

МОСКОВСКИЙ ГОСУДАРСТВЕННЫЙ УНИВЕРСИТЕТ
имени М.В. Ломоносова

На правах рукописи

Адашева Дарья Алексеевна

**РОЛЬ ПРОТЕАЗЫ RAPP-A В СЕРДЕЧНОЙ ТКАНИ
В НОРМЕ И ПРИ ГИПЕРТРОФИИ**

1.5.4 – Биохимия

АВТОРЕФЕРАТ
диссертации на соискание ученой степени
кандидата биологических наук

Москва — 2025

Диссертация подготовлена на кафедре биохимии биологического факультета МГУ имени М. В. Ломоносова.

Научный руководитель: **Серебряная Дарья Владимировна** – кандидат биологических наук

Официальные оппоненты: **Гривенников Игорь Анатольевич** – доктор биологических наук, профессор, главный научный сотрудник лаборатории молекулярной нейрогенетики и врожденного иммунитета Национального исследовательского центра «Курчатовский институт»

Петров Алексей Михайлович – доктор биологических наук, доцент, ведущий научный сотрудник лаборатории биофизики синаптических процессов Казанского института биохимии и биофизики Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», профессор кафедры нормальной физиологии Казанского государственного медицинского университета

Матюшенко Александр Михайлович – кандидат биологических наук, старший научный сотрудник лаборатории структурной биохимии белка Федерального исследовательского центра «Фундаментальные основы биотехнологии» Российской академии наук

Защита диссертации состоится «21» марта 2025 г. В 16 часов 00 минут на заседании диссертационного совета МГУ.015.1 Московского государственного университета имени М.В. Ломоносова по адресу: г. Москва, Ленинские горы, д.1, стр. 12, биологический факультет МГУ, аудитория М1.

Email: dkiselevs@mail.ru

С диссертацией можно ознакомиться в отделе диссертаций научной библиотеки МГУ имени М.В. Ломоносова (Ломоносовский проспект д. 27) и на портале: <https://dissovet.msu.ru/dissertation/3354>

Автореферат разослан « » _____ 2025 г.

Ученый секретарь диссертационного совета,
кандидат биологических наук

Киселевский Д.Б.

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА РАБОТЫ

Актуальность и степень разработанности темы исследования.

На сегодняшний день сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) остаются главной причиной смертности в мире. Одним из наиболее распространенных ССЗ является сердечная недостаточность (СН) – заболевание, характеризующееся расстройствами в работе сердца, приводящими к нарушению кровоснабжения всего организма. Зачастую хроническая СН сопровождается патологической гипертрофией миокарда. Одним из протеолитических ферментов, чья активность ассоциирована с развитием ССЗ, является ассоциированный с беременностью белок А плазмы крови, PAPPA (pregnancy associated plasma protein-A). PAPPA представляет собой матриксную металлопротеазу, которая располагается на внешней мембране или секретируется различными клетками организма человека. Одной из биологических функций PAPPA является регуляция биодоступности инсулиноподобных факторов роста I и II (IGF). Данные факторы являются составляющими IGF-сигнальной системы, функционирование которой направлено на рост, пролиферацию и поддержание жизнеспособности различных клеток и тканей организма. Кроме IGF-I и IGF-II, а также инсулина, которые выполняют роль лигандов, в состав IGF-системы входят: рецептор IGF-I (IGF-1R), рецептор IGF-II (IGF-2R), рецептор маннозо-6-фосфата/IGF-II (M6P/IGF-2R), рецептор инсулина (IR) и гибридный рецептор IR/IGF-1R, а также шесть типов IGF-связывающих белков IGFBP (IGFBP 1-6), которые взаимодействуют с IGF-I и IGF-II и таким образом ингибируют их доступность для рецепторов. Высвобождение лигандов из комплексов с IGFBP происходит благодаря протеазам, которые специфически расщепляют белки IGFBP в комплексе IGF-IGFBP и делают возможным взаимодействие молекул IGF с их рецепторами и запуск сигнальных каскадов, опосредующих их биологическое действие. PAPPA в физиологических условиях является единственной протеазой, способной расщеплять IGFBP-4. В результате данной протеолитической реакции высвобождается IGF и образуются два протеолитических фрагмента IGFBP-4: N-концевой (NT-IGFBP-4) и C-концевой

(СТ-IGFBP-4). Данные фрагменты рассматриваются как прогностические биомаркёры различных ССЗ, и, в частности, СН. Повышение уровня фрагментов IGFBP-4 в крови ассоциировано с возрастанием риска развития острого коронарного синдрома (ОКС) у пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) и повышением риска летального исхода у больных диабетом 1 типа. Также было показано, что у больных острой сердечной недостаточностью СТ-IGFBP-4 является прогностическим маркером риска летального исхода. Повышение уровня протеолитических фрагментов IGFBP-4 может свидетельствовать об усилении RAPP-A-опосредованного протеолиза IGFBP-4 и повышении концентрации IGF в примембранном пространстве клетки при развитии различных патологий миокарда. В зависимости от концентрации IGF может выступать как кардиопротектор и как индуктор патологического состояния сердца, в частности гипертрофии. Поэтому тонкая регуляция концентрации IGF в примембранном пространстве кардиомиоцитов чрезвычайно важна как для нормального функционирования сердца, так и для развития адаптивных реакций при патологических изменениях миокарда. Однако, несмотря на множество исследований, показывающих повышение концентрации фрагментов IGFBP-4 в крови пациентов до развития осложнений ССЗ, до сих пор не известно, происходит ли протеолитическое расщепление IGFBP-4 под действием RAPP-A в сердечной ткани в норме. Как уже упоминалось ранее, патологическая гипертрофия миокарда зачастую сопровождается многими ССЗ, в том числе и теми, при которых наблюдается увеличение концентрации протеолитических фрагментов IGFBP-4. Таким образом, исследование роли RAPP-A и механизма регуляции биодоступности IGF в сердечной ткани в норме и при гипертрофии является актуальной задачей как с прикладной биомедицинской, так и с фундаментальной точек зрения.

Целью настоящей работы являлось исследование роли протеазы RAPP-A в сердечной ткани в норме и при гипертрофии.

Для достижения данной цели нами были поставлены следующие ***задачи***:

1. Разработать и охарактеризовать модельные системы для исследования протеолиза IGFBP-4 под действием RAPP-A в кардиомиоцитах в норме;
2. Изучить особенности протекания протеолитического расщепления IGFBP-4 под действием RAPP-A, используя разработанные модельные системы;
3. Разработать и охарактеризовать модельные системы для исследования протеолиза IGFBP-4 под действием RAPP-A в кардиомиоцитах при гипертрофии;
4. Исследовать особенности протекания протеолиза IGFBP-4 под действием RAPP-A в культурах кардиомиоцитов, переведённых в гипертрофированное состояние.

Научная новизна и практическая значимость работы. Получены и охарактеризованы первичные культуры кардиомиоцитов из неонатальных и взрослых крыс, кардиомиоциты, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (ИПСК), а также разработаны две модели гипертрофии *in vitro* с использованием эндотелина-1 и норадреналина в культурах кардиомиоцитов, а также модель гипертрофии *in vivo*, основанная на индукции легочной гипертензии у взрослых крыс под действием монокроталина (МКТ). Полученные результаты впервые свидетельствуют о том, что RAPP-A-опосредованный протеолиз IGFBP-4 происходит в кондиционированной среде кардиомиоцитов в трёх различных модельных системах. Специфичность RAPP-A ассоциированного протеолиза IGFBP-4 впервые показана с использованием пар антител, специфичных к неоэпиту, образуемому на концах фрагментов IGFBP-4 после специфического протеолиза под действием RAPP-A. В экспериментах в присутствии гепарина определена локализация протекания протеолитического расщепления IGFBP-4 как на поверхности клеток, так и во внеклеточном пространстве. Впервые продемонстрировано, что после индукции гипертрофических изменений во всех исследуемых модельных системах как *in vitro* так и *in vivo* наблюдается повышение уровня RAPP-A-специфического протеолиза IGFBP-4. Результаты данной работы с одной стороны, расширяют понимание роли RAPP-A как регулятора биодоступности IGF в сердечной ткани

в норме и при гипертрофии, а, с другой стороны, открывают новые возможности для разработки терапии ССЗ, основанной на поддержании стабильной концентрации IGF в клетках и тканях в определенном диапазоне.

Объект исследования. В качестве объектов исследования были использованы неонатальные 2–4-дневные и взрослые трехмесячные самцы крыс линии Wistar, из сердец которых получали первичные культуры кардиомиоцитов, а также культура кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК человека. В данных клеточных культурах была проведена индукция гипертрофических изменений с применением сочетания *in vitro* и *in vivo* подходов.

Методология диссертационного исследования. Исследование выполнено с использованием современных биохимических, культурально-биологических, иммунохимических и физиологических методов.

Основные положения, выносимые на защиту

1. Разработанная комбинация трёх независимых подходов к моделированию миокарда на клеточном уровне позволяет получить более полное представление о процессах, протекающих в сердце в физиологических условиях;
2. Протеолитическое расщепление IGFBP-4 под действием PAPPA в норме протекает как на поверхности клеток, так и в кондиционированной среде, способствуя взаимодействию IGF с его рецепторами на поверхности клеток.
3. Наблюдаемое усиление протеолиза IGFBP-4 под действием PAPPA, приводящее к высвобождению IGF, может служить как компенсаторным механизмом негативных последствий гипертрофии, так и механизмом, усиливающим эти изменения.

Степень достоверности полученных результатов. Достоверность представленных результатов обусловлена воспроизводимостью измерений, проведенных в необходимом количестве биологических повторностей.

Постановка всех проведённых экспериментов проводилась в соответствии с современными правилами проведения научных исследований.

Апробация результатов работы. Результаты, полученные в данной работе, были доложены на заседаниях кафедры биохимии биологического факультета МГУ, представлены на 46-м Международном Конгрессе FEBS в 2022 г. (Лиссабон, Португалия), на итоговой научно-практической конференции ФГБУ ФНКЦ ФХМ им. академика Ю.М. Лопухина ФМБА (Москва, Россия), на 12-й международной конференции «Рецепторы и внутриклеточная сигнализация» (Пушино, Россия), на международном конгрессе ISCOMS в 2023 г. (Гронинген, Нидерланды), на 24-м съезде физиологического общества им. И.П. Павлова (Санкт-Петербург, Россия) и на всероссийской научной конференции «Биохимия человека – 2024» (Москва, Россия).

Личный вклад автора присутствует на всех этапах работы, начиная от отработки используемых методик и завершая получением экспериментальных данных, их обработки, обсуждения результатов, подготовки статей и тезисов конференций.

Структура и объём диссертации. Диссертационная работа изложена по стандартному плану и состоит из введения, обзора литературы, раздела «Материалы и методы», полученных результатов и их обсуждения, заключения, выводов и списка цитируемой литературы, в который входит 305 библиографических ссылок. Работа изложена на 200 страницах печатного текста, содержит 31 рисунок и 1 таблицу.

ОСНОВНОЕ СОДЕРЖАНИЕ РАБОТЫ

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Экспериментальные животные. В работе использовали взрослых самцов крыс линии Wistar, полученных из вивария ФГБНУ «Научно-исследовательский институт общей патологии и патофизиологии». Животных содержали в помещении для лабораторных животных, в режиме двенадцатичасового светового дня, с доступом к корму и воде *ad libitum*. В экспериментах

использовали крыс на разных стадиях онтогенеза: неонатальных возрастом 2-4 дня и взрослых возрастом 60-90 дней. Нулевым днем постнатального развития считали день родов.

Для выделения первичной культуры кардиомиоцитов из сердец неонатальных крыс трехдневных крыс декапитировали, извлекали сердца, помещали в стерильный физиологический раствор на льду. Сердца механически измельчали после чего инкубировали с коллагеназой в концентрации 5 мг/мл до полного растворения ткани. Затем клеточные суспензии центрифугировали, супернатант отбрасывали, а клеточный осадок ресуспендировали в культуральной среде DMEM с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Рассаживали клетки в нужной плотности и растили в культуральной среде в течение 4 дней, заменяя среду раз в два дня.

Культура кардиомиоцитов человека, полученная из ИПСК, была любезно предоставлена коллегами из лаборатории клеточной биологии в ФНКЦ Физико-Химической медицины им. Академика Ю.М. Лопухина ФМБА. Кардиомиоциты были дифференцированы из линии человеческих ИПСК endo-iPS12 с использованием набора для дифференцировки желудочковых кардиомиоцитов STEMdiffTM Cardiomyocyte Differentiation Kit (Stemcell Technologies, Канада) в соответствии с протоколом производителя.

Получение первичной культуры кардиомиоцитов из взрослых крыс. Крыс декапитировали, извлекали сердце и подвешивали через аорту к установке Лангендорфа. Сердце промывали физиологическим раствором Кребса-Хензеляйта, после чего заменяли его на раствор, содержащий 0,6 мг/мл коллагеназы, и промывали в течение 40 минут, после чего сердце очищали от соединительной ткани и удаляли предсердия. Желудочки механически измельчали, далее суспензию клеток фильтровали через клеточный фильтр с порами диаметром 100 мкм и центрифугировали при 100 g. Супернатант отбрасывали, а осадок ресуспендировали в растворе Кребса-Хензеляйта, после чего дожидались оседания клеток. Осадок повторно ресуспендировали в том же растворе и центрифугировали при 100 g. Затем осадок ресуспендировали в

культуральной среде DMEM, содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС). Клетки высевали в культуральные 24-луночные планшеты, покрытые фибронектином (40 мкг/мл) и инкубировали в течение 2 часов для прикрепления кардиомиоцитов.

Для in vitro индукции гипертрофии в культуру кардиомиоцитов вносили эндотелин-1 до конечных концентраций 20 нМ, 50 нМ и 100 нМ или норадреналин в концентрации 2 мкМ, 5 мкМ и 10 мкМ и инкубировали клетки в течение 24 и 48 часов при 37°C и 5% CO₂.

Для in vivo индукции гипертрофии самцов крыс линии Wistar случайным образом распределяли в контрольную группу и группу, получавшую монокроталин (МКТ). Рассчитывали количество МКТ для инъекции животным из расчета 60 мг/кг. МКТ, приготовленный на 60% спирте в дозе 20 мг/мл вводили крысам подкожно в вентральную часть грудной клетки, контрольной группе вводили аналогичную дозу 60% спирта. После чего содержали крыс в виварии в течение месяца.

Для измерения давления в правом желудочке (ПЖ) животным вводили катетер в правую яремную вену и направляли в правый желудочек, регистрируя давление с помощью датчика.

Для иммуноцитохимического окрашивания культур кардиомиоцитов клетки фиксировали и пермеабелизовали с использованием 4% параформальдегида и 0,1% Тритона X-100, затем проводили блокировку мест неспецифической сорбции антител 1% ЭТС на фосфатно-солевом буфере, содержащем 0.1% Tween-20, и инкубировали ночь с первичными моноклональными антителами, специфичными к сердечной изоформе тропонина I или T, в аналогичном буфере. Затем переводили клетки в раствор, содержащий вторичные антитела и фаллоидин, конъюгированные с флуоресцентными метками. Затем добавляли интеркалирующий краситель хроматина DAPI. Полученные окрашенные препараты кардиомиоцитов анализировали с помощью конфокального микроскопа Olympus FV3000 (Япония).

Для протеолитического расщепления IGFBP-4 под действием PAPP-A в полученной культуре в качестве субстрата использовали смесь, содержащую рекомбинантные IGFBP-4 (3 мкг/мл) и IGF-II (0,85 мкг/мл) человека, а также CaCl_2 (2 мМ). Смесь инкубировали 30 минут при комнатной температуре, для формирования комплекса IGFBP-4 с IGF-II, после чего добавляли в среду кардиомиоцитов. Инкубировали при 37°C и 5% CO_2 в течение определенных промежутков времени (от 1 до 24 часов). По завершении инкубации реакцию останавливали добавлением ЭДТА до конечной концентрации 5 мМ.

Измерение концентрации PAPP-A, NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4, натрийуретического пептида В (BNP) в кондиционированной среде кардиомиоцитов методом флуориммунного анализа «сэндвич»- типа (ФИА). Концентрации NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 в кондиционированной среде определяли методом неопитоп-специфичного ФИА «сэндвич»-типа с использованием пар антител IBP3-IBP180^{Eu*} и IBP182-IBP163^{Eu*} (HyTest, Финляндия). Концентрацию BNP определяли с использованием пары антител 24C5-AbBNP2^{Eu3*} (HyTest, Финляндия). Для измерения концентрации PAPP-A использовали пару антител 10E2-10E1^{Eu*} (HyTest, Финляндия), специфичную к димерной форме PAPP-A. Сорбировали антитела подложки в фосфатно-солевом буфере и инкубировали в течение часа. После этого в каждую лунку планшета вносили образцы и раствор детекторных антител. Инкубировали час, отмывали, после чего вносили раствор для усиления флуоресценции LANFIA, инкубировали в течение 3 мин, затем детектировали флуоресценцию на планшетном анализаторе Victor X (Perkin Elmer) в режиме Europium при длине волны 365 нм. Полученные значения концентраций нормировали на количество тотального белка в лунках, определенного методом Бредфорда.

Статистическую обработку результатов проводили с помощью программного обеспечения GraphPad Prizm 9.0. Данные представлены в виде среднего $\pm$ стандартного отклонения или среднего $\pm$ стандартной ошибки среднего. Количество отдельных измерений (n) указано в подписях к рисункам. Для оценки распределения выборки был выполнен тест Шапиро-Уилка. Для

сравнения данных с нормальным распределением проводился анализ с помощью t-критерия Стьюдента или двухфакторный дисперсионный анализ (ANOVA). Различия считались достоверными при $p \leq 0,05$.

ОСНОВНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ

Для исследования роли PAPP-A в миокарде в норме и при развитии гипертрофии мы поставили задачу разработать модельные системы как *in vitro*, так и *in vivo*. На первом этапе нашей работы мы сосредоточились на разработке и характеристике *in vitro* клеточных моделей миокарда в норме и использовали три разных типа клеточных культур: первичную культуру кардиомиоцитов, полученных из неонатальных крыс, культуру кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК и первичную культуру кардиомиоцитов, полученных из сердец взрослых крыс.

Характеристика клеточных культур кардиомиоцитов методом иммуноцитохимического окрашивания

В полученных культурах нами было проведено иммуноцитохимическое окрашивание с использованием антител, конъюгированных с флуоресцентной меткой Alexa-555, специфичных к сердечным изоформам тропонина I и T (сTnI и сTnT), являющимися специфичными маркерами данного типа клеток и миокарда в целом. В полученных культурах оценивали содержание кардиомиоцитов, рассчитывая отношение количества клеток с детектированным сTnI или сTnT к общему количеству клеток.

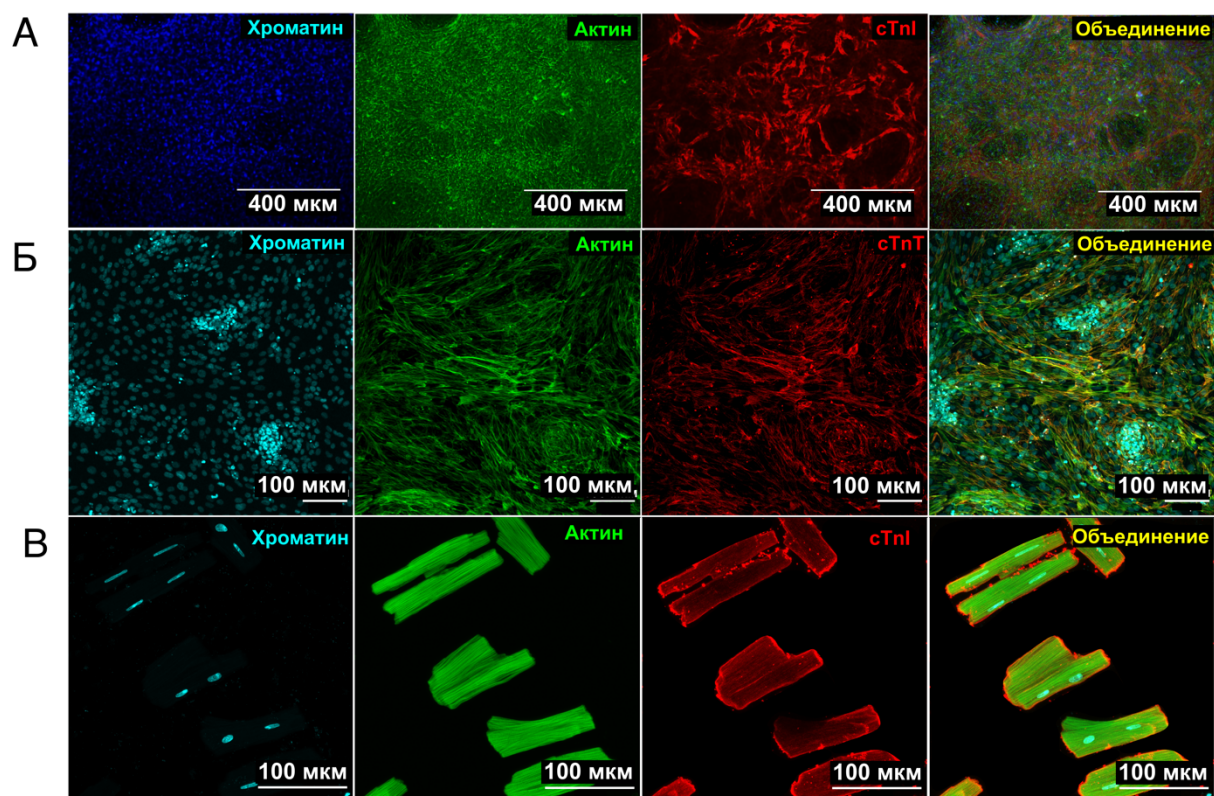


Рис. 1. Иммуноцитохимическое окрашивание: А - первичной культуры кардиомиоцитов, полученной из неонатальных крыс, Б - культуры кардиомиоцитов, полученной из ИПСК, В - культуры кардиомиоцитов, полученной из взрослых крыс. Окрашивание проводили с использованием (слева направо): ядерного красителя DAPI (синий); фаллоидина-Alexa 488 (зеленый); антител, специфичных к cTnI человека (А и В) и антител, специфичных к cTnT человека (красный) (Б).

Среднее содержание кардиомиоцитов в первичной культуре, полученной из сердец неонатальных крыс, составило $60 \pm 10\%$ от площади конфлюэнта (рис. 1А). Среднее содержание кардиомиоцитов в нескольких независимо дифференцированных из ИПСК культурах кардиомиоцитов составило $97\% \pm 2\%$ (рис. 1Б). В случае первичной культуры кардиомиоцитов, полученной из взрослых крыс чистота полученной культуры составила практически 100% (рис. 1В). Таким образом, все использованные клеточные культуры были в значительной степени обогащены кардиомиоцитами и могли быть использованы для дальнейших исследований.

Определение концентрации RAPP-A в кондиционированной среде полученных культур кардиомиоцитов

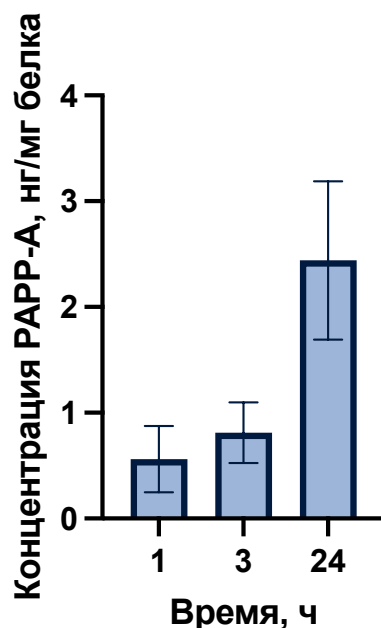


Рис. 2. Концентрация RAPP-A в кондиционированной среде культуры кардиомиоцитов человека, полученных из ИПСК. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартная ошибка среднего, $n = 4$.

На следующем этапе исследований мы пытались проанализировать концентрацию RAPP-A в кондиционированной среде, полученной от трех типов культур кардиомиоцитов. К сожалению, использованные антитела на RAPP-A человека обладали высокой специфичностью и не прокрашивали RAPP-A крысы. Поэтому мы были вынуждены ограничиться измерением концентрации RAPP-A в кондиционированной среде культуры кардиомиоцитов человека, где нам удалось проследить динамику его накопления во времени (Рис. 2). Таким образом было показано, что кардиомиоциты способны экспрессировать RAPP-A.

Исследование протеолитического расщепления IGFBP-4 под действием RAPP-A в кардиомиоцитах в норме

Установив, что кардиомиоциты способны экспрессировать RAPP-A, мы обратились к анализу протеолитического расщепления IGFBP-4 и определению концентрации NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 в кондиционированной среде трех различных культур кардиомиоцитов методом ФИА «сэндвич-типа» с использованием антител, специфичных к неопептопам, образующимся в результате специфичного расщепления IGFBP-4 под действием RAPP-A (рис.3). В культуре взрослых кардиомиоцитов нам не удалось детектировать NT-IGFBP-4 с помощью пары антител, используемой в случае неонатальных кардиомиоцитов крысы и кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК (рис. 3 А и В). Поэтому мы попробовали определить уровень протеолиза IGFBP-4 в

кондиционированной среде взрослых кардиомиоцитов, измерив концентрацию СТ-IGFBP-4 с помощью высоко специфичных антител. Только с помощью данной пары антител нам удалось оценить уровень протеолиза IGFBP-4 (рис. 3 Б), поэтому далее в случае взрослых кардиомиоцитов крысы, мы оценивали уровень протеолиза IGFBP-4 по концентрации С-фрагмента IGFBP-4.

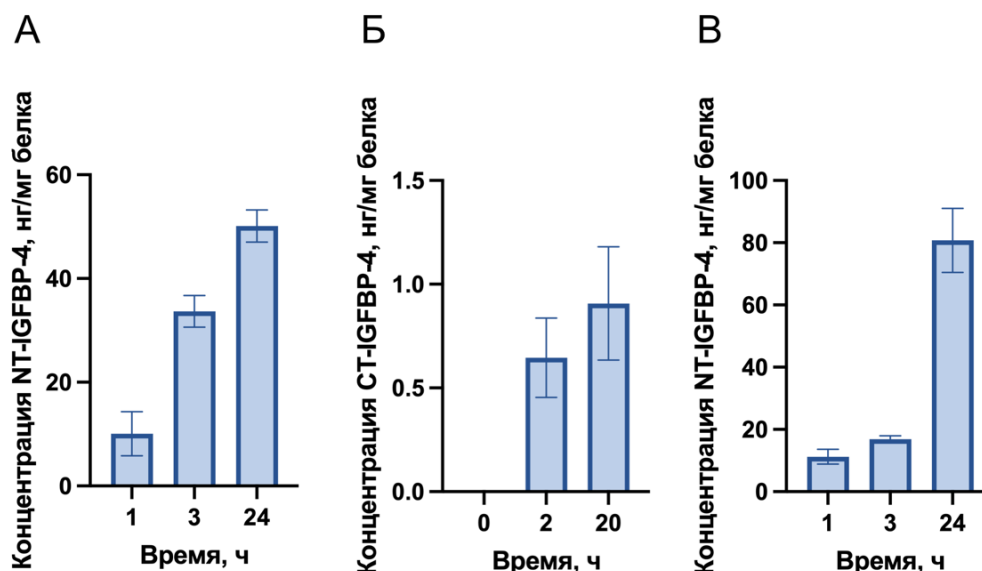


Рис. 3. Накопление NT- и СТ-IGFBP-4 в кондиционированной среде: А – первичной культуры неонатальных кардиомиоцитов; Б – первичной культуры кардиомиоцитов, полученной из взрослых крыс; В – культуры кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n=9$ (А), $n=5$ (Б), $n=5$ (В).

В случае неонатальной культуры кардиомиоцитов (рис. 3 А) и культуры кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК (рис. 3 Б), уровень протеолиза сопоставим, однако в случае культуры взрослых кардиомиоцитов протекает на очень низком уровне, по сравнению с другими культурами (рис. 3 В). Такие различия могут быть связаны с разной степенью зрелости культур кардиомиоцитов, вариациями в концентрации протеазы РАРР-А на поверхности разных типов кардиомиоцитов, а также с разницей в протеолитической активности РАРР-А. В случае неонатальных кардиомиоцитов и кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, уровень протеолиза значительно выше, так как данные клетки являются менее зрелыми и находятся в процессе формирования цитоскелета и внутриклеточных структур, в связи с чем требуют большего количества ростового фактора IGF, который и высвобождается в процессе

протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A. В случае же культуры взрослых кардиомиоцитов крысы, которая представлена зрелыми высокодифференцированными клетками, потребность в ростовых факторах может быть значительно ниже, в сравнении с менее зрелыми кардиомиоцитами, с чем может быть связана существенная разница в уровне протеолиза IGFBP-4.

Тем не менее, нам удалось установить, что протеолитическое расщепление IGFBP-4 протекает в кардиомиоцитах в норме, причем наблюдается положительная динамика накопления NT- и СТ-IGFBP-4 фрагментов в кондиционированной среде во всех случаях.

Влияние IGF-II на протекание PAPP-A зависимого протеолиза IGFBP-4 в культурах кардиомиоцитов

Известно, что протеолиз IGFBP-4 под действием PAPP-A слабо протекает в отсутствие IGF и значительно возрастает в его присутствии. На следующем этапе работы мы исследовали влияние IGF-II на протекание протеолиза IGFBP-4 в различных культурах кардиомиоцитов (рис.5).

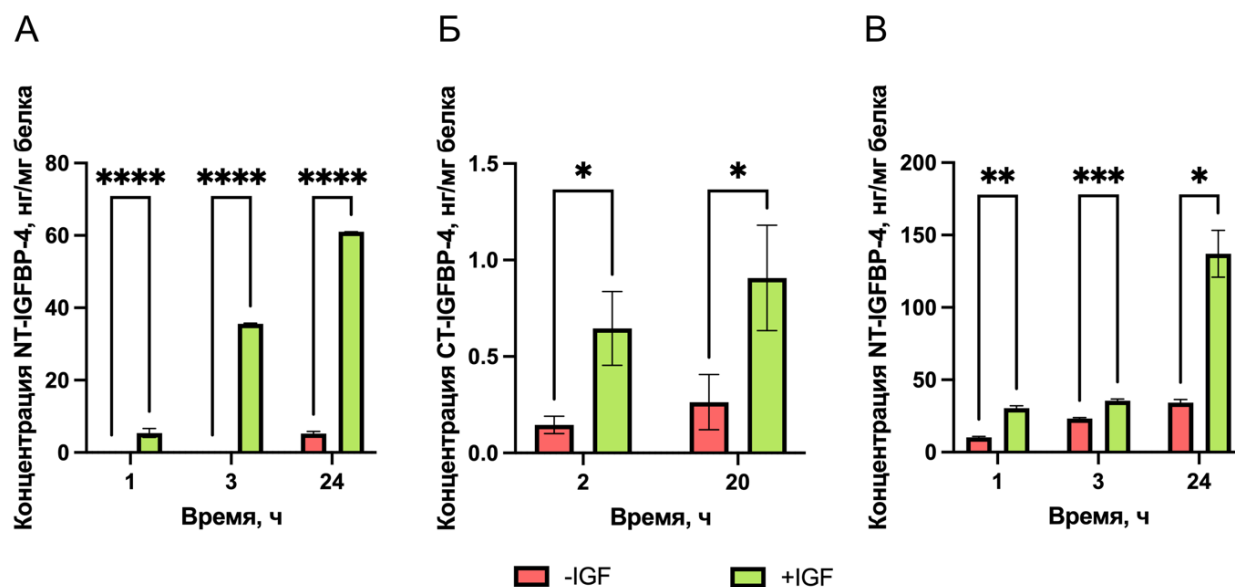
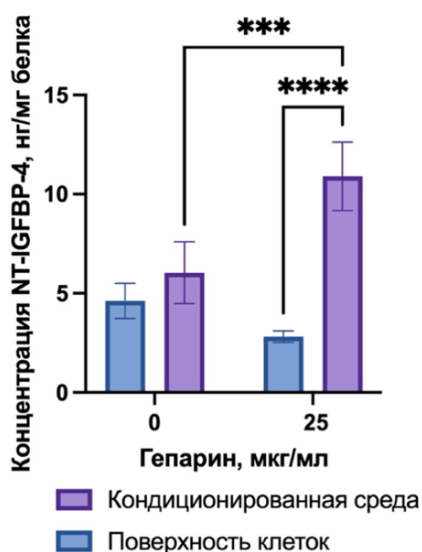


Рис. 4. Влияние IGF-II на PAPP-A-зависимый протеолиз IGFBP-4 в: А – первичной культуре кардиомиоцитов, полученной из неонатальных крыс; Б – первичной культуре кардиомиоцитов, полученной из взрослых крыс; В – культуре кардиомиоцитов человека, дифференцированных из ИПСК. Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n=9$ (А), $n=5$ (Б), $n=5$ (В); ****- $p<0,0001$, *** - $p<0,001$, ** - $p<0,01$, * - $p<0,05$ Статистически значимые различия между группами определяли по двухфакторной ANOVA.

В случае всех модельных систем концентрация фрагментов IGFBP-4, образованных в результате протеолиза в присутствии IGF-II выше, чем в отсутствие IGF-II. Таким образом, можно заключить, что в кондиционированной среде кардиомиоцитов в норме протекает RAPP-A зависимый протеолиз IGFBP-4. Следует заметить, что даже в отсутствие добавленного извне IGF в культурах кардиомиоцитов наблюдается накопление фрагментов IGFBP-4. Это может являться следствием образования комплексов добавленного IGFBP-4, с эндогенным IGF кардиомиоцитов.

Исследование локализации протекания RAPP-A специфического протеолиза IGFBP-4

Представленные ранее результаты свидетельствуют о том, что в кондиционированной среде кардиомиоцитов присутствует высоко активная протеаза RAPP-A и её активность возрастает при добавлении IGF. Логичным было задаться вопросом о том, где протекает RAPP-A специфичный протеолиз IGFBP-4. Для исследования локализации RAPP-A (на поверхности клеток или в свободном состоянии в кондиционированной среде) был использован гепарин, который позволяет удалить RAPP-A с поверхности клеток. Кардиомиоциты инкубировали с гепарином (25 мкг/мл) в течение часа, после чего отбирали кондиционированную среду, заменяли свежей и проводили протеолиз IGFBP-4 как в отобранной кондиционированной среде, так и в свежей среде (рис.5).



*Рис. 5. Локализация протекания RAPP-A специфического протеолиза IGFBP-4 в кардиомиоцитах человека, полученных из ИПСК (n=4). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Статистически значимые различия между группами определяли по двухфакторной ANOVA, ***- $p < 0,001$, ****- $p < 0,0001$.*

Обработка гепарином способствует переходу основной части RAPP-A с мембраны в кондиционированную среду, в то время как примерно 10-20% активного RAPP-A остается на поверхности клеток. Таким образом, активный фермент находится как на поверхности кардиомиоцитов, так и в кондиционированной среде.

Индукция гипертрофии в кардиомиоцитах *in vitro* и *in vivo*

Для *in vitro* индукции гипертрофии мы использовали эндотелин-1 и норадреналин, которыми стимулировали культуру неонатальных кардиомиоцитов и культуру кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК. Степень развития гипертрофических изменений *in vitro* предварительно оценивали по увеличению площади кардиомиоцитов (рис. 6, 7).

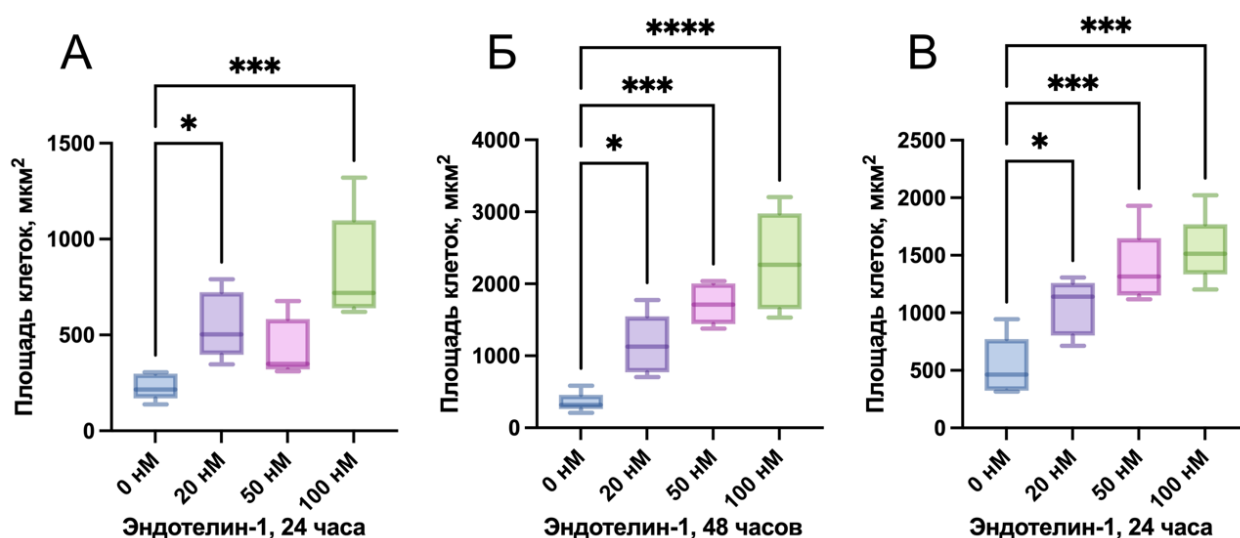


Рис. 6. Зависимость площади неонатальных кардиомиоцитов крысы (А,Б) и культуры кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК (В) от концентрации эндотелина-1 при инкубации с ним в течение 24 ч (А,В) и 48 ч (Б). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n=15$. Статистически значимые различия между группами определяли по двухфакторной ANOVA, * $p<0,05$, ***- $p<0,001$, ****- $p<0,0001$.

Площадь поверхности неонатальных кардиомиоцитов крысы после инкубации в культуральной среде, содержащей 20, 50 и 100 нМ эндотелина-1, в течение 24 или 48 часов инкубации увеличивается в среднем в 2, 1,8 и 4,5 раза и в 3,2, 4,4 и 6,4 раза, соответственно, по сравнению с контрольными

кардиомиоцитами (рис. 6 А, Б) и в 2, 2,6 и 2,8 раза в культуре кардиомиоцитов, полученных из ИПСК (рис. 6 В).

После инкубации с 2, 5 и 10 мкМ норадреналином площадь кардиомиоцитов увеличивается в 1,6, 2,1 и 2 раза соответственно по сравнению с площадью контрольных кардиомиоцитов (рис.7 А, Б).

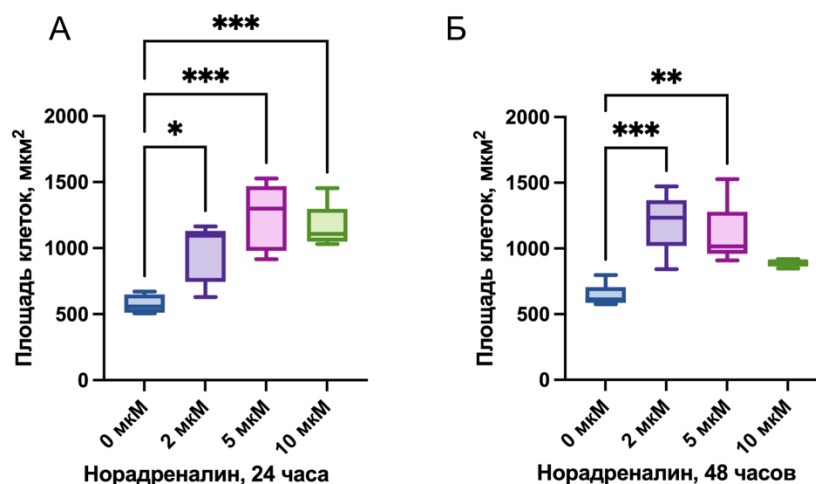


Рис. 7. Зависимость площади кардиомиоцитов от концентрации норадреналина при инкубации с индуктором в течение 24 ч (А) и 48 ч (Б). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение, $n=15$. Статистически значимые различия между группами определяли по двухфакторной ANOVA, $*p<0,05$, $***-p<0,001$

Для моделирования гипертрофии *in vivo* нами была выбрана МКТ-индуцированная гипертрофия миокарда. После инъекции МКТ мы оценивали развитие гипертрофии спустя месяц, измеряя давление в правом желудочке и массу отделов сердца и легких у контрольных и опытных крыс. Полученные значения массы использовали для расчета коэффициентов выраженности гипертрофии (рис. 8). Также для оценки общего воздействия МКТ на организм экспериментальных животных мы оценивали их массу тела и массу легких.

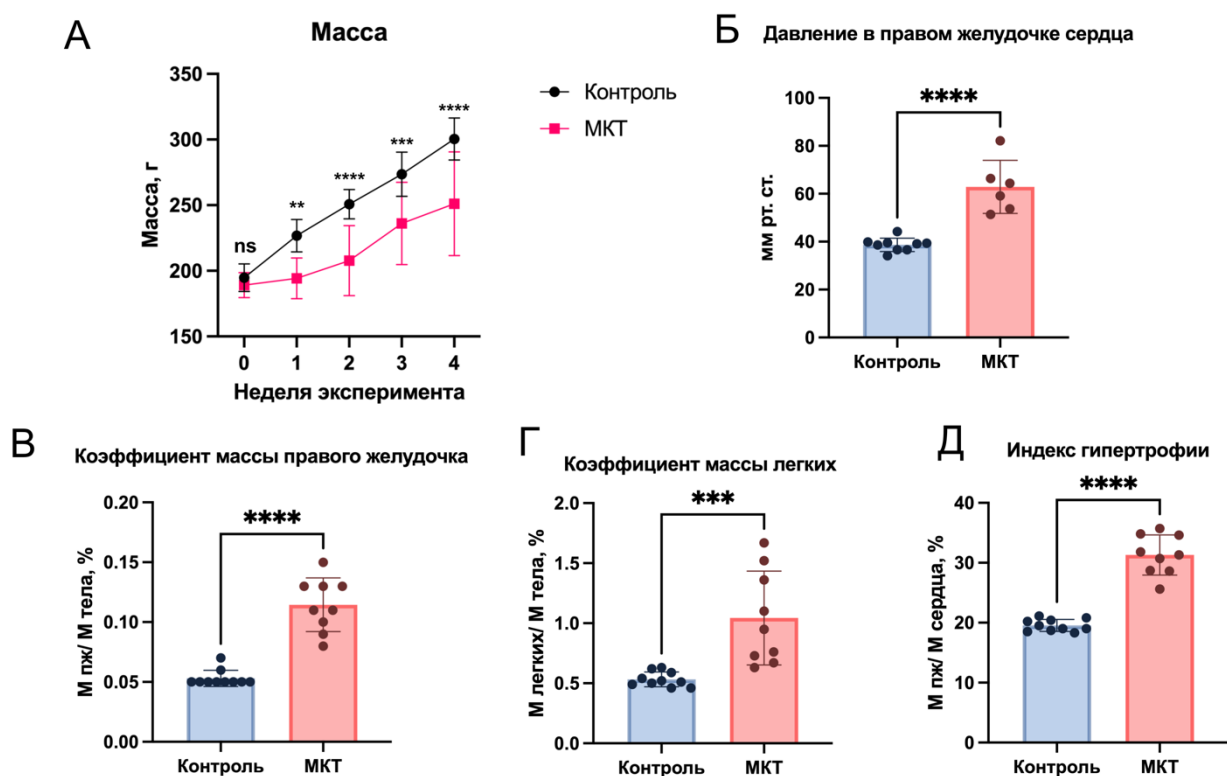


Рис. 8. Динамика изменения массы экспериментальных животных (А), разница давления в правом желудочке (Б), коэффициенты массы правого желудочка (В), легких (Г) и индекс выраженности гипертрофии правого желудочка (Д) МКТ-крыс ($n=9$) по сравнению с группой контрольных крыс ($n=10$). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Статистически значимые различия между группами определяли по А - двухфакторной ANOVA, ** - $p<0,01$, *** - $p<0,001$, **** - $p<0,0001$; Б, В, Г, Д - непарному t -тесту, *** - $p<0,001$, **** - $p<0,0001$.

В МКТ-группе наблюдалась сниженная динамика набора веса по сравнению с контролем (рис. 8 А). Давление в правом желудочке на 4 неделе после инъекции МКТ было выше в 1,6 раз по сравнению с контролем (рис. 8 Б). Коэффициент массы правого желудочка (рис. 8 В) и легких (рис. 8 Г) МКТ-группы был выше примерно в 2 раза по сравнению с контролем. Все эти данные свидетельствуют о развитии гипертрофии под воздействием МКТ.

После развития гипертрофии мы выделяли кардиомиоциты из контрольных и гипертрофированных сердец, после чего проводили измерение площади кардиомиоцитов в культуре, как это делали ранее в случае неонатальных и дифференцированных из ИПСК кардиомиоцитов (рис. 9).

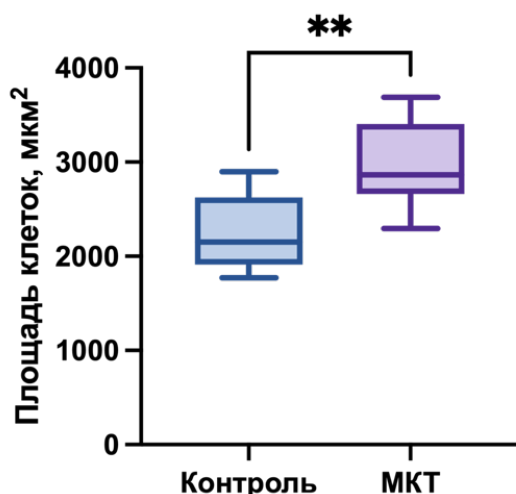


Рис.9. Измерение площади взрослых кардиомиоцитов МКТ- и контрольных групп животных, ($n=15$, $\pm$ SD). Статистически значимые различия между группами определяли по непарному t -тесту, ** - $p<0,01$.

Площадь кардиомиоцитов при вызванной МКТ гипертрофии был в среднем в 1,3 раза выше по сравнению с кардиомиоцитами из контрольной группы. Таким образом, представленные результаты свидетельствуют о сохранении гипертрофических изменений в кардиомиоцитах после индукции гипертрофии в условиях *in vivo* под действием МКТ.

Определение концентрации BNP в кардиомиоцитах

Хорошо известно, что повышенная секреция натрийуретического пептида В-типа (BNP) кардиомиоцитами является важным маркером гипертрофии. В этой связи, для подтверждения развития гипертрофии мы определяли концентрацию BNP в кондиционированной среде кардиомиоцитов во всех используемых нами моделях (рис. 10).

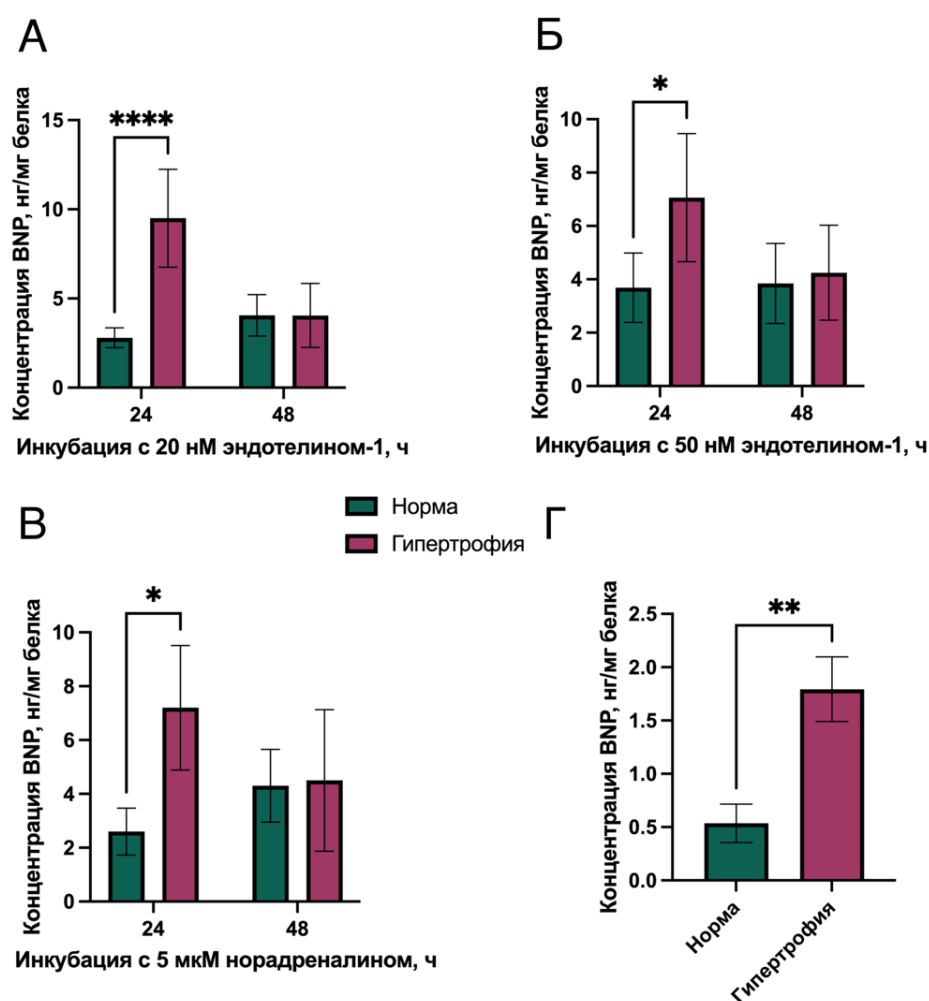


Рис. 10. Концентрация BNP в кондиционированной среде, определенная ФИА «сэндвич» типа: А- первичная культура неонатальных кардиомиоцитов после инкубации с 20 нМ эндотелином-1 ($n=5$); Б- культура кардиомиоцитов человека, дифференцированная из ИПСК, после инкубации с 50 нМ эндотелином-1 в течение 24 и 48 ч. ($n=5$); В- культура кардиомиоцитов человека, дифференцированная из ИПСК, после инкубации с 5 мкМ норадреналином в течение 24 ч. ($n=3$), Г – первичная культура кардиомиоцитов, полученная из взрослых крыс контрольной и МКТ-групп ($n=5$). Статистически значимые различия между группами определяли: А, Б, В - по двухфакторной ANOVA, * - $p<0,05$, ****- $p<0,0001$; Г - непарному t -тесту, ** - $p<0,01$.

Как видно из рисунка 10, добавление эндотелина-1 (рис. 10 А и Б) или норадреналина *in vitro* (рис. 10 В) или влияние МКТ в условиях *in vivo* (рис. 10 Г) приводит к достоверному повышению уровня BNP и свидетельствует, что в случае всех используемых моделей нам удалось добиться развития гипертрофических изменений в кардиомиоцитах.

Изучение RAPP-A-специфического протеолиза IGFBP-4 при гипертрофии

Убедившись в том, что мы можем успешно моделировать гипертрофию кардиомиоцитов, мы могли перейти к решению вопроса о том, как она может влиять на протеолиз IGFBP-4 под действием RAPP-A, поэтому на финальном этапе нашей работы, мы определили уровень RAPP-A-опосредованного протеолиза IGFBP-4 при гипертрофии кардиомиоцитов (рис. 12).

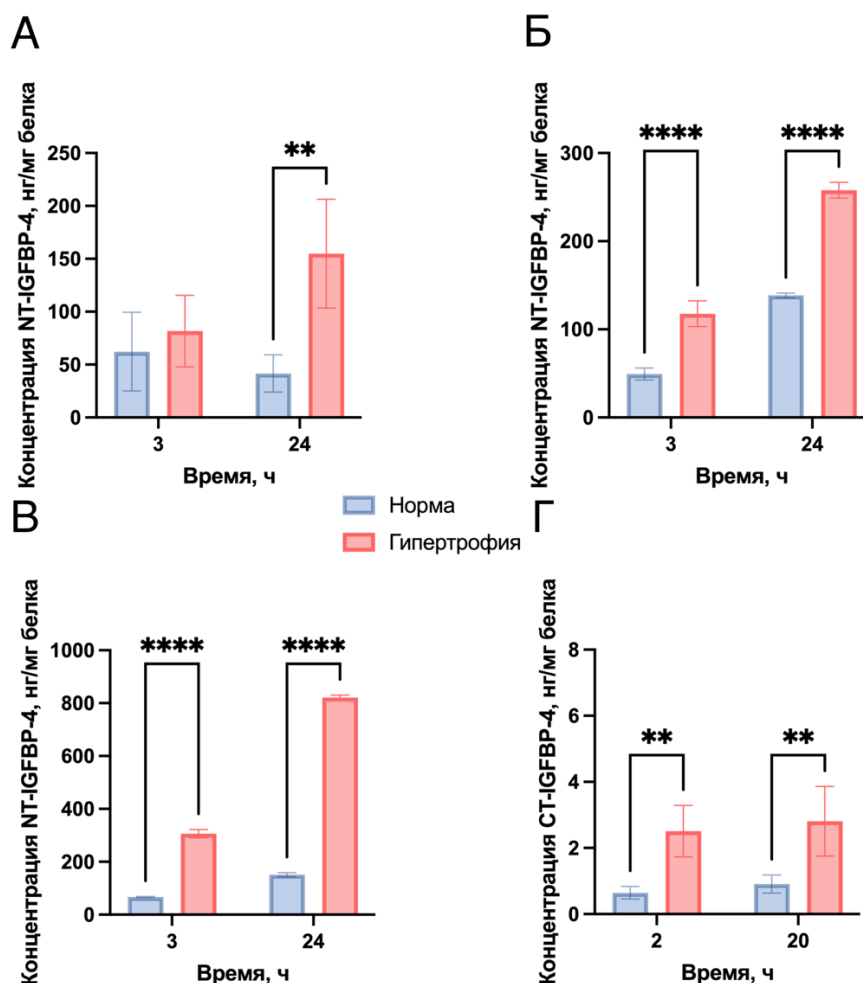


Рис. 11. Концентрация NT и CT-IGFBP-4 в кондиционированной среде: А- первичной культуры неонатальных кардиомиоцитов после инкубации с 20 нМ эндотелином-1 в течение 24 ч. (n=5); Б- культуры кардиомиоцитов человека, дифференцированной из ИПСК, после инкубации с 50 нМ эндотелином-1 в течение 24 ч. (n=5); В- культуры кардиомиоцитов человека, полученных из ИПСК, после инкубации с 5 мкМ норадреналином в течение 24 ч. (n=3), Г – первичной культуры кардиомиоцитов, полученной из взрослых крыс после индукции гипертрофии под действием MKT (n=5). Данные представлены как среднее $\pm$ стандартное отклонение. Статистически значимые различия между группами определяли по двухфакторной ANOVA, ** - $p < 0,01$, **** - $p < 0,0001$.

Как видно из результатов, концентрация NT-IGFBP4 в первичной культуре неонатальных кардиомиоцитов после индукции гипертрофии под действием 20 нМ эндотелина-1 превышала значения концентрации N-фрагмента в контрольных клетках (рис. 11 А, норма), в 1,2 и 3,7 раза. В случае гипертрофии под действием эндотелина-1 (рис. 11 Б) в культуре кардиомиоцитов, дифференцированных из ИПСК, уровень протеолиза после 3 и 24 часов протеолитической реакции повышается в 2,5 и 1,9 раз соответственно по сравнению с контролем. В случае же гипертрофического ответа после инкубации с норадреналином (рис. 11 В) концентрация NT-IGFBP-4 после 3 и 24 часов протеолитической реакции повышается в 5 и 5,3 раза соответственно. Также в случае МКТ-индуцированной гипертрофии на модели первичной культуры кардиомиоцитов, полученных из взрослых крыс (рис. 11 Г), наблюдается увеличение концентрации СТ-IGFBP-4 в 3 раза, по сравнению с уровнем СТ-IGFBP-4 в норме. Полученные нами результаты свидетельствуют об усилении протекания протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A при гипертрофических изменениях кардиомиоцитов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании были охарактеризованы три модельные системы для изучения роли протеолитического фермента PAPP-A в миокарде в норме. Использование трёх различных подходов к моделированию миокарда на клеточном уровне позволяет получить более полное и точное представление о процессах, протекающих в сердце в физиологических условиях. Результаты исследования демонстрируют, что культивируемые кардиомиоциты способны экспрессировать протеолитически активный PAPP-A на своей поверхности. PAPP-A специфически расщепляет IGFBP-4 как на поверхности клеток, так и во внеклеточном пространстве. Высвобождение IGF в результате специфического протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A может стимулировать взаимодействие IGF с его рецепторами и активировать кардиопротекторные эффекты, включая защиту от ишемических повреждений миокарда. Полученные данные указывают на то, что PAPP-A может играть важную роль в поддержании жизнеспособности и функционирования кардиомиоцитов в здоровом сердце. В нашем исследовании была использована комбинация нескольких *in vitro* и *in vivo* подходов для индукции гипертрофии в сердечной ткани. Индукция гипертрофии кардиомиоцитов *in vitro* под действием эндотелина-1 и норадреналина, а также *in vivo* под действием МКТ позволила приблизиться к реалистичной картине развития патологической гипертрофии миокарда. Изучение корреляции между уровнем протеолиза IGFBP-4 и концентрацией PAPP-A в разных моделях гипертрофии позволило расширить понимание механизмов развития гипертрофии сердечной ткани и ее связи с регуляцией биодоступности IGF. Усиление протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A, приводящее к высвобождению IGF при гипертрофии кардиомиоцитов, может служить как компенсаторным механизмом для снижения негативных последствий гипертрофии, так механизмом, усиливающим эти изменения (рис. 12).

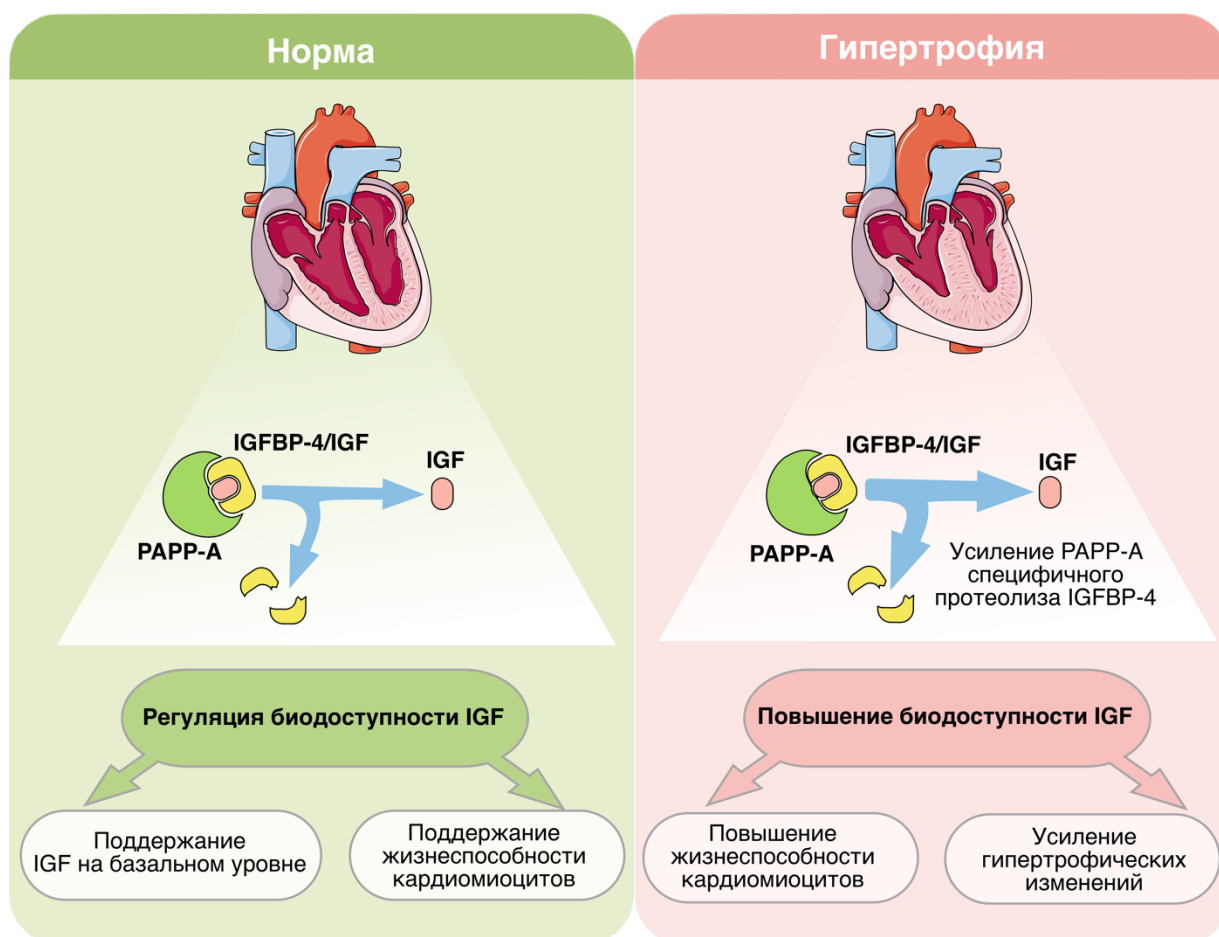


Рис. 12. Роль PAPP-A в сердечной ткани в норме и при гипертрофии.

Исходя из результатов данного исследования можно заключить, что PAPP-A-специфичный протеолиз IGFBP-4 протекает на поверхности кардиомиоцитов в норме и усиливается при гипертрофических изменениях. Полученные данные позволяют предположить, что в сердечной ткани в норме биодоступность IGF зависит от баланса экспрессии и активности PAPP-A, что может играть ключевую роль в регуляции жизнеспособности кардиомиоцитов. Усиление протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A и, как следствие, повышение концентрации IGF при гипертрофии может служить как компенсаторным механизмом для минимизации негативных последствий гипертрофических изменений, так и фактором, стимулирующим эти изменения.

ВЫВОДЫ

1. Разработаны и охарактеризованы три модельные системы на основе культур кардиомиоцитов для исследования протеолиза IGFBP-4 в сердечной ткани в норме;
2. Впервые установлено, что в норме в культурах кардиомиоцитов протекает RAPP-A-зависимый протеолиз IGFBP-4 как на поверхности клеток, так и в кондиционированной среде;
3. Разработаны и охарактеризованы три модельные системы на основе культур кардиомиоцитов, переведенных в гипертрофированное состояние *in vitro* под действием эндотелина-1 и норадреналина и *in vivo* под действием монокроталина;
4. Гипертрофия сопровождается усилением протеолиза IGFBP-4 под действием RAPP-A независимо от используемого типа клеточной культуры и способа моделирования гипертрофического ответа.

СПИСОК ПУБЛИКАЦИЙ ПО ТЕМЕ ДИССЕРТАЦИИ

Статьи, опубликованные в журналах Scopus, Web of Science (WoS), RSCI:

1. Серебряная Д.В., **Адашева Д.А.**, Конев А.А., Артемьева М.М., Катруха И.А., Постников А.Б., Медведева Н.А., Катруха А.Г. Протеолиз IGFBP-4 под действием PAPP-A в первичной культуре неонатальных кардиомиоцитов крысы в норме и при гипертрофии // *Биохимия*. – 2021. – Т. 86 – №. 11. – С. 1620–1634 (двухлетний ИФ РИНЦ – 1.58) (1,49/0.3)*

Serebryanaya D.V., **Adasheva D.A.**, Konev A.A., Artemieva M.M., Katrukha I.A., Postnikov A.B., Medvedeva N.A., Katrukha A.G. IGFBP-4 Proteolysis by PAPP-A in a Primary Culture of Rat Neonatal Cardiomyocytes under Normal and Hypertrophic Conditions // *Biochemistry (Moscow)*. – 2021. – Vol. 86. – No. 11. – P. 1395–1406

2. **Adasheva D.A.**, Lebedeva O.S., Goliusova D.V., Postnikov A.B., Teriakova M.V., Kopylova I.V., Lagarkova M.A., Katrukha A.G., Serebryanaya D.V. PAPP-A-Specific IGFBP-4 Proteolysis in Human Induced Pluripotent Stem Cell-Derived Cardiomyocytes // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2023. – Vol. 24. – No. 9. – P. 8420. (ИФ WOS JIF – 6.2) (1.15/0.23)*

3. **Адашева Д.А.**, Серебряная Д.В. IGF-сигнальный путь в сердце в норме и при патологических состояниях // *Биохимия*. – 2024. – Т. 89. – №8 – С. 1402–1428 (двухлетний ИФ РИНЦ – 1.58) (2,86/1.43)*

Adasheva D.A., Serebryanaya D.V. IGF Signaling in the Heart in Health and Disease // *Biochemistry (Moscow)*. – 2024. – Vol. 89. – No. 8. – P. 1402–1428

*-Объём в условных печатных листах/вклад автора в условных печатных листах

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ

ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания

СН – сердечная недостаточность

ОКС – острый коронарный синдром

PAPP-A – ассоциированный с беременностью белок А плазмы

IGF – инсулино-подобный фактор роста

IGFBP – белок, связывающий инсулино-подобный фактор роста

МКТ – монокроталин

ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки

ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка

BNP – натрийуретический пептид В

cTnT/cTnI – сердечные изоформы тропонина Т или I