

УДК 577.17.05

ПРОТЕОЛИЗ IGFBP-4 ПОД ДЕЙСТВИЕМ PAPP-A В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ НЕОНАТАЛЬНЫХ КАРДИОМИОЦИТОВ КРЫСЫ В НОРМЕ И ПРИ ГИПЕРТРОФИИ

© 2021 Д.В. Серебряная^{1*}, Д.А. Адашева¹, А.А. Конев², М.М. Артемьева³,
И.А. Катруха^{1,2}, А.Б. Постников^{1,2}, Н.А. Медведева³, А.Г. Катруха^{1,2}

¹ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра биохимии, 119234 Москва, Россия; электронная почта: dariaserebryanaya@gmail.com

² HyTest Ltd, 20520 Турку, Финляндия

³ Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра физиологии человека и животных, 119234 Москва, Россия

Поступила в редакцию 06.08.2021

После доработки 03.09.2021

Принята к публикации 03.09.2021

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются одной из главных причин смертности и инвалидизации населения в мире. Белок А плазмы крови, ассоциированный с беременностью (PAPP-A), представляет собой матричную металлопротеиназу, локализованную на поверхности клеток. Одним из субстратов PAPP-A является IGFBP-4 (insulin-like growth factor binding protein-4) – представитель семейства белков, связывающих IGF (insulin-like growth factor). Протеолиз IGFBP-4 под действием PAPP-A происходит по специфическому участку с образованием двух протеолитических фрагментов – N-концевого (NT-IGFBP-4) и C-концевого (CT-IGFBP-4) – и приводит к высвобождению IGF, который активизирует такие клеточные процессы, как миграция, пролиферация и клеточный рост. Повышенный уровень протеолитических фрагментов IGFBP-4 коррелирует с развитием осложнений и риском летального исхода у больных такими ССЗ, как ишемическая болезнь сердца, острый коронарный синдром и сердечная недостаточность. Однако в литературе нет данных, демонстрирующих PAPP-A-зависимый протеолиз IGFBP-4 в сердечной ткани в норме и при патологических состояниях. В настоящей работе на модели первичной культуры неонатальных кардиомиоцитов крысы нами было показано: 1) процесс протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A происходит в кондиционированной среде кардиомиоцитов, 2) переход кардиомиоцитов в гипертрофированное состояние сопровождается увеличением уровня PAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4. Таким образом, можно предположить, что усиление расщепления IGFBP-4 и гипертрофические изменения кардиомиоцитов, сопровождающие некоторые ССЗ, взаимосвязаны, и PAPP-A является одним из активаторов IGF-зависимых процессов в кардиомиоцитах в норме и особенно при гипертрофии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: сердечно-сосудистые заболевания, сердечная недостаточность, кардиомиоциты, первичная культура, протеолиз, PAPP-A, IGFBP-4, гипертрофия, кардиомаркер, эндотелин-1.

DOI: 10.31857/S0320972521110026

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) являются главной причиной летальных исходов и инвалидности во всем мире [1]. Сердечная недостаточность (СН) – одно из самых распространенных ССЗ, характеризующееся изменениями в работе сердца, приводящими к нарушению кровоснабжения всего ор-

ганизма. При хронической форме СН снижается способность сердечной мышцы к сокращению и развивается патологическая гипертрофия – аномальное утолщение стенки миокарда, возникающее вследствие увеличения кардиомиоцитов в размере и изменений во внеклеточном матриксе сердечной ткани [2]. Гипертрофия также сопровождает и другие ССЗ, такие как ишемическая болезнь сердца (ИБС), гипертония, а

Принятые сокращения: ИБС – ишемическая болезнь сердца; ОКС – острый коронарный синдром; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания; СН – сердечная недостаточность; ФИА – флуороиммунный анализ; ЭТС – эмбриональная телячья сыворотка; ВNP – натрийуретический пептид типа В; СТ-IGFBP-4 – С-концевой протеолитический фрагмент IGFBP-4; DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол; dPAPP-A – димерная форма PAPP-A; IGF – инсулиноподобный фактор роста; IGFBP-2–IGFBP-5 – белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста; NT-IGFBP-4 – N-концевой протеолитический фрагмент IGFBP-4; PAPP-A – ассоциированный с беременностью белок плазмы А; proMBP – предшественник основного щелочного белка эозинофилов.

* Адресат для корреспонденции.

также практически все известные на сегодняшний день типы врождённых и приобретённых пороков сердца [3].

Белок А плазмы, ассоциированный с беременностью (pregnancy associated plasma protein-A, PAPP-A), – матриксная металлопротеиназа, содержащая в активном центре ионы цинка и локализованная на поверхности клеток [4, 5]. Большая часть PAPP-A (~90%) в крови циркулирует в форме гетеротетрамера (htPAPP-A), в состав которого входят димер PAPP-A (dPAPP-A) и две субъединицы белка proMMP – предшественника основного щелочного белка эозинофилов. Тетрамерная форма PAPP-A является протеолитически неактивной [6]. Остальная часть PAPP-A, циркулирующего в крови, представлена его димерной формой, которая обладает протеолитической активностью [7]. Субстратами dPAPP-A в физиологических условиях являются белки, связывающие инсулиноподобный фактор роста: IGFBR-2 [8], IGFBR-4 [9] и IGFBR-5 [10]. Данные белки связываются с инсулиноподобным фактором роста (IGF), ингибируя его активность. В результате протеолиза комплекса IGFBR-белков с IGF под действием dPAPP-A IGF высвобождается из комплекса и активирует такие процессы, как клеточный рост, пролиферация, миграция и ангиогенез [11]. В случае IGFBR-4 PAPP-A является единственной протеазой, расщепляющей данный белок в физиологических условиях. Протеолиз IGFBR-4 под действием dPAPP-A происходит по специфическому участку, расположенному между аминокислотными остатками Met135 и Lys136, и в результате расщепления образуются два протеолитических фрагмента белка: N-концевой (NT-IGFBR-4) и C-концевой (CT-IGFBR-4) [12].

Ранее было показано, что уровень экспрессии dPAPP-A возрастает в атеросклеротической бляшке, а также, что dPAPP-A является маркером риска развития острого коронарного синдрома (ОКС) [13]. В ряде исследований было показано, что повышенный уровень протеолитических фрагментов IGFBR-4 (NT-IGFBR-4 и CT-IGFBR-4) ассоциирован с увеличением риска возникновения ОКС у пациентов с ИБС и наступлением смерти от ССЗ у больных диабетом 1-го типа [14, 15]. Недавно было обнаружено, что повышенный уровень протеолитических фрагментов IGFBR-4 в крови у больных сердечной недостаточностью – состоянием, которое может развиваться вследствие ОКС и инфаркта миокарда, также ассоциирован с повышенным риском летального исхода [16].

Несмотря на значительное количество исследований, демонстрирующих увеличение концентрации dPAPP-A и уровня протеолиза

IGFBR-4 в крови до начала развития осложнений при различных ССЗ, в литературе нет прямых доказательств протекания dPAPP-A-специфического протеолиза IGFBR-4 в миокарде в норме или при патологических состояниях. Поэтому данное исследование было проведено с целью установить взаимосвязь между dPAPP-A-специфическим протеолизом IGFBR-4 и гипертрофическими изменениями кардиомиоцитов, которые, как было упомянуто ранее, сопровождают многие ССЗ. Для исследования протеолиза IGFBR-4 в настоящей работе нами была разработана и охарактеризована клеточная модель гипертрофии, основанная на первичной культуре кардиомиоцитов крысы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Все использованные биохимические реактивы имели аналитическую чистоту и были приобретены в компаниях «Sigma-Aldrich» (США), «Thermo Fisher Scientific» (США), «ICN» (США), «AppliChem» (Германия), «Merck» (США), «Диа-М» (Россия) и «Bio-Rad» (США). Реактивы, использованные для проведения культурально-биологических работ, были приобретены в компаниях «HyClone» (США), «Sigma-Aldrich» и «Costar» (Нидерланды). Вторичные антитела, специфичные к константной части иммуноглобулинов G (Fc-фрагментам) антитела мыши, конъюгированные с флуорофором Alexa-594, а также фаллоидин, конъюгированный с флуорофором Alexa-488, и краситель DAPI (4',6-диамидино-2-фенилиндо́л), были приобретены в компании «Thermo Fisher Scientific». Моноклональные антитела, специфичные к сердечной изоформе тропонина I (19C7, MF4), IGFBR-4 и его фрагментам (IBP3, IBP180, IBP182, IBP163), рекомбинантные IGFBR-4, dPAPP-A, NT-IGFBR-4 и CT-IGFBR-4, а также эндогенный натрийуретический пептид В-типа (BNP) человека были любезно предоставлены компанией «HyTest» (Финляндия).

Получение первичной культуры кардиомиоцитов крысы. Получение первичной культуры кардиомиоцитов крысы проводили в соответствии с методикой Степановой и соавт. [17] с некоторыми модификациями. Сердца двух/трёхдневных крыс популяции Wistar очищали от соединительной ткани, крови и сосудов, помещали в охлаждённый раствор Кребса–Рингера (25 мМ NaCl, 2,5 мМ KCl, 1,25 мМ NaH₂PO₄, 2 мМ CaCl₂, 1 мМ MgCl₂, 25 мМ NaHCO₃, 25 мМ глюкоза, pH 7,4) и измельчали, после чего обрабатывали коллагеназой («Gibco», США) в концентрации 5 мг/мл, приготовленной на растворе Кребса–

Рингера, содержащем 50 мкМ CaCl_2 , в течение 10 мин при 37 °С. После инкубации ткань дополнительно разрушали, пипетируя смесь 30–40 раз, и после оседания крупных фрагментов ткани отбирали суспендированные клетки. Данную процедуру повторяли 4–5 раз до полного разрушения ткани и высвобождения клеток. Полученные суспензии клеток центрифугировали 10 мин при 200 g, осадки клеток ресуспендировали в среде для культивирования DMEM (модифицированная по способу Дульбекко среда Игла), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (ЭТС, «HyClone»). Все фракции, кроме первой и второй, объединяли и повторно центрифугировали при тех же условиях для дополнительной очистки от коллагеназы. Осадок клеток ресуспендировали в культуральной среде и инкубировали в полистирольном планшете в течение 20 мин при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 для отделения фракции примесных клеток. Суспензию неприкрепившихся клеток переносили в новый полистирольный планшет и культивировали в течение 7 дней при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 .

Определение площади кардиомиоцитов. Измерение площади кардиомиоцитов проводили с использованием программного обеспечения ImageJ (Fiji). Указывали значение масштабной шкалы в пикселях и в мкм, после чего с использованием программы рассчитывали значения площади отдельных клеток в мкм². Для каждого снимка рассчитывали площадь 15 клеток с использованием последовательности команд Analyse-Measure, затем полученные значения использовали для расчёта среднего значения площади клетки.

Определение частоты сокращений кардиомиоцитов. Частоту сокращений кардиомиоцитов определяли, фиксируя сокращение во времени в 10 точках культуры, чтобы убедиться в равномерности и регулярности сокращений, после чего проводили пересчёт на количество ударов в минуту.

Иммуноцитохимическое окрашивание клеток. Первичную культуру кардиомиоцитов и примесных клеток промывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) от компонентов среды, после чего проводили фиксацию и пермеабиллизацию мембран клеток в присутствии 4% параформальдегида и 0,1% (w/v) Triton X-100 соответственно в течение 15 мин при комнатной температуре. Затем клетки промывали несколько раз ФСБ и инкубировали в присутствии 1% ЭТС в течение 30 мин для блокирования неспецифической сорбции антител. После промывки к клеткам добавляли первичные антитела, специфичные к тропонину I, в указанных производи-

телем разведениях и инкубировали в течение ночи при 4 °С. После промывки клетки инкубировали в присутствии вторичных антител, специфичных к Fc-фрагментам антител мыши и конъюгированных с флуоресцентной меткой Alexa-594, в течение часа при комнатной температуре. Инкубации с фаллоидином, конъюгированным с флуорофором Alexa-488 и ядерным красителем DAPI, в указанных производителем разведениях также проводили в течение часа при комнатной температуре. После инкубации клетки трижды промывали ФСБ. Полученные препараты визуализировали с использованием флуоресцентного инвертированного микроскопа («EVOS FL Color», США).

Протеолитическое расщепление IGFBR-4 под действием RAPP-A в культурах клеток. Протеолиз IGFBR-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов и примесных клеток проводили по методике Laursen et al. [18] с некоторыми модификациями. Для проведения протеолиза IGFBR-4 использовали 10-кратную субстратную смесь, приготовленную на Tris-солевом буфере (20 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, pH 7,4) и содержащую 3 мкг/мл рекомбинантного IGFBR-4 человека, 0,85 мкг/мл рекомбинантного IGF-II человека («Sigma-Aldrich») и 2 мМ CaCl_2 . После приготовления субстратную смесь инкубировали 30 мин при комнатной температуре для формирования комплекса IGFBR-4 с IGF-II, после чего добавляли в кондиционированную среду к кардиомиоцитам в лунки 24-луночного планшета (по 40 мкл в лунку) и инкубировали в термостате при 37 °С в атмосфере 5% CO_2 в течение 30 мин, 3 или 24 ч. По окончании инкубации отбирали кондиционированную среду из лунок и останавливали реакцию добавлением ЭДТА до конечной концентрации 5 мМ. В полученных образцах кондиционированной среды проводили измерение концентраций NT-IGFBR-4, CT-IGFBR-4 и BNP методом флуороиммунного анализа «сэндвич»-типа, как описано ниже. Полученные значения концентраций NT-IGFBR-4, CT-IGFBR-4 и BNP нормировали на количество клеток в каждой лунке. Для определения количества клеток культуру кардиомиоцитов в каждой лунке трипсинизировали с использованием 0,25%-ного раствора трипсин-ЭДТА и проводили подсчёт клеток в камере Горяева с использованием раствора трипанового синего.

Детекция NT-IGFBR-4, CT-IGFBR-4 и BNP методом одностадийного флуороиммунного анализа «сэндвич»-типа (ФИА). Концентрации NT-IGFBR-4 и CT-IGFBR-4 в культуральных средах определяли методом неопитоп-специфичного флуороиммунного анализа «сэндвич»-типа с использованием пар антител IBP3-IBP180Eu³⁺

(определение концентрации NT-IGFBP-4) и IBP182-IBP163Eu³⁺ (определение концентрации СТ-IGFBP-4), как описано Konev et al. [15]. Концентрацию BNP определяли аналогичным методом с использованием пары антител 24C5-AbBNP2Eu³⁺, как описано в статье Semenov et al. [19]. Для проведения ФИА антитела подложки (20 мкг/мл, 0,1 мл/лунка в ФСБ) сорбировали на поверхность лунок 96-луночного полистирольного планшета при перемешивании в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем лунки промывали 10 мМ Tris-HCl, 150 мМ NaCl, 0,025% (v/v) Tween 20 и 0,05% NaN₃, pH 7,8 (буфер А). После этого в каждую лунку планшета вносили 0,05 мл образца, разведённого в буфере для анализа (50 мМ Tris-HCl, 0,9% NaCl, 0,01% (v/v) Tween 40, 0,5% бычьего сывороточного альбумина, 0,05% NaN₃, pH 7,7) и 0,05 мл детекторных антител (4 мкг/мл), конъюгированных со стабильным хелатом европия (Eu³⁺). Планшеты инкубировали 30 мин при комнатной температуре при постоянном перемешивании. После промывания буфером А в лунки планшета вносили по 0,2 мл раствора для усиления флуоресценции и затем детектировали флуоресценцию на планшетном анализаторе Victor X («Perkin Elmer», США).

Индукция гипертрофии в культурах кардиомиоцитов под действием эндотелина-1. Перед проведением эксперимента в лунках с клетками проводили смену культуральной среды на DMEM, содержащую 1% ЭТС. В лунки с кардиомиоцита-

ми вносили водный раствор эндотелина-1 («Sigma-Aldrich») в диапазоне концентраций 20–100 нМ. В контрольные лунки добавляли воду. Инкубировали клетки с эндотелином-1 в течение 24 и 48 ч при 37 °С в атмосфере 5% CO₂. О наличии гипертрофии судили по увеличению площади поверхности кардиомиоцитов (см. раздел «Определение площади кардиомиоцитов»), инкубированных с эндотелином-1 по сравнению с контрольными кардиомиоцитами.

Статистическую обработку результатов измерений площади кардиомиоцитов и концентраций NT-IGFBP-4, СТ-IGFBP-4 и BNP в норме и при гипертрофии проводили, используя *t*-критерий Стьюдента. Данные представлены как среднее значение ± квадратичное отклонение. Различия считали достоверными при *p* ≤ 0,05.

РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЙ

Получение первичной культуры кардиомиоцитов из неонатальных крыс и ее характеристика. Через 4 дня после выделения клеточная культура, полученная из сердец неонатальных крыс, приобретала соответствующий кардиомиоцитам фенотип (рис. 1, *a*) и демонстрировала сокращение с частотой ~11 ударов/мин. С 4 по 7 день культивирования кардиомиоцитов частота сокращения не менялась. Процентное содержание кардиомиоцитов в полученной культуре определяли иммуноцитохимически, проводя

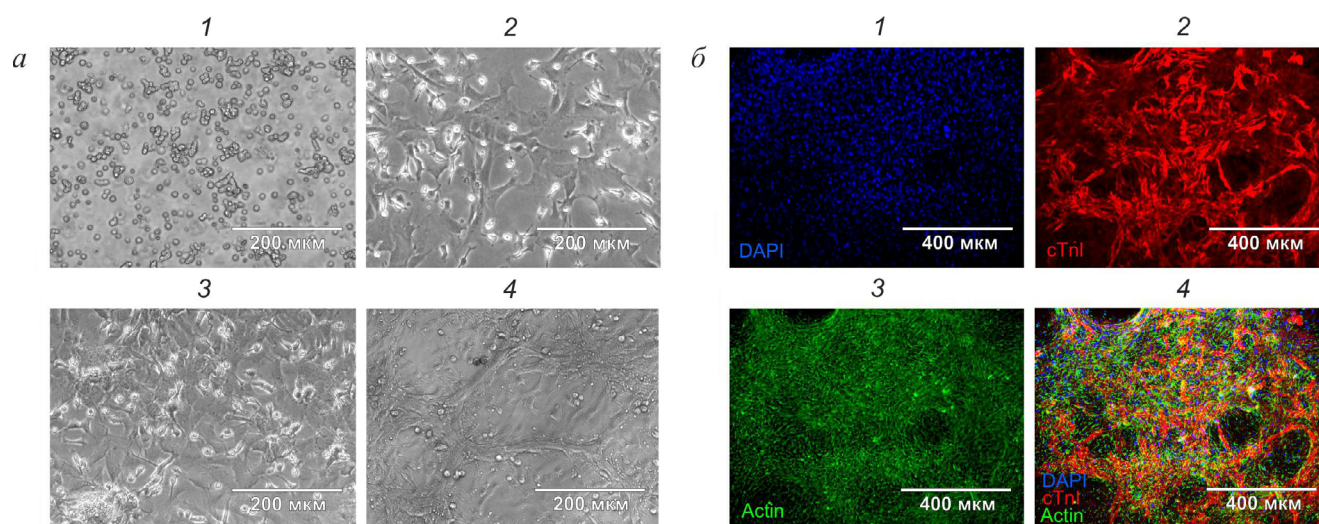


Рис. 1. Характеристика типичной первичной культуры кардиомиоцитов крысы. *a* – Микрофотографии кардиомиоцитов, сделанные в режиме фазового контраста в процессе культивирования культуры в определенные промежутки времени: 1 – 1 день; 2 – 4 дня; 3 – 6 дней; 4 – 7 дней. *б* – Иммунофлуоресцентное окрашивание полученной культуры (7 дней) с использованием: флуоресцентного ядерного красителя DAPI (1); антител, специфичных к сердечной изоформе тропонина I человека, конъюгированных с флуоресцентной меткой Alexa-594 (2); фаллоидина, конъюгированного с флуоресцентной меткой Alexa-488 (3); наложение фотографий, сделанных в трёх флуоресцентных каналах при одинаковом увеличении (4)

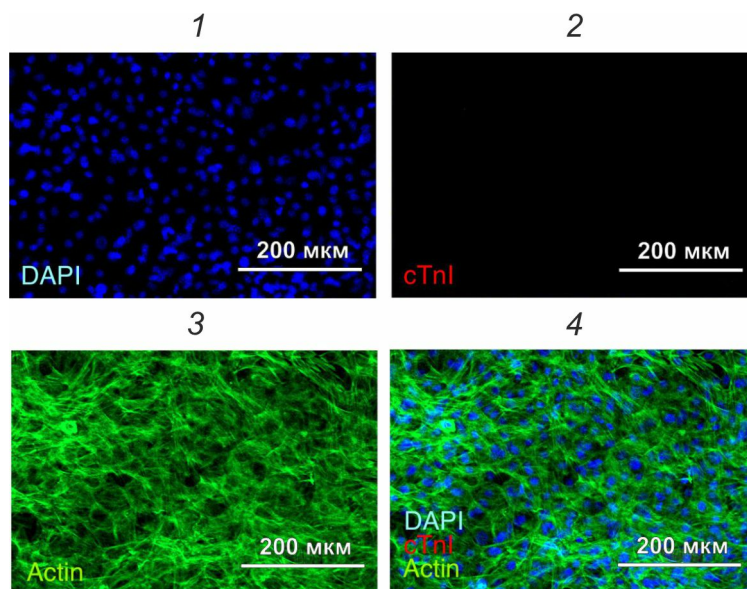


Рис. 2. Иммунофлуоресцентное окрашивание культуры примесных клеток с использованием: флуоресцентного ядерного красителя DAPI (1); антител, специфичных к сердечной изоформе тропонина I человека, конъюгированных с флуоресцентной меткой Alexa-594 (2); фаллоидина, конъюгированного с флуоресцентной меткой Alexa-488 (3); наложение фотографий, сделанных в трёх флуоресцентных каналах при одинаковом увеличении (4)

окрашивание моноклональными антителами, специфичными к сердечной изоформе тропонина I (специфическому маркеру кардиомиоцитов), и рассчитывая отношение клеток с детектированным тропонином I к общему числу клеток для каждого снимка. Количество кардиомиоцитов в полученных культурах составило 70–90% (рис. 1, б).

Остальные 10–30% клеток в полученных культурах, по всей видимости, были представлены примесными клетками, содержащимися в сердечной ткани. Для того чтобы в дальнейшем оценить суммарный вклад этих клеток в dPAPP-A-специфическую протеолитическую деградацию IGFBP-4 в сравнении с кардиомиоцитами, в ходе выделения мы также получили и охарактеризовали изолированную культуру примесных клеток, не содержащую кардиомиоциты (рис. 2). Получение культуры примесных клеток проводили, как описано в разделе «Материалы и методы». Результаты иммунофлуоресцентного окрашивания культуры примесных клеток представлены на рис. 2.

dPAPP-A-специфический протеолиз IGFBP-4 в первичной культуре кардиомиоцитов крысы. Известно, что dPAPP-A расщепляет IGFBP-4 в кондиционированной среде фибробластов [12] и фолликулярной жидкости яичника человека [20], быка, свиньи и лошади [21], а также секретируется в среду такими типами клеток, как гранулезные клетки [22], гладкомышечные

клетки сосудов [23], клетки стромы эндометрия [24], адипоциты сердечной ткани [25], клетки эндотелия коронарной артерии человека [26] и клетки-предшественники сердца человека [27]. В качестве модели для исследования протеолиза IGFBP-4 в сердечной ткани в нашей работе мы использовали первичную культуру кардиомиоцитов крысы, содержание кардиомиоцитов в которой составляло 70–90%. Протеолитическое расщепление IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов и определение концентраций NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 проводили, как описано в разделе «Материалы и методы». Как видно на рис. 3, NT-IGFBP-4 (рис. 3, а) и CT-IGFBP-4 (рис. 3, б) образуются в ходе протеолиза IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов.

Концентрации фрагментов IGFBP-4 в кондиционированной среде (рис. 3, кривая 2) через 1, 3 и 24 ч после начала реакции протеолиза составляли $5,3 \pm 4,2$ нг/мл, $50,1 \pm 8,1$ нг/мл и $98,3 \pm 12,2$ нг/мл (NT-IGFBP-4) и $4,9 \pm 4,2$ нг/мл, $43,1 \pm 8,3$ нг/мл и $95,9 \pm 15,4$ нг/мл (CT-IGFBP-4), т.е. концентрация фрагментов IGFBP-4 в кондиционированной среде увеличивалась во времени, в то время как в образцах стерильной культуральной среды образования фрагментов обнаружено не было (рис. 3, кривая 4). Также NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 не были обнаружены в кондиционированной среде кардиомиоцитов в нулевой момент протеолитической реак-

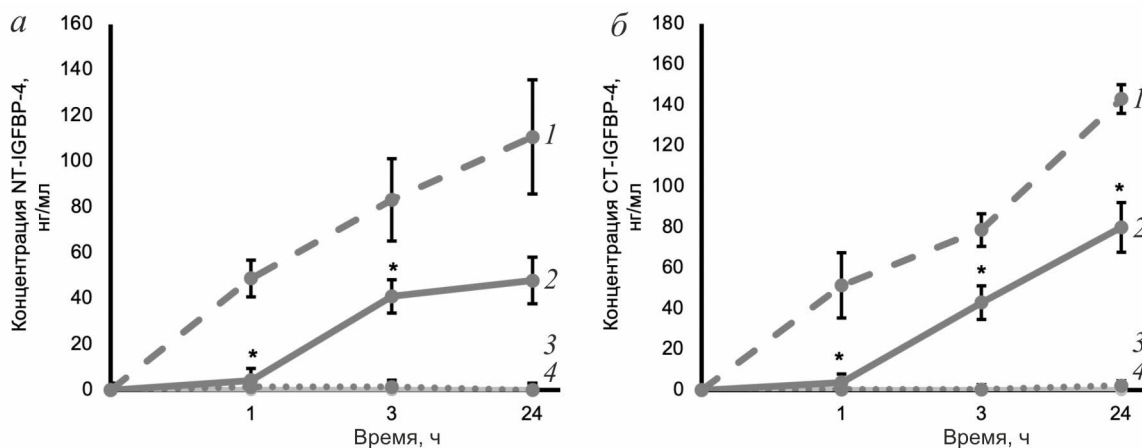


Рис. 3. Динамика образования NT-IGFBP-4 (а) и СТ-IGFBP-4 (б) в ходе протеолитической реакции IGFBP-4 в течение 1, 3 и 24 ч. Стерильная среда DMEM, проинкубированная с субстратной смесью в присутствии рекомбинантного dPAPP-A (кривая 1, пунктирная линия); кондиционированная клеточная среда, проинкубированная с субстратной смесью в присутствии первичной культуры кардиомиоцитов крысы (кривая 2, серая сплошная линия); стерильная среда DMEM проинкубированная с субстратной смесью (кривая 3, линия из точек); стерильная среда DMEM, проинкубированная аналогичные промежутки времени (кривая 4, светло-серая сплошная линия); $n = 12$, $* p < 0,05$

ции. После инкубации стерильной среды DMEM с субстратной смесью в течение аналогичных промежутков времени образования NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 не было выявлено (рис. 3, кривая 3). При этом при проведении протеолитической реакции в стерильной среде (рис. 3, кривая 1) в присутствии 500 нг/мл добавленного экзогенно dPAPP-A концентрации NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4, определенные методом ФИА, через 1, 3 и 24 ч, были в 2 раза выше, чем при отсутствии PAPP-A, что говорит о том, что dPAPP-A проявляет протеолитические свойства в данной среде, и данная модель подходит для изучения протеолиза IGFBP-4 под действием dPAPP-A.

Однако, как уже упоминалось ранее, dPAPP-A и фрагменты IGFBP-4 обнаруживаются в культуральной среде фибробластов человека [12] и эндотелиальных клетках коронарной артерии человека [26]. Данные типы клеток широко представлены в сердечной ткани [28] и могут соочищаться при выделении культуры кардиомиоцитов из сердца, т.е. входить во фракцию примесных клеток. Следовательно, можно ожидать, что кардиофибробласты и эндотелиальные клетки, присутствующие в полученной культуре кардиомиоцитов в количестве 10–30% от общего числа клеток, потенциально могут вносить вклад в наблюдаемую нами протеолитическую деградацию IGFBP-4. Для вычисления вклада dPAPP-A, секретируемого примесными клетками, в итоговый уровень протеолиза IGFBP-4 мы измерили концентрации NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 в кондиционированной среде изолированной культуры примесных клеток, которую

получили и охарактеризовали ранее (рис. 4), и сравнили полученные значения со значениями концентраций NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 в кондиционированной среде культуры с 70%-ным содержанием кардиомиоцитов, специально полученной для решения этой задачи.

Как видно из представленных результатов, в случае культуры примесных клеток (рис. 4) наблюдается накопление NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 в кондиционированной среде. Концентрации NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 в культуре примесных клеток через 3 и 24 ч после начала протеолитической реакции составили 20 и 60 нг/мл и 5 и 50 нг/мл соответственно. В случае культуры кардиомиоцитов уровень наблюдае-

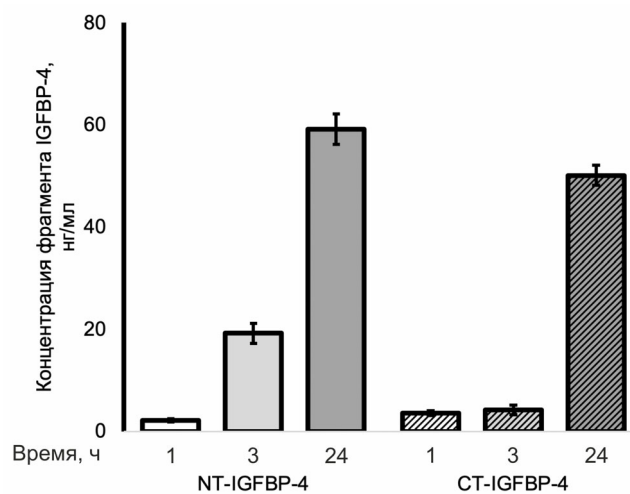


Рис. 4. Накопление NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 в кондиционированной среде культуры примесных клеток; $n = 3$

мого нами dPAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 оказался приблизительно в 2,5–3 раза выше по сравнению с фракцией примесных клеток: концентрации NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 составляют 60 и 150 нг/мл и 20 и 110 нг/мл соответственно.

Далее, используя результаты иммунофлуоресцентного окрашивания и учитывая концентрации NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 в кондиционированной среде обеих культур, мы рассчитали вклад фракции примесных клеток в протеолитическую деградацию IGFBP-4 в полученной культуре кардиомиоцитов. В том случае, когда культура кардиомиоцитов имеет 70%-ную чистоту (содержит 30% примесных клеток), концентрации NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4, которые образуются в результате секреции PAPP-A примесными клетками, будут в 3,3 раза ниже, чем в кондиционированной среде культуры, состоящей на 100% из примесных клеток. Таким образом, вклад протеолитической деградации IGFBP-4, осуществляемый dPAPP-A, секретиремого примесными клетками, в итоговые концентрации NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 во всех случаях составляет преимущественно 10–13%. Следовательно, можно ожидать, что в случае культуры кардиомиоцитов, имеющей чистоту 90%, вклад примесных клеток в итоговый уровень dPAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 будет ещё ниже и составит 3–4%. Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что наблюдаемый нами dPAPP-A-специфичный протеолиз IGFBP-4 в основном ассоциирован с кардиомиоцитами, а не с примесными клетками.

Известно, что специфический протеолиз IGFBP-4 под действием dPAPP-A может проис-

ходить преимущественно в условиях, когда IGFBP-4 находится в комплексе с IGF-II [29, 30]. Как видно на рис. 5, проведение протеолитической реакции IGFBP-4 в присутствии IGF-II (рис. 5, а и б; кривая 1) приводит к возрастанию концентраций NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов в 3–4 раза по сравнению с их концентрациями, определенными после проведения протеолиза в аналогичных условиях, но при отсутствии IGF-II (рис. 5, а и б; кривая 2).

Таким образом, суммируя полученные результаты, представленные на рис. 3–5, можно заключить: 1) протеолиз IGFBP-4 происходит в кондиционированной среде первичной культуры кардиомиоцитов и преимущественно ассоциирован именно с кардиомиоцитами, а не с примесными клетками; 2) детекция NT-IGFBP-4 и СТ-IGFBP-4 с использованием антител, специфичных к неоэпиту, образующемуся в результате специфического расщепления IGFBP-4 под действием dPAPP-A, а также необходимость IGF-II для реализации наблюдаемого протеолиза позволяют предположить, что протеолиз IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов происходит под действием PAPP-A.

Моделирование гипертрофического ответа кардиомиоцитов крысы под действием эндотелина-1. Первичная культура кардиомиоцитов хорошо известна как *in vitro* модель для исследования механизмов гипертрофии сердечной ткани [31–33]. Одним из методов индукции гипертрофии является длительная (более 24 ч) инкубация кардиомиоцитов в присутствии эндотелина-1 в диапазоне концентраций 10–100 нМ [34–37].

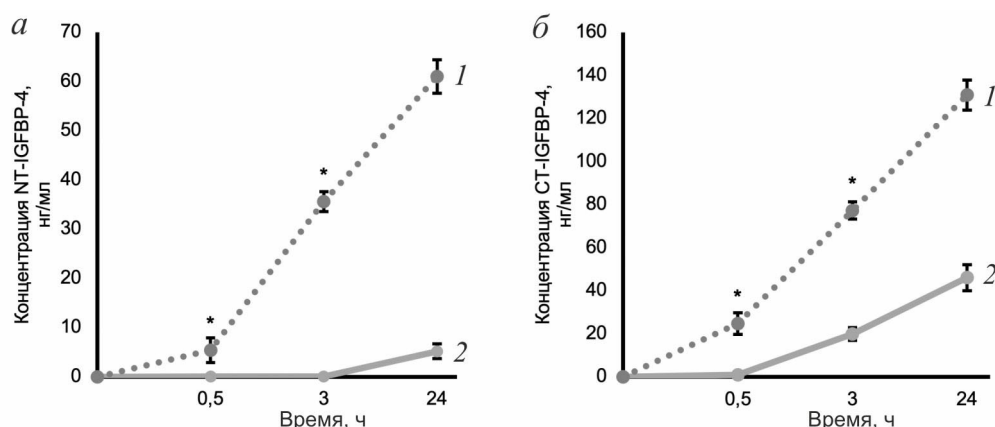


Рис. 5. Образование NT-IGFBP-4 (а) и СТ-IGFBP-4 (б) в ходе протеолитического расщепления IGFBP-4 в кондиционированной среде первичной культуры кардиомиоцитов в присутствии (кривая 1, линия из точек) и при отсутствии IGF-II (кривая 2, сплошная линия). Данные представлены как среднее значение \pm квадратичное отклонение; $n = 3$, $*p < 0,05$ по сравнению с контролем без IGF-II

a

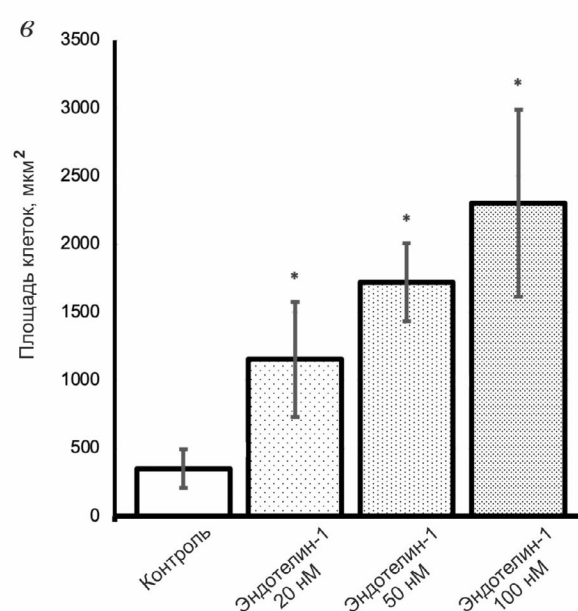
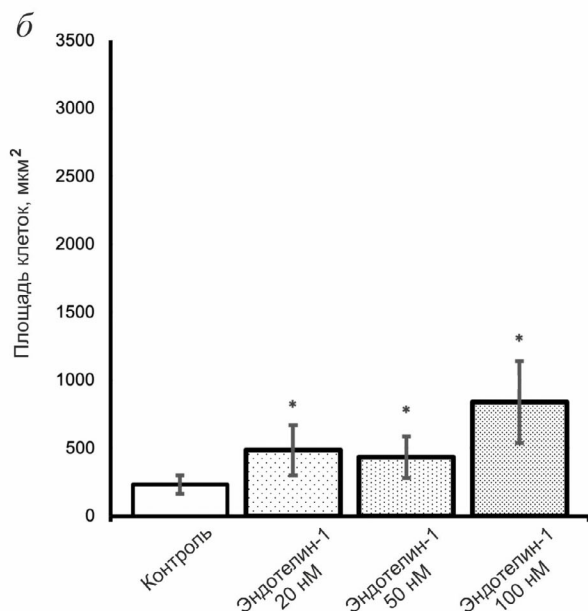
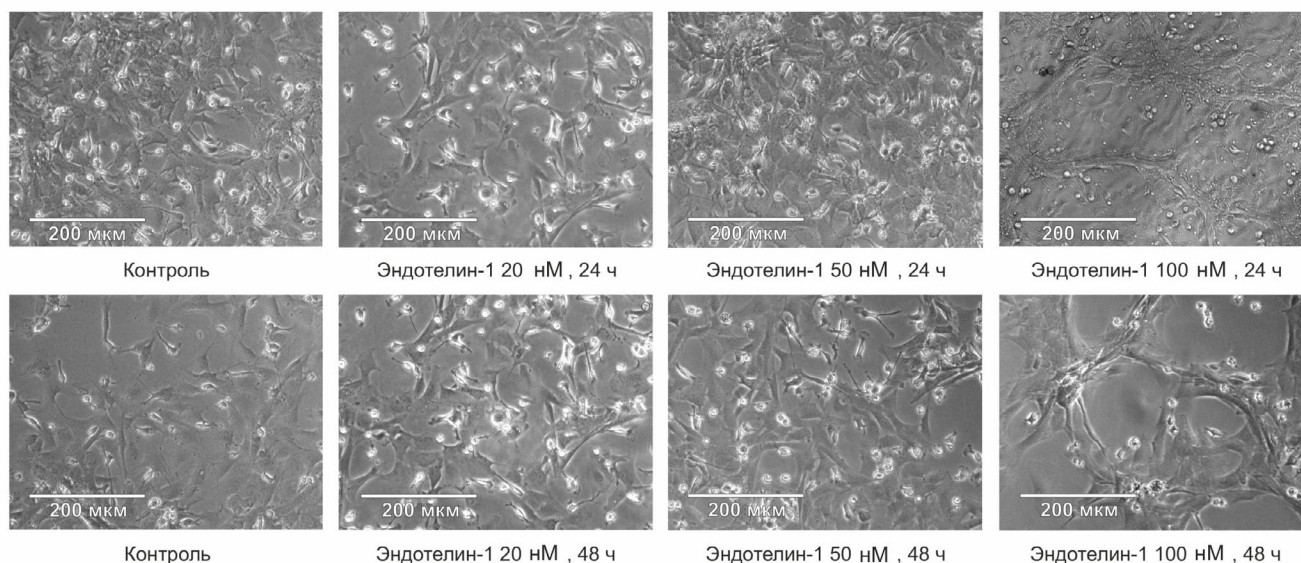


Рис. 6. Индукция гипертрофии в первичной культуре кардиомиоцитов крысы под действием эндотелина-1. *a* – Фотографии кардиомиоцитов после инкубации с различными концентрациями эндотелина-1, сделанные в режиме фазового контраста; *б* – зависимость площади кардиомиоцитов от концентрации эндотелина-1 при инкубации в течение 24 ч; *в* – зависимость площади кардиомиоцитов от концентрации эндотелина-1 при инкубации в течение 48 ч; *n* = 15, * *p* < 0,05 по сравнению с контролем без эндотелина

Как видно из результатов (рис. 6), площадь поверхности кардиомиоцитов после инкубации в культуральной среде, содержащей 20, 50 и 100 нМ эндотелина-1, в течение 24 ч (рис. 6, *б*) и 48 ч (рис. 6, *в*) 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 площадью контрольных кардиомиоцитов (культивированных без добавления эндотелина-1).

Мы также обнаружили, что после инкубации кардиомиоцитов с эндотелином-1 в концентра-

ции 20 нМ в кондиционированной среде наблюдается повышенное по сравнению с контрольными клетками содержание маркера сердечной недостаточности – натрийуретического пептида типа В (BNP) (рис. 7).

Кардиомиоциты инкубировали 24 и 48 ч в присутствии или при отсутствии 20 нМ эндотелина-1, после чего определяли концентрацию BNP в культуральных средах методом флуориммунного анализа «сэндвич»-типа с использованием антител, специфичных к BNP. Из пред-

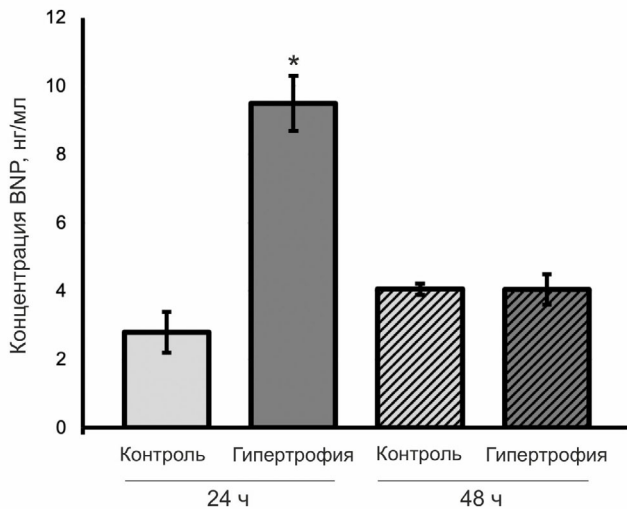


Рис. 7. Концентрация BNP в кондиционированной среде первичной культуры кардиомиоцитов после инкубации с эндотелином-1 в концентрации 20 нМ. В кондиционированную среду контрольных клеток добавляли воду; $n = 5$, * $p < 0,05$

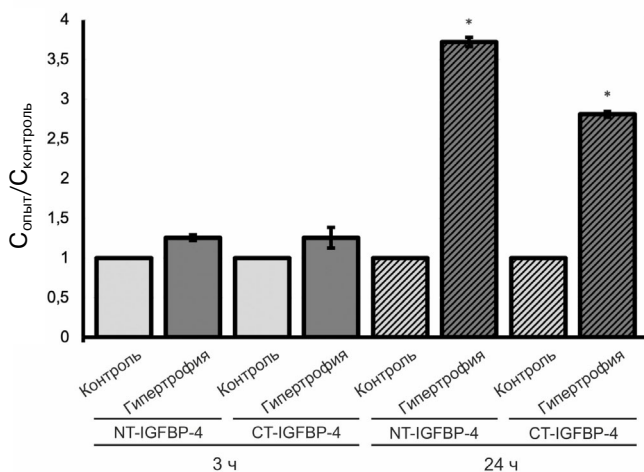


Рис. 8. Концентрация NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 в кондиционированной среде первичной культуры кардиомиоцитов крысы в норме и при гипертрофии. Отношение $C_{\text{опыт}}/C_{\text{контроль}}$ соответствует отношению концентраций фрагментов IGFBP-4, измеренных в кондиционированной среде гипертрофированных кардиомиоцитов ($C_{\text{опыт}}$) и контрольных кардиомиоцитов ($C_{\text{контроль}}$); $n = 7$, * $p < 0,05$

ставленных результатов видно, что после 24-часовой инкубации с эндотелином-1 концентрация BNP в гипертрофированной культуре в 3 раза превышает концентрацию BNP в кондиционированной среде контрольных клеток (рис. 7). Следует отметить, что инкубация кардиомиоцитов с аналогичной концентрацией эндотелина-1 в течение 48 ч не приводит к увеличению концентрации BNP в кондиционированной среде. Мы

связываем это с цитотоксическим влиянием эндотелина-1 при длительных инкубациях. Этот эффект не был напрямую нами исследован, однако при подсчёте клеток после каждого эксперимента мы наблюдали значительное уменьшение количества жизнеспособных кардиомиоцитов в культуре, инкубированной с эндотелином-1 по сравнению с контрольными клетками.

Таким образом, инкубация первичной культуры кардиомиоцитов в присутствии эндотелина-1 в концентрации 20 нМ в течение 24 ч подходит для моделирования гипертрофического ответа кардиомиоцитов, и дальнейшие исследования мы проводили при этой концентрации эндотелина-1.

Исследование протеолиза IGFBP-4 в первичной культуре кардиомиоцитов при гипертрофии. Чтобы исследовать, связано ли увеличение концентраций фрагментов IGFBP-4 с гипертрофическим ответом кардиомиоцитов, мы измерили концентрацию протеолитических фрагментов IGFBP-4 в культуре кардиомиоцитов при гипертрофии. Концентрации NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4, измеренные после протеолиза IGFBP-4, проведённого в течение 3 и 24 ч в кондиционированной среде гипертрофированных кардиомиоцитов, превышали значения концентраций фрагментов в контрольных клетках в 1,2 и 3,7 раза для NT-IGFBP-4 и в 1,2 и 2,8 раза — для CT-IGFBP-4 соответственно (рис. 8).

Однако из данных литературы известно, что инкубация в течение 24–48 ч в присутствии эндотелина-1 в концентрации 10–100 нМ приводит к активации пролиферации кардиофибробластов [38]. Поскольку кардиофибробласты с

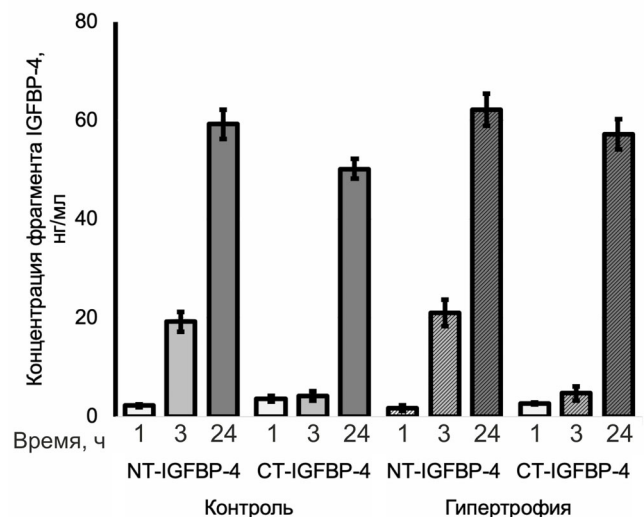


Рис. 9. Концентрация NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 в кондиционированной среде культуры примесных клеток при гипертрофии; $n = 3$

высокой вероятностью присутствуют во фракции примесных клеток, это может способствовать усилению PAPP-A-специфичной деградации IGFBP-4, не связанной с кардиомиоцитами. Для того чтобы проверить, как влияет инкубация с эндотелином-1 на количество примесных клеток, мы провели подсчёт примесных клеток до и после 24-часовой инкубации с 20 нМ эндотелином-1. Мы обнаружили, что после инкубации изолированной культуры примесных клеток с эндотелином-1 наблюдается увеличение их количества в 1,5 раза, что согласуется с литературными данными о стимулирующем эффекте эндотелина-1 на пролиферацию кардиофибробластов. Далее мы определили уровень dPAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 в кондиционированной среде до и после инкубации культуры примесных клеток с 20 нМ эндотелином-1 в течение 24 ч (рис. 9).

Из представленных результатов видно, что в случае примесной клеточной фракции инкубация с эндотелином-1 не приводила к статистически достоверному изменению уровня dPAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4. Полученные результаты подтверждают тот факт, что усиление протеолитической деградации IGFBP-4 под действием dPAPP-A при гипертрофии ассоциировано именно с кардиомиоцитами, а не с примесными клетками.

Таким образом, в используемой модели при гипертрофическом ответе кардиомиоцитов крысы наблюдается увеличение уровня протеолиза IGFBP-4 по сравнению с контрольными клетками.

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Исследование прогностических маркёров ССЗ и установление причин, приводящих к возрастанию их концентраций в крови при развитии различных патологических состояний, является важной задачей как с фундаментальной научной, так и с прикладной биомедицинской точек зрения. В нашей работе мы исследовали механизмы, приводящие к увеличению в крови концентраций фрагментов IGFBP-4 – прогностических маркёров развития таких ССЗ, как СН, ишемическая болезнь сердца и острый коронарный синдром [13–16], а также ассоциированных с повышенным риском смертности после перенесенного инфаркта миокарда и при острой сердечной недостаточности [39]. Настоящее исследование было посвящено установлению взаимосвязи между уровнем протеолиза IGFBP-4 под действием PAPP-A в кардиомиоцитах и их гипертрофическими изменениями, которые

сопровождает различные ССЗ. В нашей работе мы впервые продемонстрировали на модели первичной культуры кардиомиоцитов крысы, что dPAPP-A-специфичный протеолиз IGFBP-4 протекает в кондиционированной среде кардиомиоцитов. Мы также провели моделирование гипертрофического ответа кардиомиоцитов и впервые установили, что гипертрофические изменения кардиомиоцитов приводят к повышению уровня протеолиза IGFBP-4 по сравнению с контрольными негипертрофированными кардиомиоцитами.

Из литературных данных известно, что протеолиз IGFBP-4 под действием PAPP-A протекает в кондиционированной среде различных клеточных линий [12, 21–27]. Однако на сегодняшний день в литературе нет данных о том, происходит ли протеолитическая деградация IGFBP-4 под действием PAPP-A в кондиционированной среде кардиомиоцитов. В качестве модели для исследования протеолиза IGFBP-4 в кардиомиоцитах мы использовали первичную культуру кардиомиоцитов неонатальных крыс, которая широко применяется для изучения различных процессов, протекающих в миокарде [31–33, 40–42]. Несомненным преимуществом данной модельной системы является её приближённость по физиологическим свойствам к ткани сердечной мышцы. Однако использование такой культуры сопряжено с рядом сложностей, главной из которых является её гетерогенность (содержание кардиомиоцитов в ней составляет 70–90%, остальная часть клеток представлена кардиофибробластами и клетками эндотелия). Контаминация культуры кардиомиоцитов другими типами клеток сердечной ткани может вносить свой вклад в изучаемые молекулярные механизмы, влияя на исход эксперимента. Нам удалось впервые провести протеолитическое расщепление IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов и детектировать NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 с использованием пар антител, специфичных к неопептопам, образующимся на N- и C-фрагментах в результате протеолиза IGFBP-4 под действием dPAPP-A. Из литературных данных известно, что фибробласты и эндотелиальные клетки способны секретировать dPAPP-A [12, 26], следовательно, присутствие таких типов клеток в итоговой первичной культуре кардиомиоцитов может влиять на наблюдаемую нами протеолитическую деградацию IGFBP-4. В связи с этим мы оценили вклад суммарной фракции примесных клеток в dPAPP-A-специфичную деградацию IGFBP-4, наблюдаемую нами в первичной культуре кардиомиоцитов, который составил примерно 10–13% от общего уровня итогового про-

теолиза IGFBP-4 в случае культуры кардиомиоцитов 70%-ной чистоты. В случае, когда чистота культуры кардиомиоцитов достигала 90%, можно предположить, что вклад суммарной фракции примесных клеток в dPAPP-A-специфичную деградацию IGFBP-4 будет составлять 3–4%. Таким образом, мы впервые продемонстрировали, что PAPP-A-специфичный протеолиз IGFBP-4 протекает в первичной культуре неонатальных кардиомиоцитов крысы, и он ассоциирован преимущественно с кардиомиоцитами, а не с примесными клетками. Интересным фактом является то, что динамика накопления NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 в кондиционированных средах кардиомиоцитов и примесных клеток различается. Вероятно, это связано с тем, что состав кондиционированных сред в случае обеих культур, которые представлены данными типами клеток, также может быть разным. Кондиционированные среды кардиомиоцитов и примесных клеток могут содержать компоненты (например, различные протеазы), которые могут по-разному влиять на стабильность NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 (особенно при длительных инкубациях) и, как следствие, на их детекцию с использованием ФИА «сэндвич»-типа. Мы также обнаружили, что для реализации протеолиза IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов необходимо присутствие IGF-II, что согласуется с данными литературы [29, 30]. Таким образом, мы впервые показали возможность протекания dPAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 в первичной культуре кардиомиоцитов крысы в норме и доказали, что наблюдаемая нами PAPP-A-специфичная деградация IGFBP-4 ассоциирована именно с кардиомиоцитами, а не примесными клетками, что является новыми данными, не представленными в литературе. Основываясь на литературных данных [4, 7, 27], можно предположить, что расщепление IGFBP-4 под действием dPAPP-A будет приводить к разрушению комплекса IGFBP-4 с IGF, высвобождению IGF и активации в миокарде таких процессов, как пролиферация, миграция и клеточный рост. Регенеративные свойства IGF хорошо изучены и описаны для широкого спектра клеточных линий и активно используются для терапии различных заболеваний [43–45]. Следовательно, по аналогии с предыдущими исследованиями можно ожидать, что высвобождение IGF в результате dPAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 может быть важным механизмом для поддержания жизнеспособности кардиомиоцитов в норме.

В значительном количестве исследований было показано, что экспрессия dPAPP-A и повышенный уровень протеолиза IGFBP-4 ассо-

циированы с риском развития таких ССЗ, как ИБС и ОКС, а также риском смертности у пациентов после перенесенного инфаркта миокарда и при острой СН [13–16, 39], однако механизмы, лежащие в основе этих явлений, не исследованы. В этой связи важно было изучить возможные причины увеличения уровня протеолиза IGFBP-4 при ССЗ. В настоящем исследовании мы предположили, что одним из факторов, способствующих увеличению уровня протеолиза IGFBP-4, может быть гипертрофическое изменение сердечной мышцы, выражающееся в увеличении размеров кардиомиоцитов и ускорении в них белкового синтеза в ответ на физиологические или патологические стимулы. В нашей работе нам удалось смоделировать гипертрофический ответ на первичной культуре кардиомиоцитов крысы с использованием эндотелина-1. Данный подход хорошо описан в ряде исследований [35–37]. После 24-часовой инкубации с 20 нМ эндотелином-1 кардиомиоциты существенно увеличивались в размерах и демонстрировали значительное увеличение секреции маркера гипертрофии BNP, что согласуется с данными, описанными в литературе [36, 37]. Измерив концентрации NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 в кондиционированной среде кардиомиоцитов после индукции гипертрофии, мы обнаружили, что уровень протеолиза IGFBP-4 в кондиционированной среде гипертрофированной культуры в несколько раз превышает таковой в контрольных негипертрофированных кардиомиоцитах. При этом в условиях индукции гипертрофии (инкубация с 20 нМ эндотелином-1 в течение 24 ч) в культуре кардиомиоцитов хоть и наблюдается увеличение общего количества примесных клеток в 1,5 раза, усиления PAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 при этом не происходит. Таким образом, повышение уровня PAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 при гипертрофии связано исключительно с гипертрофическими изменениями кардиомиоцитов, а не с воздействием эндотелина-1 на примесные клетки, содержащиеся в используемой культуре. Эти данные впервые позволяют обозначить взаимосвязь между возрастанием концентраций NT-IGFBP-4 и CT-IGFBP-4 и гипертрофическими изменениями кардиомиоцитов, которые, как упоминалось выше, сопровождают многие ССЗ и проясняют функцию dPAPP-A в миокарде в норме и при его гипертрофических изменениях. По всей видимости, усиление dPAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 при гипертрофии будет приводить к повышенной по сравнению с нормой активации IGF. Данные о функциях IGF при патологиях миокарда достаточно противоречивы. С одной стороны, в ряде

исследований подробно описаны кардиопротекторные свойства IGF при различных сердечно-сосудистых патологиях, в том числе и при гипертрофии [46–49]. В 2009 г. Vinciguerra et al. [46] продемонстрировали, что гиперэкспрессия IGF-I в неонатальных кардиомиоцитах, переведённых в гипертрофированное состояние, повышает экспрессию кардиопротекторных генов (генов, экспрессия которых ассоциирована с низкой вероятностью возникновения ССЗ), таких, как гены адипонектина, разобщающего белка 1 (UCP-1) и металлотионеина 2. В 2018 г. Yeves et al. [47] продемонстрировали, что IGF-1 обладает кардиопротекторным действием на модели спонтанно гипертензивных крыс. В исследованиях, проведённых Sui et al. [48] и Lin et al. [49], гиперэкспрессия IGF-II и IGF-I соответственно улучшала функцию сердца после инфаркта миокарда у мышей. С другой стороны, в ряде исследований, напротив, показано, что IGF является индуктором патологической гипертрофии кардиомиоцитов [50–53], т.е. можно предположить, что его высвобождение в результате dPAPP-A-специфичного протеолиза IGFBP-4 при гипертрофии будет приводить к ещё большему развитию гипертрофии. Таким образом, обнаруженное нами усиление dPAPP-A-зависимого протеолиза и, как следствие, возможное высвобождение IGF при гипертрофических изменениях кардиомиоцитов может, с одной стороны, представлять собой потенциальный механизм для компенсации негативных воздействий на клеточные процессы, вызванные гипертрофией, а с другой стороны, напротив, усиливать гипертрофические изменения. Очевидно, что данная проблема требует дальнейшего изучения.

Таким образом, результаты, полученные в настоящей работе, свидетельствуют о протекании процессов dPAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 в кардиомиоцитах в норме и их активизации в гипертрофированной ткани. Во-первых, это позволяет предположить, что в сердечной ткани в норме биодоступность IGF зави-

сит от экспрессии и ферментативной активности PAPP-A, что может играть роль в регуляции жизнеспособности кардиомиоцитов. Во-вторых, усиление dPAPP-A-зависимого протеолиза IGFBP-4 и, как следствие, высвобождения IGF при гипертрофии может быть как механизмом для компенсации негативных воздействий на клеточные процессы, вызванные гипертрофическими изменениями, так и стимулировать эти изменения. И, наконец, результаты данной работы позволяют установить взаимосвязь между увеличением уровня протеолиза IGFBP-4 под действием dPAPP-A и гипертрофическими изменениями кардиомиоцитов, сопровождающимися некоторыми ССЗ, которая раньше не была исследована, и частично проясняют роль dPAPP-A в миокарде в норме и при его патологических изменениях. Активация dPAPP-A-зависимого протеолитического расщепления IGFBP-4 при гипертрофии кардиомиоцитов открывает возможности для исследования не изученных ранее механизмов развития различных ССЗ.

Благодарности. Авторы выражают искреннюю признательность д.б.н. профессору Н.Б. Гусеву и В.Е. Адашеву за ценные замечания и комментарии, которые позволили существенно улучшить рукопись.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Все применимые международные, национальные и/или институциональные принципы ухода и использования животных были соблюдены. В частности, все эксперименты с животными проводили с соблюдением этических норм, согласно «Правилам проведения работ с использованием экспериментальных животных», утвержденным директивой Евросоюза 2010/63/EU. Эксперименты были одобрены Комиссией по биоэтике МГУ имени М.В. Ломоносова. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bhatnagar, P., Wickramasinghe, K., Williams, J., Rayner, M., and Townsend, N. (2015) The epidemiology of cardiovascular disease in the UK 2014, *Heart*, **101**, 1182-1189, doi: 10.1136/heartjnl-2015-307516.
2. Rame, J. E., and Dries, D. L. (2007) Heart failure and cardiac hypertrophy, *Curr. Treat. Options Cardiovasc. Med.*, **9**, 289-301, doi: 10.1007/s11936-007-0024-3.
3. Shimizu, I., and Minamino, T. (2016) Physiological and pathological cardiac hypertrophy, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **97**, 245-262, doi: 10.1016/j.yjmcc.2016.06.001.
4. Hjortebjerg, R. (2018) IGFBP-4 and PAPP-A in normal physiology and disease, *Growth Horm. IGF Res.*, **41**, 7-22, doi: 10.1016/j.ghir.2018.05.002.
5. Lin, T. M., Halbert, S. P., and Spellacy, W. N. (1974) Measurement of pregnancy-associated plasma proteins during human gestation, *J. Clin. Invest.*, **54**, 576-582, doi: 10.1172/JCI107794.
6. Overgaard, M. T., Sorensen, E. S., Stachowiak, D., Boldt, H. B., Kristensen, L., Sottrup-Jensen, L., and Oxvig, C. (2003) Complex of pregnancy-associated plasma protein A

- and the proform of eosinophil major basic protein. Disulfide structure and carbohydrate attachment, *J. Biol. Chem.*, **278**, 2106-2117, doi: 10.1074/jbc.M208777200.
7. Oxvig, C. (2015) The role of PAPP-A in the IGF system: location, location, location, *J. Cell. Commun. Signal.*, **9**, 177-187, doi: 10.1007/s12079-015-0259-9.
 8. Monget, P., Mazerbourg, S., Delpuech, T., Maurel, M. C., Manière, S., et al. (2003) Pregnancy-associated plasma protein-A is involved in insulin-like growth factor binding protein-2 (IGFBP-2) proteolytic degradation in bovine and porcine preovulatory follicles: identification of cleavage site and characterization of IGFBP-2 degradation, *Biol. Reprod.*, **68**, 77-86, doi: 10.1095/biolreprod.102.007609.
 9. Byun, D., Mohan, S., Yoo, M., Sexton, C., Baylink, D. J., and Qin, X. (2001) Pregnancy-associated plasma protein-A accounts for the insulin-like growth factor (IGF)-binding protein-4 (IGFBP-4) proteolytic activity in human pregnancy serum and enhances the mitogenic activity of IGF by degrading IGFBP-4 *in vitro*, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **86**, 847-854, doi: 10.1210/jcem.86.2.7223.
 10. Gyrop, C., and Oxvig, C. (2007) Quantitative analysis of insulin-like growth factor-modulated proteolysis of insulin-like growth factor binding protein-4 and -5 by pregnancy-associated plasma protein-A, *Biochemistry*, **46**, 1972-1980, doi: 10.1021/bi062229i.
 11. Lindsay, C. R., and Evans, T. J. (2008) The insulin-like growth factor system and its receptors: a potential novel anticancer target, *Biologics*, **2**, 855-864, doi: 10.2147/btt.s3841.
 12. Lawrence, J. B., Oxvig, C., Overgaard, M. T., Sottrup-Jensen, L., Gleich, G. J., et al. (1999) The insulin-like growth factor (IGF)-dependent IGF binding protein-4 protease secreted by human fibroblasts is pregnancy-associated plasma protein-A, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **96**, 3149-3153, doi: 10.1073/pnas.96.6.3149.
 13. Bayes-Genis, A., Conover, C. A., Overgaard, M. T., Bailey, K. R., Christiansen, M., et al. (2001) Pregnancy-associated plasma protein A as a marker of acute coronary syndromes, *N. Engl. J. Med.*, **345**, 1022-1029, doi: 10.1056/NEJMoa003147.
 14. Postnikov, A. B., Smolyanova, T. I., Kharitonov, A. V., Serebryanaya, D. V., Kozlovsky, S. V., et al. (2012) N-terminal and C-terminal fragments of IGFBP-4 as novel biomarkers for short-term risk assessment of major adverse cardiac events in patients presenting with ischemia, *Clin. Biochem.*, **45**, 519-524, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2011.12.030.
 15. Hjortebjerg, R., Tarnow, L., Jorsal, A., Parving, H.-H., Rossing, P., Bjerre, M., and Frystyk, J. (2015) IGFBP-4 fragments as markers of cardiovascular mortality in type 1 diabetes patients with and without nephropathy, *J. Clin. Endocrin. Metab.*, **100**, 3032-3040, doi: 10.1210/jc.2015-2196.
 16. Konev, A. A., Kharitonov, A. V., Rozov, F. N., Altshuler, E. P., Serebryanaya, D. V., et al. (2020) CT-IGFBP-4 as a novel prognostic biomarker in acute heart failure, *ESC Heart Fail.*, **7**, 434-444, doi: 10.1002/ehf2.12590.
 17. Степанова О. В., Чадин А.В., Куликова Т.Г., Масенко В.П., Терещенко С.Н. (2012) Роль Rho-ассоциированной киназы в формировании миофибрилл и сократимости кардиомиоцитов, *Кардиологический вестник*, **7**, 10-14.
 18. Laursen, L. S., Overgaard, M. T., Søb, R., Boldt, H. B., Sottrup-Jensen, L., et al. (2001) Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) cleaves insulin-like growth factor binding protein (IGFBP)-5 independent of IGF: implications for the mechanism of IGFBP-4 proteolysis by PAPP-A, *FEBS Lett.*, **504**, 36-40, doi: 10.1016/s0014-5793(01)02760-0.
 19. Semenov, A. G., Tamm, N. N., Apple, F. S., Schulz, K. M., Love, S. A., et al. (2017) Searching for a BNP standard: glycosylated proBNP as a common calibrator enables improved comparability of commercial BNP immunoassays, *Clin. Biochem.*, **50**, 181-185, doi: 10.1016/j.clinbiochem.2016.11.003.
 20. Conover, C. A., Oxvig, C., Overgaard, M. T., Christiansen, M., and Giudice, L. C. (1999). Evidence that the insulin-like growth factor binding protein-4 protease in human ovarian follicular fluid is pregnancy associated plasma protein-A, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **84**, 4742-4745, doi: 10.1210/jcem.84.12.6342.
 21. Mazerbourg, S., Overgaard, M. T., Oxvig, C., Christiansen, M., Conover, C. A., et al. (2001) Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) in ovine, bovine, porcine, and equine ovarian follicles: involvement in IGF binding protein-4 proteolytic degradation and mRNA expression during follicular development, *Endocrinology*, **142**, 5243-5253, doi: 10.1210/endo.142.12.8517.
 22. Conover, C. A., Faessen, G. F., Ilg, K. E., Chandrasekhar, Y. A., Christiansen, M., et al. (2001) Pregnancy-associated plasma protein-A is the insulin-like growth factor binding protein-4 protease secreted by human ovarian granulosa cells and is a marker of dominant follicle selection and the corpus luteum, *Endocrinology*, **142**, 2155, doi: 10.1210/endo.142.5.8286.
 23. Bayes-Genis, A., Schwartz, R. S., Lewis, D. A., Overgaard, M. T., Christiansen, M., et al. (2001) Insulin-like growth factor binding protein-4 protease produced by smooth muscle cells increases in the coronary artery after angioplasty, *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.*, **21**, 335-341, doi: 10.1161/01.atv.21.3.335.
 24. Giudice, L. C., Conover, C. A., Bale, L., Faessen, G. H., Ilg, K., et al. (2002) Identification and regulation of the IGFBP-4 protease and its physiological inhibitor in human trophoblasts and endometrial stroma: evidence for paracrine regulation of IGF-II bioavailability in the placental bed during human implantation, *J. Clin. Endocrinol. Metab.*, **87**, 2359-2366, doi: 10.1210/jcem.87.5.8448.
 25. Conover, C. A., Bale, L. K., Frye, R. L., and Schaff, H. V. (2019). Cellular characterization of human epicardial adipose tissue: highly expressed PAPP-A regulates insulin-like growth factor I signaling in human cardiomyocytes, *Physiol. Rep.*, **7**, doi: 10.14814/phy2.14006.
 26. Conover, C. A., Harrington, S. C., Bale, L. K. (2008) Differential regulation of pregnancy associated plasma protein-A in human coronary artery endothelial cells and smooth muscle cells, *Growth Horm. IGF Res.*, **18**, 213-220, doi: 10.1016/j.ghir.2007.09.001.
 27. D'Elia, P., Ionta, V., Chimenti, I., Angelini, F., Miraldi, F., et al. (2013) Analysis of pregnancy-associated plasma protein A production in human adult cardiac progenitor cells, *BioMed Res. Int.*, **2013**, 190178, doi: 10.1155/2013/190178.
 28. Banerjee, I., Fuseler, J. W., Price, R. L., Borg, T. K., and Baudino, T. A. (2007) Determination of cell types and

- numbers during cardiac development in the neonatal and adult rat and mouse, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **293**, H1883-H1891, doi: 10.1152/ajpheart.00514.2007.
29. Laursen, L. S., Kjaer-Sorensen, K., Andersen, M. H., and Oxvig, C. (2007) Regulation of insulin-like growth factor (IGF) bioactivity by sequential proteolytic cleavage of IGF binding protein-4 and -5, *Mol. Endocrinol.*, **21**, 1246-1257, doi: 10.1210/me.2006-0522.
 30. Laursen, L. S., Overgaard, M. T., Nielsen, C. G., Boldt, H. B., Hopmann, K. H., et al. (2002) Substrate specificity of the metalloproteinase pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) assessed by mutagenesis and analysis of synthetic peptides: substrate residues distant from the scissile bond are critical for proteolysis, *Biochem. J.*, **367**, 31-40, doi: 10.1042/BJ20020831.
 31. Ryall, K. A., Saucerman, J. J. (2012) Automated imaging reveals a concentration dependent delay in reversibility of cardiac myocyte hypertrophy, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **53**, 282-290, doi: 10.1016/j.yjmcc.2012.04.016.
 32. Archer, C. R., Robinson, E. L., Drawnel, F. M., and Roderick, H. L. (2017) Endothelin-1 promotes hypertrophic remodelling of cardiac myocytes by activating sustained signalling and transcription downstream of endothelin type A receptors, *Cell Signal.*, **36**, 240-254, doi: 10.1016/j.cellsig.2017.04.010.
 33. Jen, H. L., Yin, W. H., Chen, J. W., and Lin, S. J. (2017) Endothelin-1-induced cell hypertrophy in cardiomyocytes is improved by fenofibrate: possible roles of adiponectin, *J. Atheroscler. Thromb.*, **24**, 508-517, doi: 10.5551/jat.36368.
 34. Higazi, D. R., Fearnley, C. J., Drawnel, F. M., Talasila, A., Corps, E. M., et al. (2009) Ca²⁺ release is a nexus for hypertrophic signaling in cardiac myocytes, *Mol. Cell*, **33**, 472-482, doi: 10.1016/j.molcel.2009.02.005.
 35. Yue, T. L., Gu, J. L., Wang, C., Reith, A. D., Lee, J. C., et al. (2000) Extracellular signal-regulated kinase plays an essential role in hypertrophic agonists, endothelin-1 and phenylephrine-induced cardiomyocyte hypertrophy, *J. Biol. Chem.*, **275**, 37895-37901, doi: 10.1074/jbc.M007037200.
 36. Yamazaki, T., Komuro, I., Kudoh, S., Zou, Y., Shiojima, I., et al. (1996) Endothelin-1 is involved in mechanical stress-induced cardiomyocyte hypertrophy, *J. Biol. Chem.*, **271**, 3221-3228, doi: 10.1074/jbc.271.6.3221.
 37. Nakahashi, T., Fukuo, K., Inoue, T., Morimoto, S., Hata, S., et al. (1995) Endothelin-1 enhances nitric oxide-induced cytotoxicity in vascular smooth muscle, *Hypertension*, **25**, 744-747, doi: 10.1161/01.hyp.25.4.744.
 38. Piacentini, L., Gray, M., Honbo, N. Y., Chentoufi, J., Bergman, M., Karliner, J. S. (2000) Endothelin-1 stimulates cardiac fibroblast proliferation through activation of protein kinase C, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **32**, 565-576, doi: 10.1006/jmcc.2000.1109.
 39. Hjortebjerg, R., Lindberg, S., Pedersen, S., Mogelvang, R., Jensen, J. S., et al. (2017) Insulin-like growth factor binding protein 4 fragments provide incremental prognostic information on cardiovascular events in patients with ST-segment elevation myocardial infarction, *J. Am. Heart Assoc.*, **6**, doi: 10.1161/JAHA.116.005358.
 40. Makkos, A., Szántai, Á., Pálóczi, J., Pipis, J., Kiss, B., et al. (2020) A Comorbidity model of myocardial ischemia/reperfusion injury and hypercholesterolemia in rat cardiac myocyte cultures, *Front. Physiol.*, **10**, 1564, doi: 10.3389/fphys.2019.01564.
 41. Ariyasinghe, N. R., Lyra-Leite, D. M., and McCain, M. L. (2018) Engineering cardiac microphysiological systems to model pathological extracellular matrix remodeling, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **315**, H771-H789, doi: 10.1152/ajpheart.00110.2018.
 42. Belostotskaya, G. B., and Golovanova, T. A. (2014) Characterization of contracting cardiomyocyte colonies in the primary culture of neonatal rat myocardial cells: a model of *in vitro* cardiomyogenesis, *Cell Cycle*, **13**, 910-918, doi: 10.4161/cc.27768.
 43. Higashi, Y., Gautam, S., Delafontaine, P., and Sukhanov, S. (2019) IGF-1 and cardiovascular disease, *Growth Horm. IGF Res.*, **45**, 6-16, doi: 10.1016/j.ghir.2019.01.002.
 44. Mohamed-Ali, V., and Pinkney, J. (2002) Therapeutic potential of insulin-like growth factor-1 in patients with diabetes mellitus, *Treat. Endocrinol.*, **1**, 399-410, doi: 10.2165/00024677-200201060-00005.
 45. Sádaba, M. C., Martín-Estal, I., Puche, J. E., and Castilla-Cortázar, I. (2016) Insulin-like growth factor 1 (IGF-1) therapy: mitochondrial dysfunction and diseases, *Biochim. Biophys. Acta*, **1862**, 1267-1278, doi: 10.1016/j.bbadis.2016.03.010.
 46. Vinciguerra, M., Santini, M. P., Claycomb, W. C., Ladurner, A. G., and Rosenthal, N. (2009) Local IGF-1 isoform protects cardiomyocytes from hypertrophic and oxidative stresses via SirT1 activity, *Aging (Albany NY)*, **2**, 43-62, doi: 10.18632/aging.100107.
 47. Yeves, A. M., Burgos, J. I., Medina, A. J., Villa-Abrille, M. C., and Ennis, I. L. (2018) Cardioprotective role of IGF-1 in the hypertrophied myocardium of the spontaneously hypertensive rats: a key effect on NHE-1 activity, *Acta Physiol. (Oxf)*, **224**, doi: 10.1111/apha.13092.
 48. Sui, Y., Zhang, W., Tang, T., Gao, L., Cao, T., et al. (2020) Insulin-like growth factor-II overexpression accelerates parthenogenetic stem cell differentiation into cardiomyocytes and improves cardiac function after acute myocardial infarction in mice, *Stem Cell Res. Ther.*, **11**, 86, doi: 10.1186/s13287-020-1575-4.
 49. Lin, M., Liu, X., Zheng, H., Huang, X., Wu, Y., et al. (2020) IGF-1 enhances BMSC viability, migration, and anti-apoptosis in myocardial infarction via secreted frizzled-related protein 2 pathway, *Stem Cell Res. Ther.*, **11**, 22, doi: 10.1186/s13287-019-1544-y.
 50. Adachi, S., Ito, H., Akimoto, H., Tanaka, M., Fujisaki, H., et al. (1994) Insulin-like growth factor-II induces hypertrophy with increased expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes, *J. Mol. Cell Cardiol.*, **26**, 789-795, doi: 10.1006/jmcc.1994.1096.
 51. Carrasco, L., Cea, P., Rocco, P., Peña-Oyarzún, D., Rivera-Mejias, P., et al. (2014) Role of heterotrimeric G protein and calcium in cardiomyocyte hypertrophy induced by IGF-1, *J. Cell Biochem.*, doi: 10.1002/jcb.24712.
 52. Ito, H., Hiroe, M., Hirata, Y., Tsujino, M., Adachi, S., et al. (1993) Insulin-like growth factor-I induces hypertrophy with enhanced expression of muscle specific genes in cultured rat cardiomyocytes, *Circulation*, **87**, doi: 10.1161/01.cir.87.5.1715.
 53. Huang, C. Y., Hao, L. Y., and Buetow, D. E. (2002) Insulin-like growth factor-II induces hypertrophy of adult cardiomyocytes via two alternative pathways, *Cell. Biol. Int.*, **26**, 737-739, doi: 10.1006/cbir.2002.0919.

IGFBP-4 PROTEOLYSIS BY PAPP-A IN A PRIMARY CULTURE OF RAT NEONATAL CARDIOMYOCYTES IN NORMAL AND HYPERTROPHIC CONDITIONS

D. V. Serebryanaya^{1*}, D. A. Adasheva¹, A. A. Konev², M. M. Artemieva³,
I. A. Katrukha^{1,2}, A. B. Postnikov^{1,2}, N. A. Medvedeva³, and A. G. Katrukha^{1,2}

¹ Department of Biochemistry, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia; E-mail: dariaserebryanaya@gmail.com

² HyTest Ltd, 20520 Turku, Finland

³ Department of Human and Animal Physiology, Faculty of Biology, Lomonosov Moscow State University, 119234 Moscow, Russia

Cardiovascular disease (CVD) is one of the leading causes of death and disability worldwide. Pregnancy-associated plasma protein-A (PAPP-A) is a matrix metalloprotease localized on the cell surface. One of the substrates that PAPP-A cleaves is IGFBP-4 (insulin-like growth factor binding protein-4), a member of the family of proteins that bind IGF (insulin-like growth factor). Proteolysis of IGFBP-4 by PAPP-A occurs at a specific site, results in formation of two proteolytic fragments – N-terminal (NT-IGFBP-4) and C-terminal (CT-IGFBP-4) – and leads to the release of IGF, which activates various cellular processes including migration, proliferation, and cell growth. An increased levels of proteolytic IGFBP-4 fragments correlate with the development of complications and the risk of death of patients with such CVD as coronary heart disease, acute coronary syndrome, and heart failure. However, there is no direct evidence of the PAPP-A-specific proteolysis of IGFBP-4 in cardiac tissue in normal and pathological conditions. In the present study, using a model of a primary culture of rat neonatal cardiomyocytes, we have demonstrated that (i) proteolysis of IGFBP-4 by PAPP-A occurs in the conditioned medium of cardiomyocytes, (ii) an increase of PAPP-A-specific IGFBP-4 proteolysis is observed when cardiomyocytes are transferred to a hypertrophic state. Thus, it can be assumed that the enhancement of IGFBP-4 cleavage and hypertrophic changes in cardiomyocytes accompanying CVD are interrelated, and PAPP-A appears to be the one of the activators of IGF-dependent processes in normal and hypertrophic cardiomyocytes.

Keywords: cardiovascular diseases, heart failure, cardiomyocytes, primary culture, proteolysis, PAPP-A, IGFBP-4, hypertrophy, endothelin-1