

Механизм действия фоллистатин-подобного белка-1 (FSTL-1)

В. Г. Кукес^{1,*}, Ю. В. Олефир¹, Б. К. Романов¹, А. Б. Прокофьев¹, Е. В. Парфенова²,
М. А. Болдырева², О. А. Горошко¹, О. К. Парфенова³, А. А. Газданова³, Е. Ю. Демченкова¹

¹ Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Научный центр экспертизы средств медицинского применения»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Петровский б-р, д. 8, стр. 2, Москва, 127051, Российская Федерация

² Федеральное государственное бюджетное учреждение
«Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
3-я Черепковская ул., 15а, Москва, 121552, Российская Федерация

³ Федеральное государственное автономное образовательное учреждение высшего образования
«Первый Московский государственный медицинский университет им. И. М. Сеченова»
Министерства здравоохранения Российской Федерации,
Трубецкая ул., д. 8, стр. 2, Москва, 119991, Российская Федерация

Резюме. Приведены современные данные о некоторых белках семейства TGF- β , потенциально способных оказывать протективное действие при патологиях сердца, легких, плаценты, половых желез и поджелудочной железы. Были изучены противовоспалительные свойства одного из представителей данного семейства белков — фоллистатин-подобного белка-1 (FSTL-1) на клеточном уровне. Установлено, что FSTL-1 отвечает за регенерацию сердечной мышцы у млекопитающих за счет активации ангиогенных факторов. Несмотря на ведущую роль данного белка в регенерации миокарда, его концентрация в эпикарде сразу после инфаркта уменьшается, что не позволяет сердцу эффективно самовосстанавливаться. Приведены данные исследований об эффективности внутривенного введения FSTL-1 у крыс с инфарктом миокарда. Однако поскольку введение чужеродного белка может вызывать аллергические реакции, более рациональным решением стал выбор лекарственного средства, индуцирующего секрецию FSTL-1. **Цель работы:** экспериментальное обоснование возможности применения экзогенной регуляции секреции фоллистатин-подобного белка-1. **Материалы и методы:** исследования концентрации FSTL-1 в плазме крыс проводили методом иммуноферментного анализа до и после курса применения антиоксидантного лекарственного средства этилметилгидроксипиридина малата. Антиоксидант вводили 15 здоровым самцам крыс линии Wistar подкожно 3 раза в сутки в дозе 6 мг/сут, курсом 14 суток. Кровь отбирали из вены натошак в первые сутки до введения препарата и на 15 сутки. **Результаты:** после курса введения этилметилгидроксипиридина малата концентрация FSTL-1 в плазме крови крыс достоверно ($p = 0,0011$) увеличивалась у экспериментальных животных и составила $0,92 \pm 0,11$ нг/мл относительно исходного значения $0,48 \pm 0,04$ нг/мл. **Заключение:** экспериментально подтверждены новые свойства этилметилгидроксипиридина малата — индукция фоллистатин-подобного белка-1 у здоровых крыс. Предлагается рассмотреть потенциальную возможность применения данного лекарственного средства как индуктора FSTL-1 при ишемии миокарда.

Ключевые слова: фоллистатин; фоллистатин-подобный белок-1; перекиси; ишемия миокарда; муковисцидоз; рак легкого

Для цитирования: Кукес ВГ, Олефир ЮВ, Романов БК, Прокофьев АБ, Парфенова ЕВ, Болдырева МА, Горошко ОА, Парфенова ОК, Газданова АА, Демченкова ЕЮ. Механизм действия фоллистатин-подобного белка-1 (FSTL-1). *Ведомости Научного центра экспертизы средств медицинского применения*. 2019;9(4):256–260. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-256-260>

***Контактное лицо:** Кукес Владимир Григорьевич; elmed@yandex.ru

The Mechanism of Action of Follistatin-like Protein-1 (FSTL-1)

V. G. Kukes^{1,*}, Yu. V. Olefir¹, B. K. Romanov¹, A. B. Prokofiev¹, E. V. Parfenova²,
M. A. Boldyreva², O. A. Goroshko¹, O. K. Parfenova³, A. A. Gazdanova³, E. Yu. Demchenkova¹

¹ Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products,
8/2 Petrovsky Blvd, Moscow 127051, Russian Federation

² National Medical Research Centre of Cardiology,
15A 3rd Cherepkovskaya St., Moscow 121552, Russian Federation

³ I. M. Sechenov First Moscow State Medical University,
8/2 Trubetskaya St., Moscow 119991, Russian Federation

Abstract. The paper provides current data on some proteins of the TGF- β family which are potentially capable of exerting a protective effect in diseases of the heart, lungs, placenta, gonads, and pancreas. The study investigated the anti-inflammatory properties of follistatin-like protein-1 (FSTL-1), one of the proteins of this family, at the cellular level. It was demonstrated that FSTL-1 is responsible for heart muscle regeneration in mammals through activation of angiogenic factors. Despite the fact that this protein plays a key role in myocardial regeneration, its concentration in the epicardium decreases immediately after a heart attack, which

hampers effective self-repair of the heart. The paper summarises the results of studies of the efficacy of intravenous administration of FSTL-1 in rats with myocardial infarction. However, the administration of a foreign protein can cause allergic reactions, therefore a drug that induces FSTL-1 secretion was chosen instead. **The aim of the study** was to provide experimental substantiation of the possibility of exogenous regulation of FSTL-1 secretion. **Materials and methods:** FSTL-1 concentration in rat plasma was assessed by enzyme immunoassay before and after treatment with the antioxidant drug ethyl methyl hydroxypyridine malate. The antioxidant was administered to 15 healthy male Wistar rats subcutaneously 3 times a day at a dose of 6 mg/day for 14 days. A fasting blood sample was obtained on the first day before administration of the drug and on day 15. **Results:** after the period of treatment with ethyl methyl hydroxypyridine malate the concentration of FSTL-1 in the plasma of the laboratory rats increased significantly ($p = 0.0011$) to reach 0.92 ± 0.11 ng/mL as compared to the initial concentration of 0.48 ± 0.04 ng/mL. **Conclusion:** the study provided experimental evidence for new properties of ethyl methyl hydroxypyridine malate, i.e. induction of FSTL-1 in healthy rats. Further studies are encouraged to assess potential use of this drug as an inductor of FSTL-1 in myocardial ischemia. **Key words:** follistatin; follistatin-like protein-1; peroxides; myocardial ischemia; cystic fibrosis; lung cancer

For citation: Kukes VG, Olefir YuV, Romanov BK, Prokofiev AB, Parfenova EV, Boldyreva MA, Goroshko OA, Parfenova OK, Gazdanova AA, Demchenkova EYu. The mechanism of action of follistatin-like protein-1 (FSTL-1). *Vedomosti Nauchnogo tsentra ekspertizy sredstv meditsinskogo primeneniya = The Bulletin of the Scientific Centre for Expert Evaluation of Medicinal Products*. 2019;9(4):256–260. <https://doi.org/10.30895/1991-2919-2019-9-4-256-260>

*Corresponding author: Vladimir G. Kukes; elmed@yandex.ru

Фоллистатины относятся к семейству белков TGF- β . Функции доменов фоллистатина различны [1]. Их основное физиологическое действие — стимуляция роста специфических мышечных клеток сердца, подавление воспаления и фиброза легких. Фоллистатин ингибирует синтез белков и гормонов: активина (липидного регулятора) и фолликулостимулирующего гормона. Также фоллистатин играет важную роль в процессах стимуляции мышц и подавлении воспаления в легких. Фоллистатин синтезируется в разных органах и тканях: в мышцах, гипофизе, половой системе, сердце, фибробластах, дендритных и тучных клетках, макрофагах, эпителии дыхательных путей и Т-клетках, но основным источником циркулирующего фоллистатина является печень [1].

Семейство фоллистатиновых олигопептидов представлено несколькими формами. Первая форма состоит из 315 аминокислотных остатков, является короткоживущей (период полувыведения — около 1,5 ч), циркулирует в крови и там связывает миостатин. Вторая форма состоит из 288 аминокислотных остатков и связывается с межклеточным матриксом, где, вероятно, она связывает миостатин локально [2].

Синтезированный на рибосомах фоллистатин секретируется в эндоплазматическую сеть клетки, где от него отщепляется сигнальный пептид — активин-А, представитель семейства TGF- β , содержание которого увеличивается при муковисцидозе (МВ) [3]. Эффективность фоллистатина, который является естественным антагонистом активина-А, была продемонстрирована на трансгенной модели мыши с МВ, который проявляется в основном дыхательной недостаточностью (главная причина смерти при МВ) [3].

Фоллистатин обладает высоким аффинитетом к активину-А, он блокирует связывание рецептора активина-А и нейтрализует его действие.

Результаты клинических исследований на взрослых пациентах с муковисцидозом также продемонстрировали повышенный уровень активина-А в слюворотке с обратной корреляцией с функцией легких

и индексом массы тела в качестве индекса кахексии. Эти результаты указывают, что фоллистатин может быть перспективен при лечении заболеваний легких у пациентов с МВ [3].

Активин-А также регулирует рост и дифференцировку клеток, имеет иммунорегуляторные функции, играя важную роль в регуляции легочного воспаления и фиброза. Особое значение при воспалительных заболеваниях легких имеет индукция активин-А провоспалительных цитокинов, таких как интерлейкины IL-1 β , IL-6 и фактор некроза опухолей (TNF- α) [3].

Результаты исследований показывают, что фоллистатин, назначенный для профилактики сразу после постановки диагноза МВ, предотвращает развитие воспаления и гиперсекреции слизи, а также уменьшает тяжесть течения инфекций и ремоделирующего каскада воспалительных реакций, который в конечной форме приводит к усугублению болезни и смерти [3].

В настоящее время публикуется все больше результатов исследований фоллистатин-подобных белков, являющихся гликопротеидами, представителями семейства фоллистатина. Белки этого семейства имеют сходное строение с фоллистатином и могут использоваться в качестве маркеров воспаления. Особое внимание следует уделить фоллистатин-подобному белку-1, поскольку инфаркт миокарда является основной причиной смерти [4] в странах с развитой системой здравоохранения, включая Российскую Федерацию.

Фоллистатин-подобный белок-1 (FSTL-1) секретируется миоцитами. Его синтез активируется в ответ на ишемические повреждения. FSTL-1 не блокирует активин и миостатин, в отличие от фоллистатина. Были изучены противовоспалительные свойства FSTL-1 на клеточном уровне [4].

На основании анализа литературы нами установлено, что FSTL-1 отвечает за регенерацию сердечной мышцы у млекопитающих за счет активации ангиогенных факторов (рис. 1). Несмотря на ведущую роль данного белка в регенерации миокарда,

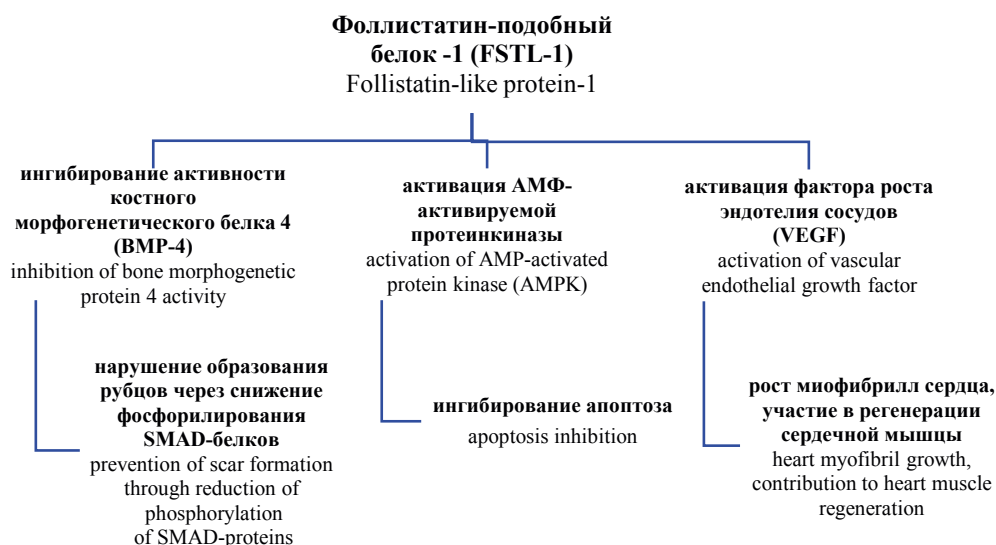


Рис. 1. Роль FSTL-1 при поражениях сердца

Fig. 1. FSTL-1 role in heart diseases

его концентрация в эпикарде сразу после инфаркта уменьшается, что не позволяет сердцу эффективно самовосстанавливаться. Увеличить концентрацию FSTL-1 в пораженном участке сердца можно применением «заплатки», насыщенной данным протеином. При наложении «заплатки» происходит постепенное высвобождение FSTL-1, и, достигая миокарда, этот белок запускает процесс регенерации. Это существенно улучшало функцию сердца животных и увеличивало выживаемость, даже если «заплатка» была наложена через неделю после перенесенного инфаркта [5]. Данный метод лечения был запатентован в 2018 году¹. Также было установлено, что инъекции FSTL-1 могут предотвращать повреждение миокарда, вызванное ишемией, путем ингибирования апоптоза и воспалительных реакций посредством активации АМФ-активируемой протеинкиназы и ингибированием BMP-4 [4].

Таким образом, можно выделить три основных действия FSTL-1 при поражениях сердца:

- 1) ингибирование активности костного морфогенетического белка 4, из-за чего нарушается образование рубцов через снижение фосфорилирования SMAD-белков [4];
- 2) активация АМФ-активируемой протеинкиназы (АМПК) с последующим ингибированием апоптоза [4];
- 3) активация фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и рост миофибрилл сердца, что содействует регенерации сердечной мышцы [5].

Кроме действия на мышцы сердца, FSTL-1 влияет на легочную ткань [9, 10]. Показано, что уменьшение содержания FSTL-1 у мышей приводит к постнатальной летальности в результате респираторной недостаточности. Также показано,

что FSTL-1 необходим для формирования хряща трахеи и альвеолярного созревания. Удаление гена FSTL-1 приводит к образованию поврежденных колец трахеи, проявляющихся в виде остановленных в развитии колец и уменьшенного количества сформированных колец [6].

J. Chiou и соавт. было установлено, что FSTL-1 играет важную роль в развитии рака легких. Результаты исследования показали, что низкая экспрессия FSTL-1 коррелировала с плохим прогнозом при раке легких, а пациенты с аденокарциномой легких и с низкой экспрессией BMP-4 или SMAD4 также показали тенденцию к неблагоприятному прогнозу. Низкая экспрессия FSTL-1, BMP-4 и SMAD4 чаще наблюдалась у курящих пациентов с аденокарциномой. Отмечено, что FSTL-1 ослабляет индуцированную никотином пролиферацию этих же клеток и может предотвратить пролиферацию клеток рака легкого, вызванную никотином [7]. В связи с тем что ишемия способна повреждать центры синтеза FSTL-1, в разных странах предпринимаются попытки его синтезировать, чтобы получить и применять экзогенный FSTL-1 у больных с хронической сердечной недостаточностью. При этом необходимо учитывать, что введение чужеродного белка может вызывать аллергические реакции. Нами предпринята попытка поиска лекарственного средства-активатора, которое может повысить уровень эндогенного FSTL-1.

Цель работы — экспериментальное обоснование возможности применения экзогенной регуляции секреции фоллистатин-подобного белка-1.

Для достижения поставленной цели необходимо было решить следующие задачи: проанализировать данные литературы по применению FSTL-1 в доклинических исследованиях у животных;

¹ Patent WO-2018052374-A1. Modulation of TJP1 expression to regulate regeneration of heart cells.

экспериментально оценить влияние вероятного экзогенного модулятора на динамику концентрации FSTL-1 в плазме крови животных.

МАТЕРИАЛЫ И МЕТОДЫ

Индукцию синтеза FSTL-1 изучали после применения лекарственного средства этилметилгидроксипиридина малата (ЭМГПМ). Исследования концентрации FSTL-1 в плазме крыс проводили до и после курса ЭМГПМ методом иммуноферментного анализа с использованием набора реагентов производства «Cloud-Clone Corp.» (USA) для определения FSTL-1 у крыс.

Для экспериментальной проверки полученных результатов ЭМГПМ вводили 15 здоровым самцам крыс линии Wistar подкожно 3 раза в сутки в дозе 6 мг/сут курсом 14 суток (при массе животного 250 г суточная доза составляла 24 мг/кг). Для улучшения всасывания и повышения точности дозирования препарат разводили физиологическим раствором таким образом, чтобы разовый объем введения составлял 200 мкл. Кровь отбирали из вены натошак в первые сутки до введения препарата и на 15 сутки, центрифугировали 10 мин при 1500g, плазму переносили в пластиковые пробирки и хранили при -20°C .

Биологический материал предоставлен ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России

на безвозмездной основе. Исследование проводилось в соответствии с правилами основных документов, регламентирующих проведение экспериментов на лабораторных животных и условия их содержания: «Правила надлежащей лабораторной практики», утвержденные приказом Минздрава России № 199н от 1 апреля 2016 г., и Директива 2010/63/EU Европейского Парламента и Совета Европейского Союза от 22 сентября 2010 г. по охране животных, используемых в научных целях. Хирургические манипуляции и процедуры эвтаназии, разработанные в соответствии с национальными и европейскими директивами, были одобрены управлением по этике и уходу за животными (ФГБУ «НМИЦ кардиологии» Минздрава России, разрешение № 385.06.2009).

Анализ результатов проводили с помощью пакета прикладных программ STATISTICA. Достоверность различий оценивалась с помощью критерия Стьюдента и коэффициента корреляции Пирсона, статистически достоверными считали результаты с уровнем значимости $p < 0,05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

После курса введения ЭМГПМ концентрация FSTL-1 достоверно ($p = 0,0011$) увеличивалась у 13 из 15 животных. Исходная концентрация FSTL-1 в плазме крови крыс составила $0,48 \pm 0,04$ нг/мл,

Таблица 1. Концентрация фоллистатин-подобного белка-1 (FSTL-1) в плазме крови крыс до и после курсового введения этилметилгидроксипиридина малата (ЭМГПМ)

Table 1. Concentration of follistatin-like protein-1 (FSTL-1) in rat plasma before and after a course of treatment with ethyl methyl hydroxypyridine malate (EMHPM)

№ животного Animal No.	Концентрация FSTL-1 до введения ЭМГПМ, нг/мл FSTL-1 concentration before administration of EMHPM, ng/mL	Концентрация FSTL-1 после курса введения ЭМГПМ, нг/мл FSTL-1 concentration after the course of treatment with EMHPM, ng/mL
1	0,544	0,966
2	0,628	2,203
3	0,248	0,563
4	0,392	1,192
5	0,905	0,765
6	0,498	1,208
7	0,467	0,451
8	0,432	0,707
9	0,346	0,401
10	0,585	0,794
11	0,397	1,022
12	0,585	1,139
13	0,426	1,035
14	0,420	0,608
15	0,409	0,839
M_{cp}	0,48	0,92
SEM	0,04	0,11

Примечание. M_{cp} — среднее значение; SEM — стандартная ошибка среднего.

Note. M_{cp} — mean value; SEM — standard error of the mean.

а после курса введения ЭМГПМ — $0,92 \pm 0,11$ нг/мл (табл. 1).

Определен диапазон разброса концентраций FSTL-1: у интактных крыс он составил 0,25–0,58 нг/мл, у получавших ЭМГПМ — 0,45–2,20 нг/мл (рис. 2).

Полученные данные отчасти могут объясняться механизмом действия антиоксидантов, в т.ч. ЭМГПМ, приводящим к росту содержания АТФ, повышению сократительной способности скелетных мышц и кардиомиоцитов, что косвенно могло привести к повышению концентрации FSTL-1 [8].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, экспериментально подтверждена возможность экзогенной индукции фоллистатин-подобного белка-1 у здоровых крыс после курсового применения лекарственного средства этилметилгидроксипиридина малата. Однако для подтверждения возможности данного эффекта препарата при ишемии необходимо проведение дальнейших исследований.

Благодарности. Работа проведена без спонсорской поддержки.

Acknowledgements. The study was performed without external funding.

ЛИТЕРАТУРА / REFERENCES

- Lee SJ, Lee YS, Zimmers TA, Soleimani A, Matzuk MM, Tsuchida K, Cohn RD, Barton ER. Regulation of muscle mass by follistatin and activins. *Mol Endocrinol.* 2008;24(10):1998–2008. <https://doi.org/10.1210/me.2010-0127>
- Keutmann HT, Schneyer AL, Sidis Y. The role of follistatin domains in follistatin biological action. *Mol Endocrinol.* 2004;18(1):228–40. <https://doi.org/10.1210/me.2003-0112>
- Hardy CL, King SJ, Mifsud NA, Hedger MP, Phillips DJ, Mackay F, et al. The activin A antagonist follistatin inhibits cystic fibrosis-like lung inflammation and pathology. *Immunol Cell Biol.* 2015;93(6):567–74. <https://doi.org/10.1038/icb.2015.7>
- Ogura Y, Ouchi N, Ohashi K, Shibata R, Kataoka Y, Kambara T, et al. Therapeutic impact of follistatin-like 1 on myocardial ischemic injury in preclinical models. *Circulation.* 2012;126(14):1728–38. <https://doi.org/10.1161/CIRCULATIONAHA.112.115089>
- Wei K, Serpooshan V, Hurtado C, Diez-Cunado M, Zhao M, Maruyama S, et al. Epicardial FSTL1 reconstitution regenerates the adult mammalian heart. *Nature.* 2015;525(7570):479–85. <https://doi.org/10.1038/nature15372>
- Geng Y, Dong Y, Yu M, Zhang L, Yan X, Sun J, et al. Follistatin-like 1 (Fstl1) is a bone morphogenetic protein (BMP) 4 signaling antagonist in controlling mouse lung development. *Proc Natl Acad Sci USA.* 2011;108(17):7058–63. <https://doi.org/10.1073/pnas.1007293108>
- Chiou J, Su CY, Jan YH, Yang CJ, Huang MS, Yu YL, Hsiao M. Decrease of FSTL1-BMP4-Smad signaling predicts poor prognosis in lung adenocarcinoma but not in squamous cell carcinoma. *Sci Rep.* 2017;(7):9830. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-10366-2>
- Zhu Z, Sierra A, Burnett CM, Chen B, Subbotina E, Koganti SR, et al. Sarcolemmal ATP-sensitive potassium channels modulate skeletal muscle function under low-intensity workloads. *J Gen Physiol.* 2014;143(1):119–34. <https://doi.org/10.1085/jgp.201311063>

ОБ АВТОРАХ / AUTHORS

Кукес Владимир Григорьевич, академик РАН, д-р мед. наук, проф. *Vladimir G. Kukes*, Academician of the Russian Academy of Sciences, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-5112-6928>

Олефир Юрий Витальевич, д-р мед. наук, ст. науч. сотр. *Yuri V. Olefir*, Dr. Sci. (Med.), Senior Research Associate. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7652-4642>

Романов Борис Константинович, д-р мед. наук, доцент. *Boris K. Romanov*, Dr. Sci. (Med.), Associate Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-5429-9528>

Прокофьев Алексей Борисович, д-р мед. наук, проф. *Alexey B. Prokofiev*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7024-5546>

Парфенова Елена Викторовна, д-р мед. наук, проф. *Elena V. Parfenova*, Dr. Sci. (Med.), Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-3947-572X>

Болдырева Мария Александровна, канд. биол. наук. *Maria A. Boldyreva*, Cand. Sci. (Biol.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0002-8309-0018>

Горошко Ольга Александровна, канд. фарм. наук. *Olga A. Goroshko*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-0448-3612>

Парфенова Ольга Константиновна. *Olga K. Parfenova*.

Газданова Альбина Амырхановна, канд. биол. наук, доцент. *Albina A. Gazdanova*, Cand. Sci. (Biol.), Associate Professor. **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0001-7099-4547>

Демченкова Елена Юрьевна, канд. фарм. наук. *Elena Yu. Demchenkova*, Cand. Sci. (Pharm.). **ORCID:** <https://orcid.org/0000-0003-1972-4386>

Статья поступила 03.06.2019

После доработки 09.09.2019

Принята к печати 19.11.2019

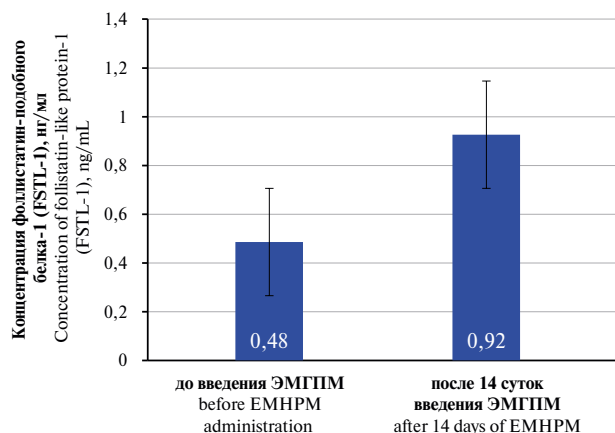


Рис. 2. Концентрация FSTL-1 в плазме до и после курса введения этилметилгидроксипиридина малата (ЭМГПМ). Вертикальными отрезками обозначен диапазон разброса концентраций

Fig. 2. FSTL-1 concentration in plasma after a course of treatment with ethyl methyl hydroxypyridine malate (EMHPM). The vertical bars show the concentration range

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов, требующего раскрытия в данной статье.
Conflict of interest. Authors declare no conflict of interest requiring disclosure in this article.