

ФЕДЕРАЛЬНОЕ ГОСУДАРСТВЕННОЕ БЮДЖЕТНОЕ УЧРЕЖДЕНИЕ НАУКИ
«НАУЧНЫЙ ЦЕНТР БИОМЕДИЦИНСКИХ ТЕХНОЛОГИЙ ФЕДЕРАЛЬНОГО
МЕДИКО-БИОЛОГИЧЕСКОГО АГЕНТСТВА»

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

Диссертация
на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Научный руководитель:
Доктор биологических наук
Помыткин Игорь Анатольевич

Москва – 2026

ОГЛАВЛЕНИЕ

ВВЕДЕНИЕ.....	4
ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ	12
1.1. Структура белка HMGB1	12
1.2. Посттрансляционные модификации белка HMGB1	15
1.3. Функции ядерного белка HMGB1	15
1.4. Роль ацетилирования в секрети ядерного белка HMGB1	17
1.5. Функции внеклеточного белка HMGB1	22
1.6. Внеклеточный белок HMGB1 – медиатор поздней фазы воспаления.....	25
1.7. Гексапептид YdAGFLR	30
1.8. Моделирование острого воспаления легких	31
1.9. Выводы по главе 1	33
ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ	35
2.1. Материалы	35
2.2. Животные.....	35
2.3. Моделирование летального острого воспаления легких, группы животных и введение препаратов	37
2.4. Моделирование нелетального острого воспаления легких, группы животных и введение препаратов	39
2.5. Сбор образцов жидкости бронхоальвеолярного смыва.....	41
2.6. Сбор образцов легочной ткани.....	41
2.7. Измерение концентраций HMGB1 в жидкости бронхоальвеолярного смыва ..	42
2.8. ПЦР в реальном времени	42
2.9. Трипсинолиз образцов легких и жидкости бронхоальвеолярного смыва	43
2.10. Анализ триптических пептидов методом ВЭЖХ-МС/МС	43
2.11. Статистический анализ.....	44
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ.....	45
3.1. Исследование влияния YdAGFLR на выживаемость мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких	45
3.2. Исследование влияния YdAGFLR на уровни HMGB1 в жидкости бронхоальвеолярного смыва мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких.....	48
3.3. Исследование влияния YdAGFLR на динамику транскрипции <i>Hmgb1</i> в легких мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких	49
3.4. Исследование влияния YdAGFLR на динамику изменений клеточного состава жидкости бронхоальвеолярного смыва в легких мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких	51

3.5. Исследование влияния YdAGFLR на соотношение ацетилированных и неацетилированных форм HMGB1 в образцах жидкости бронхоальвеолярного смыва и легких мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких..	55
3.6. Исследование влияния YdAGFLR на транскрипцию <i>Sirt1</i> и легких мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких	59
3.7. Исследование влияния налоксона, неселективного антагониста опиоидных рецепторов, на YdAGFLR-индуцированную транскрипцию <i>Sirt1</i> в легких мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких	60
ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ.....	63
ЗАКЛЮЧЕНИЕ	75
ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ.....	77
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ.....	78
СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ.....	81
ПРИЛОЖЕНИЕ А	101

ВВЕДЕНИЕ

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 [1]. В условиях воспаления белок HMGB1 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 белок HMGB1 играет роль позднего медиатора летального воспаления при сепсисе [2, 3]. С повышенными уровнями внеклеточного белка HMGB1 связано развитие тяжелой пневмонии у пациентов, инфицированных вирусом гриппа H1N1 [4]. Многократно повышенные уровни внеклеточного белка HMGB1 наблюдаются при COVID-19 [5] и положительно коррелируют с уровнями D-димера [6], тяжестью заболевания [7], более высоким баллом по шкале последовательной органной недостаточности (SOFA) (>10) и наличием септического шока или острого повреждения почек [8]. Кроме того, высокие уровни внеклеточного HMGB1 предсказывают смертность с точностью, сопоставимой с оценкой шкалы SOFA и оценкой риска шкалы COVID-GRAM [8]. Внеклеточный HMGB1 рассматривается как терапевтическая мишень для лечения COVID-19, так как уровни внеклеточного HMGB1 при COVID-19 могут достигать значений, наблюдаемых при фатальном сепсисе, а повышение сывороточного HMGB1 прямо коррелирует с тяжестью поражения легких, риском госпитализации, риском перехода на искусственную вентиляцию легких (ИВЛ) и риском смерти [9, 10]. Гипероксия и механический стресс в легких при ИВЛ также может служить причиной повышения уровней внеклеточного HMGB1 и возникновения так называемой вентилятор-ассоциированной пневмонии [11]. С учетом распространенности сепсиса как основной причины смерти пациентов в отделениях реанимации и интенсивной терапии во всем мире [12], а также жизнеугрожающего характера вирусных пневмоний, исследование факторов,

способных снижать уровни внеклеточного HMGB1, имеет высокую актуальность для разработки новых схем лечения и лекарственных средств, направленных на снижение рисков неблагоприятных клинических исходов при этих заболеваниях.

Степень разработанности темы исследования

Основным экспериментальным подходом к снижению уровней внеклеточного белка HMGB1 является его связывание в неактивные комплексы с моноклональными антителами и малыми молекулами, такими как кверцетин, глицирризин и дифлунизал [2, 13]. В рамках этого подхода, однако, до сих пор не зарегистрировано ни одного лекарственного средства. Альтернативой является создание блокаторов секреции HMGB1 клетками в условиях воспаления. Известный механизм секреции HMGB1 при воспалении включает активируемое множественное ацетилирование ядерного белка HMGB1, транслокация его в цитоплазму с последующим выходом во внеклеточное пространство [14, 15, 16]. Обратная реакция деацетилирования HMGB1 осуществляется гистоновыми деацетилазами, преимущественно никотинамиддинуклеотид (NAD⁺)-зависимой деацетилазой сиртуин 1 (SIRT1) [17, 18, 19]. Деацетилируя остатки лизина, SIRT1 препятствует секреции HMGB1 во внеклеточное пространство. Поэтому повышение активности SIRT1 рассматривается как перспективный подход к лечению воспалительных заболеваний и сепсиса. Аллостерические активаторы SIRT1 разрабатываются и широко изучаются на моделях воспаления, но также пока не вышли в клиническую практику [20, 21]. Еще одним подходом является активация некоторых внутриклеточных сигнальных путей. Так, активация $\alpha 7$ никотиновых ацетилхолиновых рецепторов ($\alpha 7$ nAChR) значительно снижает активную секрецию HMGB1 альвеолярными макрофагами [22], а также снижает повреждение легких и смертность в мышинной модели вентилятор-ассоциированной пневмонии [23]. Активация периферических δ -опиоидных рецепторов введением экспериментального пептидного агониста DADLE снижает уровни HMGB1 в сыворотке и повышает выживаемость крыс в модели сепсиса, вызванного перевязкой и перфорацией слепой кишки [24]. Хотя механизм действия DADLE на внеклеточные уровни HMGB1 неизвестен, 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 для исследования ацетилирования и секреции белка HMGB1 в условиях воспаления легких как клинически доказанный селективный агонист δ -опиоидных рецепторов [25], с превосходным профилем безопасности [26], раствор которого для ингаляционного введения 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 [27].

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 соответствует 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, а также 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 2025 г., 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 пять статей, из них четыре статьи в отечественных журналах из списка ВАК, входящих в «белый список» ВАК категории K1, и одна 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.

ГЛАВА 1. ОБЗОР ЛИТЕРАТУРЫ

1.1. Структура белка HMGB1

HMGB1 (англ. high-mobility group B1) – первый идентифицированный член семейства белков с высокой электрофоретической подвижностью [28]. В отличие от других членов семейства, экспрессия которых ограничена только некоторыми тканями, HMGB1 обнаруживается в норме во всех тканях млекопитающих, преимущественно в клеточных ядрах, но также и в цитоплазме, поскольку способен перемещаться между ядром и цитоплазмой. Ядерно-цитоплазматическое распределение HMGB1 зависит от типа ткани, стадии дифференцировки клеток, а также окислительно-восстановительного статуса самого белка [29]. Кроме того, HMGB1 может пассивно высвобождаться во внеклеточное пространство из поврежденных тканей после гибели клеток или активно секретироваться в ответ на провоспалительные стимулы и окислительный стресс [15, 16]. Внеклеточный HMGB1 относится к так называемым DAMP (англ. damage-associated molecular patterns), молекулярным паттернам индукторов воспаления, выделяемых тканями хозяина в ответ на повреждение.

HMGB1 – высококонсервативный белок, с молекулярной массой около 25 кДа, один из основных компонентов ядра эукариотов и самый распространенный негистоновый белок, содержание которого только в ~10 раз ниже, чем содержание гистона H1, и по оценкам достигает одного миллиона молекул на одну типичную клетку млекопитающих [26]. HMGB1 взаимодействует с ДНК, с межнуклеосомным (линкерным) участком, связывание с которым приводит к изгибу двойной спирали в месте связывания, облегчая взаимодействие с ДНК различных белков, в том числе транскрипционных факторов [31]. У HMGB1 отсутствует какая-либо специфичность к последовательности ДНК [31], но есть преимущественное связывание с участками ДНК с выраженными структурными нарушениями двойной спирали [32]. Ядерный HMGB1 участвует в процессах репарации,

транскрипции и репликации ДНК [33]. HMGB1 является незаменимым белком, и мыши с нокаутом HMGB1 погибают сразу после рождения с нарушениями в контроле транскрипции [14].

Первичная структура HMGB1 человека состоит из 215 аминокислот, из которых 43 приходится на остатки лизина (20%), 8 – остатки аргинина (3,7%), 20 – остатки аспарагиновой кислоты (9,3%) и 36 – остатки глутаминовой кислоты (16,7%) (Рисунок 1). Таким образом, доля основных аминокислот в структуре HMGB1 составляет 23,7%, а доля кислых аминокислот – 26,0%. Теоретическая изоэлектрическая точка HMGB1 составляет 5,62.

A

HMGB1 HUMAN

NLS1

MGKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREENK^{KKKHPDASVNFSEFSKK}CSE
 RWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYIPPKGETKKKFKDPNA
 PKRPPSAFFLCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQ
 PYEKKA^{AKLKEKYEKDIAAYRAK}GKPDAAKKG^{VVKA}E^{KS}KKKK^{EEEEED}
 EEDEEEDEEEDEEEDEEEEDDDDE

NLS2

Б

HMGB1 MOUSE

NLS1

MGKGDPKKPRGKMSSYAFFVQTCREENK^{KKKHPDASVNFSEFSKK}CSE
 RWKTMSAKEKGKFEDMAKADKARYEREMKTYI PPKGETKKK FKDPNA
 PKRPPSAFFLCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWNNTAADDKQ
 PYEKKA^{AKLKEKYEKDIAAYRAK}GKPDAAKKG^{VVKA}E^{KS}KKKK^{EEEEED}
 EEDEEEDEEEDEEEDEEEEDDDDE

NLS2

В

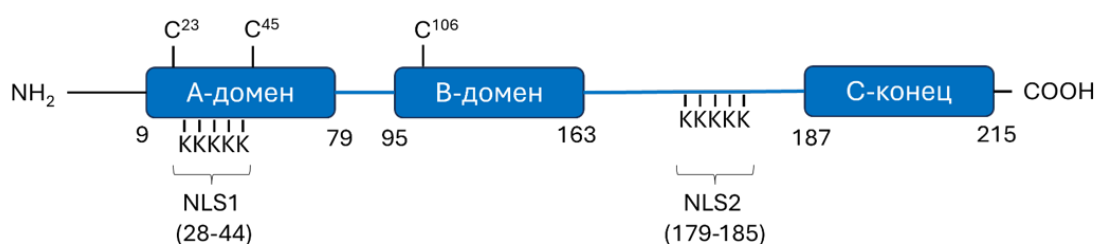


Рисунок 1 – Аминокислотная последовательность HMGB1 человека (А) и мыши (Б), и строение белка HMGB1 (В)

Аминокислотная последовательность HMGB1 мыши отличается от человеческой только двумя заменами в С-концевом фрагменте (E¹⁸⁹ вместо D¹⁸⁹ и D²⁰² вместо E²⁰²).

С функциональной точки зрения, структура HMGB1 состоит из короткого N-концевого фрагмента (аминокислоты 1 – 8), имеющего сайт связывания с гепарином и липополисахаридом (LPS), двух соединенных линкером положительно заряженных ДНК-связывающих домена, называемых А-бокс (аминокислоты 9 – 79) и В-бокс (аминокислоты 95 – 163), а также отрицательно заряженного С-концевого фрагмента (аминокислоты 187 – 215), содержащего последовательность остатков глутаминовой и аспарагиновой кислот [34]. Кроме того, белок HMGB1 содержит три остатка цистеина, два из которых C²³ и C⁴⁵ расположены в домене А, а C¹⁰⁶ – в домене В, и окислительный статус которых в значительной степени определяет биологическую активность HMGB1. Богатые остатками лизина и аргинина положительно заряженные домены А и В участвуют в неспецифическом связывании HMGB1 с сайтами ДНК [35]. С-концевой участок необходим для преимущественного связывания с изогнутой ДНК и гистонами [36, 28, 37]. Кроме того, отрицательно заряженный С-концевой фрагмент выступает в роли внутреннего регулятора, снижая возможность положительно заряженных доменов А и В связываться с ДНК одновременно. За счет взаимодействия доменов А/В и С-концевого фрагмента HMGB1 может находиться как в свернутом, так и развернутом состояниях. В свернутом HMGB1 С-концевой участок располагается в полости между положительно заряженными А и В доменами и взаимодействует с остатками R⁷², R¹⁶², K⁸¹, K¹⁶⁴ и I¹⁵⁸ [38], что способствует стабилизации молекулы в неактивном состоянии [39]. В развернутом состоянии молекула HMGB1 активна и способна связываться с ДНК и другими партнерами. Между этими состояниями существует динамическое равновесие. Удаление или инактивация С-концевого фрагмента может приводить к аномальному одновременному связыванию обоих доменов А и В с ДНК, хотя в норме в образовании комплекса HMGB1 с ДНК участвует лишь один домен из двух [40, 41]. Функции доменов А и В у внеклеточного HMGB1 отличаются. Домен В имеет сайты связывания с белком-адаптером, фактором дифференцировки миелоидных клеток 2 (MD2), в составе рецепторного комплекса с толл-подобным рецептором 4 (TLR4), что предопределяет провоспалительную активность HMGB1 [42]. Домен А действует

как естественный антагонист домена В, подавляя воспаление [43]. Кроме того, HMGB1 имеет два сайта связывания с рецептором конечных продуктов гликирования (RAGE) [42].

1.2. Посттрансляционные модификации белка HMGB1

Локализация и биологическая активность HMGB1 зависят от наличия посттрансляционных модификаций [44, 45, 46] (Таблица 1) и окислительного статуса остатков цистеина C²³, C⁴⁶ и C¹⁰⁶ [47, 48, 49].

1.3. Функции ядерного белка HMGB1

Ядерный HMGB1 играет роль незаменимого ДНК-шаперона. Уникальным свойством HMGB1 является независимая от последовательности ДНК способность связываться преимущественно с участками искаженной ДНК (изгибы, крестообразные структуры, одноцепочечные разрывы) и вызывать изгибы ДНК [73, 31]. Так, связывание HMGB1 с малой бороздкой и интеркаляция аминокислотных цепей HMGB1 (преимущественно ароматических аминокислот) в ДНК на участках связывания вызывает изгиб ДНК в сторону большой бороздки на угол до 90–130° [74]. Эта способность HMGB1 изгибать ДНК облегчает связывание ДНК с другими белками [75, 76].

HMGB1 также конкурирует с гистоном H1 за связывание с хроматином [76]. Взаимодействуя с хроматином, HMGB1 участвует в фундаментальных ядерных процессах, таких как регуляция транскрипции, репарация поврежденной ДНК и рекомбинация ДНК [77, 78, 79, 33].

Таблица 1 - Посттрансляционные модификации HMGB1

Модификация	Функции	Ссылки
Ацетилирование K ³ , K ⁷ , K ⁸ , K ¹²	- снижает заряд HMGB1; - подавляет ингибиторное связывание HMGB1 с гепарином, но ускоряет деградацию HMGB1 тромбином.	50
Ацетилирование K ²⁸ , K ²⁹ , K ³⁰ , K ⁴³ , K ⁴⁴ в составе NLS1 и K ¹⁸⁰ , K ¹⁸² , K ¹⁸³ , K ¹⁸⁴ , K ¹⁸⁵ в составе NLS2	- способствует накоплению HMGB1 в цитоплазме и дальнейшему выходу HMGB1 во внеклеточное пространство; - стимулирует аутофагию.	14, 47
Лактирование K	- повышает накопление HMGB1 в цитоплазме и уровень внеклеточного HMGB1.	51
Метилирование K ⁴³	- снижает связывание HMGB1 с ДНК; - способствует пассивной диффузии HMGB1 из ядра в цитоплазму.	44
Фосфорилирование S ³⁴ , S ³⁸ , S ⁴¹ , S ⁴⁵ , S ⁵²	- снижает заряд HMGB1; - снижает связывание HMGB1 с ДНК; - снижает обратный транспорт HMGB1 из цитоплазмы в ядро; - способствует транслокации HMGB1 из цитоплазмы во внеклеточное пространство.	52, 53
АДФ-рибозилирование S ¹⁸¹	- высвобождает HMGB1 из хроматина и ускоряет ацетилирование HMGB1 и транспорт HMGB1 во внеклеточное пространство, особенно при некрозе; - усиливает провоспалительный эффект HMGB1 за счет повышения выхода HMGB1 из клетки; - подавляет эффероцитоз, процесс удаления апоптотических нейтрофилов макрофагами, тем самым препятствуя разрешению воспаления.	54, 55, 56, 57
Гликозилирование N ³⁷ , N ¹³⁴ , N ¹³⁵	- снижает связывание HMGB1 с ДНК, но усиливает связывание HMGB1 с белком-экспортином CRM1 (англ. chromosomal maintenance 1), в целом повышая транспорт HMGB1 из ядра в цитоплазму.	58
Убиквитинирование, потенциальные сайты K ³⁰ , K ⁴³ , K ⁴⁴ , K ⁷⁶ , K ⁸² , K ⁹⁰ , K ¹¹² , K ¹¹⁴ , K ¹²⁷ , K ¹²⁸ , K ¹⁴¹ , K ¹⁴⁶ , K ¹⁴⁷ , K ¹⁵⁰	- вызывает деградацию HMGB1 через убиквитин-протеасомную систему; - подавляет внеклеточную активность HMGB1.	59, 60, 61, 62, 63
Дисульфидная связь C ²³ -S-S-C ⁴⁶ и восстановленный C ¹⁰⁶ -SH	- необходима для экспорта HMGB1 из ядра в цитоплазму; - обеспечивает связывание с рецепторным комплексом TLR4/MD2 и провоспалительную активность HMGB1, связанную с активацией ядерного фактора каппа В (NF-κB) и транскрипцией провоспалительных цитокинов.	35, 64, 65
Полностью восстановленные C ²³ -SH, C ⁴⁶ -SH, C ¹⁰⁶ -SH	- обеспечивает образование комплекса HMGB1 с хемокином CXCL12 и рецептором CXCR4, активирующего хемотаксис нейтрофилов и моноцитов; - обеспечивает связывание с рецептором RAGE и связанную с этим провоспалительную активность и аутофагию.	66, 67, 68
Полностью окисленные C ²³ -SO ₃ H, C ⁴⁶ -SO ₃ H, C ¹⁰⁶ -SO ₃ H	- потеря биологической активности HMGB1.	69, 70, 66, 71, 72

В многочисленных работах сообщается об участии HMGB1 в регуляции транскрипции различных генов как архитектурного ко-активатора транскрипционных факторов, таких как Oct4, HoxD9, p53, p73, NF-κB, Rel, SREBP-I и рецепторов стероидных гормонов [75]. Активирующий эффект HMGB1 достигается через изменение локальной архитектуры ДНК, что позволяет факторам транскрипции более эффективно связываться с целевыми последовательностями.

1.4. Роль ацетилирования в секреции ядерного белка HMGB1

Активная секреция клетками и пассивное высвобождение погибшими клетками из поврежденных тканей – два основных пути повышения концентрации внеклеточного HMGB1 [80]. В 1999 году Wang и соавт. впервые обнаружили, что культивированные макрофаги секретируют HMGB1 во внеклеточное пространство в больших количествах в условиях стимуляции LPS [2]. В 2003 году Bonaldi и соавт. показали, что критически важной стадией процесса секреции является ацетилирование остатков лизина в двух сайтах ядерной локализации 1 (NLS1) и 2 (NLS2), что ведет к накоплению HMGB1 в цитоплазме после транслокации HMGB1 из ядра в цитоплазму с участием белка-экспортера CRM1 из-за потери сайтами NLSs функции сигнала ядерной локализации и связанной с этим потерей способности HMGB1 к обратному переходу из цитоплазмы в ядро [14]. Сигнал NLS1 (аминокислоты 28–44) расположен в домене А белка HMGB1 и содержит пять остатков лизина – K²⁸, K²⁹, K³⁰, K⁴³ и K⁴⁴ [14]. Сигнал NLS2 (аминокислоты 179–185) расположен между доменом В и С-концевым фрагментом и содержит пять остатков лизина – K¹⁷⁹, K¹⁸², K¹⁸³, K¹⁸⁴ и K¹⁸⁵ [14]. Сигналы ядерного экспорта (NES), обеспечивающие связывание HMGB1 с CRM1, расположены в обоих доменах А и В [14]. CRM1 — наиболее хорошо изученный рецептор ядерного транспорта, известный также как экспортин 1 (XPO1), который переносит через ядерные поры из ядра в цитоплазму самые разнообразные белки, имеющие NES [82]. Для CRM1-зависимого транспорта белков, имеющих NES, также необходима

малая ГТФаза Ran. Комплекс CRM1/белок/Ran-ГТФ переносит NES-содержащий белок через ядерную пору, после чего гидролиз ГТФ инициирует диссоциацию комплекса, высвобождая белок в цитоплазме [81]. Обратный транспорт HMGB1 из цитоплазмы в ядро зависит от наличия свободных (неацетилированных) NLS1 и NLS2. Классический механизм импорта белка, имеющего сигналы NLSs, происходит с участием импортинов и включает образование в цитоплазме комплекса белка с гетеродимером импортин- α/β , транслокацию образовавшегося комплекса через ядерную пору в ядро, связывание комплекса с ГТФазой Ran и высвобождение белка в ядре. [82]. Ацетилирование NLS1 и NLS2 препятствует обратному транспорту HMGB1 из цитоплазмы в ядро с участием импортинов [83]. Согласно данным Bonaldi и соавт., скорость импорта свободного (неацетилированного) HMGB1 в ядро превышает скорость его экспорта из ядра, и по этой причине свободный HMGB1 преимущественно имеет ядерную локализацию, тогда как ацетилированный по сайтам NLS1 и NLS2 белок HMGB1 накапливается в цитоплазме [14].

Степень ацетилирования HMGB1 регулируется обратимыми *in vivo* процессами ацетилирования и деацетилирования. Ацетилирование остатков лизина в сайтах NLS1 и NLS2 белка HMGB1 происходит под действием p300/CBP ацетилтрансферазы из семейства гистоновых ацетилтрансфераз, что ведет к транслокации HMGB1 из ядра в цитоплазму и далее в внеклеточное пространство [14]. Обратная реакция деацетилирования HMGB1 осуществляется гистоновыми деацетилазами 1 (HDAC1), 4 (HDAC4) и 5 (HDAC5), снижение активности которых ведет к повышению секреции HMGB1 во внеклеточное пространство [84, 85]. Особую роль в деацетилировании HMGB1 в условиях воспаления играет ядерная никотинамиддинуклеотид (NAD⁺)-зависимая гистоновая деацетилаза III класса сиртуин 1 (SIRT1), для которой ацетилированная форма HMGB1 является одним из субстратов [86, 18, 19]. Повышение активности SIRT1 ведет к снижению транслокации HMGB1 из ядра в цитоплазму и далее во внеклеточное пространство, а снижение активности SIRT1, напротив, усиливает секрецию внеклеточного HMGB1. Так, трансфекция вектора, экспрессирующего SIRT1, привела к

значительному снижению степени ацетилирования HMGB1 в макрофагах RAW264.7, активированных LPS, и сопутствующему снижению транслокации HMGB1 из ядра в цитоплазму, тогда как фармакологическое подавление активности SIRT1, напротив, усилило LPS-индуцированное ацетилирование HMGB1 [18, 19]. С учетом роли внеклеточного HMGB1 как медиатора поздней фазы воспаления, активаторы SIRT1 рассматриваются как потенциально новый класс противовоспалительных средств [87].

Ацетилирование HMGB1 не является спонтанным процессом и находится под контролем сигнальных путей, наиболее изученным из которых является путь JAK/STAT1 с участием Янус киназы (JAK) и фактора транскрипции STAT1 (англ. signal transducer and activator of transcription 1). Этот путь активируется всеми интерферонами, такими как интерферон- α (IFN- α), - β (IFN- β) и - γ (IFN- γ), а также некоторыми интерлейкинами, преимущественно интерлейкином-6 (IL-6) и фактором некроза опухоли- α (TNF- α) [88]. В частности, интерфероны I типа связываются со специфическими рецепторами на поверхности клеток, что приводит к активации тирозинкиназы JAK и фосфорилированию STAT1 [89]. Фосфорилированные STAT1-белки образуют димеры и переходят в ядро, где связываются с ацетилтрансферазой p300/CBP [90]. После связывания с димером STAT1 ацетилтрансфераза p300/CBP автоацетируется (т.е., де-ингибируется), переходя в активную форму, способную ацетилировать внешние субстраты [91]. В частности, активация пути JAK/STAT1 интерфероном I типа ведет к гиперацетилированию HMGB1 и стимулирует переход HMGB1 в цитоплазму [15]. Этот механизм реализуется при активации толл-подобного рецептора 3 (TLR3) и TLR4, которые инициируют экспрессию интерферонов через активацию интерферон-регулирующего фактора 3 (IRF3) [91]. В случае TLR3, распознающего двухцепочечную РНК вирусов (dsRNA), экспрессия интерферонов является частью противовирусного ответа, тогда как в случае TLR4 экспрессия интерферонов может вызвать значительно более широкий круг лигандов, включая эндотоксин грамотрицательных бактерий LPS [92, 93], F-белок респираторно-синцитиального вируса [94], NS1-белок вируса Денге [95], компоненты внеклеточного матрикса,

такие как низкомолекулярная гиалуроновая кислота [96] и бигликан [97], HMGB1 [42], белки теплового шока HSP22 [98], HSP60 [99] и HSP70 [100], кальциневрин В [101], фибриноген [102], гетеродимер S100A8/A9 [103], и даже свободные жирные кислоты, в частности, пальмитиновая кислота [104]. Участие JAK/STAT1 сигнализации в TLR4-индуцируемой транслокации HMGB1 из ядра в цитоплазму доказывалось тем, что фармакологическое ингибирование JAK/STAT1 сигнализации ингибировало транслокацию HMGB1, индуцируемую LPS [15].

Окислительный стресс является наиболее общим неспецифическим фактором, вызывающим транслокацию HMGB1 в цитоплазму. H_2O_2 в интервале концентраций 12,5–125,0 μM дозозависимо стимулировала активную транслокацию HMGB1 из ядра в цитоплазму с участием экспортина CRM1 и последующим высвобождением HMGB1 во внеклеточное пространство из макрофагов и моноцитов [105]. N-ацетилцистеин, известная ловушка H_2O_2 , снижал секрецию HMGB1 в условиях гипоксии клетками печени *in vitro* [106]. Механистически, реакция H_2O_2 с HMGB1 ведет к образованию внутримолекулярной дисульфидной связи между C^{23} и C^{45} , появление которой при наличии восстановленной C^{106} является необходимым и достаточным условием для транслокации HMGB1 из ядра в цитоплазму [107]. Реакция частичного окисления HMGB1 катализируется пероксиредоксинами 1 (Prx1) и 2 (Prx2), которые сначала сами окисляются H_2O_2 , а затем окисляют C^{23} и C^{45} с образованием дисульфидного мостика в составе HMGB1. Дисульфидная форма HMGB1 имеет более высокую аффинность к экспортеру CRM1, чем восстановленная форма. Важность вышеуказанного процесса подчеркивается тем, что LPS-индуцированная секреция HMGB1 была значительно снижена у мышей с нокаутом *Prx1* и *Prx2* в экспериментах *in vitro* и *in vivo* [107].

По существующим представлениям, высвобождение HMGB1 во внеклеточное пространство осуществляется секреторными лизосомами, которые могут активироваться различными цитокинами, сигнальными путями и межклеточными взаимодействиями [80, 108].

На основе литературных данных представлена схема переноса HMGB1 из ядра в цитоплазму и наоборот в отсутствии воспаления (Рисунок 2), а также схема активной секреции HMGB1 во внеклеточное пространство в ответ на действие провоспалительных стимулов (Рисунок 3).

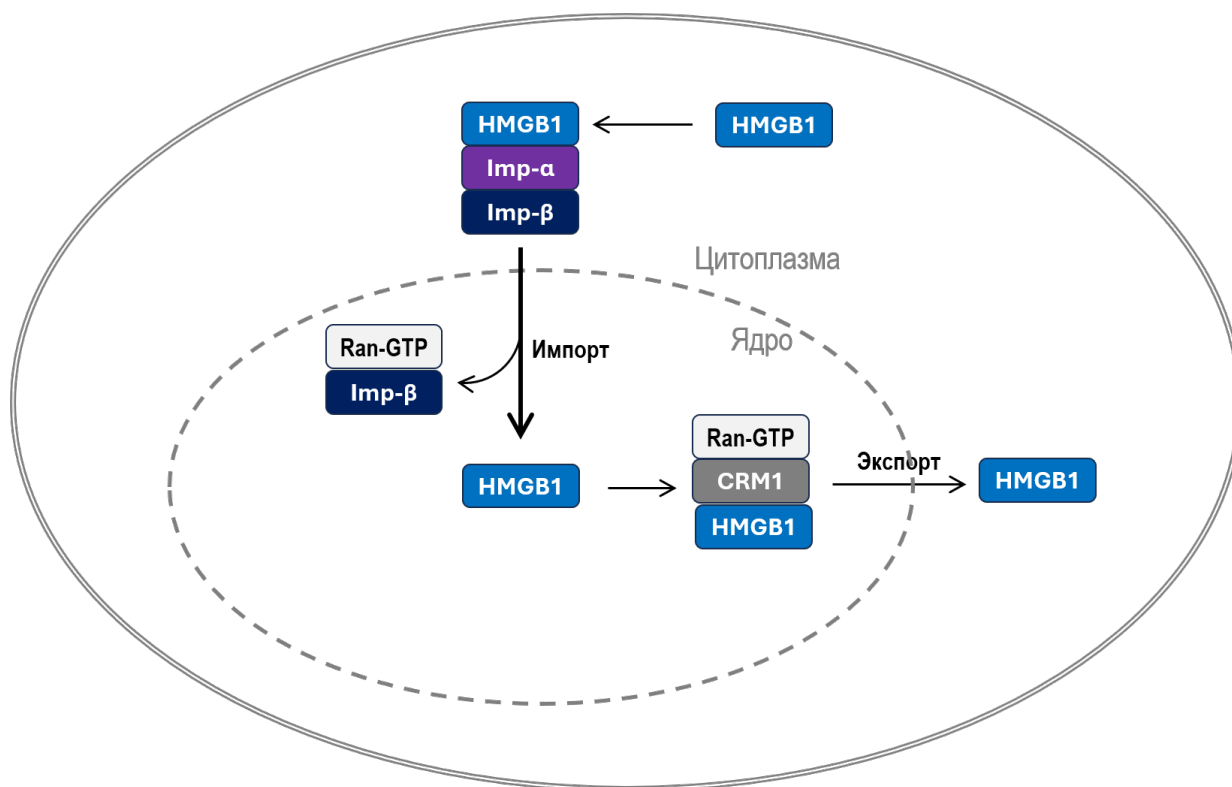


Рисунок 2 – Схема обратимого переноса HMGB1 из ядра в цитоплазму. Наличие сигналов ядерной локализации NLS1 и NLS2 в составе цитоплазматического HMGB1 обеспечивает образование тройного комплекса HMGB1 с импортинами α (Imp- α) и β (Imp- β), транслокацию этого комплекса в ядро и последующее высвобождение HMGB1 в ядре с участием ГТФазы Ran. Экспорт ядерного HMGB1 требует образования тройного комплекса с экспортином CRM1 и ГТФазой Ran, его переход в цитоплазму и высвобождение HMGB1 при гидролизе ГТФ. В норме – импорт превосходит экспорт, и HMGB1 преимущественно накапливается в ядре

Активная секреция HMGB1 из цитоплазмы во внеклеточную среду происходит по неклассическому механизму из-за отсутствия у белка N-концевой лидерной последовательности, необходимой для секреции по обычному пути с участием эндоплазматического ретикулума и аппарата Гольджи.

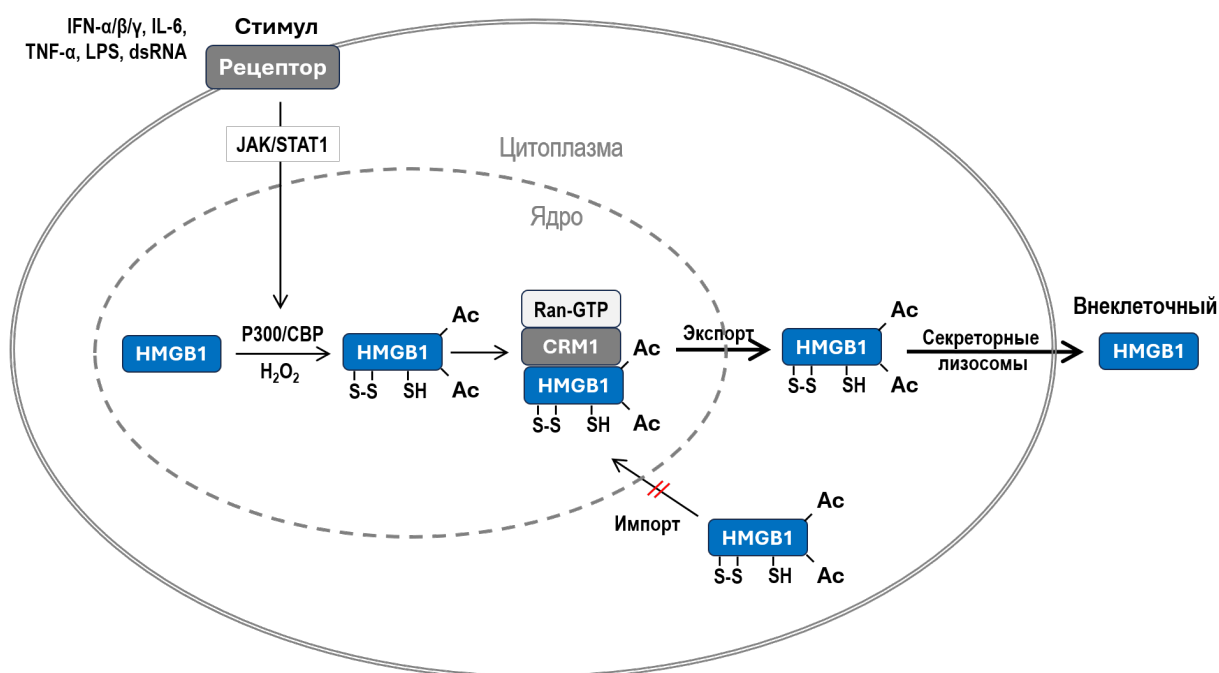


Рисунок 3 – Схема активной секреции HMGB1 во внеклеточное пространство в условиях воспаления. Выделяющаяся при окислительном стрессе H_2O_2 окисляет ядерный HMGB1 до дисульфида, после чего частично окисленная изоформа HMGB1 связывается с экспортином CRM1 и ГТФазой Ran в тройной комплекс и экспортируется из ядра в цитоплазму, где высвобождается. Активация JAK/STAT1 сигнализации провоспалительными стимулами ведет к активации ацетилтрансферазы p300/CBP и ацетилированию NLS1 и NLS2 в составе HMGB1. Потеря функциональных сигналов ядерной локализации запрещает образование комплексов с импортинами- α/β в цитоплазме и препятствует обратной транслокации HMGB1 из цитоплазмы в ядро, что способствует накоплению HMGB1 в цитоплазме. Последующая активная секреция HMGB1 из цитоплазмы во внеклеточное пространство происходит путем экзоцитоза секреторных лизосом в ответ на стимуляцию различными цитокинами, сигнальными путями и межклеточными взаимодействиями

1.5. Функции внеклеточного белка HMGB1

Биологические свойства внеклеточного белка HMGB1 определяются его способностью связываться с рецепторами и другими молекулами-партнерами и критически зависят от степени окисления остатков цистеина C^{23} , C^{45} и C^{106} . Классическим рецептором HMGB1 является TLR4 [109]. Связывание HMGB1 с TLR4 вызывает провоспалительный ответ с активацией главного регулятора воспаления транскрипционного фактора NF- κ B и секрецией провоспалительных

цитокинов и хемокинов [71]. Для полноценного связывания HMGB1 с TLR4 требуется наличие корцептора MD2 [71], восстановленного C¹⁰⁶ [109] и дисульфидного мостика C²³-SS-C⁴⁵, обеспечивающего высокое сродство этой частично окисленной изоформы HMGB1 комплексу TLR4-MD2. Снижение экспрессии MD2 значительно уменьшает HMGB1-индуцированную активацию NF-κB и последующую секрецию цитокинов фактора некроза опухоли-α (TNF-α) и интерлейкина-6 (IL-6) [71]. Полностью восстановленная изоформа HMGB1 с тремя цистеинами в тиольной форме теряет способность связывания с TLR4, но способна связываться с RAGE, другим классическим рецептором HMGB1, и также запускает провоспалительный ответ через активацию NF-κB и секрецию провоспалительных цитокинов [110, 111]. RAGE широко распространен в легких, где является одним из белков, ассоциированных с альвеолярными клетками I типа, которые покрывают более 95% внутренней поверхности легких [112, 113]. Экспрессия RAGE в легких еще более повышается при воспалении легких и ОРДС [114]. Кроме TLR4 и RAGE, доказанным партнером внеклеточного HMGB1 является хемокин CXCL12. Полностью восстановленная форма HMGB1 образует тройной комплекс с CXCL12 и рецептором хемокинов 4 (CXCR4), привлекая иммунные клетки в очаг воспаления [66, 67]. Следует отметить, что по-разному окисленные формы HMGB1 имеют разную стабильность в сыворотке и разное время жизни *in vivo*. Частично окисленная форма HMGB1 с дисульфидной связью C²³-SS-C⁴⁵ и восстановленным C¹⁰⁶ имеет период полувыведения 642 мин против 17 мин у полностью восстановленной формы HMGB1 [111] и, таким образом, является главной внеклеточной изоформой HMGB1, от которой зависит биологическая активность HMGB1 при воспалении.

Помимо провоспалительной активности внеклеточный HMGB1 может влиять на другие функции врожденной иммунной системы, в частности, на фагоцитоз и эффероцитоз. Альвеолярные макрофаги, один из основных типов клеток, обеспечивающих врожденный иммунитет в легких, отвечают за фагоцитоз и уничтожение вторгшихся патогенов до инфильтрации нейтрофилов [104]. На мышинной модели пневмонии, вызванной бактерией *P. aeruginosa*, было показано,

что нейтрализующие моноклональные антитела против HMGB1 снижают бактериальную нагрузку и повреждение легких [115]. Кроме того, альвеолярные макрофаги, выделенные из легких мышей, получавших антитела к HMGB1, обладали значительно более высокой фагоцитарной активностью, чем контрольные макрофаги, что указывает на HMGB1 как на фактор, нарушающий клиренс бактерий. В полном соответствии с этими данными, удаление гена HMGB1 в миелоидных клетках также привело к значительному улучшению элиминации спонтанной бактериальной инфекции у трансгенных мышей, моделирующих человеческий муковисцидоз [116]. Стимуляция рекомбинантным HMGB1 также привела к снижению фагоцитарной способности макрофагов *in vitro* [117]. Однако аккумуляция HMGB1 в ядре, напротив, улучшает функцию фагоцитоза у макрофагов [118] по механизму, включающему взаимодействие HMGB1 с p53 в ядре и снижение негативного влияния p53 на фосфорилирование фокальной адгезионной киназы (FAK), которая в фосфорилированном состоянии способствует образованию псевдоподий и повышает фагоцитарную способность макрофагов [119]. Внеклеточный HMGB1 подавляет еще одну форму фагоцитоза – эффероцитоз, т.е. фагоцитоз апоптотических клеток, через взаимодействие с маркерами апоптоза на поверхности клеток. Одним из основных мембранных маркеров апоптоза является фосфатидилсерин, который перераспределяется в направлении внешней стороны клеточной мембраны на ранней стадии апоптоза и становится доступным для распознавания и фагоцитоза макрофагами [120]. Было показано, что внеклеточный HMGB1 связывается с отрицательно заряженным фосфатидилсерином на поверхности апоптотических нейтрофилов, снижая эффероцитоз нейтрофилов *in vitro* и *in vivo*, и этот эффект снимается антителами к HMGB1 [121]. Кроме того, HMGB1 подавляет способность макрофагов к эффероцитозу, взаимодействуя с $\alpha_v\beta_3$ -интегрином на поверхности макрофагов [122], а также подавляя экспрессию Ras-зависимого ГТФ-связывающего белка 43 (Rab43), отвечающего за антероградный транспорт CD91 (англ. cluster of differentiation 91), который опосредует эндоцитоз и доставку лигандов в лизосомы [123]. Вызванное HMGB1 снижение клиренса апоптотических нейтрофилов в очаге

воспаления способствует увеличению продолжительности воспаления и вносит дополнительный вклад в HMGB1-индуцированное воспаление. Общие сведения о молекулах-партнерах HMGB1 суммированы в Таблице 2.

Таблица 2 – Партнеры внеклеточного белка HMGB1

Партнеры HMGB1	Функции комплекса с HMGB1	Ссылки
TLR2 (толл-подобный рецептор 2)	формирование воспалительного ответа	124
TLR4 (толл-подобный рецептор 4)	формирование воспалительного ответа	125, 126, 127, 128
TLR7 (толл-подобный рецептор 7)	формирование противовирусного ответа	128
TLR9 (толл-подобный рецептор 9)	формирование противовирусного ответа	129
CXCR4 (CD184)	усиление хемотаксиса	130
TIM-3 (Т-клеточный иммуноглобулин и муцин-3)	подавление противоопухолевого иммунитета через подавление доставки нуклеиновых кислот, маркеров опухолей, в эндосомы дендритных клеток	131, 132
RAGE	формирование воспалительного ответа	133, 134, 135, 136, 137
Фосфатидилсерин	снижение эффероцитоза апоптотических нейтрофилов	121
$\alpha_v\beta_3$ -Интегрин	снижение способности макрофагов к эффероцитозу	122

1.6. Внеклеточный белок HMGB1 – медиатор поздней фазы воспаления

Тяжелый сепсис и септический шок являются основными причинами смерти пациентов в отделениях реанимации и интенсивной терапии (ОРИТ) во всем мире [12]. Эта проблема возникает в результате чрезмерной иммунной реакции хозяина, связанной с системным воспалительным ответом, часто вызываемым грамотрицательной бактериальной инфекцией [138]. LPS, являясь структурным компонентом грамотрицательных бактерий, может вызывать секрецию и высвобождение множества «ранних» провоспалительных цитокинов, таких как TNF- α и IL-1 β , которые достигают пика в крови в течение первых часов после

заражения, затем их уровень в кровотоке возвращается к почти исходному уровню в течение трех-четырех часов [139]. В отличие от цитокинов, секреция внеклеточного HMGB1 иммунными клетками наблюдается позднее и HMGB1 впервые обнаруживается в кровотоке через восемь часов после начала летальной эндотоксемии и сепсиса, выходя на плато в интервале 16–32 ч [2]. Введение рекомбинантного HMGB1 мышам воспроизводит характерную органную дисфункцию тяжелого сепсиса, включая нарушение барьерной функции кишечника, острое повреждение легких и летальную полиорганную недостаточность [140, 3]. Введение антител к HMGB1, напротив, защищает мышей от летальной эндотоксемии в условиях экспериментального сепсиса, вызванного перевязкой и пункцией слепой кишки, даже если первые дозы вводились через 24 часа после начала сепсиса [2, 141, 142, 143]. В совокупности эти результаты подтверждают выводы Wang и соавт. [2] о том, что внеклеточный HMGB1 функционирует как поздний медиатор летального сепсиса и представляет собой ключевую мишень для клинического вмешательства при сепсисе и септическом шоке, возникающего, в том числе, как осложнение при пневмонии.

Повышенный уровень HMGB1 в сыворотке крови вызывается бактериями или вирусами как при внебольничной, так и при внутрибольничной пневмонии [144, 145, 115, 4, 146, 147, 148, 11, 149]. Оба рецептора – RAGE и TLR4 – играют роль в индукции воспалительного ответа при пневмонии, опосредованного внеклеточным HMGB1 [144, 115, 150].

Ряд клинических исследований были посвящены изучению причинно-следственной связи между уровнями внеклеточного HMGB1 и прогнозом у пациентов с внебольничной пневмонией (ВП). По данным Lu и соавт., сывороточный HMGB1 был связан с клиническими исходами и являлся независимым фактором риска 30-дневной смертности у пациентов с ВП, причем смертность была значительно выше у пациентов с высоким уровнем HMGB1 по сравнению с пациентами с низким уровнем HMGB1, на основании чего авторы предложили HMGB1 в качестве мишени для терапии ВП [151]. Gaïni и соавт. установили, что в когорте пациентов с ВП и сепсисом уровни внеклеточного

HMGB1 были статистически значимо выше у пациентов по сравнению со здоровым контролем [152]. Уровни HMGB1 в плазме и сыворотке пациентов с ВП в первые 24 часа после поступления в госпиталь были выше у инфицированных пациентов по сравнению со здоровой контрольной группой, а в группе с тяжелым сепсисом – были выше, чем в группе сепсиса, причем уровни HMGB1 коррелировали с уровнями IL-6, С-реактивного белка и количеством лейкоцитов и нейтрофилов [153]. Wang и соавт. исследовали связь между уровнями внеклеточного HMGB1 и тяжестью ВП, а также изменения уровней HMGB1 до и после лечения антибиотиками и показали, что HMGB1 в плазме коррелировал с индексом тяжести пневмонии ($r=0,566$, $p<0,001$), причем уровни HMGB1 в плазме были значительно повышены у пациентов с ВП по сравнению с контрольной группой, а лечение антибиотиками эффективно снижало уровни внеклеточного HMGB1 [154]. Angus и соавт. показали, что уровни HMGB1, измеряемые ежедневно в первую неделю у поступивших в госпиталь, были выше у людей с ВП, чем у здоровых лиц контрольной группы, выше у людей с внебольничной пневмонией с тяжелым сепсисом, чем у людей без тяжелого сепсиса, и выше у людей, не выживших после тяжелого сепсиса, чем у выживших, на основании чего авторы сделали вывод, что HMGB1 повышен почти у всех пациентов с ВП, и более высокий уровень циркулирующего HMGB1 связан со смертностью [145]. Wang и соавт. показали, что HMGB1 повышен в плазме пациентов с сепсисом независимо от природы бактериальной инфекции и наблюдался при инфицировании как грамм-положительными бактериями, такими как *Bacillus fragilis*, *Enterococcus faecalis*, *Streptococcus pneumoniae*, *Listeria monocytogenes* и *Staphylococcus aureus*, так и грамм-отрицательными бактериями, такими как *E. coli*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter calcoaceticus*, *Pseudomonas aeruginosa*, *Fusobacterium nucleatum* и *Citrobacter freundii* [2]. Deng и соавт. исследовали связь между уровнями внеклеточного HMGB1 и пневмонией, вызванной ишемическим инсультом, и показали, что повышение внеклеточного HMGB1 увеличивает вероятность возникновения пневмонии у пациентов с ишемическим инсультом [155].

Ряд исследований показали наличие причинно-следственной связи между тяжестью пневмоний, вызванных вирусными инфекциями, и повышенными уровнями внеклеточного HMGB1. Повышенные уровни внеклеточного HMGB1 были связаны с развитием тяжелой пневмонии у пациентов, инфицированных вирусом гриппа H1N1 [4], а также у пациентов с тяжелой бактериальной пневмонией, осложненной инфекцией вируса гриппа [146]. Наиболее изученной является связь между пневмонией COVID-19, вызываемой вирусом SARS-CoV-2, и уровнями внеклеточного HMGB1. В среднем, уровень HMGB1 в крови был увеличен в 11 раз у больных COVID-19 по сравнению со здоровым контролем [5]. Уровни сывороточного HMGB1 при COVID-19 положительно коррелировали с D-димером, были выше у умерших пациентов по сравнению с пациентами, выписанными на ранней легочной и гипервоспалительной фазе COVID-19 [6]. Кроме того, было показано, что уровень HMGB1 125,4 нг/мл является пороговым значением, превышение которого отличает пациентов с более высоким риском смерти [6]. Повышенные уровни HMGB1 в сыворотке и плазме пациентов с COVID-19 положительно коррелировали с уровнями провоспалительных цитокинов [156]. Внеклеточный HMGB1 вызывал воспалительные реакции, приводящие к воспалительному шторму, причем уровни HMGB1 в плазме и сыворотке у пациентов с COVID-19 положительно коррелировали с тяжестью заболевания [7]. Sivakorn и соавт. показали, что внеклеточный HMGB1 играет значимую роль в развитии «цитокинового шторма», центрального фактора патогенеза при тяжелом COVID-19, на момент поступления в ОРИТ [8]. Так, уровни HMGB1 в плазме были выше у пациентов с более высоким баллом по шкале последовательной органной недостаточности (SOFA) (>10) и наличием септического шока или острого повреждения почек. Кроме того, уровни HMGB1 в плазме были выше у пациентов с плохим статусом оксигенации ($PaO_2/FiO_2 < 150$ мм рт. ст.) и более длительной вентиляцией легких (>7 дней). Уровни HMGB1 в плазме при поступлении в ОРИТ также коррелировали с другими прогностическими маркерами, включая максимальное соотношение нейтрофилов и лимфоцитов, уровни D-димера и уровни С-реактивного белка, а также предсказывали

смертность с точностью, сопоставимой с оценкой шкалы SOFA и оценкой риска COVID-GRAM. Внеклеточный HMGB1 был предложен в качестве терапевтической мишени для лечения COVID-19 еще в 2020 году, когда в ранних исследованиях было установлено, что уровни внеклеточного HMGB1 при COVID-19 могут достигать значений, наблюдаемых при фатальном сепсисе, а повышение сывороточного HMGB1 прямо коррелирует с тяжестью поражения легких, риском госпитализации, риском перехода на искусственную вентиляцию легких и риском смерти [9, 10].

ИБЛ служит еще одной причиной повышения уровней внеклеточного HMGB1 в легких [11]. Повышенные уровни HMGB1 наблюдались в жидкости бронхоальвеолярного лаважа пациентов во время ИВЛ и вентилятор-ассоциированной пневмонии (ВАП), причем уровни HMGB1 были значительно выше у пациентов на длительной ИВЛ. Механизм повышения HMGB1 в легких при ИВЛ связан с воздействием гипероксии [118]. Так, гипероксия вызывала значительное повышение концентрации внеклеточного HMGB1 и увеличение смертности у мышей C57BL/6, инфицированных *Pseudomonas aeruginosa*, причем лечение этих мышей нейтрализующим моноклональным антителом против HMGB1 привело к снижению количества бактерий в легких и повышению фагоцитарной активности лейкоцитов по сравнению с контролем. Авторы указывают, что улучшенная фагоцитарная функция была связана с уменьшением концентрации внеклеточного HMGB1 в дыхательных путях [118]. Wang и соавт. показали, что длительное воздействие гипероксии может нарушить функции макрофагов и способствовать развитию вентилятор-ассоциированной пневмонии, а ингибирование высвобождения ядерного HMGB1 во внеклеточную среду способствует поддержанию функции макрофагов в условиях гипероксии [10]. Механистически, 24-часовая гипероксия вызывала гиперацетилирование HMGB1 в макрофагах, его последующую цитоплазматическую транслокацию и высвобождение [10]. Таким образом, гипероксия в условиях ИВЛ способствует высвобождению провоспалительного HMGB1 в БАЛЖ и за счет этого вызывает снижение фагоцитарной активности макрофагов.

Таким образом, внеклеточный белок HMGB1 является важным патогенетическим фактором сепсиса и воспалительных заболеваний легких, поэтому изучение механизмов секреции внеклеточного HMGB1 является актуальной задачей для поиска новых подходов, направленных на снижение тяжести этих заболеваний, снижение рисков развития сепсиса, полиорганной недостаточности и риска смертности, связанных с повышением уровней внеклеточного HMGB1.

1.7. Гексапептид YdAGFLR

Активация периферических δ -опиоидных рецепторов введением экспериментального пептидного агониста DADLE снижает уровни белка HMGB1 в сыворотке и повышает выживаемость крыс в модели сепсиса, вызванного перевязкой и перфорацией слепой кишки [24]. Хотя механизм действия DADLE на внеклеточные уровни HMGB1 неизвестен, сам факт снижения HMGB1 при сепсисе под действием DADLE ставит вопрос о роли опиоидной системы в модуляции воспалительного ответа с участием HMGB1. Опиоидная система млекопитающих представлена тремя классическими опиоидными рецепторами – μ (мю), δ (дельта) и κ (каппа) и неклассическим рецептором ноцицептина, а также эндогенными пептидными агонистами рецепторов, образующимися под действием пептидаз из крупных белков-предшественников, – проопиомеланокортина, проэнкефалина, продинорфина и проноцицептина [157]. Опиоидные рецепторы относятся к семейству GPCR (англ. G protein-coupled receptors) и обнаруживаются как в мозге, так и в периферических тканях, причем μ -рецепторы – преимущественно в мозге, желудочно-кишечном тракте и поджелудочной железе, δ -рецепторы – практически во всех тканях, за исключением печени, а κ -рецепторы – во всех исследованных тканях человека [158]. Все три классических опиоидных рецептора и все предшественники опиоидных пептидов экспрессируются иммунными клетками (макрофагами и лимфоцитами) [159], особенно при воспалении [160], что привело

к появлению гипотезы о локальном контроле воспалительной боли, когда выделяемые внутри очага воспаления в ответ на действие цитокинов опиоидные пептиды действуют на опиоидные рецепторы на окончаниях периферических сенсорных нервов и, тем самым, снижают болевую чувствительность в месте воспаления [27]. Обнаруженная способность агониста δ -опиоидных рецепторов DADLE снижать уровень внеклеточного HMGB1 в условиях моделирования сепсиса [24] позволяет по-новому взглянуть на роль опиоидной системы как возможного модулятора воспалительного ответа и ставит вопрос о возможном механизме такого действия.

Гексапептид YdAGFLR (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) – первый в мире терапевтический агонист δ -опиоидных рецепторов, вошедший в клиническую практику в 1987 году под названием «Даларгин» с показаниями к применению – лечение язв желудка и двенадцатиперстной кишки [26]. В дальнейшем эффективность Даларгина была доказана при лечении острого панкреатита и панкреонекроза [161], а в 2021 году раствор YdAGFLR для ингаляций был разрешен Минздравом России для лечения COVID-19 – заболевания, характеризующегося многократно повышенными уровнями внеклеточного HMGB1 [5]. YdAGFLR является селективным агонистом δ -опиоидных рецепторов, имеющим аффинность к δ -опиоидному рецептору 0,6 нМ, на порядок меньшую аффинность к μ -опиоидному рецептору (6,7 нМ) и еще меньшую аффинность к κ -опиоидному рецептору (>1000 нМ) [25]. С учетом всех этих обстоятельств, YdAGFLR является наиболее подходящим кандидатом среди других известных агонистов δ -опиоидных рецепторов для исследования механистических аспектов влияния опиоидной системы на секрецию HMGB1 в условиях воспаления.

1.8. Моделирование острого воспаления легких

Моделирование острого воспалительного повреждения легких (от англ. ALI – acute lung injury) и ОРДС у грызунов может быть вызвано гипероксией,

геморрагическим шоком, инфекционными агентами, а также молекулярными структурами патогена [162]. Релевантные модели острого воспаления легких построены на прямом инфицировании мышей линий C57BL/6J или BALB/c бактериями *Streptococcus pneumoniae* (инфекционная модель воспаления) или на интратрахеальном введении липополисахарида *E. coli* O55:B5 («стерильная» модель воспаления) [163]. Каждая из этих моделей имеет свои недостатки. Недостатком инфекционной модели воспаления легких является наличие специальных требований к проведению исследований в специализированных лабораторных помещениях, допускающих работу с инфекциями. Недостатком «стерильной» модели воспаления легких являются трудности с моделированием тяжелого и фатального воспаления легких. Последний недостаток может быть преодолен предварительной сенсibilизацией животных с использованием α -GalCer [164]. α -GalCer является стимулятором инвариантных натуральных Т-киллеров (iNKT), особой субпопуляции Т-клеток, которые в ответ на стимуляцию производят IFN- γ и усиливают иммунный ответ при последующем введении LPS. Еще более фатальное воспаление легких и ОРДС после сенсibilизации α -GalCer может быть вызвано одновременным введением сразу нескольких агонистов рецепторов распознавания паттернов (PRR). В частности, фатальное воспаление легких может быть вызвано одновременным введением LPS, активатора TLR4, и мурамилпептида, агониста рецептора NOD2 [165]. Эта модифицированная модель характеризуется тяжелым течением воспаления легких, признаками пневмонии и ОРДС и может быть использована для изучения влияния гексапептида YdAGFLR на выживаемость животных в условиях острого фатального воспаления легких и ОРДС.

1.9. Выводы по главе 1

1. HMGB1 – самый распространенный негистоновый ядерный белок, играющий роль незаменимого ДНК-шаперона, участвующего в процессах транскрипции генов, репарации и репликации ДНК.

2. В условиях воспаления белок HMGB1 переходит из ядра в цитоплазму и далее секретируется во внеклеточную среду, где выступает медиатором поздней фазы воспаления, связываясь с рецепторами TLR4 и RAGE.

3. Внеклеточный HMGB1 подавляет эффероцитоз апоптотических нейтрофилов, пролонгируя воспаление, а также вызывает иммунодефицитное состояние, подавляя фагоцитоз патогенов макрофагами.

4. Внеклеточный HMGB1 является фактором риска тяжелого течения воспаления, сепсиса, полиорганной недостаточности и смерти при бактериальных и вирусных пневмониях.

5. Необходимым условием активной секреции HMGB1 во внеклеточную среду является ацетилирование остатков лизина в сигналах ядерной локализации NLS1 и NLS2 белка.

6. Гистоновая деацетилаза III класса SIRT1 деацетилирует HMGB1 в условиях воспаления.

7. Имеется единичный пример снижения уровней внеклеточного HMGB1 в условиях моделирования сепсиса при использовании экспериментального агониста δ -опиоидного рецептора DADLE, что указывает на возможную роль опиоидной сигнализации в модулировании процессов, связанных с секрецией HMGB1.

8. Гексапептид YdAGFLR (Tyr-D-Ala-Gly-Phe-Leu-Arg) – терапевтический селективный агонист δ -опиоидных рецепторов, вошедший в клиническую практику в СССР в 1987 году в качестве активного действующего вещества в составе инъекционного лекарственного средства «Даларгин» с показаниями к применению в гастроэнтерологии, а также разрешенный Минздравом России в 2021 году в составе ингаляционного лекарственного средства «Лейтрагин» для

лечения COVID-19 – заболевания, характеризующегося многократно повышенными уровнями внеклеточного белка HMGB1.

ГЛАВА 2. МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

2.1. Материалы

Гексапептид YdAGFLR, химическое название – тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинин ацетата, брутто-формула $C_{35}H_{51}N_9O_8$, молекулярная масса 725,84 дальтон, регистрационный номер CAS 81733-79-1, в форме диацетата был приобретен в ООО “Бион” (Обнинск, Россия).

α -GalCer и липополисахарид *E. coli* 055:B5 (LPS) были получены в “Sigma-Aldrich” (“Merck”, Сент-Луис, Миссури, США). Набор для выделения РНК “RNA-extran” был приобретен у компании “Синтол” (Москва, Россия); набор для синтеза кДНК “REVERTA-L” был приобретен у компании “АмплиСенс” (Москва, Россия). Наборы трипсин/Lys-C были приобретены у “Promega” (Мэдисон, Вашингтон, США); коктейль из ингибиторов протеазы II (ab201116) был приобретен в компании “Abcam” (Кембридж, Массачусетс, США). Набор ELISA для определения мышинового HMGB1 был приобретен у “Cloud-Clone Corp.” (Ухань, Китай). Набор для окрашивания мазков крови получен в “Лаб-Медика” (Москва, Россия). Дексаметазон был приобретен у компании “KRKA” (Словения). Все остальные реагенты были приобретены у компании “Sigma-Aldrich” (“Merck”, Сент-Луис, Миссури, США).

2.2. Животные

Исследования проводились в Научном центре биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России) на мышах линии C57BL/6Y возрастом около 2,5 мес. начальной средней массой $20 \pm 2,0$ г. Животные были получены из филиала «Столбовая» ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Московская обл.). Мышей по 5 особей содержали в

микроизоляторной системе Rair Iso System. Животные соответствовали категории улучшенных конвенциональных. Животные получали стандартный комбикорм гранулированный полнораационный для лабораторных животных (экструдированный) ПК-120 ГОСТ Р 51849-2001 Р.5. Водопроводная очищенная вода всем животным давалась *ad libitum* в стандартных поилках. Животные содержались в контролируемых условиях окружающей среды при температуре воздуха 18–22°C, относительной влажности 60–70% и естественно-искусственном освещении с циклом 12/12. Вновь прибывшие животные находились на карантине 14 дней в клетках. В течение карантина проводили ежедневный осмотр каждого животного (поведение и общее состояние). Животные, не соответствующие критериям, были исключены из исследования в течение карантина. Перед началом исследования животные, отвечающие критериям включения в эксперимент, были распределены на группы методом рандомизации. В качестве критериев приемлемости рандомизации считали отсутствие внешних признаков заболеваний и гомогенность групп по массе тела.

Животным, отобранным в группы исследования, присваивался индивидуальный номер. Каждая клетка с группой мышей маркировалась с учетом названия группы, пола животных, даты начала введения веществ. Животных маркировали с помощью меток на хвосте.

Все эксперименты были одобрены биоэтической комиссией ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Протокол № 11 от 14 мая 2020 года) и проводились с соблюдением требований стандартных операционных процедур (СОП) ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, руководств и Национальных стандартов:

- ГОСТ 33044–2014 Принципы надлежащей лабораторной практики. – М.: Стандартиформ, 2015. – 16 с.;
- Решение Совета Евразийской экономической комиссии от 3 ноября 2016 г. № 89 «Об утверждении Правил проведения исследований биологических лекарственных средств Евразийского экономического союза»;

- Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ, 2-е изд. – М.: ОАО «Издательство «Медицина», 2005. – 832 с.;
- Руководство по лабораторным животным и альтернативным моделям в биомедицинских исследованиях / под ред. Н.Н. Каркищенко, С.В. Грачева. – М.: Профиль–2С, 2010. – 358 с.

2.3. Моделирование летального острого воспаления легких, группы животных и введение препаратов

Для изучения эффекта гексапептида YdAGFLR на выживаемость животных использовалась модель летального острого воспаления легких и ОРДС у мышей линии C57BL/6Y, характеризующаяся диффузным альвеолярным повреждением легких и многократным повышением мРНК и белка IL-6 в тканях легкого [165]. Мышам вводили α -GalCer ингаляционно в дозе 1 мкг/мышь и через 24 часа под общим наркозом (Золетил в дозе 80 мг/кг и Ксилазин в дозе 4 мг/кг) интратрахеально вводили смесь липополисахарида *E. coli* 055:B5 в дозе 300 мкг/мышь, 100 мкг/мышь мурамилпептида и 10 мкл/мышь полного адьюванта Фрейнда. В ложнооперированной группе животным вводили ингаляционно физ. раствор и через 24 часа под общим наркозом вводили физ. раствор интратрахеально. Сразу после проведения хирургического вмешательства подкожно вводился Антиседан в дозе 2,5 мг/кг. В постоперационном периоде выполняли ежедневный подробный клинический осмотр животного в клетке содержания, в руках и на открытой площадке, при этом отмечали проявление и выраженность признаков интоксикации, оценивали общее состояние животных, особенности их поведения, интенсивность, характер двигательной активности, наличие и характер судорог, тонус скелетных мышц, реакцию на тактильные, болевые, звуковые и световые раздражители, частоту и глубину дыхательных

движений, состояние волосяного и кожного покрова, положение хвоста, количество и консистенцию фекальных масс, частоту мочеиспускания.

Оценка пригодности модели: мыши-самки линии C57BL/6Y были распределены методом рандомизации в 3 группы по 10 особей в каждой. В первой (ложнооперированной) группе, через 30 мин после интратрахеального введения физ. раствора и далее ежедневно один раз в день, пять дней подряд, животным вводили физ. раствор внутримышечно. Во второй группе, через 30 мин после индукции ОРДС и далее ежедневно один раз в день, пять дней подряд, животным вводили физ. раствор внутримышечно. В третьей группе, через 30 мин после индукции ОРДС и далее ежедневно один раз в день, пять дней подряд, животным вводили дексаметазон внутримышечно в дозе 1,5 мг/кг в 10 мкл раствора. Выживаемость животных отслеживали в течение 144 часов (6 суток).

Для оценки эффекта курсового введения гексапептида YdAGFLR в режиме лечения на выживаемость животных мыши-самки линии C57BL/6Y были распределены методом рандомизации в 4 группы по 20 особей в каждой. В первой и второй группах животные не подвергались оперативному вмешательству и получали, соответственно, физ. раствор внутримышечно ежедневно однократно или гексапептид YdAGFLR внутримышечно в дозе 10 мкг/кг и ингаляционно внутрилегочно в дозе 100 мкг/кг. В третьей группе, через 30 мин после индукции ОРДС и далее ежедневно один раз в день до окончания эксперимента, животные получали физ. раствор внутримышечно. В четвертой группе, через 30 мин после индукции ОРДС и далее ежедневно один раз в день до окончания эксперимента, животные получали раствор гексапептида YdAGFLR в физ. растворе внутримышечно в дозе 10 мкг/кг и ингаляционно внутрилегочно в дозе 100 мкг/кг. Выживаемость животных отслеживали в течение 336 часов (14 суток).

2.4. Моделирование нелетального острого воспаления легких, группы животных и введение препаратов

Для изучения механистических аспектов действия гексапептида YdAGFLR использовалась модель нелетального острого воспаления легких у мышей линии C57BL/6Y. Каждой мыши вводили 100 мкл α -GalCer в концентрации 10 мкг/мл (50 мкг/кг), а через 24 часа под общим наркозом (Золетил в дозе 80 мг/кг и Ксилазин в дозе 4 мг/кг) вводили интратрахеально 50 мкл липополисахарида *E. coli* 055:B5 (LPS) в концентрации 6 мг/мл (доза 15 мг/кг) (Рисунок 4) [166]. Ложнооперированным животным вводили физ. раствор вместо α -GalCer и LPS.

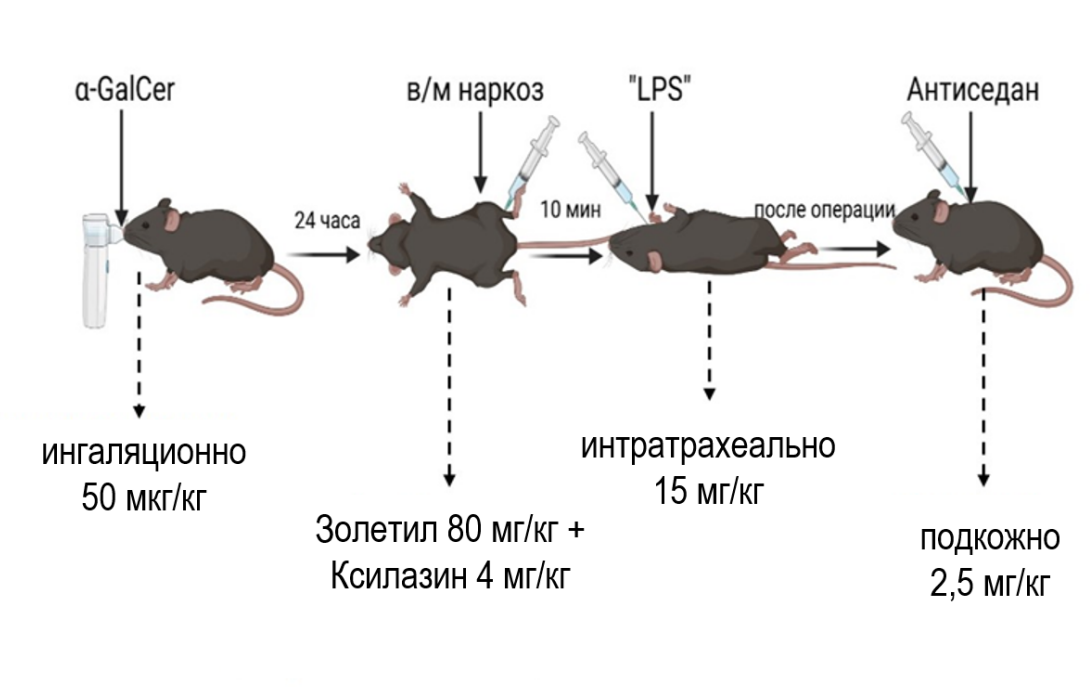


Рисунок 4 – Схема моделирования нелетального острого воспаления легких

В первой когорте, для оценки влияния однократного введения YdAGFLR на секрецию HMGB1 в легких и ацетилирование HMGB1 по остаткам лизина в сайтах ядерной локализации NLS1/NLS2, мыши-самцы линии C57BL/6Y были рандомизированы в две группы по 27–29 животных в каждой. Животным в обеих группах моделировали нелетальное острое воспаление легких. Через 30 мин после интратрахеального введения LPS животным однократно вводили ингаляционно

физ. раствор (100 мкл/мышь) или YdAGFLR в дозе 100 мкг/кг в 100 мкл физ. раствора. Во временных точках 0,25; 0,75; 1,5; 3; 12; 18; 24; 48 и 72 часа после введения YdAGFLR или физ. раствора у трех-четырех мышей из каждой группы под анестезией (Золетил в дозе 80 мг/кг и Ксилазин в дозе 4 мг/кг) после эвтаназии путем смещения шейных позвонков брали пробы легких и жидкости бронхоальвеолярного смыва.

Во второй когорте, для оценки влияния однократного введения YdAGFLR на транскрипцию *Hmgb1* и *Sirt1*, клеточный состав БАЛЖ, мыши-самцы линии C57BL/6Y были рандомизированы в две группы по 75 особей в каждой. Животным в обеих группах моделировали нелетальное острое воспаление легких. Через 30 мин после интратрахеального введения LPS животным однократно вводили ингаляционно физ. раствор (100 мкл/мышь) или YdAGFLR в дозе 100 мкг/кг в 100 мкл физ. раствора. Во временных точках 0,25; 0,5; 0,75; 1; 1,5; 2; 3; 4; 5; 6; 12; 18; 24; 48 и 72 часа после введения YdAGFLR или физ. раствора у пяти мышей из каждой группы под анестезией (Золетил в дозе 80 мг/кг и Ксилазин в дозе 4 мг/кг) после эвтаназии путем смещения шейных позвонков брали пробы легких и БАЛЖ.

В третьей когорте, для оценки роли опиоидных рецепторов в эффекте YdAGFLR на транскрипцию *Sirt1* в модели нелетального острого воспаления легких, мыши-самцы линии C57BL/6Y были рандомизированы в четыре группы по 5 особей в каждой. В первой группе через 30 мин после введения LPS животным однократно вводили внутрибрюшинно налоксон в дозе 5 мг/кг и ингаляционно физ. раствор (100 мкл/мышь). Во второй группе через 30 мин после введения LPS животным однократно вводили ингаляционно физ. раствор (100 мкл/мышь). В третьей группе через 30 мин после введения LPS животным однократно вводили YdAGFLR ингаляционно в 100 мкл физ. раствора. В четвертой группе через 30 мин после введения LPS животным однократно вводили налоксон в дозе 5 мг/кг и YdAGFLR в дозе 100 мкг/кг ингаляционно в 100 мкл физ. раствора.

2.5. Сбор образцов жидкости бронхоальвеолярного смыва

Образцы БАЛЖ были получены следующим образом: после разреза в трахею вводили пластиковую канюлю, дыхательные пути промывали с использованием 1,0 мл физ. раствора (4 раза по 0,25 мл). Затем образцы БАЛЖ центрифугировали ($1000 \times g$ в течение 5 мин) при комнатной температуре. Содержание белка в надосадочной жидкости определяли количественно с помощью анализа по Брэдфорду. Образцы БАЛЖ делили на аликвоты и хранили при температуре -80°C до проведения анализа.

Для определения клеточного состава БАЛЖ использовали осадок, который распределяли на предметном стекле с последующим окрашиванием набором красителей Лейкодиф 200 (“Erba Lachema”, Чехия). Далее окрашенные мазки микроскопировали с помощью микроскопа MT4300L (Япония) с подсчетом клеток на лабораторном счетчике.

2.6. Сбор образцов легочной ткани

Легкие были вырезаны, образцы легких массой 100-150 мг сырого веса были гомогенизированы в 600 мкл буфера, состоящего из Трис 0,5 М, NaCl 0,15 М, NP-40 0,5% и коктейля протеаз Protease Inhibitor Cocktail II (ab201116) при 6500 об/мин в течение 50 сек с использованием ротора MagNa Lyser (“Roche Diagnostics”, Мангейм, Германия) и с последующим перемешиванием при 120 об/мин в течение 30 мин. Образцы центрифугировали ($5000 \times g$ в течение 5 мин) при комнатной температуре и собирали супернатант. Содержание белка определялось количественно с помощью анализа Брэдфорда, образцы разделялись на аликвоты и хранились при температуре -80°C до проведения анализа.

2.7. Измерение концентраций HMGB1 в жидкости бронхоальвеолярного смыва

Концентрации HMGB1 в образцах БАЛЖ измеряли с использованием набора ИФА для определения мышинового HMGB1 (“Cloud-Clone”, Ухань, Китай) в соответствии с инструкциями производителя и выражали в пг/мл.

2.8. ПЦР в реальном времени

Общую РНК выделяли из образцов легких с помощью набора RNA-extran (“Синтол”, Москва, Россия) и подвергали обратной транскрипции в комплементарную ДНК с помощью набора REVERTA-L (“АмплиСенс”, Москва, Россия) в соответствии с инструкциями производителя. Реакции ПЦР в реальном времени были выполнены с использованием CFX96 Touch Real-Time (“Bio-Rad Laboratories”, Калифорния, США). Последовательности олигонуклеотидных праймеров и флуоресцентных зондов, использованных в исследовании, показаны в Таблице 3.

Таблица 3 – Олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентные зонды

Ген	Праймеры и зонды
<i>Sirt1</i>	f: 5'-TCC TTG GAG ACT GCG ATG TT-3' r: 5'-ATG AAG AGG TGT TGG TGG CA-3' z: ROX-TGA GTT GTG TCA TAG GCT AGG TGG T-BHQ2
<i>Hmgb1</i>	f: 5'-GGG TTG TAA ATT GGC ATG GA-3' r: 5'-GTC AAC AAA ACA GCC GCA AT-3' z: ROX-AGT TAT ATA TGG GGA CAG TAG TTT G-BHQ2

Экспрессия мРНК целевого гена была рассчитана относительно гена домашнего хозяйства *GAPDH*. Результаты представлены в виде среднего кратного изменения экспрессии мРНК гена-мишени, рассчитанного путем деления

индивидуального уровня экспрессии у мышей, получавших YdAGFLR или физ. раствор, на средний уровень экспрессии у здоровых интактных мышей (n=5).

2.9. Трипсинолиз образцов легких и жидкости бронхоальвеолярного смыва

Образцы БАЛЖ и легких, собранные через 48 часов после ингаляционного введения YdAGFLR или физ. раствора, а также от интактных мышей, подвергались трипсинолизу при 37°C в течение 18 часов с использованием набора Trypsin/Lys-C (“Promega”, Мэдисон, Вашингтон, США) в соответствии с инструкциями производителя. Каждый образец центрифугировали ($5000 \times g$) при комнатной температуре в течение 5 мин и использовали для анализа методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с tandemной масс-спектрометрией высокого разрешения (ВЭЖХ-МС/МС).

2.10. Анализ триптических пептидов методом ВЭЖХ-МС/МС

Пептиды, полученные в результате трипсинолиза БАЛЖ и легких (триптические пептиды), разделяли ВЭЖХ в каждом образце (10 мкл) с линейным градиентом от 97% буфера А (0,1% муравьиной кислоты в воде) и 3% буфера В (0,1% муравьиной кислоты в ацетонитриле) до 30% буфера А и 90% буфера В в течение 45 мин на колонке Poroshell 120 EC-C18 перед детекцией с использованием ВЭЖХ-МС/МС на приборе Agilent Technologies 1290 Infinity UHPLC, оснащенный времяпролетным детектором Agilent 6545 XT AdvanceBio LC/Q-TOF (“Agilent Technologies”, Санта-Клара, Калифорния, США). Ионизацию проводили электрораспылением (ESI) в положительном режиме с использованием источника DuoJet Stream ESI и ионной воронки. Анализы проводились в режиме полного сканирования МС, а также в автоматическом режиме МС/МС в диапазоне масс m/z 100-1700. Для калибровки внутренней массы на протяжении всего анализа

использовались эталонные растворы пурина ($[M + H]^+ = 121,0509$) и соединения HP0921 компании “Agilent” ($[M + H]^+ = 922,0098$). Данные обрабатывались с помощью программного обеспечения Agilent MassHunter Workstation (Agilent B.08.01). Все интегрированные пики были проверены вручную для обеспечения правильной идентификации пиков и точной интеграции. Программа MassHunter BioConfirm (Agilent B.09.00) использовалась для выведения последовательности пептида, полученного трипсинолизом, и установления его посттрансляционных модификаций путем поиска спектров MS/MS по базам данных последовательностей белков. Соотношения ацетилированных и неацетилированных остатков лизина (ацетил-K/K) в составе триптических пептидов рассчитывали на основе интенсивности ионов MS (или площади пика) для выбранных пептидов в данном образце.

2.11. Статистический анализ

Критерии Колмогорова – Смирнова и Шапиро – Уилкса применяли для выбора параметрических или непараметрических методов анализа. Статистический анализ проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным тестом Тьюки, двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA с апостериорным тестом Тьюки или Сидака для множественных сравнений между группами с использованием программного обеспечения GraphPad Prism v.8.3.0 (Сан Диего, США). Для анализа кривых выживания Каплана — Мейера использовали логранговый тест Мантела – Кокса. Следующие обозначения были использованы: M – среднее, m – стандартная ошибка, n – объем выборки, P – достигнутый уровень значимости. Различия считали статистически значимыми при $P < 0,05$.

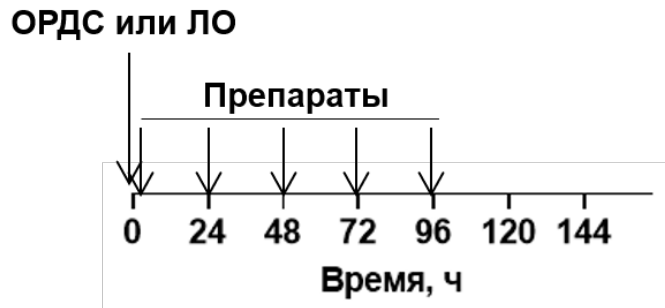
ГЛАВА 3. РЕЗУЛЬТАТЫ

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

Для того чтобы подтвердить, что модель летального острого воспаления легких и ОРДС [166] пригодна для оценки эффективности исследуемого препарата YdAGFLR, на этой модели была оценена эффективность дексаметазона, противовоспалительного средства, применимость которого в снижении летальности у пациентов с тяжелыми пневмониями, осложненными ОРДС и сепсисом уже доказана в клинической практике [167]. Для этого мышам линии C57BL/6Y после индукции летального острого воспаления легких и ОРДС вводили дексаметазон или физ. раствор (контроль) в течение пяти дней как описано в главе 2 настоящей работы, животным в ложнооперированной группе вводили физ. раствор и выживаемость животных отслеживали в течение 144 часов (Рисунок 5). Сравнение кривых выживания Каплана-Мейера с использованием логрангового теста Мантела-Кокса показало наличие статистически значимых отличий между группами ($\chi^2=15,33$; $df=2$; $P=0,0005$). Выживаемость ложнооперированных животных составляла 100% во всем периоде наблюдений, но статистически значимо снижалась до 20% в группе животных с индуцированным острым воспалением легких и ОРДС ($\chi^2=12,59$; $df=1$; $P=0,0004$), с достижением медианной смертности за 72 часа. Дексаметазон статистически значимо повысил выживаемость животных с индуцированным острым воспалением легких и ОРДС ($\chi^2=5,919$; $df=1$; $P=0,0150$) по сравнению с контролем. Таким образом, результаты, полученные в настоящей работе на модели острого летального воспаления легких и ОРДС [166] с использованием лекарственного средства дексаметазона, согласуются с известными клиническими эффектами дексаметазона при лечении тяжелых пневмоний и ОРДС у человека. Поэтому эту модель можно считать

релевантной и пригодной для оценки эффективности исследуемого в настоящей работе гексапептида YdAGFLR.

А



Б

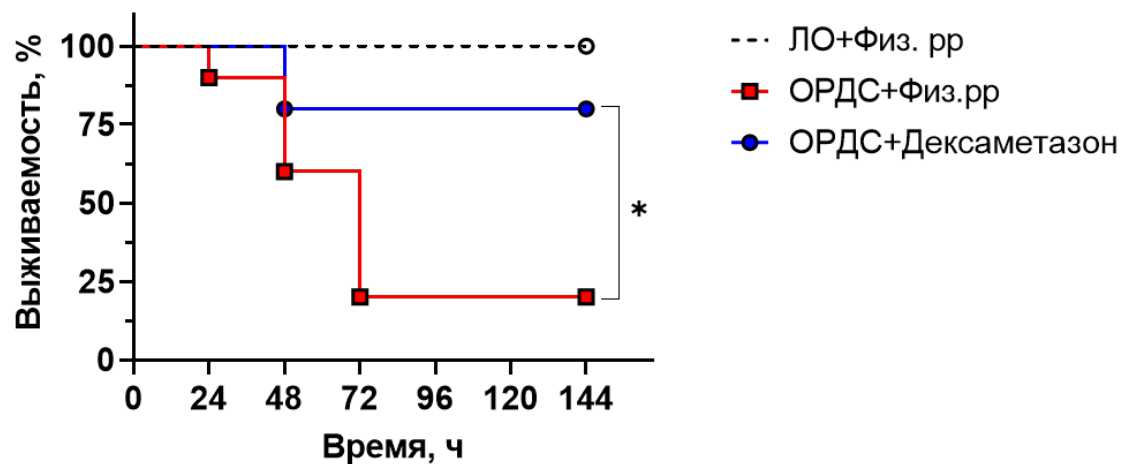


Рисунок 5 – Эффект дексаметазона на выживаемость мышей линии C57BL/6Y с острым воспалением легких и ОРДС. (А) Схема эксперимента. (Б) Кривые выживаемости Каплана-Мейера для ложнооперированной группы (ЛО+Физ. рр, n=10) и групп животных с острым воспалением легких и ОРДС, получавших физ. раствор (ОРДС+Физ. рр, n=10) или дексаметазон (ОРДС+Дексаметазон, n=10). * – $P < 0,05$ по сравнению с ОРДС+Физ. рр (логранговый тест Мантела-Кокса)

Для того чтобы оценить влияние курсового 14-дневного введения гексапептида YdAGFLR на выживаемость животных, мышам линии C57Bl/6Y с острым летальным воспалением легких и ОРДС [166] вводили гексапептид YdAGFLR или физ. раствор (контроль), отслеживая выживаемость животных в течение всего периода введения препаратов (Рисунок 6). В дополнительных контрольных группах здоровым животным вводили YdAGFLR или физ. раствор.

А



Б

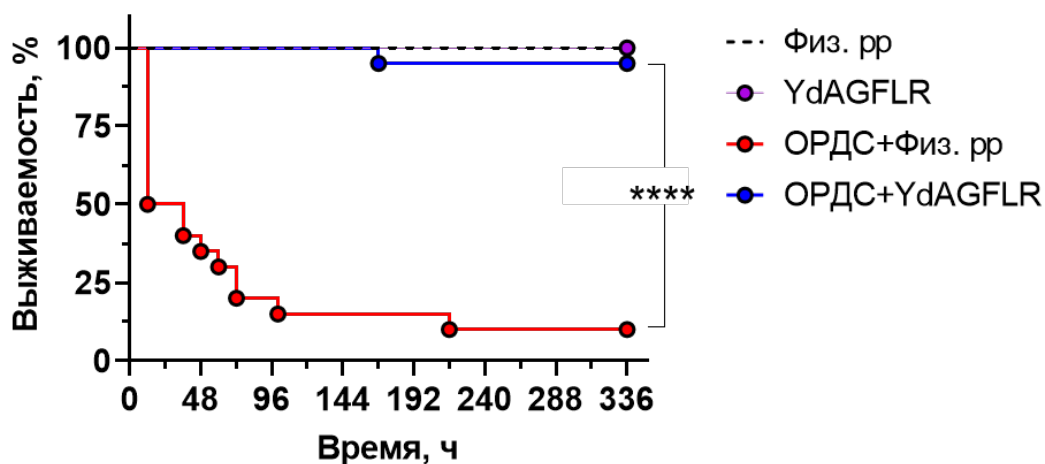


Рисунок 6 – Влияние курсового 14-дневного ежедневного введения YdAGFLR на выживаемость мышей линии C57BL/6Y с острым воспалением легких и ОРДС. (А)

Схема эксперимента. (Б) Кривые выживаемости Каплана-Мейера для здоровых животных, получавших физ. раствор (Физ. pp, n=20) или YdAGFLR (YdAGFLR, n=20); и животных с острым воспалением легких и ОРДС, получавших физ. раствор (ОРДС+Физ. pp, n=20) или YdAGFLR (ОРДС+ YdAGFLR, n=20). **** – $P < 0,0001$ по сравнению с ОРДС+Физ. pp (логранговый тест Мантела-Кокса)

Сравнение кривых выживания Каплана-Мейера с использованием логрангового теста Мантела-Кокса показало наличие статистически значимых отличий между группами ($\chi^2=89,11$; $df=3$; $P < 0,0001$). Курсовое 14-дневное введение YdAGFLR не вызывало гибели здоровых животных. YdAGFLR статистически значимо повысил выживаемость животных с индуцированным острым воспалением легких и ОРДС ($\chi^2=34,30$; $df=1$; $P < 0,0001$) по сравнению с животными, получавшими в качестве лечения физ. раствор, выживаемость которых к концу периода наблюдений составила 10%.

Таким образом, YdAGFLR при курсовом введении значимо повышает выживаемость животных в условиях острого воспаления легких и ОРДС.

3.2. Исследование влияния YdAGFLR на уровни HMGB1 в жидкости бронхоальвеолярного смыва мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких

Внеклеточный HMGB1 является медиатором летального воспаления при пневмониях и сепсисе [2, 6, 151]. С учетом предыдущих результатов, где гексапептид YdAGFLR повышал выживаемость животных в условиях острого воспаления легких и ОРДС, здесь была проверена гипотеза о том, что защитный эффект YdAGFLR может быть связан с его влиянием на уровни внеклеточного HMGB1. Для этого мышам линии C57BL/6Y после индукции нелетального острого воспаления легких, как описано в разделе 2.4 настоящей работы, вводили ингаляционно однократно гексапептид YdAGFLR или физ. раствор (контроль) и отслеживали изменения уровней HMGB1 в БАЛЖ в течение 72 часов с момента введения препаратов (Рисунок 7). Модель нелетального воспаления легких была выбрана для того, чтобы получить надежные статистические данные, исключив гибель животных в группах.

Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил статистически значимый главный эффект лечения YdAGFLR ($F_{1,38}=5,640$; $P=0,0227$) и главный эффект фактора времени ($F_{8,38}=3,716$; $P=0,0027$) на уровни HMGB1 в БАЛЖ за период наблюдений 72 часа. Апостериорный тест Сидака показал, что YdAGFLR статистически значимо снижает максимум концентрации внеклеточного HMGB1 в БАЛЖ во временной точке 48 часов ($P=0,0413$) по сравнению с контролем. Средняя площадь под кривой уровней внеклеточного HMGB1 в БАЛЖ для группы животных, получавших YdAGFLR, была ниже в 1,8 раза и составила $634,9 \pm 200,0$ усл. ед. против $1161,0 \pm 207,9$ усл. ед. у контрольных животных, получавших физ. раствор.

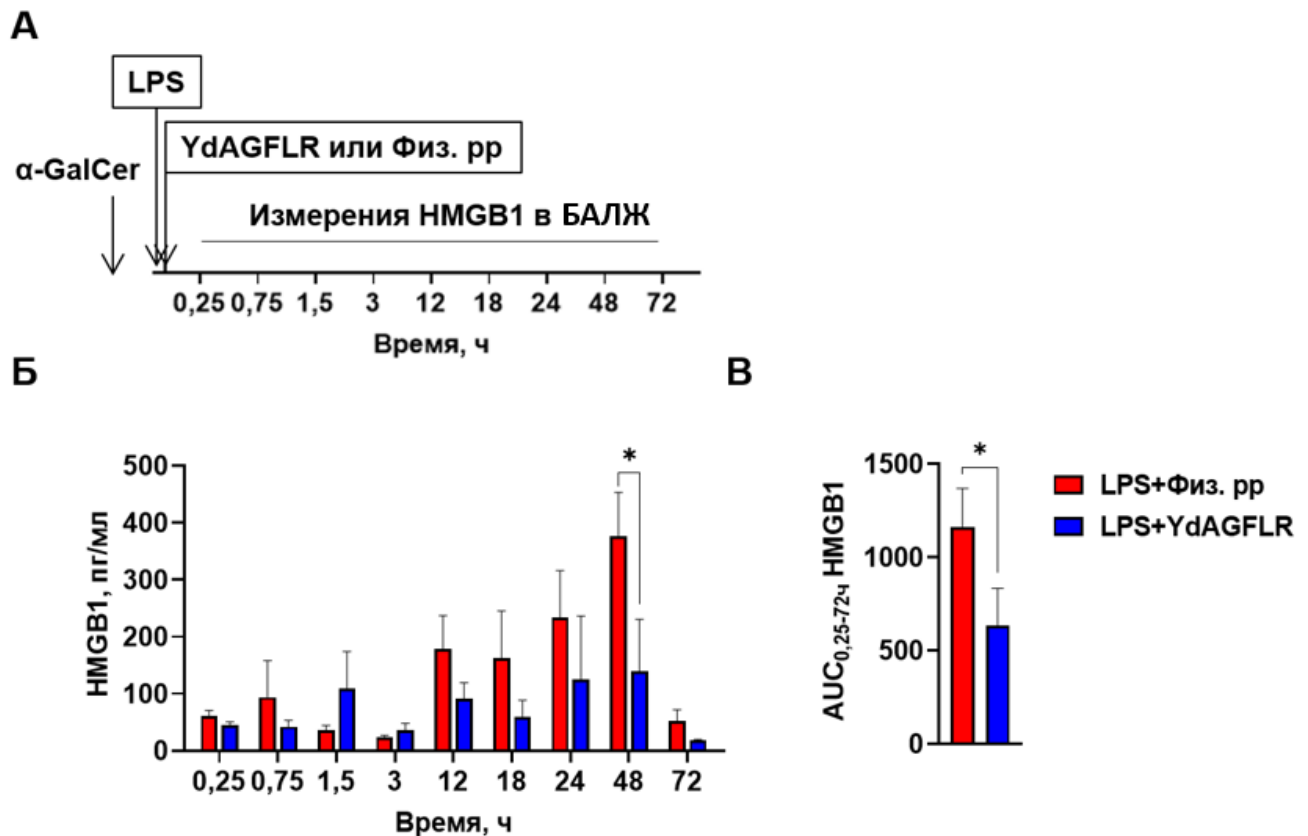


Рисунок 7 – Динамика изменений уровней HMGB1 в БАЛЖ у мышей линии C57BL/6Y с острым воспалением легких, получивших однократно ингаляционно YdAGFLR (LPS+YdAGFLR; n=27) или Физ. раствор (LPS+Физ. рр; n=29). (А) Схема эксперимента. (Б) Динамика уровней HMGB1 в БАЛЖ. Столбцы – $M \pm m$ (n=3-4) экспериментальных 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.

Таким образом, YdAGFLR снижает уровни внеклеточного HMGB1 в легких мышей с острым воспалением легких.

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

Для того чтобы выяснить, влияет ли YdAGFLR на транскрипцию *Hmgb1*, в тех же экспериментальных условиях острого воспаления легких была исследована

динамика изменений уровней мРНК HMGB1 в легких при однократном ингаляционном введении YdAGFLR или физ. раствора (Рисунок 8).

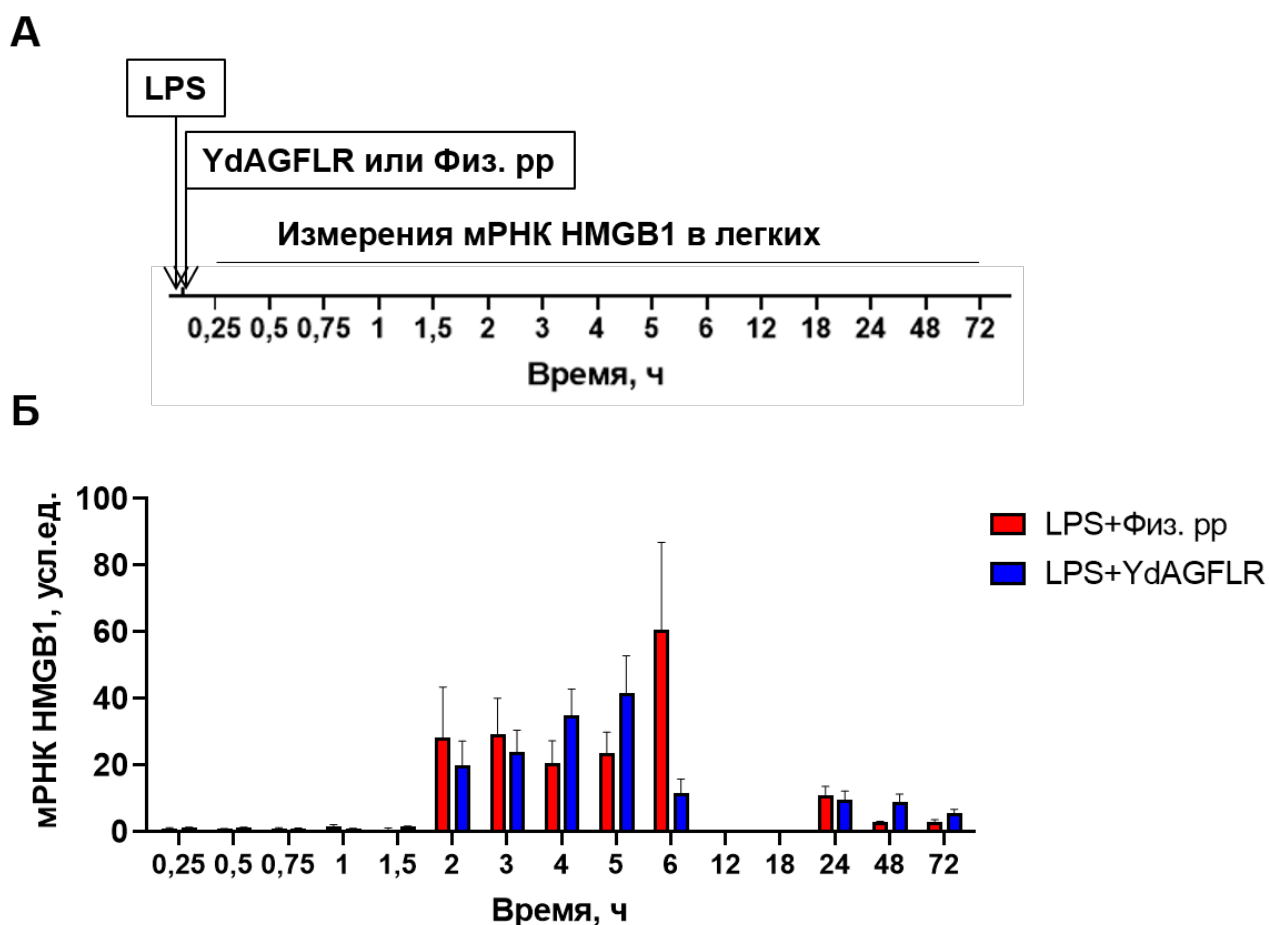


Рисунок 8 – Динамика изменений уровней мРНК HMGB1 в легких мышей линии C57BL/6Y с острым воспалением легких, получивших однократно ингаляционно YdAGFLR (n=75) или Физ. раствор (n=75). (А) Схема эксперимента. (Б) Динамика уровней мРНК HMGB1 в легких. Столбцы – $M \pm m$ (n=5) экспериментальных значений в указанных временных точках

Хотя двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил статистически значимый главный эффект фактора времени ($F_{14,112}=7,486$, $P<0,0001$) на уровни мРНК HMGB1 в легких за период наблюдений 72 часа, не было выявлено статистически значимого главного эффекта YdAGFLR на динамику мРНК HMGB1 ($F_{1,8}=0,5470$; $P=0,487$). Таким образом, YdAGFLR не влияет на транскрипцию *Hmgb1* в легких мышей с острым воспалением легких при однократном ингаляционном введении, и эффект YdAGFLR на уровни внеклеточного HMGB1 не связан с транскрипцией *Hmgb1* в условиях воспаления легких.

3.4. Исследование влияния YdAGFLR на динамику изменений клеточного состава жидкости бронхоальвеолярного смыва в легких мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких

Известно, что внеклеточный HMGB1, связываясь с хемокином CXCL12 и его рецептором CXCR4, усиливает хемотаксис нейтрофилов в очаг воспаления [66, 67]. С учетом предыдущих результатов, где гексапептид YdAGFLR снижал уровни внеклеточного HMGB1 в БАЛЖ (раздел 3.3), здесь была проверена гипотеза о том, что YdAGFLR может влиять на клеточный состав БАЛЖ. Для этого мышам линии C57BL/6Y после индукции нелетального острого воспаления легких вводили ингаляционно однократно гексапептид YdAGFLR или физ. раствор (контроль) и отслеживали изменения содержания нейтрофилов и макрофагов БАЛЖ в течение 72 часов с момента введения препаратов. Ложнооперированные животные получали физ. раствор (Рисунок 9).

Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил статистически значимый главный эффект препаратов ($F_{2,180}=13,64$; $P<0,0001$) и главный эффект фактора времени ($F_{14,180}=3,052$; $P=0,0003$) на количественное содержание клеток в БАЛЖ за период наблюдений 72 часа. Апостериорный тест Тьюки показал наличие статистически значимых отличий между группой ложнооперированных животных без воспаления легких, получавших физ. раствор, и группами животных с воспалением легких, получавших физ. раствор ($P<0,0001$) или YdAGFLR ($P=0,0012$), соответственно. При этом не было выявлено статистически значимых отличий между группами животных с воспалением легких, получавших YdAGFLR или физ. раствор ($P=0,3005$).

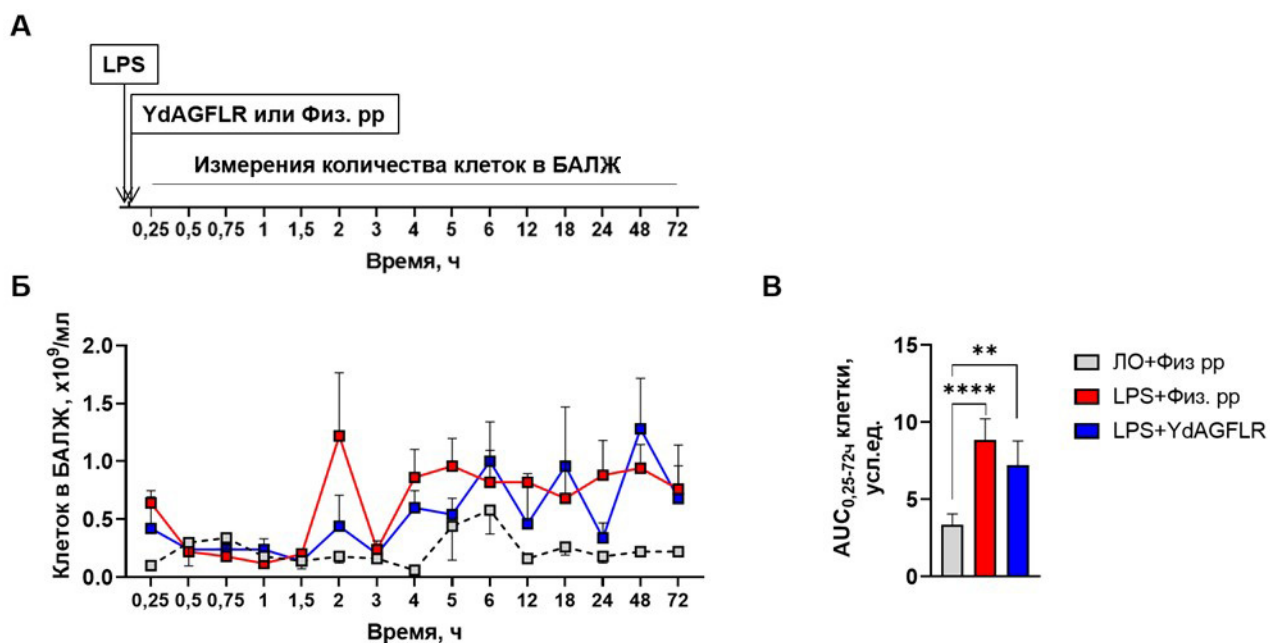


Рисунок 9 – Динамика изменений количественного содержания клеток в БАЛЖ мышей линии C57BL/6Y с острым воспалением легких, получивших однократно ингаляционно YdAGFLR (LPS+YdAGFLR, $n=75$) или физ. раствор (LPS+Физ. рр, $n=75$) по сравнению с динамикой у ложнооперированных животных (ЛО+Физ. рр, $n=75$), получивших однократно ингаляционно физ. раствор. (А) Схема эксперимента. (Б) Динамика количественного содержания клеток в БАЛЖ. Символы – $M \pm m$ ($n=5$) экспериментальных значений в указанных временных точках. (В) Площади под кривыми уровней НМGB1 в БАЛЖ ($AUC_{0,25-72ч}$) за 72 часа наблюдений. Столбцы – $M \pm m$ ($n=75$); ** – $P < 0,01$; **** – $P < 0,0001$ по сравнению с ЛО+физ. рр (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест Тьюки)

Таким образом, индукция острого воспаления легких повышает количественное содержание клеток в БАЛЖ. Абсолютный вклад отдельных клеточных фракций (макрофаги и нейтрофилы) в клеточный состав БАЛЖ в группах был оценен методом микроскопии и представлен в виде площадей под кривыми изменения количественного содержания отдельных типов клеток за период 72 часа после индукции воспаления (Рисунок 10). Индукция воспаления статистически значимо в 1,6 раза повысила количественное содержание макрофагов ($P=0,0153$) и в 35,5 раз – содержание нейтрофилов ($P < 0,0001$) в БАЛЖ по сравнению с соответствующими значениями у ложнооперированных животных, что указывает на подавляющий вклад нейтрофилов в повышение содержания клеток в БАЛЖ в условиях воспаления.

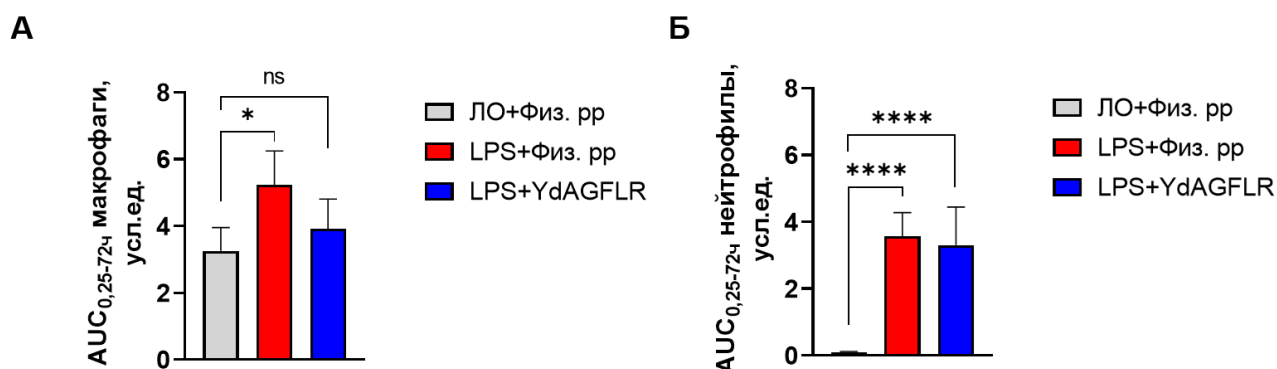


Рисунок 10 – Площади под кривыми количественного содержания макрофагов (А) и нейтрофилов (Б) за период 72 часа в БАЛЖ мышей линии C57BL/6Y с острым воспалением легких, получивших однократно ингаляционно YdAGFLR (LPS+YdAGFLR n=75) или физ. раствор (LPS+Физ. pp, n=75) по сравнению с ложнооперированными животными, получившими однократно ингаляционно физ. раствор (ЛО+Физ. pp, n=75). Столбцы – $M \pm m$ (n=75); ns – $P > 0,05$; * – $P < 0,05$; **** – $P < 0,0001$ по сравнению с ЛО+Физ. pp (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест Тьюки)

Динамика изменений относительного содержания макрофагов и нейтрофилов в общем количестве клеток в БАЛЖ у мышей линии C57BL/6Y с острым воспалением легких в группах показана на Рисунке 11. У ложнооперированных животных, получивших однократно физ. раствор, клеточный состав БАЛЖ был представлен почти исключительно макрофагами и не менялся за период наблюдений 72 часа, причем доля нейтрофилов не превышала 2%. Однако индукция воспаления изменила клеточный состав БАЛЖ за счет массовой инфильтрации нейтрофилов, доля которых среди всех клеток в БАЛЖ достигла максимального значения 72,6% во временной точке 48 часов после индукции воспаления.

Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA с апостериорным тестом Тьюки выявил статистически значимое повышение относительного содержания макрофагов до уровня 87% (возвращение к норме) в конце периода наблюдений (точка 72 часа) у животных с воспалением легких, получивших однократно гексапептид YdAGFLR ($P=0,0034$) по сравнению с контролем. При этом относительная доля нейтрофилов у группы животных, получивших однократно YdAGFLR, значимо снизилась до 13% ($P=0,0002$) против 51,8% в контроле.

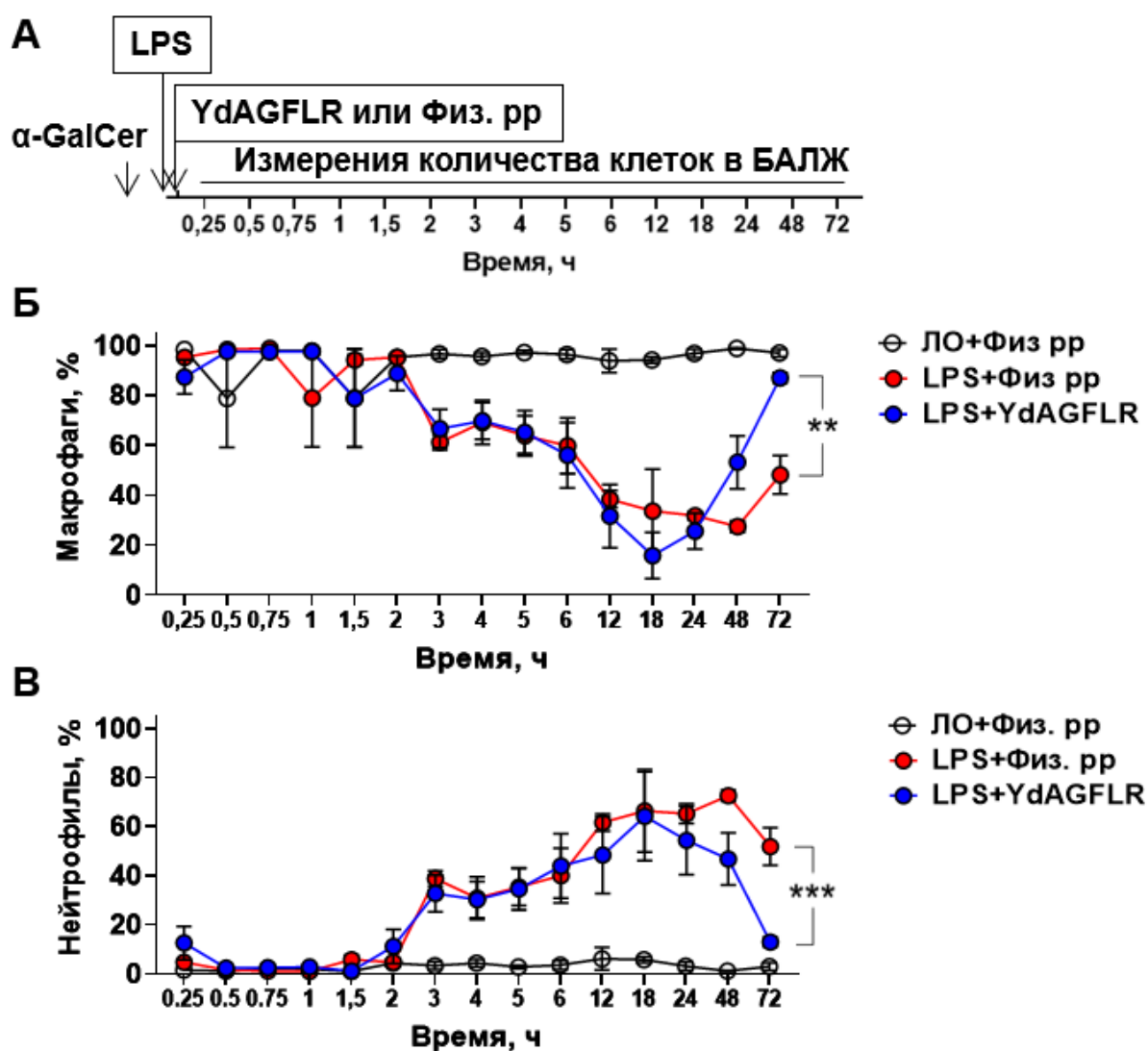


Рисунок 11 – Динамика изменений относительного содержания макрофагов и нейтрофилов в общем количестве клеток в БАЛЖ у мышей линии C57BL/6Y с острым воспалением легких, получивших однократно ингаляционно YdAGFLR (n=75) или физ. раствор (Физ. pp, n=75). (А) Схема эксперимента. (Б) Динамика изменений содержания макрофагов в БАЛЖ. (В) Динамика изменений содержания нейтрофилов в БАЛЖ. Символы – $M \pm m$ (n=5) экспериментальных значений в указанных временных точках; ** – $P < 0,01$; *** – $P < 0,001$ по сравнению с LPS+Физ. pp (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, апостериорный тест Тьюки)

Таким образом, гексапептид YdAGFLR снизил уровень инфильтрации нейтрофилов в очаге воспаления, что согласуется с эффектом YdAGFLR на уровни внеклеточного HMGB1 (раздел 3.2) в свете известного эффекта HMGB1 на хемотаксис нейтрофилов [66, 67].

3.5. Исследование влияния YdAGFLR на соотношение ацетилированных и неацетилированных форм HMGB1 в образцах жидкости бронхоальвеолярного смыва и легких мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких

Известно, что повышение уровней внеклеточного HMGB1 критически зависит от степени посттрансляционного ацетилирования сайтов ядерной локализации NLS1 и NLS2 в составе молекулы HMGB1, причем ацетилирование HMGB1 ведет к его накоплению в цитоплазме и последующему выходу во внеклеточное пространство [14, 47]. С учетом предыдущих результатов, где гексапептид YdAGFLR снижал уровни внеклеточного HMGB1 в БАЛЖ (раздел 3.3), здесь была проверена гипотеза о том, что YdAGFLR может влиять на степень посттрансляционного ацетилирования HMGB1 по сайтам ядерной локализации NLS1 и NLS2. Для этого мышам линии C57BL/6Y после индукции нелетального острого воспаления легких вводили ингаляционно однократно гексапептид YdAGFLR или физ. раствор (контроль), отбирали образцы легких и БАЛЖ во временной точке 48 часов, когда достигался максимум выхода HMGB1 в БАЛЖ, и определяли соотношение ацетилированных и неацетилированных триптических пептидов (ацетил-K/K), полученных после обработки трипсином, с помощью ВЭЖХ-МС/МС, как описано в разделах 2.9 и 2.10 главы 2 «Материалы и Методы исследования».

Анализ выявил появление триптических пептидов, соответствующих фрагментам HMGB1 26–29 (ЕНКК), 34–48 (ASVNFSEFSKKCSER), 179–183 (EKSKK) и 184–187 (KKEE), ацетилированных по остаткам K²⁸, K⁴⁴, K^{182,183} и K^{184,185}, соответственно, где K²⁸ и K⁴⁴ относятся к сайту NLS1, а тандемы K^{182,183} и K^{184,185} – 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.

Двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил статистически значимый главный эффект фактора происхождения образца, БАЛЖ или легкое ($F_{1,24}=151,0$; $P<0,0001$), и главный эффект фактора введения препаратов ($F_{2,24}=147,2$; $P<0,0001$) для соотношений ацетил- K^{28}/K^{28} – ацетилованного по K^{28} пептида ЕНКК к неацетилованному (Рисунок 12).

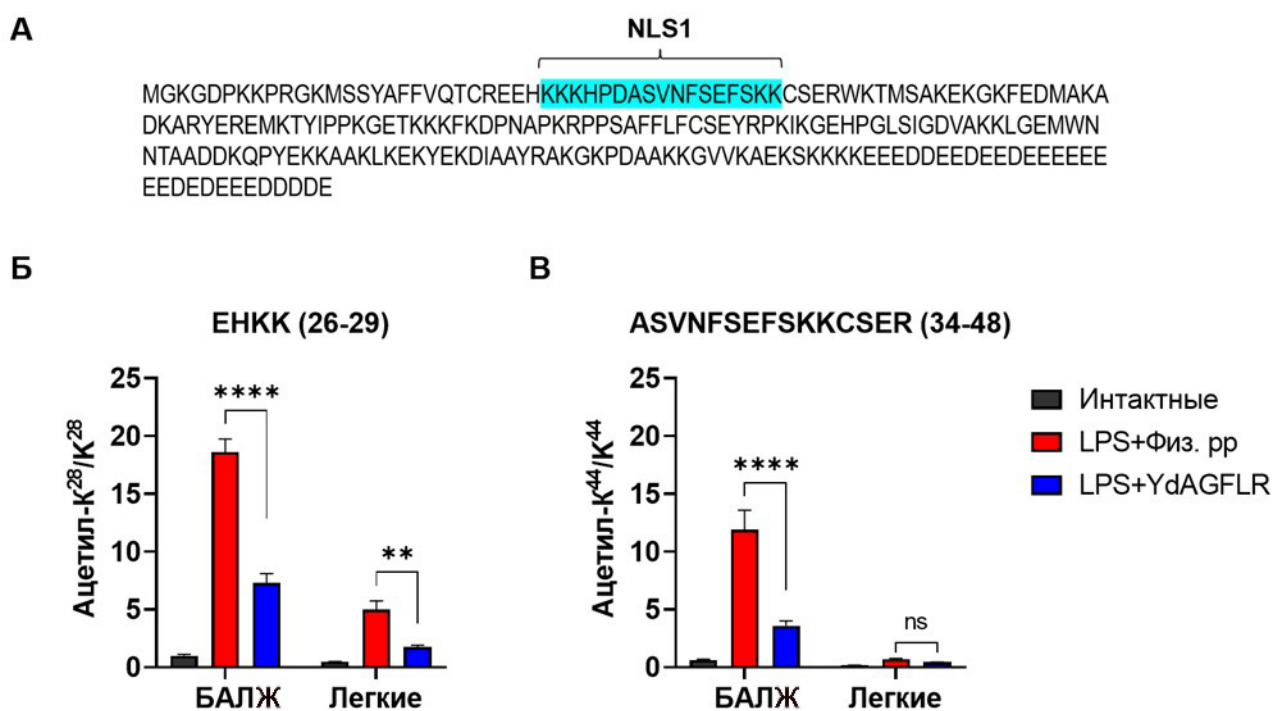


Рисунок 12 – Соотношение ацетилованных и неацетилованных форм (ацетил- K/K) триптических пептидов ЕНКК и ASVNFSEFSKKCSER, полученных трипсинолизом БАЛЖ и легких и соответствующих фрагментам HMGB1 26–29 и 34–48.

(А) Аминокислотная последовательность HMGB1 с выделенным сайтом NLS1. Соотношения ацетил- K^{28}/K^{28} для ЕНКК. (Б) и ацетил- K^{44}/K^{44} для ASVNFSEFSKKCSER (В) в образцах БАЛЖ и легкого, полученных от интактных мышей линии C57BL/6Y и мышей с воспалением легких, получивших однократно физ. раствор или YdAGFLR. Столбцы – $M \pm m$ ($n=5$) экспериментальных значений; ns – $P>0,05$; ** – $P<0,01$; **** – $P<0,0001$ по сравнению с LPS+Физ. pp (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, тест Сидака)

Апостериорный тест Сидака для множественных сравнений между группами показал, что индукция острого воспаления легких вызвала повышение соотношения ацетил- K^{28}/K^{28} в 18,6 раза в БАЛЖ ($P<0,0001$) и в 10 раз – в легких ($P=0,0002$) по сравнению соответствующими значениями у здоровых интактных животных. Введение YdAGFLR вызвало статистически значимое снижение

средних значений соотношения ацетил- K^{28}/K^{28} в БАЛЖ до уровня $7,2 \pm 0,8$ ($P < 0,0001$) против $18,6 \pm 1,1$ в контроле, и значений в легких до уровня $1,7 \pm 0,2$ ($P = 0,0059$) против $5,0 \pm 0,8$ в контроле. Для соотношения ацетил- K^{44}/K^{44} другого триптического пептида ASVNFSEFSKKCSER, двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA также выявил статистически значимый главный эффект фактора происхождения образца, БАЛЖ или легкое ($F_{1,24} = 71,60$; $P < 0,0001$), и главный эффект фактора введения препаратов ($F_{2,24} = 36,22$; $P < 0,0001$). Соотношения ацетил- K^{44}/K^{44} были статистически значимо повышены в среднем в 19,8 раз в БАЛЖ ($P < 0,0001$) и только незначительно – в легких ($P = 0,9354$) у животных с воспалением легких по сравнению со здоровыми интактными животными. Однократное введение YdAGFLR животным с воспалением легких статистически значимо снизило ацетил- K^{44}/K^{44} в БАЛЖ ($P < 0,0001$) по сравнению с контролем.

Для соотношений дважды ацетилированных и неацетилированных (ацетил- $K^{182,183}/K^{182,183}$) остатков K^{182} и K^{183} пептида EKSKK, двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил статистически значимый главный эффект фактора образца, БАЛЖ или легкое ($F_{1,24} = 43,00$; $P < 0,0001$; Рисунок 13), и главный эффект фактора введения препаратов ($F_{2,24} = 30,13$; $P < 0,0001$). Апостериорный тест Сидака показал, что индукция острого воспаления легких вызвала повышение соотношения ацетил- $K^{182,183}/K^{182,183}$ в 30 раз в БАЛЖ ($P < 0,0001$), но не в легких ($P = 0,9922$), если сравнить с соответствующими значениями у здоровых интактных животных. Однократное введение YdAGFLR эффективно снизило соотношение ацетилированных к неацетилированным формам в БАЛЖ животных с воспалением легких ($P < 0,0001$) по сравнению с контролем. Для соотношений тандема лизинов ацетил- $K^{184,185}/K^{184,185}$ в составе пептида KKEE, двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA выявил статистически значимый главный эффект фактора образца, БАЛЖ или легкое ($F_{1,16} = 33,12$; $P < 0,0001$), и главный эффект фактора введения препаратов ($F_{2,16} = 53,83$; $P < 0,0001$). Следует отметить, что дважды ацетилированный пептид KKEE не обнаруживался ни в БАЛЖ, ни в легких интактных животных. Апостериорный тест Сидака показал, что однократное введение YdAGFLR эффективно снизило соотношение ацетилированных к

неацетилированным формам в БАЛЖ ($P<0,0001$) и в меньшей степени – в легких ($P=0,046$) животных с воспалением легких по сравнению с контролем.

А

MGKGDPPKPRGKMSSYAFFVQTCREEHKKKHPDASVNFSEFSKKCSERWKTMSAKEKGKFEDMAKA
DKARYEREMKTYIPPKGETKKKFKDPNAPKRPPSAFFLCSEYRPKIKGEHPGLSIGDVAKKLGEMWN
NTAADDKQPYEKKAALKKEKYEKDIAAYRAKGKPDAAKKGVVKA**EKSKKKK**EEEDDEEDEDEDEDEDE
EEDEDEEEDDDDE

NLS2

Б

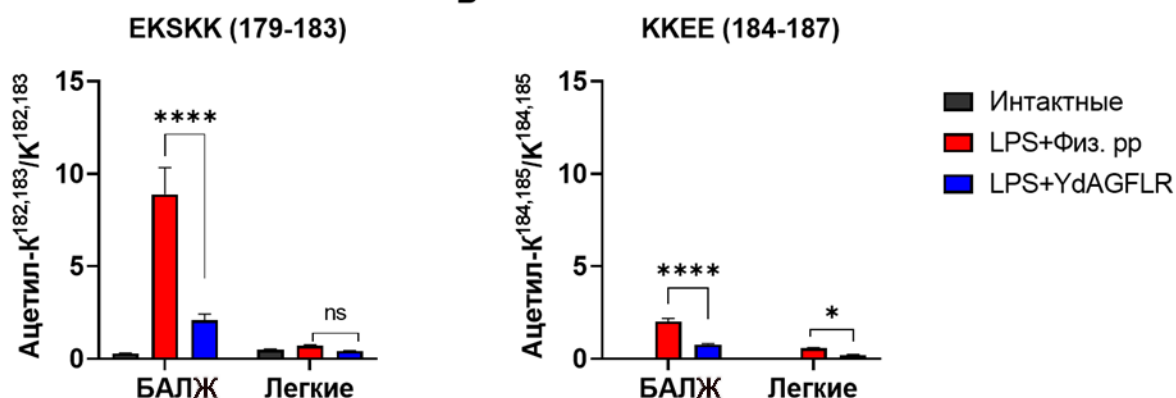


Рисунок 13 – Соотношение ацетилированных к неацетилированным форм (ацетил-К/К) триптических пептидов EKSKK и KKEE, полученных трипсинолизом БАЛЖ и легких и соответствующих фрагментам HMGB1 179–183 и 184–187, соответственно. (А) Аминокислотная последовательность HMGB1 с выделенным сайтом NLS2. Соотношения ацетил- $K^{182,183}/K^{182,183}$ для EKSKK (Б) и ацетил- $K^{184,185}/K^{184,185}$ для KKEE (В) в образцах БАЛЖ и легкого, полученных от интактных мышей линии C57BL/6Y и мышей с воспалением легких, получивших однократно физ. раствор или YdAGFLR. Столбцы – $M \pm m$ ($n=5$) экспериментальных значений; ns – $P>0,05$; * – $P<0,05$; **** – $P<0,0001$ по сравнению с LPS+Физ. pp (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, тест Сидака)

Таким образом, YdAGFLR снижает соотношение ацетил-К/К в триптических пептидах, соответствующих сайтам ядерной локализации NLS1 и NLS2 в составе HMGB1, причем наибольший эффект YdAGFLR наблюдается для образцов, полученных из БАЛЖ, где HMGB1 находится во внеклеточной форме.

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

В предыдущих разделах настоящей работы было показано, что гексапептид YdAGFLR снижает уровни внеклеточного HMGB1 в БАЛЖ (раздел 3.3), и этот эффект гексапептида связан со снижением уровней ацетилирования сайтов ядерной локализации NLS1 и NLS2 в составе HMGB1 (раздел 3.6). С учетом того, что ацетилированная форма белка HMGB1 является субстратом гистоновой деацетилазы SIRT1 [17, 18, 19], здесь была проверена гипотеза о том, что YdAGFLR может влиять на транскрипцию *Sirt1* в условиях острого воспаления легких, инициированного α -GalCer/LPS. Для этого мышам линии C57BL/6Y после индукции нелетального острого воспаления легких вводили ингаляционно однократно гексапептид YdAGFLR или физ. раствор (контроль) и отслеживали изменения содержания мРНК SIRT1 в легких в течение 72 часов (Рисунок 14).

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 $\times$ фактор введения препаратов ($F_{14,112}=3,477$; $P=0,0001$) на динамику уровней мРНК SIRT1 в интервале времени до 72 часов после индукции воспаления. Апостериорный тест Сидака показал, что YdAGFLR статистически значимо повысил транскрипцию *Sirt1* во временных точках 2 часа ($P=0,0385$) и 6 часов ($P<0,0001$) по сравнению с физ. раствором.

Площади под кривыми уровней мРНК SIRT1 за 72 часа наблюдений отличались в 2,5 раза между группами и составляли $149,1 \pm 26,8$ усл. ед. в группе животных, получивших YdAGFLR, против $60,0 \pm 10,3$ усл. ед. в группе животных, получивших физ. раствор.

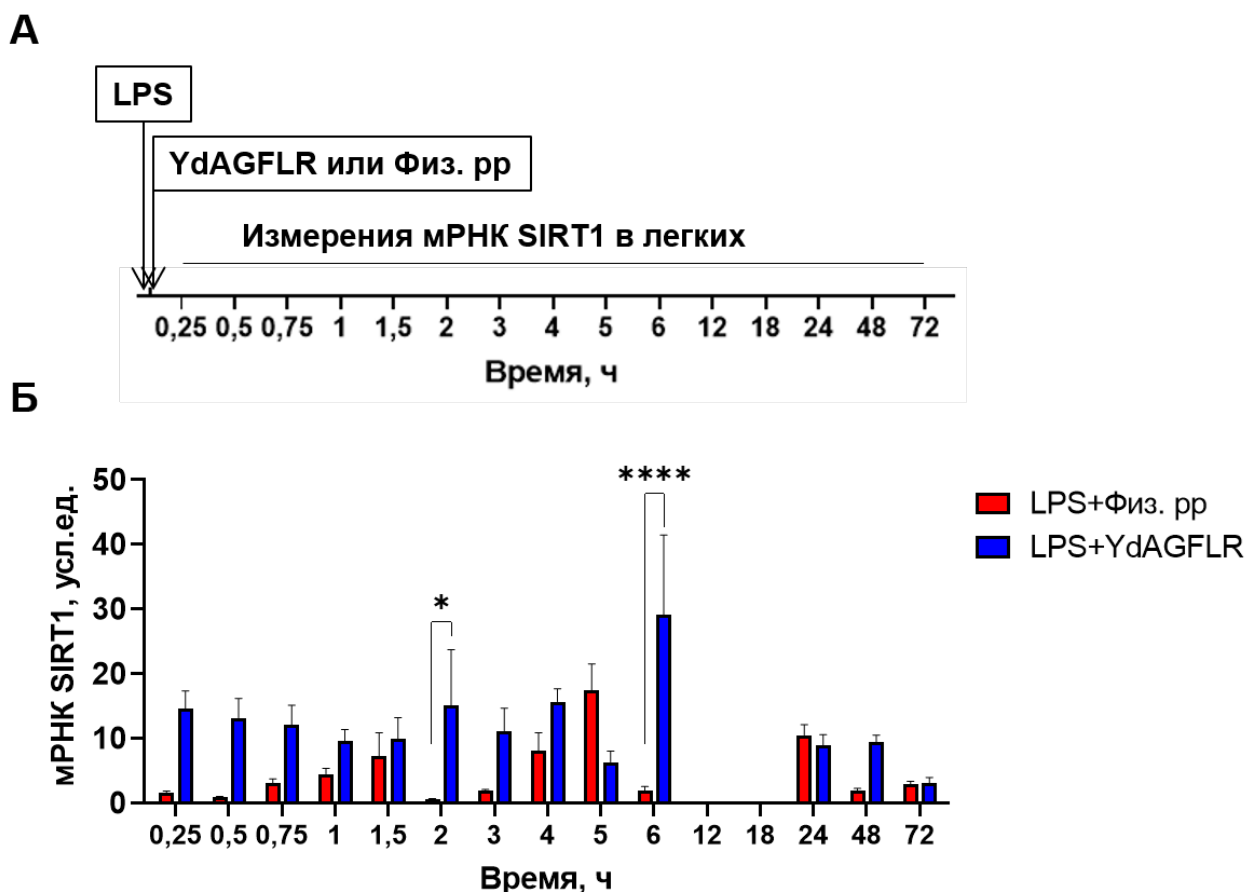


Рисунок 14 – Динамика изменений уровней мРНК SIRT1 в легких мышей линии C57BL/6Y с острым воспалением легких, получивших однократно ингаляционно YdAGFLR (n=75) или Физ. раствор (n=75). (А) Схема эксперимента. (Б) Динамика уровней мРНК HMGB1 в легких. Столбцы – $M \pm m$ (n=5) экспериментальных значений в указанных временных точках. * – $P < 0,05$; **** – $P < 0,0001$ по сравнению с LPS+Физ.рр (двухфакторный дисперсионный анализ ANOVA, тест Сидака)

Таким образом, YdAGFLR повышает транскрипцию гистоновой деацетилазы SIRT1 у мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких.

3.7. Исследование влияния налоксона, неселективного антагониста опиоидных рецепторов, на YdAGFLR-индуцированную транскрипцию *Sirt1* в легких мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких

YdAGFLR – селективный агонист δ -опиоидных рецепторов с высокой аффинностью ($K_i = 0,6$ нМ) [25]. Налоксон – неселективный антагонист δ - и μ -опиоидных рецепторов с высокой аффинностью к δ -опиоидному рецептору

($K_i=16$ нМ) [168]. Здесь была проверена гипотеза, что эффект гексапептида YdAGFLR на транскрипцию *Sirt1* в легких мышей линии C57BL/6Y в условиях острого воспаления легких связан с его опиоидной активностью. Для этого мышам линии C57BL/6Y после индукции нелетального острого воспаления легких вводили ингаляционно однократно гексапептид YdAGFLR в отсутствие или присутствии эффективных ингибиторной дозы налоксона (5 мг/кг) и измеряли уровень мРНК SIRT1 во временной точке 6 часов, в которой достигался максимальный эффект YdAGFLR на транскрипцию *Sirt1* по результатам исследования, описанного в п. 3.7 настоящей работы. В контрольной группе животные получали однократно физ. раствор (Рисунок 15).

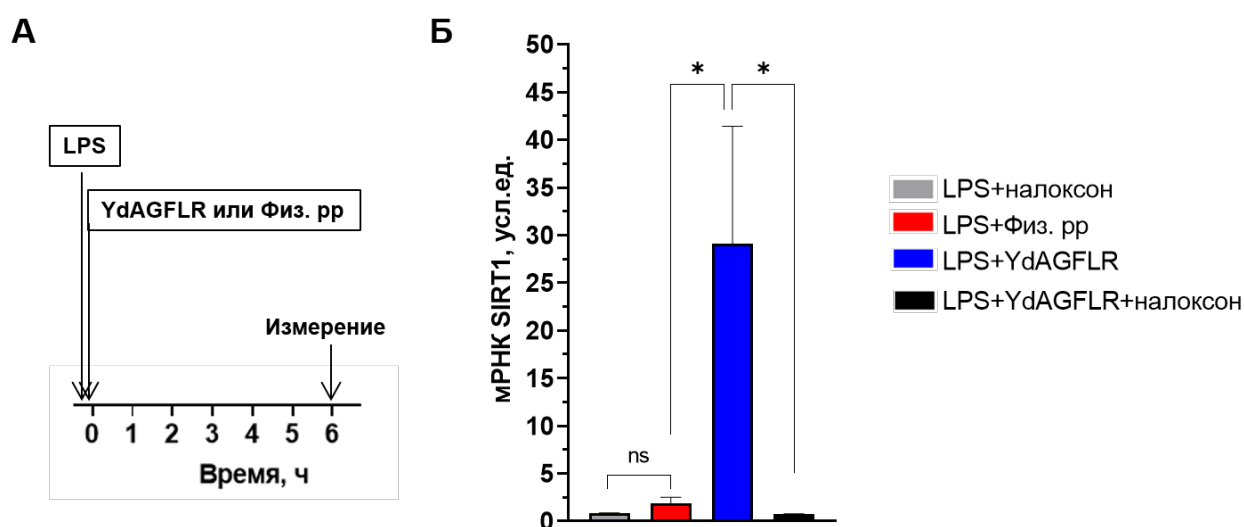


Рисунок 15 – Налоксон ингибирует эффект YdAGFLR на уровни мРНК SIRT1 в легких мышей линии C57BL/6Y с острым воспалением легких. (А) Схема эксперимента. (Б) Уровни мРНК SIRT1 в легких животных с воспалением легких, получавших налоксон, физ. раствор, YdAGFLR или YdAGFLR с налоксоном. Столбцы – $M \pm m$ ($n=5$) экспериментальных значений в указанной временной точке 6 часов. 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 YdAGFLR статистически значимо повышает уровни мРНК SIRT1 в легких мышей с воспалением легких ($P=0,0309$) по сравнению с контролем, а налоксон статистически значимо ингибирует YdAGFLR-индуцированное повышение уровней мРНК SIRT1 ($P=0,0239$). При

этом налоксон не влиял на уровни мРНК SIRT1 ($P=0,9994$) по сравнению с контролем. Таким образом, эффект YdAGFLR на транскрипцию *Sirt1* связан с его опиоидной активностью.

ГЛАВА 4. ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Гексапептид YdAGFLR в качестве активного действующего вещества входит в состав инъекционного лекарственного препарата для лечения язв желудка [26], острого панкреатита и острого некротического панкреатита [162], а также ингаляционного средства для лечения новой коронавирусной инфекции COVID-19 среднетяжелого течения [169]. YdAGFLR является синтетическим агонистом опиоидных рецепторов с высокой аффинностью к δ -рецептору ($K_i=0,6$ нМ) и на порядок меньшей аффинностью к μ -рецептору ($K_i=6,7$ нМ) [25]. Вопрос о том, почему YdAGFLR эффективен при лечении столь разных заболеваний как острый панкреатит и COVID-19, остается открытым, тем более что роль δ -опиоидной сигнализации при этих заболеваниях неизвестна. Следует отметить, что общим в патогенезе острого панкреатита и COVID-19 является наличие воспалительного процесса. У обоих заболеваний есть высокий риск развития ОРДС – критического осложнения, летальность при котором может составлять от 15 до 23% [170]. Так, согласно эпидемиологическим данным, распространенность ОРДС у пациентов с тяжелой формой острого панкреатита колеблется от 15% до 60% [171], а у пациентов с тяжелым течением пневмонии COVID-19 может достигать 32% [172]. Помимо повышенного уровня провоспалительных цитокинов, в частности IL-6, общим для этих заболеваний является наличие еще одного провоспалительного фактора, а именно повышенных уровней внеклеточного HMGB1, медиатора летального воспаления при тяжелом течении острого панкреатита [173] и COVID-19 [5, 6, 7, 8, 9, 10]. Есть данные, что между уровнями внеклеточного HMGB1 и активностью опиоидной системы существует связь. Tang и соавт. ранее показали, что экспериментальный пептидный агонист δ -опиоидных рецепторов DADLE повышает выживаемость крыс в модели сепсиса, вызванного перевязкой и перфорацией слепой кишки, и этот эффект сопровождается снижением уровней внеклеточного HMGB1 [24]. Хотя этот факт снижения внеклеточного HMGB1 под действием агониста δ -опиоидных рецепторов DADLE является единичным, он является основанием для предположения, что терапевтические эффекты

YdAGFLR, агониста δ -опиоидных рецепторов, также могут быть связаны с влиянием последнего на уровни внеклеточного HMGB1. Проверка этой гипотезы была целью настоящей работы.

На первом этапе была валидирована модель летального острого воспаления легких и ОРДС на мышах линии C57BL/6Y, характеризующаяся диффузным альвеолярным повреждением легких, многократным повышением IL-6 и летальностью до 90% [166]. Модель построена на гиперактивации системы врожденного иммунитета, вызываемой ингаляционным введением сенсibilизатора α -GalCer, агониста iNKT, с последующим интратрахеальным введением комбинации индукторов воспаления – липополисахарида *E. coli* 055:B5 в сочетании с мурамилпептидом и полным адьювантом Фрейнда. Липополисахарид *E. coli* 055:B5 был выбран в качестве индуктора воспаления как доказанный стимулятор TLR4, который в интервале 1–1000 нг/мл активирует TLR4, связываясь с ко-активатором MD2 в составе рецепторного комплекса TLR4-MD2 [174]. Мурамилпептид – минимальный фрагмент пептидогликана клеточных стенок грамотрицательных и грамположительных бактерий, активирующий внутриклеточный NOD2, еще один рецептор распознавания молекулярных паттернов патогенов [175]. Адьювант Фрейнда также содержит мурамилпептид в качестве основного активного компонента и был использован в качестве носителя при введении LPS и мурамилпептида животным. Для валидации модели в настоящем исследовании было использовано референтное противовоспалительное средство – дексаметазон, эффективность которого в снижении летальности у пациентов с тяжелыми пневмониями, осложненными ОРДС и сепсисом уже доказана в клинической практике [167]. В настоящем исследовании дексаметазон статистически значимо снижал летальность животных по сравнению с контролем, что доказывает релевантность выбранной модели и возможность ее использования для доклинической оценки эффективности гексапептида YdAGFLR при остром воспалении легких и ОРДС.

На этой модели, при ингаляционном курсовом введении, гексапептид YdAGFLR показал статистически значимое повышение выживаемости животных

($P < 0,0001$) по сравнению с контролем. Этот результат согласуется с данными о клинической эффективности ингаляционного лекарственного средства, содержащего гексапептид YdAGFLR в качестве активного действующего вещества, полученными в исследованиях III фазы на пациентах со среднетяжелым течением COVID-19, где прием указанного лекарственного средства в течение 10 суток в дозировке 10 мг/сут на фоне стандартной терапии снижал время до клинического улучшения ($P = 0,0074$), и при этом не было зафиксировано ни одного серьезного нежелательного явления с летальным исходом, тогда как в контрольной группе пациентов, находившихся на стандартной терапии, летальные исходы составляли 4% от общей численности группы [178].

С учетом того, что внеклеточный HMGB1 является известным медиатором летального воспаления [2, 6, 152], на втором этапе исследования была проверена гипотеза о возможной связи защитного эффекта YdAGFLR с его влиянием на уровни внеклеточного HMGB1. Для этого была исследована динамика уровней внеклеточного HMGB1 в БАЛЖ у животных с острым воспалением легких при однократном ингаляционном введении YdAGFLR. Объект исследования, внеклеточный HMGB1, был выбран в том числе на основании известных данных, что введение экспериментального агониста δ -опиоидных рецепторов DADLE привело к снижению как внеклеточного HMGB1, так и смертности на модели сепсиса [24]. Для оценки влияния YdAGFLR на уровни внеклеточного HMGB1 на этом этапе использовали нелетальную модель острого воспаления легких, чтобы получить надежные статистические данные, исключив гибель животных в группах. Для этого, сохранив общую схему модели с введением сенсibilизатора и индуктора воспаления, было уменьшено число индукторов воспаления путем исключения мурамилпептида и адьюванта Фрейнда из схемы моделирования воспаления легких. Полученная модель включала ингаляционное введение сенсibilизатора α -GalCer и последующее интратрахеальное введение LPS через 24 часа в дозировках, обеспечивающих отсутствие летальности у животных.

Гексапептид YdAGFLR при однократном ингаляционном введении мышам линии C57BL/6Y с острым нелетальным воспалением легких статистически

значимо снизил уровни внеклеточного HMGB1 в БАЛЖ по сравнению с контролем. С учетом известной роли внеклеточного HMGB1 как медиатора летального воспаления, снижение уровней внеклеточного HMGB1 под действием YdAGFLR объясняет выявленный в настоящем исследовании защитный эффект гексапептида на выживаемость животных.

Снижение уровней HMGB1 в БАЛЖ под действием YdAGFLR сопровождалось изменением клеточного состава БАЛЖ. До индукции воспаления основной клеточной фракцией в БАЛЖ являлись макрофаги, а доля нейтрофилов не превышала 2%. После индукции воспаления абсолютное количество нейтрофилов в БАЛЖ выросло в среднем в 35,5 раза при повышении в 1,6 раза доли макрофагов. Относительное количество нейтрофилов от всех клеток в БАЛЖ достигло максимума 72,6% во временной точке 48 часов, тогда же, когда был достигнут максимум значений HMGB1 в БАЛЖ. Высокая степень согласованности динамики нейтрофилов и HMGB1 в БАЛЖ, по-видимому, объясняется известным эффектом влияния HMGB1 на хемотаксис нейтрофилов [66, 67, 68], обусловленный способностью HMGB1 связываться с хемокином CXCL12 и активировать хемотаксис нейтрофилов и моноцитов через образования комплекса HMGB1-CXCL12 с рецептором CXCR4 на поверхности этих клеток. В контексте этого, снижение уровней HMGB1 и нейтрофилов в БАЛЖ под действием YdAGFLR являются согласованными процессами, а эффект снижения уровня нейтрофилов под действием YdAGFLR является еще одним фактором, способствующим повышению выживания животных в условиях индуцированного воспаления легких.

Теоретически, снижение уровней внеклеточного HMGB1 может быть обусловлено разными причинами, в частности, снижением транскрипции *Hmgb1* или посттрансляционными модификациями HMGB1, влияющими на переходы HMGB1 между ядром, цитоплазмой и внеклеточным пространством [14, 17, 18, 19, 51].

Для того чтобы уточнить, связан ли эффект снижения уровней внеклеточного HMGB1 под действием гексапептида YdAGFLR с влиянием последнего на

транскрипцию гена *Hmgb1*, у животных с воспалением легких были измерены уровни мРНК HMGB1 методом ПЦР в реальном времени в образцах легких в интервале 72 часа после введения YdAGFLR. Было показано, что в тех же условиях, в которых YdAGFLR снижал уровни внеклеточного HMGB1 в БАЛЖ, он не оказывал никакого влияния на уровни мРНК HMGB1 в легких, из чего следует, что эффект YdAGFLR на уровни внеклеточного HMGB1 не связан с транскрипцией *Hmgb1*.

Чтобы выяснить, связан ли наблюдаемый эффект снижения уровней внеклеточного HMGB1 под действием гексапептида YdAGFLR с влиянием последнего на степень ацетилирования сайтов NLS1/NLS2 в составе HMGB1, известную посттрансляционную модификацию HMGB1, определяющую его транслокацию из ядра в цитоплазму и далее во внеклеточное пространство [14, 15, 16], было изучено соотношение ацетилированных и неацетилированных форм HMGB1 в образцах легких и БАЛЖ мышей, полученных после индукции острого воспаления легких и введения исследуемых препаратов. Для этого образцы БАЛЖ и легких были подвергнуты трипсинолизу, после чего методом ВЭЖХ-МС/МС высокого разрешения были идентифицированы ацетилированные и неацетилированные триптические пептиды, имеющие отношение к сайтам ядерной локализации NLS1 и NLS2 белка HMGB1. Было найдено, что введение YdAGFLR статистически значимо снижает уровни ацетилирования остатков лизина в сайтах NLS1 и NLS2, особенно у внеклеточного HMGB1 в БАЛЖ, что полностью соответствует эффекту снижения уровней внеклеточного HMGB1 в свете известных литературных данных, показывающих, что ацетилирование NLS1 и NLS2 является критическим условием для повышения концентрации внеклеточного HMGB1. Полученный результат позволяет объяснить механизм противовоспалительного эффекта гексапептида YdAGFLR как средства, которое предупреждает повышение уровней внеклеточного HMGB1 в легких в условиях острого воспаления легких через снижение уровней ацетилирования сайтов ядерной локализации NLS1 и NLS2 в составе аминокислотной последовательности HMGB1.

Известно, что степень ацетилирования ядерных белков, к которым относится HMGB1, зависит от относительной активности ацетилтрансферазы p300/CBP [91, 92] и гистоновых деацетилаз, в том числе гистоновой деацетилазы SIRT1. Известно, что в условиях воспаления активация TLR4 липополисахаридом ведет к повышению активности ацетилтрансферазы p300/CBP через промежуточную стадию активации IRF3 и образования интерферонов I типа [93, 94] и последующую активацию интерферонами [90] сигнального пути Jak/STAT1, когда образующийся гомодимер STAT1 после его транслокации в ядро связывается с p300/CBP, переводя ацетилтрансферазу в активную форму, способную ацетилировать внешние субстраты, в том числе HMGB1 [92]. Этот путь ведет к гиперацетилированию HMGB1 и стимулирует переход HMGB1 в цитоплазму и внеклеточное пространство [15], что, по-видимому, и реализуется при моделировании острого воспаления легких в настоящем исследовании. Обратная реакция деацетилирования HMGB1 катализируется SIRT1, (NAD⁺)-зависимой гистоновой деацетилазой III класса, для которой ацетилированная форма HMGB1 является одним из субстратов [87, 18, 19]. Кроме SIRT1, деацетилирование HMGB1 катализируется гистоновыми деацетилазами HDAC1, HDAC4 и HDAC5, для которых известно, что снижение их активности ведет к повышению секреции HMGB1 во внеклеточное пространство [84, 85], однако действие их на конкретные сайты ацетилирования в составе HMGB1 еще недостаточно изучено. Поэтому объектом настоящего исследования была выбрана гистоновая деацетилаза SIRT1. Для проверки гипотезы, что YdAGFLR может снижать степень ацетилирования HMGB1, влияя на транскрипцию *Sirt1*, мышам линии C57BL/6Y после индукции острого воспаления легких вводили ингаляционно однократно гексапептид YdAGFLR, отслеживая изменения уровней мРНК SIRT1 в легких в течение 72 часов. Было найдено, что YdAGFLR статистически значимо повышает уровни мРНК SIRT1 по сравнению с контролем. Эти результаты указывают на то, что повышение транскрипции *Sirt1* в легких может быть тем механизмом, при помощи которого ингаляционный YdAGFLR снижает уровни внеклеточного HMGB1 в легких. Этот результат полностью согласуется с данными научной литературы о

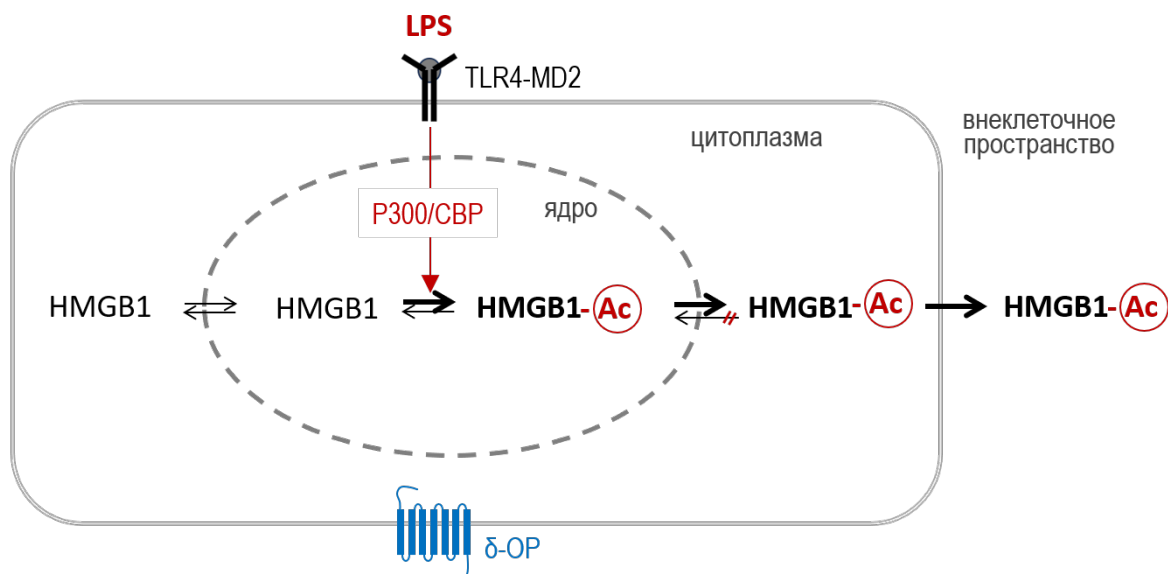
том, что SIRT1 является деацетилазой, для которой ацетилированная форма HMGB1 является одним из субстратов [87, 18, 19].

Чтобы уточнить роль опиоидной сигнализации в эффекте YdAGFLR на транскрипцию *Sirt1*, мышам линии C57BL/6Y после индукции нелетального острого воспаления легких вводили ингаляционно однократно гексапептид YdAGFLR в отсутствие или присутствие ингибирующих концентраций налоксона, неселективного антагониста δ - и μ -опиоидных рецепторов, имеющего высокую аффинность к δ -опиоидному рецептору, и измеряли уровни мРНК SIRT1 во временной точке 6 часов, когда достигался максимальный эффект YdAGFLR на транскрипцию *Sirt1*. Эксперимент показал, что налоксон практически полностью ингибирует эффект YdAGFLR на уровни мРНК SIRT1, из чего следует, что эффект YdAGFLR на транскрипцию *Sirt1* прямо связан с его опиоидной активностью.

Полученные в настоящем исследовании результаты с учетом известных данных научной литературы позволяют составить схему влияния агониста δ -опиоидных рецепторов гексапептида YdAGFLR на ацетилирование и секрецию белка HMGB1 в условиях острого воспаления легких (Рисунок 16).

Предложенная схема суммирует полученные в настоящем исследовании результаты и показывает, что защитное действие агониста δ -опиоидных рецепторов гексапептида YdAGFLR в условиях острого воспаления легких связано с его влиянием на динамику ацетилирования и секреции внеклеточного HMGB1.

A



Б

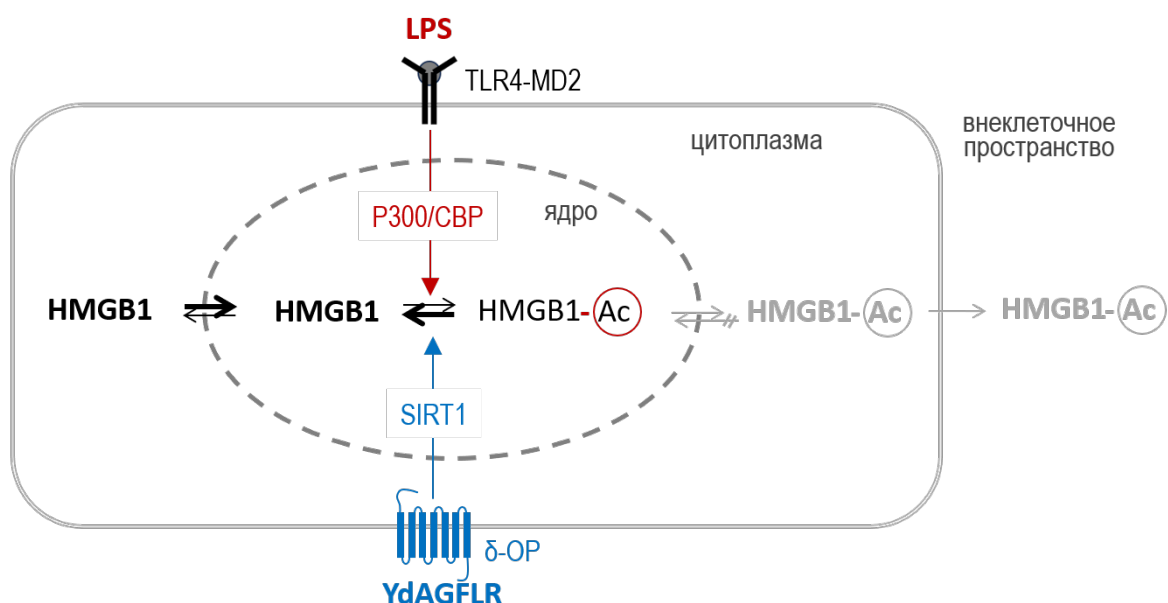


Рисунок 16 – Схема влияния гексапептида YdAGFLR на ацетилирование и секрецию белка HMGB1 в условиях воспаления легких. (А) Связывание LPS с TLR4-MD2 рецепторным комплексом [174] активирует ацетилтрансферазу p300/CBP [176, 177] и запускает ацетилирование HMGB1 по сайтам ядерной локализации NLS1 и NLS2 [14], что ведет к накоплению HMGB1 в цитоплазме и последующей секреции HMGB1 во внеклеточное пространство [14]. (Б) Активация δ-опиоидного рецептора гексапептидом YdAGFLR вызывает повышение транскрипции *Sirt1*, последующее деацетилирование сайтов ядерной локализации NLS1 и NLS2 в составе HMGB1, восстановление способности HMGB1 к транслокации из цитоплазмы в ядро, что в конечном итоге ведет к накоплению HMGB1 в ядре и снижению секреции HMGB1 во внеклеточное пространство.

HMGB1 имеет два сигнала ядерной локализации – NLS1 и NLS2, а также два сигнала ядерного экспорта NES, которые участвуют в переходах HMGB1 между внутриклеточными компартментами.

В норме, в отсутствие воспаления, импорт HMGB1 в ядро через образование комплекса HMGB1 с импортинами- α/β превалирует над экспортом HMGB1 из ядра в цитоплазму, что предопределяет преимущественное накопление HMGB1 в ядре и отсутствие значимых концентраций HMGB1 в цитоплазме и внеклеточном пространстве.

В условиях воспаления на распределение HMGB1 между ядром, цитоплазмой и внеклеточным пространством влияют два основных фактора – окислительный стресс и посттрансляционное ацетилирование сайтов ядерной локализации NLS1 и NLS2. Окислительный стресс ведет к образованию частично окисленной формы HMGB1, имеющей дисульфидную связь C^{23} -SS- C^{45} и восстановленный C^{106} -SH [107]. Эта форма HMGB1 имеет более высокое сродство к экспорту CRM1, чем полностью восстановленная форма HMGB1, что способствует быстрой транслокации HMGB1 (C^{23} -SS- C^{45} , C^{106} -SH) из ядра в цитоплазму. Активация рецептора TLR4 под действием LPS запускает активацию ацетилтрансферазы p300/CBP и ацетилирование HMGB1 [92]. Ацетилирование сайтов NLS1 и NLS2 в составе HMGB1 в условиях воспаления препятствует связыванию HMGB1 с импортинами и блокирует обратный транспорт HMGB1 из цитоплазмы в ядро (Рисунок 16А). Вследствие этого HMGB1 накапливается в цитоплазме и секретируется во внеклеточную среду под действием факторов, повышающих концентрацию Ca^{2+} в цитоплазме. Суммарно эти процессы ведут к повышению уровней внеклеточного HMGB1 и активации воспалительных процессов с участием HMGB1 как медиатора летального воспаления.

Деацетилирование сайтов ядерной локализации NLS1/NLS2 в составе HMGB1 под действием гексапептида YdAGFLR восстанавливает способность HMGB1 к взаимодействию с импортинами и обратный транспорт HMGB1 из цитоплазмы в ядро, что снижает накопление HMGB1 в цитоплазме и снижает риски секреции HMGB1 во внеклеточное пространство (Рисунок 16Б).

Полученные в настоящей работе результаты уточняют механизм действия гексапептида YdAGFLR в условиях воспаления легких и позволяют сделать обоснованное предположение о возможной перспективе применения лекарственного препарата на основе YdAGFLR для лечения заболеваний органов дыхания, для которых характерны повышенные концентрации внеклеточного HMGB1, учитывая известную роль внеклеточного HMGB1 как медиатора поздней фазы воспаления. К таким заболеваниям относятся внебольничная и внутрибольничная пневмонии, для которых характерны повышенные уровни внеклеточного HMGB1 вне зависимости от происхождения инфекции (бактериальная или вирусная), а степень тяжести заболевания и наличие серьезных осложнений прямо связаны с более высокими уровнями HMGB1 [144, 145, 115, 4, 146, 147, 148, 11, 149]. К таким заболеваниям также относится вентилятор-ассоциированная пневмония, при которой наблюдается серьезное повышение уровней внеклеточного HMGB1 в легких из-за гипероксии и механического стресса, вызванного длительным использованием ИВЛ [11, 118]. Кроме того, среди хронических заболеваний органов дыхания, характеризующихся особенно высокими уровнями внеклеточного HMGB1 в легких, к таким заболеваниям относится хроническая обструктивная болезнь легких (ХОБЛ) [179, 180], которая занимает третье место среди ведущих причин смерти в мире и седьмое место среди причин утраты здоровья во всем мире (по количеству лет жизни, скорректированных на инвалидность) [181]. Известно, что внеклеточный HMGB1 усиливает воспаление дыхательных путей и коррелирует со степенью тяжести ХОБЛ, причем концентрация HMGB1 возрастает во время обострений и снижается в периоды ремиссии. Для лечения ХОБЛ в качестве вспомогательной терапии применяются глюкокортикоиды, но их применение имеет ряд ограничений и вызывает повышенный риск развития пневмонии, поэтому существует потребность в новых эффективных и безопасных противовоспалительных средствах для лечения ХОБЛ [182].

Результаты, полученные в настоящей работе с использованием агониста δ -опиоидных рецепторов YdAGFLR на модели острого воспаления легких у мышей

линии C57BL/6Y, находятся в согласии с ранними результатами, полученными с использованием экспериментального агониста δ -опиоидных рецепторов DADLE на модели сепсиса у крыс, вызванного перевязкой и перфорацией слепой кишки [24]. Оба пептида, YdAGFLR в дозе 0,1 мг/кг при ингаляционном введении и DADLE в дозе 5 мг/кг при инъекционном введении, снижают уровни внеклеточного HMGB1 в легких и крови соответственно, и повышают выживаемость животных, что указывает на δ -опиоидную сигнализацию как на физиологический защитный механизм в условиях летального воспаления. Полученные результаты открывают перспективу применения пептидных агонистов δ -опиоидных рецепторов как нового класса лекарственных средств для лечения заболеваний органов дыхания, связанных с повышением уровней внеклеточного HMGB1.

Следует отметить, что на сегодняшний день нет коммерческих лекарственных средств, которые позиционировались бы как средства, снижающие внеклеточный HMGB1, хотя разработка таких средств активно ведется. С учетом результатов настоящего исследования, такое средство, снижающее внеклеточный HMGB1, уже применяется в практическом здравоохранении СССР и России с 1987 года, когда оно было зарегистрировано, хотя механизм действия его не был известен.

Пептидные агонисты δ -опиоидных рецепторов, к которым относится YdAGFLR, имеют ряд преимуществ по сравнению с агонистами других опиоидных рецепторов в качестве лекарственных средств. Они не вызывают угнетения дыхания и не вызывают эйфории, как μ -агонисты, или дисфории, как κ -агонисты, хотя обладают анксиолитической и антидепрессантной активностью [183].

Результаты настоящего исследования позволяют по-новому оценить роль периферической опиоидной системы в условиях воспаления. Известно, что воспаление вызывает локальный ответ опиоидной системы, характеризующийся повышением в очаге воспаления продукции и секреции коротких опиоидных пептидов иммунными клетками (макрофаги и лимфоциты) из белков-предшественников проопиомеланокортина, продинорфина и препроэнкефалина, а также экспрессией на поверхности иммунных клеток всех трех классических типов

опиоидных рецепторов – μ , δ и κ [159, 160]. Как полагают, функция опиоидных пептидов состоит в локальном контроле воспалительной боли, когда выделяемые внутри очага воспаления в ответ на действие цитокинов опиоидные пептиды действуют на опиоидные рецепторы на окончаниях периферических сенсорных нервов, снижая, тем самым, болевую чувствительность в месте воспаления [27]. Полученные в настоящем исследовании результаты, выявившие эффект δ -опиоидного агониста YdAGFLR на уровне внеклеточного HMGB1, в совокупности с известными данными о влиянии DADLE, другого агониста δ -опиоидных рецепторов, на уровне внеклеточного HMGB1 [24], указывают на защитную функцию периферической δ -опиоидной системы, а именно функцию снижения риска развития критических состояний в условиях чрезмерной активации врожденной иммунной системы.

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.

ПРАКТИЧЕСКИЕ РЕКОМЕНДАЦИИ

Результаты настоящей работы, посвященной изучению влияния агониста δ -опиоидных рецепторов гексапептида YdAGFLR на ацетилирование и секрецию белка HMGB1 в условиях острого воспаления легких, указывают на возможность использования лекарственных средств, содержащих YdAGFLR в качестве активного действующего вещества, для лечения воспалительных заболеваний легких, где внеклеточный HMGB1 является патогенетическим фактором и медиатором летального воспаления, таких как вирусные и бактериальные пневмонии, а также хроническая обструктивная болезнь легких в периоды обострения. Результаты настоящей работы были включены в обоснование механизма действия ингаляционного лекарственного препарата «Лейтрагин», активная фармацевтическая субстанция – YdAGFLR, регистрационное удостоверение № ЛП-007043, держатель регистрационного удостоверения – ФГБУН НЦБМТ ФМБА России (Приложение А).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И УСЛОВНЫХ ОБОЗНАЧЕНИЙ

Ацетил-К/К	– Соотношение ацетилированных и неацетилированных остатков лизина в составе HMGB1
БАЛЖ	– Жидкость бронхоальвеолярного смыва
ВАП	– Вентилятор-ассоциированная пневмония
ВП	– Внебольничная пневмония
ВЭЖХ-МС/МС	– Высокоэффективная жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией
ГТФ	– Гуанозинтрифосфат
ИВЛ	– Искусственная вентиляция легких
ИФА	– Иммуноферментный анализ
ЛО	– Ложнооперированные животные
мРНК	– Матричная рибонуклеиновая кислота
ОРДС	– Острый респираторный дистресс-синдром
ОРИТ	– Отделение реанимации и интенсивной терапии
ПЦР	– Полимеразная цепная реакция
СОП	– Стандартные операционные процедуры
α -GalCer	– α -галактозилцерамид
$\alpha 7nAChR$	– $\alpha 7$ никотиновый ацетилхолиновый рецептор
CD91	– Кластер дифференцировки 91
COVID-19	– Коронавирусное заболевание 2019 года (от англ. COronaVirus Disease 2019)
CRM1	– Рецептор ядерного транспорта, также известный XPO1
CXCR4	– Рецептор хемокинов 4
DADLE	– Экспериментальный пептидный агонист дельта-опиоидных рецепторов Tyr-D-Ala-Gly-Phe-D-Leu
DAMP	– Молекулярный паттерн, ассоциированный с повреждением (от англ. damage-associated molecular pattern)

dsRNA	– Двухцепочечная РНК
ESI	– Электрораспыление
FAK	– Фокальная адгезионная киназа
GAPDH	– Ген домашнего хозяйства
GPCR	– Рецепторы, сопряжённые с G-белком (от англ. G protein-coupled receptors)
HDAC1	– Гистоновая деацетилаза 1
HDAC4	– Гистоновая деацетилаза 4
HDAC5	– Гистоновая деацетилаза 5
HMGB1	– Белок бокс 1 группы высокой подвижности (от англ. High-Mobility Group Box 1)
IFN- α	– Интерферон- α
IFN- β	– Интерферон- β
IFN- γ	– Интерферон- γ
IL-6	– Интерлейкин-6
Imp- α	– Импортин α
Imp- β	– Импортин β
iNKT	– Инвариантные натуральные Т киллеры
IRF3	– Интерферон-регулирующий фактор 3
JAK	– Янус киназа
LPS	– Липополисахарид <i>E. coli</i> 055:B5
MD2	– Фактор дифференцировки миелоидных клеток 2
NES	– Сигналы ядерного экспорта
NF- κ B	– Ядерный фактор каппа В
NLS1 и NLS2	– Сайты ядерной локализации 1 и 2
NOD2	– NOD-подобный рецептор 2
PRR	– Рецептор распознавания паттернов
Rab43	– Ras-зависимый ГТФ-связывающий белок 43
RAGE	– Рецептор конечных продуктов гликирования

SIRT1	– Никотинамиддинуклеотид (NAD ⁺)-зависимая деацетилаза сиртуин 1
SOFA	– Шкала последовательной органной недостаточности
STAT1	– Фактор транскрипции 1 (от англ. signal transducer and activator of transcription 1)
TIM-3	– Т-клеточный иммуноглобулин и муцин-3
TLR2	– Толл-подобный рецептор 2
TLR3	– Толл-подобный рецептор 3
TLR4	– Толл-подобный рецептор 4
TLR7	– Толл-подобный рецептор 7
TLR9	– Толл-подобный рецептор 9
TNF- α	– Фактор некроза опухоли- α
XPO1	– Экспортин 1 (рецептор ядерного транспорта)
YdAGFLR	– Гексапептид тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинин ацетата

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. **Kang, R.** HMGB1 in health and disease / R. Kang, R. Chen, Q. Zhang [et al.] // *Mol Aspects Med.* – 2014. – Vol. 40. – P. 1-116.
2. **Wang, H.** HMG-1 as a late mediator of endotoxin lethality in mice / H. Wang, O. Bloom, M. Zhang [et al.] // *Science.* – 1999. – Vol. 285. – N 5425. – P. 248–251.
3. **Wang, H.** HMGB1 as a late mediator of lethal systemic inflammation / H. Wang, H. Yang, C. J. Czura [et al.] // *Am J Respir Crit Care Med.* – 2001. – Vol. 164. – N 10, Pt 1. – P. 1768–1773.
4. **Ito, Y.** Increased levels of cytokines and high-mobility group box 1 are associated with the development of severe pneumonia, but not acute encephalopathy, in 2009 H1N1 influenza-infected children / Y. Ito, Y. Torii, R. Ohta [et al.] // *Cytokine.* – 2011. – Vol. 56. – N 2. – P. 180–187.
5. **Grigorov, I.** Serum High-Mobility Group Box 1 and Heme Oxygenase-1 as Biomarkers in COVID-19 Patients at Hospital Admission / I. Grigorov, S. Pejić, A. Todorović [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2023. – Vol. 24. – N 17. – P. 13164.
6. **Vicentino, A.R.R.** High mobility group box 1, ATP, lipid mediators, and tissue factor are elevated in COVID-19 patients: HMGB1 as a biomarker of worst prognosis / A.R.R. Vicentino, V.D.S. Fraga-Junior, M. Palazzo [et al.] // *Clin Transl Sci.* – 2023. – Vol. 16. – N 4. – P. 631–646.
7. **Štros, M.** Progress in Assays of HMGB1 Levels in Human Plasma-The Potential Prognostic Value in COVID-19 / M. Štros, E.V. Polanská, T. Hlaváčová, P. Skládal // *Biomolecules.* – 2022. – Vol. 12. – N 4. – P. 544.
8. **Sivakorn, C.** High Mobility Group Box 1 and Interleukin 6 at Intensive Care Unit Admission as Biomarkers in Critically Ill COVID-19 Patients / C. Sivakorn, J. Dechsanga, L. Jamjumrus [et al.] // *Am J Trop Med Hyg.* – 2021. – Vol. 105. – N 1. – P. 73–80.
9. **Chen, R.** HMGB1 as a potential biomarker and therapeutic target for severe COVID-19 / R. Chen, Y. Huang, J. Quan [et al.] // *Heliyon.* – 2020. – Vol. 6. – N 12. – P. e05672.

10. **Chen, L.** Elevated serum levels of S100A8/A9 and HMGB1 at hospital admission are correlated with inferior clinical outcomes in COVID-19 patients / L. Chen, X. Long, Q. Xu [et al.] // *Cell Mol Immunol.* – 2020. – Vol. 17. – N 9. – P. 992–994.
11. **van Zoelen, M. A.** Pulmonary levels of high-mobility group box 1 during mechanical ventilation and ventilator-associated pneumonia / M. A. van Zoelen, A. Ishizaka, E. K. Wolthuis [et al.] // *Shock.* – 2008. – Vol. 29. – N 4. – P. 441–445.
12. **Angus, D. C.** Severe sepsis and septic shock / D. C. Angus, T. van der Poll // *N Engl J Med.* – 2013. – Vol. 369. – N 9. – P. 840–851.
13. **Xue, J.** HMGB1 as a therapeutic target in disease / J. Xue, J. S. Suarez, M. Minaai [et al.] // *J Cell Physiol.* – 2021. – Vol. 236. – N 5. – P. 3406–3419.
14. **Bonaldi, T.** Monocytic cells hyperacetylate chromatin protein HMGB1 to redirect it towards secretion / T. Bonaldi, F. Talamo, P. Scaffidi [et al.] // *EMBO J.* – 2003. – Vol. 22. – N 20. – P. 5551–5560.
15. **Bonaldi, T.** JAK/STAT1 signaling promotes HMGB1 hyperacetylation and nuclear translocation / B. Lu, D.J. Antoine, K. Kwan [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2014. – Vol. 111, – N 8. – P. 3068–3073.
16. **Wang, Y.** Regulation of Acetylation in High Mobility Group Protein B1 Cytosol Translocation / Y. Wang, L. Wang, Z. Gong // *DNA Cell Biol.* – 2019. – Vol. 38. – N 5. – P. 491–499.
17. **Rabadi, M. M.** High-mobility group box 1 is a novel deacetylation target of Sirtuin1 / M. M. Rabadi, S. Xavier, R. Vasko [et al.] // *Kidney Int.* – 2015. – Vol. 87. – N 1. – P. 95–108.
18. **Kim, Y. M.** Ethyl pyruvate inhibits the acetylation and release of HMGB1 via effects on SIRT1/STAT signaling in LPS-activated RAW264.7 cells and peritoneal macrophages / Y. M. Kim, E. J. Park, J. H. Kim [et al.] // *Int Immunopharmacol.* – 2016. – Vol. 41. – P. 98–105.
19. **Qi, Z.** Salidroside Inhibits HMGB1 Acetylation and Release through Upregulation of SirT1 during Inflammation / Z. Qi, Y. Zhang, S. Qi [et al.] // *Oxid Med Cell Longev.* – 2017. – P. 9821543.

20. **Sinclair, D. A.** Small-molecule allosteric activators of sirtuins / D. A. Sinclair, L. Guarente // *Annu Rev Pharmacol Toxicol.* – 2014. – Vol. 54. – P. 363–380.
21. **Opal, S. M.** Pharmacological Sirt1 activation improves mortality and markedly alters transcriptional profiles that accompany experimental sepsis / S. M. Opal, J. L. Ellis, V. Suri [et al.] // *Shock.* – 2016. – Vol. 45. – No. 4. – P. 411–418.
22. **Sitapara, R. A.** The $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor agonist GTS-21 improves bacterial clearance in mice by restoring hyperoxia-compromised macrophage function / R. A. Sitapara, A. G. Gauthier, V. S. Patel [et al.] // *Mol Med.* – 2020. – Vol. 26. – N 1. – P. 98.
23. **Gauthier, A. G.** GAT107-mediated $\alpha 7$ nicotinic acetylcholine receptor signaling attenuates inflammatory lung injury and mortality in a mouse model of ventilator-associated pneumonia by alleviating macrophage mitochondrial oxidative stress via reducing MnSOD-S-glutathionylation / A. G. Gauthier, M. Lin, S. Zefi [et al.] // *Redox Biol.* – 2023. – Vol. 60. – P. 102614.
24. **Tang, C. W.** Delayed administration of D-Ala2-D-Leu5-enkephalin, a delta-opioid receptor agonist, improves survival in a rat model of sepsis / C. W. Tang, W. M. Feng, H. M. Du [et al.] // *Tohoku J Exp Med.* – 2011. – Vol. 224. – N 1. – P. 69–76.
25. **Yarigin, K. N.** The interactions of opioids with enterocytes membranes: evidence for enzyme-catalysed covalent binding / K. N. Yarigin // *Collection of Czechoslovak Chemical Communications.* – 1990. – Vol. 55. – P. 2328–2338.
26. **Булгаков, С. А.** Гексапептид даларгин в клинической гастроэнтерологии: 30-летний опыт использования препарата / С. А. Булгаков // *Российский журнал гастроэнтерологии, гепатологии, колопроктологии.* – 2016. – Т. 26. – № 3. – С. 103–112.
27. **Cabot, P. J.** Immune-derived opioids and peripheral antinociception / P. J. Cabot // *Clin Exp Pharmacol Physiol.* – 2001. – Vol. 28. – N 3. – P. 230–232.
28. **Stros, M.** HMGB proteins: interactions with DNA and chromatin / M. Stros // *Biochim Biophys Acta.* – 2010. – Vol. 1799. – N 1-2. – P. 101–113.

29. **Mosevitsky, M. I.** Tissue specificity of nucleocytoplasmic distribution of HMG1 and HMG2 proteins and their probable functions / M. I. Mosevitsky, V. A. Novitskaya, M. G. Iogannsen, M. A. Zabezhinsky // *Eur. J. Biochem.* – 1989. – Vol. 185. – P. 303.
30. **Joshi, S. R.** Nucleosome dynamics: HMGB1 relaxes canonical nucleosome structure to facilitate estrogen receptor binding / S. R. Joshi, Y. C. Sarpong, R. C. Peterson, W. M. Scovell // *Nucleic Acids Res.* – 2012. – Vol. 40. – P. 10161.
31. **Thomas, J. O.** HMG1 and 2, and related ‘architectural’ DNA-binding proteins / J. O. Thomas, A. A. Travers // *Trends Biochem. Sci.* – 2001. – Vol. 26. – P. 167.
32. **Totsingan, F.** Interaction of HMG proteins and H1 with hybrid PNA-DNA junctions / F. Totsingan, A. J. Bell // *Protein Sci.* – 2013. – Vol. 22. – P. 1552.
33. **Reeves, R.** High mobility group (HMG) proteins, modulators of chromatin structure and DNA repair in mammalian cells / R. Reeves // *DNA Repair.* – 2015. – Vol. 36. – P. 122.
34. **Bustin, M.** High-mobility-group chromosomal proteins, architectural components that facilitate chromatin function / M. Bustin, R. Reeves // *Progr Nucl Acid Res Mol Biol.* – 1996. – Vol. 54. – P. 35.
35. **Li, J.** Structural basis for the proinflammatory cytokine activity of high mobility group box 1 / J. Li, R. Kokkola, S. Tabibzadeh [et al.] *Molecular medicine (Cambridge, Mass).* – 2003. – Vol. 9. – N 1-2. – P. 37–45.
36. **Wang, Q.** The HMGB1 acidic tail regulates HMGB1 DNA binding specificity by a unique mechanism / Q. Wang, M. Zeng, W. Wang, J. Tang // *Biochem Biophys Res Commun.* – 2007. – Vol. 360. – P. 14–19.
37. **Aizawa, S.** Stimulation of transcription in cultured cells by high mobility group protein 1: Essential role of the acidic carboxyl-terminal region / S. Aizawa, H. Nishino, K. Saito [et al.] // *Biochemistry.* – 1994. – Vol. 33. – P. 14690–14695.
38. **Knapp, S.** The long acidic tail of high mobility group box 1 (HMGB1) protein forms an extended and flexible structure that interacts with specific residues within and between the HMG boxes / S. Knapp, S. Muller, G. Digilio, T. Bonaldi [et al.] // *Biochem.* – 2004. – Vol. 43. – P. 11992.

39. **Watson, M.** Mapping intramolecular interaction between domains in HMGB1 using tail truncation approach / M. Watson, K. Stott, J. O. Thomas // *J Mol Biol.* – 2007. – Vol. 374. – P. 1286.
40. **Teo, S.H.** Differences in the DNA-binding properties of the HMG-box domains of HMGI and the sex-determining factor SRY / S. H. Teo, K. D. Grasser, J. O. Thomas // *Eur J Biochem.* – 1995. – Vol. 230. – P. 943.
41. **Chikhirzhina, E. V.** HMGI domains: The victims of the circumstances / E. V. Chikhirzhina, A. M. Polyanichko, A. N. Skvortsov [et al.] // *Molecular Biology (Mosk).* – 2002. – Vol. 36. – P. 412.
42. **Andersson, U.** Post-Translational Modification of HMGB1 Disulfide Bonds in Stimulating and Inhibiting Inflammation / U. Andersson, K. J. Tracey, H. Yang // *Cells.* – 2021. – Vol. 10. – N 12. – P. 3323.
43. **Ellerman, J. E.** Masquerader: high mobility group box-1 and cancer / J. E. Ellerman, C. K. Brown, M. de Vera [et al.] // *Clinical cancer research: an official journal of the American Association for Cancer Research.* – 2007. – Vol. 13. – N 10. – P. 2836–2848.
44. **Ito, I.** Post-translational methylation of high mobility group box 1 (HMGB1) causes its cytoplasmic localization in neutrophils / I. Ito, J. Fukazawa, M. Yoshida // *J Biol Chem.* – 2007. – Vol. 282. – P. 16336.
45. **Zhang, Q.** High mobility group proteins and their post-translational modifications / Q. Zhang, Y. Wang // *Biochim Biophys Acta.* – 2008. – Vol. 1784. – P. 1159.
46. **Oh, Y. J.** HMGB1 is phosphorylated by classical protein kinase C and is secreted by a calcium dependent mechanism / Y. J. Oh, J. H. Youn, Y. Ji [et al.] // *J Immunol.* – 2009. – Vol. 182. – P. 5800.
47. **Venereau, E.** Mutually exclusive redox forms of HMGB1 promote cell recruitment or proinflammatory cytokine release / E. Venereau, M. Casalgrandi, M. Schiraldi [et al.] // *J Exp Med.* – 2012. – Vol. 209. – P. 1519.
48. **Tsung, A.** High-mobility group box 1 in sterile inflammation / A. Tsung, S. Tohme, T. R. Billiar // *J Intern Med.* – 2014. – Vol. 276. – P. 425.

49. **Raucci, A.** The Janus face of HMGB1 in heart disease: a necessary update / A. Raucci, S. Di Maggio, F. Scavello [et al.] // *Cell Mol Life Sci.* – 2019. – Vol. 76. – P. 211.
50. **Wei, T.** Revealing the extracellular function of HMGB1 N-terminal region acetylation assisted by a protein semi-synthesis approach / T. Wei, J. Liu, C. Li [et al.] // *Chem Sci.* – 2023. – Vol. 14. – N 37. – P. 10297–10307.
51. **Yang, K.** Lactate promotes macrophage HMGB1 lactylation, acetylation, and exosomal release in polymicrobial sepsis / K. Yang, M. Fan, X. Wang [et al.] // *Cell Death Differ.* – 2022. – Vol. 29. – N 1. – P. 133–146.
52. **Kang, R.** PKR-dependent inflammatory signals / R. Kang, D. Tang // *Science Signaling.* – 2012. – Vol. 5. – P. 47.
53. **Lin, F.** HMGB1 promotes cellular chemokine synthesis and potentiates mesenchymal stromal cell migration via Rap1 activation / F. Lin, D. Xue, T. Xie, Z. Pan // *Mol Med Rep.* – 2016. – Vol. 14. – P. 1283.
54. **Li, Y.** Poly (ADP-ribosylation) of HMGB1 facilitates its acetylation and promotes HMGB1 translocation-associated chemotherapy induced autophagy in leukaemia cells / Y. Li, J. Xie, X. Li, J. Fang // *Oncol Lett.* – 2020. – Vol. 19. – N 1. – P. 368–378.
54. **Kong, Q.** SIRT6-PARP1 is involved in HMGB1 polyADP-ribosylation and acetylation and promotes chemotherapy-induced autophagy in leukemia / Q. Kong, Y. Li, Q. Liang [et al.] // *Cancer biology & therapy.* – 2020. – Vol. 21. – N 4. – P. 320–331.
56. **Davis, K.** Poly(ADP ribosyl)ation of high mobility group box 1 (HMGB1) protein enhances inhibition of efferocytosis / K. Davis, S. Banerjee, A. Friggeri [et al.] // *Molecular medicine (Cambridge, Mass).* – 2012. – Vol. 18. – N 1. – P. 359–369.
57. **Huang, H.** Hepatocyte-specific high-mobility group box 1 deletion worsens the injury in liver ischemia/reperfusion: a role for intracellular high-mobility group box 1 in cellular protection / H. Huang, G. W. Nace, K. A. McDonald [et al.] // *Hepatology (Baltimore, Md).* – 2014. – Vol. 59. – N 5. – P. 1984–1997.
58. **Kim, Y. H.** N-linked glycosylation plays a crucial role in the secretion of HMGB1 / Y. H. Kim, M. S. Kwak, J. B. Park [et al.] // *J Cell Sci.* – 2016. – Vol. 129. – N 1. – P. 29–38.

59. **Song, L.** Post-translational regulation of ubiquitin signaling / L. Song, Z. Q. Luo // *J Cell Biol.* – 2019. – Vol. 218. – N 6. – P. 1776–1786.
60. **Ferreri, A. J.** Flows and flaws in primary central nervous system lymphoma / A. J. Ferreri, G. Illerhaus, E. Zucca, F. Cavalli // *Nature reviews Clinical oncology.* – 2010. – Vol. 7. – P. 1–2. doi: 10.1038/nrclinonc.2010.9-c1.
61. **Gao, D.** LncRNA MALAT-1 Elevates HMGB1 to Promote autophagy resulting in inhibition of tumor cell apoptosis in multiple myeloma / D. Gao, A. E. Lv, H. P. Li [et al.] // *J Cell Biochem.* – 2017. – Vol. 10. – P. 3341–3348.
62. **Roy, M.** Lycorine downregulates HMGB1 to inhibit autophagy and enhances bortezomib activity in multiple myeloma / M. Roy, L. Liang, X. Xiao [et al.] // *Theranostics.* – 2016. – Vol. 6. – N 12. – P. 2209–2224.
63. **Чихиржина, Е.В.** Белок HMGB1: регуляция специфическими E3-убиквитин-лигазами / Е. В. Чихиржина, А. Н. Томилин, А. С. Цимоха // *Гены и клетки.* – 2025. – Т. 20. – № 2. – С. 72–86.
64. **Yang, H.** A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release / H. Yang, H. S. Hreggvidsdottir, K. Palmblad [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2010. – Vol. 107. – N 26. – P. 11942–11947.
65. **Yang, H.** Redox modifications of cysteine residues regulate the cytokine activity of HMGB1 / H. Yang, P. Lundbäck, L. Ottosson [et al.] // *Mol Med.* – 2021. – Vol. 27. – N 1. – P. 58.
66. **Venereau, E.** HMGB1 and leukocyte migration during trauma and sterile inflammation / E. Venereau, M. Schiraldi, M. Uguccioni, M. E. Bianchi // *Mol Immunol.* – 2013. – Vol. 1. – P. 76–82.
67. **Schiraldi, M.** HMGB1 promotes recruitment of inflammatory cells to damaged tissues by forming a complex with CXCL12 and signaling via CXCR4 / M. Schiraldi, A. Raucci, L. M. Muñoz [et al.] // *J Exp Med.* – 2012. – Vol. 209. – N 3. – P. 551–563.
68. **Tang, D.** The redox protein HMGB1 regulates cell death and survival in cancer treatment / D. Tang, M. T. Loze, H. J. Zeh, R. Kang // *Autophagy.* – 2010. – Vol. 8. – P. 1181–1183.

69. **Yang, H.** The many faces of HMGB1: molecular structure-functional activity in inflammation, apoptosis, and chemotaxis / H. Yang, D. J. Antoine, U. Andersson, K. J. Tracey // *J Leukoc Biol.* – 2013. – Vol. 6. – P. 865-873.
70. **Biscetti, F.** Therapeutic potential of high mobility group box-1 in ischemic injury and tissue regeneration / F. Biscetti, G. Ghirlanda, A. Flex // *Curr Vasc Pharmacol.* – 2011. – Vol. 9. – N 6. – P. 677–681.
71. **Yang, H.** MD-2 is required for disulfide HMGB1-dependent TLR4 signaling / H. Yang, H. Wang, Z. Ju [et al.] // *J Exp Med.* – 2015. – Vol. 212. – N 1. – P. 5–14.
72. **Kazama, H.** Induction of immunological tolerance by apoptotic cells requires caspase dependent oxidation of high-mobility group box-1 protein / H. Kazama, J. E. Ricci, J. M. Herndon [et al.] // *Immunity.* – 2008. – Vol. 29. – N 1. – P. 21–32.
73. **Travers, A. A.** Chromosomal HMG-box proteins. / A. A. Travers, J. O. Thomas // *New Compr Biochem.* – 2004. – Vol. 39. – P. 103–134.
74. **Thomas, J.O.** H1 and HMGB1: Modulators of chromatin structure / J. O. Thomas, K. Stott // *Biochem Soc Trans.* – 2012. – Vol. 40. – P. 341–346.
75. **Ueda, T.** Acidic C-tail of HMGB1 is required for its target binding to nucleosome linker DNA and transcription stimulation / T. Ueda, H. Chou, T. Kawase [et al.] // *Biochemistry.* – 2004. – Vol. 43. – P. 9901–9908.
76. **Catez, F.** Network of dynamic interactions between histone H1 and high-mobility-group proteins in chromatin / F. Catez, H. Yang, K. J. Tracey [et al.] // *Mol Cell Biol.* – 2004. – Vol. 24. – P. 4321–4328.
77. **Agresti, A.** HMGB proteins and gene expression / A. Agresti, M. E. Bianchi // *Curr Opin Genet Dev.* – 2003. – Vol. 13. – P. 170–178.
78. **Lange, S. S.** High mobility group protein B1 enhances DNA repair and chromatin modification after DNA damage / S. S. Lange, D. L. Mitchell, K. M. Vasquez // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 2008. – Vol. 105. – N 30. – P. 10320–10325.
79. **Chikhirzhina, E.** Functional Diversity of Non-Histone Chromosomal Protein HmgB1 / E. Chikhirzhina, T. Starkova, A. Beljajev [et al.] // *Int J Mol Sci.* – 2020. – Vol. 21. – N 21. – P. 7948.

80. **Chen, R.** The mechanism of HMGB1 secretion and release / R. Chen, R. Kang, D. Tang // *Exp Mol Med.* – 2022. – Vol. 2. – P. 91-102.
81. **Kehlenbach, R. H.** The nuclear export receptor CRM1/XPO1 and its diverse cargoes / R. H. Kehlenbach, Y. M. Chook // *Trends Biochem Sci.* – 2025. – Vol. 12. – P. 1131–1144.
82. **Stewart, M.** Molecular mechanism of the nuclear protein import cycle / M. Stewart // *Nat Rev Mol Cell Biol.* – 2007. – Vol. 3. – P. 195–208.
83. **Tang, Y.** Regulation of Posttranslational Modifications of HMGB1 During Immune Responses / Y. Tang, X. Zhao, D. Antoine [et al.] // *Antioxid Redox Signal.* – 2016. – Vol. 24. – N 12. – P. 620–634.
84. **Evankovich, J.** High mobility group box 1 release from hepatocytes during ischemia and reperfusion injury is mediated by decreased histone deacetylase activity / J. Evankovich, S. W. Cho, R. Zhang [et al.] // *J Biol Chem.* – 2010. – Vol. 285. – N 51. – P. 39888–39897.
85. **He, M.** HDAC4/5-HMGB1 signalling mediated by NADPH oxidase activity contributes to cerebral ischaemia/reperfusion injury / M. He, B. Zhang, X. Wei [et al.] // *J Cell Mol Med.* – 2013. – Vol. 4. – P. 531–542.
86. **Rabadi, M. M.** High-mobility group box 1 is a novel deacetylation target of Sirtuin1 / M. M. Rabadi, S. Xavier, R. Vasko [et al.] // *Kidney Int.* – 2015. – Vol. 1. – P. 95–108.
87. **Ciccone, L.** Resveratrol-like Compounds as SIRT1 Activators / L. Ciccone, E. Piragine, S. Brogi [et al.] // *International Journal of Molecular Sciences.* – 2022. – Vol. 23. – N 23. – P. 15105.
88. **Hu, X.** The JAK/STAT signaling pathway: from bench to clinic / X. Hu, J. Li, M. Fu [et al.] // *Signal Transduct Target Ther.* – 2021. – Vol. 6. – N 1. – P. 402.
89. **Stark, G. R.** The JAK-STAT pathway at twenty / G. R. Stark, J. E. Jr Darnell // *Immunity.* – 2012. – Vol. 36. – N 4. – P. 503–514.
90. **Zhang, J. J.** Two contact regions between Stat1 and CBP/p300 in interferon gamma signaling / J. J. Zhang, U. Vinkemeier, W. Gu [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA.* – 1996. – Vol. 93. – N 26. – P. 15092–15096.

91. **Ortega, E.** Transcription factor dimerization activates the p300 acetyltransferase / E. Ortega, S. Rengachari, Z. Ibrahim [et al.] // *Nature*. – 2018. – Vol. 562. – N 7728. – P. 538–544.
92. **Chow, J. C.** Toll-like receptor-4 mediates lipopolysaccharide-induced signal transduction / J. C. Chow, D. W. Young, D. T. Golenbock [et al.] // *J Biol Chem*. – 1999. – Vol. 274. – N 16. – P. 10689–10692.
93. **Shimazu, R.** MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4 / R. Shimazu, S. Akashi, H. Ogata [et al.] // *J Exp Med*. – 1999. – Vol. 189. – N 11. – P. 1777–1782.
94. **Kurt-Jones, E. A.** Pattern recognition receptors TLR4 and CD14 mediate response to respiratory syncytial virus / E. A. Kurt-Jones, L. Popova, L. Kwinn [et al.] // *Nat Immunol*. – 2000. – Vol. 1. – N 5. – P. 398–401.
95. **Modhiran, N.** Dengue virus NS1 protein activates cells via Toll-like receptor 4 and disrupts endothelial cell monolayer integrity / N. Modhiran, D. Watterson, D. A. Muller [et al.] // *Sci Transl Med*. – 2015. – Vol. 7. – P. 1-10. doi: 10.1126/scitranslmed.aaa3863.
96. **Termeer, C.** Oligosaccharides of Hyaluronan activate dendritic cells via toll-like receptor 4 / C. Termeer, F. Benedix, J. Sleeman [et al.] // *J Exp Med*. – 2002. – Vol. 195. – № 1. – P. 99–111.
97. **Schaefer, L.** The matrix component biglycan is proinflammatory and signals through Toll-like receptors 4 and 2 in macrophages / L. Schaefer, A. Babelova, E. Kiss [et al.] // *J Clin Invest*. – 2005. – Vol. 115. – N 8. – P. 2223–2233.
98. **Roelofs, M. F.** Identification of small heat shock protein B8 (HSP22) as a novel TLR4 ligand and potential involvement in the pathogenesis of rheumatoid arthritis / M. F. Roelofs, W. C. Boelens, L. A. Joosten [et al.] // *J Immunol*. – 2006. – Vol. 176. – N 11. – P. 7021–7027.
99. **Ohashi, K.** Cutting edge: heat shock protein 60 is a putative endogenous ligand of the toll-like receptor-4 complex / K. Ohashi, V. Burkart, S. Flohé, H. Kolb // *J Immunol*. – 2000. – Vol. 164. – N 2. – P. 558–561.

100. **Asea, A.** Novel signal transduction pathway utilized by extracellular HSP70: role of toll-like receptor (TLR) 2 and TLR4 / A. Asea, M. Rehli, E. Kabingu [et al.] // *J Biol Chem.* – 2002. – Vol. 277. – N 17. – P. 15028–15034.
101. **Smiley, S. T.** Fibrinogen stimulates macrophage chemokine secretion through toll-like receptor 4 / S. T. Smiley, J. A. King, W. W. Hancock // *J Immunol.* – 2001. – Vol. 167. – N 5. – P. 2887–2894.
102. **Ma, L.** Proinflammatory effects of S100A8/A9 via TLR4 and RAGE signaling pathways in BV-2 microglial cells / L. Ma, P. Sun, J. C. Zhang [et al.] // *Int J Mol Med.* – 2017. – Vol. 40. – N 1. – P. 31–38.
103. **Nicholas, D. A.** Palmitic acid is a toll-like receptor 4 ligand that induces human dendritic cell secretion of IL-1 β / D. A. Nicholas, K. Zhang, C. Hung [et al.] // *PLoS One.* – 2017. – Vol. 12. – N 5. – P. e0176793. doi: 10.1371/journal.pone.0176793.
104. **Greenberg, S.** Phagocytosis and innate immunity / S. Greenberg, S. Grinstein // *Curr Opin Immunol.* – 2002. – Vol. 14. – N 1. – P. 136–145.
105. **Tang, D.** Hydrogen peroxide stimulates macrophages and monocytes to actively release HMGB1 / D. Tang, Y. Shi, R. Kang [et al.] // *Leukoc Biol.* – 2007. – Vol. 81. – N 3. – P. 741–747.
106. **Tsung, A.** HMGB1 release induced by liver ischemia involves Toll-like receptor 4 dependent reactive oxygen species production and calcium-mediated signaling / A. Tsung, J. R. Klune, X. Zhang [et al.] // *J Exp Med.* – 2007. – Vol. 204. – N 12. – P. 2913–2923.
107. **Kwak, M. S.** Peroxiredoxin-mediated disulfide bond formation is required for nucleocytoplasmic translocation and secretion of HMGB1 in response to inflammatory stimuli / M. S. Kwak, H. S. Kim, K. Lkhamsuren [et al.] // *Redox Biol.* – 2019. – Vol. 24. – P. 101203. doi: 10.1016/j.redox.2019.101203.
108. **Gardella, S.** The nuclear protein HMGB1 is secreted by monocytes via a non-classical, vesicle-mediated secretory pathway / S. Gardella, C. Andrei, D. Ferrera [et al.] // *EMBO Rep.* – 2002. – Vol. 3. – N 10. – P. 995–1001.
109. **Yang, H.** A critical cysteine is required for HMGB1 binding to Toll-like receptor 4 and activation of macrophage cytokine release / H. Yang, H. S. Hreggvidsdottir,

K. Palmblad [et al.] // Proc Natl Acad Sci USA. – 2010. – Vol. 107. – N 26. – P. 11942–11947.

110. **Hori, O.** The receptor for advanced glycation end products (RAGE) is a cellular binding site for amphoterin. Mediation of neurite outgrowth and co-expression of rage and amphoterin in the developing nervous system / O. Hori, J. Brett, T. Slattery [et al.] // J Biol Chem. – 1995. – Vol. 270. – N 43. – P. 25752–25761.

111. **Weber, D. J.** The HMGB1-RAGE Inflammatory Pathway: Implications for Brain Injury-Induced Pulmonary Dysfunction / D. J. Weber, Y. M. Allette, D. S. Wilkes, F. A. White // Antioxid Redox Signal. – 2015. – Vol. 23. – N 17. – P. 1316–1328.

112. **Dahlin, K.** Identification of genes differentially expressed in rat alveolar type I cells / K. Dahlin, E. M. Mager, L. Allen [et al.] // Am J Respir Cell Mol Biol. – 2004. – Vol. 31. – N 3. – P. 309–316. doi: 10.1165/rcmb.2003-0423OC.

113. **McElroy, M. C.** The use of alveolar epithelial type I cell-selective markers to investigate lung injury and repair / M. C. McElroy, M. Kasper // Eur Respir J. – 2004. – Vol. 24. – N 4. – P. 664–673.

114. **Uchida, T.** Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I cell injury in acute lung injury / T. Uchida, M. Shirasawa, L. B. Ware [et al.] // Am J Respir Crit Care Med. – 2006. – Vol. 173. – N 9. – P. 1008–1015.

115. **Entezari, M.** Inhibition of high-mobility group box 1 protein (HMGB1) enhances bacterial clearance and protects against *Pseudomonas Aeruginosa* pneumonia in cystic fibrosis / M. Entezari, D. J. Weiss, R. Sitapara [et al.] // Mol Med. – 2012. – Vol. 18. – N 1. – P. 477–485.

116. **Mao, Y.** Myeloid cell-specific HMGB1 deficiency exaggerates mucoinflammatory responses but promotes bacterial clearance in mucoinflammatory lung disease / Y. Mao, S. Patial, Y. Saini // Sci Rep. – 2026. – Vol. 16. – N 1. – P. 3391.

117. **Ming, B.** Extracellular HMGB1 impairs macrophage phagocytosis and promotes salivary gland dysfunction in Sjogren's syndrome / B. Ming, L. Li, Y. Dong [et al.] // J Immunol. – 2025. – Vol. 214. – N 12. – P. 3374–3384.

118. **Miao, J.** Nuclear HMGB1 promotes the phagocytic ability of macrophages / J. Miao, S. Ye, J. Lan [et al.] // Exp Cell Res. – 2020. – Vol. 393. – N 1. – P. 112037.

119. **Miao, J.** Paeonol promotes the phagocytic ability of macrophages through confining HMGB1 to the nucleus / J. Miao, P. Ye, J. Lan [et al.] // *Int Immunopharmacol.* – 2020. – Vol. 89, Pt B. – P. 107068.
120. **Lauber, K.** Clearance of apoptotic cells: getting rid of the corpses / K. Lauber, S. G. Blumenthal, M. Waibel, S. Wesselborg // *Mol Cell.* – 2004. – Vol. 14. – N 3. – P. 277–287.
121. **Liu, G.** High mobility group protein-1 inhibits phagocytosis of apoptotic neutrophils through binding to phosphatidylserine / G. Liu, J. Wang, Y. J. Park [et al.] // *J Immunol.* – 2008. – Vol. 181. – N 6. – P. 4240–4246.
122. **Friggeri, A.** HMGB1 inhibits macrophage activity in efferocytosis through binding to the alphavbeta3-integrin / A. Friggeri, Y. Yang, S. Banerjee [et al.] // *Am J Physiol Cell Physiol.* – 2010. – Vol. 299. – N 6. – P. 1267–1276.
123. **Wang, Y.** Extracellular HMGB1 Impairs Macrophage-Mediated Efferocytosis by Suppressing the Rab43-Controlled Cell Surface Transport of CD91 / Y. Wang, W. Zhang, Y. Xu [et al.] // *Front Immunol.* – 2022. – Vol. 13. – P. 767630.
124. **Curtin, J. F.** HMGB1 Mediates Endogenous TLR2 Activation and Brain Tumor Regression / J. F. Curtin, N. Liu, M. Candolfi [et al.] // *PLoS Med.* – 2009. – Vol. 6. – N 1. – P. e1000010. doi: 10.1371/journal.pmed.1000010.
125. **Li, W.** LPS induces active HMGB1 release from hepatocytes into exosomes through the coordinated activities of TLR4 and caspase-11/GSDMD signaling / W. Li, M. Deng, P. A. Loughran [et al.] // *Front Immunol.* – 2020. – Vol. 11. – P. 229.
126. **Selnø, A. T. H.** High Mobility Group Box 1 (HMGB1) Induces Toll-Like Receptor 4-Mediated Production of the Immunosuppressive Protein Galectin-9 in Human Cancer Cells / A. T. H. Selnø, S. Schlichtner, I. M. Yasinska [et al.] // *Front Immunol.* – 2021. – Vol. 12. – P. 675731. doi: 10.3389/fimmu.2021.675731.
127. **Hamid, K.** Quantitative Evaluation of BAFF, HMGB1, TLR 4 AND TLR 7 Expression in Patients with Relapsing Remitting Multiple Sclerosis / K. Hamid, A. Nejati, Z. Shoja [et al.] // *Iran J Allergy Asthma Immunol.* – 2016. – Vol. 15. – N 1. – P. 75–81.

128. **Hreggvidsdóttir, H. S.** High mobility group box protein 1 (HMGB1)-partner molecule complexes enhance cytokine production by signaling through the partner molecule receptor / H. S. Hreggvidsdóttir, A. M. Lundberg, A. C. Aveberger [et al.] // *Molecular Medicine*. – 2012. – Vol. 8. – N 2. – P. 224–230. doi: 10.2119/molmed.2011.00327.
129. **Liu, F. Y.** TLR9 is essential for HMGB1-mediated post-myocardial infarction tissue repair through affecting apoptosis, cardiac healing, and angiogenesis / F. Y. Liu, D. Fan, Z. Yang [et al.] // *Cell Death Dis.* – 2019. – Vol. 10. – N 7. – P. 480. doi: 10.1038/s41419-019-1718-7.
130. **Pirani, E.** Tumor cells express and maintain HMGB1 in the reduced isoform to enhance CXCR4-mediated migration / E. Pirani, P. Paparoditis, M. Pecoraro [et al.] // *Front Immunol.* – 2024. – Vol. 15. – P. 1358800. doi: 10.3389/fimmu.2024.1358800.
131. **Ichimura, T.** Kidney injury molecule-1 (KIM-1), a putative epithelial cell adhesion molecule containing a novel immunoglobulin domain, is up-regulated in renal cells after injury / T. Ichimura, J. V. Bonventre, V. Bailly [et al.] // *J Biol Chem.* – 1998. – Vol. 273. – N 7. – P. 4135–4142.
132. **Chiba, Sh.** Tumor-infiltrating DCs suppress nucleic acid-mediated innate immune responses through interactions between the receptor TIM-3 and the alarmin HMGB1 / Sh. Chiba, M. Baghdadi, H. Akiba [et al.] // *Nat Immunol.* – 2012. – Vol. 13. – N 9. – P. 832.
133. **Brett, J.** Survey of the distribution of a newly characterized receptor for advanced glycation end products in tissues / J. Brett, A. M. Schmidt, S. D. Yan [et al.] // *Am J Pathol.* – 1993. – Vol. 143. – N 6. – P. 1699–1712.
134. **Bierhaus, A.** Understanding RAGE, the receptor for advanced glycation end products / A. Bierhaus, P. M. Humpert, M. Morcos [et al.] // *J Mol Med (Berl)*. – 2005. – Vol. 83. – N 11. – P. 876–886. doi: 10.1007/s00109-005-0688-7.
135. **Oczypok, E. A.** All the "RAGE" in lung disease: the receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) is a major mediator of pulmonary inflammatory responses / E. A. Oczypok, T. N. Perkins, T. D. Oury // *Paediatr Respir Rev.* – 2017. – Vol. 23. – P. 40–49. doi: 10.1016/j.prrv.2017.03.012.

136. **Shirasawa, M.** Receptor for advanced glycation end-products is a marker of type I lung alveolar cells / M. Shirasawa, N. Fujiwara, S. Hirabayashi [et al.] // *Genes Cells*. – 2004. – Vol. 9. – N 2. – P. 165–174. doi: 10.1111/j.1356-9597.2004.00712.x.
137. **Fehrenbach, H.** Receptor for advanced glycation endproducts (RAGE) exhibits highly differential cellular and subcellular localisation in rat and human lung / H. Fehrenbach, M. Kasper, T. Tschernig [et al.] // *Cell Mol Biol (Noisy-le-Grand)*. – 1998. – Vol. 44. – N 7. – P. 1147–1157.
138. **Vincent, J. L.** International study of the prevalence and outcomes of infection in intensive care units / J. L. Vincent, J. Rello, J. Marshall [et al.] // *JAMA*. – 2009. – Vol. 302. – N 21. – P. 2323–2329.
139. **Tracey, K. J.** Tumor necrosis factor, other cytokines and disease / K. J. Tracey, A. Cerami // *Annu Rev Cell Biol*. – 1993. – Vol. 9. – P. 317–343.
140. **Andersson, U.** HMGB1 is a therapeutic target for sterile inflammation and infection / U. Andersson, K. J. Tracey // *Annu Rev Immunol*. – 2011. – Vol. 29. – P. 139–162.
141. **Qin, S.** Role of HMGB1 in apoptosis-mediated sepsis lethality / S. Qin, H. Wang, R. Yuan [et al.] // *J Exp Med*. – 2006. – Vol. 203 – N 7. – P. 1637–1642.
142. **Valdes-Ferrer, S. I.** HMGB1 mediates splenomegaly and expansion of splenic CD11b⁺ Ly-6C(high) inflammatory monocytes in murine sepsis survivors / S. I. Valdes-Ferrer, M. Rosas-Ballina, P. S. Olofsson [et al.] // *J Intern Med*. – 2013. – Vol. 274. – N 4. – P. 381–390.
143. **Yang, H.** Reversing established sepsis with antagonists of endogenous high-mobility group box 1 / H. Yang, M. Ochani, J. Li [et al.] // *Proc Natl Acad Sci USA*. – 2004. – Vol. 101. – N 1. – P. 296–301.
144. **Achouiti, A.** High-mobility group box 1 and the receptor for advanced glycation end products contribute to lung injury during *Staphylococcus aureus* pneumonia / A. Achouiti, A. J. van der Meer, S. Florquin [et al.] // *Crit Care*. – 2013. – Vol. 17. – N 6. – P. R296.
145. **Angus, D. C.** Circulating high-mobility group box 1 (HMGB1) concentrations are elevated in both uncomplicated pneumonia and pneumonia with severe sepsis /

- D. C. Angus, L. Yang, L. Kong [et al.] // Critical care medicine. – 2007. – Vol. 35. – N 4. – P. 1061–1067.
146. **Kosai, K.** Elevated levels of high mobility group box chromosomal protein-1 (HMGB-1) in sera from patients with severe bacterial pneumonia coinfectd with influenza virus / K. Kosai, M. Seki, K. Yanagihara [et al.] // Scand J Infect Dis. – 2008. – Vol. 40. – N 4. – P. 338–342.
147. **Sharma, L.** Partially-desulfated heparin improves survival in *Pseudomonas* pneumonia by enhancing bacterial clearance and ameliorating lung injury / L. Sharma, J. Wu, V. Patel [et al.] // J Immunotoxicol. – 2014. – Vol. 11. – N 3. – P. 260–267.
148. **Tasaka, S.** Cytokine profiles of bronchoalveolar lavage fluid in patients with pneumocystis pneumonia / S. Tasaka, S. Kobayashi, H. Kamata [et al.] // Microbiol. Immunol. – 2010. – Vol. 54. – N 7. – P. 425–433.
149. **Zhou, W. F.** The diagnostic accuracy of high-mobility group box 1 protein and twelve other markers in discriminating bacterial, viral and co-infected bronchial pneumonia in Han children / W. F. Zhou, Q. Chen, M. F. Jin [et al.] // Microbiology and immunology. – 2011. – Vol. 55 – N 4. – P. 279–288.
150. **Ramsgaard, L.** Lack of the receptor for advanced glycation end-products attenuates *E. coli* pneumonia in mice / L. Ramsgaard, J. M. Englert, M. L. Manni [et al.] // PLoS ONE. – 2011. – Vol. 6. – N 5. – P. e20132.
151. **Lu, H.** Clinical prognostic significance of serum high mobility group box-1 protein in patients with community-acquired pneumonia / H. Lu, N. Zeng, Q. Chen [et al.] // J Int Med Res. – 2019. – Vol. 47. – N 3. – P. 1232–1240.
152. **Gaïni, S.** High mobility group box-1 protein in patients with suspected community-acquired infections and sepsis: a prospective study / S. Gaïni, S. S. Pedersen, O. G. Koldkjaer [et al.] // Crit Care. – 2007. – Vol. 11. – N 2. – P. R32.
153. **Gaïni, S.** A comparison of high-mobility group-box 1 protein, lipopolysaccharide-binding protein and procalcitonin in severe community-acquired infections and bacteraemia: a prospective study / S. Gaïni, O. G. Koldkjaer, H. J. Møller [et al.] // Crit Care. – 2007. – Vol. 11. – N 4. – P. R76.

154. **Wang, H. L.** Circulating level of high mobility group box-1 predicts the severity of community-acquired pneumonia: Regulation of inflammatory responses via the c-Jun N-terminal signaling pathway in macrophages / H. L. Wang, S. M. Tsao, C. B. Yeh [et al.] // *Mol Med Rep.* – 2017. – Vol. 16. – N 3. – P. 2361–2366.
155. **Deng, Y. E. Q.** The Association between High Mobility Group Box 1 and Stroke-Associated Pneumonia in Acute Ischemic Stroke Patients / Y. E. Q. Deng, G. Shi [et al.] // *Brain Sci.* – 2022. – Vol. 12. – N 11. – P. 1580.
156. **Wulandari, S.** The role of HMGB1 in COVID-19-induced cytokine storm and its potential therapeutic targets: A review / S. Wulandari, Hartono, T. Wibawa // *Immunology.* – 2023. – Vol. 169. – N 2. – P. 117–131.
157. **Rullo, L.** Opioid system and related ligands: from the past to future perspectives / L. Rullo, C. Morosini, A. Lacorte [et al.] // *J Anesth Analg Crit Care.* – 2024. – Vol. 4. – N 1. – P. 70.
158. **Peng, J.** Opioid receptor expression in human brain and peripheral tissues using absolute quantitative real-time RT-PCR / J. Peng, S. Sarkar, S. L. Chang // *Drug Alcohol Depend.* – 2012. – Vol. 124. – N 3. – P. 223–228.
159. **Liang, X.** Opioid System Modulates the Immune Function: A Review / X. Liang, R. Liu, C. Chen [et al.] // *Transl Perioper Pain Med.* – 2016. – Vol. 1. – N 1. – P. 5–13.
160. **Каркищенко, В.Н.** Опиоидергическая система иммунных клеток: новая фармакологическая мишень в терапии «цитокинового шторма» / В. Н. Каркищенко, И. А. Помыткин, В. И. Скворцова // *Биомедицина.* – 2020. – Т. 16. – № 4. – С. 14–23.
161. **Григус, Я. И.** Оценка эффективности даларгина в лечении постгастрорезекционного панкреатита / Я. И. Григус, О. Д. Михайлова, В. Ф. Булычев, А. Ю. Горбунов // *ПМ.* – 2012. – № 3(58). – С. 46–49.
162. **Nagato, A. C.** Experimental Models of Acute Lung Injury to Study Inflammation and Pathophysiology: A Narrative Review / A. C. Nagato, P. A. Machado-Junior, S. S. Valenca [et al.] // *Antioxidants (Basel).* – 2026. – Vol. 15. – N 1. – P. 63.
163. **D'Alessio, F. R.** Mouse Models of Acute Lung Injury and ARDS / F. R. D'Alessio // *Methods Mol. Biol.* – 2018. – Vol. 1809. – P. 341–350.

164. **Aoyagi, T.** Activation of pulmonary invariant NKT cells leads to exacerbation of acute lung injury caused by LPS through local production of IFN- γ and TNF- α by Gr-1⁺ monocytes / T. Aoyagi, N. Yamamoto, M. Hatta [et al.] // *Int Immunol.* – 2011. – Vol. 23. – N 2. – P. 97–108.
165. **Помыткин, И. А.** Модель фатального острого поражения легких и острого респираторного дистресс-синдрома / И. А. Помыткин, В. Н. Каркищенко, Ю. В. Фокин [и др.] // *Биомедицина.* – 2020. – Т. 16. – № 4. – С. 24–33.
166. **Karkischenko, V. N.** Inhaled [D-Ala2]-Dynorphin 1-6 Prevents Hyperacetylation and Release of High Mobility Group Box 1 in a Mouse Model of Acute Lung Injury / V. N. Karkischenko, V. I. Skvortsova, M. T. Gasanov [et al.] // *J Immunol Res.* – 2021. – Vol. 2021. – P. 4414544. doi: 10.1155/2021/4414544.
167. **Рудаков, Ю. В.** Перспективы адъювантной терапии внебольничной пневмонии системными глюкокортикостероидами: от эксперимента к клинической практике / Ю. В. Рудаков, В. В. Салухов, М. А. Харитонов [и др.] // *Пульмонология.* – 2024. – Т. 34. – № 6. – С. 775–787.
168. **Tam, S. W.** (+)-[3H]SKF 10,047, (+)-[3H]ethylketocyclazocine, mu, kappa, delta and phencyclidine binding sites in guinea pig brain membranes / S. W. Tam // *European Journal of Pharmacology.* – 1985. – Vol. 109. – N 1. – P. 33–41.
169. **Лейтрагин® (Leutragin)** [Электронный ресурс]: инструкция по применению // Видаль. Справочник лекарственных средств. URL: <https://www.vidal.ru/drugs/leutragin> (дата обращения: 14.07.2026)
170. **Torres, L. K.** Attributable mortality of acute respiratory distress syndrome: a systematic review, meta-analysis and survival analysis using targeted minimum loss-based estimation / L. K. Torres, K. L. Hoffman, C. Oromendia [et al.] // *Thorax.* – 2021. – Vol. 76. – N 12. – P. 1176–1185.
171. **Zhou, M. T.** Acute lung injury and ARDS in acute pancreatitis: mechanisms and potential intervention / M. T. Zhou, C. S. Chen, B. C. Chen [et al.] // *World J Gastroenterol.* – 2010. – Vol. 16. – N 17. – P. 2094–2099.

172. **Azagew, A. W.** Global prevalence of COVID-19-induced acute respiratory distress syndrome: systematic review and meta-analysis / A. W. Azagew, Z. W. Beko, Y. M. Ferede [et al.] // *Syst Rev.* – 2023. – Vol. 12. – N 1. – P. 212.
173. **Li, N.** The Role of Serum High Mobility Group Box 1 and Interleukin-6 Levels in Acute Pancreatitis: A Meta-Analysis / N. Li, B. M. Wang, S. Cai, P. L. Liu // *J Cell Biochem.* – 2018. – Vol. 119. – N 1. – P. 616–624.
174. **Shimazu, R.** MD-2, a molecule that confers lipopolysaccharide responsiveness on Toll-like receptor 4 / R. Shimazu, S. Akashi, H. Ogata [et al.] // *J Exp Med.* – 1999. – Vol. 189. – N 11. – P. 1777–1782.
175. **Ogawa, C.** Muramyl dipeptide and its derivatives: peptide adjuvant in immunological disorders and cancer therapy / C. Ogawa, Y. J. Liu, K. S. Kobayashi // *Curr Bioact Compd.* – 2011. – Vol. 7. – N 3. – P. 180–197.
176. **Deng, Y.** Pharmacological inhibition of P300 with C646 ameliorates LPS-induced acute lung injury by modulating CXCL1 in M1 alveolar macrophages / Y. Deng, G. Wen, Y. Yin [et al.] // *Int Immunopharmacol.* – 2025. – Vol. 144. – P. 113674.
177. **Cao, J.** Endotoxemia-mediated activation of acetyltransferase P300 impairs insulin signaling in obesity / J. Cao, J. Peng, H. An [et al.] // *Nat Commun.* – 2017 – Vol. 8. – N 1. – P. 131.
178. Многоцентровое двойное слепое плацебо-контролируемое проспективное рандомизированное сравнительное исследование по изучению безопасности и эффективности применения препарата Лейтрагин, раствор для ингаляций, 1 мг/мл при лечении пациентов, госпитализированных с COVID-19 среднетяжелого течения. Фаза III: отчет о клиническом исследовании / М. : ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, 2022. – 300 с.
179. **Gangemi, S.** Association between HMGB1 and COPD: A Systematic Review / S. Gangemi, M. Casciaro, G. Trapani [et al.] // *Mediators Inflamm.* – 2015. – P. 164913.
180. **Furci, F.** TSLP and HMGB1: Inflammatory Targets and Potential Biomarkers for Precision Medicine in Asthma and COPD / F. Furci, G. Murdaca, C. Pelaia [et al.] // *Biomedicines.* – 2023. – Vol. 11. – N 2. – P. 437.

181. **Wang, Y.** Chronic obstructive pulmonary disease across three decades: trends, inequalities, and projections from the Global Burden of Disease Study 2021 / Y. Wang, R. Han, X. Ding // *Front Med (Lausanne)*. – 2025. – Vol. 12. – P. 1564878.
182. **Mkorombindo, T.** Inhaled Corticosteroids in Chronic Obstructive Pulmonary Disease: Benefits and Risks / T. Mkorombindo, M. T. Dransfield // *Clin Chest Med*. – 2020. – Vol. 41. – N 3. – P. 475–484.
183. **Valentino, R. J.** Untangling the complexity of opioid receptor function / R. J. Valentino, N. D. Volkow // *Neuropsychopharmacology*. – 2018. – Vol. 43. – N 13. – P. 2514–2520.

ПРИЛОЖЕНИЕ А

(справочное)



Федеральное государственное бюджетное учреждение науки
Научный центр биомедицинских технологий
 Федерального медико-биологического агентства

(ФГБУН НЦБМТ ФМБА России)

143442, Московская область, г.о Красногорск, пос. Светлые горы, вл.1;
 тел. (495) 561-5264, (495) 561-5273; ИНН 7709379649; www.scbmt.ru; e-mail: ncbt@fmbamail.ru

УТВЕРЖДАЮ

Директор:

доктор мед. наук, профессор

В.Н. Каркищенко

15 января 2026 г.

АКТ

о внедрении результатов диссертационной работы Алимкиной Оксаны Владимировны
 «Исследование влияния агониста дельта-опиоидных рецепторов гексапептида
 YdAGFLR на ацетилирование и секрецию белка HMGB1 в условиях воспалительного
 повреждения легких» в разработку оригинального препарата Лейтрагин ФГБУН
 НЦБМТ ФМБА России, для лечения COVID-19.

Мы, нижеподписавшиеся, подтверждаем, что следующие научные положения, результаты и выводы кандидатской диссертации Алимкиной Оксаны Владимировны на тему «Исследование влияния агониста дельта-опиоидных рецепторов гексапептида YdAGFLR на ацетилирование и секрецию белка HMGB1 в условиях воспалительного повреждения легких» внедрены в разработку оригинального препарата Лейтрагин раствор для ингаляций, действующее вещество тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина ацетат 1 мг/мл, регистрационное удостоверение №: ЛП-007043 (ФГБУН НЦБМТ ФМБА России):

1. Результаты исследования противовоспалительного действия гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина ацетата на биомодели острого респираторного дистресс-синдрома на животных, как часть регистрационного досье на лекарственный препарат Лейтрагин.

2. Механизм противовоспалительного действия гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина ацетата, связанный со снижением активности белка бокс 1 группы высокой подвижности (HMGB1), как обоснование механизма противовоспалительного действия лекарственного препарата Лейтрагин при COVID-19.

3. Выбор дозы и обоснование способа применения гексапептида тирозил-D-аланил-глицил-фенилаланил-лейцил-аргинина ацетата при проведении полного комплекса доклинических исследований эффективности и безопасности лекарственного препарата Лейтрагин.

Зам. директора по научной работе
 ФГБУН НЦБМТ ФМБА России, к.м.н., доцент

Зав. лабораторией № 4



М.Т. Гасанов

Н.В. Петрова