

**НАЦІОНАЛЬНА АКАДЕМІЯ НАУК УКРАЇНИ
ІНСТИТУТ ФІЗІОЛОГІЇ ім. О.О. БОГОМОЛЬЦЯ**

ГОНЧАРОВ СЕРГІЙ ВІКТОРОВИЧ

УДК 616.8 : 612.825 : 612.827 : 612.826 : 577.152.34

**МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧНІ МЕХАНІЗМИ
ПОРУШЕННЯ ПРОТЕАСОМНОГО ПРОТЕОЛІЗУ
ПРИ АРТЕРІАЛЬНІЙ ГІПЕРТЕНЗІЇ ТА ПІДХОДИ ДО
ЇЇ КОРЕКЦІЇ**

14.03.04 – патологічна фізіологія

АВТОРЕФЕРАТ

дисертації на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук

Київ – 2021

Дисертацією є рукопис

Робота виконана у відділі загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України.

Науковий керівник:

академік НАН України, доктор медичних наук, професор

Мойбенко Олексій Олексійович

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Завідувач відділу загальної та молекулярної патофізіології

доктор медичних наук, професор

Досенко Віктор Євгенович

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Завідувач відділу загальної та молекулярної патофізіології

Офіційні опоненти:

доктор медичних наук, професор

Соловйов Анатолій Іванович

Державна установа «Інститут фармакології та токсикології НАМН України» завідувач відділу фармакології клітинних сигнальних систем та експериментальної терапії

доктор медичних наук, професор

Талаєва Тетяна Володимирівна

Державна установа «Національний науковий центр "Інститут кардіології ім. акад. М.Д. Стражеска" Національної академії медичних наук України», завідувач відділу фундаментальних досліджень

Захист дисертації відбудеться «30» березня 2021 р. о 14⁰⁰ годині на засіданні спеціалізованої вченої ради Д 26.198.01 при Інституті фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України за адресою: 01024, м. Київ-24, вул. Богомольця, 4.

З дисертацією можна ознайомитися у бібліотеці Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України та на сайті Інституту: http://biph.kiev.ua/en/Specialized_Scientific_Council

Автореферат розісланий «26» лютого 2021 р.

Вчений секретар
спеціалізованої вченої ради
кандидат біологічних наук



Любанова О.П.

ЗАГАЛЬНА ХАРАКТЕРИСТИКА РОБОТИ

Актуальність теми

Україна посідає перше місце серед країн Європи за смертністю населення від серцево-судинних захворювань, серед яких значне місце займає артеріальна гіпертензія (АГ). Ця патологія спостерігається майже у 30% дорослих мешканців та навіть у дітей (від 14,8% до 16,3%) [Bell et al., 2019]. У механізмах розвитку АГ важливе значення мають процеси синтезу та вчасної утилізації протеїнів у клітинах як судинної стінки, так і серця. Найважливішою внутрішньоклітинною системою деградації «зношених» протеїнів є убіквітинзалежний протеасомний протеоліз, за рахунок якого руйнується до 90% внутрішньоклітинних білків [Goldberg et al., 2003]. Останніми роками накопичуються дані про роль порушень протеасомного протеолізу в патогенезі захворювань судин та серця, в тому числі і АГ. Так, Сю і співавтори [Xu et al., 2012] показали аномально високу активність протеасом при ендотеліальній дисфункції у мишей. Застосовуючи синтетичні протеасомні інгібітори, Такаока та співавтори [Такаока et al., 2001, 1998] виявили, що вказані сполуки забезпечують антигіпертензивний вплив, пригнічуючи проліферацію гладеньком'язових клітин в аорті. Проте, Бокорні та інші [Bockorny et al., 2012] вказали на негативні побічні дії синтетичних інгібіторів протеасоми та дороговизну цих препаратів, що спонукає до пошуку їхніх аналогів, позбавлених таких вад. Так, Мойбенко [Мойбенко О.О. та ін., 2006] та Нам [Nam et al., 2001] показали, що, зокрема, кверцетин та поліфеноли з листя чаю є ефективними протеасомними інгібіторами. Дуарте та співавтори [Duarte et al., 2009] застосовували кверцетин для корекції АГ у спонтанно гіпертензивних щурів (SHR) та отримали зниження систолічного тиску в середньому на 18%, діастолічного – на 23%, середнього тиску – на 21%, а також спостерігали уповільнення розвитку гіпертрофії серця. Пашевін та ін. [Pashvin et al., 2011] показали антиатерогенний ефект кверцетину, оснований на пригніченні протеасомної активності. Однак слід вказати, що молекулярні механізми, котрі забезпечують вказані ефекти (зміни протеолітичної активності протеасом та/або експресії генів, що кодують субодиниці протеасоми), досі не досліджувалися.

На активність протеасом може істотно впливати і поліморфізм генів, що кодують їх субодиниці. Так, в роботах японських дослідників було встановлено, що поліморфізм гену *PSMA6* (C⁻⁸→G) позитивно впливає на транскрипційну активність цього гену і опосередковано змінює активність протеасом [Ozaki et al., 2006]. При цьому значення вказаного поліморфізму та однонуклеотидних замін у генах інших субодиниць протеасоми не вивчалися; їхня роль як факторів ризику розвитку АГ взагалі не розглядалася.

Зв'язок роботи з науковими програмами, планами, темами

Роботу виконано в рамках наукової тематики відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України: «Вивчення молекулярно-генетичних механізмів розвитку ішемії-реперфузії та розробка нових методів генотерапії інфаркту міокарда» (№ держреєстрації 0107U005336), «Дослідження ендогенних, молекулярно-генетичних механізмів

ушкодження та цитопротекції при ішемічній патології» (№ держреєстрації 0107U005323), «Вивчення механізмів розвитку серцево-судинної патології за допомогою багаторівневих досліджень: від поліморфізму та експресії генів до патофізіологічних проявів» (№ держреєстрації 0107U005336).

Метою дослідження було визначити роль протеасомного протеолізу у розвитку АГ в умовах тваринної моделі та клініки і запропонувати метод експериментальної терапії цієї патології із застосуванням інгібітору протеасомної активності.

Задачі дослідження:

1. З'ясувати роль алельного поліморфізму генів, що кодують субодиниці протеасоми при есенціальній АГ у дітей та підлітків.
2. Провести порівняльну характеристику кардіогемодинамічних та морфологічних параметрів нормотензивних та гіпертензивних щурів лінії Wistar і SHR.
3. Визначити рівень експресії мРНК генів, що кодують конститутивні, індукційні та регуляторні субодиниці протеасоми у тканинах серця та аорти щурів.
4. Встановити зміни трипсиноподібної, хімотрипсиноподібної та пептидилглютамін пептидгідролазної активностей протеасом у тканинах аорти та серця спонтанно-гіпертензивних щурів.
5. Оцінити ефективність терапії АГ із застосуванням інгібітору протеасомної активності в умовах експериментальної моделі.

Предмет дослідження – роль алельних поліморфізмів генів, що кодують субодиниці протеасоми, у формуванні ризику АГ; стан протеасомного протеолізу як фактор розвитку спонтанної АГ.

Об'єкт дослідження – активність протеасом; ДНК, виділена з венозної крові хворих на артеріальну гіпертензію та букального епітелію практично здорових осіб; РНК, виділена із тканин аорти та серця нормотензивних та гіпертензивних щурів.

Наукова новизна одержаних результатів

Вперше на сучасному методичному рівні отримано інформацію про розподіл різних алельних варіантів промотору гену *PSMA6* та генів, що кодують субодиниці імунопротеасоми (*LMP2* та *LMP7*) у дітей з первинною артеріальною гіпертензією в українській популяції. Показано, що розподіл алельних варіантів *PSMA6* та *LMP2* у нормо- та гіпертензивних осіб має суттєві відмінності. Вперше доведено, що в аорті і серці щурів переважає експресія мРНК субодиниць імунопротеасом, а при АГ експресія генів, що кодують конститутивні та регуляторні субодиниці протеасом у нормо- та гіпертензивних щурів суттєво розрізняються. Доведено, що біофлавоноїд кверцетин, який є інгібітором протеасом, забезпечує суттєве зниження артеріального тиску у щурів з генетично детермінованою гіпертензією, впливаючи як на експресію низки субодиниць протеасом, так і на протеолітичну активність останніх.

Практичне значення одержаних результатів

Проведені дослідження обґрунтували висновок про істотне значення генетичних факторів (однонуклеотидних замін) у генах, що кодують субодиниці

протеасом, в етіології АГ. Це дозволяє застосувати генотипування за цими сайтами з метою оцінки ризику виникнення вказаної патології. Експериментальні дослідження на щурах зі спонтанною гіпертензією дозволили встановити особливості експресії генів, що кодують різні субодиниці протеасом, та вперше вказати на більше значення імунопротеасом у порівнянні з конституційними протеасомами у тканинах аорти та серця. Застосування інгібітору протеасом кверцетину в експерименті на SHR дозволило показати його ефективність як антигіпертензивного засобу при експериментальній терапії і створило підґрунтя для розширення показань для застосування цього кардіо- та ангіопротектора у клініці при лікуванні АГ.

Особистий внесок здобувача

Аналіз літературних джерел, задач, дослідження та розробку дизайну експерименту проведено спільно з науковим керівником. Здобувач особисто провів необхідні експериментальні дослідження та виконав статистичну обробку результатів. Деякі експерименти були проведені разом зі співробітниками відділу загальної та молекулярної патофізіології Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, які є співавторами опублікованих робіт.

Діагностику АГ та відбір пацієнтів для генотипування було проведено співробітниками кафедри педіатрії №4 Національного медичного університету ім. О.О. Богомольця під керівництвом професора д.м.н. М. В. Хайтовича.

Апробація результатів дисертації

Результати роботи доповідалися на профільних наукових форумах: *Frontiers in CardioVascular Biology 2014* (Barcelona, Spain); *25th Anniversary of the FEPS, 168th Anniversary of French Physiological Society, June 29th - July 1st 2016* (Paris, France); *Frontiers in Cardio Vascular Biology 2016* (Barcelona, Spain); *ESC Congress 2017, 26-30 Aug 2017* (Barcelona, Spain); *51st Annual Scientific Meeting of the European Society for Clinical Investigation, May 17th-19th 2017* (Genoa, Italy); другий тур Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт із природничих, технічних і гуманітарних наук у 2009/2010 навчальному році в галузі клінічна медицина: внутрішні хвороби, хірургія, дитяча хірургія, педіатрія, інфекційні хвороби, ендокринологія, імунологія, клінічна імунологія та алергологія (Івано-Франківськ, 2010); VI Національний конгрес патолофізіологів України з міжнародною участю «Від експериментальних досліджень до клінічної патофізіології» 3-5 жовтня 2012 р. (Сімферополь-Місхор); *Third young physiologists and biophysicists conference: "Physiology: from molecules to the body"* Kyiv, 2013; VII Національний конгрес патолофізіологів України з міжнародною участю «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції», присвячений пам'яті академіка НАН України О.О. Мойбенка, 5-7 жовтня 2016 р., (Харків).

Публікації. Матеріали дисертації опубліковано у 17 наукових працях, у тому числі у 8 статтях у наукових журналах, а також у 9 тезах доповідей (у тому числі у 5 представлених на зарубіжних конференціях).

Структура та обсяг дисертації. Дисертація складається із вступу, основної частини (огляду літератури, опису матеріалів і методів досліджень, 4 розділів результатів досліджень, аналізу результатів та їх обговорення), висновків та списку

використаних джерел (91 найменувань). Робота викладена на 162 сторінках машинописного тексту та проілюстрована 43 рисунками.

ОСНОВНИЙ ЗМІСТ РОБОТИ

Розділ **Матеріали і методи досліджень** присвячений опису методів, використаних для вирішення поставлених у роботі завдань.

Характеристика клінічного матеріалу. У досліджувану групу увійшли 147 підлітків з діагнозом «есенціальна АГ», що проходили лікування у відділенні ревмокардіології Дитячої клінічної лікарні №6 м. Києва. Про первинний характер АГ свідчили дані клінічного дослідження, добового моніторингу артеріального тиску та дослідження функції нирок і залоз внутрішньої секреції відповідно до рекомендацій Американської робочої групи з контролю підвищеного тиску у дітей і підлітків (NHBPEP). Діагноз верифікували за результатами добового моніторингу артеріального тиску на 5-7-му добу стаціонарного обстеження з застосуванням моніторів тиску «ABPM-04\M» (Meditech, Угорщина) з використанням плечової манжетки. Оцінку результатів добового моніторингу артеріального тиску проводили за загальноприйнятими методами. Контрольну групу склали 208 школярів м. Києва відповідного віку з нормальним артеріальним тиском, визначеним за результатами разових вимірювань згідно з існуючими рекомендаціями (The Fourth Report on the Diagnosis, Evaluation, and Treatment of High Blood Pressure in Children and Adolescents, 2004).

Таблиця 1. Показники пацієнтів з артеріальною гіпертензією та практично здорових осіб (контроль), яких було включено до досліджених груп

Показники	Контроль (n=208)	АГ (n=147)
Стать, чоловіки/жінки	140/68	104/43
Вік, роки	13.7 ± 1.12	14.3 ± 1.62
Індекс маси тіла, кг/м ²	19.3 ± 3.44	23.0 ± 4.26
Систолічний тиск, мм рт. ст.	107.5 ± 6.86	128.8 ± 7.94*
Діастолічний тиск, мм рт. ст.	68.4 ± 6.13	74.8 ± 8.82

Вказані середні значення ± середні відхилення.

Досліджуваним матеріалом була периферична венозна кров або букальний епітелій підлітків. Венозну кров забирали у стерильних умовах у моновети та зберігали при температурі -20°C. Букальний епітелій зберігався замороженим. Усі особи або їх опікуни підписали згоду на використання біологічного матеріалу для генетичних досліджень. Комітет з біомедичної етики Інституту фізіології ім. О.О. Богомольця розглянув матеріали роботи і вказав, що робота відповідає принципам комітету та може виконуватися як дисертаційне дослідження (№2/19 від 28.02.2019).

ДНК виділяли з цільної крові або букального епітелію з використанням наборів DIAtom DNA Prep (Isogene, Росія).

Алельний поліморфізм гену *LMP2* – субдиниці імунопротеасом (*Arg*₆₀→*His*) визначався з використанням полімеразної ланцюгової реакції і наступного аналізу довжини рестрикційних фрагментів; *Arg*₆₀→*His* поліморфізм гену *LMP2* визначали за Вінаско [Vinasco et al., 1998] з деякими модифікаціями.



Доріжки: 2, 3, 5, 8, 12 відповідають Arg/Arg – генотипу, 1, 4, 6, 7, 10, 11 – Arg/His – генотипу, 9 – His/His – генотипу.

Рис. 1. Результати електрофорезу фрагменту гену *LMP2* після рестрикції з використанням ферменту *HinBI*.

Алельний поліморфізм гену *LMP7* ($Lys_{145} \rightarrow Gln$) також визначали шляхом ампліфікації фрагменту із наступною рестрикцією. Послідовність нуклеотидів у специфічних праймерах була такою: прямий (sense) – 5'-CGGACAGATCTCTGGGTGCT-3', зворотний (antisense) – 5'-СТТСССТАСТГССССААГСТ-3'. Для визначення SNP гену *LMP7* 6 мкл продукту ампліфікації інкубували при 37°C протягом 20 год із 5.0 ОД рестриктази *HindIII* (СибЕнзим, Росія) або з 2.0 ОД рестриктази *MvaI269I* в буфері R+.



Рис. 2. Результати електрофорезу фрагменту гену *LMP7* після рестрикції із застосуванням ферменту *MvaI269I*. Доріжки 1-6, 8, 9 відповідають *Lys/Lys*-генотипу, 7 – *Lys/Gln* - генотипу.

Алельний поліморфізм гену *PSMA6* ($C^8 \rightarrow G$) визначали за допомогою полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі із застосуванням TaqMan® SNP Assay C_11599359_10 та 7500 Fast Real-time PCR System (Applied Biosystems, США), після чого проводили аналіз для дискримінації алелей.

Характеристика експериментального матеріалу.

Експерименти проводили на самцях 6-місячних щурів ліній Wistar (маса 295 ± 22 г) та SHR (маса 294 ± 27 г), які були поділені на 3 групи: I (контрольну), у котру ввійшли щури лінії Wistar ($n=8$); II – щури лінії SHR ($n=8$); III – щури лінії SHR ($n=16$), що отримували таблетовану форму кверцетину («Квертин») протягом 8-ми тижнів у дозі 15 мг/кг щодня. Препарат подрібнювали та домішували до стандартного корму, пресуючи у гранули для згодовування щурам. Об'єктами дослідження були тканини серця та аорти щурів обох ліній. Гіпертензія у щурів лінії SHR була підтверджена вимірюванням артеріального тиску неінвазивним шляхом у хвостовій артерії. Для цього був використаний вимірювальний комплекс SPHYGMOMANOMETER S-2 (HSE, Німеччина). Наявність і частоту пульсу реєстрували за допомогою осцилоскопа HM303-4 (HAMEG GmbH, Німеччина). Виміри проводилися у 4-місячному віці; у дослід відбирали щурів із систолічним тиском понад 150 мм рт. ст.

Визначення параметрів кардіогемодинаміки проводилося за допомогою мікрокатетерів (SPR-838; Millar Instruments, Houston, США) чутливих до змін тиску й об'єму. Щурів наркотизували уретаном (1,5 г/кг), після чого через праву сонну артерію ретроградно вводили мікрокатетер у порожнину лівого шлуночка серця. Дані реєстрували й аналізували з використанням спеціалізованого програмного забезпечення (ADInstruments, Millar Instruments, Houston, США). Відносні величини об'єму конвертували в абсолютні згідно з рекомендаціями виробника.

Ліпідний склад крові визначали стандартними методами за допомогою біохімічного аналізатора BioSystemA25 (Bio-Systems SA, Іспанія).

Ліпідна інфільтрація тканин аорти була визначена у заморожених зрізах дуги аорти (товщина 10-12 мкм), забарвлених OilRed (Sigma-Aldrich, США) з використанням світлового мікроскопа Nikon (Японія).

Для **електронної мікроскопії** зразки тканин серця та аорти фіксували у 2%-му розчині параформальдегіда і 1%-му розчині тетроксиду осмію та вміщували в епоксидну смолу (Fluka, США). Ультратонкі зрізи контрастували ураніацетатом та цитратом свинцю і аналізували з використанням електронного мікроскопа JEOL 100CX (Японія).

Виділення РНК із тканин серця та аорти щурів проводили з використанням фенол-хлороформової екстракції. Отриману високомолекулярну нативну РНК високої чистоти (OD260/280nm 2.0) використовували для проведення зворотної транскрипції. Останню виконували з використанням First Strand cDNA Synthesis Kit (Fermentas, Литва), застосовуючи 1,2-1,5 мкг загальної РНК та випадковий гексамерний праймер. Отриману внаслідок зворотної транскрипції одноланцюгову ДНК використовували для кількісної оцінки експресії генів із використанням полімеразної ланцюгової реакції у реальному часі з застосуванням специфічних праймерів для відповідних генів. Експресію генів стандартизували відносно експресії гену β -актину, як ендogenous контролю

ПЛР-ампліфікацію генів проводили у 10 мкл суміші SYBR Green PCR Master Mix, що містила 40 пмоль кожного праймеру. Об'єм доводили до 20 мкл дейонізованою водою. Ампліфікацію здійснювали за допомогою термоциклера 7500 Fast Real-Time PCR System (США) (Табл. 2).

Відносний рівень експресії генів визначали з застосуванням загальноприйнятої методики (рівень експресії = $2^{-\Delta Ct}$, де Ct – пороговий цикл ампліфікації).

Експресію генів *PSMB5* та *PSMB9* нормували відносно гліцеральдегід-3-фосфат дегідрогенази (*GAPDH*) як ендogenous контролю. Для кількісної оцінки експресії генів використовували набори, що були розроблені на основі послідовності мРНК щура компанією Applied Biosystems (Табл. 3).

Таблиця 3. TaqMan набори для ПЛР-аналізу експресії генів

<i>PSMB5</i>	TaqMan Gene Expression Assay Rn01488742_m1
<i>PSMB9</i>	Custom TaqMan Gene Expression Assay
<i>GAPDH</i>	TaqMan Rodent GAPDH Control Reagent (VIC™Probe)

Для визначення **фібротичних змін у лівому шлуночку** аналізували заморожені поперечні зрізи (10 мкм із чотирьох ділянок міокарда цього шлуночка), які забарвлювали за методом Ван Гізона (барвник – суміш кислого фуксину і пікринової кислоти, при чому перший компонент забарвлює сполучну тканину в яскраво-червоний колір, а другий надає іншим структурам тканини жовтого забарвлення). Розростання сполучної тканини оцінювали за нормованою площею (%) поперечного зрізу лівого шлуночка. **Індекс маси серця** вираховували як відношення маси серця (мг) до маси тіла (г).

Морфометричний аналіз тканин аорти щурів різних експериментальних груп включав у себе оцінки тотальної ширини судини (включаючи інтиму та медію), відстані між двома еластичними мембранами (тобто ширини прошарку ГМК), товщини інтими, співвідношення інтима/медія, кількості прошарків ГМК, що вимірювали у 10 різних точках на кожному поперечному зрізі судин та у 5 точках по довжині судини.

Таблиця 2. Перелік праймерів для визначення рівнів експресії генів за допомогою системи SYBR Green PCR

Ген	Послідовність праймерів
<i>PSMB1</i> (NM053590)	forward: 5'-CTGТАCTCACGGCGTTTCTTC-3' reverse: 5'-ТАAGAGCTТАCTGGGTCAAAGC-3'
<i>PSMB2</i> (NM017284)	forward: 5`- GAGGGGCCAGCACTTTACTAC -3` reverse: 5`- AGTATCGGTCAAGGATGCTGAG -3`
<i>PSMB8</i> (NM080767)	forward: 5`- TGTGGTGGTGATACTAGGTTGC -3` reverse: 5`- АТААAGTCCCGGTCCCTAGAAAG -3`
<i>PSMB10</i> (NM001025637)	forward: 5`- AGCTTTGAGCTCACCCATAGAG -3` reverse: 5`- AGAGCTCTCACTTCCTGGGTCT -3`
<i>PSMC1</i> (NM057123)	forward: 5`- CCTGGTCACAGTGATGAAGGT -3` reverse: 5`- AAGAGGGAGCTCCACAGATTC -3`
<i>PSME1</i> (NM017264)	forward: 5`- СТТААAGGAGCCAGCTCTCAAC -3` reverse: 5`- CTCCTTCTCTTTCTCCTTGACG -3`
<i>beta-actin</i> (V01217)	forward: 5`-AAGTCCCTCACCCCTCCCAAAG-3` reverse: 5`-AAGCAATGCTGTCACCTTCCC-3`

Вимірювання трьох **протеасомних активностей** проводили за загальною схемою з використанням супернатанту гомогенізату тканин серця та аорти. Визначення хімотрипсиноподібної, трипсиноподібної та пептидилглютамін пептидгидролазної активностей протеасом проводили у Трис HCl буфері (0.025 M, pH 7.5), що містив при кінцевій концентрації 6.0 мкМ одного із субстратів протеасоми – сукциніл-лейцин-лейцин-валін-тирозин-7-амідо-4-метилкумарину (LLVT-AMC), бок-лейцин-серин-треонін-аргінін-7-амідо-4-метилкумарину (LSTA-AMC) або N-Cbz-лейцин-лейцин-глутамін-амідо-4-метилкумарину (LLG-AMC). Проби інкубували з зазначеними субстратами при температурі 37°C протягом 30 хв (при визначенні трипсиноподібної активності) та 60 хв (для двох інших видів). Активність протеасомного протеолізу у тканинах визначали за інтенсивністю гідролізу вказаних специфічних флуорогенних субстратів. Флуоресценцію продуктів гідролізу вимірювали за допомогою спектрофлуориметру Hitachi-4000 (Японія); довжина хвилі збудження Ex становила 360 нм, а емісії Em – 440 нм. Як стандарт використовували вільний 7-аміно-4-метилкумарин. Для підтвердження специфічності протеасомного гідролізу застосовували специфічний інгібітор протеасоми класто-лактацистин бета-лактон у концентрації 5.0 мкМ. Нормовану інтенсивність пригнічення активності гідролізу (%) відповідних субстратів під дією

інгібітора трактували як активність протеасом і виражали у нМ 7-аміно-4-метилкумарину на грам білку за 1 хв. Кінцевий вміст білку у гомогенатах тканин визначали за допомогою спектрофотометра NanoDrop 1000 (Thermo Fisher Scientific, США).

У перебігу **статистичної обробки** у разі нормального розподілу даних та гомоскедантичності вибірок використовували однофакторний дисперсійний аналіз з апостеріорними попарними *t*-тестами та поправкою Геймса-Хоуела. У інших випадках використовувався аналіз Краскела-Уоллеса з апостеріорними попарними тестами Манна-Уїтні та поправкою Бонфероні. Було проведено регресійно-кореляційний аналіз. Результати міжгрупових порівнянь вважали статистично достовірними за умови $P < 0.05$. Було використане програмне забезпечення MS Excel 2010, SPSS Statistics 18.0, Plotus 0.2.

РЕЗУЛЬТАТИ ДОСЛІДЖЕННЯ ТА ЇХ ОБГОВОРЕННЯ

Частота алельного поліморфізму генів, що кодують різні субодиниці протеасоми, у дітей з первинною артеріальною гіпертензією.

Отримані дані вказують на те, що розподіли алельних варіантів генів, котрі кодують субодиницю імунопротеасоми (*LMP2*) та протеасоми (*PSMA6*) суттєво розрізнялися у контрольній групі та у дітей з артеріальною гіпертензією; цього не спостерігалось щодо поліморфізму гену *LMP7* (Рис. 3).

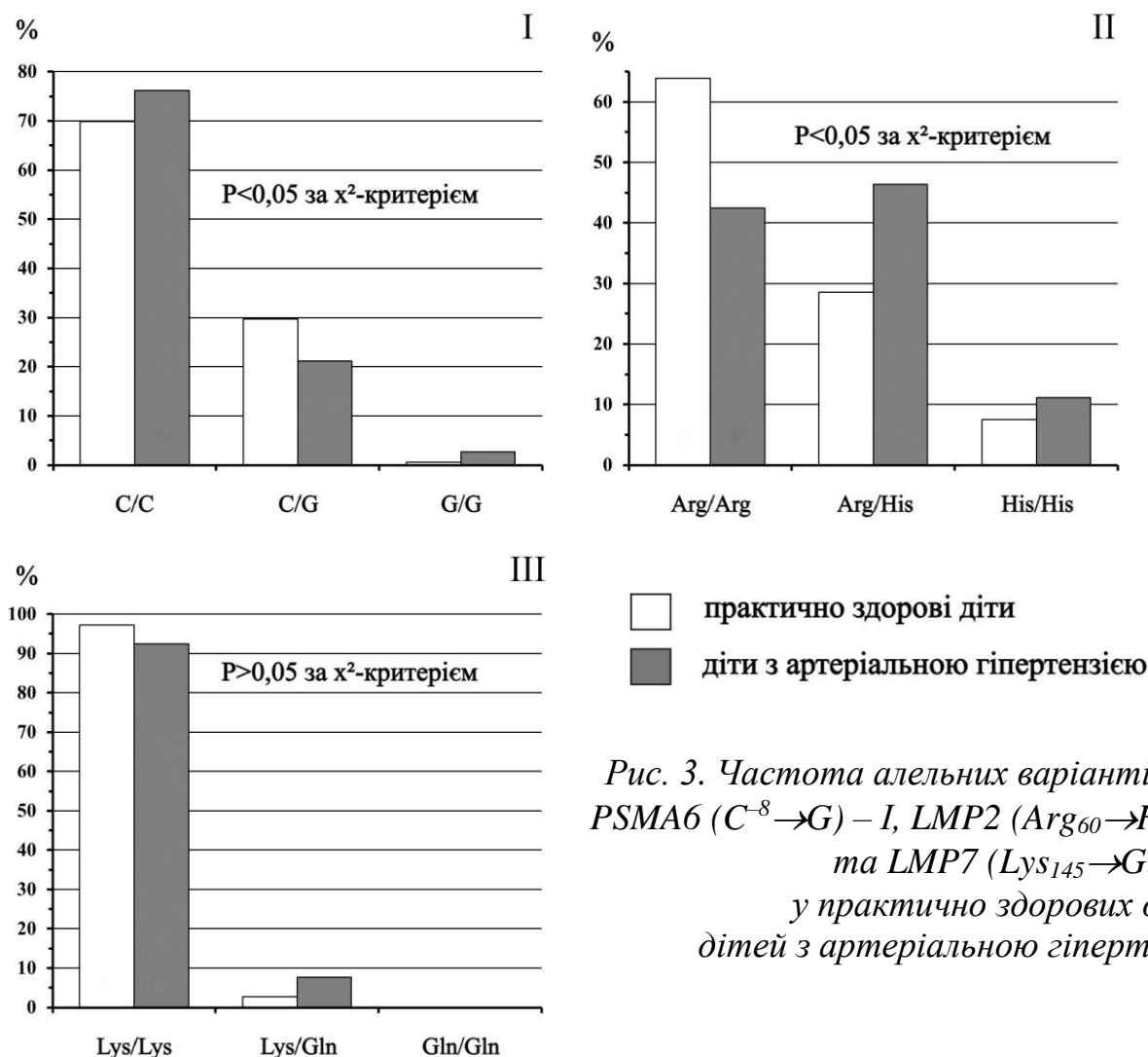


Рис. 3. Частота алельних варіантів гену *PSMA6* ($C^8 \rightarrow G$) – I, *LMP2* ($Arg_{60} \rightarrow His$) – II та *LMP7* ($Lys_{145} \rightarrow Gln$) – III у практично здорових дітей і дітей з артеріальною гіпертензією.

Алельні варіанти гену *PSMA6* розподілилися наступним чином: C/C – 69,8%, C/G – 29,7%, G/G – 0,5% (в контрольній групі) та 76,2%, 21,1%, 2,7% ($P=0.047$) у дітей з АГ відповідно. Частота алельних варіантів гену *LMP2* була наступною у контрольній групі: Arg/Arg – 63,9 %, Arg/His – 28,6%, His/His – 7,5%, а у пацієнтів з АГ вона була істотно іншою: Arg/Arg – 42,5 %, Arg/His – 46,4%, His/His – 11,1% ($P=0.001$). Розподіл алельних варіантів гену *LMP7* у практично здорових обстежених та пацієнтів з АГ суттєво не розрізнявся (Lys/Lys – 97,3 %, Lys/Gln – 2,7%, Gln/Gln – 0% та 92,4%, 7,6%, 0% відповідно, $P=0.16$).

Основні фізіологічні параметри функціонування серцево-судинної системи у нормі та при спонтанній гіпертензії у щурів та їх зміни при експериментальній терапії.

Вимірювання показників кардіодинаміки дали змогу встановити суттєві відмінності між показниками SHR у порівнянні з тваринами лінії Wistar (Табл. 4). Серед показників насосної функції серця у SHR були вірогідно нижчими наступні значення: ударний об'єм (у три рази, $P<0.0001$), фракція викиду (більш ніж у два рази, $P<0.0001$), ударна робота (на 70%, $P<0.0001$), а також частота серцевих скорочень (на 12%, $P=0.006$).

Показники діастолічної функції серця були вищими у щурів лінії SHR: кінцево-діастолічний тиск (у 6,5 разів, $P<0.005$) та dp/dt min (на 30%, $P<0.0001$).

У той же час значною мірою мінімальний тиск та кінцево-систолічний тиск були нижчими у щурів лінії SHR (у 1,5 рази, $P<0.01$ та на 15%, $P<0.004$ відповідно). Це можна пояснити змінами артеріальної жорсткості, яка була у щурів лінії SHR вищою у 4,4 рази ($P<0.0001$).

Вміст ліпопротеїдів у крові спонтанно гіпертензивних щурів до і після експериментальної терапії.

Середні рівні тотального холестерину у щурів Wistar та SHR майже не розрізнялися (1,45 та 1,41 ммоль/л відповідно). Після експериментального лікування кверцетином рівень холестерину був у середньому на 4,7% меншим, ніж у SHR на стандартній дієті.

Щодо рівнів тригліцеридів у групах щурів SHR та Wistar спостерігалася істотна різниця – у останніх цей рівень був меншим на 34,5%. Застосування кверцетину компенсувало збільшений рівень тригліцеридів у тварин; цей показник був меншим у середньому на 11% у порівнянні з таким у SHR без лікування.

Вміст ліпопротеїдів високої щільності у групі SHR був на 12% меншим, ніж у щурів Wistar. Використання кверцетину усувало це зменшення рівня ліпопротеїдів високої щільності, даний показник був вищим на 13,3%.

Рівень ліпопротеїдів низької щільності у SHR був нижчим у 3,3 рази, ніж у контрольних тварин лінії Wistar. Уведення кверцетину зменшувало цей рівень у 7 разів у порівнянні з відповідним показником у спонтанно гіпертензивних щурів без корекції.

Індекс атерогенності у SHR був більшим у середньому на 16,5%, ніж у щурів Wistar; у SHR, що отримували кверцетин, цей індекс був нижчим на 23,6%, ніж у SHR-тварин без лікування, тобто його збільшення у порівнянні з контролем ефективно попереджувалося.

Таблиця 4. Показники кардіогемодинаміки щурів ліній Wistar, SHR та SHR, що отримували кверцетин

Кардіогемодинамічні параметри	Wistar (n=8)	SHR (n=16)	SHR Кверцетин (n=8)
Кінцево-діастолічний об'єм, мкл	650,55±15,8	526,53±32,9	517,58±11,48
Кінцево-систоличний об'єм, мкл	484,75±19,1	514,99±41,7	472,86±13,5
Ударний об'єм, мкл	239,00±13,5	79,23±7,8*	129,13±9,0#
Серцевий викид, мкл/хв	82776,59±5625,4	23756,19±2385,4*	39085,18±2477,0#
Артеріальна жорсткість, мм рт.ст./мкл	0,44±0,02	1,93±0,20*	0,86±0,07#
Фракція викиду, %	62,65±1,3	29,26±1,1*	39,25±1,1#
Кінцево-діастолічний тиск, мм рт.ст.	1,93±1,8	12,31±2,4*	0,84±0,5#
Кінцево-систоличний тиск, мм рт.ст.	94,48±1,9	108,33±2,9*	91,03±2,0#
Максимальний тиск, мм рт.ст.	102,76±3,3	109,99±3,99	92,41±3,2#
Мінімальний тиск, мм рт.ст.	-1,54±1,0	8,65±2,6*	4,58±0,7#
Ударна робота, мм рт.ст.*мкл	11613,89±1246,6	3408,57±1172,4*	4713,20±1393,2
dP/dt max, мм рт.ст./с	8821,78±432,45	6881,07±468,75*	6258,40±467,4
dP/dt min, мм рт.ст./с	-8526,17±455,45	-5962,18±529,77*	-5501,78±1369,67
dV/dt max, мкл/с	13338,31±2212,45	9972,29±1828,62*	9242,55±1565,0
dV/dt min, мкл/с	-16076,50±2132,34	-7716,43±1458,93*	-10399,90±1682,42
Максимальна потужність, мВт	103,30±9,42	61,74±9,48*	68,08±8,64
ЧСС, хв ⁻¹	342,94±9,5	302,28±5,4*	305,42±5,0

* – $P < 0.05$ при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # – $P < 0.05$ при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR+кверцетин.

Таким чином, у порівнянні з контролем у SHR були вищими наступні показники ліпідного профілю: рівень тригліцеридів (на 34,5%), рівень ліпопротеїдів низької щільності (на 14,4%), вміст ліпопротеїдів дуже низької щільності (на 35%) та індекс атерогенності (на 16,5%). Рівень ліпопротеїдів високої щільності був нижчим на 13,3%. Рівень тотального холестерину у визначених групах був майже однаковим (Табл. 5).

Застосування кверцетину у щурів SHR попереджало підвищення рівнів тригліцеридів та ліпопротеїдів дуже низької щільності; у той час вміст ліпопротеїдів високої щільності був більшим і близьким до такого у тварин лінії Wistar. Єдиний показник, що істотно знижувався при застосуванні кверцетину – це рівень ліпопротеїдів низької щільності (нижче у 7 разів).

Таблиця 5. Рівні ліпопротеїдів у сироватці крові щурів Wistar, SHR та SHR, що отримували кверцетин (ммоль/л)

	Тотальний холестерин	Тригліцериди	Ліпопротеїди високої щільності	Ліпопротеїди низької щільності	Ліпопротеїди дуже низької щільності	Індекс атерогенності
Wistar	1.46±0.36	1.27±0.44	0.65±0.13	0.23±0.10	0.59±0.21	1.27±0.15
SHR	1.42±0.26	1.71±0.47	0.57±0.09	0.07±0.06	0.79±0.21	1.48±0.11
SHR Кверцетин	1.35±0.34	1.52±0.41	0.64±0.14	0.01±0.15	0.70±0.19	1.13±0.19

Ультраструктурні зміни у тканинах аорти при спонтанній гіпертензії у щурів та при її експериментальній терапії. Експресія генів субодниць протеасоми та активність останньої у тканинах аорти.

Подвійне забарвлення поперечних зрізів аорти експериментальних тварин специфічним щодо ліпідів фарбником Oil Red та гематоксилином показало повну відсутність ознак ліпідної інфільтрації у щурів лінії Wistar. У той же час у спонтанно гіпертензивних щурів на окремих ділянках стінки судин спостерігалось незначне позитивне забарвлення Oil Red; площа такого забарвлення складала 0,48% загальної площі проаналізованих зрізів аорт.

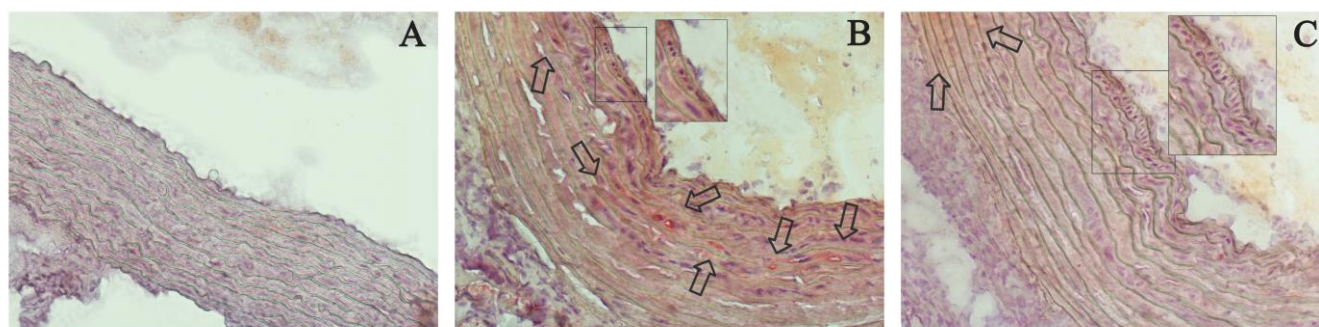


Рис. 4. Зрізи аорти щурів Wistar (A), SHR (B) та SHR лікованих кверцетин (C) після подвійного забарвлення гематоксилином та Oil Red. Стрілками вказані Oil Red-позитивні ділянки у стінці аорти. У виділених прямокутниках видно переорієнтацію ГМК (збільшення: x20).

Рівень ліпідної інфільтрації у групі спонтанно гіпертензивних тварин, що отримували таблетовану форму кверцетину («Квертин») протягом 8-ми тижнів, знижувався до 0,23%. Отже, застосування згаданого біофлавоноїду помітно впливало на процеси пов'язані з ліпідним метаболізмом у стінці судин спонтанно гіпертензивних щурів і попереджувало можливий розвиток ліпідозу (Рис. 4).

Морфометричний аналіз зрізів аорт показав наявність значних кількісних відмінностей по певним параметрам між щурами Wistar та SHR. Зокрема, стійка гіпертензія у щурів лінії SHR зумовила присутність виражених порушень у архітектоніці судин. Спостерігалось потовщення комплексу інтима-медія у порівнянні з контрольною групою (за рахунок збільшення кількості ГМК та потовщення їх прошарків на 13,3% і 18,5% відповідно); як результат, показники ширини медії були вищими на 34,3% (Рис. 5).

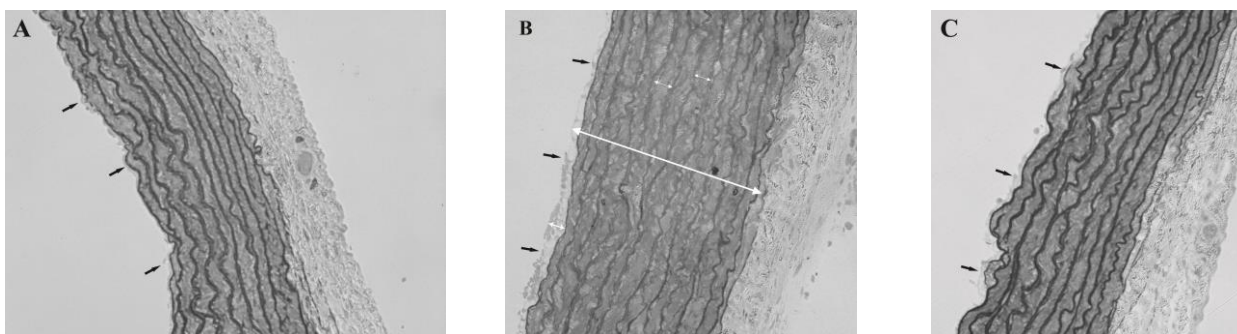


Рис. 5. Поперечні зрізи аорт щурів Wistar (A), SHR (B) та SHR лікованих кверцетином (C). Стрілка на B вказує ділянку вимірювання загальної ширини стінки аорти (інтіма-медія). Ділянки вимірювання ширини прошарку ГМК показані двосторонніми білими стрілками на B. Маленькі чорні стрілки вказують на прошарки ендотелію (збільшення: $\times 20$).

Товщина інтими аорт щурів SHR була більшою у 1,9 рази у порівнянні з такою у щурів лінії Wistar. Показники товщини комплексу інтіма-медія у спонтанно гіпертензивних тварин були більшими у середньому на 36,4% у порівнянні з контролем. Застосування кверцетину протягом 8-ми тижнів знизило показники товщини інтими і товщини комплексу інтіма-медія у спонтанно гіпертензивних щурів на 6,6% і 10,7% відповідно. Не зважаючи на незначне зростання кількості прошарків ГМК (на 8,8%), 8-тижневе додавання кверцетину до добового раціону спонтанно гіпертензивних щурів зумовлювало зниження товщини медії (на 12,3%) за рахунок потоншення кожного з наявних прошарків ГМК (на 3%).

Показник співвідношення інтіма/медія у групі SHR був більшим у 1,4 рази у порівнянні з таким у групі тварин лінії Wistar. У зв'язку з тим, що зміни у розмірах інтими та медії аорти щурів, що отримували кверцетин, відбувалися нерівномірно (біофлавоноїд у більшій мірі вплинув на розміри медії), показник співвідношення інтіма/медія в групах SHR та SHR+кверцетин майже не розрізнявся.

Електронно-мікроскопічне дослідження стінки аорти у щурів показало наявність суттєвих ультраструктурних змін та структурну неоднорідність у всіх прошарках судин в групі SHR у порівнянні із тваринами групи Wistar. Просвіт аорти у групі контрольних тварин був вистелений круглими або полігональними ендотеліоцитами, які прилягали до еластичної мембрани і були зв'язані щільними міжклітинними контактами. Ендотеліоцити містили інтактні органели, цитоплазматичні гранули та піноцитозні везикули. Еластична мембрана виглядала цілісною і однорідною. В аортах групи спонтанно гіпертензивних тварин спостерігалися вогнищеві потовщення інтими за рахунок вираженого набряку ендотелію і субендотеліального шару. Для цих щурів були характерними дезорганізація ендотеліальної вистилки та розшарування внутрішньої еластичної мембрани. На окремих ділянках судини ендотеліоцити утворювали чисельні вирости та інвагінації плазмолемі; ці клітини часто мали веретеноподібну форму та були переорієнтовані по відношенню до осі аорти з вип'ячуванням у просвіт судини. Спостерігалось вогнищеві відшарування ендотелію, аж до повної десквамації ендотеліоцитів. Ендотеліальні клітини містили велику кількість вакуолей різного походження (у тому числі і автофагічних), мітохондрії (у більшості з набряком та

частковим або повним руйнуванням крист) та мультимембранні структури, наявність яких свідчить про деградацію внутрішньоклітинних мембран. Гранулярний ендоплазматичний ретикулум у більшості ендотеліоцитів мав розширені цистерни, що є характерною ознакою розвитку стресу ендоплазматичного ретикулуму, і вказує на втрату клітиною здатності до активного синтезу білків.

У гіпертензивних щурів значна кількість міжэндотеліальних контактів втрачали щільність. Зазначені зміни, очевидно, вказують на часткову втрату бар'єрної функції ендотелію, що підтверджувалося наявністю окремих формених елементів крові в субэндотеліальному шарі. У зразках, що вивчалися, спостерігалася вогнищева просторова переорієнтація гладеньком'язових клітин щодо ендотеліального шару. Характерними були підвищена осміофілія ГМК, зменшення розмірів останніх, виражена вакуолізація цитоплазми, розширення цистерн ендоплазматичного ретикулуму, набряк та руйнування мітохондрій. Клітини утворювали чисельні вирости, які можна було бачити у субэндотеліальному шарі, що, вірогідно, було результатом руйнування внутрішньої еластичної мембрани.

Застосування кверцетину у групі SHR зменшувало кількість локусів, у яких спостерігалися вищевказані порушення, і здебільшого запобігало розвитку вказаних змін аорти. Особливо слід зазначити, що кверцетин сприяв збереженню структури ендотеліоцитів та цілісності еластичної мембрани, так само як і зменшенню площі люмінальної поверхні судин з десквамованим ендотелієм. Цей агент частково попереджував появу структурних порушень та переорієнтації ГМК (рис. 6).

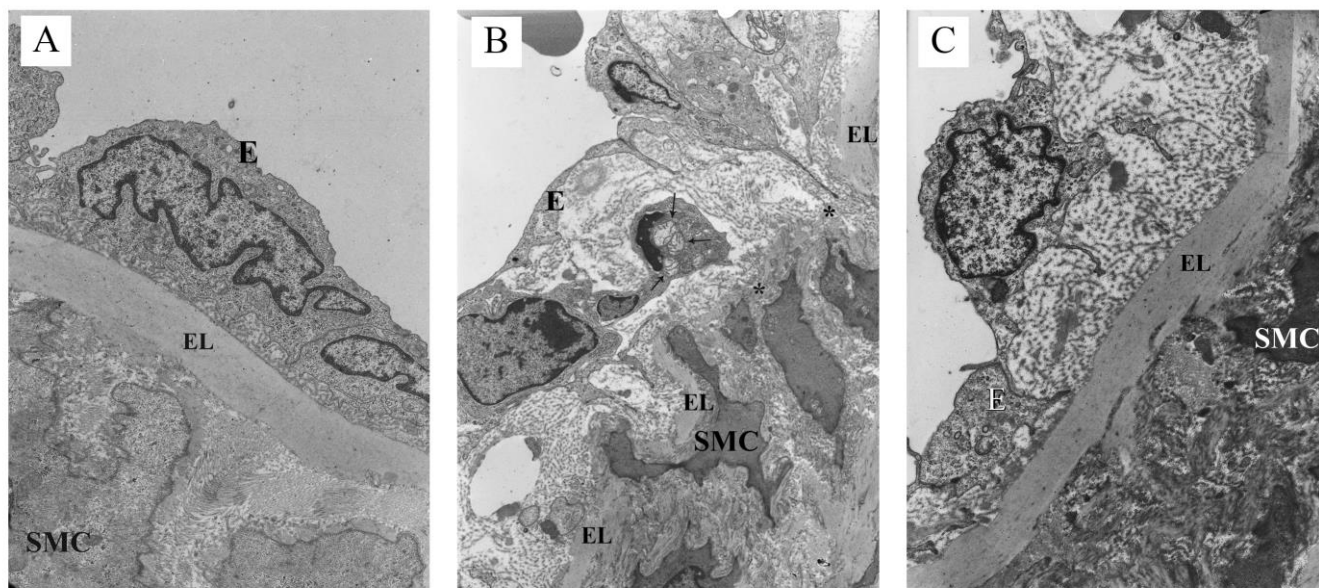


Рис. 6. Ультратонкі зрізи стінки аорти щурів. (А) Аорта щура лінії Wistar. Зображення ілюструє типову еластичну ламелум (EL) та ендотеліальний шар (E). У аорті спонтанно гіпертензивного щура (В) цитоплазма ГМК (SMC) підвищено осміофільна, клітини утворюють вирости, орієнтовані перпендикулярно щодо осі судини. Внутрішня еластична мембрана вогнищево фрагментована; ендотелій частково відшарований від базальної мембрани. У субэндотеліальному шарі, який містить фрагмент форменого елемента крові (стрілки), спостерігаються набряк та вакуолізація. Застосування до SHR кверцетину (С) запобігло розвитку

дегенеративних процесів у стінці аорти щурів, попереджуючи виникнення вищезазначених ознак (збільшення: $\times 5000$).

При визначенні трипсиноподібної, хімотрипсиноподібної та каспазоподібної активностей у тканинах аорти у щурів ліній Wistar та SHR статистично вірогідної різниці не спостерігалось, хоча трипсиноподібна активність була нижчою ніж у контролі, в середньому на 18%, а хімотрипсиноподібна – на 8%. При застосуванні кверцетину трипсиноподібна і хімотрипсиноподібна активності у тканинах аорти були нижчими у 2,7 разів ($P < 0.005$) та у 2 рази ($P < 0.003$) відповідно. Каспазоподібна активність майже не змінювалася (Рис. 7).

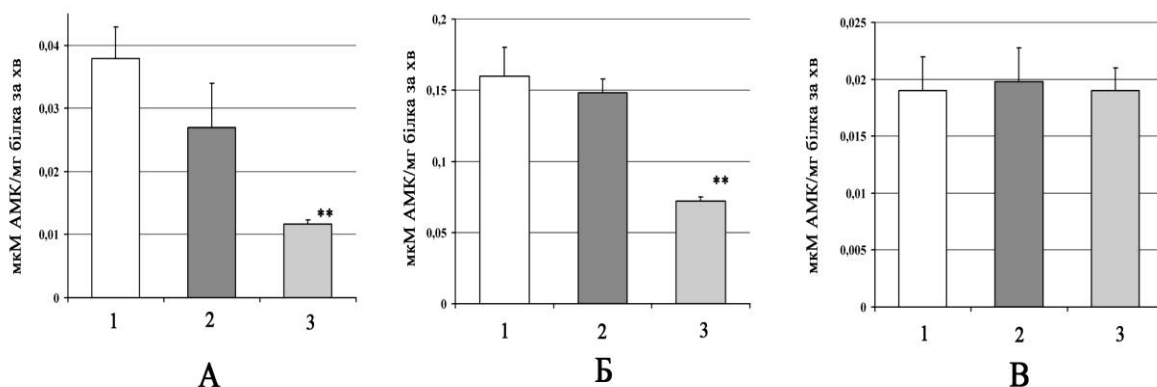


Рис. 7. Активність протеасоми у тканинах аорти. А) Трипсиноподібна активність; Б) Хімотрипсиноподібна активність; В) Пептидилглютамін пептидгідролазна активність. 1 – у щурів лінії Wistar, 2 – SHR та 3 – SHR+кверцетин. ** – $P < 0.05$ при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR+кверцетин.

Експресія генів, що кодують каталітичні конституційні (*PSMB1*, *PSMB2*, *PSMB5*) та індукційні (*PSMB8* (*LMP7*), *PSMB9* (*LMP2*), *PSMB10*) субодиниці протеасоми у тканинах аорти.

Рівень матричної РНК гену *PSMB1* був статистично вірогідно нижчим у 10,6 разів порівняно з відповідним рівнем у щурів лінії Wistar ($P = 0.0014$). У той же час рівень мРНК гену *PSMB5* у щурів SHR був нижчим на 5,6%, тоді як рівень мРНК гену *PSMB2* у цих тварин був вищим на 25%.

Корекція кверцетином у щурів лінії SHR знижувала рівень мРНК *PSMB5* всього на 28%. Рівень мРНК гену *PSMB2* у спонтанно гіпертензивних щурів, що отримували кверцетин, був у 28 разів ($P = 0.003$) нижчим порівняно з тим, що спостерігалось у тварин на стандартному кормі. У той же час рівень мРНК гену *PSMB1* у щурів лінії SHR, що отримували кверцетин, був вищим у 7,8 разів.

Порівняння рівнів експресії мРНК генів, що кодують індукційні субодиниці протеасоми у щурів лінії Wistar і SHR, проілюстрували статистично недостовірно вищі рівні експресії таких генів, як *PSMB8* (47%) та *PSMB9* (39%) у спонтанно гіпертензивних щурів. У той же час статистично достовірно нижчим був рівень експресії мРНК гену *PSMB10* (44%, $P = 0.003$). При впливі кверцетину рівні експресії всіх індукційних генів знижувалися різним чином. Експресія *PSMB8* та *PSMB9* була статистично вірогідно меншою (у 5,5 разів, $P = 0.004$ та у 112 разів, $P = 0.005$ відповідно). У той час рівень мРНК гену *PSMB10* у щурів лінії SHR, що отримували кверцетин, був нижчим на 5% (Рис. 8).

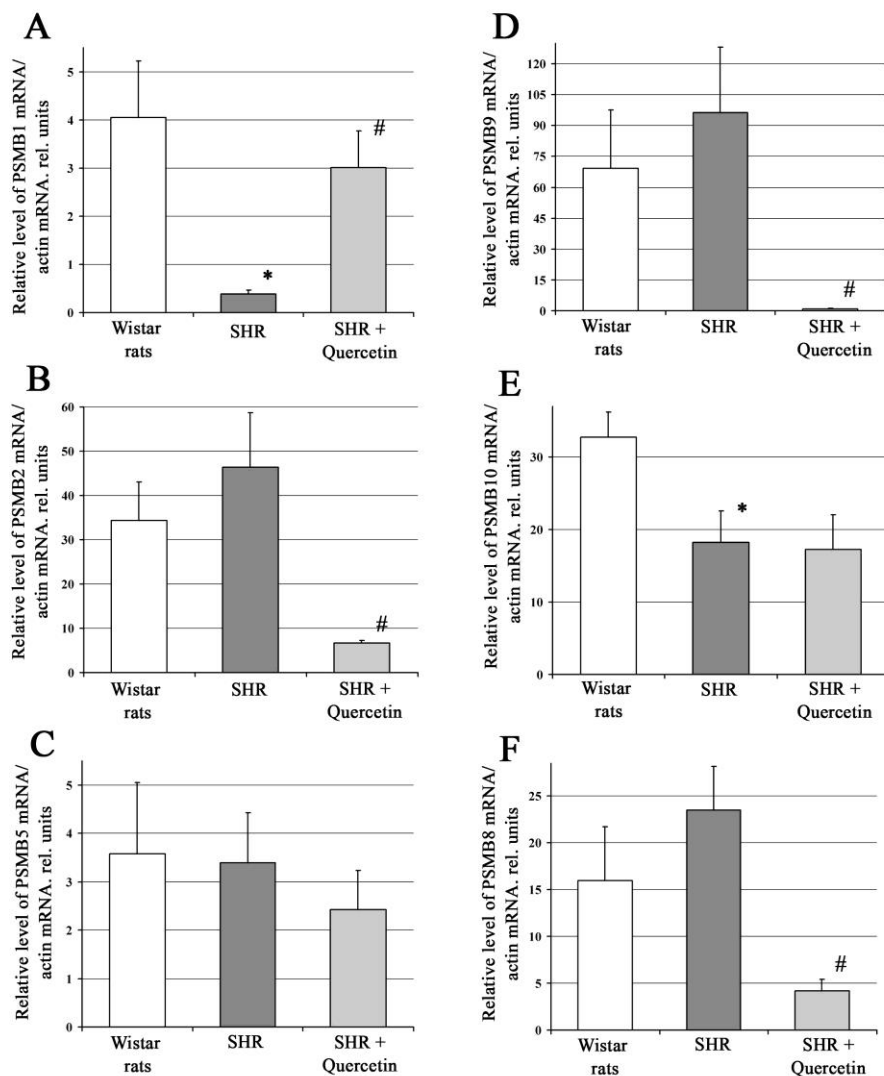


Рис. 8. Рівні експресії генів, що кодують конституційні субодиниці протеасом, у тканинах аорти щурів групи Wistar, SHR та SHR+кверцетин. А) Рівень експресії гену PSMB1; В) – гену PSMB2; С) – гену PSMB5. Рівні експресії генів, що кодують індукбельні субодиниці протеасом: D) Рівень експресії гену PSMB9; E) – гену PSMB10; F) – гену PSMB8. * – $P < 0.05$ при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # – $P < 0.05$ при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR+кверцетин.

Експресія генів, що кодують регуляторні субодиниці (*PSME1* та *PSMC1*) протеасоми, у тканинах аорти.

Порівняння рівнів експресії генів, що кодують регуляторні субодиниці протеасоми, у щурів Wistar і SHR показало відсутність вірогідно статистичної різниці. У спонтанно гіпертензивних щурів рівень експресії гену *PSMC1* був у 3,4 рази нижчим, а експресія *PSME1* була, навпаки, вищою на 34% порівняно з такою у контролі. Застосування кверцетину у щурів лінії SHR зумовило зменшення рівнів експресії мРНК генів *PSMC1* та *PSME1* на 28% та у 7,8 разів ($P=0.00004$) відповідно; при цьому зниження рівня експресії гену *PSME1* було статистично вірогідним, порівняно з таким у спонтанно гіпертензивних щурів, що знаходились на стандартній дієті (Рис. 9).

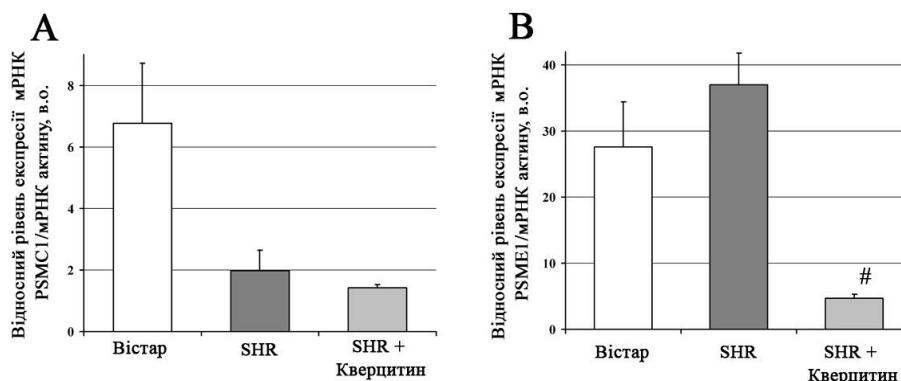


Рис. 9. Експресія генів, що кодують регуляторні субодиниці протеасоми, в тканинах аорти. А) Експресія гену *PSMC1*; В) – гену *PSME1*. # – $P < 0.05$ при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR+кверцетин.

Вплив артеріальної гіпертензії на морфометричні, патогістологічні та ультраструктурні показники тканини серцевого м'яза.

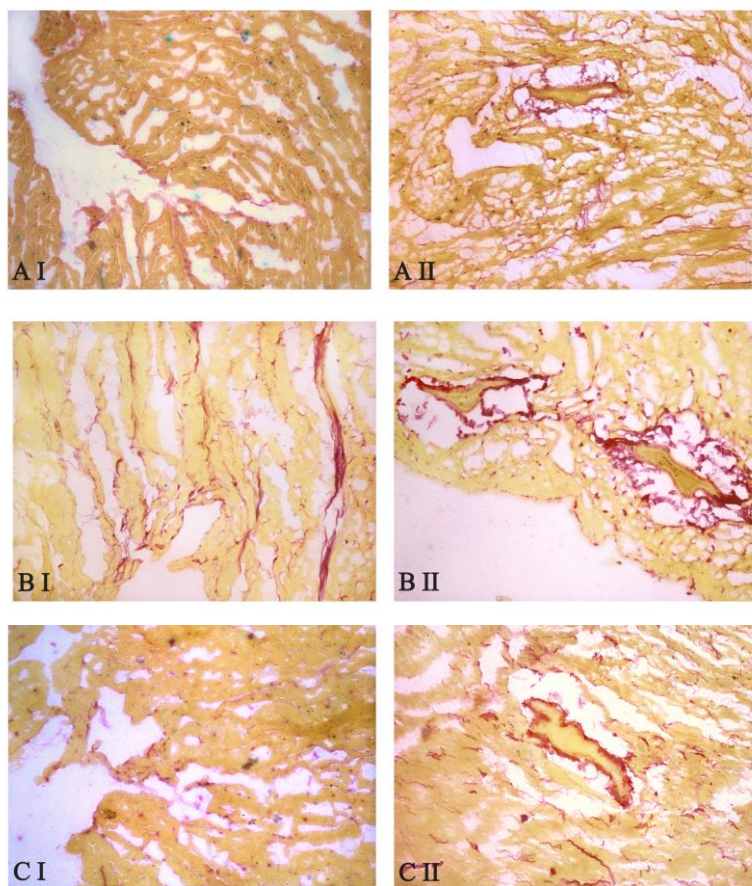
Для оцінювання рівнів розвитку гіпертрофічних процесів у серцевому м'язі щурів зі стійкою спонтанною гіпертензією проводили розрахунок індекса маси серця. Цей індекс був статистично достовірно вищим у щурів групи SHR ($3,7 \pm 0,14$ мг/г) у порівнянні з таким у щурів лінії Wistar ($2,9 \pm 0,17$ мг/г, $P = 0.003$). При додаванні кверцетину до добового раціону протягом 8 тижнів згаданий індекс у

спонтанно гіпертензивних щурів знижувався у середньому на 8% ($3,4 \pm 0,06$ мг/г).

Рис. 10. Гістологічні характеристики міокарду експериментальних тварин. Забарвлення сполучної тканини за Ван-Гізоном. А) Щур Wistar, В) – SHR та С) – SHR+кверцетин. У лівій колонці (I) показана область ендокарду, у правій (II) фібротичні зміни у периваскулярній зоні. Червоним кольором забарвлена сполучна тканина, жовтим – цитоплазма кардіоміоцитів (збільшення: $\times 10$).

Вивчення гістологічних проявів процесів фіброзу у серці експериментальних тварин показало підвищений вміст сполучної тканини (у 6 разів) у міокарді щурів лінії SHR у

порівнянні з таким у тварин лінії Wistar ($4,7 \pm 0,45$ % та $0,79 \pm 0,05$ % від загальної площі зрізів лівого шлуночка відповідно). Прояви фіброзу були найбільш виразними в області ендокарду та у периваскулярних зонах. Під впливом уведення



таблетованої форми кверцетину у щурів групи SHR частка фібротичних змін у лівому шлуночку серця знижувалася майже у 3 рази ($1,6 \pm 0.03\%$, $P < 0.05$) (Рис. 10).

На ультраструктурному рівні у міокарді спонтанно гіпертензивних щурів, на відміну від міокарду лівого шлуночка серця щурів групи Wistar, виявлені зміни свідчили про підвищену інтенсивність метаболічних процесів. Виражене збільшення кількості мультивезикулярних тілець як у субсарколемальному локусі, так і в інших локусах кардіоміоцитів могло свідчити про активацію процесів деградації, пов'язаних насамперед з активацією лізосомальної системи та, можливо, і з аутофагією. За літературними даними ендосоми (а мультивезикулярні тільця розглядаються як зрілі ендосоми) можуть бути необхідним компонентом, відповідальним за формування аутофагосом, що певною мірою підтверджується збільшенням кількості аутофагічних вакуолей порівняно з контролем (Рис. 11, 12).

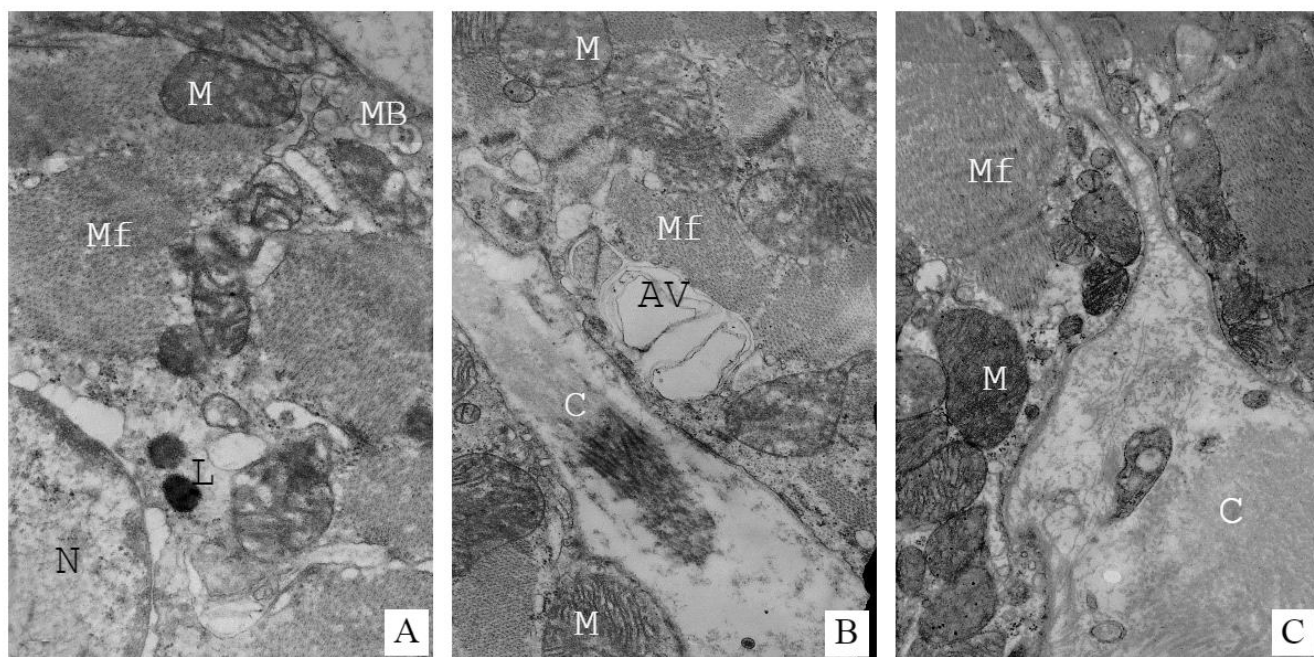


Рис. 11. Ультраструктура міокарду лівого шлуночка серця щурів групи SHR. Розширення цистерн ендоплазматичного ретикулума та T-системи, набряк мітохондрій, наявність мультивезикулярних тілець та аутофагічних вакуолей, виражене розширення міжклітинного простору, що заповнений колагеном. А) $\times 100000$; В) $\times 7200$; С) $\times 7200$. Mf – міофіламенти, M – мітохондрії, AV – аутофагічні вакуолі, MB – мультивезикулярні тільця, C – колаген, L – лізосоми, N – ядро.

Включення кверцетину у добовий раціон щурів значною мірою попереджувало виникнення вищезазначених змін. У кардіоміocyтах мітохондрії в основному зберігали свою структуру, значно зменшувалися прояви набряку внутрішніх мітохондріальних мембран. Зберігався високий рівень аутофагії, зокрема спостерігалась мітоаутофагія, орієнтована на видалення мітохондрій із зниженим мембранним потенціалом та, відповідно, з можливою загрозою відкриття мітохондріальних пор з вивільненням накопиченого кальцію і проапоптотичних факторів у цитоплазму клітини. (Рис. 13В). Це у значній мірі могло вплинути на виживання клітин серця в умовах підвищеного кров'яного тиску. А також це запобігало заміщенню втрачених кардіоміоцитів сполучною тканиною, що

підтверджувалось результатами електронно-мікроскопічного та гістологічного дослідження з кількісною оцінкою інтенсивності фіброзу в серці щурів (Рис. 13).

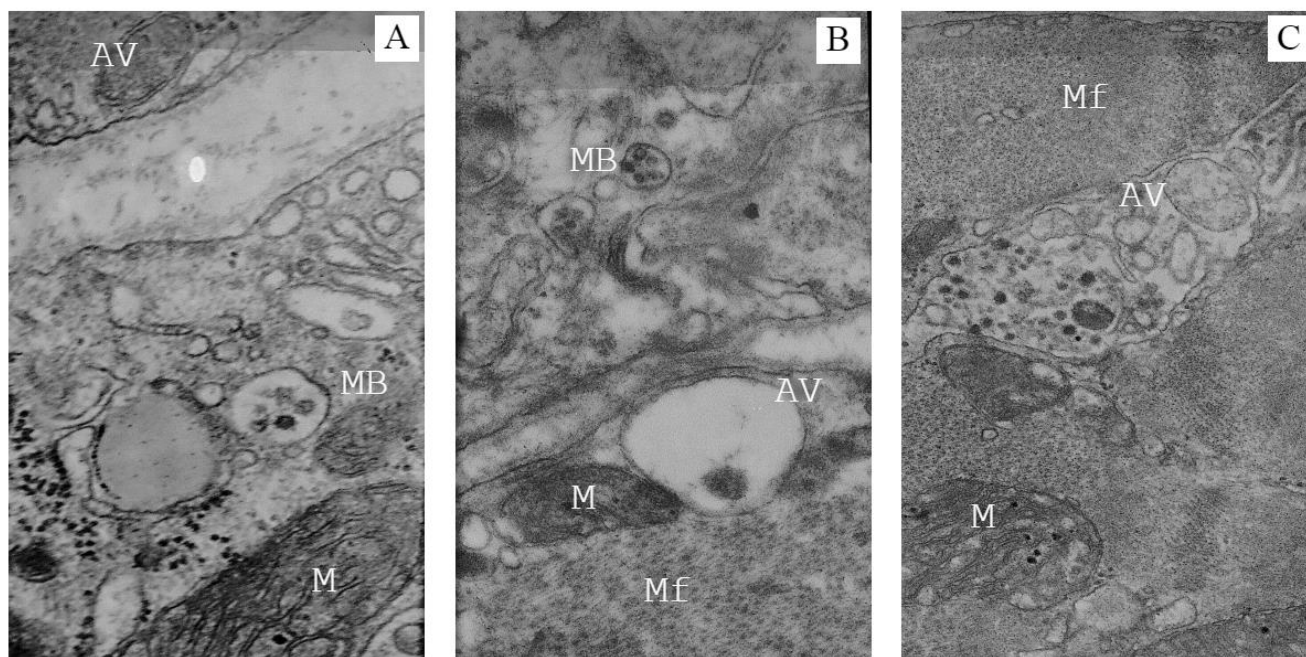


Рис. 12. Ультраструктура міокарду лівого шлуночка серця щурів групи SHR. Розширення ендоплазматичного ретикулума, везикуляція цитоплазми, накопичення мультивезикулярних тілець та аутофагічних вакуолей. А) $\times 14000$; В) $\times 14000$; С) $\times 10000$. Mf – міофіламенти, М – мітохондрії, AV – аутофагічні вакуолі, MB – мультивезикулярні тільця.

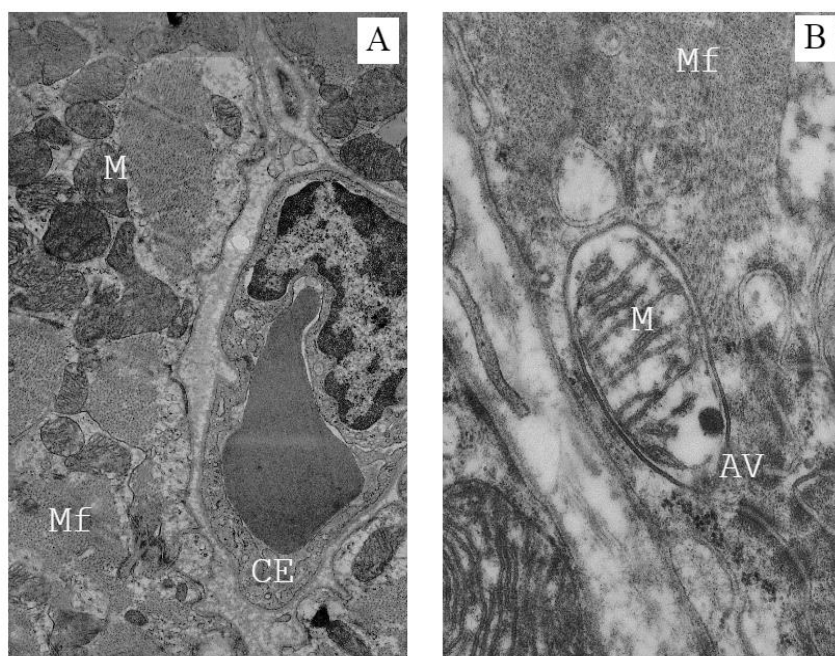


Рис. 13. Ультраструктура міокарду лівого шлуночка серця щурів групи SHR, котрим вводили кверцетин. А) Відсутність набряку в екстрацелюлярному та периваскулярному просторі, відсутність надлишків колагену, $\times 5200$. В) Аутофагічна вакуоля з ушкодженою мітохондрією, $\times 14000$. Mf – міофіламенти, М – мітохондрії, AV – аутофагічні вакуолі, CE – ендотелій капіляра.

Трипсиноподібна та каспазоподібна активність у тканинах серця щурів лінії SHR, що отримували кверцетин. Ці показники були у 2,4 рази ($P=0.04$) та у 9,3 разів ($P=0.015$) нижчими, ніж у SHR без такої терапії відповідно. **Хімотрипсиноподібна активність** у тканинах серця щурів зі спонтанною

гіпертензією, що отримували кверцетин, була більшою на 40% ($P=0.049$) у порівнянні з відповідними значеннями у SHR (Рис. 14).

Експресія генів, що кодують каталітичні конституційні субодиноці (*PSMB1 (LMP2), PSMB2, PSMB5(LMP7)*) та індукбельні субодиноці (*PSMB8, PSMB9, PSMB10*) протеасоми у тканинах серця у спонтанно гіпертензивних щурів.

У тканинах серця спонтанно гіпертензивних щурів була значно більшою експресія генів, що кодують субодиноці протеасом: *PSMB1* – у 2,6 рази ($P=0.01$), *PSMB2* – у 2,1 рази ($P=0.017$), *PSMB9* – у 1,9 рази ($P=0.03$) ніж у щурів Wistar. У той же час рівень експресії мРНК *PSMB10* і *PSMB8* у тканинах серця щурів SHR теж був помітно вищим (у 1,7 та 1,6 рази відповідно), але різниця не була статистично достовірною. Рівень експресії гена *PSMB5* у спонтанно гіпертензивних щурів, проте, був нижчим на 19,2% у порівнянні з таким у щурів Wistar (Рис. 15).

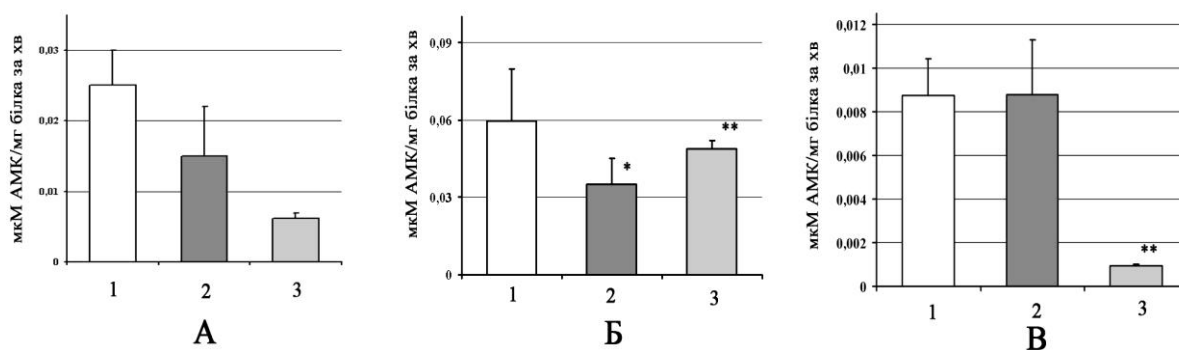


Рис. 14. Протеасомна активність у тканинах серця. А) Трипсиноподібна активність; Б) Хімотрипсиноподібна активність; В) Пептидилглутаміл пептидгідролазна активність протеасом. * – $P<0.05$ при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, ** – $P<0.05$ при порівнянні груп щурів лінії SHR з SHR+кверцетин.

Експериментальна терапія SHR за допомогою кверцетину зумовлювала достовірне зниження рівнів експресії мРНК всіх перерахованих нижче генів, а саме: *PSMB1* (у 35,5 разів, $P=0.00002$), *PSMB2* (у 10,4 разів, $P=0.00002$), *PSMB8* (у 85 разів, $P=0.000001$), *PSMB9* (у 37,8 разів, $P=0.001$), *PSMB10* (у 26,8 разів, $P=0.026$). У той же час рівень експресії мРНК *PSMB5* був вищим у групі SHR+кверцетин у 3,3 рази у порівнянні з відповідним показником у Wistar ($P=0.003$).

Рівень експресії мРНК гену *PSMC1* у щурів SHR був у 3,25 рази вищим, ніж у Wistar. У той же час вживання кверцетину незначно попереджувало збільшення рівня експресії мРНК гену *PSMC1* (на 16%).

Рівень експресії мРНК гену *PSME1* у щурів SHR був у 1,65 рази вищим, ніж у тварин Wistar, а експериментальне лікування кверцетином суттєво попереджало збільшення експресії цього рівня (у 8,2 разів, $P=0.001$) (Рис.16).

У цілому аналіз наведених даних дозволяє дійти висновків, що саме пригнічення протеасом відповідальне за прояв антигіпертензивного ефекту. Певною мірою це твердження може бути підкріплено даними, що вказують на роль запалення у патогенезі АГ [Naibo et al., 2012; Waki et al., 2013] та на підвищення рівнів прозапальних цитокінів у крові, що описане як синдром системної запальної відповіді (systemic inflammatory response) [Wisse et al., 2004; Gonzalez et al., 2003;

Christman et al., 1998]. Крім того, згідно з результатами низки досліджень слід вважати, що активація протеасом відіграє істотну роль у патогенезі системної запальної відповіді. В аспекті теорії такої патології найбільш перспективним, на нашу думку, є застосування препаратів природного походження, зокрема біофлавоноїдів. Перевагами цих препаратів є низька токсичність завдяки існуванню еволюційно налагоджених систем їх біотрансформації і детоксикації, здатність таких агентів впливати на велику кількість біологічних мішеней (антиоксидантний ефект, пригнічення ліпоксигенази та ряду протеїназ), а також відносно невисока вартість відповідних препаратів.

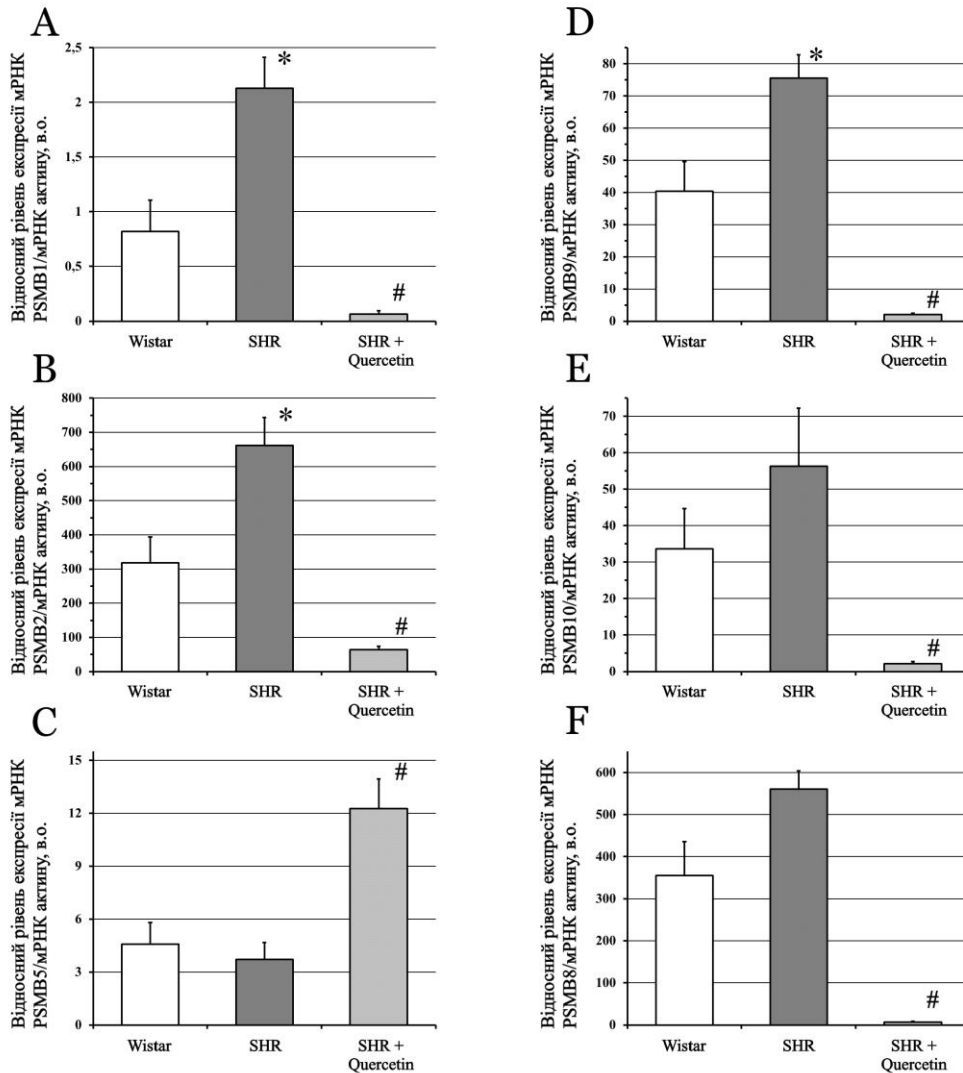


Рис. 15. Рівні експресії генів, що кодують конституційні субодиноці протеасом у тканинах серця щурів групи Wistar, SHR та SHR+кверцетин. А) Рівень експресії гену PSMB1; В) – гену PSMB2; С) – гену PSMB5. Рівень експресії генів, що кодують індукційні субодиноці протеасом: D) рівень експресії гену PSMB9; E) – гену PSMB10; F) – гену PSMB8. * – $P < 0.05$ при порівнянні груп щурів ліній Wistar з SHR, # – $P < 0.05$ при порівнянні груп щурів ліній SHR з SHR+кверцетин.

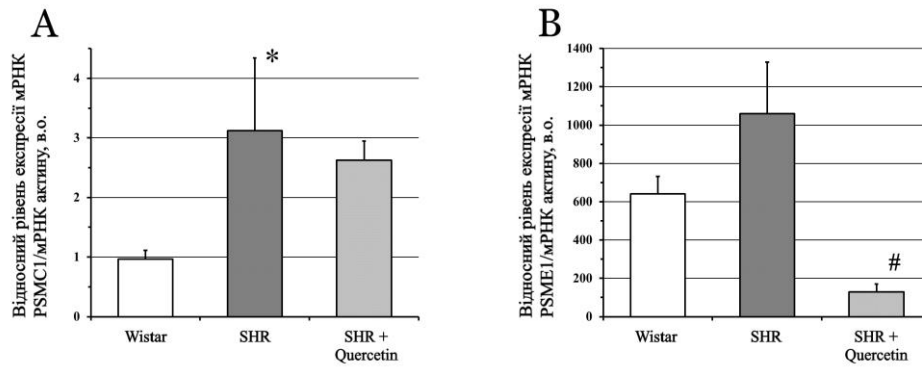


Рис.16. Експресія генів, що кодують регуляторні субодиниці (А) *PSME1* та В) *PSMC1*) протеасоми у тканинах серця у щурів лінії *SHR* та *Wistar*. * – $P < 0.05$ при порівнянні груп щурів лінії *Wistar* з *SHR*, # – $P < 0.05$ при порівнянні груп щурів лінії *SHR* з *SHR*+кверцетин.

ВИСНОВКИ

У роботі продемонстроване істотне значення протеасомного протеолізу у розвитку артеріальної гіпертензії в аспектах генетичної схильності, зміни експресії відповідних генів та активності протеолітичного комплексу та запропоновано метод експериментальної терапії цієї патології з застосуванням інгібітору протеасомної активності.

1. Розподіл алельних варіантів генів *PSMA6*, *LMP2* суттєво відрізняється у дітей та підлітків з есенціальною артеріальною гіпертензією від такого у практично здорових дітей, а зв'язку між поліморфізмом гена *LMP7* та цим захворюванням – немає.
2. У щурів зі спонтанною гіпертензією низка кардіогемодинамічних параметрів істотно відрізняється від таких у нормотензивних щурів лінії *Wistar*: ударний об'єм у середньому менший у 3 рази ($P < 0.0001$), фракція викиду менша у 2,14 рази ($P < 0.0001$), ударна робота менша на 70% ($P < 0.0001$), а також менша середня частота серцевих скорочень (на 12%, $P = 0.006$). Показники діастолічної функції серця у щурів лінії *SHR* вищі: кінцево-діастолічний тиск у середньому у 6,5 разів ($P < 0.005$), $dp/dt \min$ – на 30% ($P < 0.0001$). У той же час, мінімальний тиск та кінцево-систолічний тиск у щурів лінії *SHR* були нижчими в 1,5 рази ($P < 0.01$) та на 15% ($P < 0.004$) відповідно, а артеріальна жорсткість у щурів лінії *SHR* – вищою у 4,4 рази ($P < 0.0001$).
3. У щурів *SHR* спостерігаються суттєві морфологічні зміни аорти: загальна ширина аорти у середньому більша на 36%, ширина гладеньком'язових прошарків – на 19%, а ширина інтими – більша у 1,9 рази, ніж у контрольних нормотензивних щурів.
4. Рівні експресії мРНК генів, що кодують конститутивні, індукційні та регуляторні субодиниці протеасом у тканинах аорти у *SHR* значно відрізняється від таких у щурів *Wistar*; експресія гену *PSMB1* була нижчою у 10,6 разів, ніж у щурів лінії *Wistar* ($P = 0.0014$), а експресія мРНК гену *PSMB10* – нижчою на 44% ($P = 0.003$). У тканинах серця гіпертензивних щурів значно вищий рівень експресії наступних генів: *PSMB1* – у 2,6 рази ($P = 0.01$), *PSMB2* –

- у 2,1 рази ($P=0.017$), *PSMB9* – у 1,9 рази ($P=0.03$), *PSMC1* – у 3,2 рази ($P=0.046$) та *PSME1* – у 1,7 рази ($P=0.001$).
5. У щурів з артеріальною гіпертензією (SHR) трипсино-, хімотрипсиноподібна та пептидилглютаміл пептидгідролазна активність протеасом у тканинах аорти істотно не відрізняється від таких у нормотензивних щурів лінії Wistar.
 6. У спонтанно гіпертензивних щурів SHR хімотрипсиноподібна активність протеасом у тканинах серця вірогідно нижча (у 1,6 рази, $P=0.02$), ніж у нормотензивних тварин.
 7. Експериментальна терапія артеріальної гіпертензії з застосуванням інгібітору активності протеасом кверцетину досить ефективна. Така терапія попереджує розвиток ліпідозу у стінці аорти щурів SHR, зменшує інтенсивність фібротичних змін у лівому шлуночку серця (майже у 2,9 рази; $P<0.05$), статистично вірогідно зменшує рівень експресії *PSMB2* у тканинах аорти (у 28 разів, $P=0.003$) та збільшує рівень мРНК гену *PSMB1* (у 7,8 разів). Інтенсивність експресії генів *PSMB8* та *PSMB9* у тканинах аорти були статистично вірогідно меншими (у 5,5 разів, $P=0.004$ та у 112 разів, $P=0.005$), а *PSME1* у 7,8 разів ($P=0.00004$).

СПИСОК ПУБЛІКАЦІЙ ЗА ТЕМОЮ ДИСЕРТАЦІЇ:

в яких опубліковані основні наукові результати дисертації:

1. Altered biogenesis of microRNA-1 is associated with cardiac dysfunction in aging of spontaneously hypertensive rats / Tetiana Lapikova-Bryhinska, Anna Zhukovska, Vasyl Nagibin, Lesia Tumanovska, Georgii Portnichenko, **Sergiy Goncharov**, Alla Portnychenko, Victor Dosenko // Molecular and cellular biochemistry. – 2019. – V. 459, №1-2. – P. - 73-82. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження у складі робочої групи).
2. Cholesterol enriched diet suppresses ATF6 and PERK and upregulates the IRE1 pathways of the unfolded protein response in spontaneously hypertensive rats: Relevance to pathophysiology of atherosclerosis in the setting of hypertension / Lesya V. Tumanovska, R. James Swanson, Zoya O. Serebrovska, Georgii V. Portnichenko, **Sergii V. Goncharov**, Bohdan A. Kysilov, Olexandr O. Moibenko, Victor E. Dosenko. // Pathophysiology – 2019. – V. 26, №3-4. –P. - 219-226. (Здобувач брав участь у плануванні експерименту, зборі експериментального матеріалу, аналізі отриманих результатів та написанні статті).
3. Cholesterol-rich diet induced improvement of hemodynamic system indices in SHR / Portnichenko G.V., **Goncharov S.V.**, Stroy D.O., Dosenko V.E. // Фізіологічний журнал. – 2019. – V.65, №2. – P.68-75. (Здобувачем проведено експериментальні дослідження у складі робочої групи).
4. Cardiospecific deletion of α E-catenin leads to heart failure and lethality in mice / Balatskyi V.V., Macewicz L.L., Gan A.M., **Goncharov S.V.**, Pawelec P., Portnichenko G.V., Lapikova-Bryginska T.Y., Navrulin V.O., Dosenko V.E., Olichwier A., Dobrzyn P., Piven O.O. // PflugersArch - Eur J Physiol. - 2018. – 470, №10. – P.1485-1499. (Здобувачем проведено гемодинамічні дослідження у складі робочої групи).
5. Вплив кверцетину на протеасомну активність в аорті та серці щурів зі спонтанною гіпертензією / **Гончаров С.В.**, Портніченко Г.В., Тумановська Л.В.,

- Пашевін Д.О., Кузьменко М.О., Мойбенко О.О., Досенко В.Є. // Фізіологічний журнал. – 2014. – Т. 60, № 3. - С. - 3-10. (Здобувач брав участь у плануванні експерименту, заборі експериментального матеріалу, аналізі отриманих результатів та написанні статті).
6. Genetic predisposition to essential hypertension in children: analysis of 17 single nucleotide polymorphisms / **Sergii V. Goncharov**, Veronika L. Gurianova, Dmytro O. Stroy, Tetyana I. Drevitska, Sergii P. Kaplinskii, Evgen A. Nastenکو, Maryna Litvinenko, Roman V. Terletskiy, Mykola V. Khaitovych, Oleksiy O. Moibenکو, Viktor E. Dosenکو // Fiziolohichnyi zhurnal – 2013. – Т. 59 №6. - С. - 12-24. (Здобувачем проведено генетичні дослідження деяких поліморфізмів генів у складі робочої групи, брав участь у написанні статті).
 7. Комбинация методов логистической регрессии и мультифакторной пространственной редукции (MDR) для оценки риска развития эссенциальной гипертензии / Д.А. Строй, Е.А. Настенко, В.Л. Гурьянова, **С.В. Гончаров**, В.Е. Досенко, А.А. Мойбенко // Курский научно-практический вестник «Человек и его здоровье». – 2011. - № 2. – С.- 78-83. (Здобувачем проведено генетичні дослідження деяких поліморфізмів генів у складі робочої групи, брав участь у написанні статті).
 8. Allele polymorphism of genes coding proteasome subunits is associated with an enhanced risk for arterial hypertension in adolescents / **S.V. Goncharov**, V.E. Dosenکو, N.V. Haitovich, A.A. Moibenکو // Fiziolohichnyi zhurnal – 2009. V. 55 №2. P. - 3-10. (Здобувач брав участь у плануванні експерименту, проводив генетичні дослідження, аналіз отриманих результатів, писав статтю).

які засвідчують апробацію матеріалів дисертації:

1. The role of long non-coding RNAs (lncRNAs) in cardiac hypertrophy formation during physical exercise / Polishchuk A., Drozdovska S., Dosenکو V., **Goncharov S.** // European Journal of Sports Medicine – 2018. – V.5 S.2 - P. 26-27. (Riga, Latvia);
2. Quercetin prevents cardiac hypertrophy, fibrosis and lipidosis in spontaneously hypertensive rats and inhibits proteasomal activity / **Goncharov S.**, Portnichenko G., Tumanovska L., Goshovska Y., Dosenکو V. // Acta Physiologica. - 2017. – 217. P. 36-37;
3. Effect of cholesterol diet and corvitin at cardiohemodynamics and expression of H2S-synthesizing enzymes genes in aorta of spontaneously hypertensive rats / **Goncharov S.**, Goshovska Y., Portnichenko G., Tumanovska L., Dosenکو V., Sagach V. // European Journal Of Clinical Investigation. – 2017. – 47. – P. 130;
4. Hypotensive effect of кверцетин is possibly mediated by down-regulation of immunotroteasome subunits in aorta of spontaneously hypertensive rats / **Goncharov S.**, Portnichenko G.V., Tumanovska L.V., Goshovska Y.V., Lapikova-Bryhinska T.U., Nagibin V.S., Dosenکو V.E.. // Cardiovascular Research. – 2016.- 111. – P. S114;
5. Молекулярні механізми розвитку та попередження патологічних процесів у серцево-судинній системі та їх вікові особливості / Портніченко А.Г., Лапікова-Бригінська Т.Ю., Портніченко Г.В., **Гончаров С.В.**, Василенко М.І., Гарматіна О.Ю., Запара Ю.О., Гур'янова В.Л., Мойбенко О.О. // Тези доп. VII Національного конгресу патофізіологів України з міжнародною участю

- «Патофізіологія і фармація: шляхи інтеграції», присвяченого пам'яті академіка НАН України О.О. Мойбенка, 5-7 жовтня 2016 р., Харків. – Вид НФАУ, 2016. – С. 184;
6. P476 SREBF1, SREBF2 and their target genes expression is different in Wistar and SHR rats under high cholesterol treatment conditions / Portnichenko H.V, **Goncharov S.V.**, Tumanovska L.V, Stroy D.O., Moibenko O.S., Kuzmenko M.O., Moibenko O.O., Dosenko V.E. // Cardiovascular research. – 2014. - 103 (suppl_1). – P. S87;
 7. Зміни експресії генів, що кодують субодиниці протеасоми і протеасомної активності у щурів з спонтанною гіпертензією, вплив кверцетину / **Гончаров С.В.**, Портніченко Г.В., Тумановська Л.В., Мойбенко О.С., Пашевін Д.О., Кузьмінко М.О., Мойбенко О.О., Досенко В.Є. (тези III conference "Physiology: from molecules to the body" at Bogomoletz Institute of Physiology, Kyiv, October, 24-25 2013);
 8. Експресія генів, що кодують субодиниці протеасоми в тканинах аорти спонтанногіпертензивних щурів / **Гончаров С.В.**, Пашевін Д.О., Досенко В.Є., Мойбенко О.О. // VI Національний конгрес патологістів України з міжнародною участю, Сімферополь - Місхор, 3-5 жовтня 2012 р. – Таврійський мед.-біол. вісник, 2012. – Т.15, №3, ч.2. – С. 320;
 9. **Гончаров С.В.** Алельний поліморфізм генів, що кодують субодиниці протеасоми, як генетична основа розвитку і тяжкості перебігу первинної артеріальної гіпертензії у дітей – 2010.- С. 13-14 (тези доповідей другого туру Всеукраїнського конкурсу студентських наукових робіт із природничих, технічних і гуманітарних наук у 2009/2010 навчальному році в галузі клінічна медицина: внутрішні хвороби, хірургія, дитяча хірургія, педіатрія, інфекційні хвороби, ендокринологія, імунологія, клінічна імунологія та алергологія).

АНОТАЦІЯ

ГОНЧАРОВ С.В. Молекулярно-генетичні механізми порушення протеасомного протеолізу при артеріальній гіпертензії та підходи до її корекції. Дисертація на здобуття наукового ступеня кандидата медичних наук за спеціальністю 14.03.04 – патологічна фізіологія – Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України

Дисертаційна робота присвячена дослідженню ролі протеасомного протеолізу при артеріальній гіпертензії. Дослідження проводилися у дітей та підлітків, що мають первинну гіпертензію та практично здорових дітей. Визначали поліморфізми генів, що кодують субодиниці протеасоми (*LMP2* Arg₆₀→His, *LMP7* Lys₁₄₅→Gln і *PSMA6* C⁻⁸→G). Отримані дані вказують на те, що розподіл алельних варіантів генів, що кодують субодиницю імунопротеасоми (*LMP2*) та протеасоми (*PSMA6*) суттєво відрізняється у контрольній групі та у дітей з артеріальною гіпертензією на відміну від поліморфізму гену *LMP7*. У подальшому дослідження виконувалося на спонтанно-гіпертензивних щурах (SHR) з корекцією за допомогою кверцетину (таблетована форма, 15 мг/кг маси тіла, щодня).

Порівняння морфологічних, гістологічних, кардіогемодинамічних та морфометричних показників аорти та серця щурів SHR з Wistar дає зрозуміти, що

хронічне підвищення тиску призводить до значних порушень. Таким чином у щурів лінії SHR спостерігалось зниження таких показників: ударного об'єму (у 3 рази), фракції викиду (у 2,14 рази), ударної роботи (на 70%), частоти серцевих скорочень (на 12%), мінімального тиску (у 1,5 рази) та кінцево-систоличного тиску (на 15%). Показники діастолічної функції серця були вищими у щурів лінії SHR: кінцево-діастолічний тиск у 6,5 разів, $dp/dt \min$ на 30 % та артеріальна жорсткість у 4,4 рази.

Виявлено суттєві морфологічні зміни аорти у SHR: були більшими загальна ширина аорти (на 36%), ширина гладеньком'язових прошарків (на 19%) і ширина інтими (у 1,9 рази).

Доведено ефективність експериментальної терапії артеріальної гіпертензії з застосуванням інгібітору протеасоми – кверцетину. За допомогою біофлавоноїду вдалося попередити збільшення наступних параметрів: ліпідоз у стінці аорти щурів SHR (у 2 рази), відсоток фібротичних змін у лівому шлуночку серця (у 2,9 рази). А також спостерігалось статистично вірогідне зменшення рівня експресії наступних генів у тканинах аорти SHR: *PSMB2* (у 28 разів), *PSMB8* (у 5,5 разів), *PSMB9* (у 112 разів) та *PSME1* (у 7,8 разів). На противагу рівень мРНК гену *PSMB1* був більшим у 7,8 разів.

Ключові слова: одонуклеотидний поліморфізм, експресія генів, гіпертрофія серця, протеасомний протеоліз, артеріальна гіпертензія.

SUMMARY

GONCHAROV S.V. Molecular genetic mechanisms of proteasomal proteolysis disorder in arterial hypertension and approaches to its correction. Qualifying scientific work on the rights of manuscripts.

The dissertation submitted to acquire a degree of Candidate of Sciences in Medicine (Ph.D.), specialty 14.03.04 - Pathophysiology - Bogomoletz Institute of Physiology of NAS of Ukraine, Kyiv, 2021.

The dissertation is devoted to the research on the role of proteasomal proteolysis in arterial hypertension. The research was performed among a group of children and adolescents with primary hypertension and healthy children as well. We have determined gene polymorphisms that encode proteasome subunits (*LMP2* Arg₆₀→His, *LMP7* Lys₁₄₅→Gln and *PSMA6* C⁻⁸→G). The obtained data indicate that the distribution of allelic variants of genes, that encode the immunoproteasome (*LMP2*) and proteasome (*PSMA6*) subunit, significantly differs between the control group and the group of children with arterial hypertension in contradistinction with the *LMP7* gene polymorphism.

Subsequently, the research has been performed on spontaneously hypertensive rats (SHR) with the quercetin correction (tablet form, 15 mg per kg of body weight, daily).

Comparison of morphological, histological, cardiohemodynamic, and morphometric parameters of the aorta and heart of SHR with Wistar rats suggests that a chronic increase of high blood pressure leads to significant disorders. Thus, SHR had the following parameters decreased: stroke volume (3 times), ejection fraction (2.14 times), stroke work (70%), heart rate (12%), minimum pressure (1.5 times), and end-systolic pressure (15%). Diastolic heart function parameters in SHR were higher: end-diastolic blood pressure 6.5 times, $dp/dt \min$ 30%, and arterial elastance 4.4 times.

Significant morphological changes of the aorta were detected in SHR. The following parameters were increased: aorta total width (by 36%), smooth muscle cell width (by 19%), and intima width (1.9 times).

The efficiency of experimental therapy of arterial hypertension with the use of a proteasome inhibitor - quercetin has been proved. Bioflavonoids could prevent the increase of the following parameters: aortic wall lipidoses of SHR (2 times) and the percentage of left ventricle fibrotic changes (2.9 times). A statistically significant decrease was observed in the expression level of the following genes in the aortic tissues of SHR: *PSMB2* (28 times), *PSMB8* (5.5 times), *PSMB9* (112 times), and *PSME1* (7.8 times). In contrast, the mRNA level of the *PSMB1* gene was 7.8 times higher.

Keywords: single nucleotide polymorphism, gene expression, cardiac hypertrophy, proteasomal proteolysis, hypertension.

ПЕРЕЛІК УМОВНИХ СКОРОЧЕНЬ

АГ – артеріальна гіпертензія;

ГМК – гладеньком'язові клітини;

ПЛР – полімеразна ланцюгова реакція;

LMP – великі мультифункціональні протеїнази;

PSMA6 – ген, що кодує некаталітичну субодиницю корової частини протеасоми;

PSMB – гени, що кодують каталітичні субодиниці корової частини протеасоми;

PSMC1 – ген, що кодує некаталітичну субодиницю регуляторної частини протеасоми;

PSME1 – ген, що кодує некаталітичну субодиницю регуляторної частини протеасоми;

SHR – лінія спонтанно гіпертензивних щурів;

SNP – поліморфізм поодиноких нуклеотидів.