

ОРИГИНАЛЬНОЕ ИССЛЕДОВАНИЕ

УДК 577.29

Влияние антиоксидантов на продукцию хемокина MCP-1 клетками линии EA.hy926 в ответ на IL-6**М.А. Челомбитко^{*} , И.И. Галкин , О.Ю. Плетюшкина ,
Р.А. Зиновкин , Е.Н. Попова ***Научно-исследовательский институт физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского,
Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, 119992, г. Москва, Ленинские горы, д. 1, стр. 40**^{*}e-mail: chelombitko@mail.bio.msu.ru*

Повышенный уровень интерлейкина-6 (IL-6) в крови является биомаркером цитокинового шторма, вызванного различными заболеваниями, и способствует плохим исходам этих заболеваний, в том числе COVID-19. Одной из основных мишеней патологического действия IL-6 являются эндотелиальные клетки сосудов, которые IL-6 активирует за счет транс-сигнального пути — формирования рецепторного комплекса IL-6/sIL-6Ra/gp130 и последующей индукции сигнального пути JAK/STAT3, а также в ряде случаев PI3K/AKT и MEK/ERK. Ранее было показано, в том числе нами, что активные формы кислорода (АФК), в том числе митохондриального происхождения (мито-АФК), способствуют индукции экспрессии IL-6 в эндотелии главным образом за счет усиления активации транскрипционного фактора NF-kB. Более того, мы показали, что митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 (10-(6'-пластохинонил)децилтрифенилфосфоний) предотвращает гибель мышечных, у которых цитокиновый шторм был вызван внутривенным введением фактора некроза опухолей (TNF) в летальной дозе, а также экспрессию NF-kB-зависимых генов, в том числе цитокина IL-6 и хемокина MCP-1 в аортах этих животных. В текущей работе мы проверили гипотезу об участии мито-АФК в передаче сигнала и экспрессии провоспалительных генов в эндотелиальных клетках, активированных IL-6. SkQ1 подавлял индуцированную IL-6 в комбинации с sIL-6Ra экспрессию и секрецию хемокина MCP-1, но не экспрессию молекул адгезии ICAM1 в эндотелиальных клетках человека линии EA.hy926. Используя специфические ингибиторы, мы показали, что в этих клетках вызванная IL-6 экспрессия MCP-1 и ICAM-1 зависит от сигнального белка и активатора транскрипции STAT3 и в некоторых случаях — от киназ JNK, PI3K и MEK1/2, а также не зависит от киназы p38. В данной модели IL-6 вызывал быструю активацию STAT3 и значительно менее выраженную активацию ERK1/2, но не влиял на активацию Akt и JNK. SkQ1 частично подавлял активацию STAT3 и ERK1/2. Таким образом, мы показали, что SkQ1 подавляет не только NF-kB-зависимую экспрессию IL-6 и других провоспалительных генов, но и вызванную IL-6 активацию JAK/STAT3 и STAT3-зависимую экспрессию MCP-1. Это, вероятно, вносит вклад в общий противовоспалительный эффект SkQ1.

Ключевые слова: воспаление, цитокиновый шторм, IL-6, эндотелий, митохондрии, антиоксиданты, SkQ1

Интерлейкин-6 (IL-6) — многофункциональный плейотропный цитокин, основным источником которого являются моноциты и макрофаги и который способен секретировать многие другие типы клеток. Постоянное повышение уровня IL-6 сопровождается развитием сердечно-сосудистых, а также хронических воспалительных, аутоиммунных и онкологических заболеваний [1, 2]. При остром системном воспалении чрезмерная продукция IL-6 является биомаркером цитокинового шторма [3]. Цитокиновый шторм представляет собой чрезмерный несбалансированный иммунный ответ, который может возникать в результате инфицирования патогенными бактериями или вирусами или может иметь неинфекционную природу — например, травмы, ишемии, реакция

«трансплантат против хозяина», аутоиммунные заболевания, последствия инженерной Т-клеточной терапии у пациентов с лейкемией и др. [4]. Во время цитокинового шторма вырабатывается большое количество разнообразных активных медиаторов воспаления, таких как цитокины, хемокины и некоторые факторы роста, что способствует прогрессированию сопутствующих заболеваний [4]. Среди цитокинов, уровень которых повышен у пациентов с плохим прогнозом COVID-19, IL-6 занимает центральное место [5]. Повышенный уровень IL-6 — прогностический фактор тяжелого течения и летального исхода при COVID-19 [6–8].

На сегодняшний день при лечении ряда хронических воспалительных заболеваний применя-

ются как блокада самого IL-6, так и подавление передачи сигналов IL-6R [3]. В настоящее время проводятся многочисленные клинические испытания для оценки эффективности тоцилизумаба (гуманизированные антитела против IL-6R) для терапии осложнений COVID-19, однако результаты этих испытаний весьма противоречивы [9].

Среди мишеней IL-6 особое место занимает эндотелий сосудов, который регулирует проницаемость кровеносных сосудов и миграцию клеток из крови в ткани, а также участвует в регуляции свертывания крови и тонуса сосудов. IL-6 воздействует на эндотелиальные клетки за счет формирования комплекса с растворимой формой рецептора (sIL-6R) и рецепторного гликопротеина 130 (gp130 или CD130), который экспрессируется во всех типах клеток. Рецепторные комплексы с gp130, как правило, активируют сигнальный путь JAK/STAT, но в клетках разных типов могут быть активированы также PI3K/AKT или MEK/ERK [1, 3]. Сообщалось, что IL-6 вызывает усиление проницаемости сосудистого эндотелия [10, 11] и увеличение экспрессии молекул адгезии ICAM-1, VCAM-1 и E-селектина, а также цитокина IL-6 и ряда хемокинов — CXCL10/IP-10, CCL4/MIP-1 β , CCL5/RANTES, CCL11/Eotaxin-1, CCL17/TARC, CCL2/MCP-1 и CXCL8/IL-8, что способствует лейкоцитарной инфильтрации органов [12–16]. Показано также, что IL-6 стимулирует экспрессию PAI-1 (plasminogen activator inhibitor-1; ингибитор активатора плазминогена-1), что способствует усилению коагуляции [17]. Аномальная активация эндотелия приводит к его дисфункции, которая напрямую связана с развитием сердечно-сосудистых и метаболических заболеваний, а также является частым осложнением цитокиновых штормов [18, 19]. При COVID-19 глубокая эндотелиальная дисфункция и повреждение эндотелия сосудов является основной причиной как острого респираторного дистресс-синдрома (ОРДС), так и внелегочных осложнений, таких как острое повреждение миокарда, почечная недостаточность или тромбоэмболические осложнения [20–23].

Активные формы кислорода (АФК), в том числе продуцируемые митохондриями (мито-АФК), играют важную роль в физиологии и патофизиологии сосудистой системы [23–25]. АФК участвуют в продукции IL-6 в ответ на цитокины (TNF, IL-1 β , IL-4), ангиотензин-2, а также в условиях гипоксии [26–30]. Ранее мы показали, что снижение уровня mito-АФК с помощью митохондриально-направленного антиоксиданта SkQ1 (10-(6'-пластохинонил) децилтрифенил фосфоний) приводит к подавлению стимулированной TNF секреции IL-6 и экспрессии ряда провоспалительных генов в культивируемых эндотелиальных клетках, а также экспрессии ряда провоспалительных генов, в т.ч. IL-6, в аортах мышей,

которым вводили TNF в летальных дозах [31, 32]. Более того, SkQ1 предотвращал гибель этих животных [32]. Действие антиоксиданта было в значительной мере связано с подавлением активации транскрипционного фактора NF-kB, который регулирует экспрессию многих провоспалительных генов, в т.ч. IL-6. В то же время сообщалось, что IL-6 сам может вызывать генерацию АФК, что способствует развитию эндотелиальной дисфункции [15, 33]. Однако таких исследований крайне мало, а об участии mito-АФК в трансигнализации IL-6 ничего не известно. В представленной работе мы, используя SkQ1, оценили возможное участие mito-АФК в индуцированной IL-6 экспрессии провоспалительных генов в эндотелиальных клетках.

Материалы и методы

Материалы. SkQ1 был синтезирован Г.А. Коршуновой и Н.В. Сумбатьян в НИИ ФХБ имени А.Н. Белозерского. В работе использовали реактивы производства Sigma (США) и культуральный пластик производства Costar (США), за исключением случаев, когда указано иное.

Клетки и схема экспериментов. Клетки эндотелия человека линии EA.hy926 (ATCC CRL-2922) растили на среде DMEM с 4,5 г/л глюкозы (ПанЭко, Россия), содержащей 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Hyclone, США), 100 мкМ гипоксантина и 20 мкМ тимидина (ПанЭко, Россия).

К клеткам, помещенным в 12-луночные планшеты (100 тыс. клеток на лунку), после прикрепления и распластывания добавляли антиоксиданты (100 мкМ Trolox, 20 нМ SkQ1). Через 4 сут меняли среду на новую, содержащую 0,2% эмбриональной телячьей сыворотки, и повторно добавляли антиоксиданты. Через 12–15 ч добавляли рекомбинантный человеческий IL-6 (GenScript, США) в смеси с sIL-6Ra (GenScript, США) (концентрации и время воздействия указаны в подписях к рисункам). Ингибиторы STAT-3 (Stattic, 10 мкМ; Apex Bio, США), JNK (SP600125, 20 мкМ; Enzo, США), PI3K (LY294002, 10 мкМ; Cell Signaling, США), MEK1/2 (UO126, 10 мкМ; Cell Signaling, США) и p38 (SB203580, 5 мкМ; Cell Signaling, США) добавляли за 15 мин до смеси IL-6 с sIL-6Ra.

Определение концентрации MCP-1 в ростовой среде. Концентрацию MCP-1 в ростовой среде определяли, используя набор MCP-1-ИФА-БЕСТ (Вектор-БЕСТ, Россия) согласно протоколу производителя.

Выделение РНК, обратная транскрипция и полимеразная цепная реакция (ПЦР) в реальном времени. Тотальную РНК выделяли из культивируемых клеток с использованием набора для выделения РНК (Zymo Research; Quick-RNA MiniPrep, США) в соответствии с протоколом производителя. ДНК

разрушали, обрабатывая образцы ДНК-азой (Thermo Fisher Scientific, США), РНК осаждали спиртом, промывали, высушивали и растворяли в воде. Для получения кДНК использовали набор RevertAid RT Kit (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Количественную ПЦР в реальном времени проводили с использованием реакционной смеси ПЦР-Микс с EVA Green и ROX (Синтол, Россия). Реакцию проводили в амплификаторе iCycler iQ (Bio-Rad, США) в следующих условиях: 95°C 3 мин. → (94°C 15 сек. → 56°C 20 сек. → 72°C 20 сек.) × 40. Относительную экспрессию генов рассчитывали с использованием метода количественного определения $2^{-\Delta\Delta Ct}$. Значения экспрессии мРНК целевых генов нормировали на значения экспрессии референсного гена *RPL32*. Последовательности праймеров указаны в таблице.

Вестерн-блот. Иммуноблоттинг проводили, как описано ранее [31]. Для визуализации тотального белка в гель включали 0,5% (V/V) 2,2,2-трихлорэтанола [34]. Использовались антитела против следующих белков человека: STAT3 (#CB10245, Cell Applications, США) и фосфо-STAT3 (Tyr705; #MA5-15193; Invitrogen, США), Akt (#2967), фосфо-Akt (Ser473; #4051), ERK1/2 (#4695), фосфо-ERK1/2 (Thr202/Tyr204; #4370), p38 (#4631), фосфо-p38 (Thr180/Tyr182; #9212), SAPK/JNK (#9258), фосфо-SAPK/JNK (Thr183/Tyr185; #4668S; Cell Signaling, США), а также меченные пероксидазой хрена антитела против иммуноглобулинов кролика или мыши. Для визуализации пероксидазной реакции использовали набор SuperSignal West Dura (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с протоколом производителя. Изображения получали с использованием системы ChemiDoc™ MP System (Bio-Rad, США). Анализ полученных изображений проводили с использованием программного обеспечения ImageLab (версия 5.2.1, Bio-Rad, США).

Статистическая обработка. Данные представлены как среднее ± стандартное отклонение. Группы сравнивали с помощью двухстороннего дисперсионного анализа (ANOVA, тест множественных сравнений Сидака) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США).

Результаты

В эндотелиальных клетках человека линии EA.hy926 IL-6 (400 нг/мл) в комбинации с sIL-6Ra (400 нг/мл) заметно стимулировал экспрессию *MCP-1*, *ICAM-1* и *IL-6* (рис. 1, А). Пик экспрессии этих провоспалительных генов наблюдался через час после добавления IL-6 в комбинации с sIL-6Ra. Мы также наблюдали увеличение уровня MCP-1 в ростовой среде клеток EA.hy926 после добавления IL-6 совместно с sIL-6Ra (рис.1, Б). Пик секреции MCP-1 приходился на 8 ч после добавления IL-6 в комбинации с sIL-6Ra.

В клетках EA.hy926 мы не обнаружили роста экспрессии мРНК *PAI-1*, *IL-8* и *RANTES* под действием IL-6 в комбинации с sIL-6Ra (рис. 1, А). Очевидно, это связано с тем, что клетки линии EA.hy926 отчасти утратили эндотелиальные свойства.

Митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 и классический антиоксидант Trolox (водорастворимый аналог витамина Е) статистически значимо подавляли повышение содержания MCP-1 в ростовой среде и рост экспрессии мРНК *MCP-1*, вызванные добавлением IL-6 в комбинации с sIL-6Ra (рис. 1, Б и В). Значимого подавления экспрессии *ICAM-1* в этой модели не наблюдалось, что указывает на существование различий в регуляции экспрессии данных генов (рис. 1, Г).

Используя химические ингибиторы, мы оценили вклад сигнальных путей JAK/STAT, PI3K/AKT и MEK/ERK в вызванную IL-6 совместно с sIL-6Ra стимуляцию экспрессии мРНК *MCP-1* и *ICAM-1* в клетках EA.hy926 (рис. 2, А и Б). В наибольшей степени экспрессию *MCP-1* и *ICAM-1* подавлял ингибитор STAT3. Действие ингибиторов JNK, PI3K и MEK1/2 было менее выраженным. Ингибитор p38 экспрессию *MCP-1* и *ICAM-1* не подавлял.

В наших экспериментальных условиях на эндотелиальных клетках линии EA.hy926 IL-6 совместно с sIL-6Ra вызывал быструю и выраженную активацию STAT3 (фосфорилирование Tyr705), менее заметную активацию ERK1/2 (фосфорилирование Thr202/Tyr204), но не влиял на активацию Akt-1 (фосфорилирование Ser473) и SAPK/JNK (фосфорилирование Thr183/Tyr185)

Таблица

Последовательности использованных праймеров для количественной ПЦР

Целевой ген	Прямой (5'-3')	Обратный (5'-3')
<i>hIL-6</i>	GACAACTCATCTCATTTCTG	CCATTAACAACAACAATCTG
<i>hIL-8</i>	CAGTGAAGATGCCAGTGAA	TTAACCAGGAATCTTGTATTGC
<i>hICAM-1</i>	TGTCATCATCACTGTGGTAGC	CTTGTGTGTTCGGTTTCATGG
<i>hPAI</i>	CACATTGCCATCACTCTTG	CATTCACCTCTGCCACCTG
<i>hCCL2 (hMCP-1)</i>	CAGAAAGTGGGTTTCAGGATT	ATTCTTGGGTTGTGGAGTG
<i>hCCL5 (hRANTES)</i>	AAGAAATGGGTTTCGGGAGTA	TAGGACAAGAGCAAGCAGAA
<i>hRPL32</i>	CATCTCCTTCTCGGCATCA	AACCCTGTTGTCAATGCCTC

(рис. 2, В и Г). SkQ1 частично подавлял фосфорилирование STAT3 и в меньшей степени – ERK1/2 (рис 2, В и Г). Таким образом, мито-АФК усиливают экспрессию мРНК *MCP-1* в значительной степени за счет усиления активации STAT3.

Обсуждение

IL-6 – важный медиатор воспаления, повышенный уровень которого ассоциирован с сердечно-сосудистыми и хроническими воспалительными заболеваниями, а также цитокиновыми штормами разной этиологии и их плохими исходами [2, 3]. АФК, в том числе мито-АФК, повышают экспрессию IL-6, что способствует усилению воспаления и развитию патологий [26–30]. Есть также немногочисленные сообщения об участии АФК в передаче воспалительных сигналов от рецепторного комплекса IL-6-sIL-6Ra-gp130 [15, 33]. Показано, что IL-6 способен индуцировать окислительный стресс в культивируемых гладкомышечных клетках сосудов и сосудах мышей за счет

стимуляции экспрессии рецептора 1-го типа ангиотензина II [33]. Сообщалось также, что ресвератрол (полифенол красного вина, обладающий антиоксидантными свойствами) подавляет индуцированные IL-6 Rac1-зависимую генерацию АФК и экспрессию *ICAM-1* в эндотелии [15]. Мы показали, что митохондриально-направленный антиоксидант SkQ1 и классический антиоксидант Trolox в одинаковой степени подавляют вызванные IL-6 в комбинации с sIL-6-R1 экспрессию мРНК и секрецию белка MCP-1 (рис. 1, Б и В), что свидетельствует об участии мито-АФК в передаче воспалительного сигнала от рецепторного комплекса IL-6-sIL-6Ra-gp130 в эндотелиальных клетках.

Используя химические ингибиторы, мы показали, что в клетках EA.hy926 стимулированная IL-6 в комбинации с sIL-6Ra экспрессия *MCP-1* зависит от STAT3 и в меньшей степени – от PI3K и MEK1/2, а также от JNK, но не от p38 (рис. 2, А), что соответствовало данным, полученным на других культурах эндотелия [1, 3]. В эндотелиальных клетках линии

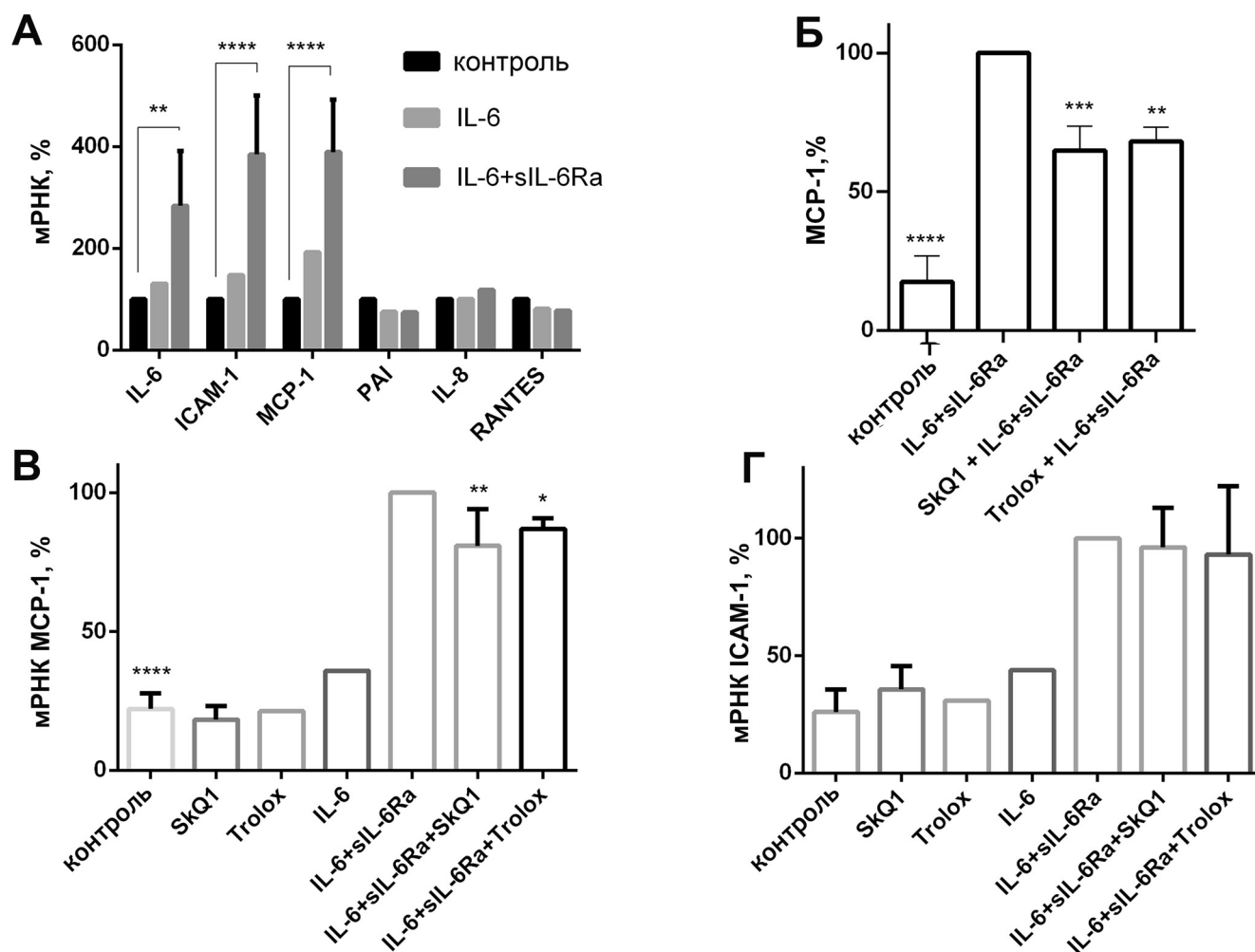


Рис. 1. Антиоксиданты SkQ1 и Trolox подавляют вызванные IL-6 экспрессию мРНК *MCP-1* и секрецию этого хемокина. Клетки обрабатывали антиоксидантами SkQ1 (20 нМ) и Trolox (100 мкМ), через 4 сут добавляли смесь IL-6 с sIL-6Ra (по 400 нг/мл). Экспрессию мРНК провоспалительных генов определяли через 1 ч, секрецию MCP-1 – через 8 ч после добавления смеси IL-6 с sIL-6Ra. А – Влияние IL-6 на экспрессию мРНК провоспалительных генов клетках EA.hy926. Б–Г – Влияние антиоксидантов SkQ1 (20 нМ, 4 сут) и Trolox (100 мкМ, 4 сут) на вызванные IL-6 секрецию MCP-1 (Б) и экспрессию мРНК *MCP-1* (В) и мРНК *ICAM-1* (Г). N ≥ 4, * – p < 0,05, ** – p < 0,01, *** – p < 0,001, **** – p < 0,0001 по сравнению с обработанными только IL-6 с sIL-6Ra клетками.

EA.hy926 IL-6 совместно с sIL-6Ra вызывал быструю и выраженную активацию STAT3 и небольшую активацию ERK1/2, но не влиял на активацию Akt-1 и JNK (рис. 2, В). Мы также показали, что SkQ1 подавляет активацию STAT3 и в меньшей степени — ERK1/2 (рис. 2, В и Г). Таким образом, в используемой модели механизм противовоспалительного действия SkQ1 в значительной степени был связан с подавлением активации STAT3.

Ранее на эндотелии из бычьих аорт было показано, что ресвератрол подавляет индуцированную IL-6 экспрессию *ICAM-1* за счет предотвращения фосфорилирования STAT3 [15]. Анализ с использованием химических ингибиторов выявил одни и те же основные регуляторы экспрессии для

MCP-1 и *ICAM-1* в нашей модели (рис. 2, А и Б). Однако, к нашему удивлению, ни Trolox, ни SkQ1 не повлияли на вызванную IL-6 экспрессию мРНК *ICAM-1* в клетках EA.hy926 (рис. 1, Г). Это указывает на существование различий в редокс-регуляции экспрессии этих генов у разных видов.

Антиоксиданты, в том числе митохондриально-направленные, проявляли выраженный терапевтический эффект в некоторых моделях сепсиса и синдрома системного воспалительного ответа у животных [32, 35, 36]. Однако в модели сепсиса, вызванного перевязкой и пункцией слепой кишки у мышей, антиоксиданты SkQ1 и mito-Tempo оказались неэффективны [37]. Ранее мы показали, что SkQ1 предотвращает падение температуры тела

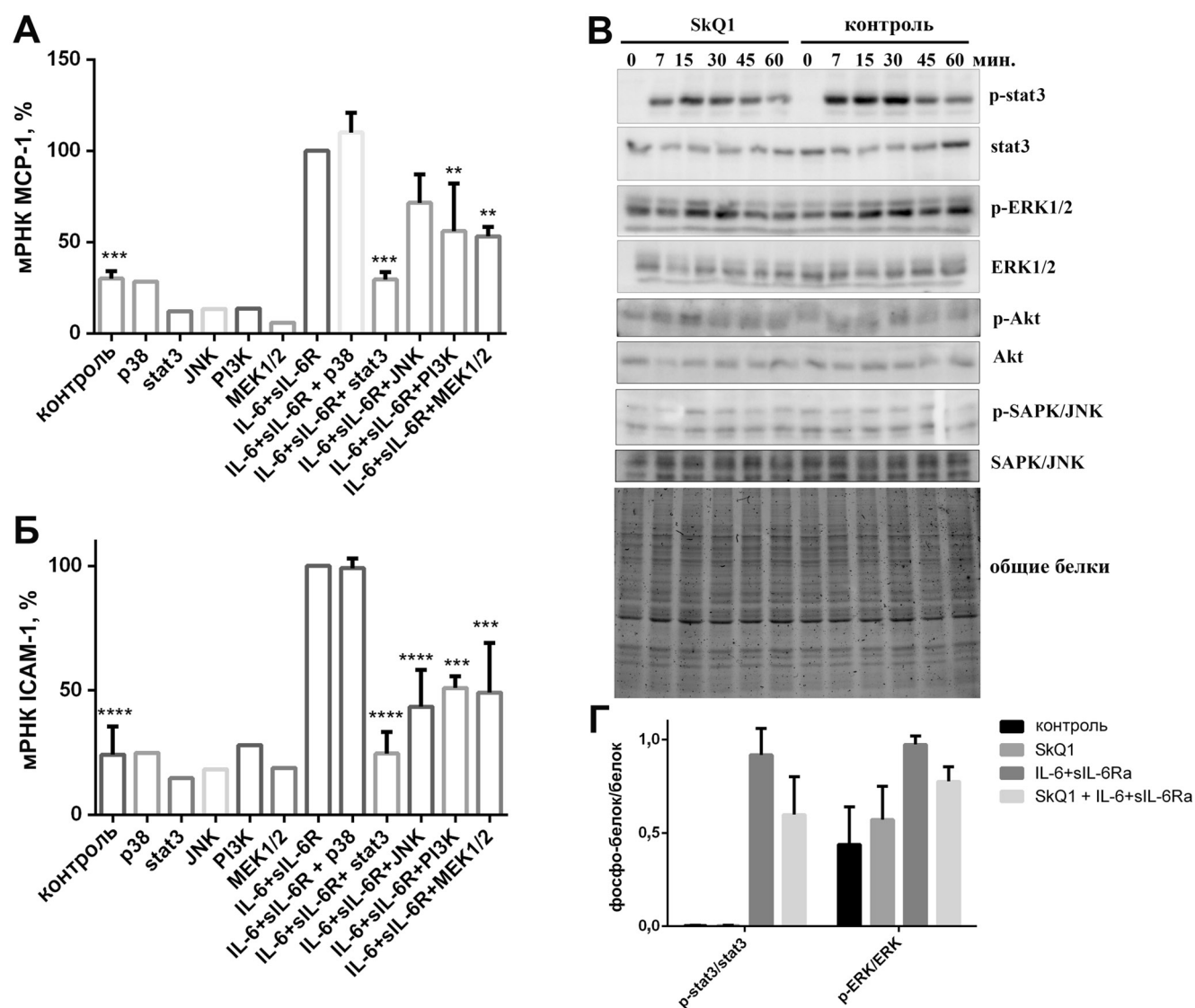


Рис. 2. Снижение экспрессии мРНК *MCP-1* под действием антиоксиданта SkQ1 по крайней мере отчасти связано с его способностью подавлять активацию STAT3. Клетки обрабатывали антиоксидантами и смесью IL-6 с sIL-6Ra, как указано в подписи к рис. 1. Ингибиторы добавляли за 15 мин до смеси IL-6 с sIL-6Ra. Образцы для ПЦР собирали через 1 ч, для вестерн-блотов — через 7–60 мин после добавления смеси IL-6 с sIL-6Ra. **А, Б** — Влияние ингибиторов STAT-3 (static, 10 мкМ), JNK (SP600125, 20мкМ), PI3K (LY294002, 10мкМ), MEK1/2 (UO126, 10мкМ) и p38 (SB203580, 5мкМ) на индуцированную IL-6 с sIL-6Ra экспрессию мРНК *MCP-1* (**А**) и *ICAM-1* (**Б**). **В, Г** — Влияние SkQ1 (20 нМ, 4 сут) и Trolox (100 мкМ, 4 сут) на активацию (фосфорилирование) STAT3, ERK1/2, Akt и SAPK/JNK под действием IL-6 с sIL-6Ra (7-60 мин). **В** — Изображения типичных вестерн-блотов; **Г** — денситометрический анализ вестерн-блотов. N ≥ 3, * — p ≤ 0,05, ** — p ≤ 0,01, *** — p ≤ 0,001, **** — p ≤ 0,0001 по сравнению обработанными только IL-6 с sIL-6Ra клетками.

и гибель мышей, которым вводили TNF в летальных дозах, и подавляет экспрессию регулируемых NF- κ B генов (*VCAM-1*, *ICAM-1*, *MCP-1* и *IL-6*) в аортах этих мышей [32]. В эндотелиальных клетках *in vitro* SkQ1 подавлял стимулированную TNF активацию транскрипционного фактора NF- κ B и, как следствие, NF- κ B-зависимую экспрессию *ICAM-1*, *VCAM-1*, *E-селектина*, *MMP-9*, а также секрецию IL-6 и IL-8 [31,32]. С использованием трансгенных мышей было показано, что подавление активации транскрипционного фактора NF- κ B в эндотелии предотвращает эндотелиальную дисфункцию в моделях сепсиса, вызванного липополисахаридаом или с помощью перевязки и пункции слепой кишки [38]. Однако терапевтический эффект SkQ1, по-видимому, не ограничивается подавлением активации NF- κ B. SkQ1 оказывает комплексное ангиопротекторное действие на эндотелий сосудов: он подавляет вызванные TNF адгезию клеток человеческого промиелоцитарного лейкоза линии HL-60 к эндотелию [31], разборку межклеточных контактов и увеличение проницаемости эндотелиального барьера [32, 39, 40], а также апоптоз эндотелиальных клеток [41]. В первых двух случаях действие SkQ1 было в значительной мере связано с предотвращением активации NF- κ B, в то время как подавление апоптоза и каспазо-

зависимого разрушения межклеточных контактов и эндотелиальной проницаемости было связано с предотвращением выхода из митохондрий цитохрома-с. Кроме того, SkQ1 ингибировал дегрануляцию тучных клеток *in vivo* и *in vitro*, что также могло способствовать снижению активации эндотелия при остром воспалении [42, 43]. Сейчас мы дополнили эту картину данными о том, что SkQ1 подавляет не только NF- κ B-зависимую экспрессию и секрецию IL-6, но и вызванную IL-6 активацию JAK/STAT3 и, как следствие, экспрессию *MCP-1*, что, вероятно, вносит вклад в общий терапевтический эффект SkQ1.

Ограничения исследования

Работа выполнена на клеточной линии EA.hy926, представляющей собой гибридную первичной культуры эндотелиальных клеток пупочной вены человека (HUVEC) и аденокарциномы легочной ткани человека линии A549.

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 20-04-60452). Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Исследования проводили без использования животных и без привлечения людей в качестве испытуемых.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Uciechowski P., Dempke W.C.M. Interleukin-6: A masterplayer in the cytokine network // *Oncology*. 2020. Vol. 98. N 3. P. 131–137.
2. Hou T., Tieu B.C., Ray S., Recinos III A., Cui R., Tilton R.G., Brasier A.R. Roles of IL-6-gp130 signaling in vascular inflammation // *Curr. Cardiol. Rev.* 2008. Vol. 4. N 3. P. 179–192.
3. Kang S., Kishimoto T. Interplay between interleukin-6 signaling and the vascular endothelium in cytokine storms // *Exp. Mol. Med.* 2021. Vol. 53. N 7. P. 1116–1123.
4. Fajgenbaum D.C., June C.H. Cytokine storm // *N. Engl. J. Med.* 2020. Vol. 383. N 23. P. 2255–2273.
5. Liu Y., Chen D., Hou J., Li H., Cao D., Guo M., Ling Y., Gao M., Zhou Y., Wan Y., Zhu Z. An inter-correlated cytokine network identified at the center of cytokine storm predicted COVID-19 prognosis // *Cytokine*. 2021. Vol. 138: 155365.
6. Chen G., Wu D.I., Guo W., et al. Clinical and immunological features of severe and moderate coronavirus disease 2019 // *J. Clin. Invest.* 2020. Vol. 130. N 5. P. 2620–2629.
7. Herold T., Jurinovic V., Arnreich C., Lipworth B.J., Hellmuth J.C., von Bergwelt-Baildon M., Klein M., Weinberger T. Elevated levels of IL-6 and CRP predict the need for mechanical ventilation in COVID-19 // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2020. Vol. 146. N 1. P. 128–136.e4.
8. Ruan Q., Yang K., Wang W., Jiang L., Song J. Clinical predictors of mortality due to COVID-19 based on an analysis of data of 150 patients from Wuhan, China // *Intensive Care Med.* 2020. Vol. 46. N 5. P. 846–848.
9. Ascierto P.A., Fu B., Wei H. IL-6 modulation for COVID-19: the right patients at the right time? // *J. Immunother. Cancer*. 2021. Vol. 9. N 4: e002285.
10. Alsaffar H., Martino N., Garrett J.P., Adam A.P. Interleukin-6 promotes a sustained loss of endothelial barrier function via Janus kinase-mediated STAT3 phosphorylation and de novo protein synthesis // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2018. Vol. 314. N 5. P. C589–C602.
11. Desai T.R., Leeper N.J., Hynes K.L., Gewertz B.L. Interleukin-6 causes endothelial barrier dysfunction via the protein kinase C pathway // *J. Surg. Res.* 2002. Vol. 104. N 2. P. 118–123.
12. Watson C., Whittaker S., Smith N., Vora A.J., Dumonde D.C., Brown K.A. IL-6 acts on endothelial cells to preferentially increase their adherence for lymphocytes // *Clin. Exp. Immunol.* 1996. Vol. 105. N 1. P. 112–119.
13. Romano M., Sironi M., Toniatti C., Polentarutti N., Fruscella P., Ghezzi P., Faggioni R., Luini W., Van Hinsbergh V., Sozzani S., Bussolino F., Poli V., Ciliberto G., Mantovani A. Role of IL-6 and its soluble receptor in induction of chemokines and leukocyte recruitment // *Immunity*. 1997. Vol. 6. N 3. P. 315–325.
14. Wung B.S., Ni C.W., Wang D.L. ICAM-1 induction by TNF α and IL-6 is mediated by distinct pathways via Rac in endothelial cells // *J. Biomed. Sci.* 2005. Vol. 12. N 1. P. 91–101.
15. Wung B.S., Hsu M.C., Wu C.C., Hsieh C.W. Resveratrol suppresses IL-6-induced ICAM-1 gene expression in endothelial cells: Effects on the inhibition of STAT3 phosphorylation // *Life Sci.* 2005. Vol. 78. N 4. P. 389–397.
16. McLoughlin R.M., Jenkins B.J., Grail D., Williams A.S., Fielding C.A., Parker C.R., Ernst M., Topley N., Jones S.A. IL-6 trans-signaling via STAT3 directs T cell infiltration in acute inflammation // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2005. Vol. 102. N 27. P. 9589–9594.

17. Kang S., Tanaka T., Inoue H., Ono C., Hashimoto S., Kioi Y., Matsumoto H., Matsuura H., Matsubara T., Shimizu K., Ogura H. IL-6 trans-signaling induces plasminogen activator inhibitor-1 from vascular endothelial cells in cytokine release syndrome // *Proc. Natl. Acad. Sci. U.S.A.* 2020. Vol. 117. N 36. P. 22351–22356.
18. Xu S., Ilyas I., Little P.J., Li H., Kamato D., Zheng X., Luo S., Li Z., Liu P., Han J., Harding I.C. Endothelial dysfunction in atherosclerotic cardiovascular diseases and beyond: From mechanism to pharmacotherapies // *Pharmacol. Rev.* 2021. Vol. 73. N 3. P. 924–967.
19. Aird W.C. Review article The role of the endothelium in severe sepsis and multiple organ dysfunction syndrome // *Blood.* 2003. Vol. 101. N 10. P. 3765–3777.
20. Prasad M., Leon M., Lerman L.O., Lerman A. Viral endothelial dysfunction: A unifying mechanism for COVID-19 // *Mayo Clin. Proc.* 2021. Vol. 96. N 12. P. 3099–3108.
21. Jin Y., Ji W., Yang H., Chen S., Zhang W., Duan G. Endothelial activation and dysfunction in COVID-19: from basic mechanisms to potential therapeutic approaches // *Signal Transduct. Target. Ther.* 2020. Vol. 5: 293.
22. Birnhuber A., Fliesser E., Gorkiewicz G., Zacharias M., Seeliger B., David S., Welte T., Schmidt J., Olschewski H., Wygrecka M., Kwapiszewska G. Between inflammation and thrombosis: Endothelial cells in COVID-19 // *Eur. Respir. J.* 2021. Vol. 58. N 3: 2100377.
23. Otifi H.M., Adiga B.K. Endothelial dysfunction in Covid-19 infection // *Am. J. Med. Sci.* 2022. Vol. 363. N 4. P. 285–291.
24. Panieri E., Santoro M.M. ROS signaling and redox biology in endothelial cells // *Cell. Mol. Life Sci.* 2015. Vol. 72. N 17. P. 3281–3303.
25. Aldosari S., Awad M., Harrington E.O., Sellke F.W., Abid M.R. Subcellular reactive oxygen species (ROS) in cardiovascular pathophysiology // *Antioxidants.* 2018. Vol. 7. N 1: 14.
26. Didion S.P. Cellular and oxidative mechanisms associated with interleukin-6 signaling in the vasculature // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. Vol. 18. N 12: 2563.
27. Volk T., Hensel M., Schuster H., Kox W.J. Secretion of MCP-1 and IL-6 by cytokine stimulated production of reactive oxygen species in endothelial cells // *Mol. Cell. Biochem.* 2000. Vol. 206. N 1–2. P. 105–112.
28. Ali M.H., Schlidt S.A., Chandel N.S., Hynes K.L., Schumacker P.T., Gewertz B.L. Endothelial permeability and IL-6 production during hypoxia: role of ROS in signal transduction. // *Am. J. Physiol. – Lung Cell. Mol. Physiol.* 1999. Vol. 277. Pt. 1. P. L1057–L1065.
29. Lee Y.W., Lee W.H., Kim P.H. Oxidative mechanisms of IL-4-induced IL-6 expression in vascular endothelium // *Cytokine.* 2010. Vol. 49. N 1. P. 73–79.
30. Pearlstein D.P., Ali M.H., Mungai P.T., Hynes K.L., Gewertz B.L., Schumacker P.T. Role of mitochondrial oxidant generation in endothelial cell responses to hypoxia // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol.* 2002. Vol. 22. N 4. P. 566–573.
31. Zinovkin R.A., Romashchenko V.P., Galkin I.I., Zakharova V.V., Pletjushkina O.Y., Chernyak B.V., Popova E.N. Role of mitochondrial reactive oxygen species in age-related inflammatory activation of endothelium // *Aging (Albany N.Y.).* 2014. Vol. 6. N 8. P. 661–674.
32. Zakharova V.V., Pletjushkina O.Y., Galkin I.I., Zinovkin R.A., Chernyak B.V., Krysko D.V., Bachert C., Krysko O., Skulachev V.P., Popova E.N. Low concentration of uncouplers of oxidative phosphorylation decreases the TNF-induced endothelial permeability and lethality in mice // *Biochim. Biophys. Acta – Mol. Basis Dis.* 2017. Vol. 1863. N 4. P. 968–977.
33. Wassmann S., Stumpf M., Strehlow K., Schmid A., Schieffer B., Böhm M., Nickenig G. Interleukin-6 induces oxidative stress and endothelial dysfunction by overexpression of the angiotensin II type 1 receptor // *Circ. Res.* 2004. Vol. 94. N 4. P. 534–541.
34. Chopra A., Willmore W.G., Biggar K.K. Protein quantification and visualization via ultraviolet-dependent labeling with 2,2,2-trichloroethanol // *Sci. Rep.* 2019. Vol. 9: 13923.
35. Li R., Ren T., Zeng J. Mitochondrial coenzyme Q protects sepsis-induced acute lung injury by activating PI3K/Akt/GSK-3 β /mTOR pathway in rats // *Biomed Res. Int.* 2019. Vol. 2019: 5240898.
36. Zakharova V.V., Pletjushkina O.Y., Zinovkin R.A., Popova E.N., Chernyak B.V. Mitochondria-targeted antioxidants and uncouplers of oxidative phosphorylation in treatment of the systemic inflammatory response syndrome (SIRS) // *J. Cell. Physiol.* 2017. Vol. 232. N 5. P. 904–912.
37. Rademann P., Weidinger A., Drechsler S., et al. Mitochondria-targeted antioxidants SkQ1 and MitoTEMPO failed to exert a long-term beneficial effect in murine polymicrobial sepsis // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2017. Vol. 2017: 6412682.
38. Ding J., Song D., Ye X., Liu S.F. A pivotal role of endothelial-specific NF- κ B signaling in the pathogenesis of septic shock and septic vascular dysfunction // *J. Immunol.* 2009. Vol. 183. N 6. P. 4031–4038.
39. Demyanenko I.A., Popova E.N., Zakharova V.V., Ilyinskaya O.P., Vasilieva T.V., Romashchenko V.P., Fedorov A.V., Manskikh V.N., Skulachev M.V., Zinovkin R.A., Pletjushkina O.Y., Skulachev V.P., Chernyak B.V. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 improves impaired dermal wound healing in old mice // *Aging (Albany N.Y.).* 2015. Vol. 7. N 7. P. 475–485.
40. Galkin I.I., Pletjushkina O.Y., Zinovkin R.A., Zakharova V.V., Chernyak B.V., Popova E.N. Mitochondria-targeted antioxidant SkQR1 reduces TNF-induced endothelial permeability in vitro // *Biochemistry (Mosc.).* 2016. Vol. 81. N 10. P. 1188–1197.
41. Galkin I.I., Pletjushkina O.Y., Zinovkin R.A., Zakharova V.V., Birjukov I.S., Chernyak B.V., Popova E.N. Mitochondria-targeted antioxidants prevent TNF α -induced endothelial cell damage // *Biochemistry (Mosc.).* 2014. Vol. 79. N 2. P. 124–130.
42. Chelombitko M.A., Averina O.A., Vasilyeva T.V., Pletjushkina O.Y., Popova E.N., Fedorov A.V., Chernyak B.V., Shishkina V.S., Ilinskaya O.P. Mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 (10-(6'-plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium bromide) inhibits mast cell degranulation in vivo and in vitro // *Biochemistry (Mosc.).* 2017. Vol. 82. N 12. P. 1493–1503.
43. Chelombitko M.A., Averina O.A., Vasil'eva T.V., Dvorianinova E.E., Egorov M.V., Pletjushkina O.Y., Popova E.N., Fedorov A.V., Romashchenko V.P., Ilyinskaya O.P. Comparison of the effects of mitochondria-targeted antioxidant 10-(6'-plastoquinonyl)decyltriphenylphosphonium bromide (SkQ1) and a fragment of its molecule dodecyltriphenylphosphonium on carrageenan-induced acute inflammation in mouse model of subcutaneous // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2017. Vol. 162. N 6. P. 730–733.

Поступила в редакцию 21.06.2022

После доработки 25.07.2022

Принята в печать 26.07.2022

RESEARCH ARTICLE

Effect of antioxidants on the production of MCP-1 chemokine by EA.hy926 cells in response to IL-6

M.A. Chelombitko^{*} , I.I. Galkin , O.Yu. Pletjushkina ,
R.A. Zinovkin , E.N. Popova 

¹*Belozersky Institute of Physico-Chemical Biology, Lomonosov Moscow State University,
1–40 Leninskie gory, Moscow, 119992, Russia*

^{*}*e-mail: chelombitko@mail.bio.msu.ru*

Elevated level of circulatory interleukin 6 (IL-6) is a biomarker for cytokine storm of various etiologies including COVID-19 and contributes to poor prognosis. Vascular endothelial cells are one of the main targets of pathological action of IL-6. IL-6 activates trans-signaling pathway via the formation of the IL-6/sIL-6Rα/gp130 receptor complex and subsequent activation of the JAK/STAT3 signaling pathway, and in some cases PI3K/AKT and MEK/ERK kinases. Previously, by our group and other researchers, it was shown that reactive oxygen species (ROS) including mitochondrial ROS (mito-ROS) contribute to the induction of IL-6 expression in the endothelium, mainly due to increased activation of the transcription factor NF-κB. We have also shown that the mitochondria-targeted antioxidant SkQ1 (plastoquinolyl-10(6'-decyltriphenyl) phosphonium) prevented tumor necrosis factor (TNF)-induced cytokine storm and death in mice. In the aortas of these animals, SkQ1 also prevented the increase in the expression of NF-κB-dependent genes, including the cytokine IL-6 and the chemokine MCP-1. In the current work, we have tested the hypothesis of mito-ROS involvement in the IL-6-signaling-mediated pro-inflammatory gene expression in endothelial cells. SkQ1 suppressed the expression and secretion of the MCP-1 chemokine, induced by IL-6 in combination with sIL-6-Rα, but not the expression of ICAM1 adhesion molecules in EA.hy926 human endothelial cells. Using specific inhibitors, we have shown that in EA.hy926 cells, IL-6-induced expression of MCP-1 and ICAM-1 depends on the signaling protein and transcription activator STAT3 and, in some cases, on JNK, PI3K, and MEK1/2 kinases and is independent of p38 kinase. In this model, IL-6 induced rapid STAT3 activation while ERK1/2 activation was less pronounced, and there was no IL-6 effect on Akt and JNK activation. SkQ1 partially suppressed STAT3 and ERK1/2 activation. Thus, we have shown that SkQ1 suppresses not only NF-κB-dependent expression of IL-6 and other pro-inflammatory genes, but also IL-6-induced activation of JAK/STAT3 and STAT3-dependent expression of MCP-1, which probably contributes to the overall therapeutic effect of SkQ1.

Keywords: *inflammation, cytokine storm, IL-6, endothelium, mitochondria, antioxidant, SkQ1*

Funding: The research was funded by Russian Foundation for Basic Research, project number 20-04-60452.

Сведения об авторах

Челомбитко Мария Александровна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. мат. методов в биологии НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: chelombitko@mail.bio.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-3902-7812>

Галкин Иван Ильич — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. мат. методов в биологии НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: ddeathseller@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-9025-3794>

Плетюшкина Ольга Юрьевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. мат. методов в биологии НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: pletjush@genebee.msu.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-4963-9054>

Зиновкин Роман Алексеевич — канд. биол. наук, зав. лабораторией электронного транспорта отдела молекулярной энергетики микроорганизмов НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: roman.zinovkin@gmail.com; ORCID: <https://orcid.org/0000-0001-5337-4346>

Попова Екатерина Николаевна — канд. биол. наук, ст. науч. сотр. отд. мат. методов в биологии НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ. Тел.: 8-495-939-03-38; e-mail: k_porova_ch@mail.ru; ORCID: <https://orcid.org/0000-0002-7521-7736>