

УДК: 615.225



## ИЗУЧЕНИЕ АНТИАТЕРОСКЛЕРОТИЧЕСКОЙ И ЭНДОТЕЛИОПРОТЕКТИВНОЙ АКТИВНОСТИ ПЕПТИДНЫХ АГОНИСТОВ ГЕТЕРОРЕЦЕПТОРА EPOR/CD131

О.А. Пученкова<sup>1</sup>, С.В. Надеждин<sup>1</sup>, В.О. Солдатов<sup>2</sup>, М.А. Жученко<sup>3</sup>, Д.С. Коршунова<sup>2</sup>, М.В. Кубекина<sup>2</sup>, Е.Н. Коршунов<sup>2</sup>, Л.В. Корокина<sup>1</sup>, П.А. Голубинская<sup>4</sup>, А.Л. Куликов<sup>1</sup>, В.В. Гуреев<sup>1</sup>, Покровский В.М.<sup>1</sup>, Патраханов Е.А.<sup>1</sup>, Лебедев П.Р.<sup>1</sup>, Т.А. Денисюк<sup>5</sup>, В.С. Беляева<sup>1</sup>, Мовчан Е.А.<sup>1</sup>, Лепетюха Е.И.<sup>1</sup>, Покровский М.В.<sup>1</sup>

<sup>1</sup> ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет», 308015, Россия, г. Белгород, ул. Победы, 85

<sup>2</sup> ФГБУН «Институт биологии гена РАН», 119334, Россия, г. Москва, ул. Вавилова, 34/5

<sup>3</sup> НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика, 123098, Россия, г. Москва, пл. Академика Курчатова, 1

<sup>4</sup> Клинико-диагностическая лаборатория, Бюджетное учреждение здравоохранения Воронежской области «Воронежская областная клиническая офтальмологическая больница» (БУЗ ВО «ВОКОБ»), 394030, Россия, г. Воронеж, ул. Революции 1905 года, д. 22

<sup>5</sup> ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет», 305041, Россия, г. Курск, ул. Карла Маркса, 3

E-mail: zinkfingers@gmail.com

Получено 10.04.2020

Рецензия (1) 20.05.2020

Рецензия (2) 28.05.2019

Принята к печати 30.05.2020

**Введение.** Препараты, воздействующие на митохондриальную дисфункцию, оксидативный стресс, апоптоз и воспаление сосудистой стенки, обладают высоким потенциалом при профилактике и лечении атеросклеротических поражений. В этой связи применение агонистов гетерорецептора EPOR/CD131, которые обладают подобным спектром фармакологических эффектов, является одной из перспективных стратегий в лечении кардиоваскулярных заболеваний.

**Материалы и методы.** Исследование было проведено на 68 самцах мышей C57Bl/6J. Атеросклероз моделировали на трансгенных животных с эндотелиоспецифичным нокадауном гена *Polg* путем моделирования баллонной травмы и содержания на западной диете. Затем в течение 27 дней вводили изучаемые препараты 1 раз в 3 дня в дозе 20 мкг/кг. На 28-й день животных эвтаназировали и оценивали площадь атеросклеротических бляшек. Также в тканях аорты определяли экспрессию генов, связанных с процессами воспаления, антиоксидантной защиты, апоптоза, ангиогенеза. Кроме того, было изучено эндотелиопротективное действие пептидов на первичных культурах эндотелиоцитов диких и трансгенных мышей *Polg-D257A*.

**Результаты.** Мы не обнаружили статистически значимого влияния препаратов на площадь липидной инфильтрации. Однако исследуемые пептиды значимо уменьшили экспрессию провоспалительных генов *iNos*, *Icam1*, *Vcam1*, *Sele*, *Il6*, *Tnfa*, генов, связанных с ангиогенезом *Vegfa*, *Flt-1* и *Hif1a*, экспрессию проапоптотических факторов и более чем в 1,5 раза снизили соотношение *Bax/Bcl-2*. Кроме того, пептиды дозозависимо увеличили выживаемость эндотелиоцитов при добавлении H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro*.

**Заключение.** Используемые пептиды на основе эритропоэтина способны улучшать функциональное состояние сосудистой стенки на фоне атеросклеротического поражения и оказывают угнетающее влияние на патобиологические процессы, связанные с митохондриальной дисфункцией. Кроме того, исследуемые пептиды оказывают значимый эндотелиопротективный эффект при индукции оксидативного стресса *in vitro*.

**Ключевые слова:** атеросклероз, производные эритропоэтина, митохондриальная дисфункция, оксидативный стресс

**Для цитирования:** Пученкова О.А., Надеждин С.В., Жученко М.А., Коршунова Д.С., Кубекина М.В., Коршунов Е.Н., Корокина Л.В., Голубинская П.А., Куликов А.Л., Гуреев В.В., Покровский В.М., Патраханов Е.А., Лебедев П.Р., Денисюк Т.А., Беляева В.С., Мовчан Е.А., Лепетюха Е.И., Покровский М.В. Изучение антиатеросклеротической и эндотелиопротективной активности пептидных агонистов гетерорецептора EPOR/CD131. *Фармация и фармакология*. 2020;8(2):100-111. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-100-111

© Пученкова О.А., Надеждин С.В., Жученко М.А., Коршунова Д.С., Кубекина М.В., Коршунов Е.Н., Корокина Л.В., Голубинская П.А., Куликов А.Л., Гуреев В.В., Покровский В.М., Патраханов Е.А., Лебедев П.Р., Денисюк Т.А., Беляева В.С., Мовчан Е.А., Лепетюха Е.И., Покровский М.В., 2020

**For citation:** Puchenkova O.A., Nadezhdin S.V., Soldatov V.O., Zhuchenko M.A., Korshunova D.S., Kubekina M.V., Korshunov E.N., Korokina L.V., Golubinskaya P.A., Kulikov A.L., Gureev V.V., Pokrovskiy V.M., Patrakhanov E.A., Lebedev P.R., Denisyuk T.A., Belyaeva V.S., Movchan E.A., Lepetukha E.I., Pokrovskiy M.V. Study of antiatherosclerotic and endothelioprotective activity of peptide agonists of EPOR/CD131 heteroreceptor. *Pharmacy & Pharmacology*. 2020;8(2):100-111. DOI: 10.19163/2307-9266-2020-8-2-100-111

## STUDY OF ANTIATHEROSCLEROTIC AND ENDOTHELIOPROTECTIVE ACTIVITY OF PEPTIDE AGONISTS OF EPOR/CD131 HETERORECEPTOR

Puchenkova O.A.<sup>1</sup>, Nadezhdin S.V.<sup>1</sup>, Soldatov V.O.<sup>2</sup>, Zhuchenko M.A.<sup>3</sup>, Korshunova D.S.<sup>2</sup>, Kubekina M.V.<sup>2</sup>, Korshunov E.N.<sup>2</sup>, Korokina L.V.<sup>1</sup>, Golubinskaya P.A.<sup>4</sup>, Kulikov A.L.<sup>1</sup>, Gureev V.V.<sup>1</sup>, Pokrovskiy V.M.<sup>1</sup>, Patrakhanov E.A.<sup>1</sup>, Lebedev P.R.<sup>1</sup>, Denisjuk T.A.<sup>5</sup>, Belyaeva V.S.<sup>1</sup>, Movchan E.A.<sup>1</sup>, Lepetukha E.I.<sup>1</sup>, Pokrovskiy M.V.<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Belgorod State National Research University, 85, Pobeda Str., Belgorod, 30801

<sup>2</sup>Institute of Gene Biology of the Russian Academy of Sciences, 34/5, Vavilov Str., Moscow, Russia, 11933

<sup>3</sup>Russian Research Center "Kurchatov Institute" – State Science Research Institute of Genetics, 1, Academician Kurchatov Square, Moscow, Russia, 123098

<sup>4</sup>Clinical diagnostic laboratory Voronezh Regional Clinical Ophthalmological Hospital, 22, Revolution of 1905 Str., Voronezh, Russia, 394030

<sup>5</sup>Kursk State Medical University, 3, Karl Marx Str., Kursk, Russia, 305041

E-mail: zinkfingers@gmail.com

Received 10 April 2020

Review (1) 20 May 2020

Review (2) 28 May 2020

Accepted 30 May 2020

**Introduction.** The drugs affecting a mitochondrial dysfunction, oxidative stresses, apoptosis and inflammation of the vascular wall, have a high potential for the prevention and treatment of atherosclerotic lesions. In this regard, the use of EPOR/CD131 heteroreceptor agonists which have a similar spectrum of pharmacological effects, is one of the promising strategies in the treatment of cardiovascular diseases.

**Materials and Methods.** The study was carried out on 68 C57Bl/6J male mice. Atherosclerosis was simulated in transgenic animals with an endotheliospecific knockdown of the *Polg* gene by simulating a balloon injury and keeping on a Western diet. Then, the studied drugs were injected once every 3 days at the dose of 20 µg/kg for 27 days. On the 28-th day, the animals were euthanized and the area of atherosclerotic plaques was assessed. The gene expression associated with the processes of inflammation, antioxidant protection, apoptosis, and angiogenesis was also determined in the aortic tissues. In addition, the endothelium protective effect of peptides on primary cultures of endothelial cells of wild and transgenic *Polg-D257A* mice was studied.

**Results.** No statistically significant effect of drugs on the area of lipid infiltration have been found. However, the studied peptides have significantly reduced the expression of proinflammatory genes (*iNos*, *Icam1*, *Vcam1*, *Sele*, *Il6*, *Tnfa*), the genes associated with angiogenesis (*Vegfa*, *Kdr*, and *Hif1a*), the expression of proapoptotic factors; they decreased the Bax/Bcl-2 ratio by more than 1.5 times. In addition, when supplemented with H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> *in vitro*, peptides dose-dependently increased endothelial cell survival.

**Conclusion.** The erythropoietin-based peptides can be used to improve the functional state of the vascular wall against the background of atherosclerotic lesions and have a depressing effect on pathobiological processes associated with a mitochondrial dysfunction. In addition, the studied peptides have a significant endothelial protective effect in the induction of oxidative stress *in vitro*.

**Keywords:** atherosclerosis, erythropoietin derivatives, mitochondrial dysfunction, oxidative stress

### ВВЕДЕНИЕ

Атеросклероз – хроническое заболевание стенок сосудов, характеризующееся асептическим воспалением, нарушением перфузии органов и тканей, склонностью к тромбообразованию и прогрессирующей с возрастом дисфункцией сосудистой стенки. В 1912 г. на заседании Общества русских врачей в Санкт-Петербурге крупный российский ученый Н.Н. Аничков, именем которого в настоящее время названа премия за самые выдающиеся исследования в области атеросклероза, совместно с С.С. Халатовым представил первые результаты своих революционных исследований, касающихся выявления

связи между алиментарными факторами, уровнем холестерина крови и атеросклерозом. Со времен этих работ, атеросклероз рассматривается, в первую очередь, как заболевание, вызванное накоплением в сосудистой стенке холестерина [1]. Эта концепция до сих пор является ключевой для снижения кардиоваскулярного риска. Тем не менее, сейчас общепризнано, что дислипидемия является единственной причиной атеросклероза только при семейных гиперхолестеринемиях. В других случаях атеросклероз – это результат совокупного действия ряда патогенетических факторов, среди которых выделяют эндотелиальную дисфункцию [2], гемодинамическую пере-

грузку [3–5], миграцию гладкомышечных клеток [6], хроническое стерильное воспаление сосудов и ряд других процессов.

Отдельное место в патобиологии атеросклероза отводится нарушению работы митохондрий [7]. Митохондрии являются главным генератором активных форм кислорода (АФК) в клетке. Например, известно, что, проходя по окислительно-восстановительному градиенту электронно-транспортной цепи, 1–3% электронов преждевременно реагируют с кислородом в комплексах I и III с образованием супероксида и других типов АФК [8]. При разных патологических состояниях, включая гипоксию и воспаление, их количество может увеличиваться. Кроме того, митохондрии выполняют в сосудистых клетках не только метаболическую, но также важную регуляторную и сигнальную роль [8].

Немаловажно также, что дисфункция митохондрий в других клетках, включая нейроны и кардиомиоциты приводит к снижению их резистентности к ишемии, что выражается в увеличении летальных исходов на фоне мозгового инсульта, окклюзии коронарных артерий, инфаркте почек и других органов. В связи с обозначенными сведениями, патогенетический каскад, объединяющий митохондриальную дисфункцию и атеросклероз, становится актуальной мишенью для фармакологического воздействия.

В качестве перспективного терапевтического подхода для воздействия на митохондриальное звено при поражении сосудистой стенки, могут быть рассмотрены агонисты гетеродимерного рецептора эритропоэтина EPOR/CD131. Первым препаратом из данной группы был 11-аминокислотный пептид rHBSP (pyroglutamate helix B surface peptide), открытый в 2008 г. научной группой под руководством Майкла Брайнса [9]. Прежде мы продемонстрировали, что данный пептид оказывает выраженное эндотелиопротективное действие при моделировании L-NAME-индуцированной эндотелиальной дисфункции у крыс [10, 11]. Однако в этом исследовании нами также был выявлен побочный эффект в виде протромботического действия. В этой связи мы попробовали модернизировать данную молекулу путем добавления трипептидных мотивов, обладающих антиагрегантным действием. В результате было получено два принципиально новых соединения, сочетающих в себе цитопротективный [12] и антиагрегантный (собственные неопубликованные данные) эффекты. Здесь мы сообщаем о результатах изучения антиатеросклеротической активности этих соединений.

**ЦЕЛЬ ИССЛЕДОВАНИЯ** – оценка антиатеросклеротических и эндотелиопротективных свойств коротких пептидных производных эритропоэтина.

## МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

### Животные и диета

В качестве основной тест-системы были использованы мыши C57Bl/6J. Животные были переданы в дар ЦКП Института биологии гена РАН и содержа-

лись в центре доклинических исследований НИИ Фармакологии живых систем. После прохождения 14-дневного карантинного режима мыши были стратифицированы по массе и рассажены в отдельные конвенциональные клетки в соответствии с принадлежностью к экспериментальной группе. До и во время выполнения исследования животные содержались в помещениях с искусственным освещением (режим 12 ч./12 ч.) при температуре 21–23 °С, влажности 38–50% и имели свободный доступ к корму и воде. Номер заключения независимого этического комитета 06-09/02-1 от 16.12.2019 г.

В исследование было включено 16 самцов дико-го типа и 52 самца (25–30 г) с генотипом Polg-D257A/Cdh5-CRE на фоне C57Bl/6J. Генотип ассоциирован с эндотелиоспецифичным нокдауном гена Polg, кодирующего фермент полимераза гамма. Нарушения в работе данного фермента приводят к развитию митохондриальной дисфункции [13, 14]. Данная линия была создана в ЦКП «Геномное редактирование» ИБГ РАН для изучения эффектов оксидативного стресса и митохондриальной дисфункции. Линия характеризуется наличием мутантной формы гена Polg под контролем CAG промотора и стоп-кассеты, фланкированной LoxP-сайтами (неопубликованные данные), принципиальное устройство конструкции описано в статье [15]. После скрещивания с мышами Cdh5-CRE происходит эндотелиоспецифичное удаление стоп-касеты и гиперэкспрессия мутантной формы Polg в эндотелии.

За 2 недели до операции животных помещали на западную диету с 2% содержанием холестерина.

При работе соблюдались требования Закона РФ «О защите животных от жестокого обращения» от 24.06.1998 г., правил лабораторной практики при проведении доклинических исследований в РФ (ГОСТ 3 51000.3-96 и ГОСТ Р 53434-2009), директивы Европейского сообщества (86/609 EC), правил Международных рекомендаций Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях (1997) и Правил лабораторной практики, принятых в Российской Федерации (приказ МЗ РФ № 708 от 29.08.2010 г.).

### Хирургические процедуры

Операцию выполняли на подогревочном столике под препаративным микроскопом. Под наркозом золазепам (Virbas, Россия) 2,5 мг/100 г + ксилазин (Биогель, Беларусь) 2 мг/100 г внутривентриально животным после выполнения срединной лапаротомии выделяли аорту на уровне между бифуркацией и отхождением почечных артерий.

На обнаженный сосуд накладывали две клипсы, надсекали между ними артериальную стенку и вводили начальный участок баллонного катетера (рис. 1). Затем снимали проксимальную клипсу и продвигали катетер в краниальном направлении на 10 мм.

После этого на 40 секунд нагнетали в баллон катетера воду, раздувая его до диаметра 1,5 мм при давлении 10 бар. Наконец, катетер извлекали, на разрез в аорте накладывали три шва, рану ушивали. После операции животных помещали в индивидуальные клетки с простерилизованным бумажным подстилом и наблюдали за ними до пробуждения.

Для облегчения послеоперационного болевого синдрома в течение 3 дней с момента операции животные получали Метамизол натрия (Фармстандарт-Лексредства (Россия) с питьевой водой *ad libitum* в концентрации 50 мг вещества на 100 мл воды [16, 17].

#### Дизайн эксперимента и введение препаратов

Животные с генотипом *Polg<sup>D257A</sup> Cdh5-CRE* были разделены 5 равных групп:

1) Интактные – животные без моделирования патологии и без введения препаратов (n=12);

2) Контроль – животные с моделированием патологии (баллонная травма + западная диета с повышенным содержанием холестерина), которым, начиная с 1-го дня, вводили воду для инъекций подкожно в объеме 0,1 мл/10 г (n=12);

3) *P-αB* – животные, с моделированием патологии, которым, начиная с 1-го дня, вводили пептид *P-αB* (ООО «Фармапарк») подкожно в дозе 20 мкг/кг 1 раз в 3 дня в течение 27 дней (суммарная доза 180 мкг/кг, n=12);

4) *P-αB1* – животные, с моделированием патологии, которым, начиная с 1-го дня, вводили пептид *P-αB1* (ООО «Фармапарк») подкожно в дозе 20 мкг/кг 1 раз в 3 дня в течение 27 дней (суммарная доза 180 мкг/кг, n=12);

5) *P-αB3* – животные, с моделированием патологии, которым, начиная с 1-го дня вводили пептид *P-αB3* (ООО «Фармапарк») подкожно в дозе 20 мкг/кг 1 раз в 3 дня в течение 27 дней (суммарная доза 180 мкг/кг, n=12) (табл. 1).

#### Измерение площади атеросклеротической бляшки

Четверым животным из каждой группы было выполнено макроскопическое изучение атеросклеротических бляшек аорты. Вкратце, на 28-й день после моделирования баллонной травмы животных эвтаназируют передозировкой наркоза (золазепам 10 мг/100 г внутривентриально) и аккуратно извлекали брюшную аорту от бифуркации до участка на уровне диафрагмы.

Затем препараты продольно рассекали, расправляли на пенопластовой подложке, промывали 50% раствором этанола и погружали в раствор Oil Red O на 15 минут. После этого препараты промывали дистиллированной водой и делали цифровые фотографии. На полученных снимках с использованием программы *imageJ* рассчитывали отношение площа-

ди атеросклеротической бляшки (окрашенной красным) к интактной ткани.

#### Количественная ПЦР

У остальных животных после эвтаназии ткань аорты в области нанесения баллонного повреждения забирали, гомогенизировали и 10 минут инкубировали при 37 °С в растворе «Extract RNA». После лизирования образца в реагенте его подвергли хлороформной очистке, надосадочную пробу собирали и промывали изопропиловым спиртом и 70%-ным этиловым спиртом. Концентрацию полученной РНК измеряли на спектрофотометре IMPLENNanoPhotometer® и довели до концентрации 300 нг/мкл.

Обратную транскрипцию проводили с использованием набора MMLVRTSK021 в соответствии с протоколом фирмы-производителя (Evrogen). Смесь аккуратно перемешивали и в течение 2 минут прогревали при 70 °С для расплавления вторичных структур РНК и последующего отжига праймера OligoDT. После переносили образцы в лед. Всю реакционную смесь инкубировали 60 мин при 40 °С в термоциклере T100™ ThermalCycler (Bio-Rad).

Для остановки реакции прогревали смесь при 70 °С в течение 10 минут. Полученную кДНК разводили до концентрации 1 нг/мкл. Уровень экспрессии гена оценивали относительно значений референсного гена *Gapdh*. Расчет экспрессии в конкретной точке производился по формуле: Экспрессия гена =  $[(Ct(Gapdh)/Ct(Ген\ интереса))]$  (таб. 2).

#### In vitro изучение цитопротективной активности

У 6-ти интактных мышей (4 животных генотипом *Polg<sup>D257A</sup>/Cdh5-CRE* и 4 животных дикого типа) после эвтаназии в стерильных условиях выделяли нижнюю полую вену и промывали раствором DPBS (Thermo FS) до полного удаления крови. Затем вену надсекали для обнажения внутренней поверхности и помещали в 0,2% раствор коллагеназы в DPBS с добавлением 0,9 mM  $CaCl_2$ , 0,493 mM  $MgCl_2$ , 5,56 mM глюкозы, 0,327 mM пирувата натрия, пенициллина и стрептомицина (Lonza), подвергая интиму ферментативной диссоциации. Для увеличения эффективности отделения эндотелиоцитов внутренний слой отслаивали стерильным пинцетом. Раствор коллагеназы, содержащий клетки, собирали в пробирку 5 мл, полученные эндотелиальные клетки культивировали в среде DMEM-F12 (Lonza) с добавлением 20 mM буфера HEPES (Lonza), 5 ЕД/мл гепарина, 200 мкг/мл ECGF (Sigma-Aldrich), 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Thermoscientific,) при 37 °С во влажной атмосфере, содержащей 5%  $CO_2$  [18].

Жизнеспособность клеток измеряли количественным колориметрическим анализом МТТ, который обеспечивает чувствительные измерения метаболических статусов клеток, в частности митохондриального статуса, которые могут отражать ранние окислительно-восстановительные изменения.

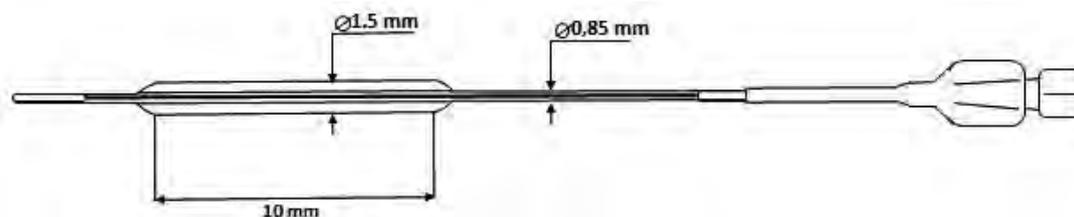


Рисунок 1 – Схематическое изображение и размеры баллонного катетера

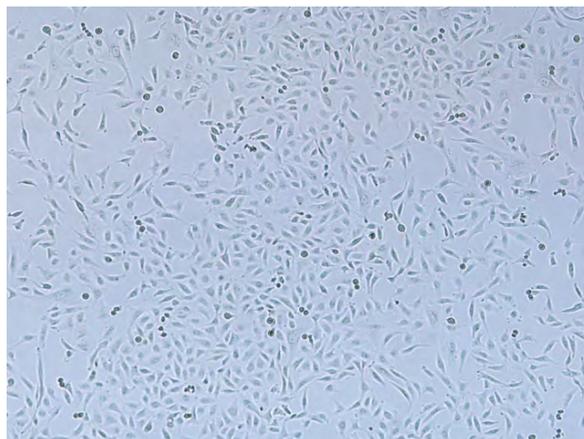


Рисунок 2 – Первичный монослой эндотелиальных клеток мыши (ув. x40)

Таблица 1 – Аминокислотная последовательность исследуемых соединений

Лабораторный шифр	Аминокислотная последовательность
P-αB	___QEQLERALNSS
P-αB1	RGDQEQLERALNSS
P-αB3	KGDQEQLERALNSS

Таблица 2 – Праймеры, используемые для количественной ПЦР

Ген	F-праймер	R-праймер	Длина продукта (п.н.)	GenBank
Trp53 (p53)	CGACTACAGTTAGGGGGCAC	CCATGGCAGTCATCCAGTCT	95	NM_001127233.1
Bcl2	TCACCCCTGGTGACAACAT	TTCCACAAAGGCATCCCAGC	102	NM_009741.5
Bax	CCCGAGCTGATCAGAACCAT	GAGGCCTCCCAGCCAC	96	NM_007527.3
Pon2	CTTCCACACTGCCACCTGAT	TCCTGGGAATTTAGACCCACA	105	NM_000305.3
Sod2	GGCTGGCTTGGCTTCAATAAG	AGCGGAATAAGGCCTGTTGTT	95	NM_013671.3
Vegfa (VEGF-A)	GGGCCTCCGAAACCATGAA	TGCAGCCTGGGACCACTTG	95	NM_001025250.3
Flt-1 (VEGF)	CCCATCGGCAGACCAATACA	CGGTGCAGTTGAGGACAAGA	96	NM_001363135.1
Nos2 (iNOS)	GCTCTAGTGAAGCAAAGCCCA	GGGATTCTGGAACATTCTGTGC	103	NM_001313921.1
Icam1	CTCCGGACTTTTCGATCTTCCA	CCTTCCAGGGAGCAAACAAC	98	NM_010493.3
Vcam1	TACTGTTTGCAGTCTCTAAGC	CGTAGTGCTGCAAGTGAGGG	101	NM_011693.3
Sele (E-selectin)	GGGAAGAAGACTGTCCTAGCC	AGGGGAGCTGGCTTCTAAG	96	XM_006496715.3
Hif1a	AGAACAACCTTGAGCTGGCGT	TGGAGGTGAACTAGGCTCTGT	103	NM_001092957.1
Casp1 (Каспаза-1)	TGTATTACAGCCCTGTTGGA	CCCTCAGGATCTTGTCAGCC	100	NM_009807.2
Casp3 (Каспаза-3)	GCTTGAACGGTACGCTAAG	CTTGCTCCCATGTATGGTCTT	105	NM_001284409.1
Il6	GACTGGGGATGTCTGTAGCTC	TGGATGGAAGTCTCTTGCAG	103	NM_001314054.1
Tnfa (TNFα)	ACTGAACTTCGGGGTGATCG	ACTTGGTGGTTTGTGAGTGTG	105	NM_001278601.1
Gapdh	GGGTCCCAGCTTAGGTTTCATC	CCCAATACGGCCAATCCGT	100	NM_001289726.1

Вкратце, экспоненциально растущие клетки высевали в 96-луночный планшет с плотностью  $4 \times 10^4$  клеток на лунку. Затем клетки обрабатывали исследуемыми пептидами P- $\alpha$ B, P- $\alpha$ B1, P- $\alpha$ B3 (ООО «Фармапарк») в 3-х концентрациях – 5, 30, 50 мкг/мл в течение 2 часов. После предварительной обработки в культуральную среду добавляли  $H_2O_2$  до конечной концентрации в конечной концентрации 200 мкМ в течение 24 часов. Клетки отрицательного контроля обрабатывали только  $H_2O_2$ , а клетки положительного контроля не обрабатывали ничем. После инкубации в течение 24 часов в каждую лунку добавляли 10 мкл реагента набора для анализа МТТ и клетки инкубировали в течение дополнительного часа. Поглощение каждого продукта реакции измеряли с помощью микропланшет-ридера на длине волны 450 нм. Результаты выражены в процентах от поглощения МТТ контрольных клеток, который был принят за 100% (рис. 2).

#### Статистическая обработка

Полученные данные были проверены на нормальность распределения с использованием критерия Шапиро-Уилка. Данные с нормальным распределением сравнивали между собой с применением One-way ANOVA с пост-хок анализом по HSD Тьюки. Данные с ненормальным распределением сравнивали с применением теста Крускала-Уоллеса и пост-хок анализом по методу Данна.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ

##### Макроскопическая оценка бляшки

При макроскопическом анализе было обнаружено, что к 28-му дню после моделирования баллонной травмы во всех препаратах аорты, окрашенных краской Oil Red O визуализировались липидные отложения, характерные для атеросклероза.

В то же время степень повреждения очень сильно варьировала внутри групп, что затруднило интерпретацию полученных результатов. В итоге мы не обнаружили достоверных различий между контрольной группой и группами с применением тестируемых препаратов, хотя некая тенденция к снижению площади наблюдалась в группе с применением P- $\alpha$ B1 (рис. 3).

##### Количественная ПЦР

С использованием молекулярно-биологического анализа тканей бляшки было обнаружено, что изучаемые пептиды выражено снижают экспрессию проапоптотических факторов Вах, каспазы 1 и каспазы-3, а также незначительно увеличивают экспрессию антиапоптотического фактора Bcl-2. Как видно из тепловой карты на рисунке 2 наибольший эффект продемонстрировал препарат P- $\alpha$ B1 (рис. 4А).

Для интегральной оценки проапоптотической направленности тканей мы рассчитали соотношение экспрессии Вах к Bcl-2. Средний расчетный пока-

затель Вах/Bcl-2 составил 0,67 в группе интактных животных, 1,81 в контрольной группе, 1,19 в группе с применением P- $\alpha$ B, 0,96 в группе с применением P- $\alpha$ B1 и 1,09 в группе с применением P- $\alpha$ B3 (рис. 4Б).

Наряду с антиапоптотическим действием, изучаемые препараты снизили повышенную на фоне травмы экспрессию генов воспалительных маркеров iNOS и молекул межклеточной адгезии ICAM-1, VCAM-1 и E-селектина. Наиболее выраженный эффект был получен в группе с применением соединения P- $\alpha$ B1 (рис. 5).

Кроме того, исследуемые препараты снизили экспрессию факторов, связанных с ангиогенезом VEGF-A, VEGFR, а также HIF-1a (рис. 6).

Наконец, нами было обнаружено, что на фоне моделирования атеросклероза у мышей *Polg*<sup>-D257A</sup>/*Cdh5-CRE* происходит увеличение экспрессии генов антиоксидантных ферментов PON2, SOD2. При этом по сравнению с контролем на фоне применения тестируемых пептидов экспрессия генов антиоксидантной системы была снижена. Также, как и при оценке влияния пептидов на провоспалительные и проангиогенные гены, наиболее выраженный эффект был получен в группе с применением соединения P- $\alpha$ B1 (рис. 7).

##### Изучение цитопротекторной активности in vitro

При проведении МТТ-теста на первичных культурах эндотелиоцитов было обнаружено, что даже без добавления  $H_2O_2$  эндотелиоциты, экспрессирующие *Polg*<sup>-D257A</sup>, характеризуются более низкой интенсивностью сигнала по сравнению с диким типом. При инкубации с  $H_2O_2$  большая часть эндотелиоцитов *Polg*<sup>-D257A</sup> теряла интенсивность сигнала почти в пять раз с 80,60 (95% CI 77,29–84,94) до 15,79 (95% CI 11,97–25,42) (рис. 8).

Исследуемые препараты дозозависимо увеличивали выживаемость клеток в условиях оксидативного стресса, вызванного добавлением  $H_2O_2$ . При этом как видно из рисунка модифицированные пептиды (P- $\alpha$ B1 и P- $\alpha$ B3) оказывали более выраженный эффект по сравнению с базовым соединением (P $\alpha$ B) при добавлении в эквивалентных дозах.

##### ОБСУЖДЕНИЕ

Пептидные агонисты гетерорецептора EPOR/CD131 являются активаторами связанных с эритропоэтином каскадов цитопротекции. Соединения P- $\alpha$ B1 и P- $\alpha$ B3 наряду с первичными антиапоптотическими свойствами обладают также антиагрегантной активностью, которая достигается за счет внесения трипептидных мотивов KGD и RGD. В данном исследовании в качестве экспериментальной модели для изучения антиатеросклеротической активности P- $\alpha$ B1 и P- $\alpha$ B3 мы использовали трансгенных мышей с митохондриальной дисфункцией на фоне тканеспецифичного нокаута гена *Polg*, кодирующего полимеразу гамма.

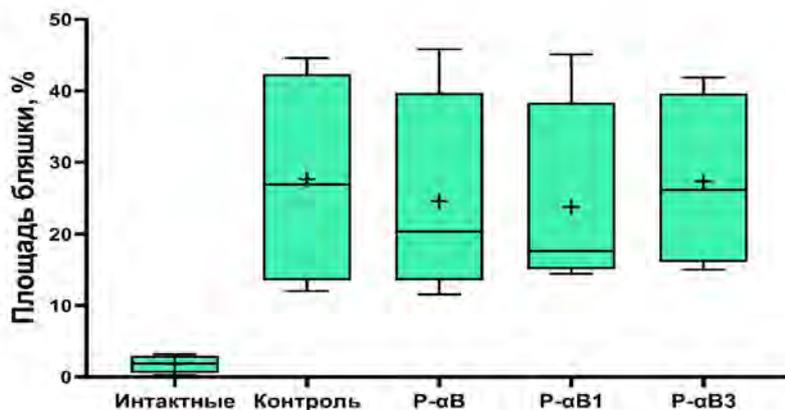


Рисунок 3 – Площадь липидных отложений

Примечание: + – среднее арифметическое.

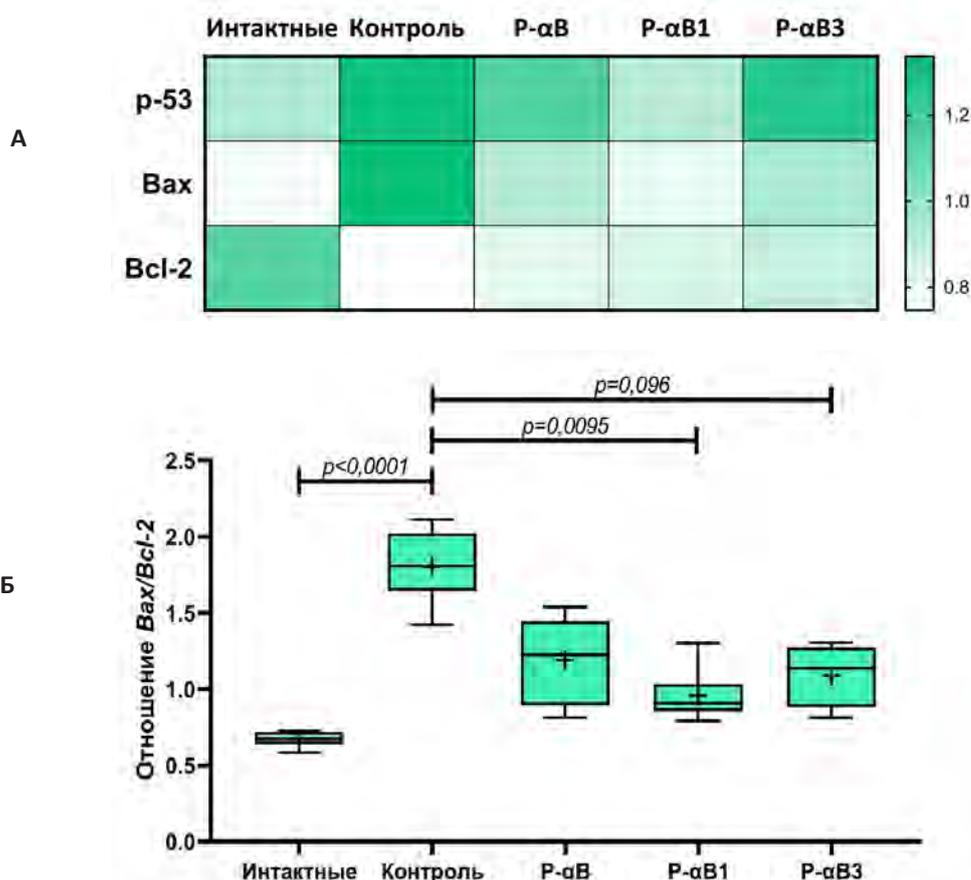


Рисунок 4 – Влияние исследуемых препаратов на относительную экспрессию маркеров апоптоза

Примечание: А) Из рисунка видно, что на фоне моделирования баллонного повреждения выражено возрастает экспрессия маркеров программируемой клеточной гибели p53 и Bax и падает экспрессия антиапоптотического маркера Bcl-2. Исследуемые препараты практически во всех случаях возвращают экспрессию p53, Bax и Bcl к уровню значений в интактной группе; В) Рисунок Б отражает соотношение Bax/Bcl-2. Соотношение характеризует проапоптотическую направленность клетки, чем оно выше, тем более выражена активация каскадов программируемой клеточной гибели. Из рисунка видно, что пептид P-αV1 статистически значимо снижает соотношение Bax/Bcl-2.

+ – среднее арифметическое; статистическую значимость межгрупповых отличий выявляли с применением теста Краскала-Уоллиса и пост-хок анализа по методу Данна.



Рисунок 5 – Уровень экспрессии генов iNOS, ICAM-1, VCAM-1 и E-селектина

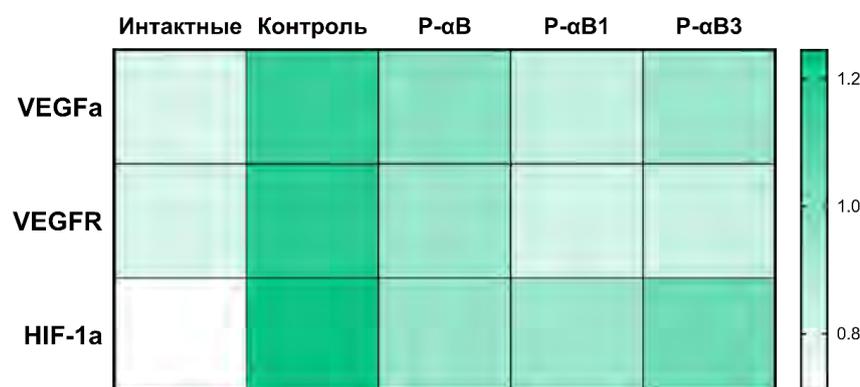


Рисунок 6 – Уровень экспрессии VEGF-A, VEGFR, и HIF-1a



Рисунок 7 – Уровень экспрессии генов PON2, SOD2

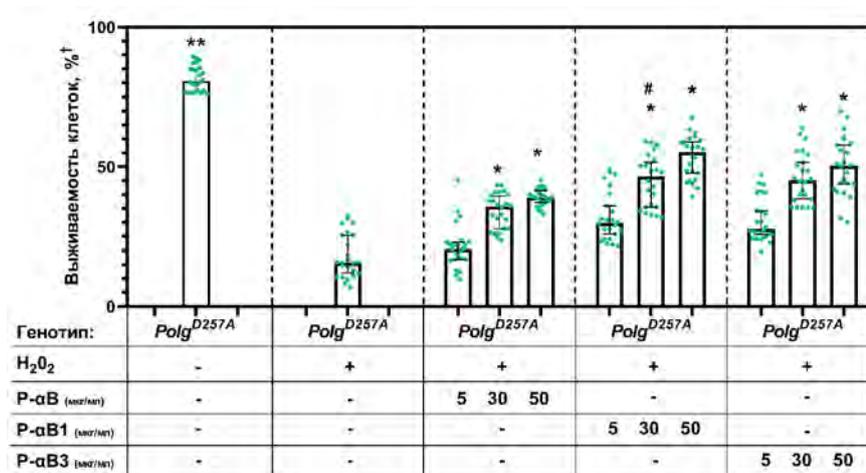


Рисунок 8 – Влияние H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> и тестируемых пептидов на выживаемость эндотелиоцитов с генотипом Polg<sup>D257A</sup>

Примечание: † – относительно интактных эндотелиоцитов дикого типа; \* – p < 0,0001 при сравнении с группой, получавшей только H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>; # – p=0,0783 при сравнении с группой с добавлением P-αB 30 мкг/мл

Полимераза гамма – это фермент, который играет ключевую роль в репликации митохондриальной ДНК. Этот фермент демонстрирует высокую точность работы и, в то же время, обладает собственной 3'->5' экзонуклеазной активностью, благодаря которой возможно исправление ошибок полимеризации. Включение «неправильных» нуклеотидов без последующего исправления приводит к накоплению митохондриальных мутаций и дисфункции митохондрий [19]. В результате происходит увеличение выработки активных радикалов и повреждение клетки. Гомозиготные животные с системным нокаутом *Polg* не выживают, поэтому в нашей работе мы использовали эндотелиоспецифичный нокаут гена [20]. Данная модель отражает одно из ключевых звеньев в патогенезе атеросклероза – оксидативный стресс на фоне митохондриальной дисфункции. Тем не менее, в любой животной модели атеросклероза, индивидуальные различия в сроках и степени формирования бляшек настолько велики, что для тестирования препаратов нужны очень большие группы животных [21–23]. В этой связи мы решили стандартизировать процесс атерогенеза путем индукции атеросклероза баллонной травмой и западной диетой.

В используемой нами модели атеросклероз связан с травматическим воздействием на сосуд на фоне повреждения эндотелиоцитов вследствие дисфункции митохондрий. Для подтверждения эффектов, наблюдаемых *in vivo*, мы также провели *in vitro* изучение эффективности выбранных пептидов на первичной культуре эндотелиоцитов *Polg<sup>-D257A</sup>*. Для усиления оксидативного стресса мы инкубировали клетки в присутствии 200 мкМ H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>.

Изучаемые пептиды продемонстрировали выраженный эндотелиопротективный эффект на модели оксидативного стресса *in vitro*. Также было обнаружено, что препараты оказывают выраженное редуцирующее влияние на экспрессию проапоптотических маркеров. Подобные результаты согласуются с представлением о базовом механизме действия производных эритропоэтина. При активации цитопротекторного гетерорецептора EPOR/CD131 происходит Jak/STAT-опосредованная передача сигнала в ядро, приводящая к сигналингу «выживания» путем снижения экспрессии проапоптотических генов [24, 25]. Аналогичные эффекты стимуляции эритропоэтиновых рецепторов прежде уже были показаны при моделировании атеросклероза [26].

Кроме того, нами было получено, что экспрессия генов антиоксидантной системы PON2 и SOD2 снизилась у леченых животных по сравнению с контролем. Мы связываем наблюдаемый эффект с тем, что в сосудах животных контрольной группы развивается сильный оксидативный и токсический стресс, который стимулирует увеличение экспрессии генов антиоксидантной системы. В то же время на фоне лечения, патологические явления в клетках были ре-

дуцированы, и стимулирующая активность в отношении генов PON2 и SOD2 также снизилась.

Также мы установили, что пептидные агонисты EPOR/CD131 обладают выраженной противовоспалительной активностью, снижая экспрессию провоспалительных цитокинов и молекул межклеточной адгезии. Воспаление является активным фактором развития атеросклероза и способствует дестабилизации атеросклеротических бляшек [27]. Особую роль в регулировании воспалительных каскадов и инфильтрации сосудов иммунными клетками играют молекулы VCAM-1 ICAM-1 IL-1b TNF-а [28–30]. В целом противовоспалительный эффект эритропоэтина и его производных являются широко изученным феноменом [31, 32]. Поэтому полученные нами данные укладываются в общее представление о фармакодинамике агонистов EPOR/CD131.

Отдельно мы решили оценить влияние исследуемых пептидов на экспрессию генов, кодирующих ангиогенные факторы. Ангиогенные факторы играют важную роль в прогрессировании атеросклероза и известно, что эритропоэтин способен стимулировать ангиогенез [33]. В зонах атеросклероза местные специфические условия (относительная аноксия, воспаление, окислительный стресс) увеличивают экспрессию классических и неклассических ангиогенных факторов, которые способствуют разрастанию ранее существовавших *vasa vasorum* [34]. Неоваскуляризация увеличивает местный поток питательных веществ и O<sub>2</sub> и, таким образом, может способствовать прогрессированию и ремоделированию бляшек [35]. Полученные нами результаты продемонстрировали, что в отличие от эритропоэтина, пептидные агонисты EPOR/CD131 демонстрируют антиангиогенное влияние, по крайней мере в отношении атеросклеротической бляшки.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прежде нами была сформулирована и подтверждена гипотеза, что при добавлении трипептидных мотивов KGD и RGD, цитопротекторные пептидные производные эритропоэтина могут приобретать антиагрегантные свойства. В ходе данного исследования мы продемонстрировали, что два инновационных пептида и базовое соединение P $\alpha$ B (pHBSF) защищают эндотелиоциты *in vitro*, а также снижают проапоптотическую, провоспалительную и ангиогенную активацию клеток сосудистой стенки в модели атеросклероза в сочетании с митохондриальной дисфункцией. Подобная фармакологическая активность изучаемых препаратов представляется очень перспективной в совокупности со сведениями о наличии у них антиагрегантной активности. Таким образом наблюдаемые эффекты дополняют сведения кардиоваскулярной активности инновационных пептидов P- $\alpha$ B1 и P- $\alpha$ B3, а также новые перспективы в разработке пептидов, сочетающих в себе атеропротективные и антиагрегантные свойства.

### ФИНАНСОВАЯ ПОДДЕРЖКА

Работа выполняется при поддержке Минобрнауки России. Соглашение о субсидии № 05.605.21.0191 (уникальный идентификатор соглашения RFMEFI60519X0191).

### АВТОРСКИЙ ВКЛАД

**О.А. Пученкова** – введение препаратов животным, забор органов для молекулярно-биологического и микроскопического изучения, написание статьи; **С.В. Надеждин** – выделение первичной культуры эндотелиоцитов, изучение цитопротективной активности производных эритропоэтина *in vitro*. Написание статьи; **В.О. Солдатов** – написание статьи, разработка дизайна исследования; **М.А. Жученко** – синтез пептида и анализ литературы; **Д.С. Коршунова** – выделение РНК, конвертация РНК в кДНК, анализ экспрессии таргетных генов; **М.В. Кубекина** – выделение РНК, конвертация РНК в кДНК, анализ экспрессии таргетных генов; **Е.Н. Коршунов** – хендлинг и уход за животными, подготовка экспериментальной группы животных; **Л.В. Корокина** – написание статьи, разработка дизайна исследования; **А.Л. Куликов** – провизорская служба, статистическая обработка и работа с графическим материалом; **П.А. Голубинская** – написание статьи, формализация списка литературы; **В.М. Покровский** – наблюдение и уход за животными, хендлинг животных, введение препаратов; **Е.А. Патраханов** – наблюдение и уход за животными, хендлинг животных, введение препаратов; **П.Р. Лебедев** – наблюдение и уход за животными, введение препаратов, некропсия животных; **В.В. Гуреев** – написание статьи, консультации по планированию, методологии и реализации эксперимента, моделирование баллонной травмы; **Т.А. Денисюк** – статистическая обработка, написание статьи, формализация списка литературы; **В.С. Беляева** – анализ графического изображения и измерение площади атеросклеротической бляшки, выделение первичной культуры эндотелиоцитов, изучение цитопротективной активности производных эритропоэтина *in vitro*; **Е.А. Мовчан** – выделение первичной культуры эндотелиоцитов, изучение цитопротективной активности производных эритропоэтина *in vitro*, пробоподготовка образцов аорты для графического анализа; **Е.И. Лепетюха** – выделение РНК, проведение количественной ПЦР; **М.В. Покровский** – создание идеи, планирование исследования, консультация по вопросам проведения отдельных этапов экспериментальных работ, обеспечение качества.

### КОНФЛИКТ ИНТЕРЕСОВ

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

### БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

- Zárate A. Cholesterol and atherosclerosis. Historical considerations and treatment / A. Zárate, L. Manuel-Apolinar, L. Basurto, E. De la Chesnaye, I. Saldivar // Arch Cardiol Mex. – 2016; – V. 86, №2. – P. 163–169. DOI: 10.1016/j.acmx.2015.12.002.
- Davignon J. Role of endothelial dysfunction in atherosclerosis / J. Davignon, P. Ganz // Circulation. – 2004. – V. 109, №23. – P. 27–32. DOI: 10.1161/01.CIR.0000131515.03336.f8.
- Davies P.F. Hemodynamic shear stress and the endothelium in cardiovascular pathophysiology / P.F. Davies // Nature Clinical Practice Cardiovascular Medicine. – 2009. – V. 6, №1. – P. 16–26. DOI: 10.1038/ncpcardio1397.
- Sorokin A. The cardio-ankle vascular index and ankle-brachial index in young Russians / A. Sorokin, K. Kotani, O. Bushueva, N. Taniguchi, V. Lazarenko // Journal of atherosclerosis and thrombosis. – 2015. – V. 22, №2. – P. 211–218. DOI: 10.5551/jat.26104.
- Polonikov A. The contribution of CYP2C gene subfamily involved in epoxygenase pathway of arachidonic acids metabolism to hypertension susceptibility in Russian population / A. Polonikov, M. Bykanova, I. Ponomarenko, S. Sirotina, A. Bocharova, K. Vagaytseva, Y. Shvetsov // Clinical and Experimental Hypertension. – 2017. – V. 39, №4. – P. 306–311. DOI: 10.1080/10641963.2016.1246562.
- Bennett M.R. Vascular Smooth Muscle Cells in Atherosclerosis / M.R. Bennett, S. Sinha, G.K. Owens // Circulation Research. – 2016. – V. 118, №4. – P. 692–702. DOI: 10.1161/CIRCRESAHA.115.306361.
- Kattoor A.J. Oxidative Stress in Atherosclerosis / A.J. Kattoor, N.V.K. Pothineni, D. Palagiri, J.L. Mehta // Current Atherosclerosis Reports. – 2017. – V. 19, №11. – 42 p. DOI: 10.1007/s11883-017-0678-6.
- Quintero M. Mitochondria as signaling organelles in the vascular endothelium / M. Quintero, S.L. Colombo, A. Godfrey, S. Moncada // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2006. – V. 103. – P. 5379–5384. DOI: 10.1073/pnas.0601026103.
- Brines M. Nonerythropoietic, tissue-protective peptides derived from the tertiary structure of erythropoietin / M. Brines, N.S. Patel, P. Villa, et al // Proceedings of the National Academy of Sciences of the United States of America. – 2008; – V. 105, №31. – P. 10925–10930. DOI: 10.1073/pnas.0805594105.
- Korokin M.V. 11-amino acid peptide imitating the structure of erythropoietin  $\alpha$ -helix b improves endothelial function, but stimulates thrombosis in rats / M.V. Korokin, V.O. Soldatov, A.A. Tietze, M.V. Golubev, A.E. Belykh, M.V. Kubekina, O.A. Puchenkova, T.A. Denisjuk, V.V. Gureyev, T.G. Pokrovskaya, O.S. Gudyrev, M.A. Zhuchenko, M.A. Zatulokina, M.V. Pokrovskiy // Pharmacy & Pharmacology. – 2019. – V. 7, №6. – P. 312–320. Russian. DOI: 10.19163/2307-9266-2019-7-6-312-320.
- Korokin M. Erythropoietin Mimetic Peptide (pHBS) Corrects Endothelial Dysfunction in a Rat Model of Preeclampsia / M. Korokin, V. Gureev, O. Gudyrev, I. Golubev, L. Korokina, A. Peresyupkina, T. Pokrovskaya, G. Lazareva, V. Soldatov, M. Zatulokina, A. Pobeda, E. Avdeeva, E. Beskhmel'nitsyna, T. Denisjuk, N. Avdeeva, O. Bushueva, M. Pokrovskiy // International Journal of Molecular Sciences. – 2020. – V. 21. – 6759 p. DOI: 10.3390/ijms21186759.
- Golubev I.V. Preclinical study of innovative peptides mimicking the tertiary structure of the  $\alpha$ -helix B of erythropoietin / I.V. Golubev, V.V. Gureev, M.V. Korokin, M.A. Zatulokina, E.V. Avdeeva, A.V. Gureeva, I.S. Rozhkov, E.A. Serdyuk, V.A. Soldatova // Research Results in Pharmacology. – 2020. – V. 6, №2. – P. 85–96. DOI: 10.3897/rrpharmacology.6.55385.
- Trifunovic A. Premature ageing in mice expressing defective mitochondrial DNA polymerase / A. Trifunovic, A. Wredenberg, A. Falkenberg, et al // Nature. – 2004. – V. 429. – P. 417–423. DOI: 10.1038/nature02517.

14. Kujoth G.C. Mitochondrial DNA mutations, oxidative stress, and apoptosis in mammalian aging / G.C. Kujoth, A. Hiona, T.D Pugh, et al. // *Science*. – 2005. – V. 309, №5733. – P. 481–484. DOI: 10.1126/science.1112125.
15. Zvartsev R.V. Neonatal Lethality and Inflammatory Phenotype of the New Transgenic Mice with Overexpression of Human Interleukin-6 in Myeloid Cells / R.V. Zvartsev, D.S. Korshunova, E.A. Gorshkova, et al. // *Doklady Biochemistry and Biophysics*. – 2018; – V. 483, №1. – P. 344–347. DOI: 10.1134/S1607672918060157.
16. Stubbendorff M. Inducing myointimal hyperplasia versus atherosclerosis in mice: an introduction of two valid models / M. Stubbendorff, X. Hua, T. Deuse, et al. // *Journal of Visualized Experiments*. – 2014. – V. 87. – 51459 p. DOI: 10.3791/51459.
17. Tediashvili G. Balloon-based Injury to Induce Myointimal Hyperplasia in the Mouse Abdominal Aorta / G. Tediashvili, D. Wang, H. Reichenspurner, T. Deuse, S. Schrepfer // *Journal of Visualized Experiments*. – 2018. – V. 132. – P. 56477. DOI: 10.3791/56477.
18. Molina-Sánchez P. Isolation of Mouse Primary Aortic Endothelial Cells by Selection with Specific Antibodies. Methods in Mouse Atherosclerosis. Methods in Molecular Biology / P. Molina-Sánchez P, V. Andrés // Humana Press, New York, NY. – 2015; – V. 1339. – P. 111–117. DOI: 10.1007/978-1-4939-2929-0\_7.
19. Stumpf J.D. Clinical and molecular features of POLG-related mitochondrial disease / J.D. Stumpf, R.P. Saneto, W.C. Copeland // *Cold Spring Harbor Perspectives in Biology*. – 2013. – V. 5, №4. – a011395 p. DOI: 10.1101/cshperspect.a011395.
20. Kusov P. Developing Novel Transgenic Mice Model Of Atherogenesis With Conditional Oxidative Stress By Introduction Of Epithelium-Specific Inducible Mitochondrial Polg With Mutagenic Activity / P. Kusov, A. Deikin // *Atherosclerosis*. -2019. – V. 287. – 99 p. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2019.06.287.
21. Poznyak A.V. Animal models of human atherosclerosis: current progress / A.V. Poznyak, Y.Y. Silaeva, A.N. Orekhov, A.V. Deykin // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. – 2020. –V. 53, №6. – 9557 p. DOI: 10.1590/1414-431x20209557.
22. Mushenkova N.V. Modelling of atherosclerosis in genetically modified animals / N.V. Mushenkova, V.I. Summerhill, Y.Y. Silaeva, A.V. Deykin, A.N. Orekhov // *American Journal of Translational Research*. – 2019. – V. 11, №8. – P. 4614–4633.
23. Volobueva A.S. An update on the tools for creating transgenic animal models of human diseases – focus on atherosclerosis / A.S. Volobueva, A.N. Orekhov, A.V. Deykin // *Brazilian Journal of Medical and Biological Research*. – 2019. – V. 52, №5. – 8108 p. DOI: 10.1590/1414-431X20198108.
24. Bittorf T. Requirement for JAK2 in erythropoietin-induced signalling pathways / T. Bittorf, R. Jaster, B. Lütke, B. Kamper B, J. Brock // *Cell Signal*. – 1997. –V. 9, №1. – P. 85–89. DOI: 10.1016/s0898-6568(96)00121-0.
25. Peng B. Erythropoietin and its derivatives: from tissue protection to immune regulation / B. Peng, G. Kong, C. Yang, et al. // *Cell Death Dis*. – 2020. –V. 11, №2. – 79 p. DOI: 10.1038/s41419-020-2276-8.
26. Warren J.S. Recombinant human erythropoietin suppresses endothelial cell apoptosis and reduces the ratio of Bax to Bcl-2 proteins in the aortas of apolipoprotein E-deficient mice / J.S. Warren, Y. Zhao, R. Yung, A. Desai // *Journal of Cardiovascular Pharmacology*. – 2011. – V. 57, №4. – P. 424–433. DOI: 10.1097/fjc.0b013e31820d92fd.
27. Bäck M. Inflammation and its resolution in atherosclerosis: mediators and therapeutic opportunities / M. Bäck, A. Yurdagül, I. Tabas, et al. // *Nature Reviews Cardiology*. – 2019 – V. 16, №7. – P. 389–406. DOI: 10.1038/s41569-019-0169-2.
28. Ley K. VCAM-1 is critical in atherosclerosis / K. Ley K, Y. Huo // *The Journal of Clinical Investigation*. – 2001. – V. 107, №10. – P. 1209–1210. DOI: 10.1172/JCI13005.
29. Fatkhullina A.R. The Role of Cytokines in the Development of Atherosclerosis / A.R. Fatkhullina, I.O. Peshkova, E.K. Koltsova // *Biochemistry (Mosc)*. – 2016. – V. 81, №11. – P. 1358–1370. Russian. DOI: 10.1134/S0006297916110134.
30. Fotis L. Intercellular adhesion molecule (ICAM)-1 and vascular cell adhesion molecule (VCAM)-1 at the early stages of atherosclerosis in a rat model / L. Fotis, G. Agrogiannis, I.S. Vlachos, A. Pantopoulou, A. Margoni, M. Kostaki, C. Verikokos, D. Tzivras, D.P. Mikhailidis, D. Perrea // *In Vivo*. – 2012. –V. 26. – P. 243–250.
31. Nairz M. The pleiotropic effects of erythropoietin in infection and inflammation / M. Nairz, T. Sonnweber, A. Schroll, I. Theurl, G. Weiss // *Microbes Infect*. – 2012. – V. 14, №3. – P. 238–246. DOI: 10.1016/j.micinf.2011.10.005.
32. Liu Y. Nonerythropoietic Erythropoietin-Derived Peptide Suppresses Adipogenesis, Inflammation, Obesity and Insulin Resistance / Y. Liu, B. Luo, R. Shi, et al. // *Scientific Reports*. – 2015. – V. 5. – 15134 p. DOI: 10.1038/srep15134.
33. Kimáková P. Erythropoietin and Its Angiogenic Activity / Kimáková P, Solár P, Solárová Z, Komel R, Debeljak N // *International Journal of Molecular Sciences*. – 2017. – V. 18, №7. – 1519 p. DOI: 10.3390/ijms18071519.
34. Michel J.B. Pathology of human plaque vulnerability: mechanisms and consequences of intraplaque haemorrhages / J.B. Michel, J.L. Martin-Ventura, A. Nicoletti, B. Ho-Tin-Noe // *Atherosclerosis*. – 2014. – V. 234, №2. – P. 311–319. DOI: 10.1016/j.atherosclerosis.2014.03.020.
35. Camaré C. Angiogenesis in the atherosclerotic plaque / C. Camaré, M. Pucelle, A. Nègre-Salvayre, R. Salvayre // *Redox Biology*. – 2017. – V. 12. – P. 18–34. DOI: 10.1016/j.redox.2017.01.007.

## АВТОРЫ

**Олеся А. Пученкова** – студентка 6 курса Медицинского института, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID 0000-0002-7657-0937. E-mail: lesya759@yandex.ru

**Сергей В. Надеждин** – кандидат биологических наук, научный сотрудник НИИ Фармакологии живых систем, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID 0000-0002-6249-2464. E-mail: sergey\_nadezhdin@yahoo.com

**Владислав О. Солдатов** – младший научный сотрудник, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет». ORCID 0000-0001-9706-0699. E-mail: pharmsoldatov@gmail.com

**Максим А. Жученко** – кандидат биологических наук, начальник сектора, НИЦ «Курчатовский институт» – ГосНИИгенетика. E-mail: maksim.zhuchenko@pharmapark.ru

**Диана С. Коршунова** – младший научный сотрудник ФГБУН «Институт биологии гена РАН». ORCID 0000-0002-0259-7045 E-mail: korshunova@genebiology.ru

**Марина В. Кубекина** – аспирант, младший научный сотрудник Центра высокоточного редактирования и генетических технологий для биомедицины ФГБУН «Институт биологии гена РАН». ORCID 0000-0002-8834-1111. E-mail: marykumy@gmail.com

**Евгений Н. Коршунов** – заведующий виварием, младший научный сотрудник ФГБУН «Института биологии гена РАН». ORCID 0000-0001-8170-4656. E-mail: korshunov@genebiology.ru

**Лилия В. Корокина** – кандидат медицинских наук, доцент, доцент кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID 0000-0001-5402-0697. E-mail: korokina@mail.ru

**Александр Л. Куликов** – научный сотрудник научный сотрудник НИИ Фармакологии живых систем, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID E-mail: alex-3031@yandex.ru

**Полина А. Голубинская** – заведующая клинико-диагностической лабораторией, Бюджетное учреждение здравоохранения Воронежской области «Воронежская областная клиническая офтальмологическая больница» (БУЗ ВО «ВОКОБ»). ORCID 0000-0002-1765-9042. E-mail: polinapigeon@gmail.com

**Владимир М. Покровский** – студент 5 курса Медицинского института, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID 0000-0003-3138-2075. E-mail: vmpokrovsky@yandex.ru

**Евгений А. Патраханов** – студент 5 курса Медицинского института, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). Наблюдение и уход за животными, хендлинг животных, введение препаратов. ORCID 0000-0002-8415-4562. E-mail: pateval7@gmail.com

**Петр Р. Лебедев** – студент 5 курса Медицинского института, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID 0000-0001-9102-3360. E-mail: Artkeit@yandex.ru

**Владимир В. Гуреев** – доктор медицинских наук, доцент, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID 0000-0003-1433-1225. E-mail: produmen@yandex.ru

**Татьяна А. Денисюк** – доктор медицинских наук, доцент кафедры фармакологии, ФГБОУ ВО «Курский государственный медицинский университет» Минздрава России. ORCID 0000-0003-0974-4818. E-mail: denitatyana@yandex.ru

**Вероника С. Беляева** – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID 0000-0003-2941-0241. E-mail: nika.believa@yandex.ru

**Евгения А. Мовчан** – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID 0000-0002-6244-2563. E-mail: ms.movchan@mail.ru

**Елизавета И. Лепетюха** – аспирант кафедры фармакологии и клинической фармакологии ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). E-mail: lisitsa007@bk.ru

**Михаил В. Покровский** – доктор медицинских наук, профессор кафедры фармакологии и клинической фармакологии, руководитель НИИ Фармакологии живых систем, ФГАОУ ВО «Белгородский государственный национальный исследовательский университет» (НИУ «БелГУ»). ORCID 0000-0002-2761-6249. E-mail: mpokrovsky@yandex.ru