

ДИКАРБОНИЛ-МОДИФИЦИРОВАННЫЕ ЛИПОПРОТЕИДЫ НИЗКОЙ ПЛОТНОСТИ – КЛЮЧЕВЫЕ ИНДУКТОРЫ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ *LOX-1* И *NOX1* В КУЛЬТИВИРУЕМЫХ ЭНДОТЕЛИОЦИТАХ ПУПОЧНОЙ ВЕНЫ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 В.З. Ланкин¹, М.Г. Шарапов^{2*}, А.К. Тихазе¹, Р.Г. Гончаров²,
О.А. Антонова¹, Г.Г. Коновалова¹, В.И. Новоселов²

¹ ФГБУ «НМИЦ кардиологии имени академика Е.И. Чазова» Минздрава России,
121552 Москва, Россия

² ФИЦ «Пушинский научный центр биологических исследований РАН»,
Институт биофизики клетки РАН,
142290 Пущино, Московская обл., Россия; электронная почта: sharapov.mg@yandex.ru

Поступила в редакцию 25.08.2023

После доработки 24.09.2023

Принята к публикации 26.09.2023

Впервые исследована экспрессия генов *LOX-1* (лектин-подобного рецептора-1 для окисленных липопротеидов низкой плотности) и *NOX1* (NADPH-оксидазы 1) в эндотелиоцитах пупочной вены человека (HUVES) при культивировании в присутствии липопротеидов низкой плотности (ЛНП), модифицированных различными природными дикарбонилами. Установлено, что из исследованных дикарбонил-модифицированных ЛНП (модифицированные малоновым диальдегидом (МДА) ЛНП, глиоксаль-модифицированные ЛНП и метилглиоксаль-модифицированные ЛНП) наибольшую индукцию генов *LOX-1* и *NOX1*, а также генов антиоксидантных ферментов и проапоптотических факторов в HUVES вызывают МДА-модифицированные ЛНП. Обсуждается важная роль дикарбонил-модифицированных ЛНП в молекулярных механизмах повреждения стенки сосудов и дисфункции эндотелия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА: липопротеиды низкой плотности (ЛНП), дикарбонил-модифицированные ЛНП, экспрессия генов *LOX-1* и *NOX1*, молекулярные механизмы атерогенеза и диабетогенеза.

DOI: 10.31857/S0320972523120138, EDN: NQUATF

ВВЕДЕНИЕ

Гиперпродукция активных форм кислорода (АФК), например, при ишемии/реперфузии органов, сопровождается иницированием свободнорадикальных процессов, приводящих к развитию окислительного стресса [1]. Окислительный стресс играет важную роль в этиологии и патогенезе атеросклероза [2–4], причем накопление первичных молекулярных продуктов свободнорадикального окисления полиеновых липидов – липогидропероксидов (ЛООН) – в процессе окислительного стресса [5, 6] вызывает последующее резкое увеличение вторичных молекулярных продук-

тов окислительной деструкции ЛООН – природных низкомолекулярных дикарбониллов, таких как 4-гидроксиноненаль и малоновый диальдегид (МДА) [5, 6]. Таким образом, окислительный стресс неизбежно переходит в карбонильный стресс, характеризующийся накоплением активных карбонильных соединений (АКС) [5, 6]. Карбонильный стресс способствует развитию сахарного диабета [4–6], но накопление АКС в этом случае происходит вследствие автоокисления и ферментативного окисления глюкозы [4–6], а также при атаке глюкозы или ее производных пероксильными радикалами липидов [7, 8]. АКС, образующиеся при окислительном и карбонильном стрессе,

Принятые сокращения: АКС – активные карбонильные соединения; АФК – активные формы кислорода; ГЛ – глиоксаль; ЛНП – липопротеиды низкой плотности; МГЛ – метилглиоксаль; МДА – малоновый диальдегид; CAT (*CAT*) – каталаза; GPx (*GPX*) – глутатионпероксидазы; HUVES – культивируемые эндотелиоциты пупочной вены человека; LOX-1 (*LOX-1*, *OLR1*) – лектин-подобный рецептор-1 для окисленных ЛНП; LOON – липогидропероксиды; NOX1 (*NOX1*) – NADPH-оксидаза 1; Prdx (*PRDX*) – пероксиредоксины; SOD (*SOD*) – супероксиддисмутазы.

* Адресат для корреспонденции.

не только вызывают повреждение клеток стенок сосудов, но и провоцируют модификацию активного центра ключевых антиоксидантных ферментов [4–6, 9, 10], таких как супероксиддисмутаза (SOD), глутатионпероксидаза (GPx) и каталаза (CAT), утилизирующих (восстанавливающих) цитотоксичные АФК [11], что сопровождается ингибированием активности этих ферментов [4–6, 9]. При окислительном и карбонильном стрессе у больных атеросклерозом и сахарным диабетом в плазме крови происходит накопление окисленных ЛНП [4–6, 12–14], включая дикарбонил-модифицированные ЛНП [15, 16], а также значительное снижение активности SOD, GPx и CAT в эритроцитах [4–6, 9].

Эндотелиальные клетки имеют особую систему защитных ферментов, представленных преимущественно различными перокси-редоксинами (Prdx) [11, 17, 18], активность которых также подвержена ингибирующему действию АКС [18]. Поверхность эндотелиоцитов покрыта гликопротеидами, образующими гликокаликс [5, 6, 19], причем структура гликокаликса может подвергаться деструкции в процессе окислительного стресса [5, 6]. Согласно литературным данным, окисленные ЛНП индуцируют синтез лектин-подобного scavenger-рецептора-1 (LOX-1) на мембране эндотелиоцитов, который может играть важную роль в повреждении эндотелиальных клеток [5, 6, 20–23]. Окисленные ЛНП инициируют образование кислородных радикалов в эндотелии [24], вероятно, вследствие экспрессии NADPH-оксидазы (NOX), что стимулирует апоптоз эндотелиоцитов [5, 6, 24]. В то же время нами получены убедительные данные, свидетельствующие о том, что scavenger-рецептор макрофагов связывается не с «окисленными» ЛНП (содержащими гидроперокси-производные в полиеновых ацилах наружного фосфолипидного слоя частиц ЛНП), а с частицами ЛНП, апопротеин В-100 которых химически модифицирован вследствие взаимодействия концевых NH_2 -групп апобелка с альдегидными группами (Maillard reaction) [5–7] вторичных продуктов свободнорадикального окисления липидов, таких как МДА, или продуктов автоокисления/ферментативного окисления глюкозы, таких как глиоксаль (ГЛ) и метилглиоксаль (МГЛ) [25–27]. На основании приведенных данных нами была высказана гипотеза о том, что, вероятно, дикарбонил-модифицированные ЛНП, а не окисленные (ЛООН-содержащие) ЛНП играют ключевую роль в развитии дисфункции эндотелия и атеросклеротическом повреждении стенки сосу-

дов [5, 6, 27]. Настоящая статья посвящена экспериментальной проверке этой гипотезы.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Выделение и культивирование эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVECs). Полость пупочной вены человека промывали в стерильных условиях раствором $1 \times \text{PBS}$ ($1,7 \text{ mM K}_2\text{HPO}_4$, $5,2 \text{ mM Na}_2\text{HPO}_4$, 150 mM NaCl , pH 7,4), заливали 0,15%-ным раствором диспазы («Sigma-Aldrich», США) в среде DMEM («Gibco», США) и инкубировали при 37°C в течение 50 мин для ферментативной диссоциации клеток интимы пупочной вены. Клеточную суспензию осаждали при 800 g в течение 15 мин (центрифуга Eppendorf 5804R, Германия). Клеточный осадок ресуспендировали в среде DMEM, содержащей 20 mM HEPES , 2 mM L -глутамин, 1 mM пирувата Na, 50 ед./мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 10% инактивированной эмбриональной телячьей сыворотки, 200 мкг/мл фактора роста эндотелиальных клеток ECGF и 5 ед./мл гепарина (все компоненты производства «Gibco»). Клетки высевали в чашки Петри (плотность 3×10^4 клеток на см^2), покрытые 0,2%-ным раствором желатина («Sigma-Aldrich»), и культивировали при 37°C во влажной атмосфере в присутствии $5\% \text{ CO}_2$ в инкубаторе INNOVA («New Brunswick Scientific», США). Ростовую среду меняли через 24 ч, а затем – каждые 48 ч. После того, как первичная культура достигала конфлюэнтного состояния (7–9 дней), клетки отмывали 0,05%-ным раствором трипсина («Gibco»), содержащим 0,02% ЭДТА («Sigma-Aldrich»), и культивировали в течение 2–3 пассажей [28].

Препаративное выделение ЛНП и химическая модификация их апопротеина В-100 природными дикарбонилами. Для выделения ЛНП использовали плазму крови здоровых доноров, которую приобретали в ФГБУ «НМИЦ сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева» (Москва). Выделение ЛНП проводили, как описано ранее [29], используя метод дифференциального ультрацентрифугирования в градиенте NaBr (ультрацентрифуга Optima XPN-80 Beckman, ротор 70.1 Ti). Выделенные ЛНП диализовали при 4°C в течение 18 ч против 2000 объемов $1 \times \text{PBS}$ при pH 7,4. Концентрацию белка в препарате ЛНП определяли по методу Лоури [30]. Для получения МДА-модифицированных ЛНП использовали свежеприготовленный раствор МДА, который получали

методом кислотного гидролиза 1,1,3,3-тетраэтоксипропана («Sigma-Aldrich») [31]. Концентрацию МДА определяли по поглощению при 267 нм на спектрофотометре UV-2600 Shimadzu («Shimadzu», Япония), используя коэффициент молярной экстинкции $31\,800\text{ M}^{-1}\cdot\text{см}^{-1}$ [31]. Модификацию ЛНП дикарбонилами проводили путем инкубации препаратов ЛНП в течение 3 ч в темноте при 37 °С в присутствии свежеполученного МДА (см. выше), ГЛ или МГЛ (все реактивы фирмы «Sigma-Aldrich») при концентрации 1 мкМ дикарбонила/100 мкг белка ЛНП [31–33]. Эффективность модификации аминокислотных остатков белков (включая апопротеин В-100) при использованных концентрациях дикарбониллов, по литературным данным, составляет не менее 80–90% [31, 34]. Очистку ЛНП от избытка диальдегидов проводили при помощи диализа при 4 °С в течение 18 ч против 2000 объемов $1\times\text{PBS}$ при pH 7,4 [31].

Культивирование HUVECs в присутствии ЛНП, модифицированных различными природными дикарбонилами. HUVECs подвергали воздействию нативных (не модифицированных) ЛНП и ЛНП, модифицированных различными природными дикарбонилами (МДА, ГЛ и МГЛ). Перед началом эксперимента HUVECs культивировали в 24-луночных планшетах до конfluence (1,5 × 10⁶ клеток на лунку) с 1 мл культуральной среды в атмосфере 21% O₂, 5% CO₂, 74% N₂ в течение 24 ч при 37 °С в описанных выше условиях. После этого добавляли ростовую среду (900 мл) и растворы, содержащие 1 мг/мл ЛНП (100 мкл). В группе 1 (контроль, без ЛНП) к клеткам добавляли 100 мкл $1\times\text{PBS}$; в группах 2–4 – по 100 мкл нативных (не модифицированных) ЛНП: МДА-модифицированных ЛНП, ГЛ-модифицированных ЛНП и МГЛ-модифицированных ЛНП соответственно. Все группы культивировали в идентичных условиях в течение 24 ч. Через 24 ч клетки снимали при добавлении раствора Трипсина-Версена («БиолоТ», Россия) и дважды промывали ростовой средой, осаждая их в центрифуге Eppendorf 5804R при 800 g в течение 10 мин. Надосадочную жидкость удаляли, а клеточный осадок ресуспендировали в 1 мл ростовой среды, содержащей 10% ДМСО, после чего клеточную суспензию замораживали и хранили при –80 °С до анализов [17, 28].

Выделение тотальной РНК и синтез кДНК. Тотальную РНК из клеток выделяли с помощью реагента ExtractRNA, согласно инструкции производителя («Евроген», Россия). Полученную тотальную РНК обрабатывали DNase I («New England Biolabs», США) для удаления

возможных примесей геномной ДНК. Целостность тотальной РНК оценивали с помощью электрофореза в 2%-ном агарозном геле в присутствии этидиум бромид (1 мкг/мл) по наличию полос рибосомальной РНК (28S и 18S). Концентрацию РНК оценивали по поглощению при 260 нм с помощью спектрофотометра NanoDrop1000 («ThermoFisher Scientific», США). Полученную РНК (2,5 мкг на реакцию) использовали для синтеза кДНК с помощью обратной транскриптазы MMLV и стандартного олигонуклеотида dT₁₅, следуя рекомендациям производителя («Евроген») [35].

ПЦР в реальном времени. Полученную кДНК использовали для ПЦР в реальном времени с ген-специфическими олигонуклеотидами (табл. 1).

ПЦР в реальном времени (ПЦР-РВ) проводили в амплификаторе DTprime («ДНК-технология», Россия) с использованием набора qPCRmix-HS с интеркалирующим красителем SYBR Green I («Евроген»). Режим ПЦР-РВ был следующий: (1) «горячий старт» (для исключения неспецифичного отжига праймеров) при 95 °С – 3 мин; (2) денатурация при 95 °С – 15 с; (3) отжиг праймеров при 60 °С – 20 с; (4) синтез ДНК при 72 °С – 30 с + регистрация флуоресценции. Этапы 2–4 повторяли 40 раз. Определение значений порогового цикла C_t проводили с помощью программного обеспечения RealTime_PCR v.7.9 («ДНК-технология»). Нормирование данных проводили относительно гена цитоскелетного бета-актина (*ACTB*). Оценку изменения экспрессии генов проводили по методу 2^{–ΔΔC_t} [36].

Иммуноблоттинг. Белки из клеток HUVECs выделяли с помощью лизирующего буфера: 25 mM Tris-HCl (pH 6,8), содержащий 50 mM DTT и 1% SDS. Общую концентрацию белка определяли методом Брэдфорда [37] по поглощению при 595 нм с помощью спектрофотометра NanoDrop1000. Равные количества белка из образцов разделяли электрофорезом в 10%-ном SDS-PAGE по Леммли в вертикальной камере VE-10 («Хеликон», Россия). Затем проводили полусухой перенос белков на нитроцеллюлозную мембрану с размером пор 0,45 мкм Hybond-C («Amersham», США). Мембрану обратимо окрашивали 2%-ным раствором Ponceau S («Sigma-Aldrich») в 7%-ной уксусной кислоте и оценивали эффективность переноса белков из геля. Затем для предотвращения неспецифического связывания антител мембрану отмывали от Ponceau S и инкубировали в буфере для гибридизации (5% бычьего сывороточного альбумина (BSA, «Amresco», США) в $1\times\text{BS}$) в течение 16 ч при 4 °С.

Таблица 1. Олигонуклеотиды, использованные для ПЦР-РВ

Гены	Номер гена в GenBank	Последовательность 5'→3'	Размер ампликона, п.н.
<i>ACTB</i>	NM_001101.3	F: GGCATTGCTGACAGGATGCA R: TCCACATCTGCTGGAAGGTGGA	147
<i>PRDX1</i>	NM_001202431.1	F: CCACGGAGATCATTGCTTTCA R: AGGTGTATTGACCCATGCTAGAT	116
<i>PRDX2</i>	NM_005809.5	F: GAAGCTGTCTGGACTACAAAGG R: TCGGTGGGGCACACAAAAG	78
<i>PRDX3</i>	NM_006793.4	F: GAGACTACGGTGTGCTGTTAGA R: GTTGACGCTCAAATGCTTGATG	95
<i>PRDX4</i>	NM_006406.1	F: AGAGGAGTGCCACTTCTACG R: GGAAATCTTCGCTTTGCTTAGGT	103
<i>PRDX5</i>	NM_012094.4	F: CCCTGAGACGCTCAGCGGGCTATAT R: ACGCCCACTCTCCTTCACTGCA	96
<i>PRDX6</i>	NM_004905.2	F: GTTGCCACCCCAGTTGATTG R: TGAAGACTCCTTTCGGGAAAAGT	100
<i>SOD1</i>	NM_000454.4	F: CCATTGCATCATTGGCCGC R: AAACGACTTCCAGCGTTTCC	105
<i>SOD2</i>	NM_000636.3	F: TGGGGTTGGCTTGGTTTCAA R: GCAGTGGAATAAGGCCTGTTG	100
<i>SOD3</i>	NM_003102.2	F: CCTGCACTCGCGCTAACAG R: CACCTTCCAGCTCCTCCAAG	111
<i>CAT</i>	NM_001752.3	F: TGTTGCTGGAGAATCGGGTTC R: TCCCAGTTACCATCTTCTGTGTA	87
<i>GPX1</i>	NM_000581.2	F: CAGTCGGTGTATGCCTTCTCG R: GAGGGACGCCACATTCTCG	105
<i>GPX3</i>	NM_002084.3	F: GAGCTTGCACCATTCGGTCT R: GGGTAGGAAGGATCTCTGAGTTC	94
<i>GPX4</i>	NM_002085.4	F: GAGGCAAGACCGAAGTAACTAC R: CCGAACTGGTTACACGGGAA	100
<i>GPX7</i>	NM_015696.4	F: CGCACCTACAGTGTCTCATTC R: CAGGTACTTGAAGGCAGGATG	81
<i>GPX8</i>	NM_001008397.3	F: TACTTAGGGCTGAAGGAACTGC R: GGCTCCGATTCTCCAACTGA	92
<i>LOX-1 (OLR1)</i>	NM_001172632.1	F: TTCTCCTTTGATGCCCCACTTATTT R: TTTTCCGCATAAACAGCTCCTC	105
<i>NOX1</i>	NM_001271815.2	F: ACATCGTGACAGGTCTGAAACA R: CTCCCACTACAGACTTGGGGT	102
<i>BAX</i>	NM_001291428.1	F: TGGAGCTGCAGAGGATGATTG R: GCAAAGTAGAAAAGGGCGACAA	93
<i>CASP9</i>	NM_001229.4	F: CCTACTCTACTTTCCAGGTTTGT R: ACTGCTCAAAGATGTCGTCCAG	90

Таблица 1 (окончание)

Гены	Номер гена в GenBank	Последовательность 5'→3'	Размер ампликона, п.н.
<i>CASP3</i>	NM_004346.3	F: CTGCCTCTTCCCCATTCTC R: CGCTTCCATGTATGATCTTTGGT	110
<i>TP53</i>	NM_000546.6	F: TTCACCCTTCAGATCCGTGG R: CTGGGCATCCTTGAGTTCCAA	81
<i>NFKB</i>	NM_001165412.1	F: CAAGGCAGCAAATAGACGAGC R: AAGCTGAGTTTGCGGAAGGA	82
<i>NFE2L2</i>	NM_001145412.3	F: AGGTTGCCACATTCCCAAA R: ACGTAGCCGAAGAAACCTCAT	108
<i>c-FOS</i>	NM_005252.4	F: TCTTACTACCACTCACCCGCAGAC R: GGAATGAAGTTGGCACTGGAGAC	103
<i>c-JUN</i>	NM_002228.4	F: ACCAAGAAGTGCATGGACCTAACA R: GCTCAGCCTCGCTCTCACAA	178
<i>STAT3</i>	NM_003150.3	F: CGCACTTTAGATTCATTGATGCAG R: GTCAAAGGTGAGGGACTCAAAGTG	90
<i>TLR2</i>	NM_003266.4	F: AGTTTGAAGTGAGAAAAAGGTTGA R: GATGATGACCCCCAAGACCC	81
<i>TLR4</i>	NM_003266.4	F: GAGCTTTAATCCCCTGAGGCA R: TTGTCTGGATTTACACCTGGA	95

Далее мембрану инкубировали в том же буфере для гибридизации с добавлением соответствующих первичных антител к цитоскелетному бета-актину (bAct) или к каспазе-3 («Cell Signaling Technology», США) в разведении, рекомендованном производителем (1 : 3000), в течение 18 ч при 4 °С. Затем мембрану трижды промывали буфером для отмывки (5%-ный БСА в 1× PBS, содержащий 0,1% (v/v) Tween 20) и инкубировали 1 ч при 37 °С в буфере со вторичными антителами к иммуноглобулинам кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена («ИМТЭК», Россия), в разведении 1 : 5000. После промывки мембраны связавшиеся антитела детектировали с помощью диаминобензидина (DAB, «Amresco») [38]. Денситометрический анализ окрашенных мембран проводили с помощью программы ImageJ v.1.50 (National Institutes of Health, США).

Статистический анализ. Статистический анализ выполняли с использованием программ Microsoft Office Excel 2016 («Microsoft», США) и SigmaPlot 11 («Systat Software Inc.», США). Результаты выражали как среднее значение ± стандартное отклонение (SD). Статистическая значимость между отдельными экспериментальными группами определялась с помощью непарного *t*-критерия Стьюдента.

Значение $p < 0,05$ принимали статистически достоверным.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время можно считать установленным, что свободнорадикальное окисление ЛНП играет важную роль в индукции и прогрессировании атеросклероза [4–6, 26, 27]. Окислительная модификация частиц ЛНП может осуществляться как при накоплении липогидропероксидов в них (физическая модификация структуры ЛНП вследствие увеличения микровязкости фосфолипидного монослоя), так и при химической модификации апопротеина В-100 в процессе его взаимодействия со вторичным молекулярным продуктом липопероксидации – МДА [4–6, 26, 27]. Нами было экспериментально доказано, что при длительном Cu^{2+} -инициированном окислении ЛНП *in vitro*, так же как *in vivo*, образуются не только окисленные (ЛООН-содержащие) ЛНП, но и МДА-модифицированные ЛНП [27]. Литературные данные свидетельствуют, что ЛНП, окисленные при иницировании ионами Cu^{2+} , вызывают всплеск генерирования АФК и последующий апоптоз эндотелиоцитов как

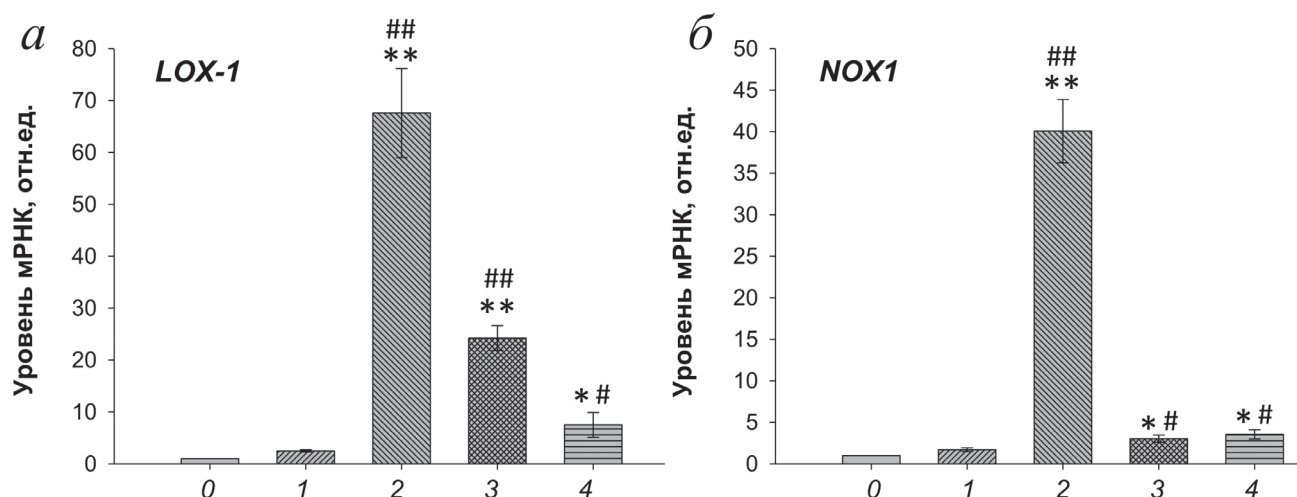


Рис. 1. Изменение уровня мРНК генов *LOX-1* (а) и *NOX1* (б) в клетках HUVECs при культивировании их без добавления ЛНП (контроль, 0), а также в присутствии нативных (немодифицированных) ЛНП (1), МДА-модифицированных ЛНП (2), ГЛ-модифицированных ЛНП (3) и МГЛ-модифицированных ЛНП (4). Изменения статистически достоверны относительно группы без ЛНП (* $p < 0,05$; ** $p < 0,01$) и нативных ЛНП (# $p < 0,05$; ## $p < 0,01$)

в культуре HUVECs, так и в инкубируемых фрагментах аорты кролика [24]. В соответствии с этим было постулировано, что *LOX-1* является scavenger-рецептором «окисленных» ЛНП, которые по принципу обратной связи индуцируют его экспрессию, прежде всего, в эндотелиоцитах [20–23]. Индукция *LOX-1* сопровождается ростом экспрессии NADPH-оксидазы, которая является классическим продуцентом АФК, резкое увеличение образования которых приводит к стимуляции апоптоза эндотелиоцитов [5, 6, 20–23]. Таким образом, в литературе бытовало мнение, что именно «окисленные» ЛНП играют ведущую роль в повреждении эндотелиальных клеток и дисфункции эндотелия [5, 6, 20–23]. До настоящего времени влияние химически модифицированных ЛНП (дикарбонил-модифицированных ЛНП) на экспрессию генов *LOX-1* и *NOX1* в эндотелиоцитах не исследовалось. Тем не менее наши предшествующие работы указывали на то, что атерогенными (активно поглощаемыми культивируемыми макрофагами с образованием «пенистых» клеток) являются не LOOH-содержащие ЛНП (образованные при ферментативном окислении С-15 липоксигеназой), а частицы ЛНП, химически модифицированные МДА и другими дикарбонилами [5, 6, 25–27]. В связи с этим нами было высказано предположение, что не «окисленные» (LOOH-содержащие), а дикарбонил-модифицированные ЛНП являются ключевым фактором в молекулярных механизмах атеросклеротического повреждения стенки сосудов и дисфункции эндотелия [5, 6]. Экспериментальные данные, подтверждающие важную

роль дикарбонил-модифицированных ЛНП в развитии дисфункции эндотелия, приведены ниже.

Наиболее показательные результаты исследования приведены на рис. 1. Представленные данные свидетельствуют о том, что культивирование HUVECs в присутствии нативных ЛНП не оказывает существенного влияния на экспрессию генов *LOX-1* и *NOX1* (рис. 1, а и б), что соответствует ранее опубликованным данным [39, 40].

Различия в уровне мРНК *LOX-1* и *NOX1* в HUVECs при их культивировании в присутствии нативных (немодифицированных) ЛНП были незначительны по сравнению с соответствующими показателями в пробах без ЛНП (рис. 1, а и б). В то же время достоверное увеличение уровня мРНК *LOX-1* и *NOX1* в HUVECs было выявлено при культивировании эндотелиальных клеток в присутствии ЛНП, модифицированных всеми исследованными дикарбонилами: МДА, ГЛ и МГЛ (рис. 1, а и б). Наибольшие изменения уровня экспрессии *LOX-1* были обнаружены при действии МДА-модифицированных ЛНП (увеличение в 67 раз), тогда как ГЛ-модифицированные ЛНП и МГЛ-модифицированные ЛНП обладали значительно меньшим эффектом (увеличение в 24 и 8 раз соответственно) (см. рис. 1, б). Следует отметить, что, в соответствии с литературными данными [39], культивирование эндотелиоцитов аорты быка в течение 24 ч в присутствии «окисленных» ЛНП вызывало увеличение мРНК *LOX-1* не более чем в 5 раз, т.е. почти в 13 раз меньше, чем в проведенных нами аналогичных опытах

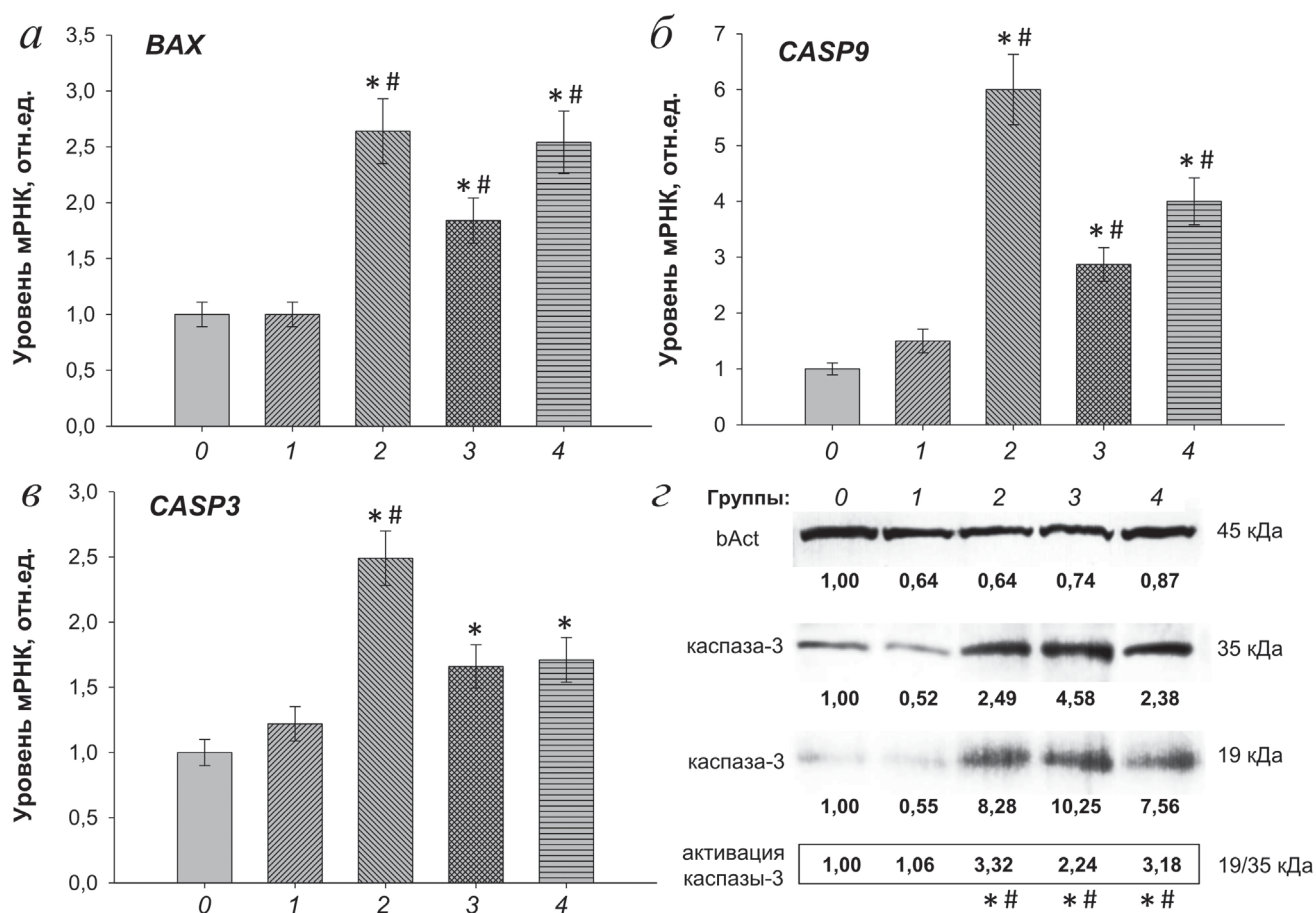


Рис. 2. Экспрессия генов маркеров апоптоза (а – ген *BAX*; б – ген *CASP9*; в – ген *CASP3*) в клетках HUVECs при культивировании их без добавления ЛНП (контроль, 0), а также в присутствии нативных (немодифицированных) ЛНП (1), МДА-модифицированных ЛНП (2), ГЛ-модифицированных ЛНП (3) и МГЛ-модифицированных ЛНП (4); г – оценка активации каспазы-3 из клеточных лизатов HUVECs с помощью иммуноблоттинга. Нормирование внутри групп проводили относительно цитоскелетного bAct. За 1 приняты значения уровня белков в интактных клетках HUVECs. Активацию каспазы-3 оценивали по отношению уровня протеолитически-активированной формы (19 кДа) к неактивной форме (35 кДа). Изменения статистически достоверны относительно группы без ЛНП (* $p < 0,05$) и нативных ЛНП (# $p < 0,05$)

при культивировании HUVECs с МДА-модифицированными ЛНП (рис. 1, а). Одновременно наибольшие изменения уровня экспрессии *NOX1* также были обнаружены при действии МДА-модифицированных ЛНП (увеличение в 40 раз), причем ГЛ-модифицированные ЛНП и МГЛ-модифицированные ЛНП обладали значительно меньшим эффектом (увеличение в 3 и 3,5 раза соответственно) (рис. 1, а).

Поскольку гиперактивация *LOX-1* и *NOX1* приводит к апоптозу эндотелиальных клеток [40] и их преждевременному старению [41], мы изучили влияние различных дикарбонил-модифицированных ЛНП на экспрессию основных проапоптотических маркеров в культивируемых эндотелиальных клетках. Полученные нами результаты свидетельствуют о том, что дикарбонил-модифицированные ЛНП индуцируют рост экспрессии генов *BAX*,

CASP9 и *CASP3*, которые играют ведущую роль в запуске апоптоза (рис. 2).

Как известно, ген *BAX* кодирует bcl-2-подобный белок 4, участвующий в открытии митохондриальной поры и запуске цитохром *c*-опосредованного апоптоза [42], ген *CASP9* кодирует индуцируемую каспазу-9, «вышестоящую» протеазу в апоптотическом каскаде [42], а ген *CASP3* кодирует эффекторную каспазу-3, играющую ведущую роль в стимуляции апоптоза [42]. Как видно из рис. 2, а, изменение уровня экспрессии гена *BAX* при культивировании в присутствии нативных (немодифицированных) ЛНП было статистически недостоверным ($p > 0,05$) по сравнению с соответствующим показателем в контроле (без ЛНП) (рис. 2, а). Различия между этими показателями для генов *CASP9* и *CASP3* были достоверными, но незначительными (уровни значений в присутствии нативных ЛНП

были выше контроля на 30% и 20% соответственно) (рис. 2, б и в). Достоверное увеличение уровня экспрессии генов *BAX*, *CASP9* и *CASP3* было выявлено при культивировании эндотелиальных клеток в присутствии ЛНП, модифицированных всеми исследованными дикарбонилами: МДА, ГЛ и МГЛ (рис. 2, а–в). Наибольшие изменения уровня экспрессии этих генов были обнаружены при действии МДА-модифицированных ЛНП (увеличение в 3–6 раз), тогда как ГЛ-модифицированные ЛНП и МГЛ-модифицированные ЛНП обладали несколько меньшим эффектом (увеличение в 1,5–3 раза и 2–4 раза соответственно) (рис. 2, а–в). Как видно из рис. 2, г, уровень белка каспазы-3 находится в хорошем соответствии с уровнем мРНК *CASP3*. Из приведенных данных следует, что МДА-модифицированные ЛНП, вызывая существенный рост экспрессии генов *LOX-1* и *NOX1*, оказывают наиболее драматическое воздействие на эндотелиальные клетки, стимулируя их апоптотическую гибель (рис. 2, а–в), вероятно, вследствие гиперпродукции АФК [5, 6].

Действительно, не является удивительным тот факт, что резкое увеличение уровня АФК играет ведущую роль в апоптозе эндотелиальных клеток с гиперэкспрессией генов *LOX-1* и *NOX1* [5, 6]. Как отмечалось ранее, экспрессия *NOX1* приводит к гиперпродукции АФК [24], стимулируя активацию антиоксидантного ответа клетки [43]. Мы обнаружили, что МДА-модифицированные ЛНП вызывают наибольшую индукцию экспрессии генов антиоксидантного ответа в клетках HUVECs (табл. 2). Наиболее существенный рост показан для секреторной Cu/Zn супероксиддисмутазы (*SOD3*), глутатионпероксидазы 1 и 8 (*GPX1*, *GPX8*) и пероксиредоксинов (*PRDX1*, *PRDX2*, *PRDX3*, *PRDX4*). Следует отметить, что среди исследованных генов наибольшая индукция обнаружена именно для генов пероксиредоксинов, что соответствует ранее полученным нами данным [17, 18] и подтверждает важнейшую роль этого семейства ферментов в антиоксидантной защите эндотелия.

Можно полагать, что клетки HUVECs должны реагировать на присутствие дикарбонил-

Таблица 2. Изменение уровня экспрессии генов антиоксидантных ферментов в клетках HUVECs при их культивировании в присутствии нативных и различных дикарбонил-модифицированных ЛНП

Гены	Без ЛНП	Нативные ЛНП	МДА-ЛНП	ГЛ-ЛНП	МГЛ-ЛНП
<i>CAT</i>	1	1,32	0,66	2,14	1,62
<i>SOD1</i>	1	1,0	1,62	1,87	2,14
<i>SOD3</i>	1	0,93	5,29*	2,02	1,95
<i>GPX1</i>	1	1,2	3,52*	0,96	1,07
<i>GPX3</i>	1	1,32	2,14	1,07	1,15
<i>GPX4</i>	1	1,0	1,07	0,42	1,62
<i>GPX7</i>	1	0,76	1,41	1,0	0,98
<i>GPX8</i>	1	1,1	4,92*	0,76	0,87
<i>PRDX1</i>	1	0,71	2,3*	1,32	1,41
<i>PRDX2</i>	1	1,23	13**	8,57**	8,57**
<i>PRDX3</i>	1	0,9	4,29*	2,46*	2,64*
<i>PRDX4</i>	1	0,5	2,46*	1,62	2,64*
<i>PRDX5</i>	1	1,02	1,62	1,15	1,07
<i>PRDX6</i>	1	0,76	1,32	0,31	1,07

Примечание. МДА-ЛНП — липопропротеиды низкой плотности, модифицированные малоновым диальдегидом; ГЛ-ЛНП — глиоксаль-модифицированные ЛНП; МГЛ-ЛНП — метилглиоксаль-модифицированные ЛНП. Представлены средние значения ($n = 5$) в каждой группе. Изменения статистически достоверны (выделены полужирным шрифтом) относительно контрольной группы клеток (без добавления ЛНП): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

Таблица 3. Изменение уровня экспрессии маркерных генов в клетках HUVECs при их культивировании в присутствии нативных и различных дикарбонил-модифицированными ЛНП

Гены	Без ЛНП	Нативные ЛНП	МДА-ЛНП	ГЛ-ЛНП	МГЛ-ЛНП
<i>NFKB1</i>	1	0,97	1,77	2,86*	1,61
<i>NFE2L2</i>	1	1,08	6,19**	2,81*	2,04
<i>FOS</i>	1	2,2	4,59**	1,15	1,23
<i>STAT3</i>	1	1,87	4,2*	2,0	2,0
<i>TP53</i>	1	0,71	3,52*	2,87*	3,28*
<i>JNK</i>	1	2,2	4,29**	2,14	1,15
<i>TLR2</i>	1	2,1	1,57	2,3	1,8
<i>TLR4</i>	1	1,32	0,76	0,31*	0,38

Примечание. МДА-ЛНП – липопропротеиды низкой плотности, модифицированные малоновым диальдегидом; ГЛ-ЛНП – глиоксаль-модифицированные ЛНП; МГЛ-ЛНП – метилглиоксаль-модифицированные ЛНП. Представлены средние значения ($n = 5$) в каждой группе. Изменения статистически достоверны (выделены полужирным шрифтом) относительно контрольной группы клеток (без добавления ЛНП): * $p < 0,05$; ** $p < 0,01$.

модифицированных ЛНП дозозависимым образом, причем с ростом концентрации дикарбонил-модифицированных ЛНП возрастает окислительная нагрузка на клетку. Превышение антиоксидантного барьера, обеспеченного в первую очередь пероксиредоксинами (табл. 2), может индуцировать апоптотическую гибель HUVECs. Установлено, что редокс-гомеостаз клеток определяется балансом между прооксидантной и антиоксидантной системами, функция которых, в свою очередь, контролируется транскрипционным аппаратом клетки [44]. Мы сделали попытку оценить, какие регуляторные процессы могут превалировать в клетках HUVECs, культивируемых в присутствии дикарбонил-модифицированных ЛНП, проанализировав экспрессию некоторых маркерных генов (табл. 3), связанных с регуляцией антиоксидантного ответа (*NFE2L2*), воспаления (*NFKB1*, *TLR2*, *TLR4*, *JNK*) и апоптоза (*FOS*, *STAT3*, *JNK*, *TP53*).

Из табл. 3 видно, что наибольшие изменения в экспрессии маркерных генов наблюдаются в HUVECs, культивируемых в присутствии МДА-модифицированных ЛНП. Среди транскрипционных факторов наибольшее увеличение отмечено для NRF2 (*NFE2L2*), который при накоплении уровня внутриклеточных АФК является основным регулятором экспрессии генов, связанных с антиоксидантной защитой, обеспечивая тем самым поддержание клеточного редокс-гомеостаза [45]. Важно отметить, что увеличение уровня мРНК гена *NFE2L2* находится в соответствии с ро-

стом экспрессии генов антиоксидантного ответа (табл. 2). Обнаружено также повышение экспрессии гена *FOS*, который кодирует с-Fos, входящий вместе с белками Jun в комплекс транскрипционного фактора AP-1, регулирующего апоптоз, дифференцировку и пролиферацию клеток [46]. В свою очередь, транскрипционная активность AP-1 регулируется различными стимулами, из которых важная роль принадлежит АФК, и реализуется через окисление и последующее глутатионилирование цистеиновых остатков в субъединицах с-Fos и с-Jun [47]. Повышение экспрессии гена *FOS* сопровождается активацией каспаз в клетках HUVECs, культивируемых в присутствии дикарбонил-модифицированных ЛНП (рис. 2, б и в). Об активации проапоптотических тенденций под влиянием МДА-модифицированных ЛНП свидетельствует также увеличенная экспрессия гена *TP53*, кодирующего транскрипционный фактор p53 – важнейший активатор гибели клеток [48]. Вероятно, наибольший стресс среди исследованных групп клетки HUVECs испытывают под действием МДА-модифицированных ЛНП, о чем косвенно свидетельствует достоверное увеличение экспрессии гена (*STAT3*) транскрипционного фактора STAT3, который участвует в регуляции апоптоза и ответа клетки на цитокины, а также гена киназы JNK, которая активируется в стрессовых условиях [49]. Почти трехкратное увеличение экспрессии гена *NFKB1* (p50) в клетках HUVECs при обработке ГЛ-модифицированными ЛНП, по всей вероятности,

обусловлено активацией рецептора TLR2 (рост экспрессии *TLR2* более чем в 2 раза) при одновременном подавлении экспрессии гена *TLR4*. Это особенно важно отметить, поскольку TLR2-опосредованные сигналы оказывают влияние на экспрессию LOX-1 [50, 51], что еще раз указывает на сложную регуляцию ответа эндотелиальной клетки на окислительную модификацию ЛНП.

Ранее было показано, что увеличение экспрессии LOX-1 в клетках HUVECs под действием «окисленных» ЛНП вызывает активацию генов NADPH-оксидаз (*NOX1* и *NOX2*), что должно приводить к активному генерированию внутриклеточных АФК (преимущественно O_2^- и H_2O_2) [52]. В связи с этим чрезвычайно важно отметить, что нами была обнаружена мощная экспрессия гена *NOX1* в клетках HUVECs, культивируемых в присутствии не LOOH-содержащих, а МДА-модифицированных ЛНП (рис. 1, в). Кроме того, имеются данные о том, что трехкратное увеличение уровня МДА в плазме крови (до 15 мкМ) вдвое увеличивает синтез белков LOX-1 и NOX1 в клетках эндотелия аорты мышей [53]. Таким образом, МДА-модифицированные ЛНП, вероятно, могут являться важными индукторами экспрессии NOX1 в клетках эндотелия. В связи с этим следует отметить, что МДА-модифицированные ЛНП тем не менее весьма быстро элиминируются из кровотока млекопитающих, включая приматов [32, 33]. Эти данные не исключают предположение о важной роли МДА-модифицированных ЛНП в индукции генов *LOX-1* и *NOX1* в эндотелиальных клетках, учитывая крайне высокие патофизиологические потенции этой модификации ЛНП (рис. 1, а и б).

В последние годы проводятся многочисленные исследования о роли LOX-1 в развитии супероксид-зависимого повреждения стенки сосудов в связи с тем, что «окисленные» ЛНП являются индукторами экспрессии LOX-1 в эндотелиоцитах [5, 6, 20–23]. ЛНП в этих исследованиях окисляли при многочасовой инициации ионами Cu^{2+} (до 6 ч) или спонтанно (до 24 ч) [5, 6, 24, 54–56], т.е. провоцируя накопление и МДА-модифицированных ЛНП [27]. Действительно, процесс свободнорадикального окисления ЛНП протекает многостадийно, причем сначала образуются первичные молекулярные продукты окисления — липогидропероксиды, а затем вторичные продукты — низкомолекулярные дикарбонилы, важнейшим из которых является МДА. Как показано нами, в условиях длительного Cu^{2+} -зависимого свободнорадикального окис-

ления неизбежно получают не так называемые «окисленные ЛНП», а смесь истинно окисленных (LOOH-содержащих) ЛНП и МДА-модифицированных ЛНП в произвольных пропорциях [27]. Несмотря на это, в подавляющем большинстве исследований роли LOX-1 в дисфункции эндотелия используют именно такие «окисленные» ЛНП, полученные при длительном Cu^{2+} -инициированном свободнорадикальном или спонтанном окислении [5, 6, 24, 54–56], что не позволяет корректно интерпретировать полученные результаты. В связи с этим крайне важным является установление различий в патофизиологическом действии LOOH-содержащих ЛНП и МДА-модифицированных ЛНП. Согласно полученным нами ранее данным [6, 26, 27], не «окисленные» ЛНП (LOOH-содержащие ЛНП, полученные при ферментативном окислении С-15 липоксигеназой ретикулоцитов), а исключительно МДА-модифицированные ЛНП играют ведущую роль в образовании «пенистых» клеток и развитии липоидозных предатерогенных повреждений стенки сосудов. Результаты настоящего исследования подтверждают тот факт, что дикарбонил-модифицированные ЛНП (и, прежде всего, МДА-модифицированные ЛНП) играют важную роль в развитии дисфункции эндотелия, причем выводы предшествующих работ, в которых постулирована ведущая роль так называемых «окисленных» ЛНП, могут быть подвергнуты сомнению [5, 6]. Предлагаемый нами подход, основанный на изучении действия ЛНП, модифицированных различными природными низкомолекулярными дикарбонилами, кардинально отличается от ранее выполненных работ с использованием «окисленных» ЛНП. Очевидно, что отсутствие строго контролируемого состава «окисленных» ЛНП не позволяет установить конкретные действующие факторы в этих исследованиях. Развиваемые нами подходы позволяют исследовать патофизиологическое действие ЛНП, модифицированных конкретными дикарбонилами, накапливающимися при окислительном стрессе в процессе атерогенеза или карбонильном стрессе при развитии сахарного диабета.

Следует отметить, что опубликованные ранее данные с использованием так называемых «окисленных» ЛНП, полученных при Cu^{2+} -инициированном или спонтанном окислении, несомненно могут быть объяснены значительным накоплением МДА-модифицированных ЛНП в этих условиях [27], учитывая, что другие дикарбонил-модифицированные ЛНП ввиду отсутствия глюкозы образоваться не могут. Следовательно, как мы отмечали выше,

корректная трактовка результатов по эффектам «окисленных» ЛНП должна базироваться на признании неизбежного образования МДА-модифицированных ЛНП в этих системах, что позволяет учитывать данные многочисленных работ такого рода как дополнительное свидетельство важной роли дикарбонил-модифицированных ЛНП в дисфункции эндотелия. Таким образом, полученные в настоящей работе данные подтверждают высказанную нами ранее гипотезу о том, что дикарбонил-модифицированные ЛНП, провоцируя экспрессию *LOX-1* и *NOX1*, могут являться важным, если не ключевым, фактором молекулярных механизмов атерогенеза и диабетогенеза [5, 6].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное нами исследование роли дикарбонил-модифицированных ЛНП в *LOX-1*- и *NOX1*-опосредованных молекулярных механизмах дисфункции эндотелия ставит под сомнение ранее полученные результаты с использованием так называемых «окисленных» ЛНП, полученных при длительном Cu^{2+} -инициированном свободнорадикальном или спонтанном окислении частиц ЛНП. Поскольку при проведении окисления ЛНП в подобных условиях неизбежно образуется смесь истинно окисленных (ЛООН-содержащих) ЛНП и МДА-модифицированных ЛНП в непредсказуемых пропорциях, приписывание ключевой роли в *LOX-1*-индуцируемых молекулярных механизмах дисфункции эндотелия так называемым «окисленным» ЛНП представляется не корректным. Фактически, нами обнаружено, что важная роль в индукции атерогенеза и диабетогенеза может принадлежать не ЛНП с обогащенными ЛООН фосфолипидами в наружном слое частиц, а ЛНП, в которых апопротеин В-100 подвергся химической модификации природными низкомолекулярными

дикарбонилами, что, естественно, приводит к изменению рецепторных свойств этого белка. Осознание этих результатов должно способствовать кардинальному изменению стратегии дальнейших исследований в связи с открывающимися возможностями изучения действия конкретных дикарбонилов, накапливающихся в крови пациентов с атеросклерозом (таких как МДА) и сахарным диабетом (таких как глиоксаль и метилглиоксаль). Очевидно, что полученные данные диктуют кардинальное изменение стратегии фармакотерапии атеросклероза и диабета, поскольку она, по нашему мнению, должна быть направлена не на не оправдавшую себя антиоксидантную терапию [4, 5], а на создание препаратов из класса гидразинов, способных детоксицировать и утилизировать потенциально опасные молекулы дикарбонилов [57, 58].

Вклад авторов. Ланкин В.З. — общее руководство работой, написание статьи, обсуждение результатов; Шарапов М.Г. — проведение молекулярно-биологических исследований, написание статьи, обсуждение результатов, анализ литературы; Тихазе А.К. — участие в написании и редактировании статьи; Гончаров Р.Г. — проведение молекулярно-биологических исследований; Антонова О.А. — получение первичной культуры и культивирование HUVECs; Коновалова Г.Г. — выделение ЛНП и получение дикарбонил-модифицированных ЛНП; Новоселов В.И. — участие в написании и обсуждении статьи.

Финансирование. Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 22-15-00013).

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или использованием животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гончаров Р. Г., Шарапов М. Г. (2023) Ишемически-реперфузионные поражения: молекулярные механизмы патогенеза и способы их коррекции, *Мол. Биол.*, **6**, 1150-1174, doi: 10.31857/S0026898423060071.
2. Dubois-Deruy, E., Peugnet, V., Turkieh, A., and Pinet, F. (2020) Oxidative stress in cardiovascular diseases, *Antioxidants (Basel)*, **9**, 864, doi: 10.3390/antiox9090864.
3. Lankin, V. Z., and Tikhaze, A. K. (2003) Atherosclerosis as a free radical pathology and antioxidative therapy of this disease, *Free Radicals NO and Inflammation*, IOS Press, Amsterdam etc., **344**, 218-231.
4. Lankin, V. Z., and Tikhaze, A. K. (2017) Role of oxidative stress in the genesis of atherosclerosis and diabetes mellitus: a personal look back on 50 years of research, *Curr. Aging Sci.*, **10**, 18-25, doi: 10.2174/1874609809666160926142640.

5. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Melkumyants, A. M. (2022) Dicarbonyl-dependent modification of LDL as a key factor of endothelial dysfunction and atherosclerotic vascular wall damage, *Antioxidants (Basel)*, **11**, 1565, doi: 10.3390/antiox11081565.
6. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Melkumyants, A. M. (2023) Malondialdehyde as an important key factor of molecular mechanisms of vascular wall damage under heart diseases development, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 128, doi: 10.3390/ijms24010128.
7. Spiteller, G. (2008) Peroxyl radicals are essential reagents in the oxidation steps of the Maillard reaction leading to generation of advanced glycation end products, *Ann. NY Acad. Sci.*, **1126**, 128-133, doi: 10.1196/annals.1433.031.
8. Lankin, V. Z., Shadyro, O. I., Shumaev, K. B., Tikhaze, A. K., and Sladkova, A. A. (2019) Non-enzymatic methylglyoxal formation from glucose metabolites and generation of superoxide anion radical during methylglyoxal-dependend cross-links reaction, *J. Antioxidant Activity*, **1**, 34-45, doi: 10.14302/issn.2471-2140.jaa-19-2997.
9. Lankin, V. Z., Konovalova, G. G., Tikhaze, A. K., Shumaev, K. B., Belova-Kumskova, E. M., Grechnikova, M. A., and Viigimaa, M. (2016) Aldehyde inhibition of antioxidant enzymes in the blood of diabetic patients, *J. Diabetes*, **8**, 398-404, doi: 10.1111/1753-0407.12309.
10. Lankin, V. Z., Shumaev, K. B., Tikhaze, A. K., and Kurganov, B. I. (2017) Influence of dicarbonyls on kinetic characteristics of glutathione peroxidase, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **475**, 287-290, doi: 10.1134/S1607672917040123.
11. Sharapov, M. G., Gudkov, S. V., and Lankin, V. Z. (2021) Hydroperoxide reducing enzymes in the regulation of free radical processes, *Biochemistry (Moscow)*, **86**, 1256-1274, doi: 10.1134/S0006297921100084.
12. Witztum, J. L., and Steinberg, D. (1991) Role of oxidized low-density lipoprotein in atherogenesis, *J. Clin. Invest.*, **88**, 1785-1792, doi: 10.1172/JCI115499.
13. Yla-Herttuala, S. (1994) Role of lipid and lipoprotein oxidation in the pathogenesis of atherosclerosis, *Drugs Today*, **30**, 507-514.
14. Steinberg, D. (1995) Role of oxydized LDL and antioxidants in atherosclerosis, *Adv. Exp. Med. Biol.*, **369**, 39-48, doi: 10.1007/978-1-4615-1957-7_5.
15. Lankin, V., Viigimaa, M., Tikhaze, A., Kumskova, E., Konovalova, G., Abina, J., Zemtsovskaya, G., Kotkina, T., Yanushevskaya, E., and Vlasik, T. (2011) Cholesterol-rich low-density lipoproteins are also more oxidized, *Mol. Cell. Biochem.*, **355**, 187-191, doi: 10.1007/s11010-011-0853-y.
16. Viigimaa, M., Abina, J., Zemtsovskaya, G., Tikhaze, A., Konovalova, G., Kumskova, E., and Lankin, V. (2010) Malondialdehyde modified low-density lipoproteins as biomarker for atherosclerosis, *Blood Press*, **19**, 164-168, doi: 10.3109/08037051.2010.484158.
17. Sharapov, M. G., Goncharov, R. G., Gordeeva, A. E., Novoselov, V. I., Antonova, O. A., Tikhaze, A. K., and Lankin, V. Z. (2016) Enzymatic antioxidant system of endotheliocytes, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **471**, 410-412, doi: 10.1134/S1607672916060090.
18. Lankin, V. Z., Sharapov, M. G., Goncharov, R. G., Tikhaze, A. K., and Novoselov, V. I. (2019) Natural dicarbonyls inhibit peroxidase activity of peroxiredoxins, *Dokl. Biochem. Biophys.*, **485**, 132-134, doi: 10.1134/S1607672919020157.
19. Rubio-Gayosso, I., Platts, S. H., and Duling, B. R. (2006) Reactive oxygen species mediate modification of glycocalyx during ischemia-reperfusion injury, *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.*, **290**, H2247-H2256, doi: 10.1152/ajpheart.00796.2005.
20. Pirillo, A., Norata, G. D., and Catapano, A. L. (2013) LOX-1, OxLDL, and atherosclerosis, *Mediat. Inflamm.*, **2013**, 152786, doi: 10.1155/2013/152786.
21. Lubrano, V., and Balzan, S. (2014) LOX-1 and ROS, inseparable factors in the process of endothelial damage, *Free Radic. Res.*, **48**, 841-848, doi: 10.3109/10715762.2014.929122.
22. Chistiakov, D. A., Orekhov, A. N., and Bobryshev, Yu. V. (2016) LOX-1-mediated effects on vascular cells in atherosclerosis, *Cell. Physiol. Biochem.*, **38**, 1851-1859, doi: 10.1159/000443123.
23. Kattoor, A. J., Kanuri, S. H., and Mehta, J. L. (2019) Role of Ox-LDL and LOX-1 in atherogenesis, *Curr. Med. Chem.*, **26**, 1693-1700, doi: 10.2174/0929867325666180508100950.
24. Galle, J., Schneider, R., Heinloth, A., Wanner, C., Galle, P. R., Conzelmann, E., Dimmeler, S., and Heermeier, K. (1999) Lp(a) and LDL induce apoptosis in human endothelial cells and in rabbit aorta: role of oxidative stress, *Kidney Int.*, **55**, 1450-1461, doi: 10.1046/j.1523-1755.1999.00351.
25. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., Kapel'ko, V. I., Shepel'kova, G. S., Shumaev, K. B., Panasenko, O. M., Konovalova, G. G., and Belenkov, Y. N. (2007) Mechanisms of oxidative modification of low-density lipoproteins under conditions of oxidative and carbonyl stress, *Biochemistry (Moscow)*, **72**, 1081-1090, doi: 10.1134/S0006297907100069.
26. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Kumskova, E. M. (2012) Macrophages actively accumulate malonyldialdehyde-modified but not enzymatically oxidized low density lipoprotein, *Mol. Cell. Biochem.*, **365**, 93-98, doi: 10.1007/s11010-012-1247-5.
27. Lankin, V. Z., Tikhaze, A. K., and Konovalova, G. G. (2023) Oxidized lipoproteins: definition of the term and pathophysiologic effects, *Biochemistry (Moscow)*, **88**, 1910-1919, doi: 10.1134/S0006297923110196.
28. Antonov, A. S., Nikolaeva, M. A., Klueva, T. S., Romanov, Y. A., Babaev, V. R., Bystrevskaya, V. B., Perov, N. A., Repin, V. S., and Smirnov, V. N. (1986) Primary culture of endothelial cells from atherosclerotic human aorta. Part 1. Identification,

- morphological and ultrastructural characteristics of two endothelial cell subpopulations, *Atherosclerosis*, **59**, 1-19, doi: 10.1016/0021-9150(86)90027-4.
29. Tertov, V. V., Kaplun, V. V., Dvoryantsev, S. N., and Orekhov, A. N. (1995) Apolipoprotein B-bound lipids as a marker for evaluation of low-density lipoprotein oxidation *in vivo*, *Biochem. Biophys. Res. Commun.*, **214**, 608-613, doi: 10.1006/bbrc.1995.2329.
 30. Lowry, O. H., Rosebrough, N. J., Farr, A. L., and Randall, R. J. (1951) Protein measurement with the Folin phenol reagent, *J. Biol. Chem.*, **193**, 265-275, doi: 10.1016/S0021-9258(19)52451-6.
 31. Requena, J. R., Fu, M. X., Ahmed, M. U., Jenkins, A. J., Lyons, T. J., Baynes, J. W., and Thorpe, S. R. (1997) Quantification of malondialdehyde and 4-hydroxynonenal adducts to lysine residues in native and oxidized human low-density lipoprotein, *Biochem. J.*, **322**, 317-325, doi: 10.1042/bj3220317.
 32. Tikhaze, A. K., Domogatsky, S. P., and Lankin, V. Z. (2021) Clearance of carbonyl-modified low-density lipoproteins in rabbits, *Biochemistry (Moscow) Suppl. Ser. B Biomed. Chem.*, **15**, 119-124, doi: 10.1134/S1990750821020104.
 33. Lankin, V. Z., Konovalova, G. G., Domogatsky, S. P., Tikhaze, A. K., Klots, I. N., and Ezhov, M. V. (2023) Clearance and utilization of dicarbonyl-modified LDL in monkeys and humans, *Int. J. Mol. Sci.*, **24**, 10471, doi: 10.3390/ijms241310471.
 34. Schalkwijk, C. G., Vermeer, M. A., Stehouwer, C. D., te Koppele, J., Princen, H. M., and van Hinsbergh, V. W. (1998) Effect of methylglyoxal on the physicochemical and biological properties of low-density lipoprotein, *Biochim. Biophys. Acta*, **1394**, 187-198, doi: 10.1016/s0005-2760(98)00112-x.
 35. Sharapov, M. G., Glushkova, O. V., Parfenyuk, S. B., Gudkov, S. V., Lunin, S. M., and Novoselova, E. G. (2021) The role of TLR4/NF- κ B signaling in the radioprotective effects of exogenous Prdx6, *Arch. Biochem. Biophys.*, **702**, 108830, doi: 10.1016/j.abb.2021.108830.
 36. Schmittgen, T. D., and Livak, K. J. (2008) Analyzing real-time PCR data by the comparative CT method, *Nat. Protoc.*, **3**, 1101-1108, doi: 10.1038/nprot.2008.73.
 37. Bradford, M. M. (1976) A rapid and sensitive method for the quantitation of microgram quantities of protein utilizing the principle of protein-dye binding, *Anal. Biochem.*, **72**, 248-254, doi: 10.1006/abio.1976.9999.
 38. Sharapov, M. G., Goncharov, R. G., Parfenyuk, S. B., and Glushkova, O. V. (2022) Effect of peroxiredoxin 6 on p53 transcription factor level, *Biochemistry (Moscow)*, **87**, 839-849, doi: 10.1134/S0006297922080156.
 39. Aoyama, T., Fujiwara, H., Masaki, T., and Sawamura, T. (1999) Induction of lectin-like oxidized LDL receptor by oxidized LDL and lysophosphatidylcholine in cultured endothelial cells, *J. Mol. Cell. Cardiol.*, **31**, 2101-2114, doi: 10.1006/jmcc.1999.1041.
 40. Hong, D., Bai, Y. P., Gao, H. C., Wang, X., Li, L. F., Zhang, G. G., and Hu, C. P. (2014) Ox-LDL induces endothelial cell apoptosis via the LOX-1-dependent endoplasmic reticulum stress pathway, *Atherosclerosis*, **235**, 310-317, doi: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.04.028.
 41. Wang, Y. C., Lee, A. S., Lu, L. S., Ke, L. Y., Chen, W. Y., Dong, J. W., Lu, J., Chen, Z., Chu, C. S., Chan, H. C., Kuzan, T. Y., Tsai, M. H., Hsu, W. L., Dixon, R. A. F., Sawamura, T., Chang, K. C., and Chen, C. H. (2018) Human electronegative LDL induces mitochondrial dysfunction and premature senescence of vascular cells *in vivo*, *Aging cell*, **17**, e12792, doi: 10.1111/acer.12792.
 42. Bagci, E. Z., Vodovotz, Y., Billiar, T. R., Ermentrout, G. B., and Bahar, I. (2006) Bistability in apoptosis: roles of bax, bcl-2, and mitochondrial permeability transition pores, *Biophys. J.*, **90**, 1546-1559, doi: 10.1529/biophysj.105.068122.
 43. Batty, M., Bennett, M. R., and Yu, E. (2022) The role of oxidative stress in atherosclerosis, *Cells*, **11**, 3843, doi: 10.3390/cells11233843.
 44. Kohlgrüber, S., Upadhye, A., Dyballa-Rukes, N., McNamara, C. A., and Altschmied, J. (2017) Regulation of transcription factors by reactive oxygen species and nitric oxide in vascular physiology and pathology, *Antioxid. Redox Signal*, **26**, 679-699, doi: 10.1089/ars.2016.6946.
 45. Leonarduzzi, G., Sottero, B., and Poli, G. (2010) Targeting tissue oxidative damage by means of cell signaling modulators: the antioxidant concept revisited, *Pharmacol. Ther.*, **128**, 336-374, doi: 10.1016/j.pharmthera.2010.08.003.
 46. Szalóki, N., Krieger, J. W., Komáromi, I., Tóth, K., and Vámosi, G. (2015) Evidence for homodimerization of the c-Fos transcription factor in live cells revealed by fluorescence microscopy and computer modeling, *Mol. Cell. Biol.*, **35**, 3785-3798, doi: 10.1128/MCB.00346-15.
 47. Hirota, K., Matsui, M., Iwata, S., Nishiyama, A., Mori, K., and Yodoi, J. (1997) AP-1 transcriptional activity is regulated by a direct association between thioredoxin and Ref-1, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **94**, 3633-3638, doi: 10.1073/pnas.94.8.3633.
 48. Shi, T., and Dansen, T. B. (2020) Reactive oxygen species induced p53 activation: DNA damage, redox signaling, or both? *Antioxid. Redox Signal.*, **33**, 839-859, doi: 10.1089/ars.2020.8074.
 49. Ji, Z., He, L., Regev, A., and Struhl, K. (2019) Inflammatory regulatory network mediated by the joint action of NF- κ B, STAT3, and AP-1 factors is involved in many human cancers, *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*, **116**, 9453-9462, doi: 10.1073/pnas.1821068116.
 50. Kielian, T., Haney, A., Mayes, P. M., Garg, S., and Esen, N. (2005) Toll-like receptor 2 modulates the proinflammatory milieu in *Staphylococcus aureus*-

- induced brain abscess, *Infect. Immun.*, **73**, 7428-7435, doi: 10.1128/IAI.73.11.7428-7435.
51. Ohgi, K., Kajiya, H., Goto-T, K., Okamoto, F., Yoshinaga, Y., Okabe, K., and Sakagami, R. (2018) Toll-like receptor 2 activation primes and upregulates osteoclastogenesis via lox-1, *Lipids Health Dis.*, **17**, 132, doi: 10.1186/s12944-018-0787-4.
 52. Lee, W.-J., Ou, H.-C., Hsu, W.-C., Chou, M.-M., Tseng, J.-J., Hsu, S.-L., Tsai, K.-L., and Sheu, W. H.-S. (2010) Ellagic acid inhibits oxidized LDL-mediated LOX-1 expression, ROS generation, and inflammation in human endothelial cells, *J. Vasc. Surg.*, **52**, 1290-1300, doi: 10.1016/j.jvs.2010.04.085.
 53. Chan, S. H., Hung, C. H., Shih, J. Y., Chu, P. M., Cheng, Y. H., Lin, H. C., Hsieh, P. L., and Tsai, K. L. (2018) Exercise intervention attenuates hyperhomocysteinemia-induced aortic endothelial oxidative injury by regulating SIRT1 through mitigating NADPH oxidase/LOX-1 signaling, *Redox Biol.*, **14**, 116-125, doi: 10.1016/j.redox.2017.08.016.
 54. Zhao, R., Ma, X., Xie, X., and Shen, G. X. (2009) Involvement of NADPH oxidase in oxidized LDL-induced upregulation of heat shock factor-1 and plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **297**, E104-E111, doi: 10.1152/ajpendo.91023.2008.
 55. Furman, C., Martin-Nizard, F., Fruchart, J. C., Duriez, P., and Teissier, E. (1999) Differential toxicities of air (mO-LDL) or copper-oxidized LDLs (Cu-LDL) toward endothelial cells, *J. Biochem. Mol. Toxicol.*, **13**, 316-323, doi: 10.1002/(sici)1099-0461(1999)13:6<316::aid-jbt5>3.0.co;2-o.
 56. Sangle, G. V., Zhao, R., and Shen, G. X. (2008) Transmembrane signaling pathway mediates oxidized low-density lipoprotein-induced expression of plasminogen activator inhibitor-1 in vascular endothelial cells, *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.*, **295**, E1243-E1254, doi: 10.1152/ajpendo.90415.2008.
 57. Galvani, S., Coatrieux, C., Elbaz, M., Grazide, M. H., Thiers, J. C., Parini, A., Uchida, K., Kamar, N., Rostaing, L., Baltas, M., Salvayre, R., and Nègre-Salvayre, A. (2008) Carbonyl scavenger and anti-atherogenic effects of hydrazine derivatives, *Free. Radic. Biol. Med.*, **45**, 1457-1467, doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2008.08.026.
 58. Belkheiri, N., Bouguerne, B., Bedos-Belval, F., Duran, H., Bernis, C., Salvayre, R., Nègre-Salvayre, A., and Baltas, M. (2010) Synthesis and antioxidant activity evaluation of a syringic hydrazones family, *Eur. J. Med. Chem.*, **45**, 3019-3026, doi: 10.1016/j.ejmech.2010.03.031.

DICARBONYL-MODIFIED LOW-DENSITY LIPOPROTEINS ARE KEY INDUCERS OF *LOX-1* AND *NOX1* GENE EXPRESSION IN CULTURED HUMAN UMBILICAL VEIN ENDOTHELIOCYTES

V. Z. Lankin¹, M. G. Sharapov^{2*}, A. K. Tihaze¹, R. G. Goncharov², O. A. Antonova¹,
G. G. Konovalova¹, and V. I. Novoselov²

¹ National Medical Research Center of Cardiology named after Academician E. I. Chazov,
Ministry of Health of Russia, 121552 Moscow, Russia

² Institute of Cell Biophysics, Russian Academy of Sciences,
142290 Pushchino, Moscow Region, Russia; e-mail: sharapov.mg@yandex.ru

The expression of *LOX-1* and *NOX1* genes in human umbilical vein endothelial cells (HUVECs) when cultured in the presence of low-density lipoproteins (LDL) modified with various natural dicarbonyls was investigated for the first time. It was found that of the investigated dicarbonyl-modified LDLs (malondialdehyde (MDA)-modified LDLs, glyoxal-modified LDLs, and methylglyoxal-modified LDLs), namely MDA-modified LDLs caused the greatest induction of *LOX-1* and *NOX1* genes, as well as genes of antioxidant enzymes and genes of signaling molecules in HUVECs. MDA-modified LDLs also induce the highest peroxiredoxins expression of the studied antioxidant enzyme genes. The key role of dicarbonyl-modified LDLs in the molecular mechanisms of vascular wall damage and endothelial dysfunction is discussed.

Keywords: low-density lipoproteins (LDL), dicarbonyl-modified LDL, expression of *LOX-1* and *NOX1* genes, molecular mechanisms of atherogenesis and diabetogenesis