

УДК 577.27

ИССЛЕДОВАНИЕ АССОЦИАЦИЙ МЕЖДУ УРОВНЕМ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ МИТОХОНДРИАЛЬНОГО РАЗОБЩЕНИЯ (ANT2 И UCP2) И СЕКРЕЦИЕЙ ЦИТОКИНОВ CD14+ КЛЕТКАМИ У БОЛЬНЫХ МЕТАБОЛИЧЕСКИМ СИНДРОМОМ

Воронова С.С., Бограя М.М., Малащенко В.В., Хазиахматова О.Г., Шнар В.А., Белецкая М.А., Литвинова Л.С.
БФУ им. И. Канта, Калининград, Россия

XULOSA

Maqsad. CD14+ hujayralarida ANT2 va UCP2 mitoxondrial ajralish (MA) genlari, shuningdek NF-kB signalizatsiya genlari (NFKBIA, p65) va metabolic sindrom (MetS) bo'lgan bemorlarda ushbu hujayralarning yallig'lanishga qarshi va yallig'lanishga qarshi sitokinlarining sekretiya profile o'rtasidagi munosabatlarni o'rganish.

Materiallar va usullar. Tadqiqot uch guruhga bo'lingan 88 donorni o'z ichiga oldi: 1) shartli sog'lom donorlar; 2) MetS bilan kasallangan bemorlar; 3) semirib ketgan bemorlar va MSning bir komponenti. Tadqiqot ob'ekti immunomagnit ajratish usuli yordamida bemorlarning venoz qonidan olingan CD14+ hujayralari edi. Qiziqarli genlarning ifodasi (NFKBIA, p65, ANT2, UCP2) real vaqtda RT-PCR bilan baholandi, sitokinlarning sekretiysi (IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, TNF-a) ferment orqali hujayra supernatantlarida baholandi.

Natijalar. Qiziqarli genlarning ifoda darajasi (NFKBIA, p65, ANT2, UCP2) o'zgarmadi. MetS bilan og'rikan bemorlarda IL-8 va IL-10 sekretiya darajasi pasaygan. ANT2ning ifoda darajasi p65 ifoda darajasi bilan salbiy, IL-10 bilan ijobiy bog'liq. Bundan tashqari, ANT2ning ifoda darajasi TNF-a sekretiysining ortishi bilan kamaydi. Shunday qilib, ANT2 CD14+ hujayralarida yallig'lanishga qarshi rol o'ynaydi.

Xulosa. MA oqsillarining genlari (ayniqsa ANT2) NF-kB signalizatsiyasi orqali MSda CD14+hujayralari tomonidan sitokin sekretiysini tartibga solishda bilvosita ishtirok etishi mumkin.

Kalit so'zlar: monositlar; meta-yallig'lanish, metabolic sindrom, mitoxondriyal ajralish.

SUMMARY

Objective. To investigate the relationships between the expression of mitochondrial uncoupling (MU) genes (ANT2 and UCP2), NF-kB signalling genes (NFKBIA, p65) in CD14+ cells and the secretion profile of pro- and anti-inflammatory cytokines of these cells in severe metabolic syndrome (MetS).

Materials and methods. The study included 88 donors divided into three groups: 1) conditionally healthy donors, 2) patients with MetS, 3) patients with obesity and a component of MetS. The object of the study was CD14+ cells obtained from the patients' venous blood using the immunomagnetic separation method. The expression of the genes of interest (NFKBIA, p65, ANT2, UCP2) was determined by RT-PCR in real time, the secretion of cytokines (IL-1b, IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, TNF-a) was determined in the cell supernatant by enzyme immunoassay.

Results. The expression level of the genes of interest (NFKBIA, p65, ANT2, UCP2) did not change. The secretion levels of IL-8 and IL-10 decreased in MetS patients. The expression level of ANT2 correlated negatively with the expression level of p65, positively with IL-10. In addition, the expression of ANT2 decreased with an increase in TNF-a secretion. Thus, ANT2 probably plays an anti-inflammatory role in CD14+ cells.

Conclusion. Genes of MU proteins (especially ANT2) may be indirectly involved in the regulation of cytokine secretion by CD14+ cells in MetS through NF-kB signalling.

Keywords: monocytes, metaflammation, metabolic syndrome, mitochondrial uncoupling.

ВВЕДЕНИЕ

Метаболический синдром (МС) – одно из важнейших патологических состояний современности [1]. Неотъемлемым компонентом патогенеза МС является метавоспаление. Так, иммунокомпетентные клетки крови, в частности, моноциты (CD14+ клет-

ки), приобретают провоспалительный фенотип и рекрутируются в жировую ткань, печень, где дифференцируются в макрофаги, что приводит к развитию хронического воспаления. К тому же, у больных МС наблюдаются значительно более высокие уровни фенотипа M1 по сравнению с контрольной группой [3].

Известно, что на приобретение провоспалительного фенотипа CD14⁺ клетками, влияет состояние их митохондрий (переход от окислительного фосфорилирования к гликолизу). Ключевая роль в этом процессе принадлежит митохондриальному разобщению (MP), опосредуемому двумя белками – ANT2 и UCP2 [4].

Немногочисленные исследования влияния MP на иммунометаболизм при патологиях, связанных с MC, концентрируются на макрофагах, но не на моноцитах. Известно, что нокаут Ant2 в миелоидных клетках снижает метавоспаление при ожирении. Кроме того, Ant2 необходим для провоспалительной активации макрофагов жировой ткани (в том числе, секреции Tnf- α), при ожирении выявлен рост уровня экспрессии Ant2 в этих клетках [10]. Сверхэкспрессия другого белка-разобщителя, UCP2, наоборот, приводила к снижению концентрации митохондриальных АФК и переходу макрофагов в противовоспалительный фенотип, а также снижению секреции провоспалительных цитокинов через ингибирование NF-kB сигнального пути (TNF- α , IL-1 β и IL-6) [7,10].

Такие противоречивые сведения о роли MP в иммунометаболизме CD14⁺ клеток при MC требуют дополнительных исследований.

В связи с вышесказанным, ЦЕЛЬЮ НАШЕЙ РАБОТЫ явилась оценка взаимосвязи между экспрессией генов MP ANT2 и UCP2, а также генов сигналинга NF-kB (NFKBIA, p65) с профилем секреции про- и противовоспалительных цитокинов CD14⁺ клетками, полученными у больных MC.

МАТЕРИАЛ И МЕТОДЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

В исследование было включено 88 доноров, которые были поделены на три группы: 1) условно здоровые доноры (УЗД) (32 человека, ИМТ < 25 кг/м², отсутствие кардио-метаболических, инфекционных заболеваний); 2) группа сравнения (ГС) (19 человек, ИМТ > 30 кг/м² и один критерий MC), 3) больные MC (MC) (37 человек, MC согласно критериям IDF 2006). Все доноры подписали информированное согласие на участие в исследовании и использование биологического материала в целях исследования.

Объектом исследования являлись полученные из венозной крови пациентов методом иммуномагнитной сепарации CD14⁺ моноцит/макрофаги. Для оценки уровня экспрессии генов интереса (NFKBIA, p65, ANT2, UCP2) в моноцитах периферической крови, выделяли РНК с использованием реагента ExtractRNA, согласно протоколу производителя (Евроген, Россия). Проведение реакции обратной транскрипции осуществляли с использованием набора MMLV RT kit (Евроген, Россия) и добавлением ингибитора РНКаз RiboCare (Евроген, Россия). Количественную ПЦР выполняли с использованием микса 5X qPCRmix-HS SYBR (Евроген, Россия). Для нормализации данных экспрессии была использована панель из четырех референсных генов (RPL13A, PPIB, PPIA, ACTB). Полученные данные экспрессии

генов были трансформированы в логарифмы по степени 10 для приведения к нормальному распределению.

CD14⁺ клетки культивировали в условиях *in vitro* 24 часа в 48-ми луночной планшете с добавлением бессывороточной питательной среды Искова. В супернатантах клеточных культур оценивали уровень секреции цитокинов (IL-1 β , IL-6, IL-8, IL-10, MCP-1, TNF- α) методом иммуноферментного анализа.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Уровень экспрессии генов *NFKBIA* (ингибитор NF-kB, осуществляющий отрицательную обратную связь) [15], *p65* (основная субъединица комплекса NF-kB) [15] в CD14⁺ клетках значимо не изменялся между группами (рисунок 1, а). Сигнальный путь NF-kB, ассоциированный с поддержанием хронического воспаления при MC, играет важную роль в секреции провоспалительных цитокинов (IL-6, IL-1 β , IL-8, TNF- α) [6]. Вероятно, регуляция NF-kB сигналинга может происходить на более высоких (трансляционный, посттрансляционный) уровнях.

Уровень экспрессии генов MP (ANT2, UCP2) в CD14⁺ клетках также значимо не различался между группами (рисунок 1, а). На сегодняшний день существует ограниченное количество данных об экспрессии генов MP в CD14⁺ клетках, полученных у больных MC. Известно, что уровень экспрессии UCP2 снижался у больных ожирением и СД2Т в мононуклеарных клетках крови [9].

Содержание противовоспалительного IL-10 [2, 13] (TNF в супернатантах культур CD14⁺ клеток, полученных у больных MC, было значимо ниже аналогичных значений УЗД ($p = 0,0019$) (рисунок 1, б).

Уровень секреции IL-8, опосредующего провоспалительные сигнальные каскады при MC [11, 12], также был значимо ниже в группе MC и ГС по сравнению с УЗД ($p = 0,0100$ и $p = 0,0161$ соответственно). Снижение продукции данных цитокинов CD14⁺ клетками может быть связано с подавлением функциональной активности моноцитов у больных MC.

Так, известно, что уровень базальной секреции MCP-1 и IL-6 *in vitro* значимо снижался у больных ожирением [8].

Согласно корреляционному анализу (рисунок 2), уровень экспрессии ANT2 положительно коррелировал с уровнем экспрессии NFKBIA ($r = 0,328$, $p = 0,00218$) и отрицательно с уровнем экспрессии p65 ($r = -0,427$, $p = 0,00004$), что может указывать на противовоспалительный эффект, опосредуемый ANT2. Уровень экспрессии UCP2 наоборот, положительно коррелировал с уровнем экспрессии p65 ($r = 0,334$, $p = 0,00158$). Кроме того, были обнаружены слабые значимые корреляции между содержанием цитокинов в супернатантах культур моноцитов и генами интереса: NFKBIA положительно коррелировал с IL-6 ($r = 0,295$, $p = 0,00706$), IL-10 ($r = 0,355$, $p = 0,00235$) и отрицательно – с TNF- α ($r = -0,322$, $p = 0,00512$), что не противоречит данным литературы [15].

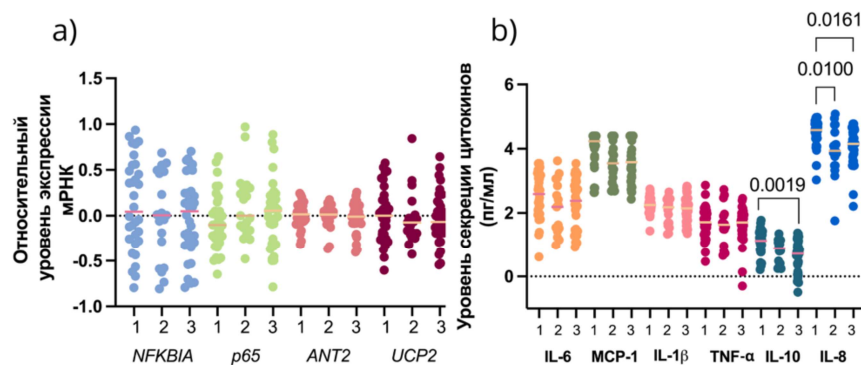


Рис. 1. Исследование уровней мРНК генов интереса и секреции цитокинов CD14+ клетками.

а) Относительный уровень экспрессии генов интереса; б) Уровень секреции цитокинов в клеточных супернатантах. 1 – УЗД, 2 – ГС, 3 – МС.

ANT2 положительно коррелировал с IL-10 ($r=0,259$, $p = 0,02891$), также была обнаружена отрицательная корреляция между UCP2 и MCP-1 ($r=-0,212$, $p = 0,04838$).

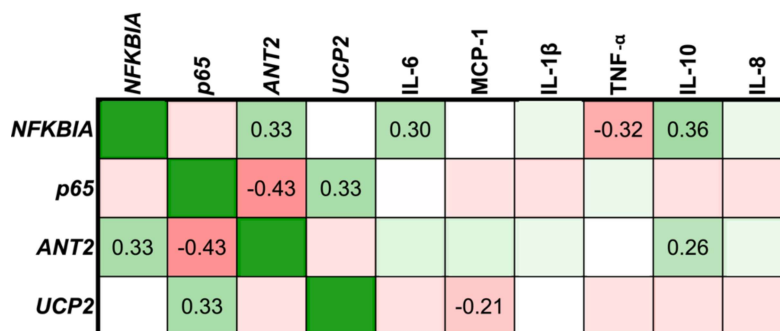


Рис. 2. Корреляционная матрица.

Для более прицельного изучения влияния генов интереса на секрецию цитокинов, данные были разделены по терциям (I, II, III) – значения секреции цитокинов моноцитами были распределены от меньшего к большему и поделены на три равные группы (30, 29, 29) (рис. 3).

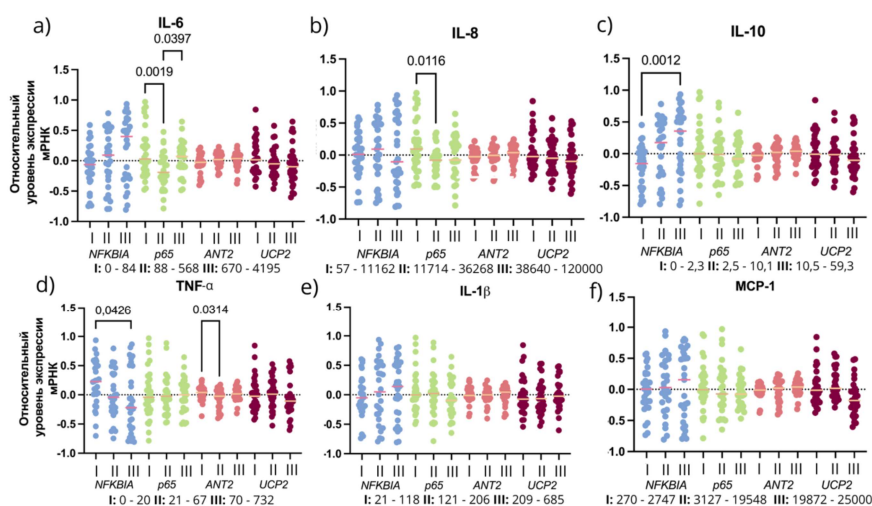


Рис. 3. Уровень экспрессии генов интереса при делении групп по уровню секреции цитокинов.

Было обнаружено, что уровень экспрессии p65 значительно снижался при повышении секреции IL-6 ($p=0,0019$, I по сравнению со II), однако затем уровень экспрессии p65 значительно повышался ($p = 0,0397$, II по сравнению с III) (рис. 3, а). Схожая динамика наблюдалась и при повышении секреции IL-8 – уро-

вень экспрессии p65 значительно снижался ($p=0,0116$, I по сравнению со II) (рис.3, б). Это сложно объяснить результаты, поскольку повышенная секреция IL-6 и IL-8 опосредуется NF-kB сигналингом и активной экспрессией субъединицы p65 [5, 15]. С другой стороны, в данном случае может иметь место отрица-

тельная обратная связь – чем больше секретируется данный провоспалительный цитокин, тем сильнее подавляется NF-κB сигналинг (в частности, экспрессия субъединицы p65) [15].

Уровень экспрессии NFKBIA значимо повышался при увеличении секреции IL-10 ($p = 0,0012$, I по сравнению с III) (рисунок 3, с). Сигналинг, активируемый IL-10, через подавление NF-κB, снижает секрецию провоспалительных цитокинов через NFKBIA [14]. В то же время, уровень экспрессии NFKBIA значимо снижался при повышении секреции TNF-α ($p = 0,0426$, I по сравнению с III) (рисунок 3, d), что также соответствует данным литературы – NF-κB сигналинг связан с секрецией TNF-α, и при повышении секреции этого цитокина, экспрессия ингибитора NF-κB может снижаться [15].

Что касается генов МР, то значимые результаты были обнаружены только по ANT2 – при повышении секреции TNF-α, снижался уровень экспрессии ANT2 ($p = 0,0314$, I по сравнению со II). Это неожиданный результат, поскольку в исследованиях *in vivo* нокаут Ant2 в миелоидных клетках приводил к снижению секреции провоспалительных цитокинов [10].

Таким образом, данные, полученные в нашем исследовании – отрицательные корреляции между ANT2 и p65, положительные корреляции с IL-10, а также упомянутое выше снижение экспрессии ANT2 при повышении секреции TNF-α – свидетельствуют скорее о противовоспалительной роли ANT2 в CD14+ клетках. Роль UCP2 все еще не до конца ясна и требует дальнейшего изучения.

Подводя итог, гены белков МР (в особенности, ANT2) косвенно могут участвовать в регуляции цитокиновой секреции CD14+ клетками при МС через NF-κB сигналинг.

Исследование было выполнено при поддержке гранта Российского научного фонда No. 23-15-00061.

ЛИТЕРАТУРА

1. Ahima R. S. Overview of Metabolic Syndrome под ред. R. S. Ahima, Cham: Springer International Publishing, 2020. С. 1–12.
2. Barry J. C. [и др.]. Hyporesponsiveness to the anti-inflammatory action of interleukin-10 in type 2 diabetes // *Scientific Reports*. 2016. (6). С. 21244.
3. Chen X., Devaraj S. Monocytes from metabolic syndrome subjects exhibit a proinflammatory M1 phenotype // *Metabolic Syndrome and Related Disorders*. 2014. № 7 (12). С. 362–366.
4. Emre Y., Nübel T. Uncoupling protein UCP2: When mitochondrial activity meets immunity // *FEBS Letters*. 2010. № 8 (584). С. 1437–1442.
5. Guo Q. [и др.]. NF-κB in biology and targeted therapy: new insights and translational implications // *Signal Transduction and Targeted Therapy*. 2024. № 1 (9). С. 53.
6. Jialal I. [и др.]. Increased Toll-Like Receptor Activity in Patients With Metabolic Syndrome // *Diabetes Care*. 2012. № 4 (35). С. 900–904.
7. Lang L. [и др.]. Uncoupling protein 2 modulates polarization and metabolism of human primary macrophages via glycolysis and the NF-κB pathway // *Experimental and Therapeutic Medicine*. 2023. № 6 (26). С. 583.
8. Malashchenko V. V. [и др.]. Characteristics of the proinflammatory response of monocytes/macrophages in patients with metabolic syndrome, exemplified by the production of IL-6 and MCP-1 // *Russian Journal of Immunology*. 2024. № 4 (27). С. 877–882.
9. Margaryan S. [и др.]. The mRNA expression levels of uncoupling proteins 1 and 2 in mononuclear cells from patients with metabolic disorders: obesity and type 2 diabetes mellitus // *Postepy Higieny I Medycyny Doswiadczalnej (Online)*. 2017. № 0 (71). С. 895–900.
10. Moon J.-S. [и др.]. ANT2 drives proinflammatory macrophage activation in obesity // *JCI insight*. 2021. № 20 (6). С. e147033.
11. Shin M.-J. [и др.]. Circulating IL-8 levels in heart failure patients with and without metabolic syndrome // *Clinica Chimica Acta; International Journal of Clinical Chemistry*. 2009. № 1–2 (405). С. 139–142.
12. Straczkowski M. [и др.]. Plasma interleukin-8 concentrations are increased in obese subjects and related to fat mass and tumor necrosis factor-α system // *The Journal of Clinical Endocrinology and Metabolism*. 2002. № 10 (87). С. 4602–4606.
13. Subramanian N. [и др.]. Sex-specific regulation of IL-10 production in human adipose tissue in obesity // *Frontiers in Endocrinology*. 2022. (13). С. 996954.
14. Verma R. [и др.]. A network map of Interleukin-10 signaling pathway // *Journal of Cell Communication and Signaling*. 2016. № 1 (10). С. 61–67.
15. Сигнальный путь NF-κB в базе данных KEGG (hsa04064) // KEGG PATHWAY Database [Электронный ресурс]. URL: <https://www.genome.jp/kegg/pathway.html>.