УДК 577.112.6:57.053

РОЛЬ СЕЛЕКТИВНОЙ АКТИВАЦИИ РЕЦЕПТОРА КОНЕЧНЫХ ПРОДУКТОВ ГЛИКИРОВАНИЯ В ИЗМЕНЕНИИ ОКИСЛИТЕЛЬНО-ВОССТАНОВИТЕЛЬНОГО БАЛАНСА И ОБЕСПЕЧЕНИИ ЖИЗНЕСПОСОБНОСТИ КЛЕТОК ГОЛОВНОГО МОЗГА

DOI 10.24412/CL-37124-2023-36-40

Винокуров А. Ю. [1], **Серегина Е. С.** [1], **Камынина А. В.** [2], **Абрамов А. Ю.** [1,3]

[1] Орловский государственный университет имени И. С. Тургенева, Орел, Россия,
[2] Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Москва, Россия,
[3]UCL Queen Square Institute of Neurology, London, UK
e-mail: vinokurovayu@oreluniver.ru

Аннотация. селективно связывающиеся с RAGE фрагменты V-домена рецептора увеличивают производство активных форм кислорода за счет прямой активации НАДФН-оксидаз, которая не вызывает снижения жизнеспособности клеток первичной смешанной культуры коры головного мозга, но снижают токсический эффект бета-амилоида.

Ключевые слова: фрагменты RAGE, активные формы кислорода, НАДФН-оксидаза, бета-амилоид.

RAGE — это преимущественно трансмембранный гликопротеин типа I, относящийся к суперсемейству иммуноглобулинов [1]. Рецептор может существовать в виде нескольких изоформ, наиболее изученным из которых является полноразмерная молекула, состоящая из трех доменов: внеклеточного лигандсвязывающего, одинарной трансмембранной спирали и С-терминального короткого домена, при этом последний не обладает ферментативной активностью, но играет важную роль для передачи сигналов. Известны другие мембранные формы, отличающиеся той или иной степенью деградации цитоплазматического С-концевого фрагмента. Деградация связанного с мембраной участка обусловливает существование растворимой формы RAGE [2].

Увеличение экспрессии RAGE выявлено при различных патологиях, включая болезнь Альцгеймера (БА), ишемические повреждения мозга, системный амилоидоз, развитие опухолей и ряда других [1, 3, 4]. В то же время отмечается, что RAGE является регулятором ряда процессов, обусловливающих выживаемость клеток, в частности, рост нейронов, воспалительные реакции, элиминации апоптотических клеток [5]. Помимо этого показано, что активация рецептора может регулировать развитие кальциевых сигналов в нейронах посредством обеспечения высвобождения глутамата из астроцитов и последующего стимулирования NMDA и AMPA/каинатных рецепторов [6]. Исследованиями показано, что при БА уровень экспрессии гена RAGE положительно коррелирует со степень тяжести заболевания [7]. Однако при этом остается вопросом, является ли это составляющей патологического процесса или же инструментом, обеспечивающим снижение уровня повреждений структур головного мозга. Отчасти это связано с мультилигандным характером RAGE. Его активация может происходить в результате связывания с широким набором лигандов, включая конечные продукты гликирования белков (AGEs), белок HMGB1, бета-амилоид (βA), молекулы ДНК, лизофосфатидную кислоту, молекулы семейства S100 [1, 2]. Для последних, в частности, известны такие эффекты в отношении астроцитов, олигодендроцитов и нейронов как стимулирование роста, пролиферации, защиты от повреждения активными формами кислорода (АФК) и ряд других [8]. Кроме того защитный эффект в моделях БА, который является результатом связывания с βA, показан для пептидов — полученных синтетическим путем фрагментов RAGE [9, 10]. Затруднения в поиске ответа на вопрос о роли RAGE в физиологии и патологии во многом связано с мультифункциональностью и, соответственно, различными механизмами воздействия его лигандов на внутриклеточные процессы. В частности, βA способен вызывать токсический эффект и в результате неспецифического связывания с клеточной мембраной или проникновения внутрь клетки [6].

В связи с этим целью настоящего исследования явилось изучение действия ряда синтетических пептидов разной длины– фрагментов участка V-домена RAGE, для некоторых из которых уже показана специфическая способность к связыванию с рецептором [6] с тем, чтобы определить соединения с наиболее высокой агонистической активностью, а также выявить характер воздействия на клетки посредством одного из показанного для RAGE механизма — стимулирования продукции АФК.

Исследования влияния пептидов на образование АФК выполнены как на переживающих срезах, так и первичных смешанных нейроглиальных культурах коры головного мозга методом конфокальной микроскопии (ZEISS LSM 900) с использованием окисляющегося преимущественно супероксид-анионом и приобретающего в результате этого способность к флуоресценции зонда дигидроэтидий (HEt) (максимум поглощения 530 нм). Показано, что одинаковые по длине, но отличающиеся наличием/отсутствие защитных групп соединения (60—76) (пептид 1) и Ac- (60—76)-NH2 (пептид 6) способны к значительному увеличению скорости образования АФК относительно базового уровня, взятого за 100 % (220 % и 480 % соответственно). При этом более короткий фрагмент (60—62) не оказал никакого влияния и был использован в последующих экспериментах в качестве контроля.

Нивелирование стимулирующего эффекта в присутствии хлорида дифениленйодония (DPI) (0,5 мкМ), ингибирующего НАДФН-оксидазы, и отсутствие влияния оксипуринола (20 мкМ), блокирующего ксантиноксидазу, свидетельствует о том, наиболее вероятной причиной увеличения скорости окисления HEt является активация первой группы ферментов.

С учетом того, что наблюдаемый эффект увеличения продукции АФК может быть обусловлен как прямым влиянием активированного RAGE, так и опосредован более сложными сигнальными механизмами с альтернативными путями запуска, были выполнены исследования с применением селективного антагониста RAGE FPS-ZM1 (1 мкМ), а также CNQX (10 мкМ) и МК-801 (10 мкМ), блокирующих AMPA/каинатные и NMDA рецепторы соответственно. Присутствие двух последних соединений не оказывало снижающего эффекта на способность пептидов 1 и 7 к ускорению окисления HEt. В то же время под влиянием FPS-ZM1 происходило полное исключение гиперпродукции АФК при сохранении способности НАДФ-оксидазы к активации при последующем добавлении форболового эфира.

Анализ скорости перекисного окисления липидов (ПОЛ), а также сравнительная оценка уровня восстановленного глутатиона (GSH) с применением зондов C-11 BODIPY 581/591 и монохлорбиман соответственно не обнаружил признаков окислительного стресса в случае пептида 6, а также выявил ускорение ПОЛ (187 % от базового уровня) и снижение содержания GSH (75 % от контроля) после воздействия пептида 1. Однако отсутствие статистически значимых отличий изменения содержания некротических клеток,

выявленное с помощью двойного окрашивания йодидом пропидия и Hoechst 33342, свидетельствует о том, что активация продукции АФК под влиянием исследуемых фрагментов RAGE не приводит к ассоциированным с клеточной гибелью повреждениям.

С учетом того, что обусловленная βA токсичность части связана с гиперпродукцией АФК и развитием окислительного стресса, были проведены исследования влияния активации RAGE на жизнеспособность клеток смешанной нейроглиальной культуры при инкубировании в присутствии βA 1—40 (10 мкМ). На фоне значительного увеличения доли окрашенных йодидом пропидия клеток в присутствии только βA (26 % некротических клеток) дополнительная обработка пептидом 1 приводила к снижению этого параметра до уровня 15 %, сопоставимого с контрольной культурой без какого-либо воздействия.

Таким образом, синтетические пептиды (60—76) и Ac- (60—76)-NH2 — фрагменты V-домена RAGE выступают селективными агонистами данного рецептора, вызывающими непосредственную активацию НАДФН-оксидазы. Происходящие при этом изменения уровня продукции АФК не приводят к патологическим для клеток последствиям и, вероятно, являются элементом физиологических процессов, обусловливающих жизнеспособность клеток головного мозга в условиях стресса.

Работа выполнена при поддержке гранта Правительства Российской Федерации № 075—15—2022—1095.

Список литературы

1. Успенская, Ю. А. и др. Лиганды RAGE-белков: роль в межклеточной коммуникации и патогенеза воспаления. Вестник РАМН **70**, 694—703 (2015).
2. Ding, Q. & Keller, J. N. Evaluation of rage isoforms, ligands, and signaling in the brain. *Biochim. Biophys. Acta — Mol. Cell Res.* **1746**, 18—27 (2005).
3. Askarova, S., Yang, X., Sheng, W., Sun, G. Y. & Lee, J. C. Role of AB-RAGE Interaction in Oxidative Stress and cPLA2 Activation in Astrocytes and Cerebral E ndothelial Cells. 375—385 (2011).
4. Muhammad, S. *et al.* The HMGB1 receptor RAGE mediates ischemic brain damage. *J. Neurosci.* **28**, 12023—12031 (2008).
5. Kierdorf, K. & Fritz, G. RAGE regulation and signaling in inflammation and beyond. *J. Leukoc. Biol.* **94**, 55—68 (2013).

6. Kamynina, A. *et al.* Activation of RAGE leads to the release of glutamate from astrocytes and stimulates calcium signal in neurons. *J. Cell. Physiol.* **236**, 6496—6506 (2021).
7. Leclerc, E., Sturchler, E. & Vetter, S. W. The S100B/RAGE axis in alzheimer's disease. *Cardiovasc. Psychiatry Neurol.* **2010**, (2010).
8. 8. Donato, R. *et al.* Functions of S100 Proteins. *Curr. Mol. Med.* **13**, 24—57 (2012).
9. Volpina, O. M. *et al.* Synthetic Fragment of Receptor for Advanced Glycation End Products Prevents Memory Loss and Protects Brain Neurons in Olfactory Bulbectomized Mice. *J. Alzheimer's Dis.* **61**, 1061—1076 (2018).
10. Kamynina, A. V. *et al.* Synthetic Fragments of Receptor for Advanced Glycation End Products Bind Beta-Amyloid 1—40 and Protect Primary Brain Cells From Beta-Amyloid Toxicity. *Front. Neurosci.* **12**, 1—9 (2018).

THE ROLE OF SELECTIVE ACTIVATION OF RECEPTOR FOR ADVANCED GLUCATION ENDPRODUCTS IN REDOX BALANCE AND VIABILITY OF BRAIN CELLS

Vinokurov A. Y. [1], **Seryogina E. S.** [1], **Kamynina A. V.** [2], **Abramov A. Y.** [1,3]

[1] Orel State University, Orel, Russia,
[2] Moscow Institute of Physics and Technology, Moscow, Russia,
[3] UCL Queen Square Institute of Neurology, London, UK

Annotation. fragments of the RAGE V-domain selectively bind to the receptor and increase the production of reactive oxygen species due to direct activation of NADPH oxidases, which does not lead to a decrease in the viability of the primary cortical co-culture, but reduces the toxic effect of beta-amyloid.

Key words: RAGE fragments, reactive oxygen species, NADPH-oxidase, beta-amyloid.