

ГЕНОМИКА.  
ТРАНСКРИПТОМИКА

УДК 577.218

ВЛИЯНИЕ АДИПОРОНА НА ЭКСПРЕССИЮ ГЕНОВ ЛИПИДНОГО  
ОБМЕНА В ПЕРВИЧНОЙ КУЛЬТУРЕ МАКРОФАГОВ ЧЕЛОВЕКА

© 2023 г. И. А. Побожьева<sup>а, б, \*</sup>, К. В. Драчева<sup>а, б</sup>, С. Н. Пчелина<sup>а, б, с</sup>, В. В. Мирошникова<sup>а, б</sup>

<sup>а</sup>Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Национальный исследовательский центр  
“Курчатовский институт”, Гатчина, Ленинградская обл., 188300 Россия

<sup>б</sup>Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова  
Министерства здравоохранения Российской Федерации Санкт-Петербург, 197022 Россия

<sup>с</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия

\*e-mail: perhaps\_to\_be@mail.ru

Поступила в редакцию 11.11.2022 г.

После доработки 08.01.2023 г.

Принята к публикации 25.01.2023 г.

Избыточное поглощение богатых холестерином липопротеинов низкой плотности макрофагами сосудистой стенки приводит к трансформации макрофагов в пенистые клетки, накоплению липидов в интима артерий и, как следствие, к образованию атеросклеротических бляшек и развитию сердечно-сосудистых заболеваний. Адипонектин — секретируемый жировой тканью адипокин, вызывает антиатерогенные и противовоспалительные эффекты, взаимодействуя с рецепторами AdipoR1 и AdipoR2. Одним из механизмов антиатерогенного действия адипонектина может быть участие в регуляции обратного транспорта холестерина и предотвращение образования пенистых клеток. Мы предположили, что низкомолекулярный агонист рецепторов адипонектина — адипорон — может модулировать экспрессию генов обратного транспорта холестерина и воспаления в макрофагах человека, и изучили влияние различных концентраций адипорона (0, 5, 10 и 20 мкМ) на экспрессию генов *ABCA1*, *ABCG1*, *APOA1*, *NR1H3 (LXRα)*, *NR1H2 (LXRβ)*, *PPARG*, *ACAT1*, *IL6*, *TNFA*, *TLR4* в клетках первичной культуры макрофагов человека, а также на макрофаги линии THP-1. Выживаемость клеток оценивали с использованием MTS-теста. Уровень мРНК генов *ABCA1*, *ABCG1*, *APOA1*, *NR1H3*, *NR1H2*, *PPARG*, *ACAT1*, *IL6*, *TNFA*, *TLR4* в первичной культуре макрофагов человека оценивали методом ПЦР в реальном времени. Показано увеличение относительного уровня мРНК генов *PPARG* и *ABCA1* при воздействии адипорона в концентрации 5 и 10 мкМ в течение суток. Отмечен цитотоксический эффект адипорона в высокой концентрации (20 мкМ), выраженный в большей степени в макрофагах линии THP-1. Полученные данные о влиянии адипорона на макрофаги человека и изучение возможных агонистов рецепторов адипонектина представляют значительный интерес, учитывая необходимость поиска новых подходов к профилактике и лечению атеросклероза.

**Ключевые слова:** адипорон, *ABCA1*, *PPARG*, обратный транспорт холестерина, макрофаги, THP-1

**DOI:** 10.31857/S0026898423040183, **EDN:** QLXHWK

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) — основная причина смертности во всем мире [1, 2], поэтому поиск молекулярных маркеров развития

Сокращения: ССЗ — сердечно-сосудистые заболевания; ИБС — ишемическая болезнь сердца; ЛПНП — липопротеины низкой плотности; *LXRα*, *LXRβ* — X-рецепторы печени α и β; *RXR* — ретиноидный X-рецептор; *PPARα*, *PPARγ* — рецепторы α и γ, активируемые пролифераторами пероксисом; *ABCA1*, *ABCG1* — ABC-кассетные транспортеры; ЛПВП — липопротеины высокой плотности; *OTX* — обратный транспорт холестерина; *AdipoR1*, *AdipoR2* — рецепторы адипонектина; *APOA1* — аполипопротеин A1; *ACAT-1* — ацил-СоА-холестерин-ацилтрансфераза-1; *TNF-α* — фактор некроза опухоли α; *IL-6* — интерлейкин-6; *TLR4* — Toll-подобный рецептор 4; *PBS* — фосфатно-солевой буфер; *DMSO* — диметилсульфоксид; *FBS* — эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота.

ССЗ и подходов к их лечению не теряет своей актуальности. Более половины смертей от ССЗ приходится на ишемическую болезнь сердца (ИБС), которая характеризуется нарушением кровоснабжения миокарда вследствие гемодинамически значимого поражения коронарных артерий [3, 4]. Атеросклероз — это многофакторное заболевание, при котором происходит накопление липидов, главным образом эфиров холестерина, в интима артерий [5]. Отличительным признаком начальных стадий атеросклеротических поражений является образование пенистых клеток, обусловленное неконтролируемым поглощением макрофагами богатых холестерином липопротеинов низкой плотности (ЛПНП), подверженных различным модификациям, таким как окисление,

ферментативное и неферментативное расщепление, агрегация, десИАлирование [2, 5–11].

Прогрессирование атеросклероза определяется двумя основными процессами — нарушением метаболизма липопротеинов, сопровождающимся накоплением внутриклеточных липидов, и развитием хронического воспаления, важную роль в котором, согласно последним данным, играет митохондриальная дисфункция [12]. Макрофаги захватывают модифицированные ЛПНП посредством рецептор-опосредованного фагоцитоза и пиноцитоза и секретируют широкий спектр факторов, регулирующих воспаление и фиброз [9, 13]. Последующая хронизация воспаления при атеросклерозе может вызываться активацией врожденного иммунитета, обусловленной мутациями митохондриальной ДНК (мтДНК) и нарушениями митофагии [14]. Предполагается, что накопление мутаций мтДНК в макрофагах приводит к снижению ими продукции АТФ, синтеза лизосомных липаз, а макрофаги при этом утрачивают способность метаболизировать модифицированные ЛПНП и, накапливая липиды, превращаются в пенистые клетки [15]. Таким образом, атеросклеротическое поражение возникает из-за локального воспаления в стенке артерий, которое становится хроническим и сопровождается неконтролируемым накоплением липидов [14].

Накопление клеточного холестерина приводит к активации нескольких транскрипционных факторов, включая X-рецепторы печени  $\alpha$  и  $\beta$  ( $LXR\alpha$ ,  $LXR\beta$ ), ретиноидный X-рецептор (RXR) и рецепторы, активируемые пролифератором пероксисом PPAR ( $PPAR\gamma$ ,  $PPAR\alpha$ ). Эти транскрипционные факторы регулируют экспрессию ABC-кассетных транспортеров ABCA1 и ABCG1. ABCA1 вместе с APOA1 участвует в биогенезе липопротеинов высокой плотности (ЛПВП), в то время как ABCG1 способствует оттоку холестерина из макрофагов на зрелые частицы ЛПВП. В процессе обратного транспорта холестерина (ОТХ) антиатерогенные ЛПВП принимают участие в транспорте холестерина из периферических тканей в печень для его последующей утилизации в составе желчных кислот [3, 16, 17].

Адипонектин — плейотропный адипокин, секретируемый жировой тканью, оказывает противовоспалительное, антидиабетическое и антиатерогенное действие, взаимодействуя с рецепторами AdipoR1 и AdipoR2, и может рассматриваться как важная терапевтическая мишень. Адипонектин участвует в углеводном и липидном обмене, регулирует чувствительность тканей к инсулину, уменьшает сосудистое воспаление и препятствует проатеросклеротическим процессам, т.е. адгезии моноцитов, трансформации макрофагов в пенистые клетки, миграции и пролиферации гладкомышечных клеток [18–21]. Участвуя в регуляции

липидного спектра крови, адипонектин защищает от развития атеросклероза и неалкогольной жировой болезни печени [22, 23]. Следует отметить, что более медленное прогрессирование атеросклеротических ССЗ у женщин может быть связано с рядом протективных факторов, в том числе, с более высокой концентрацией адипонектина в крови, чем у мужчин [24]. Однако нами не обнаружено различий в концентрации адипонектина в сыворотке крови мужчин и женщин, что может быть связано с ИБС у женщин в исследуемой выборке [25].

Снижение экспрессии гена адипонектина при ожирении, связанном с высоким риском развития ИБС, описано ранее [26–28]. Нами показано снижение концентрации адипонектина в сыворотке крови, а также относительного уровня мРНК и белка адипонектина в подкожной жировой ткани пациентов с ИБС по сравнению с контрольной группой [25].

Предполагается, что одним из механизмов, связанных с предотвращением образования пенистых клеток, может быть участие адипонектина в регуляции ОТХ. Liang и соавт. [29] показали, что адипонектин увеличивает экспрессию гена *ABCA1* как на уровне мРНК, так и на уровне белка, а также способствует оттоку холестерина на ApoA1 в макрофагах RAW264,7 путем активации  $LXR\alpha$  [29]. Адипонектин может влиять на темпы накопления липидов, снижая экспрессию гена, кодирующего ацил-CoA-холестерин-ацилтрансферазу-1 (ACAT-1), которая катализирует образование эфиров холестерина [30]. Помимо этого, противовоспалительное действие адипонектина может быть связано с подавлением секреции цитокинов, таких как TNF- $\alpha$  и IL-6 [31–33]. Поэтому актуальным представляется поиск соединений, усиливающих функциональную активность адипонектина. Адипорон, идентифицированный как низкомолекулярный агонист рецепторов адипонектина, улучшает метаболизм глюкозы и липидов, повышает чувствительность к инсулину как в культивируемой клеточной линии миоцитов, так и у мышей [34, 35]. Мы предположили, что адипорон может модулировать экспрессию генов ОТХ и воспаление в макрофагах человека.

Цель данной работы состояла в изучении влияния различных концентраций адипорона на экспрессию генов липидного обмена (*ABCA1*, *ABCG1*, *APOA1*, *NR1H3* ( $LXR\alpha$ ), *NR1H2* ( $LXR\beta$ ), *PPARG*, *ACAT1*) и воспаления (*IL6*, *TNFA*, *TLR4*) в макрофагах человека.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

**Культивирование макрофагов.** Первичные культуры макрофагов человека получены из образцов (30 мл) периферической крови трех здо-

ровых доноров. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ПСПБГМУ им. И.П. Павлова. Фракцию мононуклеарных клеток получали методом градиентного центрифугирования при 1600 об/мин в растворе фиколла ( $\rho = 1.077$ , “Corning”, США) по методике, описанной ранее [36], и дважды отмывали в холодном PBS. Далее мононуклеарные клетки ресуспендировали в культуральной среде (Alpha MEM, “Биолот”, Россия), содержащей 10% аутологичной сыворотки человека, 1% антибиотика (гентамицин), и инкубировали в 24-луночных планшетах в концентрации  $2 \times 10^5$  клеток на лунку в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub> при 37°C в течение 2 ч, после чего клетки промывали в PBS. Прикрепившиеся к чашкам Петри моноциты культивировали в течение 5 сут с заменой питательной среды на 1-е и 3-и сут.

Полученные клетки инкубировали в течение суток в культуральной среде, содержащей адипорон (“Sigma-Aldrich”, США) в концентрации 0 (DMSO), 5, 10 и 20 мкМ. Адипорон поставляется в лиофилизированном виде и растворяется в DMSO, поэтому DMSO использовали в качестве отрицательного контроля. Концентрации адипорона, в том числе предельно допустимые, определяли после проведения теста на выживаемость клеток (MTS-тест). После инкубации клетки отмывали в PBS и использовали для выделения РНК.

В работе также использовали клеточную линию моноцитарного лейкоза человека THP-1 (ЦКП “Коллекция клеточных культур позвоночных” Института цитологии РАН). Клетки культивировали в среде RPMI 1640 с добавлением 10% FBS, 2 мМ L-глутамина и 1% антибиотика (гентамицин) при 37°C в инкубаторе с 5% CO<sub>2</sub>. Для дифференцировки в макрофаги клетки рассаживали на 24-луночные планшеты по  $5 \times 10^5$  на лунку. Дифференцировку моноцитов THP-1 в макрофаги индуцировали форболовым эфиром (“Novus Biologicals”, США) в концентрации 50 нг/мл в течение 24 ч.

**MTS-тест.** MTS-тест проводили с помощью набора CellTiter 96® AQueous One Solution Cell Proliferation Assay (“Promega”, США). К 100 мкл питательной среды добавляли 20 мкл реагента CellTiter 96® AQueous One Solution и инкубировали при 37°C с 5% CO<sub>2</sub> в течение 1 ч. Жизнеспособность клеток определяли, измеряя оптическую плотность при 490 нм на спектрофотометре xMark (“Bio-Rad”, США).

**Определение уровня мРНК исследуемых генов.** РНК выделяли с использованием набора GeneJET RNA Purification Kit (“ThermoFisher Scientific”, США). кДНК получена методом обратной транскрипции с использованием набора MMLV RT kit (“Евроген”, Россия). Чистоту препарата РНК оценивали на спектрофотометре SmartSpecPlus (“Bio-Rad”) по соотношению поглощения при

длинах волн 260 и 280 нм (критерий чистоты 2). Отсутствие деградации РНК проверяли с помощью электрофореза в 1%-ном агарозном геле по соотношению интенсивности полос, соответствующих 28S и 18S рРНК (2 : 1 при отсутствии деградации).

Относительный уровень мРНК генов *ABCA1*, *ABCG1*, *APOA1*, *NR1H3*, *NR1H2*, *PPARG*, *ACAT1*, *IL6*, *TNFA*, *TLR4* определяли методом ПЦР в режиме реального времени с флуоресцентными зондами TaqMan на приборе CFX96 (“Bio-Rad”). Использовали праймеры и зонды, меченные различными флуорофорами (“ДНК-синтез”, Москва). Последовательности праймеров и зондов представлены в табл. 1.

Аmplификацию проводили с использованием Taq AB мастер-микса  $\times 2.5$  (“АлкорБио”, Россия) в 20 мкл смеси в следующем температурно-временном режиме: первый цикл – 95°C, 3 мин – предварительная денатурация; плавление – 95°C, 10 с; отжиг – 58°C, 30 с; синтез – 72°C, 10 с, 44 цикла. Достоверность и точность эксперимента обеспечивали, проводя измерения всех образцов как минимум в трех повторах. Относительный уровень мРНК исследуемых генов рассчитывали с использованием метода  $\Delta\Delta Ct$  с модификацией для нескольких референсных генов и выражали в относительных единицах [36].

**Статистическая обработка.** Статистическую обработку выполняли с использованием программ SPSS 23.0 для Windows и R-Studio. Статистический анализ различий между сравниваемыми группами проводили с использованием Н-критерия Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением методом Данна. Критический уровень статистической значимости принимали равным 0.05.

## РЕЗУЛЬТАТЫ ИССЛЕДОВАНИЯ

Нами оценена выживаемость клеток линии THP-1 и первичной культуры макрофагов в присутствии адипорона в концентрации от 0 до 25 мкМ. Для первичной культуры макрофагов выбрана концентрация 20 мкМ как максимальная для клеток данного типа. Воздействие адипорона в тех же концентрациях на клеточную линию THP-1 приводило к более значительному снижению их выживаемости, поэтому дальнейшие эксперименты с этими клетками не проводили (рис. 1).

Определен относительный уровень мРНК генов *ABCA1*, *ABCG1*, *APOA1*, *NR1H3*, *NR1H2*, *PPARG*, *ACAT1*, *IL6*, *TNFA*, *TLR4* в первичной культуре макрофагов человека после воздействия адипорона.

Показано, что воздействие адипорона в концентрации 5 и 10 мкМ на макрофаги человека вы-

**Таблица 1.** Структура олигонуклеотидных праймеров и зондов

Ген	Прямой (F) и обратный (R) праймеры и TaqMan® зонды
<i>ABCA1</i> (целевой ген)	F: 5'-CTCCTGTGGTGTCTTCTGGATG-3' R: 5'-CTTGACAACACTTAGGGCACA-3' 5' (FAM)-AAGCCCGGCGGTTCTTGTGG -3'(RTQ1)
<i>ABCG1</i> (целевой ген)	F: 5'-CACGTACCTACAGTGGATGT-3' R: 5'-GTCTAAGCCATAGATGGAGA-3' 5' (FAM)-CTATGTCAGGTATGGGTTCGAAG-3'(RTQ1)
<i>APOA1</i> (целевой ген)	F: 5'- CCTTGGGAAAACAGCTAAACC-3' R: 5'-CAGCTTGCTGAAGGTGGAG-3' 5' (FAM)-AGCTCCTTGACAACCTGGGACAGCGT-3' (BHQ1)
<i>ACAT1</i> (целевой ген)	F: 5'-TCAATGGAGGAGCTGTTTCTC-3' R: 5'-AGACCGTATTCTCCTTGCTTCA-3' 5' (FAM)-AATTGGGATGTCTGGAGCCA-3' (RTQ1)
<i>IL6</i> (целевой ген)	F: 5'-ACAACCTGAACCTTCCAAAGA-3' R: 5'-ACCTCAAACCTCCAAAAGACCA-3' 5' (FAM)-CAATGAGGAGACTTGCCTGGTGA-3' (BHQ1)
<i>NR1H3(LXRα)</i> (целевой ген)	F: 5'-TCACCTTCCTCAAGGATTTCA-3' R: 5'-TCGAAGATGGGGTTGATGA-3' 5' (FAM)-TAACCGGGAAGACTTTGCCAAAGCA-3'(RTQ1)
<i>NR1H2(LXRβ)</i> (целевой ген)	F: 5'-CTGTTGCTTGGAGAGGGGC-3' R: 5'-CGTGGTAGGAGAGGACATGG-3' 5' (FAM)-CTGGAGAGAGGCTGCTCCGTGA-3'(RTQ1)
<i>TNFA</i> (целевой ген)	F: 5'-CCA-GGG-ACC-TCT-CTC-TAA-TCA-3' R: 5'-CTA-CAA-CAT-GGG-CTA-CAG-GC-3' 5' (FAM)-CTCTGGCCAGGCAGTCGAATCA-3' (BHQ1)
<i>TLR4</i> (целевой ген)	F: 5'-GAGACCAGAAAGCTGGGAG-3' R: 5'-GTAGAAATTCAGCTCCATGC-3' 5' (FAM)-CCTGCGTGGAGGTGGTTCCTAA-(RTQ1)-3'
<i>PPARG</i> (целевой ген)	F: 5'-GATGTCTCATAATGCCATCACGTT-3' R: 5'-GGATTCAGCTGGTTCGATATCACT-3' 5' (FAM)-CCAACAGCTTCTCCTTCTCGGCCTG-3' (RTQ1)
<i>RPLP0</i> (референсный ген)	F: 5'-GATCAGGGACATGTTGCTGG-3' R: 5'-GACTTCACATGGGGCAATGG-3' 5'(ROX)-CAATAAGGTGGCAGCTGCTGC-3' (RTQ2)
<i>ACTB</i> (референсный ген)	F: 5'-CGTGCTGCTGACCGAGG-3' R: 5'-ACAGCCTGGATAGCAACGTAC-3' 5'(HEX)-CCAACCGCGAGAGGATGACCCAGAT-3' (BHQ1)

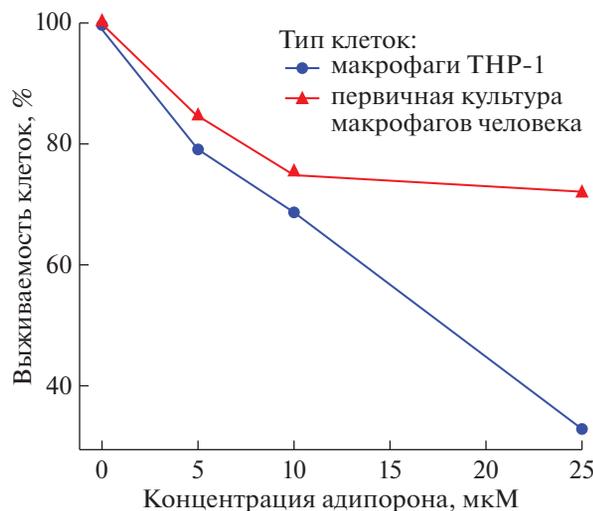
звало повышение уровня мРНК генов *ABCA1* и *PPARG* ( $p < 0.05$  и  $p < 0.05$  соответственно) (рис. 2, 3).

Не выявлено изменений в относительном уровне мРНК генов *ABCG1*, *APOA1*, *NR1H3*, *NR1H2*, *ACAT1*, *IL6*, *TNFA*, *TLR4* при воздействии адипорона.

## ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

Адипорон – это низкомолекулярный агонист рецепторов AdipoR1 и AdipoR2 адипонектина. Активация рецепторов приводит к запуску ряда сигнальных каскадов, через которые могут реали-

зоваться антиатерогенные свойства адипонектина [34, 38, 39]. В нашей работе впервые изучено воздействие адипорона на экспрессию генов липидного обмена (*ABCA1*, *ABCG1*, *APOA1*, *NR1H3*, *NR1H2*, *PPARG*, *ACAT1*) и воспаления (*IL6*, *TNFA*, *TLR4*) в макрофагах человека. Мы наблюдали увеличение экспрессии генов *PPARG* и *ABCA1* при концентрациях адипорона 5 и 10 мкМ. Ранее было показано, что адипонектин время- и дозозависимым образом усиливает экспрессию гена *ABCA1* в макрофагах мыши, активируя LXRα, а также экспрессию генов *ABCA1*, *NR1H3* и *PPARG* в макрофагах человека [29, 40]. Уровень экспрессии ге-



**Рис. 1.** Выживаемость клеток первичной культуры макрофагов и клеток ТНР-1 после воздействия различных концентраций адипорона.

на *ABCG1* при этом не изменялся, как показано и в нашем исследовании [40].

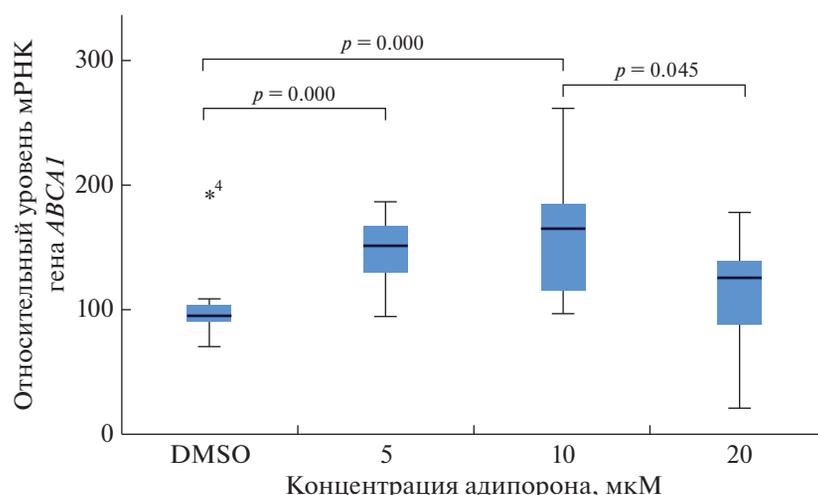
В исследовании Furukawa и соавт. показано, что воздействие рекомбинантного адипонектина приводит к снижению экспрессии гена *ACAT1* в макрофагах человека, однако наши данные это не подтверждают. Можно предположить, что отсутствие влияния адипорона обусловлено необходимостью дополнительной инкубации в присутствии ЛПНП и может проявляться при экстремальном накоплении липидов [30].

Однако следует отметить, что большой разброс в уровнях мРНК большинства исследуемых генов, наблюдаемый при использовании адипорона в концентрации 20 мкМ, может указывать на

цитотоксический эффект больших концентраций адипорона и затруднять его применение в терапевтических целях. Этим может объясняться и снижение относительного уровня мРНК генов *ABCA1* и *PPARG*, вызванное воздействием 20 мкМ адипорона, по сравнению с 10 мкМ. Показано, что инъекции адипорона в высоких дозах подавляют пролиферацию клеток гиппокампа у мышей [41]. В исследовании Duan и соавт. адипорон в концентрации более 6 мкМ вызывал значительную гибель клеток первичной культуры хондроцитов человека [42].

Адипорон, как и адипонектин, снижает индуцированную полиинозиновой-полицитидиловой кислотой и липополисахаридом продукцию провоспалительных цитокинов, в частности таких, как  $TNF\alpha$  и  $IL-6$ , в макрофагах человека. Однако адипорон не влиял на продукцию цитокинов нестимулированными макрофагами человека [43]. Мы также не наблюдали изменений в экспрессии генов *IL6*, *TNFA*, *TLR4*, что соответствует данным [43].

Нами показано, что воздействие повышенных концентраций адипорона на макрофаги ТНР-1 приводит к снижению их жизнеспособности. Аналогичные данные получены и на линии клеток пигментного эпителия ARPE-19: адипорон снижал пролиферацию и миграцию этих клеток в зависимости от дозы [44]. Вероятно, это связано с тем, что адипорон обладает цитотоксической и противоопухолевой активностью, как показано в ряде работ [45–47]. Предполагается, что снижение жизнеспособности клеток рака поджелудочной железы связано в основном с RIPK1-зависимым некроптозом и в меньшей степени с независимым от каспазы апоптозом и аутофагической гибелью клеток, вызванной митохондриальной дисфункцией [48]. Изучение роли адипонектина



**Рис. 2.** Относительный уровень мРНК гена *ABCA1* в макрофагах после воздействия адипорона.

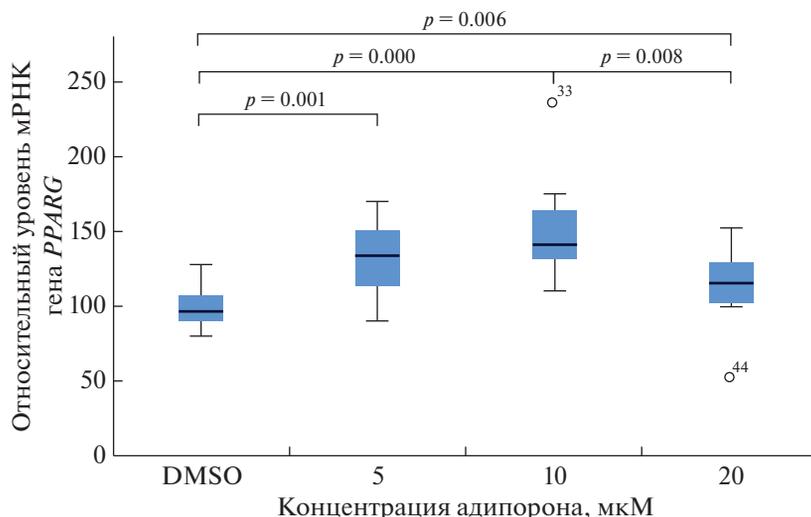


Рис. 3. Относительный уровень мРНК гена *PPARG* в макрофагах после воздействия адипорона.

в развитии опухолей [49, 50] показало, что при раке молочной железы адипонектин как стимулирует рост, так и ингибирует пролиферацию различных типов клеток [51]. Адипонектин индуцирует ингибирование роста и апоптоз клеток рака легкого и снижает скорость пролиферации клеток колоректального рака [52–54], а также доз- и времязависимым образом подавляет пролиферацию и жизнеспособность клеток рака щитовидной железы [55]. Кроме того, обнаружено, что адипонектин ингибирует подвижность клеток рака щитовидной железы и их способность к инвазии [55]. По-видимому, результаты изучения воздействия адипорона и, вероятно, адипонектина, полученные на иммортализованных клеточных линиях, таких как ТНР-1, могут отличаться от результатов, полученных на первичных культурах клеток.

Поиск новых терапевтических подходов к профилактике и лечению атеросклероза остается актуальным, поэтому необходимо дальнейшее изучение механизма действия адипорона, осуществляемого с помощью рецепторов адипонектина.

## ВЫВОДЫ

Показано повышение экспрессии генов *PPARG* и *ABCA1* в первичной культуре макрофагов человека в присутствии адипорона в концентрации 5 и 10 мкМ. Влияние адипорона на экспрессию генов липидного обмена и воспаления говорит о возможном участии адипорона в стимуляции ОТХ в первичной культуре макрофагов человека. Отмечен цитотоксический эффект более высоких концентраций адипорона.

Авторы выражают признательность за помощь в работе с клетками линии ТНР-1 и обсуждение

результатов сотрудникам Института экспериментальной медицины С.В. Орлову, Е.Е. Ларионовой, Д.А. Тянянскому.

Эксперименты по изучению экспрессии генов в первичной культуре макрофагов выполнены в рамках государственного задания по теме “Изучение молекулярных и клеточных компонентов патогенеза социально-значимых заболеваний для разработки методов ранней диагностики и лечения” (регистрационный номер № 121060200125-2); эксперименты по оценке выживаемости клеток ТНР-1 выполнены в рамках государственного задания “Молекулярно-клеточные механизмы активации транспорта липопротеинов через эндотелий на разных стадиях атерогенеза” (шифр № FGWG-2022-0003).

Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом ПСПбГМУ им. И.П. Павлова. Все участники подписали добровольное информированное согласие на участие в исследовании.

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ghantous C.M., Kamareddine L., Farhat R., Zouein F.A., Mondello S., Kobeissy F., Zeidan A. (2020) Advances in cardiovascular biomarker discovery. *Biomedicines*. **8**, 552.
2. Libby P., Buring J.E., Badimon L., Hansson G.K., Deanfield J., Bittencourt M.S., Tokgözoğlu L., Lewis E.F. (2019) Atherosclerosis. *Nat. Rev. Dis. Primers*. **5**, 56.
3. Крюков Н.Н., Николаевский Е.Н., Поляков В.П. (2010) *Ишемическая болезнь сердца (современные аспекты клиники, диагностики, лечения, профилактики, медицинской реабилитации, экспертизы): Монография*. Самара: ФГОУ ВПО “Самарский государ-

- ственный медицинский университет Росздрава”, 651 с.
4. Severino P., D’Amato A., Pucci M., Infusino F., Adamo F., Birtolo L.I., Netti L., Montefusco G., Chimenti C., Lavallo C., Maestrini V., Mancone M., Chilian W.M., Fedele F. (2020) Ischemic heart disease pathophysiology paradigms overview: from plaque activation to microvascular dysfunction. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 8118.
  5. Рыжкова А.И., Карагодин В.П., Сухоруков В.Н., Сазонова М.А., Орехов А.Н. (2017) Десилированные липопротеины низкой плотности в крови человека. *Clin. Medicine. Russ. J.* **95**(3), 216–221.
  6. Miller Y.I., Choi S., Fang L., Harkewicz R. (2009) Toll-like receptor-4 and lipoprotein accumulation in macrophages. *Trends Cardiovasc. Med.* **19**, 227–232.
  7. Demina E.P., Smutova V., Pan X., Fougerat A., Guo T., Zou C., Chakraborty R., Snarr B.D., Shiao T.C., Roy R., Orekhov A.N., Miyagi T., Laffargue M., Sheppard D.C., Cairo C.W., Pshezhetsky A.V. (2021) Neuraminidases 1 and 3 trigger atherosclerosis by desialylating low-density lipoproteins and increasing their uptake by macrophages. *J. Am. Heart. Assoc.* **10**, e018756.
  8. Мищенко Е.Л., Мищенко А.М., Иванисенко В.А. (2021) Механочувствительные молекулярные взаимодействия в атерогенных районах артерий: развитие атеросклероза. *Вавил. журн. генетики и селекции.* **25**, 552–561.
  9. Yu X., Fu C., Zhang D., Yin K., Tang C. (2013) Foam cells in atherosclerosis. *Clinica Chimica Acta.* **424**, 245–252.
  10. Chistiakov D.A., Bobryshev Y.V., Orekhov A.N. (2016) Macrophage-mediated cholesterol handling in atherosclerosis. *J. Cell. Mol. Med.* **20**, 17–28.
  11. Shemiakova T., Ivanova E., Grechko A.V., Gerasimova E.V., Sobenin I.A., Orekhov A.N. (2020) Mitochondrial dysfunction and DNA damage in the context of pathogenesis of atherosclerosis. *Biomedicine.* **8**, 166.
  12. Shemiakova T., Ivanova E., Wu W.K., Kirichenko T.V., Starodubova A.V., Orekhov A.N. (2021) Atherosclerosis as mitochondriopathy: repositioning the disease to help finding new therapies. *Front. Cardiovasc. Med.* **8**, 660473.
  13. Никифоров Н.Г., Грачев А.Н., Собенин И.А., Орехов А.Н., Кжышковска Ю.Г. (2012) Макрофаги и метаболизм липопротеинов в атеросклеротическом поражении. *Патологическая физиология.* **13**, 900–922. [www.medline.ru](http://www.medline.ru)
  14. Bezsonov E.E., Sobenin I.A., Orekhov A.N. (2021) Immunopathology of atherosclerosis and related diseases: focus on molecular biology. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 4080.
  15. Смирнова Л.А., Хасанова З.Б., Ежов М.В., Полевая Т.Ю., Матчин Ю.Г., Балахонова Ю.Г., Собенин И.А., Постнов А.Ю. (2014) Связь мутаций митохондриального генома с атеросклеротическим поражением коронарных и сонных артерий. *Клиницист.* **1**, 34–41.
  16. Remmeriea A., Scott C.L. (2018) Macrophages and lipid metabolism. *Cell. Immunol.* **330**, 27–42.
  17. Miroshnikova V.V., Panteleeva A.A., Pobozheva I.A., Razgildina N.D., Polyakova E.A., Markov A.V., Belyaeva O.D., Berkovich O.A., Baranova E.I., Nazarenko M.S., Puzryev V.P., Pchelina S.N. (2021) ABCA1 and ABCG1 DNA methylation in epicardial adipose tissue of patients with coronary artery disease. *BMC Cardiovasc. Disord.* **21**, 566.
  18. Liberale L., Bonaventura A., Vecchiè A., Matteo C., Dallegri F., Montecucco F., Carbone F. (2017) The role of adipocytokines in coronary atherosclerosis. *Curr. Atherosclerosis Rep.* **19**, 10.
  19. Villarreal-Molina M.T., Antuna-Puente B. (2012) Adiponectin: anti-inflammatory and cardioprotective effects. *Biochimie.* **94**, 2143–2149.
  20. Choi H.M., Doss H.M., Kim K.S. (2020) Multifaceted physiological roles of adiponectin in inflammation and diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1219.
  21. van Stijn C.M.W., Kim J., Lusi A.J., Barish G.D., Tangirala R.K. (2015) Macrophage polarization phenotype regulates adiponectin receptor expression and adiponectin anti-inflammatory response. *FASEB J.* **29**, 636–649.
  22. Shabalala S.C., Dlodla P.V., Mabasa L., Kappo A.P., Basson A.K., Pfeiffer C., Johnson R. (2020) The effect of adiponectin in the pathogenesis of non-alcoholic fatty liver disease (NAFLD) and the potential role of polyphenols in the modulation of adiponectin signaling. *Biomed. Pharmacother.* **131**, 110785
  23. Lia H., Yub X.H., Ouc X., Ouyang X.P., Tang C.K. (2021) Hepatic cholesterol transport and its role in non-alcoholic fatty liver disease and atherosclerosis. *Prog. Lipid Res.* **83**, 101109.
  24. Christen T., Trompet S., Noordam R., van Klinken J.B., van Dijk K.W., Lamb H.J., Cobbaert C.M., den Heije M., Jazet I.M., Jukema J.W., Rosendaal F.R., de Mutser R. (2018) Sex differences in body fat distribution are related to sex differences in serum leptin and adiponectin. *Peptides.* **107**, 25–31
  25. Побожева И.А., Разгильдина Н.Д., Полякова Е.А., Пантелеева А.А., Беляева О.Д., Нифонтов С.Е., Галкина О.В., Колодина Д.А., Беркович О.А., Баранова Е.И., Пчелина С.Н., Мирошникова В.В. (2020) Экспрессия гена адипонектина в эпикардальной и подкожной жировой ткани при ишемической болезни сердца. *Кардиология.* **60**, 62–69.
  26. Jonas M.I., Kurylowicz A., Bartoszewicz Z., Lisik W., Jonas M., Domienik-Karłowicz J., Puzianowska-Kuznicka M. (2017) Adiponectin/resistin interplay in serum and in adipose tissue of obese and normal-weight individuals. *Diabetol. Metab. Syndr.* **9**, 95.
  27. Sadashiv, Tiwari S., Paul B.N., Kumar S., Chandra A., Dhananjai S., Pal M., Negi S. (2013) Adiponectin mRNA in adipose tissue and its association with metabolic risk factors in postmenopausal obese women. *Hormones.* **12**, 119–127.
  28. Разгильдина Н.Д., Бровин Д.Л., Побожева И.А., Пантелеева А.А., Мирошникова В.В., Беляева О.Д., Нифонтов С.Е., Галкина О.В., Колодина Д.А., Беркович О.А., Баранова Е.И., Пчелина С.Н., Мирошникова В.В. (2018) Экспрессия гена *ADIPOQ* в подкожной и интраабдоминальной жировой ткани у женщин с различной степенью ожирения. *Цитология.* **60**, 531–535.
  29. Liang B., Wang X., Guo X., Yang Z., Bai R., Liu M., Xiao C., Bian Y. (2015) Adiponectin upregulates ABCA1 expression through liver X receptor alpha signaling pathway in RAW 264.7 macrophages. *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* **8**, 450–457.
  30. Furukawa K., Hori M., Ouchi N., Kihara S., Funahashi T., Matsuzawa Y., Miyazaki A., Nakayama H.,

- Horiuchi S. (2004) Adiponectin down-regulates acyl-coenzyme A: cholesterol acyltransferase-1 in cultured human monocyte-derived macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **317**, 831–836.
31. Yuan B., Huang L., Yan M., Zhang S., Zhang Y., Jin B., Ma Y., Luo Z. (2018) Adiponectin downregulates TNF- $\alpha$  expression in degenerated intervertebral discs. *Spine (Phila Pa 1976)*. **43**, E381–E389.
  32. Choi H.M., Doss H.M., Kim K.S. (2020) Multifaceted physiological roles of adiponectin in inflammation and diseases. *Int. J. Mol. Sci.* **21**, 1219.
  33. Ohashi K., Parker J.L., Ouchi N., Higuchi A., Vita J.A., Gokce N., Pedersen A.A., Kalthoff C., Tullin S., Sams A., Summer R., Walsh K. (2010) Adiponectin promotes macrophage polarization toward an anti-inflammatory phenotype. *J. Biol. Chem.* **285**, 6153–6160.
  34. Zhang Y., Zhao J., Li R., Lau W.B., Yuan Y., Liang B., Li R., Gao E., Koch W.J., Ma X., Wang Y. (2015) AdipoRon, the first orally active adiponectin receptor activator, attenuates postischemic myocardial apoptosis through both AMPK-mediated and AMPK-independent signaling. *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* **309**, E275–E282.
  35. Okada-Iwabu M., Iwabu M., Ueki K., Yamauchi T., Kadowaki T. (2015) Perspective of small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Diabetes Metab. J.* **39**, 363–372.
  36. Натвиг Д.Б., Перлманн П., Визгель Х. (1980) *Лимфоциты: выделение, фракционирование и характеристика*. Москва: Медицина, 185–201.
  37. Мирошникова В.В., Пантелеева А.А., Баженова Е.А., Демина Е.П., Усенко Т.С., Николаев М.А., Семенова И.А., Неймарк А.Е., Хе Чж., Беляева О.Д., Беркович О.А., Баранова Е.И., Пчелина С.Н. (2016) Регуляция экспрессии генов транспортеров ABCA1 и ABCG1 в интраабдоминальной жировой ткани. *Биомед. химия*. **62**, 283–289.
  38. Okada-Iwabu M., Yamauchi T., Iwabu M., Honma T., Hamagami K., Matsuda K., Yamaguchi M., Tanabe H., Kimura-Someya T., Shirouzu M., Ogata H., Tokuyama K., Ueki K., Nagano T., Tanaka A., Yokoyama S., Kadowaki T. (2013) A small-molecule AdipoR agonist for type 2 diabetes and short life in obesity. *Nature*. **503**, 493–499.
  39. Tian L., Luo N., Zhu X., Chung B.H., Garvey W.T., Fu Y. (2012) Adiponectin-adipoR1/2-APPL1 signaling axis suppresses human foam cell formation; differential ability of AdipoR1 and AdipoR2 to regulate inflammatory cytokine responses. *Atherosclerosis*. **221**, 66–75.
  40. Tsubakio-Yamamoto K., Matsuura F., Koseki M., Oku H., Sandoval J.C., Inagaki M., Nakatani K., Nakaoka H., Kawase R., Yuasa-Kawase M., Masuda D., Ohama T., Maeda N., Nakagawa-Toyama Y., Ishigami M., Nishida M., Kihara S., Shimomura I., Yamashita S. (2008) Adiponectin prevents atherosclerosis by increasing cholesterol efflux from macrophages. *Biochem. Biophys. Res. Commun.* **375**, 390–394.
  41. Lee T.H., Christie B.R., van Praag H., Lin K., Ming-Fai Siu P., Xu A., So K., Yau S. (2021) AdipoRon treatment induces a dose-dependent response in adult hippocampal neurogenesis. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 2068.
  42. Duan Z., Tu C., Liu Q., Li S., Li Y., Xie P., Li Z. (2020) Adiponectin receptor agonist AdipoRon attenuates calcification of osteoarthritic chondrocytes by promoting autophagy. *J. Cell. Biochem.* **121**, 3333–3344.
  43. Salvatore H., Grassin-Delyle S., Brollo M., Couderc L., Abrial C., Victoni T., Naline E., Devillier P. (2021) Adiponectin inhibits the production of TNF- $\alpha$ , IL-6 and chemokines by human lung macrophages. *Front. Pharmacol.* **12**, 718929.
  44. Mallardo M., Costagliola C., Nigro E., Daniele A. (2021) AdipoRon negatively regulates proliferation and migration of ARPE-19 human retinal pigment epithelial cells. *Peptides*. **146**, 170676.
  45. Messaggio F., Mendonsa A.M., Castellanos J., Nagathihalli N.S., Gorden L., Merchant N.B., VanSaun M.N. (2017) Adiponectin receptor agonists inhibit leptin induced pSTAT3 and *in vivo* pancreatic tumor growth. *Oncotarget*. **8**, 85378–85391.
  46. Ramzan A.A., Bitler B.G., Hicks D., Barner K., Qamar L., Behbakht K., Powell T., Jansson T., Wilson H. (2019) Adiponectin receptor agonist AdipoRon induces apoptotic cell death and suppresses proliferation in human ovarian cancer cells. *Mol. Cell. Biochem.* **461**, 37–46.
  47. Wang S., Wang C., Wang W., Hao Q., Liu Y. (2020) Adiponectin receptor agonist AdipoRon inhibits the proliferation of myeloma cells via the AMPK/autophagy pathway. *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. **28**, 171–176.
  48. Akimoto M., Maruyama R., Kawabata Y., Tajima Y., Takenaga K. (2018) Antidiabetic adiponectin receptor agonist AdipoRon suppresses tumour growth of pancreatic cancer by inducing RIPK1/ERK-dependent necroptosis. *Cell Death Dis.* **9**, 804.
  49. Parida S., Siddharth S., Sharma D. (2019) Adiponectin, obesity, and cancer: clash of the bigwigs in health and disease. *Int. J. Mol. Sci.* **20**, 2519.
  50. Nigro E., Daniele A., Salzillo A., Ragone A., Naviglio S., Sapio L. (2021) AdipoRon and other adiponectin receptor agonists as potential candidates in cancer treatments. *Int. J. Mol. Sci.* **22**, 5569.
  51. Mauro L., Pellegrino M., De Amicis F., Ricchio E., Giordano F., Rizza P., Catalano S., Bonofiglio D., Sisci D., Panno M.L., Andò S. (2014) Evidences that estrogen receptor  $\alpha$  interferes with adiponectin effects on breast cancer cell growth. *Cell Cycle*. **13**, 553–564.
  52. Illiano M., Nigro E., Sapio L., Caiafa I., Spina A., Scudiero O., Bianco A., Esposito S., Mazzeo F., Pedone P.V., Daniele A., Naviglio S. (2017) Adiponectin down-regulates CREB and inhibits proliferation of A549 lung cancer cells. *Pulm. Pharmacol. Ther.* **45**, 114–120.
  53. Nigro E., Scudiero O., Sarnataro D., Mazzarella G., Sofia M., Bianco A., Daniele A. (2013) Adiponectin affects lung epithelial A549 cell viability counteracting TNF- $\alpha$  and IL-1 $\beta$  toxicity through AdipoR1. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* **45**, 1145–1153.
  54. Kim A.Y., Lee Y.S., Kim K.H., Lee J.H., Lee H.K., Jang S., Kim S., Lee G.Y., Lee J., Jung S., Chung H.Y., Jeong S., Kim J.B. (2010) Adiponectin represses colon cancer cell proliferation via AdipoR1- and -R2-mediated AMPK activation. *Mol. Endocrinol.* **24**, 1441–1452.
  55. Nigro E., Orlandella F.M., Polito R., Mariniello R.M., Monaco M.L., Mallardo M., De Stefano A.E., Iervolino P.L.C., Salvatore G., Daniele A. (2021) Adiponectin and leptin exert antagonizing effects on proliferation and motility of papillary thyroid cancer cell lines. *J. Physiol. Biochem.* **77**, 237–248.

## The Effect of Adiporon on Lipid Metabolism Genes Expression in Human Macrophages

I. A. Pobozeva<sup>1, 2, \*</sup>, K. V. Dracheva<sup>1, 2</sup>, S. N. Pchelina<sup>1, 2, 3</sup>, and V. V. Miroshnikova<sup>1, 2</sup>

<sup>1</sup>Petersburg Nuclear Physics Institute named by B.P. Konstantinov of National Research Centre "Kurchatov Institute", Gatchina, Leningrad Region, 188300 Russia

<sup>2</sup>Pavlov First St.-Petersburg State Medical University, Saint-Petersburg, 197022 Russia

<sup>3</sup>Institute of Experimental Medicine, Saint-Petersburg, 197376 Russia

\*e-mail: perhaps\_to\_be@mail.ru

Atherosclerosis is characterized by excessive uptake of cholesterol-rich low-density lipoproteins by the vascular wall macrophages. It leads to macrophage transformation into foam cells, accumulation of lipids in the intima of the arteries, atherosclerotic plaques development and following progression of cardiovascular diseases. Adiponectin, adipose tissue adipokine, has anti-atherogenic and anti-inflammatory effects that are mediated through binding to its receptors – AdipoR1 and AdipoR2. One of the mechanisms of adiponectin anti-atherogenic activity may be the participation in the regulation of reverse cholesterol transport and prevention of foam cells formation. We assumed that AdipoRon, a small-molecule adiponectin receptor agonist, could modulate the reverse cholesterol transport and inflammation genes expression in human macrophages. The aim of the present study was to investigate the effect of various concentrations of AdipoRon on the lipid metabolism *ABCA1*, *ABCG1*, *APOA1*, *NR1H3* (*LXR $\alpha$* ), *NR1H2* (*LXR $\beta$* ), *PPARG*, *ACAT1* genes expression and inflammation *IL6*, *TNFA*, *TLR4* genes expression in human macrophages. Primary human macrophages and THP-1 macrophages cell line were treated with various concentrations of AdipoRon. Cell viability was measured using the MTS assay. *ABCA1*, *ABCG1*, *APOA1*, *NR1H3*, *NR1H2*, *PPARG*, *ACAT1*, *IL6*, *TNFA*, *TLR4* mRNA levels in the primary human macrophages was assessed using real-time PCR. The increase of *PPARG* and *ABCA1* mRNA levels was shown in the primary human macrophages after 5 and 10  $\mu$ M AdipoRon treatment for 24 h. At the same time high concentration (20  $\mu$ M) of AdipoRon has cytotoxic effect on macrophages, especially, on THP-1 cell line. The effect of AdipoRon on human macrophages and the investigation of potential adiponectin receptor agonists is of interest, due to the search for new approaches to the prevention and treatment of atherosclerosis.

**Keywords:** AdipoRon, *ABCA1*, *PPARG*, reverse cholesterol transport, macrophages, THP-1