

© М. де К. Фонсека, К.Дж. Агуйар, Ж.А. да Роча Франко, Р. Н. Гинголд, М.Ф. Лейте, 2017
УДК 577.352.4 : 612.815

*M. de K. Fonseca¹, К.Дж. Агуйар², Ж.А. да Роча Франко¹, Р.Н. Гинголд¹,
М.Ф. Лейте¹*

GPR91: РАСШИРЕНИЕ ПРЕДСТАВЛЕНИЙ О МЕТАБОЛИТАХ ЦИКЛА КРЕБСА

¹Отдел физиологии и биофизики Федерального университета Минас-Жерайса, Бразилия, ²центр Университета Estácio de Sá, Бело
Горизонте, MG, Бразилия

*M. de C. Fonseca¹, C.J. Aguiar², J.A. da Rocha Franco¹, R.N. Gingold¹,
M.F. Leite¹*

GPR91: EXPANDING THE FRONTIERS OF KREBS CYCLE INTERMEDIATES

¹Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas-Gerais, Brazil, ²Centro Universitário Estácio de Sá, Belo Horizonte, MG, Brazil

РЕФЕРАТ

Цикл лимонной кислоты со времени его открытия рассматривали как центральную часть метаболизма и энергетического гомеостаза клетки. Находясь главным образом в митохондриальном матриксе, некоторые из промежуточных продуктов цикла Кребса присутствуют также и в кровотоке. В настоящее время имеются свидетельства того, что метаболиты цикла Кребса играют важную роль и за пределами цикла. Так, сукцинат является внеклеточным лигандом сопряженного с G-белком рецептора, известного как GPR91, который экспрессирован в почках, печени, сердце, клетках сетчатки и, вероятно, во многих других тканях. Активация сукцинатом GPR91 вызывает целый ряд физиологических и патологических эффектов. Посредством связывания с GPR91 сукцинат участвует в регуляции кровяного давления, подавлении липолиза в белой жировой ткани, развитии васкуляризации сетчатки, гипертрофии миокарда и активации звездчатых клеток печени ишемизированными гепатоцитами. Данный обзор посвящен обсуждению этих эффектов.

Ключевые слова: сукцинат, GPR91, клеточные функции, клеточный сигналинг.

ABSTRACT

Since it was discovered, the citric acid cycle has been known to be central to cell metabolism and energy homeostasis. Mainly found in the mitochondrial matrix, some of the intermediates of the Krebs cycle are also present in the blood stream. Currently, there are several reports that indicate functional roles for Krebs intermediates out of its cycle. Succinate, for instance, acts as an extracellular ligand by binding to a G-protein coupled receptor, known as GPR91, expressed in kidney, liver, heart, retinal cells and possibly many other tissues. Succinate activated GPR91 induces a wide array of physiological and pathological effects. Through GPR91, succinate is involved in functions such as regulation of blood pressure, inhibition of lipolysis in white adipose tissue, development of retinal vascularization, cardiac hypertrophy and activation of stellate hepatic cells by ischemic hepatocytes. Current review is dedicated to discussion of these effects.

Key words: succinate, GPR91, cell functions, cell signaling.

ВВЕДЕНИЕ

Еще в 1920 году Thorsten Thunberg впервые предположил, что сукцинат (янтарная кислота при физиологических значениях pH крови), дикарбоновая кислота, образуется в процессе окисления углеводов [1]. В последующее десятилетие механизм окисления был изучен более подробно благодаря исследованиям Albert von Szent-Györgyi на модели грудной мышцы голубя [2]. Им была открыта роль сукцината как переносчика водорода

при аэробном дыхании [2]. Впоследствии в конце 30-х годов XX века Krebs описал центральную часть процесса аэробного дыхания – цикл Кребса, также называемый циклом трикарбоновых кислот, или циклом лимонной кислоты [3]. С некоторыми последующими дополнениями цикл Кребса остается на сегодняшний день наиболее употребительной биохимической моделью аэробного дыхания [4]. Соответственно на протяжении многих десятилетий сукцинат рассматривали только как промежуточный продукт цикла Кребса, который считали единственным местом его синтеза.

Однако недавние исследования показали, что

M. de C. Fonseca Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG, CEP: 31270-901, Brazil. hp.matheus@gmail.com

образование сукцината может происходить и неферментативным образом. Это становится возможным, например, в условиях оксидативного стресса, при котором ряд ферментов цикла Кребса ингибированы, и синтез α -кетоглутарата происходит альтернативным способом, посредством трансаминирования. Накопление α -кетоглутарата в сочетании с инактивацией α -кетоглутаратдегидрогеназы, одного из ферментов цикла Кребса, способствует неферментативному декарбоксилированию α -кетоглутарата с образованием сукцината [5]. Следует отметить, что в 1970 году Krebs указывал, что некоторые метаболиты цикла Кребса, в том числе сукцинат, могут накапливаться в межклеточном пространстве в условиях ишемии, хотя метаболические причины и последствия этого на тот момент не были полностью ясны [6]. Недавно (2014 г.) Chouchani и соавт. описали механизм повышения экстрацеллюлярной концентрации сукцината при ишемии (рис. 1).

Исследования с использованием изотопной ^{13}C -метки показали, что в этих условиях сукцинат генерируется не из глюкозы, глутамата, жирных кислот и γ -аминомасляной кислоты (ГАБА-шунт) как при нормоксии, а из иных источников. Более того, авторы нашли, что инфузия диметилмалоната, предшественника малоната и конкурентного ингибитора сукцинатдегидрогеназы, снижает накопление сукцината, а также продемонстрировали, что повышение содержания сукцината при ишемии происходит вследствие обратимости действия сукцинатдегидрогеназы, восстанавливающей фумарат (образующийся за счет функционирования малат аспартатного челнока и цикла пуриновых нуклеотидов; оба этих пути активируются в условиях ишемии) до сукцината [7, 8] (см. рис. 1). Таким образом, образование в митохондриях сукцината – важного промежуточного продукта цикла Кребса – может происходить несколькими способами. В условиях недостаточного кровоснабжения концентрация сукцината в крови возрастает; при этом сукцинат образуется за счет биохимических путей, не относящихся к циклу Кребса.

Накопившийся в митохондриальном матриксе сукцинат способен перемещаться в цитозоль при помощи транспортеров дикарбоновых кислот внутренней мембраны митохондрий. На сегодняшний день к таковым относят транспортер сукцинат фумарат/малат SLC25A10 (10-й член 25-го семейства мембранных транспортеров). Вторая фаза переноса, во время которой сукцинат проходит сквозь внешнюю мембрану митохондрий, происходит за счет поринов, белковых каналов,

обеспечивающих неспецифический транспорт веществ с молекулярной массой до 1,5 кДа. Наконец, существует механизм быстрого выведения сукцината из цитозоля в кровяной поток. Транспортер, белок, называемый INDY (от I'm Not Dead Yet = Я еще не умер; название дано благодаря тому, что снижение экспрессии этого белка увеличивает продолжительность жизни лабораторных животных), является натрий-независимым анионным переносчиком [9] (хотя в предыдущих исследованиях его рассматривали как натрий-зависимый транспортер) [10], переносящим дикарбоновые кислоты и цитрат через клеточную мембрану.

Почему необходимо знать механизмы альтернативных путей синтеза сукцината и его транспорта? Главным образом потому, что сукцинат имеет ряд функций, отличных от участия в цикле Кребса, и часть из них – которым и посвящена данная статья – обусловлены наличием рецепторов, сопряженных с G-белком, известных как GPR91 или SUCNR1, для которых сукцинат является специфическим лигандом [11]. После связывания с этими рецепторами сукцинат проявляет гормоноподобное действие в различных органах и тканях, в числе которых клетки крови, жировая ткань, печень, сердце, почки и сетчатка глаза, причем в почках данные рецепторы экспрессированы в наибольшем количестве [11].

Обзор строения GPR91 и профиля его экспрессии

GPR91 – рецептор, сопряженный с G-белком, лигандом для которого является внеклеточный сукцинат [11, 12]. На основании генетических экспериментов установлено, что ведущая роль в его функционировании принадлежит Arg⁹⁹, His¹⁰³, Arg²⁵² и Arg²⁸¹. Эти аминокислоты расположены в завитках центральной части рецептора таким образом, что образуют положительно заряженную родопсиноподобную структуру, способную притягивать ион сукцината [11]. На рис. 2 показаны результаты компьютерного моделирования структуры GPR91 и возможных мест связывания сукцината.

Несмотря на то, что GPR91 на 33% гомологичен GPR99 (рецептору, взаимодействующему с α -кетоглутаратом), при определении степени аффинности оказалось, что сукцинат взаимодействует только с GPR91, в то время как α -кетоглутарат является лигандом только для GPR99 [11]. Установлено, что EC₅₀ (полумаксимальная эффективная концентрация лиганда) для пары сукцинат-GPR91 составляет 20–50 мкмоль [11]. При этом была исследована аффинность различных веществ, в том числе фармакологических субстан-

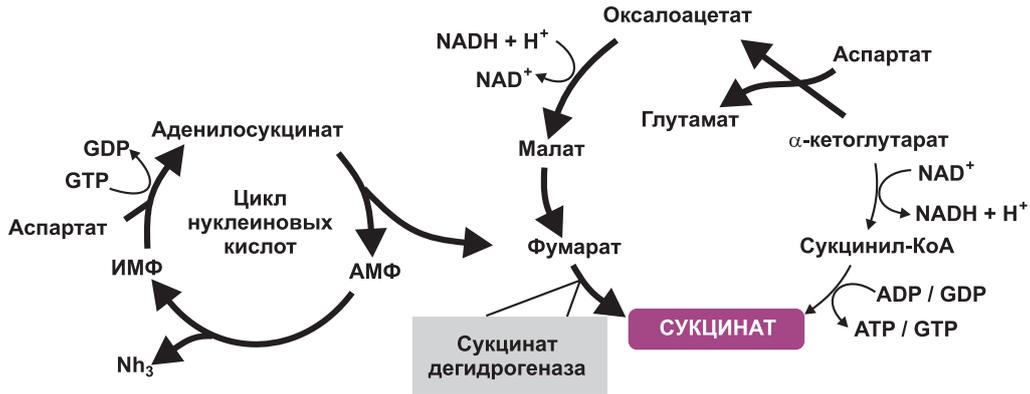


Рис. 1. Схема продукции сукцината при ишемии/реперфузии. Показано, что реверсивное действие сукцинатдегидрогеназы является основной причиной накопления сукцината при ишемии, несмотря на уменьшение, вследствие избытка НАДН, его продукции в регулярном цикле Кребса. Основными источниками фумарата, который затем восстанавливается в сукцинат, являются цикл пуриновых нуклеотидов (на рисунке слева) и малат-аспартатный шунт, что создает картину функционирования цикла Кребса в обратном направлении. АМФ – аденозинмонофосфат; ИМФ – инозинмонофосфат; АТФ, АДФ – аденозинтри- и дифосфат; ГТФ, ГДФ – гуанозинтри- и дифосфат; NADH, NAD⁺ – никотинамидадениндинуклеотид в восстановленной и окисленной формах.

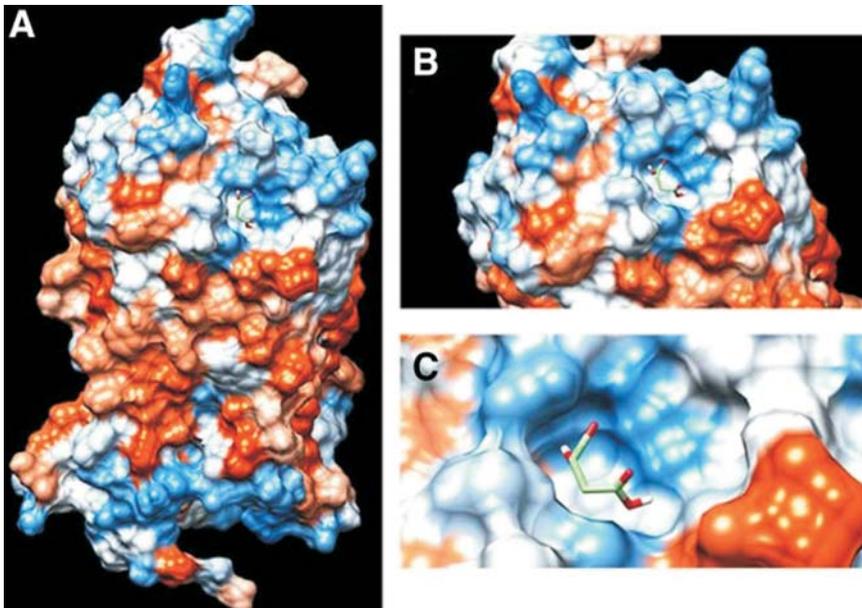


Рис. 2. Компьютерная модель структуры активного центра GPR91 (Website Protein Data Bank, PDB) при последовательном (А, В, С) увеличении. Сукцинат связывается с рецептором за счет разности электростатических потенциалов (красный – отрицательный заряд, синий – положительный).

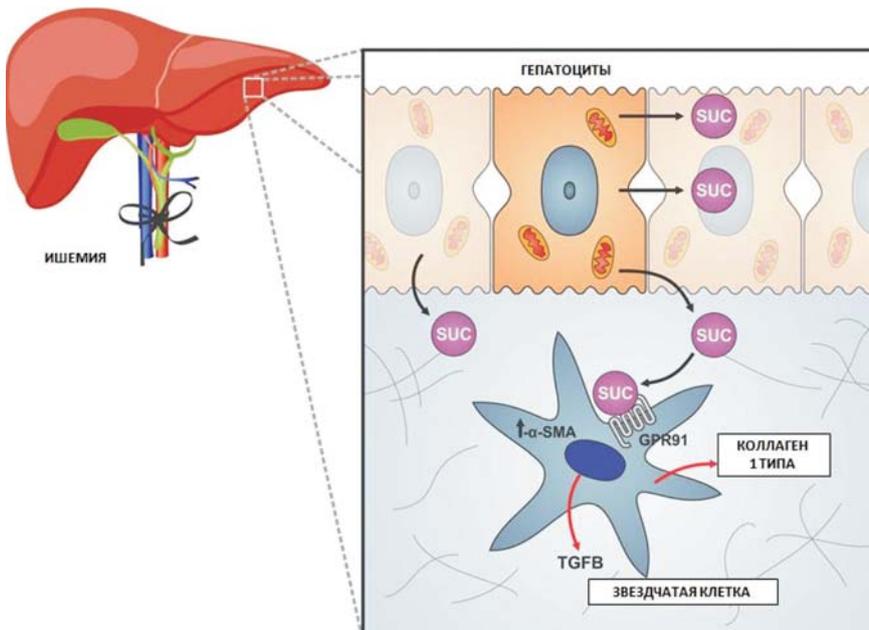


Рис. 3. Взаимодействие сукцината (SUC) и GPR91 в печени. При ишемии сукцинат высвобождается гепатоцитами и связывается звездчатыми клетками, активируя последних. Активированные звездчатые клетки увеличивают экспрессию фиброгенных продуктов, таких как гладкомышечный α -актин (α -sma), TGF- β и коллаген 1-го типа.

ций, а также карбоновых кислот, близких по строению к сукцинату, для различных сопряженных с G-белком рецепторов. Некоторые из тестируемых соединений были способны связываться с GPR91, однако, значительно хуже, чем сукцинат [11–13]. Таким образом, установлено, что сукцинат является эндогенным лигандом для GPR91.

GPR91 может взаимодействовать с различными G-белками. По данным исследований, использовавших токсин коклюша, GPR91 может активировать как G_i -, так и G_q -белки, запуская различные сигнальные пути и обуславливая различные клеточные эффекты. В HEK293 и MDCK (клеточных культурах, полученных из почек), сукцинат, к примеру, вызывает внутриклеточное высвобождение кальция, образование инозитолтрифосфата, активирует внеклеточную сигнал-регулируемую киназу 1/2 (ERK 1/2) и снижает концентрацию циклического аденозинмонофосфата (цАМФ). Путь активации – G_i – или G_q -сопряженный – зависит только от концентрации сукцината [11]. В гемопоэтических стволовых клетках сигнал опосредуется исключительно $G_{i/o}$ -белками и ведет к пролиферации клеток за счет активации ERK 1/2 [14]. В кардиомиоцитах сукцинат увеличивает, а не снижает концентрацию цАМФ, что приводит к активации протеинкиназы А (PKA) и заставляет предположить, что GPR91 может также взаимодействовать с G_s -белком [15]. Наличие разнообразных внутриклеточных сигнальных путей, активируемых GPR91, свидетельствует о том, что гормональные эффекты сукцината могут быть чрезвычайно разнообразными. После запуска сигнального каскада происходит интернализация GPR91 в эндосомы. Визуализирующие исследования показали, что GPR91 находится исключительно на поверхности плазматической мембраны, а его интернализация и последующая десенситизация происходят в результате взаимодействия с лигандом [11, 12].

GPR91 впервые был обнаружен в почках, впоследствии была показана его высокая экспрессия в печени, селезенке и кишечнике [11], а в настоящее время известно, что в организме он присутствует повсеместно как в возбудимых, так и в невозбудимых клетках. В почках GPR91 располагаются в сосудистом русле, в особенности в афферентных артериолах и капиллярах клубочков. Кроме того, GPR91 экспрессируются на люминальной мембране клеток различных отделов почечных канальцев: толстого восходящего отдела петли Генле, в том числе на апикальной мембране клеток плотного пятна, а также корковых и медуллярных собирательных канальцев [16–18]; при этом ренин-

продуцирующие клетки юкстагломерулярного аппарата (ЮГА), клетки мезангия и гладкомышечные клетки сосудов не имеют GPR91 [17]. В печени GPR91 экспрессируется исключительно в покоящихся звездчатых клетках [19], а в миокарде – в сарколемме и Т-канальцах кардиомиоцитов [15]. В сетчатке GPR91 преимущественно находятся в слое ганглионарных нейронов [20]. Адипоциты белой жировой ткани, гемопоэтические стволовые клетки, большинство клеток крови и иммунной системы также экспрессируют GPR91. Также GPR91 найден в незрелых дендритных клетках. Таким образом, с 2004 года, когда GPR91 был идентифицирован как рецептор сукцината [11], его присутствие обнаружено во многих типах клеток, что обуславливает широкий спектр его функций в организме. Дополнительные сведения о роли системы сукцинат/GPR91 в некоторых из указанных выше клетках и тканях будут представлены далее.

GPR91-обусловленная передача сигнала (GPR91-сигналинг) в печени

Печень является мишенью для большого количества факторов роста и гормонов, которые взаимодействуют как с гепатоцитами, так и с другими клетками печени, например, со звездчатыми клетками (ЗКП). Многие из этих молекул [тромбоцитарный фактор роста (PDGF), трансформирующий фактор роста-бета (TGF- β) и др.] активируют ЗКП при повреждении печени. «Нетрадиционные» сигналы, такие как плотность клеточного матрикса, некоторые метаболиты и окислительный стресс, также способны активировать ЗКП. Correa и соавт. в исследовании 2007 г. предположили, что сукцинат может служить метаболическим сенсором печени, расширив понимание того, как повреждение печени может стимулировать продукцию сукцината и последующую активацию ЗКП [19]. В соответствии с данными Correa и соавт., ишемия-реперфузия печени грызунов *in vitro* приводила к накоплению сукцината во внеклеточной жидкости, и этот феномен играл важную роль в активации ЗКП (рис. 3).

Эти же исследователи показали, что в печени GPR91 экспрессированы, главным образом, в ЗКП, находящихся в состоянии покоя, а после активации ЗКП уровень экспрессии снижается. С другой стороны – Li и соавт. в 2015 г. нашли, что присутствие сукцината вызывает увеличение экспрессии GPR91 в ЗКП с последующим двукратным возрастанием степени их дифференцировки, т.е. к активации ЗКП [24].

Li и соавт. получили и другие данные, продемонстрировав специфические молекулярные эф-

факты сукцината при активации ЗКП. В исследовании, использовавшем как *in vitro*, так и *in vivo* модели, было показано, что культивирование ЗКП в среде, содержащей сукцинат или ингибиторы сукцинатдегидрогеназы (малонат, пальмитат или среда с низким содержанием метионина и холина), вызывает увеличение экспрессии не только GPR91, но и гладкомышечного актина (α -актин), TGF- β и коллагена 1 типа, т.е. маркеров фиброгенного ответа (см. рис. 3) [24]. С другой стороны – введение в эти клетки малых интерферирующих РНК (siRNA), нарушающих экспрессию GPR91, устраняло продукцию α -актина, вызванную сукцинатом, указывая на то, что профиброгенный ответ вызван именно стимуляцией GPR91. В исследованиях *in vivo* ЗКП, выделенные из печени мышей, страдавших гепатостеатозом вследствие диеты, бедной метионином и холином, имели повышенное содержание сукцината и уровень экспрессии GPR91 и α -актина. В совокупности полученные данные указывают на зависимость активации ЗКП и фиброгенеза от стимуляции GPR91 сукцинатом. Таким образом, GPR91 могут играть существенную роль в гомеостазе печени и являться возможной мишенью для терапии, направленной на модулирование печеночных функций. Например, блокирование GPR91 при трансплантации печени могло бы способствовать устранению нежелательных фиброгенных реакций.

GPR91-сигналинг в сетчатке

Помимо повреждения печени, неблагоприятные эффекты, обусловленные активацией сукцинатом GPR91, были обнаружены и в такой тонкой и высокоспециализированной структуре, как сетчатка глаза, имеющая обширную сосудистую сеть, которая обеспечивает ее метаболические потребности [25]. При определенных условиях дисбаланс между уровнем кровоснабжения и потребностью сетчатки в кислороде и питательных веществах приводит к неблагоприятным последствиям в виде развития преретинальной и интравитреальной неоваскуляризации. Поскольку кровоснабжение напрямую сопряжено с метаболическими потребностями ткани, а сукцинат накапливается при ишемии [26, 27], была исследована роль сукцината в развитии гипоксической неоваскуляризации сетчатки. Выявлено, что в ишемизированной сетчатке крыс повышается уровень сукцината в сочетании с увеличенной экспрессией GPR91, в том числе, в ганглионарных нейронах (в которых, главным образом, и локализованы GPR91 сетчатки) [20]. Вдобавок сукцинат-индуцированные васкуляризация сетчатки и увеличение плотности

сосудов в значительной степени подавляются при помощи siRNA к GPR91. В данной работе Sapieha и соавт. показали, что роль сукцината заключается в аутокринной стимуляции ганглиозных клеток сетчатки посредством связывания с GPR91 [20]. В ответ на повышение концентрации сукцината эти клетки продуцируют целый ряд ангиогенных факторов, в том числе, сосудистый эндотелиальный фактор роста (VEGF) вследствие специфической активации GPR91. Необходимо особо отметить, что в развитии этого эффекта не участвует индуцируемый гипоксией фактор 1 α (HIF-1 α) (рис. 4).

Также сукцинат не оказывает описанного действия у крыс, имеющих малое количество ганглионарных нейронов, что подтверждает важность этих клеток для развития сукцинат- GPR91-зависимой неоваскуляризации сетчатки. В противоположность сукцинату семафорин 3A (представитель класса секретируемых и мембранных белков, которые являются молекулами-проводниками для аксонального конуса роста), вероятно, подавляет неоваскуляризацию [28]. Joyal и соавт. предположили, что эта молекула способствует деструкции капилляров и последующему формированию химического барьера, препятствующего проникновению новообразующихся сосудов в стекловидное тело [28].

В дополнение к вышеуказанным эффектам сукцината, Hu и соавт. показали, что в культуре клеток сетчатки RGC-5, инкубируемой в среде, содержащей сукцинат или большое количество глюкозы, GPR91 регулирует также продукцию VEGF [29]. Данный эффект, возможно, реализуется посредством ERK1/2- и JNK- (с-Jun-NH₂-терминальная киназа) зависимых сигнальных путей. Недавняя работа той же группы авторов подкрепила полученные данные. Используя клеточную линию RGC-5, Hu и соавт. показали, что GPR91 регулирует секрецию VEGF и пролиферацию клеток эндотелия, активируя сигнальные пути ERK1/2 и JNK с последующей апрегуляцией экспрессии циклооксигеназы-2 (COX-2) и простагландина E2 (PGE2). Поскольку ген COX-2 кодирует содержащийся в цитозоле белок, продукция которого увеличивается при воспалении и который может способствовать возникновению локальной ишемии и гипоксии, повышенный уровень экспрессии COX-2 позволяет предположить, что воспаление играет важную роль в возникновении и развитии диабетической ретинопатии [30].

Таким образом, имеются убедительные доказательства того, что система сукцинат/ GPR91 является важным сигнальным путем активации неан-

гиогенеза в сетчатке в условиях гипоксии, и модулирование высвобождения VEGF при этом процессе может являться возможной целью терапии.

GPR91-сигналинг и метаболизм

Эффекты GPR91-сигналинга на метаболизм впервые описал Sadarogan в 2007 г. На модели грызунов, страдающих диабетом, ожирением и гипертензией, было показано, что уровень циркулирующего сукцината у этих животных повышен по сравнению с контролем [31], однако причины такого повышения остались непонятными. У человека в противоположность грызунам ни гипертензия, ни диабет не ассоциируются с повышением концентрации сукцината в крови [31]. Причины такого расхождения до сих пор не ясны; имеются данные, что у пациентов, которым была выполнена трансплантация печени, было выявлено повышение уровня сукцината в крови через 2 ч после пересадки, которое сохранялось и через 6 ч после операции [15].

Недавно McCreath и соавт. показали, что GPR91 в значительном количестве экспрессируются в белой жировой ткани мышей и регулируют массу жировой ткани и гомеостаз глюкозы [32]. После создания клона мышей, нокаутных по гену GPR91, было обнаружено, что отсутствие сукцинатного рецептора оказывает двоякое действие на метаболизм и общую массу тела, причем при отсутствии различий между массой отдельных органов имела заметная разница в общем количестве жировой ткани [32]. В условиях обычной диеты *Sucnr-/-* мыши имели меньшее количество белого жира, меньшие размеры адипоцитов, увеличенное расходование энергии и лучшую переносимость нагрузок глюкозой. Хотя можно было бы предположить, что сниженная экспрессия GPR91 приведет к уменьшению экспрессии генов, ответственных за дифференцировку адипоцитов, устранение GPR91 не нарушило адипогенез, но имело результатом снижение накопления жира и уменьшение размеров адипоцитов. Метаболические изменения, вызванные отсутствием GPR91, были оценены путем определения скорости потребления кислорода (VO_2 тест). Как и ожидалось, скорость потребления кислорода была выше у *Sucnr-/-* мышей по сравнению с контролем. Напротив, диета с высоким содержанием жира у нокаутных по гену GPR91 мышей приводила к увеличенному накоплению жира, гипергликемии, уменьшенной секреции инсулина и более выраженному повреждению гепатоцитов по сравнению с обычными (*wild-type*) животными. Таким образом, имеющиеся данные позволяют рассма-

тривать GPR91 как сенсор пищевой энергии и, соответственно, как возможную мишень лечения ожирения, гипертензии и диабета.

GPR91-сигналинг в сердце

Сукцинат может оказывать как негативное, так и положительное влияние на состояние сердечно-сосудистой системы, в частности, на артериальное давление и толщину миокарда. В 2010 г. Aguiar и соавт. показали, что GPR91 экспрессируются в саркомере и Т-трубочках кардиомиоцитов желудочков [33]. Поскольку эти рецепторы были обнаружены в миоцитах сердца, а миокардиальная функция является важным детерминантом артериального давления и других аспектов сердечно-сосудистого гомеостаза, возникла необходимость изучения последствий стимуляции сукцинатом GPR91 сердца. Aguiar и соавт. установили, что прямая активация сукцинатом GPR91 кардиомиоцитов влияет на трансмембранный транспорт Ca^{++} . Было показано, что белки мембраны кардиомиоцитов, участвующие в процессе высвобождения Ca^{++} из клетки, такие как фосфоламбан и рианодин, активируются в результате взаимодействия сукцината и GPR91. Триггером этого эффекта является аденилатциклаза и последующая активация протеинкиназы А, и в конечном итоге это приводит к апоптозу кардиомиоцитов [33], который можно предотвратить ингибированием протеинкиназы А. В совокупности эти данные свидетельствуют о том, что сукцинат в высоких концентрациях может приводить к гибели кардиомиоцитов. Таким образом, повышение уровня циркулирующего сукцината, например, в условиях ишемии может являться значимой причиной гибели сердечных клеток.

В дальнейшем было показано, что продолжительное воздействие сукцината вызывает гипертрофию кардиомиоцитов [15]. Поскольку активация GPR91 в почках приводит к повышению артериального давления вследствие стимуляции ренин-ангиотензиновой системы (РАС) [11], возникает вопрос: является ли гипертрофия миокарда, вызванная увеличением концентрации сукцината в кровотоке, следствием повышения среднего артериального давления (САД), или она обусловлена прямым влиянием сукцината на GPR91 миокарда. Было обнаружено, что САД на фоне применения сукцината остается на исходном уровне в течение 2 дней, умеренно повышается к 4-му дню и возвращается к нормальным значениям к окончанию исследования. Это свидетельствует о том, что вызванная сукцинатом гипертрофия миокарда обусловлена не только повышением САД, но существуют и другие механизмы [15]. Подтвержде-

нием этого служат результаты экспериментов на грызунах, показавшие, что антагонист АТ-1 рецепторов ангиотензина II лозартан устраняет вызванное сукцинатом повышение САД, но не влияет на наиболее показательный эхокардиографический признак гипертрофии миокарда – толщину задней стенки левого желудочка. Эти данные согласуются с результатами предыдущих исследований, согласно которым сукцинат вызывает активацию PAC, но увеличение САД – не единственная причина сукцинат-индуцированной гипертрофии миокарда. Для изучения связи гипертрофии сердечной мышцы и активации GPR91 сукцинатом были проведены ряд экспериментов на нокаутных по GPR91 мышцах. Оказалось, что увеличение толщины задней стенки левого желудочка происходит только в контрольной группе, но не у GPR91-КО мышцей. Полученные данные свидетельствуют о том, что GPR91 являются главной причиной вызванной сукцинатом гипертрофии сердца. В совокупности имеющиеся результаты позволяют утверждать, что длительное повышение уровня циркулирующего сукцината может вызывать гипертрофию миокарда посредством активации GPR91. При этом тот факт, что лозартан устраняет ряд эффектов сукцината, способствующих развитию гипертрофии (кроме увеличения толщины задней стенки левого желудочка), свидетельствует также и о том, что ремоделирование миокарда, обусловленное сукцинатом, вызвано не только прямым действием на GPR91 кардиомиоцитов, но и влиянием сукцината на другие органы.

В экспериментах с использованием клеточной культуры неонатальных кардиомиоцитов были установлены внутриклеточные механизмы, благодаря которым активация GPR91 вызывает гипертрофию миокарда [15]. Было показано, что после связывания с GPR91 сукцинат активирует кальмодулин-зависимую киназу IIδ (CaMKIIδ) и ERK1/2, что в итоге завершается транскрипцией генов, ответственных за гипертрофию [15] (рис. 5). Система сукцинат/ GPR91 активирует фосфолипазу C, которая генерирует инозитола 3,4,5-трифосфат и запускает процесс высвобождения кальция из эндоплазматического ретикулума. Повышение уровня Ca⁺⁺ в цитоплазме активирует CaMKIIδ, фосфорилирующую гистоновую деацетилазу 5, которая выходит за пределы ядра клетки, что способствует транскрипции ответственных за гипертрофию генов (см. рис. 5). Наконец, GPR91 стимулирует митоген-активируемую протеинкиназу (MAPK), которая фосфорилирует ERK1/2. Фосфорилированная ERK1/2 (pERK1/2) транслоцируется в ядро

кардиомиоцита, где также запускает сигнальный каскад, индуцирующий гипертрофию сердца. Вполне вероятно, имеются и другие, неизвестные еще механизмы, вовлеченные в процесс гипертрофии миокарда, обусловленный сукцинатом/GPR91.

В дополнение к данным, полученным на экспериментальных животных, было показано, что у пациентов, перенесших ишемический эпизод трансплантированного органа, имеется повышение уровня циркулирующего сукцината, и эти пациенты имеют повышенный уровень маркеров гипертрофии в крови [15]. Клиническое значение этих данных нуждается в дополнительной оценке, но, по предварительному впечатлению, сукцинат может быть использован как предиктивный маркер гипертрофии, а также может служить потенциальной мишенью терапии, направленной на устранение постишемической гипертрофии миокарда, часто наблюдаемой после трансплантации.

Начатый в этой связи систематический поиск активных химических соединений по принципу структура-свойство позволил выявить вещество, способное блокировать функции GPR91 у человека и крыс [13]. Соединение, известное как «4с», показало наилучший антагонистический эффект *in vitro* (концентрация полумаксимального ингибирования (IC₅₀) равнялась 7nM), а также почти на 80% уменьшало вызванное сукцинатом повышение САД у крыс. Другие соединения похожей структуры, обозначенные как «5g» и «7e», сохраняли свою активность при пероральном применении, что представляет перспективы для их последующего фармакологического использования. Следует отметить, что структура ни одного из этих соединений не имеет сходства с сукцинатом, и механизм связывания их с рецептором на сегодняшний день не вполне понятен [12].

GPR91-сигналинг в почках и его влияние на артериальное давление

Помимо прямого влияния на сердце, приводящего к развитию гипертрофии миокарда, сукцинат является мощным модулятором высвобождения ренина. По данным He и соавт. (2004 г.), у мышцей, получавших сукцинат, регистрировалось повышение артериального давления, однако механизм этого оставался неясным [11]. Работа Vargas и соавт. 2009 года прояснила причину этого явления. Накопление сукцината в канальцах нефрона активирует клетки плотного пятна и юкстагломерулярного аппарата, способствуя высвобождению ренина, который, вызывая констрикцию периферических артерий, повышает артериальное давление (АД) [17]. В этом случае сукцинат взаимодействует с GPR91,

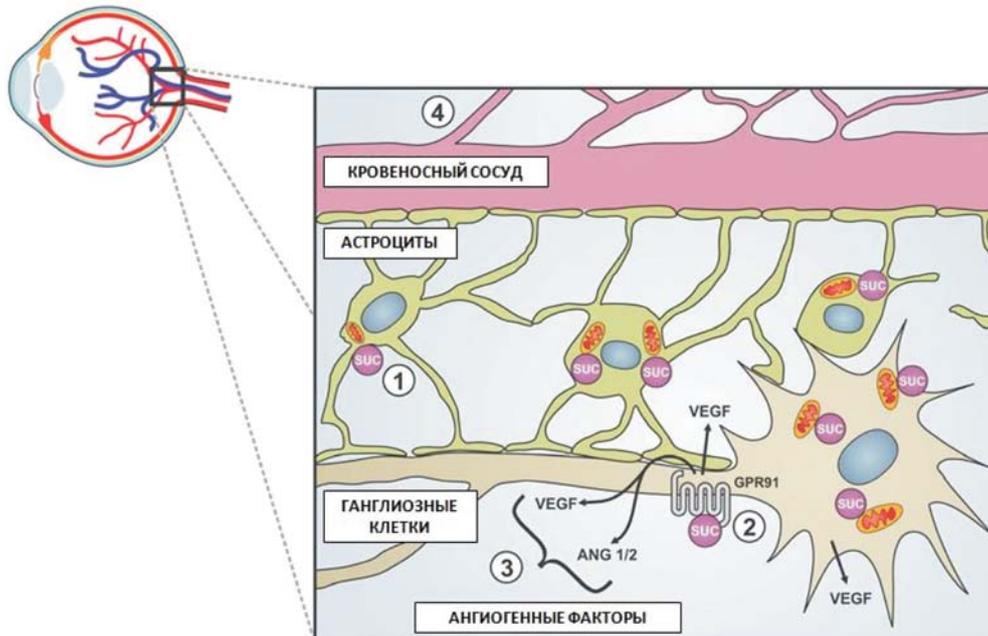


Рис. 4. Активация GPR91 вызывает неоваскуляризацию сетчатки при ишемической пролиферативной ретинопатии. При гипоксии сукцинат накапливается (1) и связывается с GPR91 ганглиозных клеток сетчатки (2), что приводит к повышению продукции ангиогенных факторов (3), стимулирующих развитие новых сосудов (4) для восстановления кровоснабжения в ишемизированной сетчатке. VEGF – сосудистый эндотелиальный фактор роста, ANG 1/2 – ангиогенин 1/2.

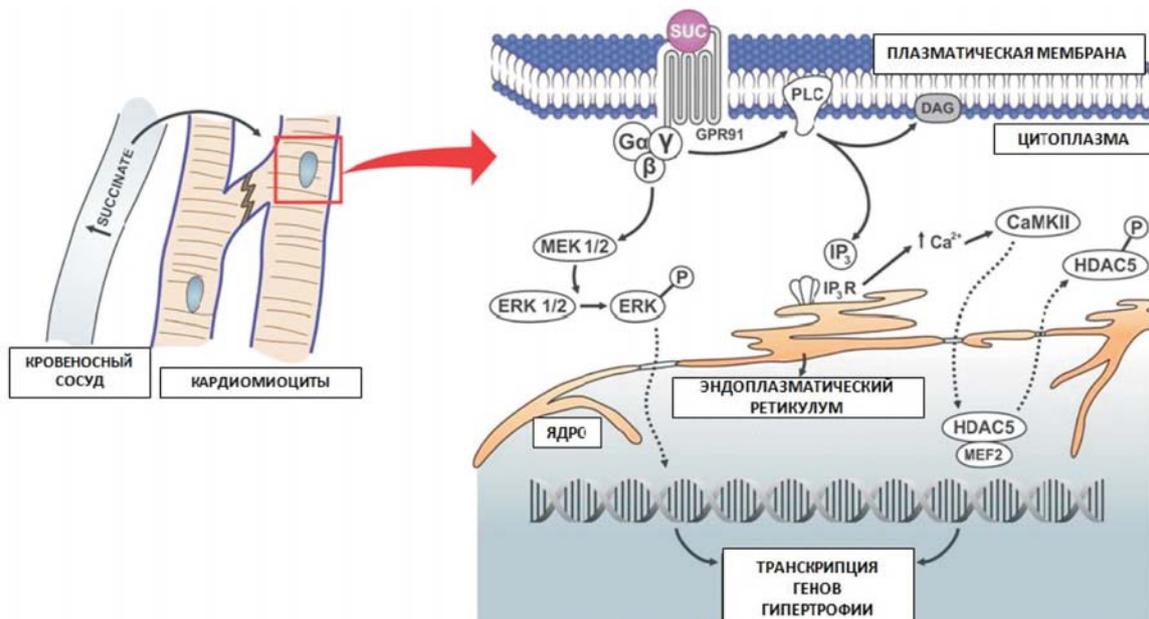


Рис. 5. Активация сукцинатом GPR91 вызывает гипертрофию кардиомиоцитов. При увеличении концентрации сукцината в крови происходит его взаимодействие с GPR91 кардиомиоцитов, что приводит к активации по крайней мере двух внутриклеточных сигнальных путей. Во-первых, GPR91 стимулирует MEK1/2 (киназу митогенактивируемой протеинкиназы 1/2), которая фосфорилирует ERK1/2 (внеклеточную сигнал-регулируемую киназу 1/2). Фосфорилированная ERK1/2 транслоцируется в ядро, где стимулирует транскрипцию генов, ответственных за гипертрофию. Во-вторых, GPR91 активирует фосфолипазу C (PLC), что ведет к образованию инозитол-3-фосфата (IP_3) и диацилглицерола (DAG). IP_3 связывается со своим рецептором (IP_3R), что приводит к высвобождению Ca^{2+} из эндоплазматического ретикулума в цитоплазму. Ca^{2+} активирует кальмодулин-зависимую киназу IIδ (CaMKIIδ), фосфорилирующую гистоновую деацетилазу 5 (HDAC5), которая высвобождает транскрипционный фактор миоцитов 2 (MEF2), что способствует транскрипции генов гипертрофии.

находящимися на апикальной поверхности клеток плотного пятна, что приводит к активации киназ p38 и pERK1/2, которые, в свою очередь, увеличивают активность COX-2 и приводят к секреции PGE2. PGE2, в свою очередь, через простагланди-

новый рецептор EP2/4 и cAMP активирует ренин-ангиотензиновую систему, стимулируя продукцию и секрецию ренина клетками ЮГА. Повышение давления также происходит за счет реакции клеток почечного эндотелия, в первую очередь располо-

женных в афферентной артериоле и сосудистом клубочке, где сукцинат воздействует через обширно экспрессированный GPR91, увеличивая трансмембранный транспорт Ca^{2+} и высвобождение PGE₂, PGI₂ (простаглицлин 2) и NO (оксида азота), что в дальнейшем также приводит к высвобождению ренина в клетках ЮГА [19]. Недавнее исследование показало, что микроперфузия клубочка сукцинатсодержащим буферным раствором вызывает выброс ренина из ЮГА и дилатацию афферентной артериолы клубочка, подтверждая тем самым, что сукцинат играет важную роль в развитии клубочковой гиперfiltrации и активации PAC.

Эти данные свидетельствуют о том, что сукцинат не только играет важную роль в регуляции АД при ишемических событиях, но может также стать терапевтической целью новых методов лечения гипертензии. Например, пациенты с ишемическим повреждением трансплантата могут получать антагонисты GPR91, чтобы предотвратить возможное повышение АД после восстановления перфузии. Такой подход к лечению в сочетании с известными мерами профилактики послеоперационной гипертензии может снизить риск сердечно-сосудистых осложнений, ассоциированных с длительным повышением АД, таких как артериосклероз и аневризмы.

Перспективы, связанные с системой сукцинат/GPR91

Имеются данные, указывающие на то, что сукцинат является «тревожным сигналом», который позволяет GPR91 ощутить иммунологическую опасность и усиливает реакцию отторжения трансплантата [21]. Как было указано выше, в крови пациентов после пересадки печени уровень сукцината возрастает [15]. Недостаточность митохондриальной системы сукцинат-цитохром С-редуктаза – генетически обусловленное состояние, ведущее к повышению уровня сукцината в крови, требует особого внимания при проведении трансплантации органов, поскольку донор может передать данное врожденное генетическое нарушение реципиенту [34]. Это имеет принципиальное значение в случаях, когда донор является кровным родственником, что увеличивает риск аутомомно-рецессивных заболеваний, таких как вышеупомянутое. Имеется свидетельство возникновения полиорганной недостаточности после пересадки печени и кишечника от донора с недостаточностью сукцинат-цитохром С-оксидазы в педиатрической практике. Также описана застойная сердечная недостаточность у больного с недостаточностью сукцинатдегидрогеназы, еще одним состоянием, приводящим к повышению

внеклеточной концентрации сукцината [35]. Следовательно, применение антагонистов GPR91 в составе консервирующих растворов при трансплантации органов может быть полезным для предотвращения реакций отторжения и других осложнений.

Таким образом, сукцинат может служить клиническим маркером ишемии, и повышение его уровня в крови при трансплантации органов должно быть исключено.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

После открытия около 10 лет назад GPR91 – сукцинатного рецептора, сопряженного с G-белком – изучение сигнальных путей сукцинат/GPR91 расширило понимание о функционировании систем организма. Необходимо помнить, что в соответствии с современными представлениями сукцинат – не только промежуточный продукт метаболизма. Как показано в данном обзоре, циркулирующий сукцинат посредством активации GPR91 вовлечен в регуляцию целого ряда физиопатологических процессов. Таким образом, сукцинат можно рассматривать как сигнальную молекулу с гормоноподобной функцией. Поскольку уровень сукцината повышается главным образом в условиях ишемии-реперфузии, стали очевидными перспективы применения полученных знаний при трансплантации органов. Понимание роли метаболитов цикла Кребса как сигнальных молекул, участвующих в целом ряде метаболических процессов, способствует расширению представлений о функционировании клетки и, в конечном счете, повышению качества лечения.

Авторы выражают признательность за техническую помощь и внимательное чтение рукописи Gilson Nogueira u Dr. M. J. Amaya (Йельский университет, США)

БИБЛИОГРАФИЧЕСКИЙ СПИСОК

1. Thunberg T. Zur Kenntnis des intermediären Stoffwechsels und der dabei wirksamen. *Enzyme Skandinavisches Archiv für Physiologie* 1920;40:1–91. doi: 10.1111/j.1748-1716.1920.tb01412.x
2. Annan G, Banga I, Blazsó A et al. Über die Bedeutung der Fumarsäure für die tierische Gewebeatmung. *Einleitung, übersicht, Methoden Hoppe-Seyler's Zeitschrift für Physiologische Chemie* 1935;236:1–20
3. Krebs HA, Johnson WA. The role of citric acid in intermediary metabolism in animal tissues. *Enzymologia* 1937;4:148–156
4. Krebs HA. The history of the tricarboxylic acid cycle. *Perspect Biol Med.* 1970;14:154–170
5. Fedotcheva NI, Sokolov AP, Kondrashova MN. Nonenzymatic formation of succinate in mitochondria under oxidative stress. *Free Radic Biol Med* 2006;41:56–64. doi: 10.1016/j.freeradbiomed.2006.02.012
6. Brosnan JT, Krebs HA, Williamson DH. Effects of Ischaemia on Metabolite Concentrations in Rat Liver. *Biochem J* 1970;117:91–96. doi: 10.1042/bj1170091

7. Taegtmeyer H. Metabolic responses to cardiac hypoxia. Increased production of succinate by rabbit papillary muscles. *Circ Res* 1978;43:808–815
8. Chouchani ET, Pell VR, Gaude E et al. Ischaemic accumulation of succinate controls reperfusion injury through mitochondrial ROS. *Nature* 2014;515(7527):431–435. doi: 10.1038/nature13909
9. Knauf F, Rogina B, Jiang Z et al. Functional characterization and immunolocalization of the transporter encoded by the life-extending gene *Indy*. *Proc Natl Acad Sci U S A* 2002;99:14315–14319. doi: 10.1073/pnas.222531899
10. Inoue K, Fei YJ, Zhuang L et al. Functional features and genomic organization of mouse NaCT, a sodium-coupled transporter for tricarboxylic acid cycle intermediates. *Biochem J* 2004;378:949–957. doi: 10.1042/BJ20031261
11. He W, Miao FJ, Lin DC et al. Citric acid cycle intermediates as ligands for orphan G-protein-coupled receptors. *Nature* 2004;429(6988):188–193. doi: 10.1038/nature02488
12. Ariza AC, Deen PM, Robben JH. The succinate receptor as a novel therapeutic target for oxidative and metabolic stress-related conditions. *Front Endocrinol* 2012;00022:1664–2392
13. Bhuniya D, Umrani D, Dave B et al. Discovery of a potent and selective small molecule hGPR91 antagonist. *Bioorg Med Chem Lett* 2011;21(12):3596–3602. doi: 10.1016/j.bmcl.2011.04.091
14. Hakak Y, Lehmann-Bruinsma K, Phillips S et al. The role of the GPR91 ligand succinate in hematopoiesis. *J Leukoc Biol* 2009;85:837–843. doi: 10.1189/jlb.1008618
15. Aguiar CJ, Rocha-Franco JA, Sousa PA et al. Succinate causes pathological cardiomyocyte hypertrophy through GPR91 activation. *Cell Commun Signal* 2014;12(1):78. doi: 10.1186/s12964-014-0078-2
16. Toma I, Kang JJ, Sipos A et al. Succinate receptor GPR91 provides a direct link between high glucose levels and renin release in murine and rabbit kidney. *J Clin Invest* 2008;118:2526–2534. doi: 10.1172/JCI33293
17. Vargas SL, Toma I, Kang JJ et al. Activation of the succinate receptor GPR91 in macula densa cells causes renin release. *J Am Soc Nephrol* 2009;20(5):1002–11. doi: 10.1681/ASN.2008070740
18. Robben JH, Fenton RA, Vargas SL et al. Localization of the succinate receptor in the distal nephron and its signaling in polarized MDCK cells. *Kidney Int* 2009;76(12):1258–1267. doi: 10.1038/ki.2009.360
19. Correa PRAV, Krulog EA, Thompsom M et al. Succinate is a paracrine signal for liver damage. *J Hepatology* 2007;47:262–269. doi: 10.1016/j.jhep.2007.03.016
20. Sapieha P, Sirinyan M, Hamel D et al. The succinate receptor GPR91 in neurons has a major role in retinal angiogenesis. *Nat Med* 2008;14(10):1067–1076. doi: 10.1038/nm.1873
21. Rubic T, Lametschwandtner G, Jost S et al. Triggering the succinate receptor GPR91 on dendritic cells enhances immunity. *Nat Immunol* 2008;9:1261–1269. doi: 10.1038/ni.1657
22. Macaulay IC, Tijssen MR, Thijssen-Timmer DC et al. Comparative gene expression profiling of in vitro differentiated megakaryocytes and erythroblasts identifies novel activatory and inhibitory platelet membrane proteins. *Blood* 2007;109:3260–3269. doi: 10.1182/blood-2006-07-036269
23. Friedman SL. Molecular regulation of hepatic fibrosis, an integrated cellular response to tissue injury. *J Biol Chem* 2000;275(4):2247–2250
24. Li YH, Woo SH, Choi DH, Cho EH. Succinate causes a-SMA production through GPR91 activation in hepatic stellate cells. *Biochem Biophys Res Commun* 2015;463:853–858. doi: 10.1016/j.bbrc.2015.06.023
25. Adair TH, Gay WJ, Montani JP. Growth regulation of the vascular system: evidence for a metabolic hypothesis. *Am J Physiol* 1990;259:393–404
26. Folbergrova J, Ljunggren B, Norberg K, Siesjo BK. Influence of complete ischemia on glycolytic metabolites, citric acid cycle intermediates, and associated amino acids in the rat cerebral cortex. *Brain Res* 1974;80:265–279
27. Hoyer S, Krier C. Ischemia and aging brain. Studies on glucose and energy metabolism in rat cerebral cortex. *Neurobiol Aging* 1986;7:23–29
28. Joyal JS, Sitaras N, Binet F et al. Ischemic neurons prevent vascular regeneration of neural tissue by secreting semaphorin 3A. *Blood* 2011;117:6024–6035. doi: 10.1182/blood-2010-10-311589
29. Hu J, Wu Q, Li T et al. Inhibition of high glucose-induced VEGF release in retinal ganglion cells by RNA interference targeting G protein-coupled receptor 91. *Exp Eye Res* 2013;109:31–39. doi: 10.1016/j.exer.2013.01.011
30. Hu J, Li T, Du S et al. The MAPK signaling pathway mediates the GPR91-dependent release of VEGF from RGC-5 cells. *Int J Mol Med* 2015;36(1):130–138. doi: 10.3892/ijmm.2015.2195
31. Sadagopan N, Li W, Roberds SL et al. Circulating succinate is elevated in rodent models of hypertension and metabolic disease. *Am J Hypertens* 2007;20(11):1209–1215. doi: 10.1016/j.amjhyper.2007.05.010
32. McCreath KJ, Espada S, Gálvez BG et al. Targeted disruption of the SUCNR1 metabolic receptor leads to dichotomous effects on obesity. *Diabetes* 2015;64(4):1154–1167. doi: 10.2337/db14-0346
33. Aguiar CJ, Andrade VL, Gomes ER et al. Succinate modulates Ca²⁺ transient and cardiomyocyte viability through PKA-dependent pathway. *Cell Calcium* 2010;47(1):37–46. doi: 10.1016/j.ceca.2009.11.003
34. Zucker AR, Gondolesi GE, Abbott MA et al. Liver-intestine transplant from a pediatric donor with unrecognized mitochondrial succinate cytochrome C reductase deficiency. *Transplantation* 2005;79(3):356–358
35. Davili Z, Johar S, Hughes C et al. Succinate dehydrogenase deficiency associated with dilated cardiomyopathy and ventricular noncompaction. *Eur J Pediatr* 2007;166:867–870. doi: 10.1007/s00431-006-0310-1

Статья переведена на русский язык и опубликована согласно условиям лицензии «Creative Commons». Журнал FEBS J. 2016 Sep;283(18):3303–24. doi: 10.1111/febs.13704.

Перевод: А.В. Карунная
Редакция перевода: Р.В. Голубев

Сведения об авторах:

M. de C. Fonseca Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG, CEP: 31270-901, Brazil. hp.matheus@gmail.com

C.J. Aguiar Centro Universitário Estácio de S6, Belo Horizonte, MG, Brazil. carlajeane33@hotmail.com

J.A. da Rocha Franco Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG, CEP: 31270-901, Brazil. joaoantoniodarochafranco@hotmail.com

R.N. Gingold Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG, CEP: 31270-901, Brazil. r.n.gingold@gmail.com

M.F. Leite Department of Physiology and Biophysics, Federal University of Minas Gerais, Av. Antonio Carlos 6627, Belo Horizonte, MG, CEP: 31270-901, Brazil. leitemd@ufmg.br

Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Поступила в редакцию: 01.06.2016 г.
Принята в печать: 05.12.2016 г.