

# Функціональна активність ядерного протеїну амфотерину та його роль у розвитку ендотоксемії

О.А. Кондрацька, Н.Г. Грушка, В.В. Мешко, С.І. Павлович, Р.І. Янчій

Інститут фізіології ім. О.О. Богомольця НАН України, Київ; e-mail: elena-shepel@ukr.net

*В огляді представлені узагальнюючі сучасні наукові дані стосовно основних функцій білка HMGB1, його фізіологічної та патологічної ролі. Амфотерин бере участь у ключових процесах, які забезпечують функціонування ДНК в ядрі клітини та має важливий вплив за його межами. HMGB1 задіяний в багатьох запальних захворюваннях людини, таких як сепсис, ішемічно-реперфузне пошкодження, неврологічні стани, серцево-судинні, аутоімунні захворювання тощо. В цьому огляді описано структуру і основні функції HMGB1, обговорено значення останнього як молекули молекулярного патерна, пов'язаного з пошкодженням, проаналізовано участь у запальному процесі та загибелі клітин. Особливу увагу зосереджено на ролі HMGB1 в розвитку ендотоксемії, а також даних про сигнальні шляхи, що залучені в її патогенез. Також представлено відомості про можливість модуляції активності цього білка за допомогою інгібіторів, оскільки розуміння цього може бути корисним для розробки нових терапевтичних стратегій, спрямованих на лікування запальних станів різного генезу. Ключові слова: амфотерин; ендотоксемія; терапевтичні стратегії; запальні стани.*

## ВСТУП

Шляхи, механізми та наслідки клітинної загибелі викликають велику зацікавленість як імунофізіологів, так і імунопатологів. Важливість цієї проблеми зумовлена тим, що запалення та імунну відповідь індукують не тільки антигени та молекулярні патерни мікроорганізмів, а й продукти загибелі власних клітин (молекулярні патерни, які асоційовані із ушкодженням – damage-associated molecular patterns – DAMPs) [1, 2]. Внутрішньоклітинні молекули DAMPs (амфотерин – HMGB1, білки теплового шоку, АТФ, сечова кислота, інтерлейкін-1 $\alpha$ , калгрануліни, позаклітинні ДНК й РНК та інші), що вивільняються назовні, зокрема, внаслідок клітинної загибелі, провокують запалення та імунну реакцію, тобто діють як сигнали небезпеки, через що і названі алармінами [1–3].

Нині відкрито 13 алармінів. Це ендогенні речовини, які дуже швидко вивільняються або продукуються у відповідь на мікробну інфекцію або пошкодження тканин, і

діють як потужні ефектори вродженого захисту. Алармінам властива антимікробна, хроматинзв'язувальна та ферментативна дія. Одним із найважливіших з них є цитокіновий білок HMGB1 (high-mobility group box 1). Він є у всіх типах клітин, має широкий спектр фізіологічної та патофізіологічної активності, бере участь у регуляції вродженого та адаптивного імунітету як за нормальних умов, так і під час патологічних процесів різного генезу [3]. HMGB1 робить свій внесок у патогенез багатьох хронічних запальних та аутоімунних захворювань, включаючи сепсис, ревматоїдний артрит, системний червоний вовчак, хронічне запалення нирок, атеросклероз тощо [4–7]. Його розглядають як одну із перспективних терапевтичних мішеней, оскільки являє собою ядерну сигнальну молекулу тривоги, що зумовлює прозапальні ефекти некротичної клітинної загибелі. Незважаючи на те, що кількість досліджень, присвячених вивченню HMGB1 щороку збільшується, залишається ще багато невирішених питань,

пов'язаних з механізмами його впливу на розвиток різних захворювань та стратегії їх лікування, участі в загибелі клітин при запальних станах та ефектів від його інгібування.

### Загальні уявлення та структура HMGB1

Амфотерин відноситься до великої групи білків HMG, яка включає 3 надродини – HMGB, HMGN і HMGA. Вони були відкриті у 1973 р. Ернестом Джонсом і його колегами Гремом Гудвіном і Клайвом Сандерсом й отримали назву через свою високу електрофоретичну рухливість на поліакриламідних гелях – білки «групи високої мобільності» [4]. Вперше їх виділили з хроматину тимуса теляти. У процесі еволюції ці білки, на відміну від гістонів, лишаються висококонсервативними, майже не змінюються та слабо зв'язуються з хроматином [3]. У 1999 р. в експериментах з макрофагами, яких піддавали впливу ліпополісахариду (ЛПС), вперше було показано, що ця молекула може виділятися у великих кількостях у позаклітинний простір [8].

HMGB є низькомолекулярними ядерними негістоновими білками, які містять 215 амінокислот і мають молекулярну масу 29 кДа [4, 8]. Вони складаються з двох N-кінцевих гомологічних ДНК-зв'язуючих доменів, а саме А- та В-боксу, та третього домену – С-кінцевої ділянки з негативним зарядом, яка насичена аспарагіною та глутаміною кислотами [2, 7]. Отже, амінокислоти N-С-кінцевих ділянок мають, відповідно, основну та кислу природу і можуть виконувати свої різноманітні функції під час взаємодії з різними факторами. Зв'язування цього білка з ДНК здатне індукувати її конформаційні та структурні зміни [4]. Вважають, що А-бокс HMGB1 несе протизапальний, а В-бокс – прозапальний потенціал. С-кінцевий фрагмент аларміну служить для взаємодії з ДНК, внаслідок утворення внутрішньомолекулярних зв'язків з А- і В-боксом або міжмолекулярної взаємодії з гістонами (наприклад, H1 і H3). Протизапальна активність HMGB1 А-боксу посилюється при злитті із С-кінцевим кислим

фрагментом. Залишки у С-кінцевій ділянці сприяють антибактеріальній активності рекомбінантного HMGB1 [8].

Група HMGB має низку особливостей, зокрема екстрагуються з хроматину за допомогою 0,35 М NaCl, розчиняються у 5%-й хлорній кислоті або трихлороцтовій кислоті, молекулярна маса до 30 кДа з високим вмістом заряджених амінокислот, швидко рухаються в поліакриламідних гелях, чутливі до посттрансляційних модифікацій (фосфорилування, ацетилювання та полі-АДФ-рибозилування), їх експресія, залежна від тканин і розвитку [9]. Амфотерин є універсальним сигналізатором. Це пов'язано з тим, що він може взаємодіяти з великою кількістю ядерних чи позаклітинних молекул, зокрема утворювати комплекси з деякими молекулами, наприклад, ЛПС, інтерлейкін-1 $\beta$  (IL-1 $\beta$ ) і підсилювати їх дію [10].

Встановлено, що мРНК амфотерину є поліаденільованою, а сам білок демонструє 100%-ву гомологію між мишами та щурами та 99%-ву між гризунами та людиною. Цей білок є надзвичайно мобільним у межах клітини. Наприклад, переміщається з ядра до цитозолу за 1-2 с, зокрема, у відповідь на різні чинники, такі як цитокіни, хемокіни, тепло, гіпоксію, окиснювальний стрес та онкогени [9].

### Функції та роль HMGB1

За нормальних умов HMGB1 знаходиться в ядрі, де активно експресується і залучений у процесах, пов'язаних з функціонуванням ДНК, зокрема, реплікацією, відновленням, рекомбінацією, транскрипцією і стабільністю геному. Однак під час дії стресових факторів він переміщується із ядра в цитозоль, а потім потрапляє у позаклітинний простір, де функціонує як медіатор запалення [3, 11]. Перебуваючи в середині клітини HMGB1 виконує низку функцій, пов'язаних із координацією реакцій клітинного стресу, регуляцією аутофагії, захистом від апоптотичної загибелі клітин. Позаклітинний амфотерин виступає

як цитокін й хемокін, котрий керує запальною реакцією й імунною відповіддю. Цими властивостями пояснюється зацікавленість у його використанні як терапевтичної мішені для лікування багатьох захворювань, зокрема інфекційних, ішемії, імунних та метаболічних розладів, нейродегенеративних хвороб та раку. Було продемонстровано як *in vitro*, так і *in vivo*, що інгібування експресії, секреції, активності HMGB1 або його взаємодії із рецепторами являє собою ефективний підхід для модуляції прозапальної та онкопосилуючої активності білка і має протективну дію під час інфекційних захворювань, ішемії, імунної патології тощо [11].

Експресія амфотерину відбувається в різних тканинах, високі його концентрації виявлено в тимусі та селезінці. У мієлоїдних клітинах вона вища, ніж у лімфоїдних, корелює зі стадією диференціювання цих клітин. Експресія HMGB1 збільшується за умов онкогенезу, але знижується при старінні [9]. Циркуляційний вміст амфотерину підвищений при багатьох захворюваннях, пов'язаних із запаленням [12].

Амфотерин є життєвонеобхідним: миші, яким був здійснено нокаут гена, що кодує цей білок, помирали невдовзі після народження. Основною причиною смерті було зниження регуляції глюкокортикоїдного рецептора та нездатність використовувати глікоген, який зберігається в печінці. При введенні таким мишам додатково глюкози тривалість їх життя подовжувалась, але вони не доживали до статевої зрілості. Для передімплантаційного розвитку ембріона мишей необхідні як екзогенний, так і ендогенний HMGB1 [9]. Проте, якщо здійснити нокаут цього гена лише в конкретних органах, таких як підшлункова залоза, печінка, серце та мієлоїдних клітинах, то миші продовжують жити, хоча й стають більш чутливими до стерильного запалення [13]. Ці дані підтверджуються і в інших працях, в яких показано, що нокаут гена амфотерину в печінці, підшлунковій залозі й макрофагах призводив до більшої чутливості тварин до

панкреатиту, ішемічного/реперфузійного пошкодження печінки й сепсису [9].

Амфотерин існує в кількох ізоформах, що впливає на його функціональну активність. Здатність HMGB1 активувати чи пригнічувати імунну відповідь залежить від окисно-відновного статусу залишків цистеїну у поліпептидному ланцюзі білка [4, 7, 14]. Існують три окисно-відновні форми HMGB1. Внутрішньоклітинний повністю відновлений HMGB1 (тіоловий) може сприяти міграції імунних клітин [8], тобто має хемотаксичну активність і провокує розвиток запалення [3]. Частково відновлений HMGB1 (дисульфідний) також викликає запальні реакції [8], зокрема індукує транслокацію ядерного фактора NF-κB і секрецію медіаторів запалення (у тому числі цитокінів) через toll-подібний рецептор 4 (TLR4) в активованих імунних клітинах [3]. Повністю окиснений HMGB1 (сульфонільний) є інертним, не має хемокінової або цитокінової (прозапальної) активності. Таким чином, різні модифікації опосередковують його транслокацію з ядра в цитоплазму, а потім – у позаклітинний простір [8].

Зазвичай у позаклітинному середовищі амфотерин знаходиться у вигляді суміші кількох ізоформ, саме у цьому полягає й складність у підборі відповідних антогоністів до HMGB1, що, наприклад, може знадобитися для терапевтичного ефекту при певних захворюваннях. Інша складність вивчення й застосування полягає у тому, що амфотерин дуже добре вступає з іншими молекулами у комплекси. І навіть якщо в експерименті *in vitro* або *in vivo* використовувати чистий білок, то є ймовірність, що він асоціюється з якоюсь з молекул [10].

### Рецептори до HMGB1

У позаклітинному середовищі HMGB1 проявляє свою біологічну активність у запуску запального каскаду внаслідок зв'язування з різними рецепторами, включаючи рецептор кінцевих продуктів глікування (RAGE), TLRs,

IL-6. Крім того, він взаємодіє з інтегринами та протеогліканами, маркером диференціації В-клітин CD24, TIM-3, CXCR4 й TREM-1. Серед рецепторів, з якими зв'язується амфотерин, найбільш вивченими є RAGE та TLR 2, 4, 9 [9]. RAGE та TLR4 ідентифіковані як первинні рецептори для HMGB1 та є ключовими компонентами вродженої імунної системи [15]. Встановлено, що HMGB1 і рецептори RAGE, TLR2 і TLR4 беруть участь у механізмах розвитку багатьох захворювань, включаючи, сепсис, атеросклероз, інсульт, аутоімунні розлади, хвороба Альцгеймера, рак тощо [4, 7, 15, 16].

RAGE є трансмембранним багатолігандним рецептором. Він походить з родини молекул клітинної адгезії. Один з його доменів має важливе значення в трансдукції внутрішньоклітинних сигналів, наприклад NF-κB. RAGE є муьтилігандним, адже зв'язує не лише амфотерин, а ще й білок S100, амілоїдний β-пептид, ДНК, РНК. Він потрібен для HMGB1-залежної міграції клітин, проліферації, розвитку запалення та аутофагії. Позаклітинний амфотерин стимулює експресію RAGE в деяких типах клітин. Нокаут гена, що кодує цей рецептор, призводить до зменшення росту клітин, метастазування. За фізіологічних умов його експресія висока в легенях й клітинах епітелію шкіри. Також невеликий вміст виявлено в гладеньком'язових клітинах судин, ендотеліальних клітинах, моноцитах і макрофагах, нейтрофілах і нейронах [3]. Зв'язування амфотерину з RAGE призводить до секреції запальних цитокінів, серед яких фактор некрозу пухлин α (TNF-α) та IL-6 та IL-1β [4]. Зазвичай взаємодію HMGB1 з RAGE вивчають у контексті таких захворювань, як діабет, онкологічні хвороби, запальні та аутоімунні, адже вісь HMGB1/RAGE є потенційною терапевтичною мішенню у даних випадках [9]. Її інгібування є перспективним методом [3] для лікування остеоартриту, серцево-судинних захворювань й хвороби Альцгеймера [4].

TLR, зокрема TLR2, TLR4, TLR9 – ін-

ша поширена група рецепторів, з якими зв'язується амфотерин. Вони розпізнають сигнали небезпеки для активації вродженої імунної системи. TLR4 є ключовим рецептором, що бере участь у вродженому імунитеті, його активація індукує запальну реакцію через сигнальний шлях NF-κB [17]. Розрізняють два шляхи активації TLR – MyD88-залежний та незалежний. У першому випадку запускається утворення запальних цитокінів, інший – відповідальний за дозрівання дендритних клітин. Внаслідок взаємодії HMGB1 і TLR2, TLR4 або TLR9 активуються шляхи NF-κB та IRF, активно продукуються цитокіни та хемокіни. Нокаут гена TLR4 *in vitro* або *in vivo* призводить до зменшення індукованого HMGB1 ураження тканини. Цей рецептор має відношення до ангиогенезу, клітинної міграції, адгезії, впливає разом з TLR2 на пошкодження тканин [9]. HMGB1, взаємодіючи з TLR4 та TLR9, може ініціювати утворення гранулоцитами нейтрофільних позаклітинних пасток (NET), наприклад, при пошкодженні печінки [10]. Рецептори TLR та RAGE мають спільні загальні сигнальні шляхи для індукції запалення. Вони залучені до патогенезу деяких захворювань, що визначає їх терапевтичний потенціал [15]. Зокрема, під час ішемічного інсульту HMGB1 може передавати сигнал через TLR та RAGE [7]. Показано, що останній відіграє значну роль у нейродегенерації, а TLR4 регулює імунну відповідь як рецептор імунних клітин.

Ще одним рецептором до амфотерину є CXCR4, який активно секретується гемопоетичними клітинами. Його залучення надзвичайно важливе у рекрутуванні запальних клітин до місця пошкодження і наступної регенерації тканин, що є необхідним для підтримки гомеостазу. HMGB1, вивільнений із некротичних клітин, утворює гетерокомплекс із CXCL12, який секретується активованими імунними клітинами або ж виділяється із клітин пошкодженої тканини. Сформований гетерокомплекс зв'язується з CXCR4 та ініціює міграцію запальних клітин до місця



ушкодження і надалі сприяє відновленню та регенерації тканин. Однак індуковані при цьому молекулярні механізми ще недостатньо вивчені [18]. Крім того, вважають, що сигнальний шлях HMGB1/CXCL12/CXCR4 відіграє важливу роль у регулюванні запальних станів у місці пошкодження [19]. Слід зазначити, що в здорових тканинах вміст CXCR4 значно нижчий, ніж у пухлинних клітинах, тому вважають, що він задіяний у канцерогенезі й метастазування.

TIM-3 належить до сімейства TIM (Т-клітинний імуноглобулін і домен муцину). Вперше його виявили на поверхні диференційованих лімфоцитів Th1 при дослідженні аутоімунних захворювань, згодом на інших імунних клітинах, зокрема, дендритних, моноцитах, макрофагах, природних кілерах. Тобто він бере участь у регулюванні запалення, ефероцитозу та цитотоксичності. Зв'язування TIM-3 з його лігандами загалом відіграє інгібіторну роль у Т-лімфоцитах [20]. Він має відносно високу афінність зв'язування з HMGB1, подібну до RAGE. Існують докази залучення осі HMGB1/TIM-3 в імуносупресію, викликану функціональним виснаженням Т-лімфоцитів під час сепсису [21]. Припускають, що комплекс HMGB1/TIM-3 може активувати інгібіторні шляхи як у клітинах вродженого імунітету, так і у Т-клітинах [20]. TIM-3 здатний виступати як негативний рецептор у протипухлинному імунітеті. Зв'язуючись з HMGB1, він пригнічує асоційовані з пухлиною дендритні клітини у відповідь на ДНК-вакцини та хімотерапію. Проте використання нейтралізуючих антитіл до TIM-3 підвищує ефективність протипухлинних препаратів [9]. Таким чином, вплив на TIM-3 можна розглядати як потенційний метод лікування в сучасній імунотерапії.

TREM-1 – тригерні рецептори, що експресуються на мієлоїдних клітинах, відіграють значну роль у вродженому імунітеті та передачі сигналів запалення. Зокрема, встановлено їх участь у розвитку запальної відповіді,

ініційованої TLR у нейтрофілах, моноцитах і макрофагах. Зв'язування амфотерину з TREM-1 індукує активацію NF- $\kappa$ B, що індукує продукцію цитокінів. Показано залучення взаємодії HMGB1 і TREM-1 у запальний процес, індукований бактеріальним ендотоксином. При цьому TREM-1 синергізує з TLR, що посилює ЛПС-індуковану запальну відповідь і секрецію TNF- $\alpha$  та IL-8. Одночасне блокування TREM-1 і TLR4 повністю пригнічувало виділення цитокінів і значно послаблювало інтенсивність запального процесу [22]. Такі результати можуть бути важливими для запобігання посиленню та пролонгації запальної відповіді під час розробки терапевтичних підходів до лікування бактеріальної інфекції.

Інтегрини – це білки адгезії, які допомагають лімфоцитам покидати кров'яне русло й мігрувати до місця запалення. Особливий інтегрин Mac-1, що знаходиться на лейкоцитах, може взаємодіяти з ендотеліальними RAGE, тобто потенційно впливає на регуляцію активності амфотерину. Останній посилює експресію цього інтегрину, окрім того сприяє подальшій взаємодії Mac-1 і RAGE, що, в свою чергу, необхідно для HMGB1-опосередкованого залучення нейтрофілів. Невеликий G-білок Ras1 регулює експресію Mac-1 на нейтрофілах. Таким чином, Ras1 відіграє важливу роль у регуляції активації та рекрутуванні нейтрофілів. Зв'язуючись з іншим інтегрином –  $\alpha$ V $\beta$ 3, амфотерин інгібує активність макрофагів у ефероцитозі [9].

Протеоглікани, як наслідок взаємодії білка з глікозамінгліканом, виконують різні функції в організмі, є важливою складовою міжклітинної речовини сполучної тканини. HMGB1 може зв'язуватись з протеогліканами, це було доведено у експериментах з виділенням амфотерину гепарин-сефарозною хроматографією. Деякі протеоглікани були ідентифіковані як рецептори до HMGB1, серед них гепарансульфат, синдекан, нейрокан. При зв'язуванні амфотерину з гепарансульфатом важливе значення має RAGE, хоча й деталі такої взаємодії досі лишаються невідомими [9].

На спорідненість між HMGB1 та його рецепторами впливає окисно-відновний статус залишків цистеїну у поліпептидному ланцюзі білка. Наприклад, HMGB1, що містить дисульфід, зв'язується з TLR4 і сприяє запальним реакціям [4]. Відновлений HMGB1 утворює гетерокомплекс із CXCL12 і передає сигнали через свій рецептор CXCR4. Є дані, що протизапальний аспіриноподібний препарат дифлунісал пригнічує хемотаксичну активність HMGB1, але не TLR4-залежні відповіді [23]. Слід зауважити, що окисно-відновний статус у тканині під час захворювання є динамічним процесом, відповідно й позаклітинна активність HMGB1 може змінюватися. Неокиснений (активний) амфотерин, що циркулює в кровотоці, взаємодіє із TLR2, 4, 9, а також із рецепторами RAGE фагоцитів [24]. Неактивний стан HMGB1 виникає в результаті дії супероксидних аніонів [25]. Підвищення вмісту HMGB1, RAGE і TLR4 при різних запальних станах та в експериментальних моделях вказує на їх участь у патогенезі захворювань, являючи собою можливий фактор ризику та терапевтичну мішень. Так, блокада HMGB1, RAGE і TLR4 при експериментальних патологіях, подібних до хвороби Альцгеймера, продемонструвало багатообіцяючі результати, змінюючи прогресування хвороби внаслідок пригнічення нейрозапалення [15].

### **Шляхи виділення HMGB1, механізми дії, інгібітори**

Як зазначалося вище, за нормальних умов амфотерин локалізується в ядрі, але внаслідок дії стресових факторів переміщується в цитоплазму, а потім виділяється з клітини і взаємодіє з низкою рецепторів [3, 13]. За чітке розташування амфотерину в ядрі відповідають N-кінцеві сигнали ядерної локалізації – NLS1 та NLS2. Як тільки відбуваються певні пострасляційні модифікації, молекула білка стає рухливою й прагне покинути ядро. Ці сигнальні молекули можуть модифікуватися ацетилюванням та деацетилюванням. Також

на вихід амфотерину з ядра впливає фосфорилування амінокислотних залишків цих молекул. Метилування самого HMGB1 здатне змінювати конформацію останнього й знижувати його активність зв'язування з ДНК. Подібний ефект має й N-глікозилування. На виділення амфотерину з клітин діють різні фактори, індукуючи його пасивне або активне вивільнення. Пасивний шлях є швидким і виникає при пошкодженні тканин та загибелі клітин, зокрема при некрозі, гіпоксії, старінні та аутоімунних захворюваннях [3]. Втрата цілісності клітинної мембрани при загибелі клітин призводить до неконтрольованого вивільнення вмісту клітин, включаючи DAMP, що має сильний прозапальний та імуногенний ефект [26]. Численні сигнальні шляхи регулюють пасивний вихід HMGB1 у позаклітинний простір [8, 9]. Один з них пов'язаний з надмірною активацією полі (АДФ-рибозо) полімерази-1 (PARP-1) внаслідок інтенсивного пошкодження ДНК [6, 9]. За таких умов виникає енергетична недостатність через виснаження НАД<sup>+</sup>, що призводить до некротичної загибелі та вивільнення HMGB1. Цей фермент також взаємодіє з факторами транскрипції p53 і NF-κB і, таким чином, регулює експресію генів (наприклад, TNF-α), які беруть участь у загибелі клітин і розвитку запалення. Показано, що PARP-1 відповідає за індуковане ДНК-пошкоджуючим агентом вивільнення HMGB1 під час некрозу, при цьому нокаут PARP-1 або використання його інгібітора значно пригнічує транслокацію та вивільнення амфотерину. Тобто PARP-1 може бути мішенню для пригнічення вивільнення HMGB1 і пов'язаної з некрозом запальної відповіді. Цікаво, що внутрішньоклітинний HMGB1 регулює активність PARP-1, його втрата призводить до надмірної активації ферменту. Позаклітинний HMGB1 підвищує активацію PARP-1 [9], що викликає подальше посилення запального процесу та збільшення його тривалості. Вільні радикали індукують як активне виділення HMGB1, так і пасивне під час загибелі клітин (таких як некроз,

апоптоз та некроптоз), оскільки у надмірній кількості вони можуть безпосередньо викликати клітинну загибель [8, 9]. Активна секреція амфотерину відбувається внаслідок стимуляції моноцитів, макрофагів та дендритних клітин патогенними продуктами, цитокінами, молекулами окисного стресу тощо. Цей секреторний шлях є повільним, тому що опосередкований передачею клітинного сигналу [3]. Наприклад, перекис водню активує шляхи MAPK і NF-κB, що, у свою чергу, сприяє виділенню цього білка моноцитами й макрофагами [9]. Деякі антиоксиданти, зокрема, ресвератрол й кверцетин, пригнічують вивільнення HMGB1 у різних моделях інфекцій і травм *in vitro* та *in vivo* [8, 9]. Все більше доказів свідчить про те, що гемоксигеназа-1, яка має цитопротективні властивості і відіграє головну роль у захисті організму від ушкоджень, викликаних окиснювачами під час запальних процесів, впливає на виділення HMGB1. Активація цього ферменту пригнічує вивільнення останнього у відповідь на запальний стимул [8, 9]. Іони кальцію, як універсальний месенджер, також можуть стимулювати секрецію амфотерину. Зокрема, на це впливає кальційопосередкована сигнальна трансдукція. Також є переконливі дані про те, що локальне регулювання температури пригнічує позаклітинний вихід HMGB1. Наприклад, це відбувається при ішемічному/реперфузійному пошкодженні міокарда. Тому можна вважати, що механізм секреції HMGB1 термочутливий [8]. Важливим є вплив сигнального шляху, пов'язаного з активацією оксиду азоту (NO), що продукується NO-синтазою. Надмірне утворення макрофагами індукцйбельної NO-синтази (iNOS) у відповідь на дію ендотоксинів або цитокінів викликає запалення, і, таким чином, сприяє вивільненню HMGB1. У свою чергу останній також здатний індукувати експресію iNOS, сприяючи розвитку запального ураження та його посиленню [8, 9].

Численні дослідження [8, 11, 16, 22, 27] показали, що NF-κB є як фактором, активація

якого призводить до виділення амфотерину у позаклітинний простір, так і важливою ланкою сигнального шляху, що активується цим білком після його взаємодії з відповідними рецепторами. Активація NF-κB індукує продукцію та вивільнення багатьох прозапальних медіаторів, що визначає надзвичайно важливу роль цього транскрипційного фактора у розвитку запалення та імунній відповіді. Виявлено два шляхи активації NF-κB – канонічний та неканонічний. Сутність першого полягає у тому, що димери субодиниці p65/p50 активуються у відповідь на різні стресові сигнали. Такими стресорами можуть бути ЛПС, деякі цитокіни, фактори росту тощо. Після цього кіназний комплекс ІκB (ІКК) фосфорилує білки родини ІκB й відбувається їх подальша протеосомна деградація, що призводить до переміщення p65/p50 до ядра й індукується експресія відповідних прозапальних медіаторів. Встановлено, що інгібування канонічного шляху NF-κB зменшує секрецію HMGB1 активованими імунними клітинами. Однак істотна роль NF-κB у регуляції вивільнення HMGB1 залишається предметом майбутніх досліджень [8]. Механізм дії HMGB1, опосередкований активацією NF-κB і наступною експресією та синтезом медіаторів запалення, залучений у патогенез багатьох захворювань та патологічних станів [9, 11, 16].

Крім NF-κB позаклітинний HMGB1 регулює передачу сигналів й через інші шляхи, серед яких MAPK і PI3K [27]. Наприклад, активуючи сигнальний шлях TLR4/MyD88/NF-κB/p65, позаклітинний HMGB1 може сприяти пошкодженню ендотеліальних клітин гломерулярного апарату нирок під час вовчакового нефриту [28]. HMGB1 бере участь у патогенезі метаболічних захворювань, таких як діабет і пов'язаних з ним ускладнень. Зокрема, у тканині печінки шурів з діабетом взаємодія HMGB1 і TLR4 супроводжується активацією сигнальних шляхів MAPK (p38, ERK, JNK), NFκB-p65 і JAK1/STAT3, що посилює розвиток системного запалення [27]. При гострому ураженні легень, індукованому

ЛПС, було виявлено активацію HMGB1-опосередкованих шляхів TLR4/NF-κB та PI3K/Akt/mTOR [29]. Є дані, що HMGB1-індукована стимуляція та агрегація тромбоцитів опосередковується через TLR-4/NF-κB/ІкВa/cGMP [3]. При залученні TLR2 або TLR4 амфотерин посилює продукцію цитокінів із ізольованих клітин селезінки миші. Під час діабету 2-го типу, нейродегенеративних розладів, серцево-судинних та аутоімунних захворювань, сепсису в механізм підтримки запального процесу залучено HMGB1/RAGE. З'ясовано, що їх зв'язок стимулює різні сигнальні молекули, серед них —NF-κB, p38, кінази, такі як ERK1/2 IRAK, cdc42 тощо [4, 7, 9]. Важливим є також шлях HMGB1/CXCL12/CXCR4, який відіграє критичну роль в ініціюванні міграції імунних клітин до місця ушкодження та регуляції запального процесу [19]. Отже, існує значна кількість сигнальних шляхів, які HMGB1 залучає у свій механізм дії. Вивчення сигналізації HMGB1 сприяє ідентифікації сполук і виявленню ключових молекул, які можуть бути корисними в подальших клінічних дослідженнях, спрямованих на розробку ефективних терапевтичних підходів до лікування запальних станів. Нині відомо про низку речовин, які пригнічують активність цього білка, серед них гліциризин, етилпіруват, флувастатин, берберин і блеацеїн.

Гліциризин – глікокон'югований тритерпен, наявний у корені солодки, є ефективним інгібітором HMGB1 і чинить захисну дію під час запальних процесів різного генезу [3, 16, 30]. Блокуванням низхідних сигнальних шляхів NF-κB і MAPK/ERK гліциризин пригнічував активовану амфотерином міграцію моноцитів та посилював апоптоз цих клітин, інгібований HMGB1, і, таким чином, послаблював системне запалення [30]. Під час сепсису він зменшував утворення позаклітинних пасток нейтрофілів пригніченням HMGB1/TLR9, що полегшувало гострий респіраторний дистрес-синдром [31]. Також сприяв послабленню патологічних змін, які виникають при сепсисі, регулюючи сигнальний шлях

HMGB1-RAGE/TLR4-MAPKs/NF-κB [16]. При гострому ураженні печінки гліциризин пригнічує запалення та апоптоз макрофагів печінки інгібуванням HMGB1 через PI3K/mTOR [30].

Етилпіруват – простий аліфатичний ефір піровиноградної кислоти, його протизапальну дію широко досліджено на тваринних і клітинних моделях [32]. Експериментально показано, що етилпіруват пригнічує HMGB1, перешкоджаючи його цитоплазматичному експорту [33]. Наприклад, застосування етилпірувату знижує вміст HMGB1 та зменшує кількість летальних випадків за умов експериментального коліту у мишей [3]. Використання етилпірувату було також ефективним при лікуванні аутоімунних та хронічних запальних захворювань [34, 35].

Інші інгібітори є менш вивченими. Однак відомо про кардіопротекторний та протизапальний вплив флувастатину на ішемічне пошкодження серця, який пов'язаний із його антиаутофагічними та антиапоптотичними функціями через інгібування шляху HMGB1/TLR4 [36]. Встановлено здатність берберину пригнічувати транслокацію HMGB1 із ядра в цитозоль, а також і зворотний перехід з цитозолу в ядро NF-κB, що дає йому змогу виявляти протизапальну дію пригніченням активації сигналізації HMGB1/TLR4/NF-κB [37]. Цікавим є той факт, що добре знайомий нам антитромбоцитарний препарат аспірин блокує індуковане тромбіном і колагеном вивільнення HMGB1 в активних тромбоцитах. Тому HMGB1 можна використовувати як терапевтичну мішень для антитромбоцитарних препаратів при тромбоутворенні [3]. Таким чином, ідентифікація сполук, які мають властивості пригнічувати активацію амфотерину, з'ясування сигнальних механізмів їх дії викликають не тільки експериментальний, а й клінічний інтерес, оскільки створюють передумови для розробки і впровадження відповідних препаратів для профілактики та лікування різноманітних захворювань, опосередкованих запаленням.



## Ендотоксемія та HMGB1

Ендотоксемія – це надходження ендотоксинів у кров'яне русло, що стимулює імунну відповідь. Ендотоксинами виступають речовини бактерій, які вивільняються внаслідок лізису бактеріальної клітини. Інший, дуже серйозний стан, що може виникати внаслідок такого потрапляння бактерій, вірусів, їх токсинів чи інших речовин – сепсис. Ця системна запальна реакція у відповідь на проникнення інфекційних агентів спричинює дисфункцію систем органів [38]. Ендотоксемія разом з сепсисом є летальними системними запальними захворюваннями, особливості яких досліджуються протягом довгого часу. Одним з найвідоміших ендотоксинів є ЛПС, компонент клітинної стінки грамнегативних бактерій, зокрема *E.coli* [39]. Про поширеність цих станів свідчить статистика: згідно з епідеміологічними даними у 2017 р. на сепсис в усьому світі захворіли 48,9 млн, а 11,0 млн пацієнтів померли [40].

Надзвичайний інтерес становить вивчення ролі амфотерину у розвитку ендотоксемії та сепсису. HMGB1 активно виділяється у відповідь на проникнення ендотоксинів. Важливу роль у цьому процесі відіграє ЛПС, TNF- $\alpha$ , оксид азоту та інші чинники. Відомо, що умовний нокаут HMGB1 у макрофагах спричиняє смерть тварин при бактеріальному інфекціюванні та ендотоксемії [9]. Вплив ЛПС на ендотеліальні клітини судин легень може призводити до їх піроптозу, особливого виду запрограмованої літичної загибелі клітин, яку викликають запальні каспази. Встановлено, що у мишей каспаза-11-залежний піроптоз відіграє важливу роль при ендотоксемії [38, 41]. HMGB1, що вивільняється в плазму, зв'язується з ЛПС і забезпечує інтерналізацію останнього в лізосоми ендотеліальних клітин за допомогою RAGE. У кислому лізосомальному середовищі HMGB1 проникає через подвійний шар ліпідів, дестабілізуючи лізосомальну мембрану, що дає змогу ЛПС потрапляти в цитозоль і активувати каспазу-11 [41]. Ге-

парин може інгібувати взаємодію HMGB1 і ЛПС, зменшити надходження останнього у цитоплазму і, таким чином, блокувати активацію каспази-11. Під час інфекції ЛПС стимулює гепатоцити вивільняти HMGB1 у кровообіг. У плазмі він з'єднується з позаклітинним ЛПС і утворюються кінцеві продукти глікування, індукуючи розрив лізосоми та розщеплення каспази-11. Внаслідок цього пошкоджується легеневий ендотеліальний бар'єр, що призводить до набряку легень, вивільнення прозапальних цитокінів, витоку рідини та білка й міграції лейкоцитів. Проте у разі дефіциту каспази-11 або ж нейтралізації позаклітинного HMGB1 чи делеції його у гепатоцитах покращується виживання тварин при експериментальному сепсисі. Делеція гена, що кодує HMGB1, має захисну дію за умов цієї патології. У разі сепсису, який виникає внаслідок ураження легень, гепарин діє не лише як антикоагулянт, а й блокатор передачі сигналів каспазою-11, при цьому покращуючи прогноз сепсису та полегшуючи ураження. Як введення гепарину, так і делеція каспази-11 зменшують пошкодження легень у мишей. Гостре ураження легень різними грамнегативними бактеріями є одним з найбільш поширених випадків смертності серед критично хворих пацієнтів, тому перспективи використання гепарину дають надію збільшити кількість одужань серед таких пацієнтів [41].

Під час ендотоксемії та сепсису гепатоцити є основним джерелом циркулюючого амфотерину. Однак механізм активного вивільнення HMGB1 із гепатоцитів у відповідь на дію ЛПС вивчено недостатньо. Відомо, що у цей процес залучено опосередковане TLR4 поглинання ендотоксину гепатоцитами, що призводить до активації каспази-11. Але не відомо, як при цьому регулюється вивільнення HMGB1. У праці Li W і співавт. [38] показано, що гепатоцити мобілізують амфотерин із ядра до цитозолю, залучаючи шлях каспаза-11/GSDMD. Каспаза-11 (каспази 4 та 5 у людини) належить до родини прозапаль-

них каспаз, її також називають неканонічною інфламасомою. А GSDMD – це білок газдермін D, що бере участь в імунній відповіді, запальних реакціях. Суть запропонованого авторами механізму заключається в тому, що під час ендотоксемії активація TLR4 призводить до посилення експресії каспази-11, а також збільшення вивільнення екзосом. Активація каспази-11 викликає розщеплення GSDMD, внаслідок цього підвищується вміст внутрішньоклітинного кальцію (який, на думку авторів, виділяється із ендоплазматичного ретикулула), що в свою чергу, сприяє фосфорилуванню кальцій-кальмодулінкінази і переміщенню ядерного HMGB1 у цитоплазму. В цій роботі доведено, що фрагмент GSDMD вбудовується в мембрану ендоплазматичного ретикулула і може ініціювати кальційзалежну передачу сигналів. Позаклітинне вивільнення амфотерину відбувається через екзосоми і залучає шляхи, які потребують активації TLR4, каспази-11 та GSDMD. Таким чином, дані цих досліджень свідчать, що у мишей ЛПС розпізнається не тільки рецепторним комплексом TLR4 на поверхні клітини, а й цитозольною каспазою-11. На відміну від макрофагів та ендотеліальних клітин, у яких активація каспази-11 призводить до їх піроптозу, посилення експресії останньої та розщеплення GSDMD у гепатоцитах не викликає пошкодження або загибелі цих клітин. Поглиблюється розуміння механізму активної секреції HMGB1 із гепатоцитів у міжклітинний простір, що є надзвичайно важливим, оскільки встановлено, що вміст HMGB1 під час дії ЛПС збільшується не через загибель чи пошкодження клітин, а саме через запуск специфічних механізмів для активного виділення амфотерину. Нокаут генів, що кодуєть каспазу-11 або GSDMD, не впливав на вміст ядерного HMGB1, але у той самий час делеція будь-якого з цих генів запобігала накопиченню HMGB1 у цитоплазмі, та його вивільненню культивованими гепатоцитами за умов впливу ЛПС [38]. Вищезгадана робота дуже важлива, адже створює фундамент

для подолання не лише сепсису, а й інших тяжких хвороб печінки. Інгібування HMGB1 може знизити смертність пацієнтів із сепсисом, тому дослідження у цій сфері мають перспективи та прикладне значення.

Експерименти, проведені на мишачій моделі ендотоксемії, індукованої ЛПС, показали, що макрофаги вивільняють HMGB1 активно під час аутофагії або пасивно під час некрозу. Амфотерин діє як хемоатрактант для незрілих дендритних клітин, приваблюючи їх до осередку запалення або до вторинних лімфоїдних органів і, таким чином, активуючи їх дозрівання. Так білок індукує активацію нових імунних клітин, що сприяє прогресуванню запального процесу [9].

Експериментально доведено, що стимуляція макрофагів ЛПС призводить до зростання експресії HMGB1 [7, 8, 16, 22, 27]. Також є дані, які свідчать, що позаклітинний HMGB1 може посилювати запальну відповідь та збільшувати її тривалість, бо стимулює макрофаги виділяти прозапальні медіатори, залучаючи TLR2, TLR4 або RAGE. Амфотерин здатний інгібувати ефероцитоз, за який відповідають макрофаги. Ефероцитоз – це процес видалення мертвих клітин фагоцитарними клітинами з тканин. Попередня обробка макрофагів HMGB1 призводить до зниження активності NF- $\kappa$ B і викликає толерантність до ендотоксину. Досліджено, що RAGE потрібен для HMGB1-опосередкованої толерантності до ендотоксину, а TLR2 і TLR4 – до ліпотейхоєвої кислоти [9].

Нами було встановлено, що пригнічення ядерного білка амфотерину за допомогою інгібітора гліциризинату амонію чинило виражену протизапальну та цитопротективну дію на клітини лімфовузлів у мишей з ЛПС-індукованою ендотоксемією [42]. Спостерігалось послаблення генотоксичного стресу та зниження некротичної та апоптотичної загибелі лімфоцитів, а також запобігання розвитку оксидативного стресу і забезпечення посилення антиоксидантного захисту. Це свідчить про перспективність подальших досліджень

щодо застосування блокаторів HMGB1 для лікування захворювань, індукованих впливом ендотоксину грамнегативних бактерій.

Дослідження, спрямовані на пошук шляхів зниження летальності від ЛПС-індукованої ендотоксемії є надзвичайно актуальними. Одній з груп вчених вдалося виявити, що пригнічення HMGB1-опосередкованої передачі сигналів каспази-11 знижувало загибель тварин. Було проведено скринінг великої кількості хімічних речовин, і вони дійшли висновку, що інгібування можливо здійснити, використавши похідне 8-гідроксидініліну. Ця речовина може порушувати взаємодію HMGB1-ЛПС й пригнічувати опосередковану амфотерином доставку ЛПС у цитозоль клітини, а також зменшувати вивільнення IL-1 $\alpha$  та IL-1 $\beta$ , захищати від опосередкованого каспазою-11 пошкодження органів і летальності у мишей з ендотоксемією. Результати даного дослідження свідчать про те, що HMGB1/каспаза-11 є потенційною мішенню при лікуванні летальних імунних розладів [40].

Таким чином, інтерес наукової спільноти у вивченні проблеми ролі амфотерину в розвитку ендотоксемії та сепсису має важливе практичне значення з точки зору як розкриття механізмів залучення цього білка у розвиток системного запалення, так і потенціалу використання HMGB1 як терапевтичної мішені для контролю патологічних станів.

## ВИСНОВОК

Таким чином, HMGB1 є життєво необхідним білком, його роль залежить від локалізації, окисно-відновного стану залишків цистеїну, та загалом, від про- та антиоксидантних процесів в організмі, тканинах та клітинах. Залежно від цього амфотерин виконує функції, які є основою різних процесів як фізіологічних, так і патофізіологічних. HMGB1 може бути вирішальним фактором у процесах загибелі, а також сприяти виживанню клітин під час запалення. Вивчення ефектів

фармакологічного інгібування HMGB1 за умов запальних захворювань є актуальним для встановлення патогенетичної ролі цього аларміну та визначення перспектив його фармакологічного інгібування в терапії запальних процесів, про що свідчить постійно зростаюча кількість досліджень та інтерес до HMGB1 як успішної терапевтичної мішені в експериментальних моделях різних захворювань.

*The authors of this study confirm that the research and publication of the results were not associated with any conflicts regarding commercial or financial relations, relations with organizations and/or individuals who may have been related to the study, and interrelations of co-authors of the article.*

**O.A. Kondratska, N.G. Grushka, V.V. Meshko, S.I. Pavlovych, R.I. Yanchii**

## MULTIFUNCTIONAL ACTIVITY OF NUCLEAR PROTEIN AMPHOTERIN AND ITS ROLE IN ENDOTOXEMIA

*Bogomoletz Institute of Physiology of the National Academy of Sciences of Ukraine, Kyiv; e-mail: elena-shepel@ukr.net*

The review summarizes generalizing modern scientific data on the main functions of the protein HMGB1, and its physiological and pathological roles. Amphoterin is involved in key processes that ensure the functioning of DNA in the cell nucleus and plays an important role outside it. HMGB1 has been implicated in many human inflammatory diseases such as sepsis, ischemic reperfusion injury, neurological conditions, cardiovascular disease, autoimmune disease, and others. This manuscript describes the structure and main functions of HMGB1, discusses the significance of this alarmin as damage-associated molecular patterns, and analyzes its role in the development of inflammation and cell death. Special attention is focused on the role of HMGB1 in the development of endotoxemia, as well as data on the signaling pathways involved in its pathogenesis. Information on the results of studies of the possibility of modulating the activity of this protein using inhibitors is also considered, since understanding this may be useful for developing new therapeutic strategies aimed at treating inflammatory conditions of various origins. Key words: amphoterin; endotoxemia; therapeutic strategies; inflammatory conditions.

## REFERENCES

1. Raucci A, Di Maggio S, Scavello F, D'Ambrosio A, Bianchi ME, Capogrossi MC. The Janus face of HMGB1

- in heart disease: a necessary update. *Cell Mol Life Sci*. 2019;76(2):211-29.
2. Andersson U, Yang H, Harris H. High-mobility group box 1 protein (HMGB1) operates as an alarmin outside as well as inside cells. *Semin Immunol*. 2018;38:40-8.
  3. Gonevuc S, Bandyopadhyay A, Bhagat S, Alam MI, Khan GA. Sterile inflammatory role of high mobility group box 1 protein: biological functions and involvement in disease. *J Vascul Res*. 2018;55(4):244-54.
  4. Singh H, Agrawal DK. Therapeutic potential of targeting the HMGB1/RAGE axis in inflammatory diseases. *Molecules*. 2022;27(21):7311.
  5. Vijayakumar EC, Bhatt LK, Prabhavalkar KS. High mobility group box-1 (HMGB1): a potential target in therapeutics. *Curr Drug Targets*. 2019;20(14):1474-85.
  6. Vitali R, Mancuso AB, Palone F, Pioli C, Cesi V, Negroni A, Cucchiara S, Oliva S, Carissimi C, Laudadio I, Stronati L. PARP1 activation induces HMGB1 secretion promoting intestinal inflammation in mice and human intestinal organoids. *Int J Mol Sci*. 2023;24(8):7096.
  7. Watanabe H, Son M. The immune tolerance role of the HMGB1-RAGE axis. *Cells*. 2021;10(3):564.
  8. Chen R, Kang R, Tang D. The mechanism of HMGB1 secretion and release. *Exp Mol Med*. 2022;54(2):91-102.
  9. Kang R, Chen R, Zhang Q, Hou W, Wu S, Cao L, Huang J, Yu Y, Fan XG, Yan Z, Sun X, Wang H, Wang Q, Tsung A, Billiar TR, Zeh HJ 3rd, Lotze MT, Tang D. HMGB1 in health and disease. *Mol Aspect Med*. 2014;40:1-116.
  10. Magna M, Pisetsky DS. The alarmin properties of DNA and DNA-associated nuclear proteins. *Clin Ther*. 2016;38(5):1029-41.
  11. Wang Y, Wang L, Hu F, Zou M, Luo R, Sun Y, Wang T, Guo Q, Peng X. Extracellular HMGB1 as inflammatory mediator in the progression of mycoplasma gallisepticum infection. *Cells*. 2022;11(18):2817.
  12. Liu F, Yang X, Xing J, Han K, Sun Y. Glycyrrhizin potentially suppresses the inflammatory response in pre-eclampsia rat model. *Pregnan Hypertens*. 2021;23:34-40.
  13. Sun X, Tang D. HMGB1-dependent and-independent autophagy. *Autophagy*. 2014;10(10):1873-6.
  14. Chen R, Zou J, Kang R, Tang D. The redox protein HMGB1 in cell death and cancer. *Antioxid Redox Signal*. 2023 Feb 2. Epub ahead of print.
  15. Paudel YN, Angelopoulou E, Piperi C, Othman I, Aamir K, Shaikh MF. Impact of HMGB1, RAGE, and TLR4 in Alzheimer's disease (AD): from risk factors to therapeutic targeting. *Cells*. 2020;9(2):383.
  16. Zhao F, Fang Y, Deng S, Li X, Zhou Y, Gong Y, Zhu H, Wang W. Glycyrrhizin protects rats from sepsis by blocking HMGB1 signaling. *Biomed Res Int*. 2017;2017:9719647.
  17. Zhou M, Zhang Y, Tang R, Liu H, Du M, Gao Z, Ji Z, Fang H. HMGB1/TLR4 signaling affects regulatory T cells in acute lung injury. *J Inflamm Res*. 2021;14:1551-61.
  18. D'Agostino G, Artinger M, Locati M, Perez L, Legler DF, Bianchi ME, Rüegg C, Thelen M, Marchese A, Rocchi MBL, Cecchinato V, Uguccioni M.  $\beta$ -Arrestin1 and  $\beta$ -Arrestin2 are required to support the activity of the CXCL12/HMGB1 heterocomplex on CXCR4. *Front Immunol*. 2020;11:550824.
  19. Haque N, Fareez IM, Fong LF, Mandal C, Abu Kasim NH, Kacharaju KR, Soesilawati P. Role of the CXCR4-SDF1-HMGB1 pathway in the directional migration of cells and regeneration of affected organs. *World J Stem Cells*. 2020;12(9):938-51.
  20. Cazzato G, Colagrande A, Cimmino A, Cicco G, Scarcella VS, Tarantino P, Rospalluti L, Romita P, Foti C, Demarco A, Sablone S, Candance PMV, Cicco S, Lettini T, Ingravalle G, Resta L. HMGB1-TIM3-HO1: A new pathway of inflammation in skin of SARS-CoV-2 patients? A retrospective pilot study. *Biomolecules*. 2021;11(8):1219.
  21. Huang S, Liu D, Sun J, Zhang H, Zhang J, Wang Q, Gan L, Qu G, Qiu J, Deng J, Jiang J, Zeng L. Tim-3 regulates sepsis-induced immunosuppression by inhibiting the NF- $\kappa$ B signaling pathway in CD4 T cells. *Mol Ther*. 2022;30(3):1227-38.
  22. El Mezayen R, El Gazzar M, Seeds MC, McCall CE, Dreskin SC, Nicolls MR. Endogenous signals released from necrotic cells augment inflammatory responses to bacterial endotoxin. *Immunol Lett*. 2007;111(1):36-44.
  23. De Leo F, Quilici G, Tirone M, De Marchis F, Mannella V, Zucchelli C, Preti A, Gori A, Casagrandi M, Mezzapelle R, Bianchi ME, Musco G. Diflunisal targets the HMGB1/CXCL12 heterocomplex and blocks immune cell recruitment. *EMBO Rep*. 2019;20(10):e47788.
  24. Ferguson TA, Choi J, Green DR. Armed response: how dying cells influence T-cell functions. *Immunol Rev*. 2011;241(1):77-88.
  25. Kaczmarek A, Vandenabeele P, Krysko DV. Necroptosis: the release of damage-associated molecular patterns and its physiological relevance. *Immunity*. 2013;38(2):209-23.
  26. Anderton H, Wicks IP, Silke J. Cell death in chronic inflammation: breaking the cycle to treat rheumatic disease. *Nat Rev Rheumatol*. 2020;16(9):496-513.
  27. Tao Z, Helms MN, Leach BCB, Wu X. Molecular insights into the multifaceted functions and therapeutic targeting of high mobility group box 1 in metabolic diseases. *J Cell Mol Med*. 2022;26(14):3809-15.
  28. Yu T, Xiaojuan F, Jinxi L, Xinyan M, Jie X, Yuexin T, Qingjuan L, Wei Z, Cunyang G, Jie H, Lunbi W, Hang Z, Shuxia L, Huifang G. Extracellular HMGB1 induced glomerular endothelial cell injury via TLR4/MyD88 signaling pathway in lupus nephritis. *Mediat Inflamm*. 2021;2021:9993971.
  29. Meng L, Li L, Lu S, Li K, Su Z, Wang Y, Fan X, Li X, Zhao G. The protective effect of dexmedetomidine on LPS-induced acute lung injury through the HMGB1-mediated TLR4/NF- $\kappa$ B and PI3K/Akt/mTOR pathways. *Mol Immunol*. 2018;94:7-17.
  30. Shen CH, Ma ZY, Li JH, Li RD, Tao YF, Zhang QB, Wang ZX. Glycyrrhizin improves inflammation and apoptosis via suppressing HMGB1 and PI3K/mTOR pathway in lipopolysaccharide-induced acute liver injury. *Eur Rev Med Pharmacol Sci*. 2020;24(12):7122-30.



31. Gu J, Ran X, Deng J, Zhang A, Peng G, Du J, Wen D, Jiang B, Xia F. Glycyrrhizin alleviates sepsis-induced acute respiratory distress syndrome via suppressing of HMGB1/TLR9 pathways and neutrophils extracellular traps formation. *Int Immunopharmacol.* 2022;108:108730.
32. Olcum M, Tufekci KU, Durur DY, Tastan B, Gokbayrak IN, Genc K, Genc S. Ethyl pyruvate attenuates microglial NLRP3 inflammasome activation via inhibition of HMGB1/NF- $\kappa$ B/miR-223 signaling. *Antioxidants (Basel).* 2021;10(5):745.
33. Xue J, Suarez JS, Minaai M, Li S, Gaudino G, Pass HI, Carbone M, Yang H. HMGB1 as a therapeutic target in disease. *J Cell Physiol.* 2021;236(5):3406-19.
34. Gajić D, Despotović S, Koprivica I, Miljković Đ, Saksida T. Ethyl pyruvate ameliorates experimental autoimmune myocarditis. *Biomolecules.* 2021;11(12):1768.
35. Jung SM, Lee J, Baek SY, Lee J, Jang SG, Hong SM, Park JS, Cho ML, Park SH, Kwok SK. Ethyl pyruvate ameliorates inflammatory arthritis in mice. *Int Immunopharmacol.* 2017;52:333-41.
36. Ding HS, Yang J, Yang J, Guo X, Tang YH, Huang Y, Chen Z, Fan ZX, Huang CX. Fluvastatin attenuated ischemia/reperfusion-induced autophagy and apoptosis in cardiomyocytes through down-regulation HMGB1/TLR4 signaling pathway. *Mol Biol Rep.* 2021;48(5):3893-901.
37. Zhu JR, Lu HD, Guo C, Fang WR, Zhao HD, Zhou JS, Wang F, Zhao YL, Li YM, Zhang YD, Yang CQ, Sun JG. Berberine attenuates ischemia-reperfusion injury through inhibiting HMGB1 release and NF- $\kappa$ B nuclear translocation. *Acta Pharmacol Sin.* 2018;39(11):1706-15.
38. Li W, Deng M, Loughran PA, Yang M, Lin M, Yang C, Gao W, Jin S, Li S, Cai J, Lu B, Billiar TR, Scott MJ. LPS induces active HMGB1 release from hepatocytes into exosomes through the coordinated activities of TLR4 and caspase-11/GSDMD signaling. *Front Immunol.* 2020;11:229.
39. Grushka NG, Pavlovych SI, Kondratska OA, Pilkevich NO, Yanchii RI. The protective effect of germanium citrate on functional state of immune cells and neutrophil activity under the condition of lipopolysaccharide induced inflammation. *Fiziol Zh.* 2019;65(6):43-50.
40. Wang X, Shi J, Li Z, Li L, Zhang R, Bai Y, Li J, Liang F, Tang Y. An 8-hydroxy-quinoline derivative protects against lipopolysaccharide-induced lethality in endotoxemia by inhibiting HMGB1-mediated caspase-11 signaling. *Front Pharmacol.* 2021;12:673818.
41. Yang R, Zhang X. A potential new pathway for heparin treatment of sepsis-induced lung injury: inhibition of pulmonary endothelial cell pyroptosis by blocking hMGB1-LPS-induced caspase-11 activation. *Front Cell Infect Microbiol.* 2022;12:984835.
42. Kondratska OA, Grushka NG, Pavlovych SI, Stovbun YuR, Plyska OI, Yanchii RI. Ammonium glycyrrhizinate has a protective effect on oogenesis and reduces genotoxic stress and death of immune cell in lipopolysaccharide-induced endotoxemia. *ECPB.* 2020, 91(3): 5-11.

*Матеріал надійшов  
до редакції 18.07.2023*