные формы HMGB1 являются известным субстратом, и эффект YdAGFLR на транскрипцию деацетилазы полностью ингибируется налоксоном, антагонистом опиоидных рецепторов, что доказывает участие опиоидной сигнализации в повышении транскрипции SIRT1 в ответ на YdAGFLR в условиях воспаления легких. Полученные результаты находятся в полном согласии с данными научной литературы о роли посттрансляционного ацетилирования в активной секреции HMGB1 и роли гистоновой деацетилазы SIRT1 как отрицательного регулятора этого процесса, а также позволяют уточнить функции δ-периферической опиоидной сигнальной системы как регулятора воспалительного процесса, а не только как известного фактора антиноцицепции, уменьшающего восприятие боли в очаге воспаления [Cabot, 2001].

Теоретическая и практическая значимость работы

Теоретическая значимость настоящей работы состоит в том, что выявлена неизвестная ранее функция δ-опиоидной сигнализации в легких, связанная с предупреждением активной секреции внеклеточного HMGB1, известного медиатора летального воспаления при тяжелых пневмониях. Активация опиоидной сигнализации селективным агонистом δ-опиоидных рецепторов YdAGFLR в условиях острого воспаления легких снижает степень посттрансляционного ацетилирования остатков лизина в сайтах ядерной локализации белка HMGB1 и ведет к снижению уровней внеклеточного HMGB1. Полученные в настоящей работе результаты создают теоретические предпосылки для разработки новых препаратов на основе агонистов δ-опиоидных рецепторов для адъювантной противовоспалительной терапии тяжелых пневмоний. Практическая значимость работы состоит в том, что выявленные эффекты гексапептида YdAGFLR на внеклеточные уровни HMGB1 позволяют уточнить механизм действия ингаляционного лекарственного препарата для лечения COVID-19, в составе

которого YdAGFLR является действующим веществом, и оценить возможное расширение показаний к применению этого препарата для лечения заболеваний органов дыхания, характеризующихся повышением уровней внеклеточного HMGB1.

Методология и методы исследования

Настоящее исследование выполнено на двух моделях острого воспаления легких у мышей линии C57BL/6Y. Летальное острое воспаление легких и ОРДС моделировали последовательным с интервалом 24 часа введением в легкие мышей α-галактозилцерамида (α-GalCer) ингаляционно и смеси липополисахарида *E. coli* 055:B5 (LPS), мурамилпептида и полного адъюванта Фрейнда. Нелетальное острое воспаление легких моделировали последовательным введением мышам α-GalCer ингаляционно и LPS интратрахеально. Методология исследования включала измерение уровней внеклеточного HMGB1 в легких методом иммуноферментного анализа во временном интервале до 72 часов, а также определение соотношения ацетилированных и неацетилированных форм HMGB1 методом трипсинолиза образцов легких и БАЛЖ с анализом образующихся триптических пептидов методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с тандемной масс-спектрометрией (ВЭЖХ-МС/МС). Транскрипцию *Sirt1* и *Hmgb1* в легких оценивали методом ПЦР в реальном времени в интервале до 72 часов. Клеточный состав БАЛЖ исследовали с помощью микроскопии. Статистическая обработка результатов исследования включала выбор параметрических или непараметрических методов статистического анализа по критерию Шапиро-Уилкса, статистический однофакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным тестом Тьюки, двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорными тестами Тьюки и Сидака. Анализ кривых выживаемости проводили с использованием логрангового критерия Мантела-Кокса.

Положения, выносимые на защиту

1. Гексапептид YdAGFLR повышает выживаемость животных в условиях летального острого воспаления легких и ОРДС.

2. Гексапептид YdAGFLR влияет на динамику уровней внеклеточного HMGB1 в легких в условиях острого воспаления легких.

3. Гексапептид YdAGFLR влияет на динамику изменений клеточного состава БАЛЖ в условиях острого воспаления легких.

4. Гексапептид YdAGFLR снижает по сравнению с контролем соотношение ацетилированных форм HMGB1 к неацетилированным в условиях острого воспаления легких.

5. Гексапептид YdAGFLR повышает транскрипцию *Sirt1* в легких по сравнению с контролем в условиях острого воспаления легких.

6. Налоксон, неселективный антагонист опиоидных рецепторов, блокирует эффекты гексапептида YdAGFLR на транскрипцию *Sirt1* в легких в условиях острого воспаления легких.

Соответствие диссертации паспорту научной специальности

Настоящее исследование соответствуют паспорту научной специальности 1.5.4. «Биохимия» и направлению исследований «Проблемы строения, свойств и функционирования отдельных молекул и надмолекулярных комплексов в биологических объектах, изучение молекулярной организации структурных компонентов, выяснение путей метаболизма и их взаимосвязей» (п. 1) и «Теоретические и прикладные проблемы природы и закономерностей химических превращений в живых организмах, молекулярных механизмов интеграции клеточного метаболизма, связей биохимических процессов с деятельностью органов и тканей, с жизнедеятельностью организма для решения задач сохранения здоровья человека, животных и растений, выяснения причин различных болезней и изыскания путей их эффективного лечения» (п. 10).

Степень достоверности и апробация результатов

Достоверность результатов настоящего исследования основана на выборе методов исследования, соответствующих цели и задачам исследования, использовании достаточного количества животных в исследуемых группах и группах сравнения, адекватных методах статистического анализа полученных данных и на высокой степени согласованности результатов исследования.

Результаты исследования были представлены на конференциях: XVII научно-практическая межрегиональная конференция «Биомедицина и биомоделирование» (26-27 мая 2021 г., Московская обл. – С-Петербург – Ростов-на-Дону), XXI научно-практическая межрегиональная конференция «Биомедицина и биомоделирование» (21-22 мая 2025г., Московская обл.).

Личный вклад автора

Автор провел сбор и анализ научной литературы по теме диссертации, принимал участие в постановке целей и задач исследования, разработке протоколов экспериментов, а также выполнял все операционные манипуляции при моделировании острого воспаления легких на мышах линии C57BL/6Y для решения задач исследования ацетилирования и секреции белка HMGB1 *in vivo*. Автор вел послеоперационные наблюдения, подготавливал пробы и изучал клеточный состав БАЛЖ. Автором были получены, обработаны и проанализированы данные, отражающие результаты исследования, а также подготовлены статьи к публикации. Доклады по теме диссертации были лично представлены автором на всероссийских научных конференциях.

Публикации по теме диссертации

Всего по результатам настоящего исследования автором опубликовано 5 статей, из них 4 статьи в отечественных журналах из списка ВАК, входящих в «белый список» ВАК категории К1, и 1 статья в иностранном журнале, входящем в первый квартиль (Q1) по импакт-фактору The SCImago Journal Rank (SJR) of Scopus на дату публикации.

Структура и объем диссертации

Диссертационная работа оформлена в соответствии с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р 7.0.11–2011, изложена на 101 листе машинописного текста, состоит из введения, 4-х глав, заключения, практической значимости, списка сокращений и условных обозначений, списка литературы и 1-го приложения. Список литературы состоит из 183 работ, из них 7 русскоязычных источников и 176 зарубежных источников. Текст иллюстрирован 3 таблицами и 16 рисунками.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

Материалы и методы исследования

Исследования проводились в Научном центре биомедицинских технологий ФМБА России на мышах линии C57BL/6Y, возраст около 2,5 мес., начальная средняя масса 20±2,0 г. Все эксперименты были одобрены биоэтической комиссией (Протокол № 11 от 14.05.2020) и проводились с соблюдением требований стандартных операционных процедур (СОП) центра, руководств и Национальных стандартов. Острое воспаление легких моделировали ингаляционным введением α-GalCer (1 мкг/мышь) с последующим через 24 часа интратрахеальным введением под общим наркозом либо смеси 300 мкг/мышь липополисахарида *E. coli* 055:B5 (LPS), 100 мкг/мышь мурамилпептида и 10 мкл/мышь полного адъюванта Фрейнда (летальная модель) либо 15 мг/кг LPS (нелетальная модель). Клеточный состав БАЛЖ определяли с помощью микроскопа MT4300L (Япония) путем подсчета клеток на лабораторном счетчике. Концентрации HMGB1 измеряли с использованием набора ИФА (“Cloud-Clone”, Китай). Уровни мРНК SIRT1 и HMGB1 в образцах легких определяли с помощью ПЦР в реальном времени с использованием CFX96 Touch Real-Time (“Bio-Rad Laboratories”, США) относительно гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Соотношения ацетилированных и неацетилированных остатков лизина (ацетил-K/K) в составе триптических пептидов, полученных трипсинолизом образцов БАЛЖ и легких, определяли методом ВЭЖХ-МС/МС с использованием Agilent Technologies 1290 Infinity UHPLC, с времяпролетным детектором Agilent 6545 XT AdvanceBio LC/Q-TOF (“Agilent Technologies”, США) на основе сравнения интенсивностей ионов (или площади пика) для выбранных пептидов в данном образце. Статистический анализ проводили с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v.8.3.0 (“San Diego”, США). Были использованы следующие обозначения: M – среднее, m – стандартная ошибка, n – объем выборки, *P* – достигнутый уровень значимости. Различия считали статистически значимыми при $P<0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ СОБСТВЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ

Исследование влияния YdAGFLR на выживаемость мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких

Курсовое 14-дневное введение гексапептида YdAGFLR статистически значимо повысило выживаемость мышей линии C57BL/6Y (P<0,0001; логранговый тест Мантела-Кокса) по сравнению с контролем (физ. раствор) в условиях моделирования летального острого воспаления легких и ОРДС.

Исследование влияния YdAGFLR на уровни HMGB1 в БАЛЖ мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких

Для проверки гипотезы, что эффект YdAGFLR на выживаемость животных связан с его действием на уровни внеклеточного HMGB1, мышам линии C57BL/6Y с нелетальным острым воспалением легких вводили однократно ингаляционно YdAGFLR и измеряли концентрации HMGB1 в БАЛЖ (Рисунок 1).

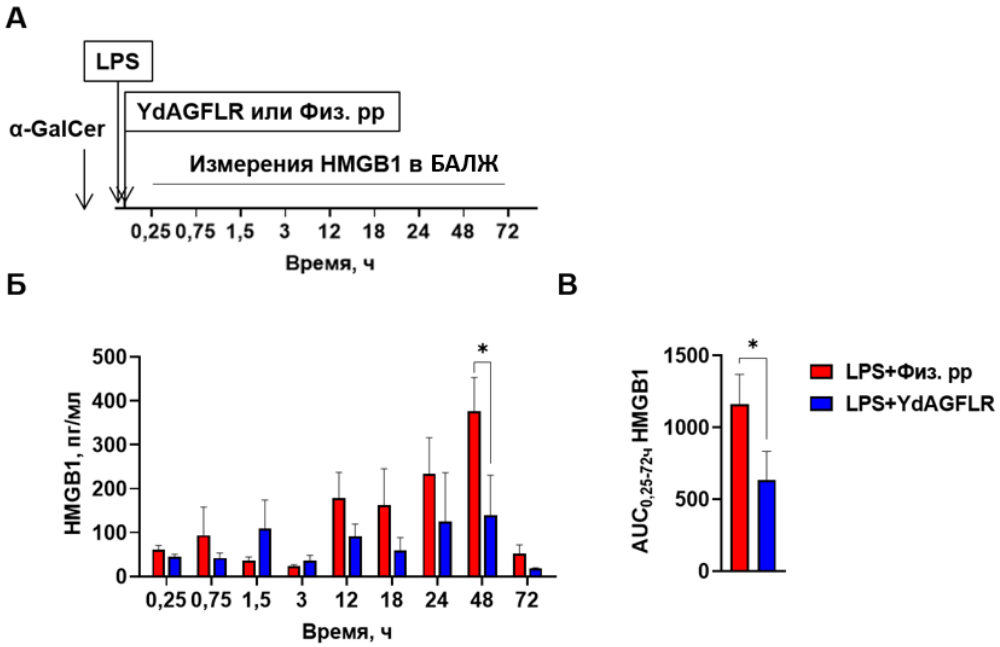


Рисунок 1 – Динамика уровней HMGB1 в БАЛЖ у мышей линии C57BL/6Y, получавших 100 мкг/кг YdAGFLR (LPS+YdAGFLR; n=27) или Физ. раствор (LPS+Физ. рр; n=29). (А) Схема эксперимента. (Б) Динамика уровней HMGB1 в БАЛЖ. Столбцы – M±m (n=3-4) экспериментальных значений в указанных временных точках; * – P<0,05 по сравнению с Физ. раствором (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест Сидака). (В) Площади под кривыми уровней HMGB1 в БАЛЖ ($AUC_{0,25-72ч}$) за 72 часа наблюдений. * – P<0,05 по сравнению с Физ. раствором

Гексапептид YdAGFLR статистически значимо снизил уровни внеклеточного HMGB1, известного медиатора летального воспаления, в БАЛЖ ($F_{1,38}$=5,640; P=0,0227) по сравнению с контролем в течение всего периода наблюдений 72 часа и, особенно, во временной точке 48 часов, когда достигается максимум концентрации внеклеточного HMGB1 в БАЛЖ.

Исследование влияния YdAGFLR на динамику транскрипции *Hmgb1* в легких мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких

Чтобы выяснить, связан ли эффект YdAGFLR на уровни внеклеточного HMGB1 с транскрипцией *Hmgb1*, мышам линии C57BL/6Y с нелетальным острым воспалением легких вводили однократно ингаляционно YdAGFLR и измеряли уровни мРНК HMGB1 в легких (Рисунок 2).

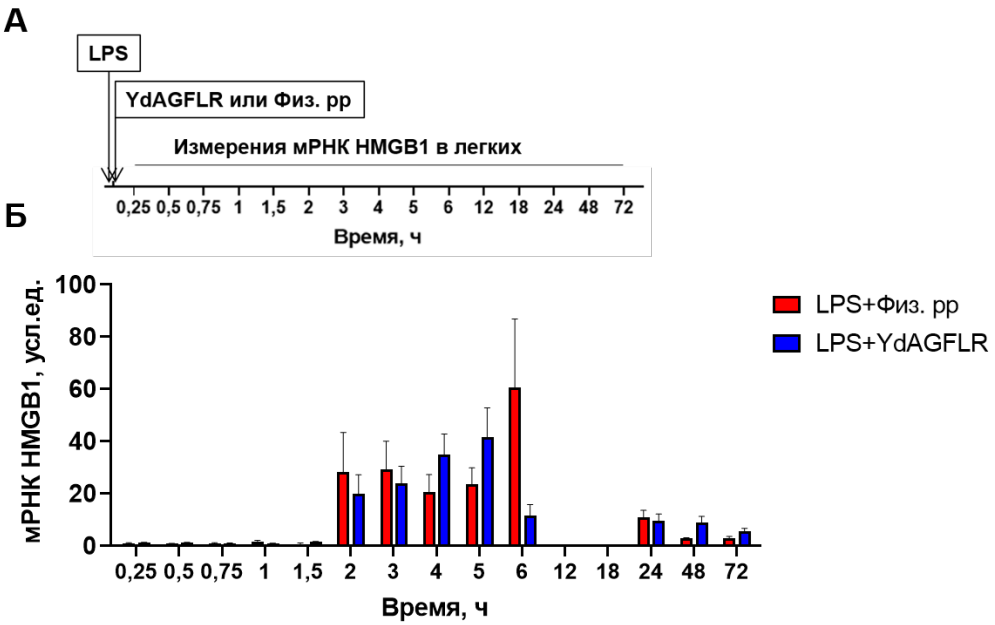


Рисунок 2 – Динамика уровней мРНК HMGB1 в легких мышей линии C57BL/6Y, получивших 100 мкг/кг YdAGFLR (n=75) или Физ. раствор (n=75). (А) Схема эксперимента. (Б) Уровни мРНК HMGB1 в легких. Столбцы – M±m (n=5) экспериментальных значений в указанных временных точках

Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA не выявил статистически значимого главного эффекта YdAGFLR на динамику мРНК HMGB1 ($F_{1,8}$=0,5470;

P=0,487). Таким образом, эффект YdAGFLR на уровни внеклеточного HMGB1 не связан с транскрипцией *Hmgb1* в условиях воспаления легких.

Исследование влияния YdAGFLR на динамику изменений клеточного состава БАЛЖ в легких мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких

Для выяснения влияния YdAGFLR на клеточный состав БАЛЖ мышам линии C57BL/6Y с нелетальным острым воспалением легких вводили однократно ингаляционно YdAGFLR или физ. раствор и отслеживали изменения клеточного состава БАЛЖ в течение 72 ч после введения препаратов (Рисунок 3).

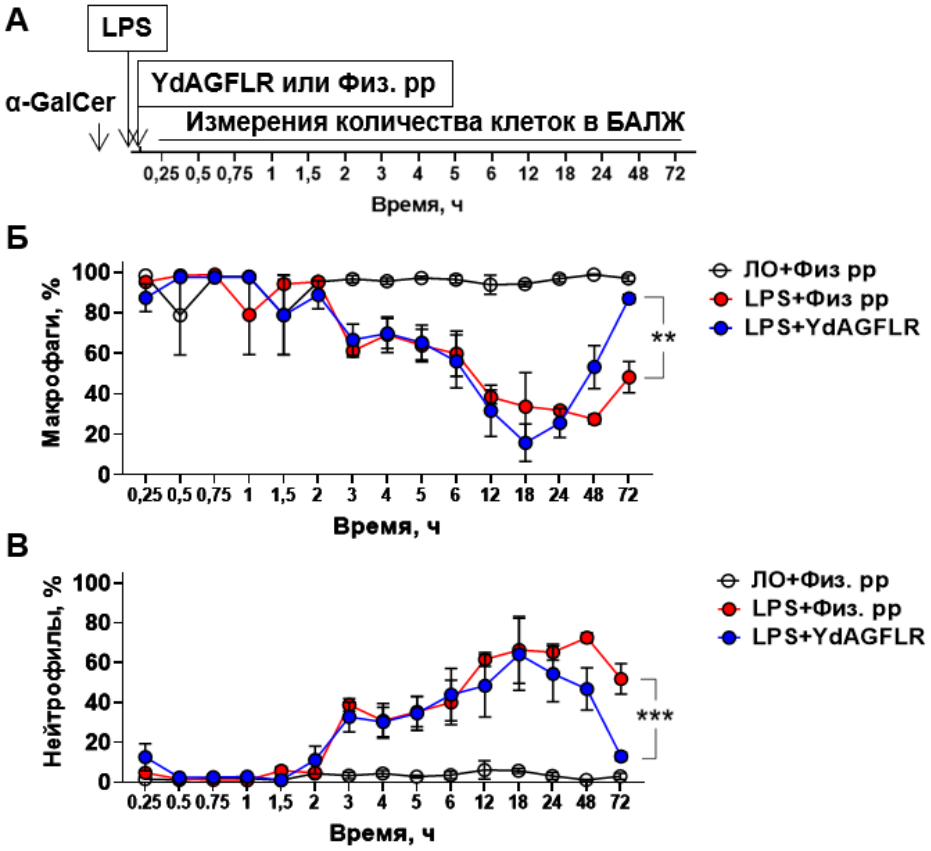


Рисунок 3 – Динамика содержания макрофагов и нейтрофилов в БАЛЖ у мышей линии C57BL/6Y, получивших 100 мкг/кг YdAGFLR (n=75) или Физ. раствор (n=75). Схема эксперимента (А). Процентное содержание макрофагов (Б) и нейтрофилов (В) в БАЛЖ. Символы – M±m (n=5) экспериментальных значений в указанных временных точках; * – *P*<0,05; ** – *P*<0,01; *** – *P*<0,001 по сравнению с LPS+Физ. рр (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест Тьюки)

Гексапептид YdAGFLR статистически значимо снизил долю нейтрофилов и повысил долю макрофагов в БАЛЖ в поздней фазе воспаления (48–72 часа), тогда же когда достигался максимальный эффект YdAGFLR на уровни внеклеточного HMGB1 в БАЛЖ, что согласуется с известными данными о HMGB1 как ко-активаторе хемотаксиса нейтрофилов [Venereau et al., 2013; Schiraldi et al., 2012].

Исследование влияния YdAGFLR на соотношение ацетилированных и неацетилированных форм HMGB1 в образцах БАЛЖ и легких мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких

Для проверки гипотезы, что эффект YdAGFLR на уровни внеклеточного HMGB1 связан с его действием на посттрансляционное ацетилирование остатков лизина в составе сайтов ядерной локализации NLS1 и NLS2 белка HMGB1, мышам линии C57BL/6Y с нелетальным острым воспалением легких вводили однократно ингаляционно YdAGFLR и с помощью ВЭЖХ-МС/МС определяли соотношение ацетилированных и неацетилированных (ацетил-К/К) форм триптических пептидов, полученных после обработки трипсином образцов БАЛЖ и легких, взятых во временной точке 48 часов (максимум секреции внеклеточного HMGB1).

Анализ выявил наличие триптических пептидов, соответствующих фрагментам HMGB1 26–29 (EHKK), 34–48 (ASVNFSEFSKKCSER), 179–183 (EKSKK) и 184–187 (KKEE), ацетилированных по остаткам $К^{28}$, $К^{44}$, $К^{182,183}$ и $К^{184,185}$, соответственно, где $К^{28}$ и $К^{44}$ относятся к сайту NLS1, а тандемы лизинов $К^{182,183}$ и $К^{184,185}$ относятся к сайту NLS2. Следует отметить, что уровни ацетилированных пептидов в образцах БАЛЖ и легких интактных животных были существенно ниже, чем у животных с индуцированным воспалением легких, и даже не обнаруживались в случае пептида KKEE.

Для соотношений ацетил-$К^{28}/К^{28}$ (пептид EHKK) и ацетил-$К^{44}/К^{44}$ (пептид ASVNFSEFSKKCSER), относящихся к сайту NLS1, двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил статистически значимый главный эффект фактора происхождения образца, БАЛЖ или легкое (P<0,0001), и главный эффект фактора введения препаратов ($F_{2,24}$=147,2; P<0,0001 для EHKK и $F_{2,24}$=36,22; P<0,0001 для ASVNFSEFSKKCSER) (Рисунок 4).

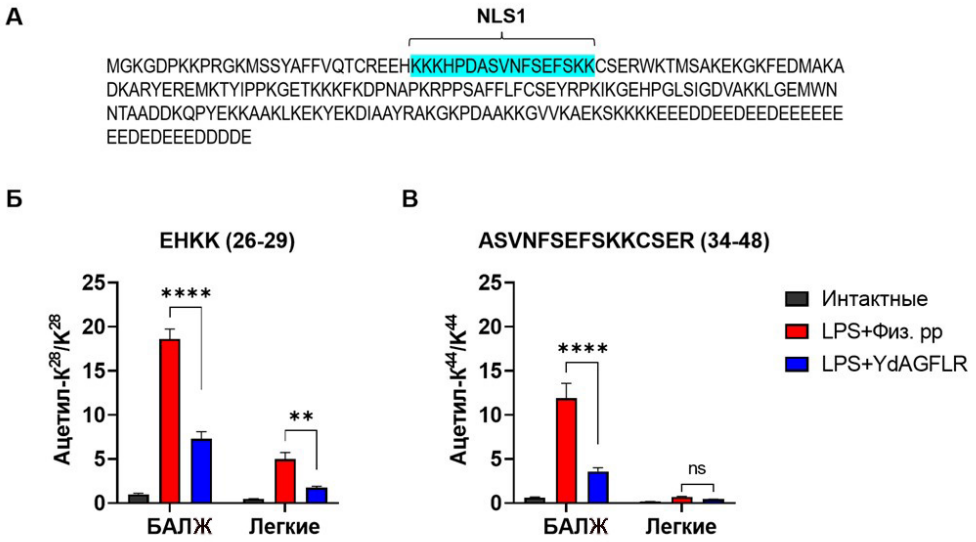


Рисунок 4 – Соотношение ацетилированных и неацетилированных форм триптических пептидов EHKK и ASVNFSEFSKKCSER, полученных трипсинолизом БАЛЖ и легких, и соответствующих фрагментам HMGB1 26–29 и 34–48. (А) Аминокислотная последовательность HMGB1 с выделенным сайтом NLS1. Соотношения ацетил-$К^{28}/К^{28}$ для EHKK (Б) и ацетил-$К^{44}/К^{44}$ для ASVNFSEFSKKCSER (В) в образцах БАЛЖ и легкого, полученных от интактных мышей линии C57BL/6Y и мышей с острым воспалением легких, получивших однократно физ. раствор (контроль) или 100 мкг/кг YdAGFLR. Столбцы – M±m (n=5) экспериментальных значений; ns – P>0,05; ** – P<0,01; **** – P<0,0001 по сравнению с LPS+Физ.pp (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест Сидака)

Апостериорный тест Сидака показал, что индукция острого воспаления легких вызвала повышение соотношений ацетил-$К^{28}/К^{28}$ и ацетил-$К^{44}/К^{44}$ в БАЛЖ в 18,6 (P<0,0001) и 19,8 раз (P<0,0001) соответственно, а в легких – в 10,0 (P=0,0002) и 4,4 раза (P=0,9354) соответственно, по сравнению с соответствующими значениями у здоровых интактных животных. Введение YdAGFLR снизило средние значения ацетил-$К^{28}/К^{28}$ и ацетил-$К^{44}/К^{44}$ в БАЛЖ в 2,6 (P<0,0001) и 3,3 (P<0,0001) раза соответственно, а в легких – в 2,8 (P=0,0059) и 1,7 (P=0,9902) раза соответственно, по сравнению с соответствующими контролями.

Для соотношений ацетил-$К^{182,183}/К^{182,183}$ (пептид EKSKK) и ацетил-$К^{184,185}/К^{184,185}$ (пептид KKEE), относящихся к сайту NLS2, двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил статистически значимый главный эффект фактора происхождения образца, БАЛЖ или легкое (P<0,0001), и главный эффект

фактора введения препаратов ($F_{2,24}$=30,13; P<0,0001 для EKSKK и $F_{2,16}$=53,83; P<0,0001 для KKEE) (Рисунок 5).

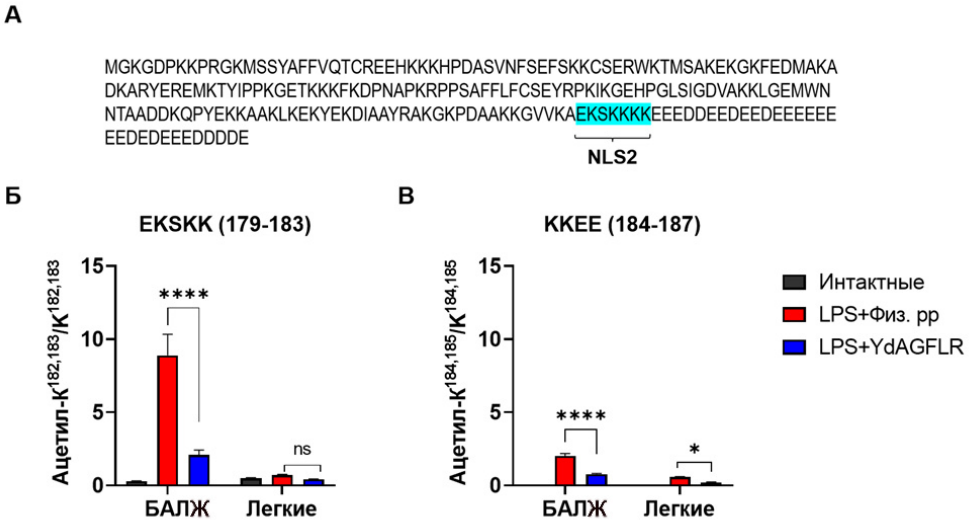


Рисунок 5 – Соотношение ацетилированных и неацетилированных форм триптических пептидов EKSKK и KKEE, полученных трипсинолизом БАЛЖ и легких, и соответствующих фрагментам HMGB1 179–183 и 184–187, соответственно. (А) Аминокислотная последовательность HMGB1 с выделенным сайтом NLS2. Соотношения ацетил-$К^{182,183}$/$К^{182,183}$ для EKSKK (Б) и ацетил-$К^{184,185}$/$К^{184,185}$ для KKEE (В) в образцах БАЛЖ и легкого, полученных от интактных мышей линии C57BL/6Y и мышей с острым воспалением легких, получивших однократно физ. раствор или 100 мкг/кг YdAGFLR. Столбцы – M±m (n=5) экспериментальных значений; ns – P>0,05; * – P<0,05; **** – P<0,0001 по сравнению с LPS+Физ.pp (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, тест Сидака)

Апостериорный тест Сидака показал, что введение YdAGFLR снизило средние значения ацетил-$К^{182,183}$/$К^{182,183}$ и ацетил-$К^{184,185}$/$К^{184,185}$ в БАЛЖ в 4,3 (P<0,0001) и 2,6 (P<0,0001) раза соответственно, а в легких – в 1,7 (P=0,9837) и 2,7 раза (P=0,0461) соответственно, по сравнению с соответствующими контролями. В целом, введение YdAGFLR снизило степень ацетилирования сайтов NLS1/NLS2 преимущественно во внеклеточном HMGB1 в БАЛЖ, что согласуется с известными данными о секреции именно ацетилированных форм HMGB1 [Bonaldi et al., 2003]. Таким образом, эффект YdAGFLR на уровни внеклеточного HMGB1 в условиях острого воспаления легких связан с его действием на уровни ацетилирования сайтов ядерной локализации NLS1/NLS2 в составе HMGB1.

Исследование влияния YdAGFLR на транскрипцию *Sirt1* и легких мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких

Для проверки гипотезы, что эффект YdAGFLR на ацетилирование сайтов ядерной локализации NLS1/NLS2 в составе HMGB1 может быть связан с транскрипцией гистоновой деацетилазы SIRT1, известным субстратом которой являются ацетилированные формы HMGB1 [Rabadi et al., 2015], мышам линии C57BL/6Y с нелетальным острым воспалением легких вводили однократно ингаляционно YdAGFLR и измеряли уровни мРНК SIRT1 в легких (Рисунок 6).

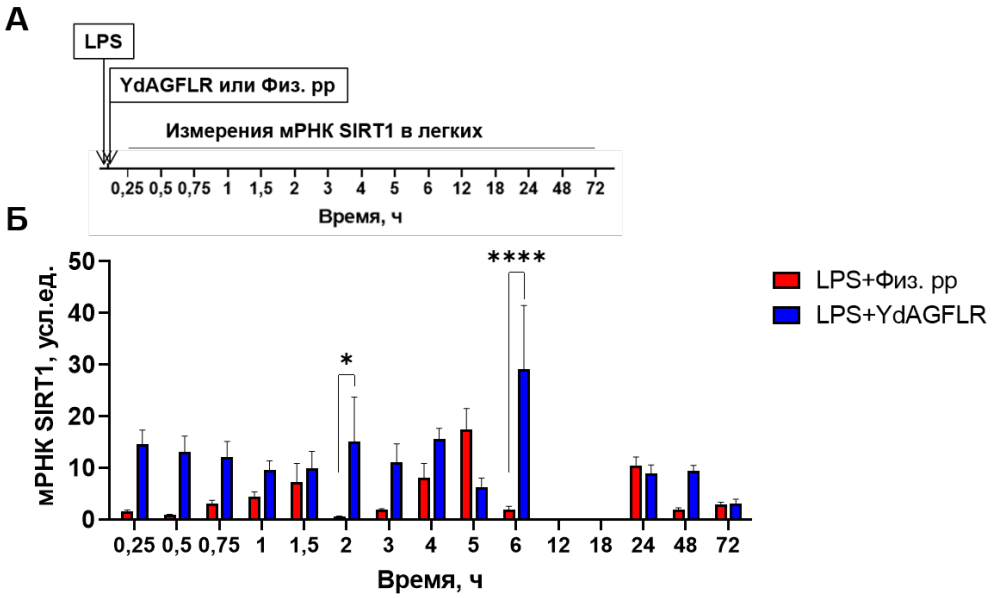


Рисунок 6 – Динамика уровней мРНК SIRT1 в легких мышей линии C57BL/6Y, получивших однократно ингаляционно 100 мкг/кг YdAGFLR (n=75) или Физ. раствор (n=75). (А) Схема эксперимента. (Б) Динамика уровней мРНК HMGB1 в легких. Столбцы – M±m (n=5) экспериментальных значений в указанных временных точках.
* – P<0,05; **** – P<0,0001 по сравнению с LPS+Физ.рр (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, тест Сидака)

Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил статистически значимый главный эффект фактора времени ($F_{14,112}$=3,082; P=0,0005), главный эффект фактора введения препаратов ($F_{1,8}$=34,10; P=0,0004) и статистически значимый эффект взаимодействия фактор времени × фактор введения препаратов ($F_{14,112}$=3,477; P=0,0001). Апостериорный тест Сидака показал, что YdAGFLR статистически значимо повысил уровни мРНК SIRT1 во временных точках 2 часа

(*P*=0,0385) и 6 часов (*P*<0,0001) по сравнению с контролем. Таким образом, YdAGFLR повышает транскрипцию гистоновой деацетилазы SIRT1 у мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких.

Исследование влияния налоксона на YdAGFLR-индуцированную транскрипцию *Sirt1* в легких мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких

Для проверки гипотезы, что эффект YdAGFLR на транскрипцию *Sirt1* может быть связан с его опиоидной активностью, мышам линии C57BL/6Y с острым воспалением легких вводили 100 мкг/кг YdAGFLR и измеряли уровни мРНК SIRT1 в легких в отсутствие или присутствие налоксона (5 мг/кг), неселективного антагониста опиоидных рецепторов (Рисунок 7).

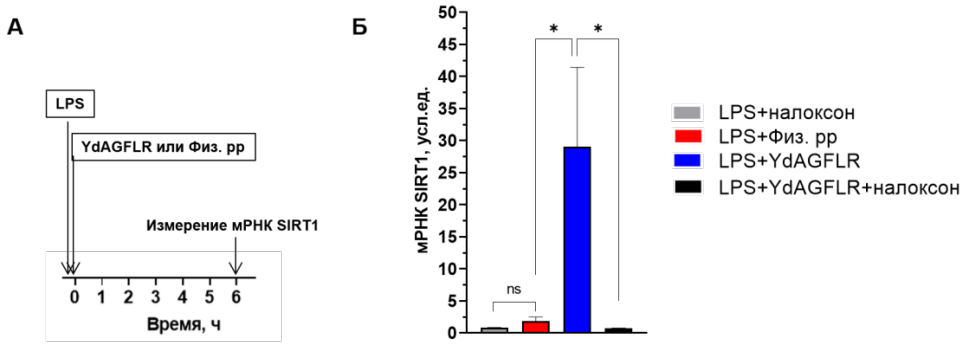


Рисунок 7 – Налоксон ингибирует эффект YdAGFLR на транскрипцию *Sirt1* в легких мышей линии C57BL/6Y с острым воспалением легких. (А) Схема эксперимента. (Б) Уровни мРНК SIRT1 в легких животных, получавших налоксон, физ. раствор, YdAGFLR или YdAGFLR с налоксоном. Столбцы – M±m (n=5) экспериментальных значений в указанной временной точке 6 ч. ns – *P*>0,05; * – *P*<0,05 (однофакторный дисперсионный анализ ANOVA, тест Тьюки)

Однофакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил наличие статистически значимых отличий между группами ($F_{3,16}$=5,097; *P*=0,0115). Апостериорный тест Тьюки показал, что налоксон статистически значимо ингибирует YdAGFLR-индуцированное повышение уровней мРНК SIRT1 (*P*=0,0239). Таким образом, эффект YdAGFLR на транскрипцию *Sirt1* связан с его опиоидной активностью.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящей работе впервые показано, что агонист δ-опиоидных рецепторов гексапептид YdAGFLR снижает уровни внеклеточного HMGB1, известного медиатора летального воспаления при сепсисе и пневмониях [Wang et al., 1999; Sivakorn et al., 2021], что может объяснить положительный эффект YdAGFLR на выживаемость животных в условиях острого воспаления легких. Полученные в настоящей работе результаты с учетом известных данных научной литературы позволяют составить схему влияния YdAGFLR на активную секрецию белка HMGB1 в условиях острого воспаления легких (Рисунок 8).

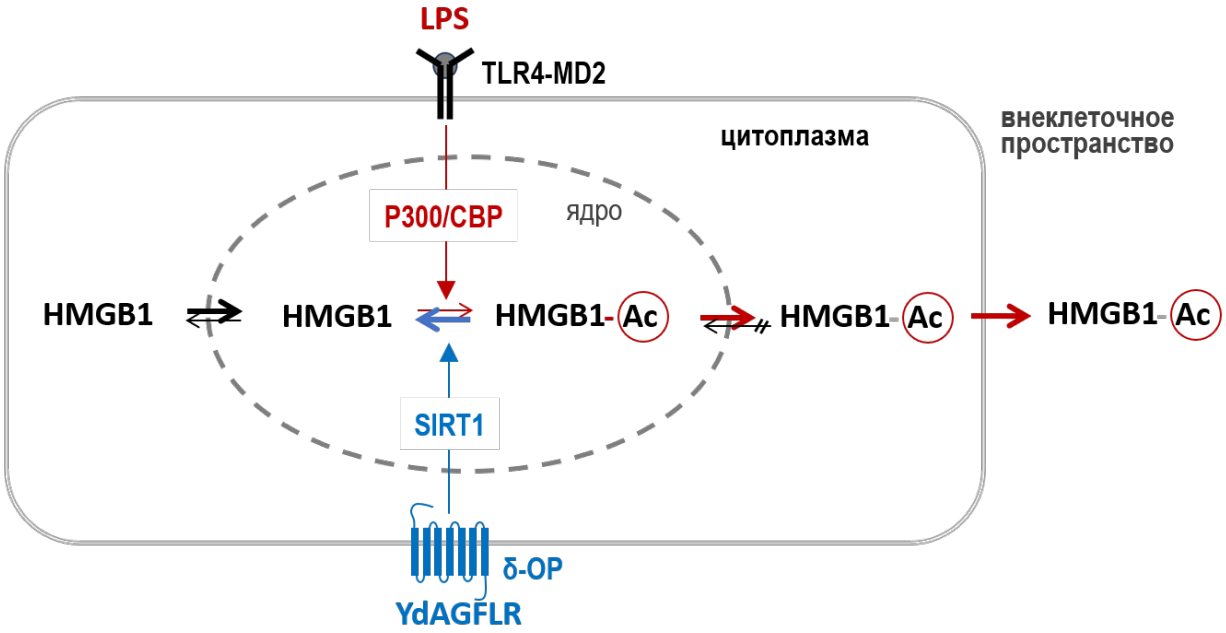


Рисунок 8 – Схема влияния гексапептида YdAGFLR на ацетилирование и секрецию белка HMGB1 в условиях острого воспаления легких. Связывание LPS с TLR4-MD2 [Shimazu et al., 1999] активирует ацетилтрансферазу p300/CBP [Cao et al., 2017] и запускает ацетилирование сайтов ядерной локализации NLS1 и NLS2 в составе HMGB1 [Bonaldi et al., 2003], что ведет к накоплению HMGB1 в цитоплазме и последующей секреции ацетилированных форм HMGB1 во внеклеточное пространство [Bonaldi et al., 2003]. Активация δ-опиоидного рецептора (δ-OP) YdAGFLR вызывает повышение транскрипции *Sirt1*, деацетилирование NLS1 и NLS2, восстановление способности HMGB1 к импорту из цитоплазмы в ядро, что в конечном итоге ведет к накоплению HMGB1 в ядре и снижению секреции HMGB1 во внеклеточное пространство

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе изучено влияние агониста δ-опиоидных рецепторов – гексапептида YdAGFLR на выживаемость животных, а также ацетилирование и секрецию белка HMGB1 в условиях моделирования острого воспаления легких у мышей линии C57BL/6Y.

Основной результат настоящей работы состоит в том, что впервые показано, что агонист δ-опиоидных рецепторов – гексапептид YdAGFLR статистически значимо снижает уровни внеклеточного HMGB1, известного медиатора летального воспаления, в условиях моделирования острого воспаления легких. С теоретической точки зрения, этот результат вносит вклад в расширение представлений о функциях периферической δ-опиоидной сигнализации и указывает на ее роль в регуляции иммунного ответа как защитного фактора, ограничивающего чрезмерный воспалительный ответ. С практической точки зрения, полученный результат указывает на возможность применения лекарственных средств, содержащих гексапептид YdAGFLR в качестве активного действующего вещества, для лечения заболеваний органов дыхания, характеризующихся повышенными уровнями внеклеточного HMGB1, таких как пневмония и ХОБЛ.

По результатам настоящего исследования можно сделать следующие выводы:

1. Гексапептид YdAGFLR статистически значимо снижает уровни внеклеточного HMGB1 по сравнению с контролем в условиях моделирования нелетального острого воспаления легких у мышей линии C57BL/6Y.

2. При курсовом введении YdAGFLR статистически значимо повышает выживаемость животных по сравнению с контролем в условиях моделирования летального острого воспаления легких у мышей линии C57BL/6Y, что согласуется с выявленным эффектом YdAGFLR на уровни внеклеточного HMGB1 и известной ролью внеклеточного HMGB1 как медиатора летального воспаления.

3. Гексапептид YdAGFLR статистически значимо снижает долю нейтрофилов в БАЛЖ мышей линии C57BL/6Y по сравнению с контролем в

условиях моделирования нелетального острого воспаления легких, что согласуется с известной функцией внеклеточного HMGB1 как ко-активатора хемотаксиса нейтрофилов в очаг воспаления.

4. Вызванный введением гексапептида YdAGFLR эффект снижения уровней внеклеточного HMGB1 в легких мышей линии C57BL/6Y в условиях моделирования нелетального острого воспаления легких связан со снижением доли ацетилированных по сайтам ядерной локализации NLS1 и NLS2 форм HMGB1.

5. Эффект снижения уровней ацетилированных форм HMGB1 под действием YdAGFLR в легких мышей линии C57BL/6Y в условиях моделирования нелетального острого воспаления легких связан с повышением транскрипции сиртуина 1, гистоновой деацетилазы III класса.

6. Эффект гексапептида YdAGFLR на транскрипцию сиртуина 1 обусловлен его опиоидной активностью, так как полностью ингибируется налоксоном, неселективным антагонистом опиоидных рецепторов.

7. Выявленный в настоящем исследовании эффект гексапептида YdAGFLR на ацетилирование и секрецию HMGB1 в условиях острого воспаления легких позволяет уточнить механизм защитного действия оригинального отечественного лекарственного препарата для лечения пневмонии COVID-19, в состав которого гексапептид YdAGFLR входит в качестве действующего вещества.

СПИСОК РАБОТ, ОПУБЛИКОВАННЫХ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

1. Inhaled [d-ala^2]-dynorphin 1-6 prevents hyperacetylation and release of high mobility group box 1 in a mouse model of acute lung injury / Karkischenko V.N., Gasanov M.T., Fokin Y.V., Nesterov M.S., Petrova N.V., **Alimkina O.V.**, Pomytkin I.A., Skvortsova V.I. // **Journal of Immunology Research.** – 2021. – Vol. 2021. – P. 10.

2. Лейтрагин повышает выживаемость животных в модели фатального острого респираторного дистресс-синдрома при профилактическом и лечебном режимах введения / Каркищенко В.Н., Помыткин И.А., Гасанов М.Т., Нестеров М.С., Фокин Ю.В., Табоякова Л.А., **Алимкина О.В.**, Хвостов Д.В. // **Биомедицина**. – 2020. – Т. 16. – № 4. – С. 44-51.

3. Цитологический анализ лёгочного материала мышей линии C57BL/6Y при моделировании острого респираторного дистресс-синдрома / **Алимкина О.В.**, Петренко А.Э. // **Биомедицина**. – 2021. – Т. 17. – № 3Е. – С. 17-22.

4. Биомоделирование лёгочных патологий посредством интратрахеальной инстилляции сенсибилизирующих веществ лабораторным животным / Табоякова Л.А., **Алимкина О.В.**, Огнева Н.С., Савченко Е.С. // **Биомедицина**. – 2021. – Т. 17. – № 3Е. – С. 95-98.

5. Анализ клеточного состава бронхоальвеолярного лаважа при моделировании и лечении острого респираторного дистресс-синдрома на мышах-биомоделях / **Алимкина О.В.**, Петренко А.Э., Савченко Е.С., Огнева Н.С., Табоякова Л.А., Максименко С.В., Скрипкина М.М., Борисова М.М. // **Биомедицина**. – 2021. – Т. 17. – № 3. – С. 17-22.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ацетил-К/К	–	Соотношения ацетилированных и неацетилированных остатков лизина
БАЛЖ	–	Жидкость бронхоальвеолярного смыва
ВЭЖХ-МС/МС	–	Высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией
ИВЛ	–	Искусственная вентиляция легких
ИФА	–	Иммуноферментный анализ
мРНК	–	Матричная рибонуклеиновая кислота
ОРДС	–	Острый респираторный дистресс-синдром
ПЦР	–	Полимеразная цепная реакция
СОП	–	Стандартные операционные процедуры
α-GalCer	–	α-галактозилцерамид
α7nAChR	–	α7 никотиновый ацетилхолиновый рецептор
COVID-19	–	Коронавирусное заболевание 2019 года
DADLE	–	Экспериментальный пептидный агонист δ-опиоидных рецепторов YdAGFdL
HMGB1	–	Белок бокс 1 группы высокой подвижности (от англ. High-Mobility Group Box 1)
IL-6	–	Интерлейкин-6
LPS	–	липополисахарид *E. coli*
PRR	–	Рецептор распознавания паттернов
SIRT1	–	Никотинамиддинуклеотид (NAD^+)-зависимая гистоновая деацетилаза сиртуин 1
SOFA	–	Шкала последовательной органной недостаточности
YdAGFLR	–	Гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинин ацетата