

**ЕНДОТЕЛИН-1, КАРДИОТРОФИН-1, ГАЛЕКТИН-3, МАТРИКСНА
МЕТАЛОПРОТЕИНАЗА-1 И ТЪКАНИЯ ИНХИБИТОР НА
МЕТАЛОПРОТЕИНАЗИТЕ-1, КАТО БИОМАРКЕРИ ЗА СЪРДЕЧНО-СЪДОВИЯ
РИСК ПРИ ПАЦИЕНТИ С АРТЕРИАЛНА ХИПЕРТЕНЗИЯ**

**Красимир Костов¹, Тихомир Рашев², Анелия Димитрова¹, Снежана Тишева³,
Александър Блажев⁴, Милена Атанасова⁴, Константин Господинов³**

¹*Катедра „Физиология и патофизиология”,*

²*Сектор „Молекулярна биология” - лаборатория за научни изследвания,*

³*Катедра „Кардиология, пулмология и ендокринология”,*

⁴*Катедра „Анатомия, хистология, цитология и биология”,*

МУ-Плевен, ул. „Климент Охридски“ №1, 5800 Плевен, България

e-mail: dr.krasi_kostov@abv.bg

**ENDOTHELIN-1, CARDIOTROPHIN-1, GALECTIN-3, MATRIX
METALLOPROTEINASE-1 AND TISSUE INHIBITOR OF METALLOPROTEINASES-1
AS BIOMARKERS OF CARDIOVASCULAR RISK IN PATIENTS WITH ARTERIAL
HYPERTENSION**

**Krasimir Kostov¹, Tihomir Rashev², Anelia Dimitrova¹, Snejana Tisheva³, Aleksander
Blazhev⁴, Milena Atanasova⁴, Konstantin Gospodinov³**

¹*Department of "Physiology and Pathophysiology",*

²*Sector "Molecular Biology" - Laboratory for research,*

³*Department of "Cardiology, Pulmonology and Endocrinology",*

⁴*Department of "Anatomy, Histology, Cytology and Biology",*

Medical University of Pleven, 1 "Kliment Ohridski" Str., 5800 Pleven, Bulgaria

e-mail: dr.krasi_kostov@abv.bg

ABSTRACT

The prevalence of hypertension is increasing worldwide and heart failure as a result of hypertensive heart disease, would soon be become the most common cause of heart failure. Search for suitable biomarkers of inflammation and fibrosis, can identify these patients who are with higher risk for progression from latent to symptomatic heart failure. Timely detection and treatment of these patients would reduce the future cardiovascular risk, earlier debilitating condition, and the costs of hospitalization, medical cares and expensive therapy. Such biomarkers in patients with arterial hypertension may be: ET-1, CT-1, Gal-3, MMP-1 and TIMP-1.

Key words: *arterial hypertension, endothelin-1, cardiotrophin-1, galectin-3, MMP-1, TIMP-1*

УВОД

Разпространението на артериалната хипертензия се увеличава в световен мащаб и сърдечната недостатъчност вследствие на хипертензивните сърдечни заболявания (hypertensive heart disease- ННД), скоро ще се превърне в най-честата причина за сърдечна недостатъчност (СН). Търсенето на подходящи биомаркери на възпалителния процес и последващата фиброза в съдовете и сърцето, може да идентифицира тези пациенти, които са с най-висок риск за прогресия от латента към симптомна СН. Своевременното откриване и лечение на тези пациенти би намалило бъдещия сърдечно-съдов риск, ранното им инвалидизиране, както и разходите за хоспитализация, медицински грижи и скъпо струваща терапия. Въпреки важността на проблема, търсенето на специфични биомаркери при артериална хипертензия изостава в сравнение с други заболявания. Определението на

понятието „биомаркер“ дадено от Националния институт по здравеопазване, е: "характеристика, която може да бъде обективно измерена и оценена като индикатор на нормални биологични или патологични процеси или фармакологичен отговор на терапевтична интервенция" [26]. Такива биомаркери при пациенти с артериална хипертензия могат да бъдат ET-1, CT-1, Gal-3, MMP-1 и TIMP-1. Откриването на ранни промени в нивата на тези маркери би могло да се използва като индикатор за възникването, развитието и прогнозата на хипертензивните сърдечни заболявания.

Ендотелин-1

През 1985 г. Nikey и сътр. публикуват доклад, който описва съществуването на ендотелен контрактилен фактор. Впоследствие Masashi Yanagisawa и Hiroki Kurihara, заедно със Sadao Kimura и Katsutoshi Goto, започват работа по изолирането на това вещество. През 1988 г. този фактор е успешно пречистен и идентифициран, като нов пептид означен с наименованието „ендотелин“, поради ендотелния си произход [18, 19]. Семейството на ендотелините включва три изоформи, които се означават като ET-1, ET-2, ET-3, състоят се от 21 аминокиселини и съдържат по две дисулфидни връзки в молекулата си. ET-1 е с молекулно тегло 2492 D и се кодира от ген, който се намира в хромозома 6. Кодиращият ген на ET-2 се намира в хромозома 1. ET-2 съдържа две замествания на АК и има 90% хомоложни последователности с ET-1. Кодиращият ген на ET-3 се намира в хромозома 20. ET-3 съдържа шест замествания на АК и има 71% хомоложни последователности с ET-1 и ET-2. Най-важно значение от трите ендотелни пептида има ET-1 [9, 11]. Хемодинамичният стрес при артериална хипертензия води до повишена продукция на ET-1, който е един от най-силните открити до момента вазоконстриктори. Неговото действие е от 30 до 50 пъти по-силно от това на норадреналина и АТ II [1] и между 8-110 пъти по-слабо от това на уротензин II (U-II) [20, 21]. През последните години се натрупаха неопровержими доказателства за връзката на ET-1 с патогенезата на артериалната хипертензия [1, 3, 16], оксидативния стрес на съдовата стена [23, 24, 25] и възпалението [7, 22]. Резултати от наше предходно проучване показват, че при пациентите с лека хипертензия (ЛХ) и тежка хипертензия (ТХ), нивата на ET-1 са по-високи от тези на контролната група, като съществуват статистически значими разлики ($p=0,0189$ и $p=0,0181$). Концентрациите на ET-1 в групата с ЛХ бяха по-високи от тези при ТХ, което доказва, че ET-1 играе основна роля за хипертензивното състояние още в началните етапи на заболяването, преди да са настъпили процесите на стабилно съдово ремоделиране [4]. ET-1 взаимодейства с два типа ендотелинови рецептори: ET_A и ET_B. ET_B-рецепторите се класифицират в два подтипа- ET_{B1} и ET_{B2}. ET_A-рецепторите се експресират предимно в съдовите гладкомускулни клетки и кардиомиоцитите. Ефектите свързани с ET_A-рецептора водят до засилена Ca²⁺ мобилизация в гладкомускулните клетки на съдовете и вазоконстрикция. ET_B-рецепторите се експресират предимно върху съдовите ендотелни клетки. Стимулацията на ET_{B1}-рецептора, активира сигнални пътища, които водят до освобождаване на релаксиращи фактори, като азотен оксид (NO), простагландин-I₂ (PGI₂) и ендотел продуциран хиперполяризиращ фактор (EDHF). ET_{B2}-свързаният отговор е вазоконстрикция, подобно на действието на ET_A рецептора [10, 14]. ET-1 се генерира основно от ендотелните клетки и концентрациите му в съдовата стена са над 100 пъти по-високи от циркулиращите плазмени нива. Така ET-1 действа основно като автокринен / паракринен пептид, а не като циркулиращ хормон [10]. Освен в ендотела, ET-1 се произвежда в сърцето, бъбреците, надбъбречната жлеза, задния дял на хипофизата и ЦНС, макар и в изключително ниски концентрации [16]. Синтезата на ET-1 минава през препро-ET-1 и Big ET-1, което се осъществява с помощта на ендотелин конвертиращ ензим (ECE). Елиминирането на ET-1 е по-бързо от това на неговия прекурсор Big ET-1. Плазмените нива на Big ET-1 при хора, зайци и плъхове са по-високи от тези на ET-1. Това предполага ролята на прекурсора, като по-подходящ индикатор за количествена оценка на

освобождаването от ендотелните клетки [5]. ET-1 осъществява контрола върху на артериалното налягане чрез влияние върху съдовия тонус, участва в бъбречната регулация на артериалното налягане, повлиява надбъбречната жлеза и продукцията на алдостерон и катехоламини, участва в централната и барорецепторната регулация и има положителен инотропен ефект върху сърцето [16].

Кардиотрофин-1

СТ-1 е протеин съставен от 201 аминокиселини. Първоначално е изолиран през 1995 г. Сходството на аминокиселинната му последователност и структурна хомология с IL-6 показва, че СТ-1 е член на IL-6 фамилията цитокини. Тя включва IL-6, левкемия инхибиторен фактор (LIF), цилиарен невротрофичен фактор (CNTF), онкостатин М (OSM) и IL-11. Тези цитокини медиат редица процеси, вкл. растеж и диференциация, чрез уникална рецепторна система, състояща се от IL-6 рецептор (IL-6R) и гликопротеин 130 (gp130). СТ-1 осъществява своите ефекти чрез LIFR комплекс, състоящ се от gp130/LIFR β хетеродимер. Предаването на сигнала след gp130 се състои най-малко от три различни пътя: 1) Janus киназа, която активира на JAK/STAT път, 2) Път на p42/44 митоген активирана протеин киназа (p42/44 MAPK), който е известен още като път на извънклетъчната рецепторна киназа-1/2 (ERK1/2), 3) Път на фосфатидилинозитол 3-ОН киназа (PI3K)/Akt [8].

Въпреки че преобладаващите действия на СТ-1 са основно върху сърцето, той може да има ефекти и в много други органи където да изпълнява важна роля. Повишената продукция на СТ-1 в кардиомиоцитите и други клетки зависи от редица фактори, като механичен стрес (механично разтягане), неврохуморални фактори (ангиотензин II, алдостерон, норепинефрин, урокортин и фибробластен растежен фактор-2), метаболитни фактори (глюкоза и инсулин) и хипоксичен стрес. СТ-1 играе двойна роля във физиологията на миокарда - от една страна осигурява защита, а от друга предразполага към патологични състояния (хипертрофия, фиброза и сърдечна недостатъчност). СТ-1 е способен да насърчава пролиферацията и оцеляването на ембрионални или неонатални кардиомиоцити. Доказано е, че предварителното третиране на култивирани неонатални кардиомиоцити с СТ-1 е в състояние да ги предпази от последващо излагане на повишена температура (топлинен шок) или симулирана исхемия / хипоксия. Тези ефекти са свързани със способността на СТ-1 да индуцира повишаване на нивата на топлошоквите протеини (heat shock proteins- HSP), като например на hsp70 и hsp90 [13], които имат цитопротективен ефект и подпомагат оцеляването на клетките. СТ-1 позитивно корелира с индекса на левокамерната маса и серумната концентрация на карбокси-терминалния пропептид на проколаген тип I (carboxy-terminal propeptide of procollagen type I - PIP), който е биомаркер за синтезата на колаген. Това предполага, че СТ-1 може да допринесе за развитието на кардиомиоцитната хипертрофия и фиброза. Освен сърдечна фиброза и дисфункция, СТ-1 индуцира значително съдово ремоделиране, характеризиращо се с натрупване на екстрацелуларни матриксни протеини и артериална ригидност. СТ-1 увеличава пролиферацията и хипертрофията на съдовите гладкомускулни клетки и синтезата на екстрацелуларен матрикс [17].

Установено е, че плазмените концентрации на СТ-1 са увеличени при пациенти с хипертензия, в сравнение с нормотензивни лица [12]. Едно скорошно проучване върху плъхове показва, че IL-6-свързаните цитокини могат да участват в развитието на хипертоничната левокамерна хипертрофия (ЛКХ). В действителност плазмените нива на СТ-1 са по-висока при хора с лекувана или нелекувана хипертензия в сравнение с нормотензивни лица. Освен това, сред пациентите с хипертензия, СТ-1 е по-висок при тези с ЛКХ, отколкото при нормална дебелина на камерната стена [8]. Високата концентрация на СТ-1 в кръвта е независим предиктор за смъртност при пациенти със сърдечна недостатъчност (CH) от хипертоничен и нехипертоничен произход. СТ-1 има добра чувствителност (70%) и специфичност (75%) за откриване на ЛКХ (предварително оценена

ехографски) при пациенти с хипертензия без СН. От интерес е и факта, че чувствителността на циркулиращите нива на СТ-1 за откриване на асимптоматича ЛКХ при тези пациенти явно превъзхожда тази на електрокардиограмата (50%). СТ-1 показва по-висока чувствителност, но по-ниска специфичност за диагностициране на клинично проявена СН от аминокиселинния про-мозъчен натриуретичен пептид (NT-proBNP) при хипертонични пациенти. Едновременната оценка обаче на двата показателя води до увеличаване на чувствителността за откриване на СН при тези пациенти (72-78%)^[21]. Интересно е да се отбележи, че 31% от пациентите с хипертензия без ЛКХ вече показват повишени концентрации на СТ-1 над горната граница на нормата, в сравнение с нормотензивна контролна популация. Това предполага, че СТ-1 се увеличава още в ранните етапи от развитието на артериалната хипертензия^[12]. Редица клинични находки подкрепят идеята, че циркулиращите нива на СТ-1, измерени в серум или плазма, може да бъдат потенциален биохимичен маркер за развитието, прогресията или регресия на хипертензивните сърдечни заболявания (hypertensive heart disease- ННД). Последни данни показват, че СТ-1, може да послужи като биомаркер на левокамерна хипертрофия и дисфункция при пациенти с хипертензия, и да е потенциална мишена за терапия, успоредно с антихипертензивното лечение^[13]. СТ-1 стимулира също експресията на ендотелин-1 в съдовите ендотелни клетки ^[27].

Галектин-3

Галектините са семейство разтворими β -галактозид-свързващи лектини, които играят важна регулаторна роля във възпалението, имунологичния отговор и неопластичния растеж. Те се свързват със специфични въглехидратни молекули, използвайки въглехидрат разпознаваща област на галектиновия протеин. Галектин-3 (Gal-3) е най-добре проученият член на тази фамилия. През последните години се натрупаха редица доказателства за ролята на Gal-3, като нов биомаркер за фиброза и ремоделиране. Той има не само прогностично значение, но играе директна роля в прогресията на СН. Той представлява 29-35 kDa тип химера галектин и единствен притежава разширен N-краен домен, състоящ се от тандемно повтарящи се къси аминокиселинни сегменти (110-130 аминокиселини) и е свързан с единичен C-краен въглехидрат-разпознаващ домен от около 130 аминокиселини. Gal-3 взаимодейства с множество лиганди - въглехидрати, като N-ацетилгалактозамин и негликозилирани молекули като повърхностни клетъчни рецептори (макрофаги) и екстрацелуларни рецептори (колаген IV). Свързването с въглехидратите се осъществява обичайно чрез C-крайния домен, а с негликозилираните молекули чрез N-крайния домен. C-крайният домен отговаря за лектиновата активност, а наличието на N-краен домен е необходимо за пълната биологична активност на Gal-3. Gal-3 представлява интригуваща връзка между възпалението и фиброзата. Той се освобождава в екстрацелуларното пространство и кръвообръщението от активирани макрофаги в отговор на възпаление. Gal-3 се намира на мястото на фиброзата заедно с фибробласти и макрофаги. Опити *in vitro* на култури от сърдечни фибробласти показват, че Gal-3 причинява пролиферация и синтез на колаген. Gal-3 е potentен митоген за фибробластите, засяга синтеза на нови матриксни компоненти, като колаген тип I и повлиява разграждането на компоненти на екстрацелуларния матрикс чрез взаимодействие с матриксните металопроотеинази (MMPs) и тъканните инхибитори на металопроотеиназите (TIMPs). Gal-3 е мощен прогностичен фактор по отношение на СН. Изследването му при болни в по-ранен стадий на СН може да го направи маркер, който идентифицира тези, които са с най-висок риск от прогресия към симптомна СН. Инхибирането на профибротичното действие на Gal-3 може да се превърне в таргет за превенция и лечение на сърдечно-съдовите заболявания. Интригуваща е възможността да се проучи ролята на Gal-3 като биомаркер и при пациенти с артериална хипертензия ^[2].

MMP-1 и TIMP-1

Матриксните металопроотеинази (MMPs) са Zn^{2+} и Ca^{2+} -зависими протеолитични ензими, които разграждат извънклетъчните матриксни протеини. Активността на MMPs може да модулира хипертензивно- свързаната акумулация на екстрацелуларни матриксни протеини в резистивните артерии. Няколко различни MMPs присъстват в съдовете: колагенази (MMP-1 и MMP-13), които разграждат колагенни типове от I до III, желатинази А (MMP-2) и В (MMP-9), които са намерени в субендотелната базална мембрана и разграждат денатуриран колаген (желатин) и колагени типове IV и V, стромелизини (напр. MMP-3), които разграждат адхезивни молекули, като ламинин, фибронектин, нефибрилари колагени и протеогликани [15]. Сърцето също съдържа множество MMPs с различна степен на специфичност, които могат да разграждат ЕСМ протеини. Те включват колагенази (MMP-1, MMP-8 и MMP-13), които инициират процес на разграждане на екстрацелуларния матрикс (ЕЦМ) чрез разцепване на α -веригите на колагени тип I и тип II и желатинази (MMP-2 и MMP-9), които разграждат по-нататък колагеновите фрагменти. При пациенти с хипертензия с ЛКХ, има повишени нива на циркулиращия TIMP-1, но понижени нива на циркулиращи MMP-1 и колаген тип I телопептид (C1P, продукт от разграждането на колагена), в сравнение с пациенти с хипертония без ЛКХ. Ahmed и др. показват, че пациентите с хипертония, но нормална структура и функция на лявата камера имали нормални плазмени MMPs и TIMPs нива. Само пациентите с ЛКХ и сърдечна недостатъчност имали повишени нива на TIMP-1. При пациенти с хипертензия, промените в ЕЦМ, които предразполагат към фиброза допринасят за функционалните и структурни нарушения, които причиняват прогресивна сърдечна дисфункция. При тях нормалните нива на MMPs и TIMPs корелират с нормална структура и функция на лявата камера. Промени в MMPs профила, които благоприятстват натрупването ЕСМ са свързани с ЛКХ и диастолна дисфункция, а увеличеното разграждане ЕЦМ вероятно е предвестник на прехода към систолна дисфункция. Тези констатации показват, че наблюдението на плазмените маркери за ЕЦМ миокардно ремоделиране може да осигури важна прогностична информация по отношение на продължаващото неблагоприятно левокамерно ремоделиране при пациенти с артериална хипертензия [6].

ЛИТЕРАТУРА

1. Димитрова, А., Д. Страшимиров, 2005. Ролята на ендотелините в патогенезата на артериалната хипертензия, Сборник от научна конференция с международно участие. Стара Загора, 4, 164-170
2. Кишева, А., Й. Йотов, 2012. Сърдечна фиброза и роля на галектин-3 в диагностичната и прогностична оценка на сърдечно болните, Българска кардиология, XVIII, 4, 14-19
3. Костов, К., А. Григорян, А. Димитрова, 2012. Ендотелини и артериална хипертензия. Сборник с научни съобщения от конкурсни сесии „Наука и младост“, Пловдив, 223-231
4. Костов, К., А. Григорян, А. Димитрова, С. Тишева, А. Русева, М. Атанасова, К. Господинов, А. Блажев, 2013. Ендотелин-1 и матриксни металопроотеинази-2 и 9 при пациенти с различна степен на артериална хипертензия, Сборник с научни съобщения от конкурсни сесии „Наука и Младост“, Пловдив, 85-90
5. Anunciato, I., R. Lobo, E. Coelho, W. Verri Jr, A. Eckeli, P. Evora, F. Nobre, J. Moriguti, E. Ferrioli, N. Lima, 2013. Big endothelin-1 and nitric oxide in hypertensive elderly patients with and without obstructive sleep apnea-hypopnea syndrome, Arq Bras Cardiol., 101, 344-51
6. Berk, B., K. Fujiwara, S. Lehoux, 2007. ECM remodeling in hypertensive heart disease, Journal of Clinical Investigation, 117, 568-575
7. Böhm, F., J. Pernow, 2007. The importance of endothelin-1 for vascular dysfunction in cardiovascular disease, Cardiovascular Research, 76, 8-18

8. Calabrò, P., G. Limongelli, L. Riegler, V. Maddaloni, R. Palmieri, E. Golia, T. Roselli, D. Masarone, G. Pacileo, P. Golino, R. Calabrò, 2009. Novel insights into the role of cardiotrophin-1 in cardiovascular diseases, *Journal of Molecular and Cellular Cardiology*, 46, 142–148
9. Can, J., 2008. Endothelin Biology, *Physiol Pharmacol.*, 86, 485-498
10. Del Villar, C., C. Garcia, C. Feldstein, L. Juncos, J. Carlos, 2005. Role of Endothelin in the Pathogenesis of Hypertension, *Mayo Clin Proc.*, 80, 84-96
11. Dhaun, N., J. Goddard, D. Kohan, D. Pollock, E. Schiffrin, D. Webb, 2008. Role of Endothelin-1 in Clinical hypertension: 20 Years On, *Hypertension*, 52, 452-459
12. Gonzalez, A., B. Lopez, S. Ravassa, J. Beaumont, T. Arias, N. Hermida, A. Zudaire, J. Díez, 2009. Biochemical markers of myocardial remodelling in hypertensive heart disease, *Cardiovascular Research*, 81, 509–518
13. Gonzalez, A., B. Lopez, S. Ravassa, J. Beaumont, A. Zudaire, I. Gallego, C. Brugnolaro, J. Díez, 2012. Cardiotrophin-1 in hypertensive heart disease, *Endocrine*, 42, 9–17
14. Hynynen, M., R. Khali, 2006. The Vascular Endothelin System in Hypertension - Recent Patents and Discoveries, *Recent Patents on Cardiovascular Drug Discovery*, 1, 95-108
15. Intengan, H., E. Schiffrin, 2001. Vascular Remodeling in Hypertension: Roles of Apoptosis, Inflammation and Fibrosis, *Hypertension*, 38, 581-587
16. Kohan, D., N. Rossi, E. Inscho, D. Pollock, 2011. Regulation of Blood Pressure and Salt Homeostasis by Endothelin, *Physiol Rev.*, 91, 1–77
17. López-Andrés, N., A. Rousseau, R. Akhtar, L. Calvier, C. Iñigo, C. Labat, X. Zhao, K. Cruickshank, J. Díez, F. Zannad, P. Lacolley, P. Rossignol, 2012. Cardiotrophin-1 Is Involved in Cardiac, Vascular, and Renal Fibrosis and Dysfunction, *Hypertension*, 60, 563-573
18. Masaki, T., 1998. The discovery of endothelins, *Cardiovascular Research*, 39, 530–533
19. Masaki, T., 2004. Historical review: Endothelin, *Trends in Pharmacological Sciences*, 25, 219-224
20. Nakayama, T., T. Hirose, K. Totsune, N. Mori, Y. Maruyama, T. Maejima, K. Minagawa, R. Morimoto, K. Asayama, M. Kikuya, T. Ohkubo, J. Hashimoto, M. Kohzuki, K. Takahashi, Y. Imai, 2008. Increased gene expression of urotensin II - related peptide in the hearts of rats with congestive heart failure, *Peptides*, 29, 801-808
21. Pakala, R., 2008. Role of urotensin II in atherosclerotic cardiovascular diseases. *Cardiovascular Revascularization Medicine*, 9, 166-178
22. Pernow, J., A. Shemyakin, F. Böhm, 2012. New perspectives on endothelin-1 in atherosclerosis and diabetes mellitus, *Life Sciences*, 91, 507–516
23. Piechota, A., A. Polańczyk, A. Goraca, 2010. Role of endothelin-1 receptor blockers on hemodynamic parameters and oxidative stress, *Pharmacol Rep.*, 62, 28-34
24. Romero, M., R. Jiménez, M. Sánchez, R. López-Sepúlveda, A. Zarzuelo, J. Tamargo, F. Pérez-Vizcaino, J. Duartea, 2010. Vascular superoxide production by endothelin-1 requires Src non-receptor protein tyrosine kinase and MAPK activation, *Atherosclerosis*, 212, 78–85
25. Skalska, A., A. Pietrzycka, M. Stepniewski, 2009. Correlation of endothelin-1 plasma levels with plasma antioxidant capacity in elderly patients treated for hypertension, *Clinical Biochemistry*, 42, 358–364
26. Giles, T., 2013. Biomarkers, Cardiovascular Disease and Hypertension, *Journal of Clinical Hypertension*, 15, 1-1
27. Tokito, A., M. Jougasaki, T. Ichiki, S. Hamasaki, 2013. Cardiotrophin-1 Induces Matrix Metalloproteinase-1 in Human Aortic Endothelial Cells, *PLoS ONE*, 8, e68801