

<https://doi.org/10.31146/1682-8658-ecg-207-11-204-210>

Роль перлекана в ремоделировании внеклеточного матрикса печени, легких и селезенки мышей после введения вакцины БЦЖ и липосомальной формы декстразида

Ким Л. Б., Путятин А. Н., Русских Г. С.

ФГБНУ «Федеральный исследовательский центр фундаментальной и трансляционной медицины», Новосибирск, Российская Федерация, 630117, ул. Тимакова, 2

Для цитирования: Ким Л. Б., Путятин А. Н., Русских Г. С. Роль перлекана в ремоделировании внеклеточного матрикса печени, легких и селезенки мышей после введения вакцины БЦЖ и липосомальной формы декстразида. Экспериментальная и клиническая гастроэнтерология. 2022;207(11): 204–210. DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-207-11-204-210

✉ Для переписки:

Ким

Лена Борисовна

lenkim@centercem.ru

Ким Лена Борисовна, д.м.н., гл.н.с., руководитель группы биохимии соединительной ткани; Отдел общей патологии
Путятин Анна Николаевна, к.м.н., н.с. группы биохимии соединительной ткани; Отдел общей патологии
Русских Галина Сергеевна, к.б.н., с.н.с. лаборатории медицинской биотехнологии

Резюме

Несмотря на известные достижения в диагностике туберкулёза, вопросы механизма развития и лечения фибротических осложнений остаются актуальными и нуждаются в решении.

Цель исследования — изучить содержание перлекана и выяснить его участие в ремоделировании внеклеточного матрикса органов мышей с туберкулёзным воспалением и при введении им противотуберкулёзной композиции.

Материалы и методы. Эксперимент проводили на мышах-самцах линии BALB/c, которые были разделены на 4 группы по 5 особей в каждой. Всем животным за исключением интактных мышей (группа 1) для моделирования генерализованного туберкулёзного процесса однократно ретроорбитально вводили вакцину БЦЖ (0,5 мг микробных тел в 0,2 мл 0,9% раствора NaCl). Через 6 мес после инфицирования в течение 3 мес мышам группы 2 внутривентрально вводили 50 мкл 0,9% раствора NaCl, группы 3 — внутривентрально 50 мкл раствора липосомальной формы декстразида (ЛФДЗ, конъюгат изониазида и окисленного декстрана, заключенный в липосомы), группы 4 — ингаляционно подавали раствор ЛФДЗ, распыляя в камере через небулайзер в течение 5 мин из расчёта 50 мкл раствора на животное. После последнего введения раствора NaCl и ЛФДЗ мышей выводили из эксперимента, забирали органы, готовили гомогенаты тканей. Измеряли содержание перлекана, гиалуронана, белково-связанного гидроксипролина, тканевых ингибиторов металлопротеиназ (ТИМП-1, ТИМП-2) и активность матриксных металлопротеиназ (ММП), гиалуронидаз, α 2-макроглобулина.

Результаты. Во всех органах инфицированных мышей было увеличено содержание перлекана, гиалуронана, белково-связанного гидроксипролина, ТИМП-1, ТИМП-2, активированы ММП, гиалуронидазы, α 2-макроглобулин. Независимо от способа введения ЛФДЗ уменьшалась выраженность фиброза за счет снижения содержания гиалуронана во всех органах и белково-связанного гидроксипролина в лёгких. Перлекан при внутривентральном введении участвует в фиброзировании селезёнки, ингаляционным — отражает выраженность фиброза печени.

Заключение. Корреляции перлекана с компонентами внеклеточного матрикса отражают участие в регуляции фиброза органов при БЦЖ-индуцированном воспалении.

Ключевые слова: туберкулёз, липосомальная форма декстразида, перлекан, гиалуронан, гидроксипролин/коллаген, α 2-макроглобулин, матриксные металлопротеиназы/тканевые ингибиторы металлопротеиназ, гиалуронидазы, органы мышей, фиброз

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

EDN: SERRDB





The role of perlecan in remodeling the extracellular matrix of the liver, lungs and spleen of mice after administration of BCG vaccine and the liposome-encapsulated dextrazide

Lena B. Kim, Anna N. Putyatina, Galina S. Russkikh

Federal Research Center of Fundamental and Translational Medicine, Novosibirsk, 630117, 2 Timakova str., Russia

Citation: Lena B. Kim, Anna N. Putyatina, Galina S. Russkikh The role of perlecan in remodeling the extracellular matrix of the liver, lungs and spleen of mice after administration of BCG vaccine and the liposome-encapsulated dextrazide. *Experimental and Clinical Gastroenterology*. 2022;207(11): 204–210. (In Russ.) DOI: 10.31146/1682-8658-ecg-207-11-204-210

✉ **Corresponding author:**

Lena B. Kim

lenkim@centercem.ru

Lena B. Kim, MD, chief researcher, head of the Connective tissue biochemistry group; Department of General Medicine; ORCID: 0000–0002–4051–8854; Research ID: A-8821–2016; Scopus Author ID: 7202158963

Anna N. Putyatina, PhD of Medical Sciences, researcher of the Connective tissue biochemistry group; Department of General Medicine; ORCID: 0000–0001–9599–3049; Research ID: S-5813–2017; Scopus Author ID: 48661356700

Galina S. Russkikh, PhD in Biological Sciences, senior researcher at the Laboratory of medical biotechnology; ORCID: 0000–0003–1565–5248; Scopus Author ID: 6602320242

Summary

Despite significant advances in the diagnosis of tuberculosis, the issues of the mechanism of development and treatment of fibrotic manifestations are relevant and take place in the treatment.

The aim of the study was to study the content of perlecan and to find out its participation in the remodeling of the extracellular matrix of the organs of mice with tuberculous inflammation and when they were injected with an antitubercular composition.

Materials and methods. The experiment was carried out on male mice of the BALB/c line, which were divided into 4 groups of 5 individuals each. All animals, with the exception of intact mice (group 1), were retroorbitally injected with BCG vaccine once (0.5 mg of microbial bodies in 0.2 ml of 0.9% NaCl solution) to simulate a generalized tuberculosis process. After infection 6 mo for 3 mo, group 2 mice were intraperitoneally injected with 50 µl of 0.9% NaCl solution, group 3 — intraperitoneally with 50 µl of liposome-encapsulated dextrazide solution (LEDZ, isoniazid conjugate and oxidized dextran enclosed in liposomes), group 4 — LEDZ solution was inhaled by spraying in the chamber through a nebulizer for 5 min at the rate of 50 µl of solution per animal. After the last administration of the NaCl and LEDZ solution, mice were removed from the experiment, organs were taken, and tissue homogenates were prepared. The content of perlecan, hyaluronan, protein-bound hydroxyproline, tissue metalloproteinase inhibitors (TIMP-1, TIMP-2) and the activity of matrix metalloproteinases (MMP), hyaluronidases, α2-macroglobulin were measured.

Results. In all organs of infected mice, the content of perlecan, hyaluronan, protein-bound hydroxyproline, TIMP-1, TIMP-2 was increased, MMP, hyaluronidase, α2-macroglobulin were activated. Regardless of the method of administration of LEDZ, the severity of fibrosis decreased due to a decrease in the content of hyaluronan in all organs and protein-bound hydroxyproline in the lungs. Perlecan with intraperitoneal administration is involved in fibrosis of the spleen, inhalation — reflects the severity of liver fibrosis.

Conclusion. Correlations of perlecan with extracellular matrix components reflect participation in the regulation of fibrosis of organs in BCG-induced inflammation.

Keywords: tuberculosis, liposome-encapsulated dextrazide, perlecan, hyaluronan, hydroxyproline/collagen, α2-macroglobulin, matrix metalloproteinases/tissue metalloproteinase inhibitors, hyaluronidases, mouse organs, fibrosis

Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest.

Введение

Туберкулёз является системным заболеванием, вызывается *M. tuberculosis*, отличается многообразием клинических форм и осложнений. К сожалению, заболевание остается одной из наиболее частых причин летальных исходов среди инфекционных болезней [1].

По данным ВОЗ в терапии туберкулёза просматриваются успехи, однако они не настолько велики, чтобы говорить о победе. По-видимому, эта ситуация связана с тем, что, во-первых, неполноценны знания, касающиеся патогенеза заболевания и терапевтических мишеней, во-вторых, недостаточная эффективность имеющихся в арсенале средств, в третьих, не всегда соблюдается приверженность пациентов к терапии из-за продолжительности лечения и развивающихся побочных эффектов, вызываемых противотуберкулёзными препаратами (токсичность, интерстициальный фиброз органов и др.).

На модели БЦЖ-индуцированного гранулематоза у мышей продемонстрирована периодизация процесса, основанная на степени развития фиброза [2]. Известно, что фиброз органов – это динамичный процесс, в котором есть общие фазы и для реакции заживления ран [3]. Часто о фиброзе судят по избыточной продукции и содержанию коллагенов в тканях [4, 5]. Однако фиброзирование это сложный процесс, происходящий с участием факторов роста, хемокинов, при котором физиологическое ремоделирование внеклеточного матрикса (ВКМ) приобретает свойства патологического, нарушаются взаимосвязи между основными компонентами ВКМ, развивается дисбаланс в системе локальной регуляции матриксные металлопротеиназы/тканевые ингибиторы металлопротеиназ (ММП/ТИМП) [6]. К основным компонентам ВКМ относят коллагены (типы I–XXVIII), гликопротеины, протеогликаны (ПГ). Среди последних выделяют гепарансульфатные ПГ (перлекан, агрин, коллаген XVIII типа) [7], которым отводят ключевую роль в регуляции фиброгенеза [3]. Объясняется это тем, что перлекан постоянно присутствует в базальных мембранах [8] и во ВКМ [9]. В сложной мультидоменной структуре перлекана имеются сайты

связывания факторов роста (фактор роста фибробластов-2 (FGF-2), тромбоцитарный фактор роста (PDGF), фактор роста эндотелия сосудов (VEGF), фактор роста соединительной ткани (CTGF)), ламинина, коллагена IV и XI типов, ЛПНП, которые обеспечивают организацию тканей и стабилизацию ВКМ [10, 11]. Локализация перлекана и способность взаимодействовать со многими компонентами ВКМ предполагает участие перлекана в физиологическом развитии и патогенезе многих заболеваний, модификации структурной поддержки базальной мембраны и взаимосвязи ВКМ с клетками, необходимой для стабильного формирования и функционирования тканей [10].

Способность изменять структуру и функцию ВКМ обеспечивают ключевую роль перлекана в регуляции фиброгенеза [3]. Однако в чем заключается участие перлекана при туберкулёзной инфекции, осложненной фиброзом органов, предстоит еще выяснить. В связи со сказанным в настоящем исследовании предполагается проверить гипотезу о ключевой роли перлекана в регуляции фиброгенеза при фиброзе органов туберкулёзной этиологии и при введении противотуберкулёзной композиции, содержащей конъюгат изониазида с окисленным декстраном (декстразид), заключенный в липосомы, обозначенная как липосомальная форма декстразида (ЛФДЗ).

Поскольку нами ранее было показано, что эффекты введения ЛФДЗ зависели от периода введения инфицированным *M. tuberculosis* мышам и от способа введения [12, 13], целесообразным представлялось изучение содержания перлекана и выявление корреляционных связей его с другими компонентами ВКМ в периоде хронического воспаления. В этом периоде в печени и лёгких инфицированных мышей содержание гидроксипролина (ГОП), маркера коллагена, было максимальным [2, 14].

Цель исследования – изучить содержание перлекана и выяснить его участие в ремоделировании ВКМ органов мышей с БЦЖ-индуцированным воспалением и при введении им противотуберкулёзной композиции.

Материалы и методы исследования

Эксперимент проводили на 20 мышах линии BALB/c (2-х месячные самцы массой 18–22 г). Животные получены из Государственного научного центра вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово, г. Новосибирск). Животные содержались в стандартных условиях вивария со свободным доступом к питьевой воде и корму. Случайным образом мыши были разделены на 4 группы по 5 особей в каждой.

Всем животным, за исключением 1-й группы интактных мышей для моделирования генерализованного туберкулёзного процесса однократно реинтубировано вводили вакцину БЦЖ («НИИЭМ им. Н. Ф. Гамалеи» МЗ России, Москва) из расчёта 0,5 мг микробных тел в 0,2 мл 0,9% раствора NaCl.

Через 6 мес после инфицирования в течение 3 мес (2 раза в неделю) мышам 2-й группы внутриперитонеально вводили 50 мкл 0,9% раствора NaCl, 3-й группы – внутриперитонеально 50 мкл раствора ЛФДЗ (смесь 2% раствора декстразида и 1% фосфатидилхолина, липосомы размером 0,20–0,25 мкм), 4-й группы – ингаляционно подавали раствор ЛФДЗ, который распыляли в камере через небулайзер Comp Air NE-C28-Ru (Omron, Китай) в течение 5 мин из расчёта 50 мкл раствора на животное.

Уход за животными и эксперименты проводили в соответствии с требованиями Европейской конвенции о защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях, а также в соответствии с «Правилами

проведения работ с использованием экспериментальных животных» (Приложение к приказу Министерства здравоохранения СССР от 12.08.1977 г. № 755).

На следующий день после последнего введения раствора NaCl и ЛФДЗ мышей выводили из эксперимента, забирали органы (печень, лёгкие, селезёнка), готовили 10% гомогенаты. К этому моменту возраст мышей составил 11 мес.

С помощью ELISA kit для мышей согласно инструкции производителя определяли содержание перлекана (Cloud-Clone Corp., США), гиалуронана (MyBioSource Inc., Германия), ТИМП-1 и ТИМП-2 (Invitrogen, США). Измеряли содержание белково-связанного ГОП (белГОП), активность гиалуронидаз, ММП, $\alpha 2$ -макроглобулина ($\alpha 2$ -МГ) по ранее описанным методам [13]. Активность гиалуронидаз, ММП, $\alpha 2$ -МГ и содержание перлекана,

гиалуронана, ТИМП пересчитывали на белок, измеренный по методу Bradford.

Статистическую обработку полученных результатов проводили с использованием пакета прикладных программ Statistica v. 10,0 (StatSoft Inc., США). Поскольку в большинстве случаев распределение признаков в выборках не подчинялось закону нормального распределения, были использованы непараметрические методы анализа, вычисляли медиану (Me), нижний и верхний квартили (Q_{25} ; Q_{75}). Корреляционный анализ параметров проводили с учетом ранговой корреляции по Спирмену. Для проверки статистической гипотезы разности значений для двух независимых переменных использовали U-критерий Манна-Уитни. Критическим уровнем значимости при проверке статистической гипотезы принимали $p < 0,05$.

Результаты исследования

Содержание перлекана у контрольных мышей (группа 1) в органах было различным: наибольшее значение отмечено в печени, наименьшее – в селезёнке (табл. 1). У инфицированных мышей (группа 2) содержание перлекана увеличилось во всех органах, в частности в печени в 6,5 раз, лёгких – 17,7 раза, селезенке – 8,6 раз относительно мышей группы 1.

После 3-мес внутриперитонеального введения ЛФДЗ у мышей (группы 3) значимое снижение содержания перлекана было в печени (в 5,2 раза) и лёгких (7,6 раза) при отсутствии различий в селезёнке по сравнению с данными группы 2. Ингаляционное введение ЛФДЗ (группа 4) вызывало более равномерное снижение перлекана (в печени в 2,4 раза, лёгких – 2,8 раза, селезенке – 2,7 раза) относительно данных группы 2.

В группе 1 наименьшее содержание гиалуронана и белГОП отмечено в селезёнке, после инфицирования их содержание увеличилось во всех органах, особенно в селезёнке (в 40 и 10,5 раз соответственно). После введения ЛФДЗ эти показатели снижались. При этом содержание гиалуронана значимо снижено в трех органах как группе 3, так и в группе 4. Содержание белГОП в группе 3 было снижено в печени и лёгких, в группе 4 – снижено в лёгких, но повышено в печени, тогда как в селезёнке в обеих группах наметилась лишь тенденция к снижению ($p \geq 0,05$).

Обнаружены изменения в ферментативной системе, регулирующей обменные процессы во ВКМ (табл. 1). В группе 1 в селезёнке была наименьшая активность ММП, гиалуронидаз, $\alpha 2$ -МГ и наименьшее содержание ТИМП-1 и –2 по сравнению с другими органами.

У мышей группы 2 во всех органах, особенно в селезёнке, отмечена активация деградирующих ферментов (ММП, гиалуронидаз) и повышение содержания ингибирующих ферментов (ТИМП-1 и –2). Максимальная активация $\alpha 2$ -МГ была в печени.

В группе 3 отмечено значимое снижение активности гиалуронидаз в лёгких и увеличение в селезёнке. Активность ММП, $\alpha 2$ -МГ и содержание

ТИМП-1 и –2 были снижены в печени и лёгких относительно данных группы 2, в селезёнке они оставались на уровне группы 2.

В группе 4 отмечено значимое снижение в лёгких и селезёнке активности гиалуронидаз, в селезёнке – активности ММП, во всех 3-х органах – активности $\alpha 2$ -МГ и содержания ТИМП-1 и –2 относительно данных группы 2.

Таким образом, у инфицированных мышей во всех изученных органах, особенно в лёгких, повышенное содержание перлекана, гиалуронана и белГОП сопровождалось активацией деградирующих ферментов (ММП, гиалуронидаз), активацией и повышением содержания ингибирующих ферментов ($\alpha 2$ -МГ, ТИМП-1 и –2).

После внутриперитонеального введения ЛФДЗ отмечено в разной степени выраженное снижение изученных компонентов ВКМ (перлекана и белГОП – в печени и лёгких, гиалуронана во всех органах) и ферментов: ММП, ТИМП-1, –2 и $\alpha 2$ -МГ – в печени и лёгких. После ингаляционного введения ЛФДЗ были снижены содержание перлекана и гиалуронана во всех органах, белГОП – в лёгких и повышено его содержание – в печени. Последнее пока не поддается объяснению, поскольку активность ММП сохранялась на уровне инфицированных мышей, тогда как ингибиторы ТИМП-1, ТИМП-2 и активность $\alpha 2$ -МГ в печени снижены. В селезёнке сохранение содержания белГОП на уровне инфицированных мышей можно связать со снижением активности ММП и $\alpha 2$ -МГ, содержания ингибиторов ТИМП-1 и –2 в этом органе.

Результаты корреляционного анализа продемонстрировали у мышей группы 1 в лёгких положительную связь с активностью гиалуронидаз ($r=0,96$; $p=0,010$) и ТИМП-2 ($r=0,96$; $p=0,010$), но отрицательную корреляцию с белГОП ($r=-0,90$; $p=0,037$). В селезёнке наблюдали положительную связь с гиалуронаном ($r=0,92$; $p=0,028$), ТИМП-1 ($r=0,97$; $p=0,005$) и отрицательную корреляцию с белГОП ($r=-0,91$; $p=0,031$).

В группе 2 содержание перлекана в печени положительно коррелировало с активностью

Таблица 1.

Содержание перлекана, гиалуронана, белково-связанного гидроксипролина и реакция системы ММП/ТИМП в органах мышей с БЦЖ-индуцированным воспалением при введении ЛФДЗ (Me (Q₂₅; Q₇₅))

Примечание:

NaCl – физиологический раствор, ЛФДЗ – липосомальная форма декстразы, ГОП – гидроксипролин, ММП – матриксные металлопротеиназы, ТИМП – тканевые ингибиторы металлопротеиназ.

* p<0,05 по сравнению с данными группы 1; + – группы 2; # – группы 3

Показатель	Орган	Группа			
		Интактные мыши	БЦЖ+NaCl внутри-перитонеально	БЦЖ+ЛФДЗ внутри-перитонеально	БЦЖ+ЛФДЗ ингаляции
		1 группа, n=5	2 группа, n=5	3 группа, n=5	4 группа, n=5
Перлекан, пг/мг белка	Печень	283,60 (231,27; 297,00)	1857,00* (1469,93; 3835,62)	353,48* (286,65; 420,82)	784,70*** (692,02; 1046,48)
	Лёгкие	165,86 (164,06; 196,43)	2940,00* (2533,45; 3346,63)	386,88** (346,27; 496,27)	1046,70*** (915,55; 1137,32)
	Селезёнка	26,82 (20,22; 46,00)	230,98* (224,39; 359,34)	220,20* (211,41; 237,54)	85,24*** (62,53; 92,70)
Гиалуронан, нг/мг белка	Печень	25,21 (20,71; 31,78)	149,19* (77,78; 256,95)	33,75* (27,93; 35,01)	123,25** (77,16; 138,38)
	Лёгкие	27,68 (24,24; 32,69)	357,14* (308,30; 569,48)	52,01** (49,54; 56,72)	114,73*** (93,00; 164,79)
	Селезёнка	4,45 (3,87; 5,34)	178,62* (167,82; 235,96)	155,17** (140,83; 164,03)	33,65*** (27,93; 53,05)
Белково-связанный ГОП, мкг/мг сухой ткани	Печень	65,52 (49,61; 83,96)	457,47* (413,19; 601,38)	257,01** (233,54; 379,04)	622,88*** (564,77; 636,28)
	Лёгкие	8,92 (8,04; 13,98)	57,27* (50,44; 63,57)	31,86** (27,77; 51,90)	44,32** (40,49; 47,75)
	Селезёнка	7,26 (4,11; 9,22)	76,29* (63,59; 87,02)	56,78* (53,51; 81,91)	64,01* (52,74; 78,29)
Активность гиалуронидаз, нМ NAG/мин/мг белка	Печень	0,49 (0,42; 0,57)	1,83* (0,91; 2,59)	1,96* (1,44; 2,12)	0,79 (0,57; 1,76)
	Лёгкие	0,48 (0,40; 0,75)	2,32* (1,32; 3,40)	0,51* (0,40; 0,80)	0,52* (0,43; 0,97)
	Селезёнка	0,03 (0,03; 0,04)	1,16* (0,54; 1,31)	4,02** (3,86; 5,32)	0,21*** (0,14; 0,43)
Активность ММП, мкМ МСА/мин/мг белка	Печень	5,51 (4,25; 7,45)	48,66* (41,91; 61,35)	17,92** (15,05; 21,45)	38,77** (35,79; 51,09)
	Лёгкие	13,76 (11,56; 18,74)	128,67* (110,23; 162,61)	34,17** (32,80; 37,42)	115,77** (103,78; 124,46)
	Селезёнка	0,54 (0,37; 0,61)	18,67* (17,60; 28,90)	25,04* (18,66; 31,67)	6,08*** (4,97; 8,19)
Активность α2-макроглобулина, ИЕ/мг белка	Печень	0,004 (0,004; 0,006)	0,21* (0,19; 0,25)	0,09** (0,07; 0,10)	0,03*** (0,02; 0,03)
	Лёгкие	0,03 (0,03; 0,06)	0,37* (0,31; 0,52)	0,06** (0,05; 0,08)	0,11*** (0,09; 0,18)
	Селезёнка	0,007 (0,005; 0,010)	0,12* (0,11; 0,26)	0,15* (0,12; 0,17)	0,04*** (0,03; 0,05)
ТИМП-1, нг/мг белка	Печень	1,75 (1,41; 2,10)	21,00* (20,26; 24,98)	3,45** (2,24; 6,10)	6,85** (3,72; 8,39)
	Лёгкие	1,14 (0,96; 1,41)	10,81* (10,55; 16,39)	1,71** (1,59; 1,82)	4,43*** (3,62; 5,34)
	Селезёнка	0,12 (0,10; 0,16)	2,64* (1,77; 5,02)	3,97* (2,90; 5,31)	0,85*** (0,80; 1,23)
ТИМП-2, нг/мг белка	Печень	4,22 (3,44; 5,09)	82,21* (81,60; 85,13)	8,40** (7,22; 9,47)	21,23*** (16,62; 23,55)
	Лёгкие	1,58 (1,24; 2,10)	20,02* (18,93; 26,45)	2,96** (2,36; 3,18)	5,96*** (4,92; 7,60)
	Селезёнка	0,04 (0,04; 0,06)	0,89* (0,63; 1,61)	1,24* (1,10; 2,02)	0,34*** (0,26; 0,46)

гиалуронидаз (r=0,90; p=0,037), ингибиторами протеаз: α2-МГ (r=0,97, p=0,005) и ТИМП-1 (r=0,98, p=0,002), в селезёнке – с активностью ММП (r=0,90, p=0,037). В лёгких мышей значимых корреляций не выявлено.

У мышей группы 3 значимые корреляции были только в селезёнке: содержание перлекана

положительно коррелировало с гиалуронаном (r=0,90, p=0,037), ингибиторами ММП – ТИМП-1 (r=0,92, p=0,029), ТИМП-2 (r=0,91, p=0,029).

У мышей группы 4 корреляции отмечены только в печени: содержание перлекана положительно коррелировало с гиалуронаном (r=0,90, p=0,037) и ТИМП-2 (r=0,93, p=0,021).

Обсуждение

В настоящем исследовании обнаружено различное содержание перлекана в органах интактных мышей. Надо заметить, что содержание ГОП в этих органах у 12 мес интактных мышей соотносилось таким же образом: максимальное содержание было в печени, минимальное – в селезёнке и среднее – в лёгких [15].

Максимальное увеличение в селезёнке после инфицирования содержания гиалуронана и белГОП

наряду с максимально высокой активностью ММП и гиалуронидаз, содержанием ТИМП-1 и –2 можно объяснить способностью перлекана связывать интерлейкин-2. Предположение основано на том факте, что перлекан идентифицируется как основной интерлейкин-2-связывающий ПГ в селезёнке мышей [16]. Располагаясь в базальных мембранах, а также в красной пульпе и краевых зонах селезёнки интерлейкин-2, связывается

с гепарансульфатными цепями N-концевого домена перлекана, проявляет иммунные реакции на внедрение инфекта, в нашем случае – *M. tuberculosis*.

Отмеченные корреляционные связи перлекана в печени, лёгких и селезёнке интактных мышей (группа 1) свидетельствует о его связи с разными компонентами ВКМ, в том числе с гиалуронатом, коллагеном (белГОП) и элементами регуляции метаболизма ВКМ – ингибиторами ММП (ТИМП-1, ТИМП-2). Эти корреляции можно рассматривать как свидетельство взаимодействия перлекана с основными компонентами ВКМ и его участие в обеспечении организации тканей, стабилизации матрикса, поддержание тканевого гомеостаза и функции органа [11]. Отрицательные корреляции перлекана с белГОП в лёгких и селезёнке, по-видимому, предполагают причастность перлекана в регуляции синтеза коллагена в этих органах.

После 6 мес инфицирования мышей (группа 2) содержание перлекана увеличилось во всех органах, особенно в лёгких (табл. 1), что связано с повышенным его синтезом, как и коллагена, динамика которого была описана ранее [2]. В синтезе перлекана, коллагена и других компонентов ВКМ участвуют циркулирующие воспалительные клетки, макрофаги и гранулоциты, мезенхимальные стволовые клетки [17]. Огромный вклад в этот процесс вносят активированные фибробласты (ФБ) – миоФБ, которые экспрессируют α -гладкомышечный актин (α -SMA) и гиперэкспрессия коллагена и фибронектина. Известно, что активация ФБ индуцируется и поддерживается многими воспалительными медиаторами (трансформирующим фактором роста- β (TGF- β), тромбоцитарным фактором роста (PDGF), фактором некроза опухоли (TNF- α), интерлейкином-6) [18–20]. В этой группе

мышей обнаружены в печени сильные положительные связи содержания перлекана с активностью гиалуронидаз и ингибиторами протеаз: α 2-МГ и ТИМП-1, которые предполагают, что перлекан участвует в развитии фиброза печени, взаимодействуя с ферментами, обладающими деградирующими и ингибирующими компоненты ВКМ свойствами. Можно ожидать, что чем выше будут показатели, тем заметнее будет вклад перлекана в фиброзирование печени. В селезёнке мышей, отмеченная положительная корреляция содержания перлекана с активностью ММП, позволяет ожидать, что повышение активности ММП усилит вклад перлекана в ремоделирование ВКМ и фиброз селезёнки. Это ожидание вполне реально, поскольку выше отмечалось, что селезёнка инфицированных мышей отличалась максимальной активностью ММП, большим содержанием белГОП и гиалуронана по сравнению с другими органами (табл. 1).

После внутривентриального введения ЛФДЗ (группа 3) в селезёнке мышей были значимые положительные корреляции содержания перлекана с гиалуронатом, ингибиторами ММП – ТИМП-1 и –2. Поскольку в этом органе содержание белГОП и перлекана оставалось на уровне инфицированных мышей (группа 2), отмеченные корреляции свидетельствуют об участии перлекана в фиброзировании органа.

После ингаляционного введения ЛФДЗ (группа 4) в печени положительные корреляции содержания перлекана с гиалуронатом и ТИМП-2 на фоне снижения содержания перлекана, но повышения белГОП и отсутствия различий в активности ММП и гиалуронидаз относительно данных группы 2, можно допустить участие перлекана в качестве показателя выраженности фиброза в печени.

Выводы

1. Различное содержание перлекана, мультидоменного гепарансульфатного ПГ в печени, лёгких и селезёнке, отражает его органоспецифичность.
2. После инфицирования мышей микобактериями вакцины БЦЖ в печени, лёгких и, особенно, в селезёнке отмечены признаки фиброза, активации деградирующих и ингибирующих ферментов, регулирующих обмен компонентов ВКМ органов.
3. При введении ЛФДЗ инфицированным мышам уменьшается выраженность фиброза независимо от способа введения за счет снижения содержания гиалуронана в трех органах и белГОП – в лёгких.
4. При внутривентриальном введении ЛФДЗ наличие в селезёнке корреляции перлекана с гиалу-

ронаном при сохраняющейся высокой активности деградирующих ферментов (ММП и гиалуронидазы) и содержания ингибирующих энзимов (ТИМП-1, ТИМП-2, активность α 2-МГ) и белГОП как в группе 2 свидетельствует об участии перлекана в фиброзировании органа.

5. При ингаляционном введении ЛФДЗ наличие в печени корреляции перлекана с гиалуронатом при отсутствии различий в активности деградирующих ферментов (ММП и гиалуронидаз), снижения содержания ингибирующих энзимов (ТИМП-1, ТИМП-2) и повышения белГОП позволяет рассматривать перлекан как показатель выраженности фиброза в этом органе.

Благодарность

Авторы выражают благодарность сотрудникам лаборатории биосовместимых наночастиц, наноматериалов и средств адресной доставки ФИЦ ФТМ (рук.к.м.н. Троицкий А. В.) за предоставленные образцы ЛФДЗ.

Финансирование

Работа выполнена в рамках государственного задания № 122032300155–4 с использованием оборудования ЦКП «Современные оптические системы», а также ЦКП «Протеомный анализ», поддержанного финансированием Минобрнауки России (соглашение № 075–15–2021–691).

Литература | References

1. Global tuberculosis report 2020. Geneva: World Health Organization; 2020.
2. Shkurupiy V. A., Kim L. B., Potapova O. V., et al. Fibrogenesis in granulomas and lung interstitium in tuberculous inflammation in mice. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014;156(6):731–5. doi: 10.1007/s10517-014-2435-y.
3. Lord M. S., Tang F., Rnjak-Kovacina J., et al. The multifaceted roles of perlecan in fibrosis. *Matrix Biol.* 2018;68–69:150–66. doi: 10.1016/j.matbio.2018.02.013.
4. Karsdal M. A., Nielsen S. H., Leeming D. J., et al. The good and the bad collagens of fibrosis – Their role in signaling and organ function. *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2017;121:43–56. doi: 10.1016/j.addr.2017.07.014.
5. Karsdal M. A., Daniels S. J., Holm Nielsen S., et al. Collagen biology and non-invasive biomarkers of liver fibrosis. *Liver Int.* 2020;40(4):736–50. doi: 10.1111/liv.14390.
6. Giannandrea M., Parks W. C. Diverse functions of matrix metalloproteinases during fibrosis. *Dis. Model Mech.* 2014;7(2):193–203. doi: 10.1242/dmm.012062.
7. Iozzo R. V., Schaefer L. Proteoglycan form and function: a comprehensive nomenclature of proteoglycans. *Matrix Biol.* 2015;42:11–55. doi: 10.1016/j.matbio.2015.02.003.
8. Farach-Carson M. C., Warren C. R., Harrington D. A., Carson D. D. Border patrol: insights into the unique role of perlecan/heparan sulfate proteoglycan 2 at cell and tissue. *Matrix Biol.* 2014;34:64–79. doi:10.1016/j.matbio.2013.08.004.
9. McCarthy K. J. The basement membrane proteoglycans perlecan and agrin: something old, something new. *Curr. Top Membr.* 2015;76:255–303. doi: 10.1016/bs.ctm.2015.09.001.
10. Arikawa-Hirasawa E. Role of perlecan in development and diseases. *Adv. Dev. Biol.* 2005;15:65–80. doi: 10.1016/S1574-3349(05)15002-9.
11. Melrose J. Perlecan, a modular instructive proteoglycan with diverse functional properties. *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2020;128:105849. doi: 10.1016/j.biocel.2020.105849.
12. Kim L. B., Putyatina A. N., Russkikh G. S., Shkurupiy V. A. Antifibrotic effect of liposome-encapsulated composition of oxidized dextran and isonicotinic acid hydrazide in mice with BCG-induced granulomatosis depends on administration route. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2020;169(1):71–6. doi: 10.1007/s10517-020-04827-4.
13. Kim L. B., Putyatina A. N., Russkikh G. S., Shkurupiy V. A. Specific parameters of extracellular matrix remodeling of liver and lungs of mice with BCG granulomatosis during chronic inflammation depending on the method of administration of liposomal oxidized dextran. *Tuberculosis and Lung Diseases.* 2021;99(8):40–6. (In Russ.) doi: 10.21292/2075-1230-2021-99-8-40-46.
14. Kim L. B., Putyatina A. N., Russkikh G. S., Шкурупий В. А. Особенности ремоделирования внеклеточного матрикса печени и лёгких мышей с БЦЖ-гранулематозом в периоде хронического воспаления в зависимости от способа введения липосомальной формы декстразида // Туберкулёз и болезни лёгких. – 2021. – Т. 99, № 8. – С. 40–6.
15. Shkurupiy V. A., Kim L. B., Potapova O. V. et al. Study of fibrotic complications and hydroxyproline content in mouse liver at different stages of generalized BCG-induced granulomatosis. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2014;157(4):466–9. doi: 10.1007/s10517-014-2592-z.
16. Kim L. B., Putyatina A. N., Russkikh G. S., Shkurupiy V. A. Peculiarities of collagen turnover in aging BALB/c mice. *Bull. Exp. Biol. Med.* 2020;169(1):100–3. doi: 10.1007/s10517-020-04833-6.
17. Miller J. D., Stevens E. T., Smith D. R., et al. Perlecan: a major IL-2-binding proteoglycan in murine spleen. *Immunol. Cell Biol.* 2008;86(2):192–9. doi: 10.1038/sj.icb.7100128.
18. Asplund A., Stillemark-Billton P., Larsson E., et al. Hypoxic regulation of secreted proteoglycans in macrophages. *Glycobiology.* 2010;20(1):33–40. doi: 10.1093/glycob/cwp139.
19. Scotton C. J., Chambers R. C. Molecular targets in pulmonary fibrosis: the myofibroblast in focus. *Chest.* 2007;132(4):1311–21. doi: 10.1378/chest.06-2568.
20. Hinz B. The myofibroblast: paradigm for a mechanically active cell. *J. Biomech.* 2010;43(1):146–55. doi: 10.1016/j.jbiomech.2009.09.020.
21. Albeiroti S., Soroosh A., de la Motte C. A. Hyaluronan's role in fibrosis: a pathogenic factor or a passive player? *Biomed. Res. Int.* 2015;2015:790203. doi: 10.1155/2015/790203.