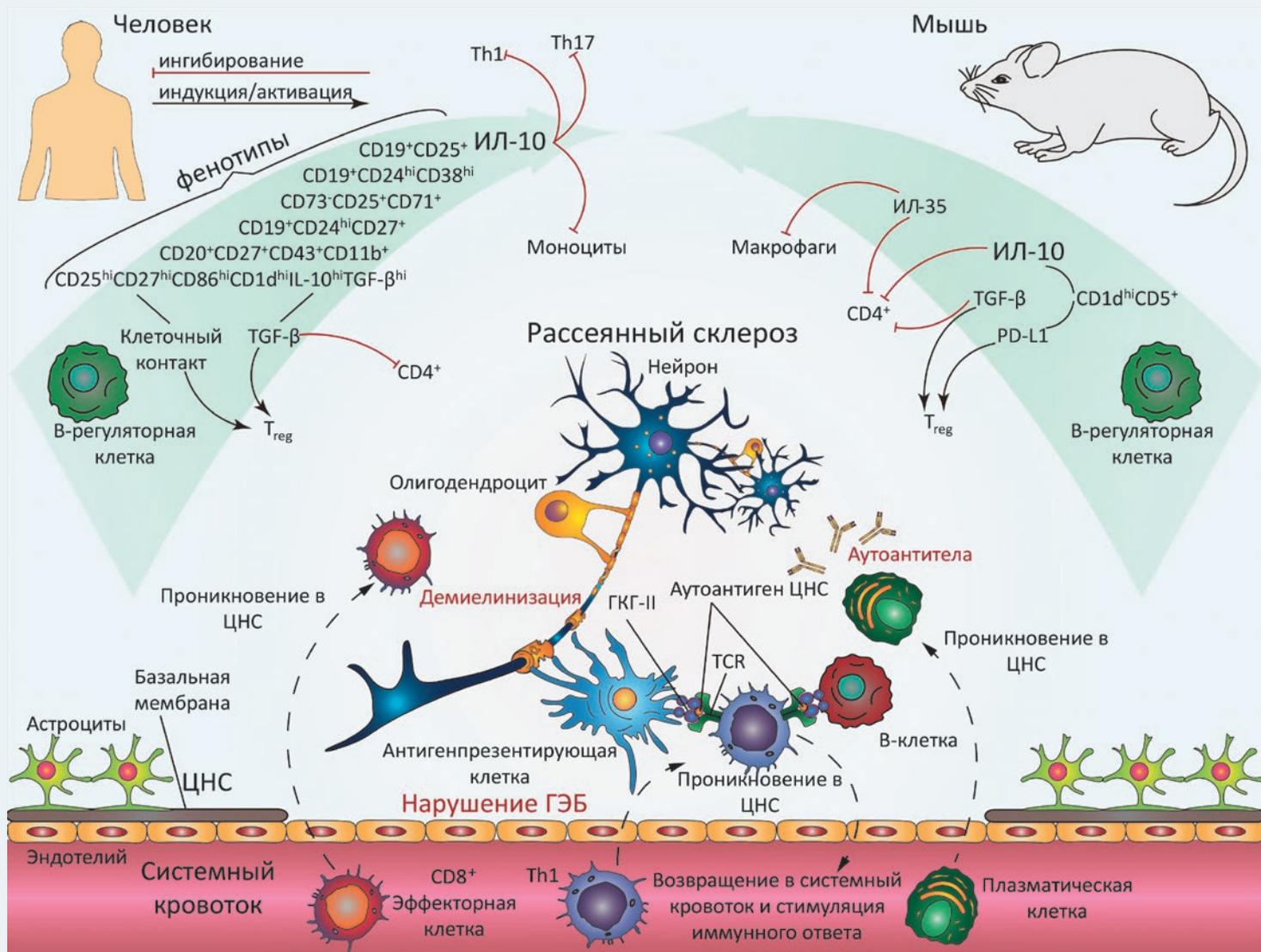


Acta Naturae

В-клеточное звено в регуляции аутоиммунных заболеваний



ВЫСОКОПРОИЗВОДИТЕЛЬНЫЙ СКРИНИНГ ПРИРОДНОГО БИОРАЗНООБРАЗИЯ С ЦЕЛЬЮ ПОИСКА НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ
 СТР. 24

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНОЕ МОДЕЛИРОВАНИЕ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА У ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС
 СТР. 4

MERCK

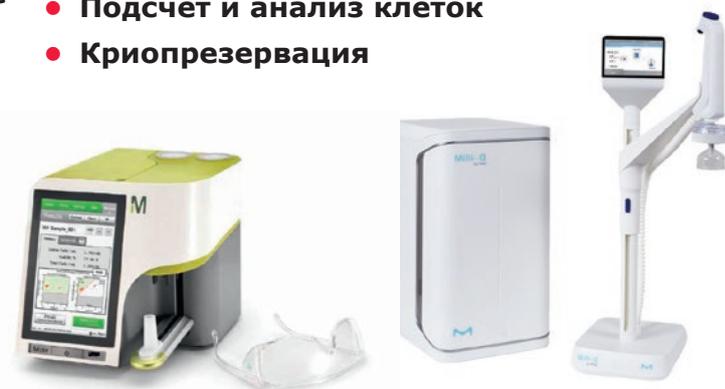
КОМПЛЕКСНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ КЛЕТОЧНОГО АНАЛИЗА



- Клеточные линии и первичные клетки
- Среды классические и специальные
- Стерилизующая фильтрация



- Биохимические реагенты
- Системы очистки воды
- Подсчет и анализ клеток
- Криопрезервация



Широкий выбор и высочайшее качество клеточных линий нашего партнера – Европейской коллекции клеточных культур (ECACC):

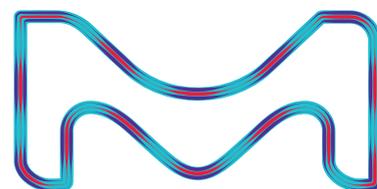
- 4000 клеточных линий животных и человека;
- Клетки 45 видов животных и 50 типов тканей;
- 370 эталонных В-лимфобластных клеточных линий с данными о типе лейкоцитарного антигена человека (HLA);
- 480 гибридомных клеточных линий, секретирующих моноклональные антитела;
- ДНК, РНК, кДНК, экстрагированные из клеточных линий коллекции;

SIGMAaldrich.com/ECACC

ООО «Мерк»

115054, г. Москва, ул. Валовая, д. 35, Тел.: +7 (495) 937-33-04
E-mail: mm.russia@merckgroup.com, ruorder@sial.com

SIGMAaldrich.com/cellculture
MERCKmillipore.com/cellculture

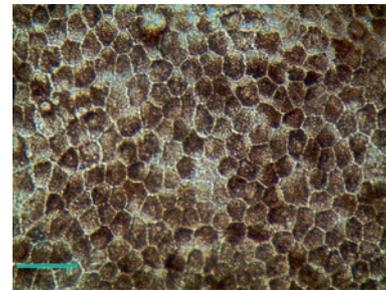


SIGMA-ALDRICH® is now MERCK

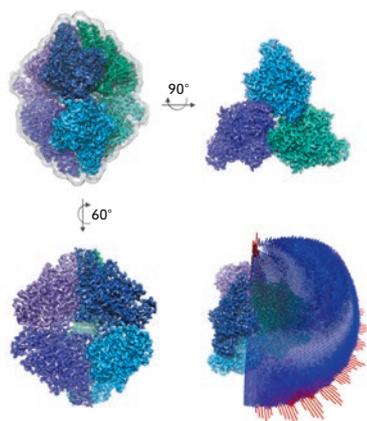
Возможности использования плюрипотентных стволовых клеток для восстановления поврежденного пигментного эпителия сетчатки глаза

А. Е. Харитонов, А. В. Сурдина, О. С. Лебедева, А. Н. Богомазова, М. А. Лагарькова

Плюрипотентные стволовые клетки можно с высокой эффективностью дифференцировать в пигментный эпителий сетчатки, что открывает возможности для клеточной терапии при дегенерации сетчатки и позволяет замедлить развитие патологии и даже, возможно, вернуть пациенту зрение. В обзоре обобщен текущий статус доклинических и клинических исследований в области заместительной терапии пигментного эпителия сетчатки. На основании собственных и опубликованных данных проведено сравнение разных протоколов дифференцировки, обозначены медицинские проблемы, стоящие на пути к широкому применению пигментного эпителия сетчатки, дифференцированного из плюрипотентных стволовых клеток.



Клетки пигментного эпителия сетчатки, дифференцированные из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток здорового донора



Итоговая карта плотности наилучшего разрешения 2.56 Å

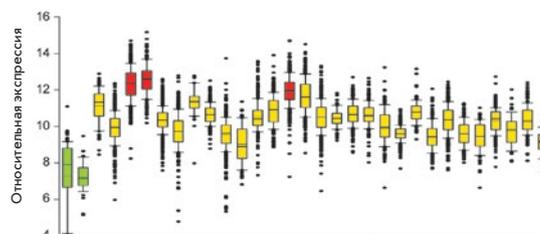
Пространственная структура цитохром с нитритредуктазы, полученная методом криоэлектронной микроскопии

Т. Н. Баймухаметов, Ю. М. Чесноков, Е. Б. Пичкур, К. М. Бойко, Т. В. Тихонова, А. Г. Мясников, А. Л. Васильев, А. В. Липкин, В. О. Попов, М. В. Ковальчук

Методом криоэлектронной микроскопии получена структура цитохром с нитритредуктазы из бактерии *Thioalkalivibrio nitratireducens* с разрешением 2.56 Å. Проверена возможная структурная гетерогенность фермента, показано отсутствие значимых различий как в ходе полипептидной цепи, так и в ориентации боковых групп модели, полученной на основании данных криоэлектронной микроскопии, относительно структуры высокого разрешения, полученной методом рентгеноструктурного анализа.

Экспрессия и внутриклеточная локализация параоксоназы 2 в опухолевых клетках различного типа

М. И. Шахпаронов, Н. В. Антипова, В. О. Шендер, П. В. Шнайдер, Г. П. Арапиди, Н. Б. Пестов, М. С. Павлюков
Для понимания роли белка параоксоназы 2 (PON2) в различных видах новообразований впервые проанализирована экспрессия и мутации гена *PON2* в злокачественных опухолях 31 типа, а также изучена связь между экспрессией *PON2* и выживаемостью пациентов. Показано, что высокий уровень экспрессии *PON2* является значимым диагностическим признаком многих видов солидных опухолей.



Относительный уровень экспрессии гена *PON2* в раковых опухолях различного вида

Учредители:

Министерство образования и науки РФ,
Московский государственный
университет имени М.В. Ломоносова,
ООО «Парк-медиа»

Редакционный совет:

Председатель: А.И. Григорьев
Главные редакторы: А.Г. Габибов, С.Н. Кочетков

В.В. Власов, П.Г. Георгиев, М.П. Кирпичников,
А.А. Макаров, А.И. Мирошников, В.А. Ткачук,
М.В. Угрюмов

Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре

К.В. Анохин (Москва, Россия),
И. Безпрозванный (Даллас, Техас, США),
И.П. Биленкина (Москва, Россия),
М. Блэкбёрн (Шеффилд, Великобритания),
Дж. Ву (Шанхай, Китай),
В.М. Говорун (Москва, Россия),
С.М. Деев (Москва, Россия),
О.А. Донцова (Москва, Россия),
К. Драуз (Ганау-Вольфганг, Германия),
М. Зуали (Париж, Франция),
М. Исагулянц (Стокгольм, Швеция),
А.Л. Конов (Москва, Россия),
М. Лукич (Аль Айн, ОАЭ),
П. Массон (Гренобль, Франция),
В.О. Попов (Москва, Россия),
И.А. Тихонович (Москва, Россия),
А. Трамонтано (Дэвис, Калифорния, США),
А. Фрибуле (Компьень, Франция),
В.К. Швядас (Москва, Россия),
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

Руководитель проекта: Н.В. Соболева
Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева
Подготовка иллюстраций: К.К. Опарин
Верстка: К.К. Опарин
Корректура: Р.С. Шаймарданова
Дизайн-проект: Х. Шнайдер

Телефон/факс: +7 (495) 727 38 60
E-mail: actanaturae@gmail.com

При перепечатке материалов ссылка на журнал
Acta Naturae обязательна. Любое воспроизведение опубликованных
материалов без письменного согласия редакции не допускается.
Редакция не несет ответственность за достоверность информации,
опубликованной в рекламных материалах.

© ACTA NATURAE, 2018

Номер подписан в печать 27 сентября 2018 г.
Тираж 300 экз. Цена свободная.
Отпечатано в типографии «МИГ ПРИНТ»

Включен в базы данных PubMed,
Web of Science, Scopus, РИНЦ

Журнал *Acta Naturae* входит
в Перечень ведущих периодических
изданий Высшей аттестационной комиссии
Минобрнауки России

Публикация в журнале бесплатная
Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 2.00

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

А. Н. Минаков, А. С. Чернов, Д. С. Асютин,
Н. А. Коновалов, Г. Б. Телегин

Экспериментальное моделирование травмы
спинного мозга у лабораторных крыс 4

А. В. Соколов, А. А. Шмидт, Я. А. Ломакин

В-клеточное звено в регуляции аутоиммунных
заболеваний. 11

С. С. Терехов, И. А. Остерман, И. В. Смирнов

Высокопроизводительный скрининг
природного биоразнообразия с целью
поиска новых антибиотиков. 24

А. Е. Харитонов, А. В. Сурдина, О. С. Лебедева,
А. Н. Богомазова, М. А. Лагарькова

Возможности использования
плюрипотентных стволовых клеток
для восстановления поврежденного
пигментного эпителия сетчатки глаза 31

М. В. Шепелев, С. В. Калинин, А. В. Дейкин,
И. В. Коробко

Получение рекомбинантных белков
из молока трансгенных животных:
современное состояние и перспективы. 42

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Т. Н. Баймухаметов, Ю. М. Чесноков, Е. Б. Пичкур, К. М. Бойко, Т. В. Тихонова, А. Г. Мясников, А. Л. Васильев, А. В. Липкин, В. О. Попов, М. В. Ковальчук
Пространственная структура цитохром с нитритредуктазы, полученная методом криоэлектронной микроскопии 51
- М. Л. Бычков, Н. А. Васильева, М. А. Шулепко, П. М. Балабан, М. П. Кирпичников, Е. Н. Люкманова
Lpx1 предотвращает нарушение долговременной потенциации и экспрессии нейромодулятора, вызванные $A\beta_{1-42}$ и активацией JNK 61
- А. Р. Ким, Т. А. Павленко, Л. А. Катаргина, Н. Б. Чеснокова, М. В. Угрюмов
Биохимические и функциональные изменения в глазу как проявление системной деградации нервной системы при паркинсонизме 67
- А. А. Кубанов, А. В. Рунина, А. В. Честков, А. В. Кудрявцева, Ю. А. Пеков, И. О. Корвиго, Д. Г. Дерябин
Полногеномное секвенирование российских штаммов *Neisseria gonorrhoeae*, отнесенных к геногруппе ST 1407 73
- В. В. Куликова, М. Ю. Чернуха, Е. А. Морозова, С. В. Ревтович, А. Н. Родионов, В. С. Коваль, Л. Р. Аветисян, Д. Г. Кулястова, И. А. Шагинян, Т. В. Демидкина
Антибактериальное действие тиосульфидов на мультирезистентные штаммы бактерий, выделенные от больных муковисцидозом 83
- П. Ю. Поварнина, Т. Л. Гарибова, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин
Дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора обладает свойствами антидепрессанта при пероральном введении 88

А. М. Сапожников, А. В. Климова, О. А. Шустова, М. В. Гречихина, М. С. Киялчус, О. А. Стрёмовский, Е. И. Коваленко, С. М. Деев

Новый подход к противоопухолевой терапии: направленная доставка HSP70 к поверхности раковых клеток с помощью супрамолекулярных конструкций на основе пары барстар:барназа 93

М. И. Шахпаронов, Н. В. Антипова, В. О. Шендер, П. В. Шнайдер, Г. П. Арапиди, Н. Б. Пестов, М. С. Павлюков

Экспрессия и внутриклеточная локализация параоксоназы 2 в опухолевых клетках различного типа 100

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

С. Е. Проскурина, К. А. Петров, Е. Е. Никольский

Влияние активации NMDA-рецепторов на мембранный потенциал покоя мышечной клетки в нервно-мышечном синапсе в условиях наличия или отсутствия ионов магния 108

Правила для авторов 112

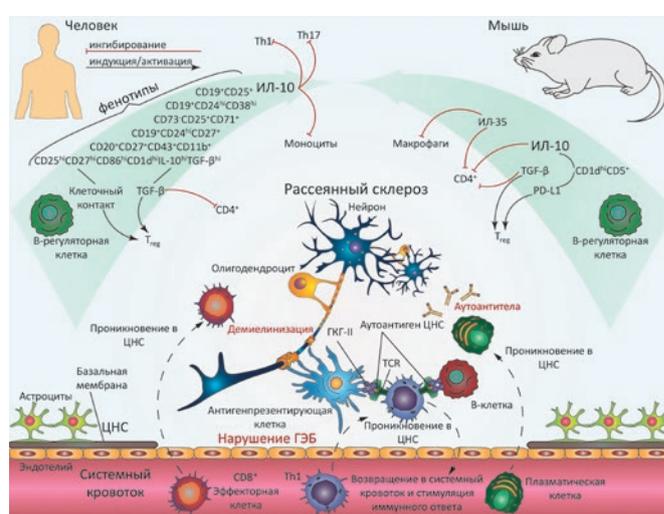


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
 (см. статью Соколова и др.)

УДК 616.8-091.931, 57.089.62, 57.084.1

Экспериментальное моделирование травмы спинного мозга у лабораторных крыс

А. Н. Минаков¹, А. С. Чернов¹, Д. С. Асютин², Н. А. Коновалов², Г. Б. Телегин¹¹Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Пущино, просп. Науки, 6²Национальный научно-практический медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125047, Москва, 4-я Тверская-Ямская ул., 16

E-mail: telegin@bibch.ru

Поступила в редакцию 08.11.2017

Принята к печати 25.06.2018

РЕФЕРАТ Заболевания, приобретенные в результате травмы спинного мозга, занимают одно из ведущих мест в мире. Поиск новых терапевтических соединений и биodeградируемых многомерных материалов для восстановления функций спинного мозга является актуальной задачей. В обзоре обобщены данные о наиболее часто используемых экспериментальных моделях травмы спинного мозга у лабораторных крыс, а также проанализирован опыт применения биodeградируемых многомерных материалов – скаффолдов при экспериментальном изучении спинальной травмы. Проведен систематический анализ значимых преимуществ и недостатков описанных моделей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биомоделирование, лабораторная крыса, скаффолды, травма спинного мозга.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ТСМ – травма спинного мозга; С – шейный отдел позвоночника; Th – грудной отдел позвоночника; L – поясничный отдел позвоночника.

ВВЕДЕНИЕ

Одной из наиболее острых и социально значимых задач современной регенеративной медицины остается функциональное восстановление спинного мозга при структурных дефектах различного генеза, большинство из которых обусловлены травмой [1]. Травма спинного мозга (ТСМ) признается одной из основных причин инвалидности [2]. По данным ВОЗ, ежегодно до 500 000 человек получают повреждение спинного мозга [3]. Основными причинами ТСМ являются дорожно-транспортные происшествия (38%), падения (22.2%), спортивные травмы и несчастные случаи (22.5%) [4]. Клиническая картина ТСМ характеризуется дефицитом двигательной активности, нарушениями сенсорных и вегетативных функций, нейропатическими болями. Патогенез спинальной травмы обычно обременен плохим прогнозом, связанным с развитием паралича. Кроме того, некоторые заболевания могут вызывать или увеличивать риск повреждения спинного мозга [5]. Помимо прямых последствий ТСМ, связанных с потерей моторной, сенсорной и вегетативной функций, существует вероятность развития вторичных процессов, которые

могут усугубить травму и привести к атрофии мышц, хроническим болям, инфекции мочевыводящих путей и пролежням [6, 7].

Современное понимание процессов стимулирования роста нервов и формирования комплекса иммунологических, воспалительных и рубцово-образовательных реакций, возникающих в ответ на ТСМ, привело к развитию ряда фармакологических методов лечения. В сочетании с различными клеточными и аддитивными технологиями эти методы дают надежду на то, что в скором времени большинство травм спинного мозга будут излечимы [8–11].

Испытание новых материалов и техник, способствующих регенерации спинного мозга на животных моделях, необходимый и важный этап доклинической разработки стратегии лечения травм спинного мозга. Одним из ключевых объектов биомоделирования спинальной травмы является крыса. Повреждения спинного мозга у крысы стали основной моделью, используемой для оценки стратегии экспериментального лечения ТСМ [4, 12]. В этом обзоре рассмотрены последние достижения в применении биodeградируемых многомерных материа-

лов – скаффолдов, призванных обеспечить регенеративный рост аксонов по всей площади повреждения спинного мозга, создавая тем самым среду для его эндогенного восстановления.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ МОДЕЛИ ТРАВМЫ СПИННОГО МОЗГА У ЛАБОРАТОРНЫХ КРЫС

При выборе оптимальной животной модели для решения конкретных исследовательских задач необходимо учитывать множество факторов: вид, возраст, размер, пол животных, возможность применения методов визуализации и функциональной оценки их состояния. Начиная со второй половины прошлого века способы предотвращения последствий травмы спинного мозга стали предметом систематического исследования на различных животных, включая крыс, мышей, кошек, собак, минипигов [13–15]. Экспериментальные модели различаются типами травматических повреждений спинного мозга: контузионным, компрессионным, дистракционным, дислокационным, химическим, ишемическим и реперфузионным, а также различными видами лацерации. Из большого числа разработанных на крысах моделей ТСМ наибольшее распространение получили модели, приближенные к клинической практике закрытых травм: компрессионная, имитирующая сдавливание, и контузионная, имитирующая ушиб [16–18]. Средняя продолжительность эксперимента в большинстве исследований составляет около 2 месяцев. Основным критерием оценки адекватности модели является регистрация морфологических изменений (аксональной регенерации, миелинизации, васкуляризации, плотности глиального рубца, воспалительной реакции) гистологическими методами (изучают, как правило, поперечные и сагиттальные срезы в зоне повреждения и смежных с ней, с проксимальной и дистальной сторон, областях). В качестве вспомогательных критериев используют методы аппаратной диагностики с помощью МРТ и функциональную оценку посредством электромиограммы. Клиническую оценку осуществляют по рейтинговой шкале Бассо, Битти и Бреснахан (BBB-тест) при перемещении крысы в открытом пространстве клетки из плексигласа с использованием цифровых камер с регистрацией соматосенсорных потенциалов [19–21], теста «Динамическая весовая нагрузка» (ДВН) [22], а также по поведенческим тестам.

К недостаткам большинства экспериментальных моделей ТСМ у крыс относятся слабая контролируемость степени воздействия, а также глубокие деструктивные изменения серого и белого вещества спинного мозга, включающие комплекс патологических сдвигов, гибель нейронов и глиальных клеток, дегенерацию нервных волокон, демиелинизацию,

активацию микроглии и макрофагов [23]. Все эти нарушения приводят к возникновению устойчивого функционального дефицита. Модели контузионного, компрессионного, тракционного, фотохимического, воспалительного, ишемического и реперфузионного повреждений используют преимущественно для исследования патофизиологии ТСМ, так как они воспроизводят возможные механизмы нанесения травмы и повреждения спинного мозга [15]. Представленные способы моделирования могли бы полноценно отразить клинико-морфологические сдвиги при ТСМ у человека, однако большинство этих моделей трудно воспроизвести, и они не могут быть использованы для изучения регенерации спинного мозга при структурных повреждениях.

Доказано, что функциональный дефицит спинного мозга крысы обусловлен в основном несостоятельностью проводящих путей белого вещества [24]. Поэтому при рассмотрении патофизиологических процессов спинальной травмы уместны аналогии с процессами, происходящими при травме периферических отделов нервной системы. Зависимость способности восстановления иннервации применительно к периферическому нерву от степени повреждения была установлена и количественно охарактеризована (в виде трех- и пятибалльной шкалы) еще в середине прошлого столетия [25–28].

При легкой степени (нейропраксии) повреждения периферических нервов аксональная регенерация экспериментально доказана и, более того, находит подтверждение в клинической практике. Известно много примеров восстановления иннервации эффекторного участка у млекопитающих как посредством хирургических техник, так и самопроизвольно. Установлено, что между нейронами, клетками Шванна, макрофагами и окружающей средой возникают «клеточно-сигнальные» факторы, которые способствуют ремиелинизации, росту и, что примечательно, самонаведению регенерирующего аксона [29–32]. Восстановление проводимости происходит в несколько этапов, включающих миелинизацию, прорастание аксона, образование синаптических контактов и, наконец, восстановление функций эффектора [33]. Доказано, что регенерация аксонов происходит в ретроградном направлении, вдоль прежнего пролегания волокна со средней скоростью примерно 1–2 мм в день [34–38].

При повреждениях средней степени тяжести в месте травмы происходит разрушение миелиновой оболочки аксона, антероградная (распространяющаяся от места повреждения к периферическому сегменту) Валлерова дегенерация дистального участка нерва, идущего к эффектору, в то время как проксимальный участок нерва и само тело нейрона остаются не-

затронутыми, обуславливая, например, фантомные боли после ампутации конечности [39].

В тяжелых случаях возможно образование невромы и глиальных рубцов. В 30% общего числа клинических случаев, преимущественно в боковых канатиках белого вещества спинного мозга образуются «ипсилатеральные» кисты (сирингомиелия, кистозная дегенерация) [40]. Установлено, что на стадии формирования рубцового перерождения глия выполняет барьерную функцию, препятствуя распространению продуктов тканевого распада и медиаторов воспаления (преимущественно макрофагов), а также обуславливает поддержку архитектоники органов центральной нервной системы. Однако, формируясь, тканевая структура таких дефектов уплотняется и препятствует регенеративному прорастанию аксонов, обуславливая тот факт, что после повреждения, сопровождающегося демиелинизацией, аксоны центральной нервной системы взрослых млекопитающих самостоятельно не восстанавливаются [40–42].

Одно из направлений методологии хирургического лечения ТСМ в наиболее часто встречающейся и показанной к оперативному разрешению хронической ее форме (на стадии уже сформированных структурных дефектов) – создание благоприятных условий для роста аксонов в виде обеспечения «свободного» пространства в зоне структурного дефекта путем устранения механических преград (рубцов) по принципу их иссечения в пределах здоровых тканей. Эта идея положена в основу целого ряда исследований по хирургическому созданию структурного дефекта спинного мозга у крыс посредством его полного пересечения скальпелем [43–52], частичной резекции посредством микрохирургических ножниц [41, 53–57].

Частичное пересечение спинного мозга (гемисекция) позволяет сравнить поврежденные и здоровые волокна у одного и того же животного. Например, гемисекция может быть использована для изучения локомоторной функции и ее восстановления на различных уровнях спинного мозга, а также для сравнения неврологического дефицита при контр- и ипсилатеральных поражениях. Кроме того, частичное иссечение спинного мозга приводит к менее тяжелой травме, чем полное иссечение, что в значительной степени облегчает послеоперационный уход за животным [58]. Во многих исследованиях показано, что у крыс восстановление функции спинного мозга происходит в первые 3 недели после нанесения травмы [13, 59], что нельзя связывать только с компенсаторными возможностями и регенерацией поврежденных аксонов. Это также свидетельствует о том, что односторон-

няя травматизация спинного мозга приводит к обратимой дисфункции спинного мозга за счет того, что посттравматические изменения в ткани не распространяются на участки спинного мозга, противоположные месту повреждения [60]. Также необходимо учитывать, что не всегда удастся оценить объем полученных повреждений. В таких случаях для повышения точности эксперимента ученые были вынуждены прибегнуть к методу соматосенсорных вызванных потенциалов [61].

Модель полного пересечения спинного мозга представляет собой диссоциацию между каудальным и ростральным сегментами спинного мозга и выгодна своей легкой воспроизводимостью. После пересечения спинного мозга возникает каскад сложных патофизиологических процессов, которые ингибируют потенциальную регенерацию аксонов и формируют глиальный рубец. Эта модель описана у различных животных, включая крыс, мышей, кошек, собак и приматов [62]. Таким образом, модель полного пересечения спинного мозга наиболее удобна ввиду возможностей тканевой инженерии [63]. В комплексном подходе к лечению ТСМ с использованием скаффолдов, которые также могут нести как целевые молекулы, так и клетки в поврежденный участок спинного мозга, мы можем использовать только модели частичной структурной травмы спинного мозга: они полезны как для оценки регенерации аксонов, так и для последующего функционального восстановления.

В большинстве работ экспериментальную травму спинного мозга моделировали на уровне грудного отдела позвоночника [37, 47, 50–54, 57, 64, 65]. Как правило, у людей ТСМ встречаются на шейном уровне, особенно спортивные травмы или травмы, полученные в результате ДТП [48, 49, 55, 56]. В связи с этим последние исследования сосредоточены в основном на моделях травм шейного уровня. В этих моделях по сравнению с моделями травм грудного отдела спинного мозга развивается выраженный неврологический дефицит, что усложняет уход и наблюдение за животными в послеоперационном периоде и резко повышает летальность [66]. С меньшей частотой описаны модели ТСМ на позвонках поясничного уровня [67]. Однако неврологический дефицит, полученный при травме поясничного отдела спинного мозга, в значительной степени возникает в результате повреждения серого вещества, наиболее развитого в поясничном утолщении, нежели из-за повреждения белого вещества. Наблюдения показывают, что повреждение серого вещества может привести к значительному функциональному дефициту, включая параплегию, при отсутствии нарушения основных нисходящих путей.

Обобщенная информация по экспериментальным моделям ТСМ у крыс

№	Уровень доступа	Характер травмы	Степень сложности*	Степень инвазивности*	Применение	Ссылки
1	C 2	Левосторонняя гемисекция	+++	+++	Оценка функционального восстановления	[20]
2	C 4	Резекция	+++	+++	Изучение регенеративных процессов в проводящих путях при имплантации скаффолда и под действием нейротрофического фактора роста	[48, 58]
3	C 5	Контузия	++	+++	Изучение электро- и патофизиологии травмы	[13, 66]
4	C 5	Поперечная резекция участка спинного мозга	+++	+++	Исследование регенерации аксонов в структуре скаффолдов	[37, 65]
5	Th 3, Th 3–6	Поперечная резекция спинного мозга	+++	+++	Изучение регенерации двигательных аксонов в составе фибринового геля под действием нейрональных стволовых клеток и фактора роста (NGF) в структуре скаффолда	[9, 46, 47]
6	Th 5–7	Компрессия	+++	++	Оценка клинических последствий в зависимости от времени экспериментальной компрессии спинного мозга	[16, 18]
7	Th 6–7	Поперечная резекция спинного мозга	+++	+++	Имплантация скаффолда, изучение регенерации поврежденных аксонов	[83]
8	Th 6–10	Химическая травма	++	+++	Исследование возможности ремиелинизации нервных волокон	[32]
9	Th 7–9, Th 7–10	Поперечная резекция участка спинного мозга	++	+++	Имплантация скаффолда, изучение способности аксонов прорасти через скаффолд	[53, 63]
10	Th 7–12	Полное пересечение спинного мозга	+++	+++	Изучение спонтанного восстановления подвижности задних конечностей после травмы	[60]
11	Th 8	Поперечная резекция участка спинного мозга	++	+++	Имплантация скаффолдов различной структуры	[67, 69, 70, 78]
12	Th 8–9, Th 9	Поперечная резекция участка спинного мозга	++	+++	Изучение процессов ремиелинизации аксонов в структуре коллагенового фибриллярного скаффолда и возможностей спонтанного функционального восстановления	[33, 50, 52, 59]
13	Th 9	Контузия	++	+++	Оценка степени тяжести контузионной травмы в локомоторных тестах и исследования воздействия мезенхимальных стволовых клеток на регенеративные процессы	[21, 64]
14	Th 9	Контузия с последующей резекцией глиального рубца	+++	+++	Замещение глиального рубца коллагеновым скаффолдом с мезенхимальными стволовыми клетками	[84]
15	Th 9–10	Гемиламинэктомия	++	++	Имплантация скаффолда	[61]
16	Th 9–12	Поперечная резекция участка спинного мозга	++	+++	Изучение воздействия аутологических обонятельных эпителиальных клеток на регенерацию спинного мозга	[11]
17	Th 10	Контузия	++	+++	Изучение контузионной травмы	[23]
18	Th 10	Поперечная резекция участка спинного мозга	++	+++	Исследование миелинизации поврежденных нервных волокон и образования глиального рубца, изучение функционального восстановления с помощью нейрональных стволовых клеток	[41, 44]
19	Th 10–11	Химическая травма	++	+++	Исследование миграции астроцитов в область травмы под действием магнитного поля	[42]
20	Th 11	Контузия	++	+	Моделирование контузионной травмы	[40]
21	Th 11	Электростимуляция	+++	++	Сравнение компенсаторных возможностей при спинальной травме у приматов и крыс	[1]
22	Th 11–12	Полное пересечение	+++	+++	Имплантация скаффолда, изучение воздействия нейронального на регенерацию аксонов	[74]
23	L 1–5	Поперечная резекция участка спинного мозга	++	+++	Изучение регенерации аксонов мотонейронов	[43]

*Оценка степени: «+» – легкая, «++» – средняя, «+++» – тяжелая.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ СКАФФОЛДОВ ДЛЯ СТИМУЛИРОВАНИЯ РЕГЕНЕРАЦИИ И ФУНКЦИОНАЛЬНОГО ВОССТАНОВЛЕНИЯ СПИННОГО МОЗГА

Активное развитие аддитивных технологий стереолитографии и тканевой инженерии дало мощный толчок для разработки новых биосовместимых каркасных биодеградируемых трехмерных материалов, которые могут стимулировать регенерацию аксонов и их функциональное восстановление. Большая часть исследований в области ТСМ направлена на уменьшение вторичных повреждений и способствование тканевой регенерации [7]. Наибольшее распространение получает комбинированный подход к лечению ТСМ, объединяющий скаффолды, трансплантацию клеток и доставку биоактивных веществ [33, 68].

Основное требование, предъявляемое к скаффолдам, – биосовместимость, благодаря которой должна создаваться среда, способствующая росту ткани и ее васкуляризации, позволяющая аксонам регенерировать через трансплантат. Изучением биодеградируемых многомерных материалов скаффолдов занимался целый ряд научных коллективов [7, 49, 65, 69–78]. Изучались скаффолды в виде сот [47], нановолокон [49], губок [50]. При этом появлялось множество вопросов, связанных с биосовместимостью материала. Последние работы количественно доказывают, что имплантация скаффолдов в зону структурного дефекта спинного мозга способствует аксональной регенерации. Так, например, в одной из работ уже через месяц после имплантации скаффолда в виде микрофиламентов зарегистрировано появление двигательной функции, а через 2 месяца по завершении эксперимента в структуре скаффолда было достоверно зафиксировано присутствие ремиелинизированных нервных волокон. Их доля составляла 10–25% от общего количества проводящих путей [33].

Еще одним направлением в развитии скаффолдов стало создание каркасов с близкими к тканям глии физическими свойствами – гидрогелей [54, 57]. Сродство физических свойств импланта и субстрата выявило 3–4-кратное увеличение интенсивности регенеративного роста аксонов в гидрогелях по сравнению с жесткими механическими каркасами [37]. Проведено изучение *in vivo* гидрогелей с внутрикапиллярной и пористой структурой. Как характерную особенность гидрогелей, авторы отмечали потерю линейности каналов имплантов в хроническом опыте [22]. Одной из прогрессивных технологий производства гидрогелевых имплантов является двухфотонная полимеризация. По мнению авторов, скаффолды, созданные посредством этого инновационного метода, минимизируют повреждения окружающих тканей и создают архитектурную поддержку объема

окружающих тканей в посттравматический период, что предотвращает разрушение нейронных сетей в зоне образовавшегося дефекта [79, 80].

Параллельно обеспечению механической поддержки и определению направления роста аксонов ведутся работы по стимулированию регенеративных процессов биоактивными соединениями, присутствующими в каналах скаффолдов. Доказано, что синергизм микроокружения с нейротрофическими факторами способствует более эффективным регенеративным процессам в реабилитационном периоде структурной травмы спинного мозга [81]. В качестве таких ростовых факторов применяют стволовые клетки [7, 42, 44, 82–85], факторы роста нервных клеток [86–89] и даже локально доставляемые магнитные наночастицы [90]. Для направленного роста аксонов предложено использовать многоканальные скаффолды из полилактидгликолида, содержащие шванновские клетки, полученные от новорожденных крысят [76]. Помещение подобных конструкций в рану спинного мозга взрослых крыс приводило к регенерации поврежденных аксонов спустя месяц после имплантации. Позже было показано, что если вместо шванновских клеток в каналы скаффолда помещать мезенхимальные стволовые клетки костного мозга, то у крыс с ТСМ наблюдается аналогичный эффект регенерации поврежденных аксонов [83].

Отдельного внимания при разработке многоканальных биодеградируемых скаффолдов заслуживает вопрос об адекватности выбора диаметра каналов [48, 56]. Известно, что у крыс диаметр аксонов варьирует в диапазоне от 1 до 8 мкм с превалированием поперечного сечения 2–4 мкм [91, 92]. При создании структуры внутренних каналов скаффолда необходимо учитывать тот факт, что в процессе регенерации сначала формируется новая миелиновая оболочка, через которую позднее происходит прорастание аксона [93, 94]. Так, увеличение диаметров каналов альгинатного скаффолда на 50% (с 41 до 64 мкм) стимулировало регенеративную активность аксонов более чем в 2 раза [37].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном обзоре изложены основные подходы и особенности моделирования ТСМ у лабораторных крыс, показана возможность применения биодеградируемых многомерных материалов скаффолдов для восстановления функций поврежденного спинного мозга. Однако каждая модель ТСМ должна быть усовершенствована и адаптирована к типу и форме нового исследуемого скаффолда. Соотношение между количественным восстановлением аксонов и поддержанием двигательной функции после травмы зависит от вида модели, материала и формы скаффолда.

Обобщенные данные по основным экспериментальным моделям ТСМ у крыс представлены в *таблице*.

Приведенные данные, к сожалению, не отражают весь спектр разработанных на сегодняшний день моделей ТСМ. Их количество постоянно растет. Достоинства и недостатки каждой модели следует рассматривать в контексте ее этиологического и патогенетического соответствия заболеванию человека. Адекватность модели служит определяющим критерием для оценки возможности экстраполяции полученных выводов на клиническую практику.

Вопрос о том, в какой степени результаты, полученные на крысиных биомоделях, можно экстраполировать на организм человека, является одновременно и важнейшим, и сложнейшим при экспериментальном моделировании с использованием лабораторных животных [95, 96]. Вопрос об адекватности той или иной экспериментальной биомодели процессам, протекающим в организме человека, продолжает оставаться открытым для большинства животных моделей. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Friedli L., Rosenzweig E.S., Barraud Q., Schubert M., Dominići N., Awai L., Nielson J.L., Musienko P., Nout-Lomas Y., Zhong H., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2015. V. 7. № 302. P. 134.
- La Placa M.C., Simon C.M., Prado G.R., Cullen D.K. // *Prog. Brain. Res.* 2007. V. 161. P. 13–26.
- Информационный бюллетень № 384, ноябрь 2013, ВОЗ.
- Gomes-Osman J., Cortes M., Guest J., Pascual-Leone A. // *J. Neurotrauma*. 2016. V. 33. P. 425–438.
- National Spinal Cord Injury Statistical Center // *J. Spinal Cord Med.* 2016. V. 39. P. 370–371.
- Abrams G.M., Ganguly K. // *Neurol.* 2015. V. 21. P. 188–200.
- Sakiyama-Elbert S., Johnson P.J., Hodgetts S.I., Plant G.W., Harvey A.R. // *Handb. Clin. Neurol.* 2012. V. 109. P. 575–594.
- Silver J., Schwab M.E., Popovich P.G. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2014. V. 7. a020602.
- Olson L. // *Exp. Neurol.* 2013. V. 248. P. 309–315.
- Ahuja C.S., Fehlings M. // *Stem Cells Transl. Med.* 2016. V. 5. P. 914–924.
- Watzlawick R., Rind J., Sena E.S., Brommer B., Zhang T., Kopp M.A., Dirnagl U., Macleod M.R., Howells D.W., Schwab J.M. // *PLoS Biol.* 2016. V. 14. P. e1002468.
- Reier P.J., Lane M.A., Hall E.D., Teng Y.D., Howland D.R. // *Handb. Clin. Neurol.* 2012. V. 109. P. 411–433.
- Onifer S.M., Nunn C.D., Decker J.A., Payne B.N., Wagoner M.R., Puckett A.H., Massey J.M., Armstrong J., Kaddumi E.G., Fentress K.G., et al. // *Exp. Neurol.* 2007. V. 207. P. 238–247.
- Cheriyian T., Ryan D.J., Weinreb J.H., Cheriyian J., Paul J.C., Lafage V., Kirsch T., Errico T.J. // *Spinal Cord*. 2014. V. 52. № 8. P. 588–595.
- Zhang N., Fang M., Chen H., Gou F., Ding M. // *Neural Regen. Res.* 2014. V. 9. № 22. P. 2008–2012.
- Rivlin A.S., Tator C.H. // *Surg. Neurol.* 1978. V. 10. P. 38–43.
- von Euler M., Seiger A., Sundström E. // *Exp. Neurol.* 1997. V. 145. P. 502–510.
- Gruner J.A., Yee A.K., Blight A.R. // *Brain Res.* 1996. V. 729. P. 90–101.
- Basso D.M., Beattie M.S., Bresnahan J.C. // *Exp. Neurol.* 1996. V. 139. P. 244–256.
- Fujiki M., Kobayashi H., Inoue R., Ishii K. // *Exp. Neurol.* 2004. V. 187. P. 468–477.
- Cao Q., Zhang Y.P., Iannotti C., DeVries W.H., Xu X.M., Shields C.B., Whitemore S.R. // *Exp. Neurol.* 2005. V. 191. P. 3–16.
- Pertici V., Trimaille T., Laurin J., Felix M.S., Marqueste T., Pettmann B., Chauvin J.P., Gimes D., Decherchi P. // *Biomaterials*. 2014. V. 35. № 24. P. 6248–6258.
- Mills C.D., Grady J.J., Hulsebosch C.E. // *J. Neurotrauma*. 2001. V. 18. P. 1091–1105.
- Fehlings M.G., Tator C.H. // *Exp. Neurol.* 1995. V. 132. P. 220–228.
- Seddon H. // *Brain*. 1943. V. 66. № 4. P. 237–288.
- Sunderland S. // *Brain*. 1951. V. 74. № 4. P. 491–516.
- Zhou L., Kambin P., Casey K.F., Bonner F.J., O'Brien E., Shao Z., Ou S. // *Neurol. Res.* 1995. V. 17. № 4. P. 307–311.
- Alant J.D., Kemp S.W., Khu K.J., Kumar R., Webb A.A., Midha R. // *J. Neurotrauma*. 2012. V. 29. № 8. P. 1691–1703.
- Geuna S., Raimondo S., Ronchi G., Di Scipio F., Tos P., Czaja K., Fornaro M. // *Int. Rev. Neurobiol.* 2009. V. 87. P. 27–46.
- Belkas J.S., Shoichet M.S., Midha R. // *Neurol. Res.* 2004. V. 26. № 2. P. 151–160.
- Hilliard M.A. // *J. Neurochem.* 2009. V. 108. № 1. P. 23–32.
- Taveggia C., Feltri M.L., Wrabetz L. // *Nat. Rev. Neurobiol.* 2010. V. 6. № 5. P. 276–287.
- Suzuki H., Kanchiku T., Imajo Y., Yoshida Y., Nishida N., Gondo T., Yoshii S., Taguchi T. // *Med. Mol. Morphol.* 2015. V. 48. № 4. P. 214–224.
- Lundy-Ekman L. *Neuroscience: Fundamentals for Rehabilitation*. 3rd ed. St. Louis, Missouri: Elsevier Saunders, 2007.
- Campos N.A., Chiles J.H., Plunkett A.R. // *Pain Physician*. 2009. V. 12. № 6. P. 997–1000.
- Willenbring S., DeLeo J.A., Coombs D.W. // *Anesth. Analg.* 1995. V. 81. № 3. P. 549–554.
- Günther M.L., Weidner N., Müller R., Blesch A. // *Acta Biomater.* 2015. V. 27. P. 140–150.
- Ilfeld B.M., Preciado J., Trescot A.M. // *Expert. Rev. Med. Devices*. 2016. V. 13. № 8. P. 713–725.
- Gruber H., Glodny B., Kopf H., Bendix N., Galiano K., Strasak A., Peer S.A. // *J. Roentgenol.* 2008. V. 190. № 5. P. 1263–1269.
- Marcol W., Slusarczyk W., Gzik M., Larysz-Brysz M., Bobrowski M., Gryniewicz-Bylina B., Rosicka P., Kalita K., Węglarz W., Barski J.J., et al. // *J. Reconstr. Microsurg.* 2012. V. 28. № 8. P. 561–568.
- Cui Z.S., Zhao P., Jia C.X., Liu H.J., Qi R., Cui J.W., Cui J.H., Peng Q., Lin B., Rao Y.J. // *Genet. Mol. Res.* 2015. V. 14. № 3. P. 9109–9117.
- Li Z., Fang Z.Y., Xiong L., Huang X.L. // *Indian J. Biochem. Biophys.* 2010. V. 47. P. 359–363.
- Kjell J., Olson L. // *Dis. Model Mech.* 2016. V. 9. № 10. P. 1125–1137.
- Liao Y., Zhong D., Kang M., Yao S., Zhang Y., Yu Y. // *Zhongguo Xiu Fu Chong Jian Wai Ke Za Zhi*. 2015. V. 29. № 8. P. 1009–1015.
- Schrimsher G.W., Reier P.J. // *Exp. Neurol.* 1993. V. 120. P. 264–276.
- Cameron A.A., Smith G.M., Randal D.C., Brown D.R., Rabchevsky A.G. // *J. Neurosci.* 2006. V. 26. P. 2923–2932.

47. Gao M., Lu P., Bednark B., Lynam D., Conner J.M., Sakamoto J., Tuszynski M.H. // *Biomaterials*. 2013. V. 34. P. 1529–1536.
48. Gros T., Sakamoto J.S., Blesch A., Havton L.A., Tuszynski M.H. // *Biomaterials*. 2010. V. 31. P. 6719–6729.
49. Huang Y.C., Huang Y.Y. // *Artif. Organs*. 2006. V. 30. P. 514–522.
50. Patist C.M., Mulder M.B., Gautier S.E., Maquet V., Jérôme R., Oudega M. // *Biomaterials*. 2004. V. 25. P. 1569–1582.
51. Spilker M.H., Yannas I.V., Kostyk S.K., Norregaard T.V., Hsu H.P., Spector M. // *Restor. Neurol. Neurosci.* 2001. V. 18. P. 23–28.
52. Taylor S.J., Sakiyama-Elbert S.E. // *J. Control. Release*. 2006. V. 116. P. 204–210.
53. King V., Phillips J., Hunt-Grubbe H., Brown R., Priestley J. // *Biomaterials*. 2006. V. 27. P. 485–496.
54. King V.R., Alovskaya A., Wei D.Y., Brown R.A., Priestley J.V. // *Biomaterials*. 2010. V. 31. P. 4447–4456.
55. Mothe A.J., Tam R.Y., Zahir T., Tator C.H., Shoichet M.S. // *Biomaterials*. 2013. V. 34. P. 3775–3783.
56. Stokols S., Tuszynski M.H. // *Biomaterials*. 2006. V. 27. P. 443–451.
57. Wei Y., He Y., Xu C., Wang Y., Liu B., Wang X., Sun X.D., Cui F.Z., Xu Q.Y. // *J. Biomed. Mater. Res. B. Appl. Biomater.* 2010. V. 95. P. 110–117.
58. Kwon B.K., Liu J., Messerer C., Kobayashi N.R., McGraw J., Oschopok L., Tetzlaff W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. № 5. P. 3246–3251.
59. You S.W., Chen B.Y., Liu H.L., Lang B., Xia J.L., Jiao X.Y., Ju G. // *Restor. Neurol. Neurosci.* 2003. V. 21. № 1–2. P. 39–45.
60. Li L.-S., Yu H., Raynald R., Wang X.-D., Dai G.-H., Cheng H.-B., Liu X.-B., An Y.-H. // *Peer. J.* 2017. V. 5. e2865.
61. Cloud B.A., Ball B.G., Chen B.K., Knight A.M., Hakim J.S., Ortiz A.M., Windebank A.J. // *J. Neurosci. Meth.* 2012. V. 211. P. 179–184.
62. Heimburger R.F. // *Spinal Cord*. 2005. V. 43. P. 438–440.
63. Lukovic D., Moreno-Manzano V., Lopez-Mocholi E., Javier Rodriguez-Jiménez F., Jendelova P., Sykova E., Oria M., Stojkovic M., Erceg S. // *Sci. Repts.* 2015. V. 5. № 9640.
64. Cho S., Kim Y.R., Kang H., Yim S.H., Park C., Min Y.H., Lee B.H., Shin J.C., Lim J.B. // *Cell Transplant.* 2009. V. 18. P. 1359–1368.
65. Novikova L.N., Pettersson J., Brohlin M., Wiberg M. // *Biomaterials*. 2008. V. 29. P. 1198–1206.
66. Dunham K.A., Siriphorn A., Chompoopong S., Floyd C.L. // *J. Neurotrauma*. 2010. V. 27. P. 2091–2106.
67. Zhao Z., Alam S., Oppenheim R.W., Prevette D.M. // *Exp. Neurol.* 2004. V. 190. P. 356–372.
68. Straley K.S., Foo C.W., Heilshorn S.C. // *J. Neurotrauma*. 2010. V. 27. № 1. P. 1–19.
69. Yara T., Kato Y., Kataoka H., Kanchiku T., Suzuki H., Gondo T., Yoshii S., Taguchi T. // *Med. Mol. Morphol.* 2009. V. 42. P. 150–154.
70. Yoshii S., Oka M., Shima M., Akagi M., Taniguchi A. // *Spine*. 2003. V. 28. P. 2346–2351.
71. Yoshii S., Oka M., Shima M., Taniguchi A., Taki Y., Akagi M. // *J. Biomed. Mater. Res.* 2004. V. 70. P. 569–575.
72. Guo S.Z., Ren X.J., Wu B., Jiang T. // *Spinal Cord*. 2010. V. 48. P. 576–581.
73. Geller M., Fawcett J.W. // *Exp. Neurol.* 2002. V. 174. P. 125–136.
74. Jain A., Kim Y.T., McKeon R.J., Bellamkonda R.V. // *Biomaterials*. 2006. V. 27. P. 497–504.
75. Hurtado A., Moon L.D., Maquet V., Blits B., Jérôme R., Oudega M. // *Biomaterials*. 2006. V. 27. P. 430–442.
76. Moore M.J., Friedman J.A., Lewellyn E.B., Mantila S.M., Krych A.J., Ameenuddin S., Knight A.M., Lu L., Currier B.L., Spinner R.J., Marsh R.W., Windebank A.J., Yaszemski M.J. // *Biomaterials*. 2006. V. 27. P. 419–429.
77. Novikova L.N., Novikov L.N., Kellerth J.O. // *Curr. Opin. Neurol.* 2003. V. 16. P. 711–715.
78. Tsai E.C., Dalton P.D., Shoichet M.S., Tator C.H. // *Biomaterials*. 2006. V. 27. P. 519–533.
79. Balyabin A.V., Tikhobrazova O.P., Muravyeva M.S., Klyuev E.A., Ponyatovskaya A.V., Shirokova O.M., Bardakova K.N., Minaev N.V., Koroleva A.V., Mitaeva Y.I., et al. // *Neurosci. Res.* 2016. V. 8. № 4. P. 198–211.
80. Timashev P.S., Vedunova M.V., Guseva D., Ponimaskin E., Deiwick A., Mishchenko T.A., Mitroshina E.V., Koroleva A.V., Pimashkin A.S., Panchenko V.Ya., et al. // *Biomed. Phys. Eng. Express*. 2016. V. 2. № 3. P. 035001.
81. Jerani T.S., Pettikiriarachchi C., Parish L., Shoichet M.S., Forsythe J.S., Nisbet D.R. // *Aust. J. Chem.* 2010. V. 63. P. 1143–1154.
82. Ragnarsson K.T. // *Spinal Cord*. 2008. V. 46. P. 255–274.
83. Yang E.-Z., Zhang G.-W., Xu J.-G., Chen S., Wang H., Cao L.-L., Liang B., Lian X.-F. // *Acta Pharmacol. Sinica*. 2017. V. 38. P. 623–637.
84. Wang N., Xiao Z., Zhao Y., Wang B., Li X., Li J., Dai J. // *J. Tissue. Eng. Regen. Med.* 2017. doi: 10.1002/term.2450.
85. Zhao Y., Xiao Z., Chen B., Dai J. // *Organogenesis*. 2017. V. 10. P. 1–8.
86. Shi Q., Gao W., Han X., Zhu X.S., Sun J., Xie F., Hou X.L., Yang H.L., Dai J.W., Chen L. // *Stem Cells Reg Med. China*. 2014. V. 57. № 2. P. 232–240.
87. Jiao G., Pan Y., Wang C., Li Z., Li Z., Guo R. // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 2017a. V. 76. P. 81–87.
88. Jiao G., Lou G., Mo Y., Pan Y., Zhang Z., Guo R., Li Z. // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 2017b. V. 74. P. 230–237.
89. Xu Z.X., Zhang L.Q., Wang C.S., Chen R.S., Li G.S., Guo Y., Xu W.H. // *Curr. Neurovasc. Res.* 2017. doi: 10.2174/1567202614666170718093508.
90. Zhang C., Morozova A.Y., Abakumov M.A., Gubsky I.L., Douglas P., Feng S., Bryukhovetskiy A.S., Chekhonin V.P. // *Med. Sci. Monit.* 2015. V. 21. P. 3179–3185.
91. Kato N., Nemoto K., Nakanishi K., Morishita R., Kaneda Y., Uenoyama M., Ikeda T., Fujikawa K. // *Diabetes*. 2005. V. 54. № 3. P. 846–854.
92. Boehmerle W., Huehnchen P., Peruzzaro S., Balkaya M., Endres M. // *Sci. Rep.* 2014. V. 18. № 4. P. 63–70.
93. Abdullah M., O'Daly A., Vyas A., Rohde C., Brushart T.M. // *Exp. Neurol.* 2013. V. 249. P. 1–7.
94. Muheremu A., Wang Y., Peng J. // *Can. J. Neurol. Sci.* 2013. V. 40. P. 292–298.
95. Roep B.O., Atkinson M. // *Diabetologia*. 2004. V. 47. № 10. P. 1650–1656.
96. Mestas J., Hughes C.C. // *J. Immunol.* 2004. V. 172. № 5. P. 2731–2738.

УДК 571.27

В-клеточное звено в регуляции аутоиммунных заболеваний

А. В. Соколов¹, А. А. Шмидт¹, Я. А. Ломакин^{1,2*}¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

*E-mail: yasha.l@bk.ru

Поступила в редакцию 06.12.2017

Принята к печати 21.06.2018

РЕФЕРАТ Антителонезависимые эффекторские функции В-клеточного звена играют важную роль в развитии и подавлении иммунного ответа. За последние 15 лет накопился большой объем данных о цитокиновой регуляции воспаления В-лимфоцитами. В обзоре проанализированы механизмы подавления воспалительного ответа субпопуляциями регуляторных В-клеток в норме и при развитии аутоиммунных патологий.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА В-клетки, интерлейкин-10, интерлейкин-35, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, системная красная волчанка, экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит, Breg, CD19+CD24(hi)-CD38(hi).

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АПК – антигенпрезентирующие клетки; ГКГС – главный комплекс гистосовместимости; ИЛ – интерлейкин; РА – ревматоидный артрит, РС – рассеянный склероз; Breg – регуляторные В-клетки; Treg – регуляторные Т-клетки; СКВ – системная красная волчанка; ЦНС – центральная нервная система, ЭАЭ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит.

ВВЕДЕНИЕ

В-клетки являются одним из центральных элементов гуморального иммунитета. Традиционно считалось, что основная роль В-клеток заключается в продукции антител, однако в дальнейшем было выявлено их непосредственное участие и в клеточном иммунитете. В-лимфоциты участвуют в активации Т-клеток путем презентации антигена, костимуляции и выработке цитокинов; влияют на противомикробные защитные механизмы и воспалительные процессы в тканях организма; также они выступают в роли регуляторных клеток, которые управляют и клеточными, и гуморальными иммунными ответами.

Предположения о существовании В-клеток, способных к подавлению иммунного ответа, высказывались уже в семидесятые годы прошлого столетия. Группа профессора Джеймса Турка обнаружила, что удаление В-клеток из пула спленоцитов морской свинки приводит к невозможности ингибирования реакции гиперчувствительности замедленного типа (delayed-type hypersensitivity, DTH) [1]. Однако охарактеризовать это наблюдение с молекулярной или биохимической точки зрения на тот момент не представлялось возможным, поэтому исследования были приостановлены. И только спустя 20 лет впервые были достоверно описаны регуляторные

свойства В-клеток при экспериментальном аутоиммунном энцефаломиелите (ЭАЭ) – животной модели рассеянного склероза у человека. Иммунизация генетически модифицированных мышей с делецией В-лимфоцитов (линия В10.PL μ MT) пептидом основного белка миелина (ОБМ) приводила к развитию острой и более тяжелой формы ЭАЭ. Патологический процесс протекал неконтролируемо, не наблюдалось спонтанной ремиссии, характерной для мышей линии В10.PL, продуцирующих зрелые В-клетки [2]. За последние 10 лет в изучении иммуносупрессорных В-клеток достигнут большой прогресс. Стало известно, что регуляторные В-клетки (B regulatory cell, Breg) способны влиять на дифференцировку Т-клеток, смещая ее в сторону регуляторного фенотипа [3]. С тех пор регуляторная функция В-лимфоцитов была показана и на животных моделях аутоиммунного колита, ревматоидного артрита, аутоиммунного диабета и системной красной волчанки (СКВ) [4–6].

МЕХАНИЗМЫ ФУНКЦИОНИРОВАНИЯ РЕГУЛЯТОРНЫХ В-КЛЕТОК

Впервые само понятие регуляторных В-клеток было сформулировано совсем недавно S. Fillatreau [4] при описании вырабатывающих интерлейкин-10

(ИЛ-10) В-клеток (В10-клеток), способных уменьшать клинические проявления ЭАЭ. Как один из противовоспалительных цитокинов, ИЛ-10 регулирует иммунные реакции и влияет в основном на антигенпрезентирующие клетки, уменьшая экспрессию провоспалительных цитокинов и молекул, участвующих в презентации антигена (ГКГС I, ГКГС II, молекулы адгезии и др.), а также ингибирует пролиферацию и CD4⁺ Т-лимфоцитов [5]. Последующие эксперименты по удалению популяции В10-лимфоцитов у мышей также выявили корреляцию с уменьшением количества Treg, ассоциированной к тому же с избыточной пролиферацией провоспалительных Т-клеток после индукции аутоиммунного ответа [6]. Продуцируя ИЛ-10, Breg подавляют дифференцировку Т-хелперных клеток типа 1 (Т helper 1, Th1) и Т-хелперов 17 (Т helper 17, Th17), понижая выработку провоспалительных цитокинов дендритными клетками [7]. Таким образом, выработка ИЛ-10, как наиболее широко изученный В-клеточный регуляторный механизм, часто используется для выявления новых субпопуляций Breg. Тем не менее в последнее время появляется все больше данных и о других механизмах, с помощью которых Breg контролируют развитие иммунного ответа, таких, как выработка TGF- β (трансформирующий фактор роста- β), ИЛ-35, IgM, IgG4, воздействие на Т-лимфоциты путем прямых межклеточных взаимодействий и т.д. (таблица). При этом часто выявляют регуляцию иммунных процессов с использованием одновременно нескольких механизмов – например, путем продукции как ИЛ-10, так и TGF- β , оба из которых по большому счету ингибируют Т-клеточный ответ [8]. Показано, что активированные липополисахаридом (ЛПС) В-клетки, несмотря на повышенный уровень экспрессии ИЛ-10, способствуют апоптозу CD4⁺ и инактивации CD8⁺ эффекторных Т-клеток именно за счет продукции TGF- β [9, 10]. Особое внимание стоит обратить и на ИЛ-35 – еще один охарактеризованный совсем недавно ключевой иммунорегуляторный цитокин, вырабатываемый Breg. У генетически модифицированных мышей, В-клетки которых не экспрессируют субъединицы ИЛ-35, развивалась острая форма ЭАЭ. В случае воспаления, вызванного *Salmonella typhimurium*, отсутствие экспрессии ИЛ-35 В-клетками приводило к увеличению пролиферации Th1 и повышению количества макрофагов в селезенке [11]. В другом независимом исследовании показано, что стимулированные ИЛ-35 В-клетки вырабатывали ИЛ-35 и могли ингибировать экспериментальный увеит при адоптивном переносе [12]. Доказана важная роль Breg в поддержании баланса и функций естественных киллерных Т-лимфоцитов

типа 1 (invariant natural killers, iNKT), необходимых для поддержания толерантности к антигенам организма при аутоиммунных заболеваниях [13].

Как видно из таблицы, упомянутые механизмы действуют в основном на субпопуляции Т-лимфоцитов с провоспалительными свойствами, ингибируя их дифференцировку и развитие, тем не менее наблюдаются и другие эффекты Breg (например, ослабление активации системы комплемента и удаление апоптотических телец), которые в итоге также ведут к снижению силы иммунных реакций [14].

В функционировании Breg принимают участие такие молекулы, как CD40, TLR, В-клеточный рецептор, CD19, CD1d и др. [14]. Мембранный рецептор CD40, активированный соответствующим лигандом (CD40L, присутствующий на мембране эффекторных Т-клеток), способен стимулировать каскадные реакции. Тем самым CD40 вовлечен в развитие В-клеток памяти, переключение классов иммуноглобулинов и формирование герминативных центров. Его участие в функционировании регуляторных В-клеток показано на В-лимфоцитах мыши и человека. Активация В-клеток в присутствии лиганда или активированных Т-клеток инициировала выработку ИЛ-10 и способствовала началу процесса регенерации при ЭАЭ; и наоборот, блокирование рецептора или его элиминация (CD40^{-/-}) делали невозможным синтез ИЛ-10.

Известно, что Толл-подобные рецепторы (TLR) распознают большое разнообразие молекулярных эпитопов и играют важную роль в передаче сигналов во врожденном и адаптивном иммунитете. Стимуляция TLR соответствующими антигенами увеличивает выживаемость мышей в моделях СКВ и ЭАЭ в сравнении с контрольной группой, не получившей стимулирующий агент; при этом наблюдается также уменьшение пролиферации Т-клеток и выделение ими провоспалительных цитокинов [40]. В *in vitro* исследованиях на В-клетках селезенки и периферической крови человека стимуляция антигенами TLR индуцировала выработку ИЛ-10, наибольший эффект вызывала стимуляция липополисахаридом и CpG (лиганды TLR4 и TLR9 соответственно) [22]. Изучена также роль BCR, CD19 и других поверхностных маркеров В-клеток в индукции регуляторного фенотипа. Показано, что активация рецепторов приводит к выработке ИЛ-10, а также к снижению силы клинических проявлений исследуемых заболеваний на животных моделях. Отсутствие же этих молекул заметно нарушает способность В-клеток регулировать иммунные реакции [14]. Повышенный уровень экспрессии В- и Т-лимфоцитарного аттенюатора (BTLA) или лиганда рецептора программиру-

Механизмы функционирования В-регуляторных клеток

Регуляторный механизм	Эффект	Экспериментально подтверждено на В-клетках	
		мыши	человека
Выработка ИЛ-10	Ингибирование пролиферации CD4 ⁺ Т-лимфоцитов	✓ [15]	✓ [3]
	Ингибирование дифференцировки Т-хелперов 1 и 17	✓ [4, 16]	✓ [3, 17]
	Индукция пролиферации Т-регуляторных клеток	✓ [18–21]	✓
	Ингибирование выработки ФНО-α ¹ моноцитами		✓ [22]
	Ингибирование цитотоксической активности Т-лимфоцитов		✓ [23]
	Ингибирование дифференцировки Т-фолликулярных хелперов (Т _{FH}) и В-клеток		✓ [24]
Выработка TGF-β	Ингибирование дифференцировки Т-хелперов 1 и АПК	✓ [9, 11]	
	Индукция пролиферации Т-регуляторных клеток	✓ [24, 25]	✓ [26]
	Регуляция активности макрофагов	✓ [27]	
	Ингибирование дифференцировки Т-фолликулярных хелперов (Т _{FH}) и В-клеток		✓ [24]
Выработка ИЛ-35	Ингибирование активации макрофагов и провоспалительных Т-лимфоцитов	✓ [11]	
Выработка IgM	Индукция удаления апоптотических телец	✓ [28]	
	Подавление аллергического ответа Т-хелперов 2	✓ [29]	
Межклеточные взаимодействия	Ингибирование пролиферации CD4 ⁺ Т-лимфоцитов	✓ [30, 31]	✓ [32]
GITRL ²	Индукция пролиферации Т-регуляторных клеток	✓ [33]	
Выработка IgG4	Ослабление активации системы комплемента		✓ [34]
Экспрессия BTLA ³	Индукция пролиферации и активация Т-регуляторных клеток	✓ [35]	
	BTLA/HVEM ⁴ Взаимодействие?		
	Ингибирование Т-клеточной активации? Ингибирование В-клеточной пролиферации?		✓ [36]
Экспрессия PD-L1 ⁵	Подавление воспалительного ответа путем ингибирования Т-фолликулярных хелперов (Т _{FH}) и уменьшения выработки антител		✓ [37]
	Индукция пролиферации Т-регуляторных клеток?		✓ [38]
	Ингибирование CD8 ⁺ ? Ингибирование CD4 ⁺ ? Ингибирование АПК?		✓ [23, 39]

¹ – ФНО-α, фактор некроза опухолей α;

² – GITRL (glucocorticoid-induced tumor necrosis factor receptor-related ligand) – лиганд глюкокортикоид-индуцированного рецептора фактора некроза опухолей;

³ – BTLA, В- и Т-лимфоцитарный аттенуатор;

⁴ – HVEM (herpes virus entry mediator) – медиатор входа вируса герпеса;

⁵ – PD-L1 (Programmed death-1-ligand) – лиганд программируемой гибели клеток-1.

емой смерти (PD-L1) на определенных популяциях В-регуляторных клеток может приводить к уменьшению воспалительного ответа путем ингибирования эффекторных Т- и В-клеток через взаимодействие с HVEM или PD-рецептором соответственно [23, 35, 41]. Приведенные примеры показывают, насколько улучшилось понимание множественных ролей В-регуляторных клеток при условии, что Breg способны взаимодействовать со многими клетками иммунной системы для обеспечения подавления иммунного ответа (рис. 1). Нарушение функций В-регуляторных клеток и их количества чаще всего связано с аутоиммунными заболеваниями.

Становится понятным, что функционирование данной субпопуляции лимфоцитов должно строго контролироваться организмом, начиная с восприятия ими провоспалительных сигналов в своем микроокружении и заканчивая жестким контролем их дифференцировки и развития. Тем не менее, до сих пор неизвестно, всегда ли субпопуляция Breg присутствует в организме или ее развитие индуцируется сигналами извне. Хотя очевидно, что В-лимфоциты выполняют множество функций и в здоровой иммунной системе, и при заболеваниях, они играют как патологическую, так и защитную роль в аутоиммунных процессах, инфекции и аллергии [42].

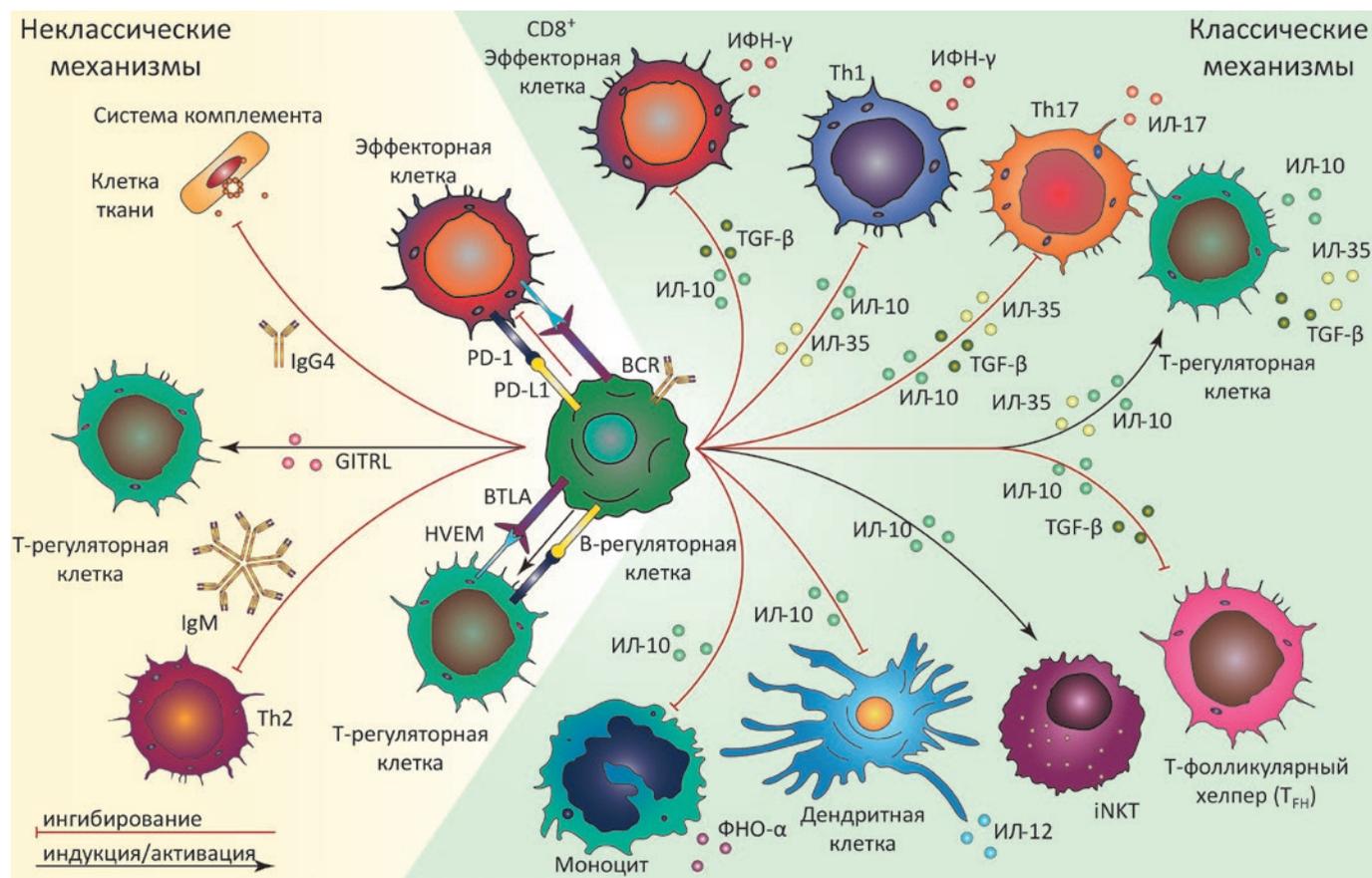


Рис. 1. Механизмы функционирования В-регуляторных клеток, их влияние на клетки иммунной системы. Регуляторные В-клетки продуцируют противовоспалительные цитокины, индуцирующие образование регуляторных Т-клеток и поддерживающие функционирование инвариантных естественных киллерных Т-лимфоцитов (iNKT) – обозначено черными стрелками. Продуцируемые Breg интерлейкины (ИЛ) ингибируют дифференцировку Т-фолликулярных хелперов, Т-хелперов 1 и 17, ингибируют цитотоксическую активность Т-лимфоцитов (CD8⁺), ингибируют выработку провоспалительных цитокинов моноцитами и дендритными клетками (красные стрелки). Также регуляторные В-клетки уменьшают воспаление путем прямого межклеточного контакта, через экспрессию В- и Т- лимфоцитарного аттенюатора (BTLA), лигандов рецептора программируемой смерти (PD-L1), выработкой IgM, IgG4 и др.

ФЕНОТИП И ПРОИСХОЖДЕНИЕ В-РЕГУЛЯТОРНЫХ КЛЕТОК

Другой важный вопрос при изучении В-регуляторных клеток – определение их фенотипа. На сегодняшний день описано множество различающихся субпопуляций Breg, сходных фенотипически и функционально. Обусловлены ли наблюдаемые между этими субпопуляциями отличия влиянием иммунологического окружения или действительно изначально существуют линии В-регуляторных клеток различного происхождения до сих пор не ясно. У мышей популяции В-регуляторных клеток составляют до 5% от общего пула В-клеток в селезенке и лимфатических узлах, при этом при развитии воспалительных ответов (например, при ЭАЭ [43],

индуцированном коллагеном артрите [21] или гельминтозе [44]) их количество значительно возрастает. У мышей выделяют три основных субпопуляции В-регуляторных клеток: T2-MZP (transitional 2 marginal-zone precursor) CD19⁺CD21^{high}CD23^{high}IgM^{high} [31], CD19⁺CD5⁺CD1d^{high} [45], Tim-1⁺ В-клетки [46]. У человека B10-клетки составляют менее 1–2% от общего числа В-клеток крови. Среди Breg человека можно выделить CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi}CD1d^{hi} и CD19⁺CD24^{hi}CD27⁺ [22]. Как связано между собой развитие и дифференцировка данных субпопуляций не установлено. Хотя идентификация выработки ИЛ-10 была хорошим подходом к определению супрессорных В-клеток, многие поверхностные молекулы-маркеры, необходимые для более точной

характеристики субпопуляции, могут по-разному экспрессироваться при активации иммунного ответа, что затрудняет изучение Breg в различных экспериментальных условиях, часто ведущих к изменению фенотипа подтипов Breg. Решением данной проблемы может стать идентификация Breg-специфичного транскрипционного фактора, с помощью которого можно ответить на вопрос, принадлежат ли данные клетки к одной линии развития. На сегодня можно предположить две модели развития Breg. Согласно одной из них, регуляторные В-клетки, подобно Treg, представляют собой обособленную линию В-клеток со специфичным набором факторов контроля экспрессии генов, ответственных за их способность к подавлению иммунных реакций. Вторая теория заключается в том, что в ответ на определенные стимулы В-лимфоциты подвергаются фенотипическим перестройкам для подавления местного воспаления. Несмотря на исследования, проведенные на мышах и человеке, обнаружить специфичный транскрипционный фактор пока не удалось. Невозможность идентификации подобного рода маркеров, а также гетерогенность фенотипов Breg указывают на то, что супрессорные В-клетки не являются отдельной линией развития, т.е. любая В-клетка потенциально может дифференцироваться в регуляторную под воздействием внешних факторов [8]. Показано даже, что в дополнение к ранее описанным субпопуляциям Breg, плазмобласты могут также подавлять воспалительные реакции. У мышей, лишенных плазмобластов путем генетического удаления транскрипционных факторов *Irf4* и *Prdm1* (*Blimp1*), необходимых для дифференцировки плазматических клеток, развивалась острая форма ЭАЭ [7]. Это не первый случай, когда В-клетки, вырабатывающие антитела, выполняют также регуляторную функцию: CD138⁺ плазматические клетки, продуцирующие ИЛ-10 и ИЛ-35, подавляли провоспалительные реакции при ЭАЭ и инфекции, вызванной *Salmonella enterica* [11]. Более того, ранее были описаны B10-клетки в селезенке, которые подвергались дифференцировке в продуцирующие антитела плазмобласты после стимуляции как *in vivo*, так и *in vitro* [47]. Были высказаны идеи о наличии связи между CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} В-клетками, выполняющими регуляторные функции и секретирующими ИЛ-10 плазмобластами у человека. Такое предположение наводит на мысль о сходном векторе дифференцировки – развитии в плазматические клетки – Breg в организме мышей и человека. Идея о том, что вырабатывающие антитела клетки являются также регуляторами иммунных реакций, плохо сочетается с современным представлением о том, что плазматические клетки вызывают воспалительный ответ, продуцируя анти-

тела, которые часто бывают патогенными в контексте аутоиммунных заболеваний или аллергии. Поэтому возможно, что определенная субпопуляция плазмобластов вырабатывает антитела и тем самым поддерживает возможность регуляции воспалительных реакций. Такое предположение подтверждается данными о том, что дефицит *Bcl6* – транскрипционного фактора, необходимого для пролиферации В-клеток в герминальных центрах, не влиял на развитие регуляторных плазмобластов [7].

Согласно недавним исследованиям, незрелые В-клетки, зрелые В-клетки и плазмобласты способны к дифференцировке в ИЛ-10-продуцирующие Breg в организме мышей и человека. Это подтверждает предположение о том, что для дифференцировки регуляторных В-клеток необходим не специфичный транскрипционный фактор, а скорее среда, в которой находится В-лимфоцит. Таким образом, поиск стимулов, необходимых для приобретения В-клеткой регуляторных функций, становится важным для оценки происхождения Breg. Тем не менее, недавно показано, что и провоспалительные цитокины могут вызывать дифференцировку регуляторных В-клеток, вырабатывающих ИЛ-10 [8].

РОЛЬ РЕГУЛЯТОРНЫХ В-КЛЕТОК В РАЗВИТИИ ВОСПАЛИТЕЛЬНОГО ОТВЕТА

Существуют убедительные доказательства того, что количество Breg и их способность к подавлению иммунного ответа возрастают при воспалении. Известно, что они присутствуют у «наивных» мышей, но число их увеличивается при развитии некоторых аутоиммунных заболеваний [31, 48]. Более того, установлено, что Breg участвуют в подавлении воспаления при аутоиммунных патологиях, например, в отсутствие Breg в животной модели РС развиваются более тяжелые и острые формы ЭАЭ [4, 6]. Недавно было показано, что количество регуляторных В-клеток увеличивается в ответ на выделение провоспалительных цитокинов ИЛ-1 β и ИЛ-6 после индукции артрита [49]. Выделение этих цитокинов у мышей с артритом контролируется сообществом бактерий в кишечнике. Ранее роль микробиоты уже была показана при дифференцировке проартритогенных Th17 [50]. У выросших в нестерильных условиях мышей, В-клетки которых не экспрессируют ИЛ-1R1 или ИЛ-6R, развивается острая форма артрита [49]. Таким образом, можно предположить, что пролиферация Breg повышается в ответ на ИЛ-1 β и ИЛ-6 для предотвращения неконтролируемой амплификации провоспалительных лимфоцитов, таких, как Th17. Другие воспалительные цитокины, необходимые для дифференциации фенотипа Th17 – ИЛ-21 и гранулоцитарно-макрофагальный

колониестимулирующий фактор (granulocyte macrophage colony-stimulating factor, GM-CSF) вместе с ИЛ-15, – также играют важную роль в развитии Breg [51, 52]. Идентифицированы различные источники цитокинов, которые могут вызвать повышение выработки ИЛ-10 В-клетками. Миелоидные клетки лимфатических сосудов и селезенки, продуцирующие ИЛ-6 и ИЛ-1 β , ответственны за увеличение количества Breg при артрите, в то время как CD4⁺ Т-клетки селезенки, вырабатывающие ИЛ-21, активируют Breg при экспериментальном артрите [49, 52]. С другой стороны, введение мышам противовоспалительного цитокина ИЛ-35 увеличивало популяцию В-клеток, экспрессирующих ИЛ-10 и ИЛ-35, и тем самым подавляло развитие увеита [53]. Однако стоит учитывать, что ИЛ-35 не экспрессируется постоянно, а индуцируется в ответ на воспаление [54].

Хотя перечисленные цитокины явно играют важную роль в пролиферации Breg, нельзя забывать о том, что при развитии иммунного ответа В-клеточные рецепторы (B-cell receptor, BCR) необходимы также для индукции Breg. У мышей линии MD4, BCR которых специфичен к куриному лизоциму (HEL – hen egg lysozyme), нарушена активация Breg при развитии ЭАЭ. Было показано, что химерные животные с В-клетками MD4 или В-клетками, неспособными к продукции ИЛ-10, развивают более тяжелые формы ЭАЭ и не способны к восстановлению [4]. Также В-клетки MD4 выделяют меньше ИЛ-10, а число самих В10-клеток меньше, чем у мышей дикого типа [45, 55]. О важности правильного узнавания BCR в Breg свидетельствуют результаты, полученные с использованием мышей со специфичной делецией молекул стромального взаимодействия 1 (STIM-1, stromal interaction molecule 1) и STIM-2 в В-клетках. Эти молекулы необходимы для регуляции поступления кальция в цитозоль В-клеток после взаимодействия BCR с антигеном. У мышей, В-лимфоциты которых лишены STIM-1 и STIM-2, наблюдается снижение продукции ИЛ-10 после стимуляции аутоантигеном МОГ (миелин-олигодендроглиоцитарный гликопротеин) [56]. Эти данные показывают, что антигенспецифичное узнавание В-клеточного рецептора важно для функционирования и пролиферации Breg. В ответ на распознавание В-клеточного рецептора при развитии иммунного ответа В-клетки могут дифференцироваться в регуляторные или вырабатывающие антитела клетки.

Значимость воспалительного ответа в дифференцировке Breg поднимает вопрос о месте их созревания. На сегодняшний день в большинстве работ изучали популяции В-клеток в селезенке. Однако Breg выявлены также в лимфатических

сосудах, близких к месту воспаления, при колите и ЭАЭ [7, 48]. Более того, регуляторные В-клетки могут развиваться и приобретать способность к подавлению иммунного ответа вне селезенки, а именно, в лимфатических сосудах (при этом удаление селезенки не влияет на их появление) [7]. Все эти данные поддерживают теорию, согласно которой Breg индуцируются под влиянием воспалительного окружения, что противоречит ранее опубликованным результатам, характеризующим селезенку как основное место развития регуляторных В-клеток.

В-КЛЕТОЧНАЯ РЕГУЛЯЦИЯ В РАЗВИТИИ АУТОИММУННЫХ ПАТОЛОГИЙ

Рассеянный склероз (РС)

Популяция регуляторных В-клеток также участвует в патогенезе РС, занимающего особое место в списке аутоиммунных патологий и являющегося одним из наиболее социально и экономически значимых неврологических заболеваний современности. РС возникает в основном у лиц среднего возраста, за 10–15 лет приводит к практически полной потере трудоспособности, а при недостаточно эффективном и своевременном лечении и к летальному исходу. Длительное время ведущая роль в развитии РС отводилась Т-клеточному звену иммунитета. Однако в настоящее время существует множество данных, указывающих на важную роль В-клеток в патогенезе РС [57, 58]. У пациентов даже обнаружены каталитические антитела, гидролизующие основной белок миеллина – один из знаковых аутоантигенов РС [59, 60]. И хотя этиология РС до сих пор не до конца ясна, в качестве факторов, связанных с его возникновением, наряду с генетической предрасположенностью, гормональным статусом и климатическими условиями, особое внимание уделяется бактериальным и вирусным инфекциям. Считается, что молекулярная мимикрия и кросс-реактивность могут лежать в основе механизмов вирусной индукции заболевания. Еще в 2003 г. было показано кросс-реактивное узнавание моноклональным Т-клеточным рецептором ядерного антигена вируса Эпштейна–Барр (EBNA) и аутоантигенного пептида основного белка миеллина (ОБМ) [61]. Позже обнаружили и подтвердили наличие кросс-реактивности и у аутоантител к белку LMP1 вируса Эпштейна–Барр и ОБМ [62, 63]. При ЭАЭ Breg могут ингибировать аутоиммунные Т-клеточные ответы, замедляя дифференцировку провоспалительных Т-хелперов 1, специфичных к аутоантигенам ЦНС [57]. Отсутствие же Breg приводит к обострению реакций иммунной системы. Как уже упоминалось ранее, у мышей с ЭАЭ, лишенных В10-клеток,

развивалась острая форма болезни без ремиссии [4]. Регуляторные функции В-клеток, вырабатывающих ИЛ-10, подтверждены результатами исследования, в котором адоптивный перенос В-клеток дикого типа уменьшал тяжесть проявлений ЭАЭ, в отличие от переноса В-лимфоцитов ИЛ-10^{-/-} от мышей линии μMT. В данном эксперименте В-клетки мышей первой группы вырабатывали ИЛ-10. Недавно охарактеризовали связь между В- и Т-регуляторными клетками в развитии патологии при ЭАЭ [43]. Адоптивно перенесенные В10-клетки действительно прямо влияли на патогенез ЭАЭ, как и в работе М. Янга [64] при этом их количество увеличивалось в селезенке, но не в ЦНС,

что соответствует представлениям о наличии у них регуляторных функций. Более того, перенос активированных антигеном В10-клеток в мышью дикого типа сильно замедлял инициацию ЭАЭ, однако В10-лимфоциты не могли ингибировать дальнейшую прогрессию ЭАЭ. В то же время количество регуляторных Т-клеток в ЦНС заметно увеличивалось при развитии заболевания, и этот процесс влиял на течение ЭАЭ на поздних стадиях. На основании этих данных можно предположить, что Breg играют ведущую роль на ранних стадиях болезни, в то время как Treg выполняют регуляторные функции при дальнейшем развитии заболевания.

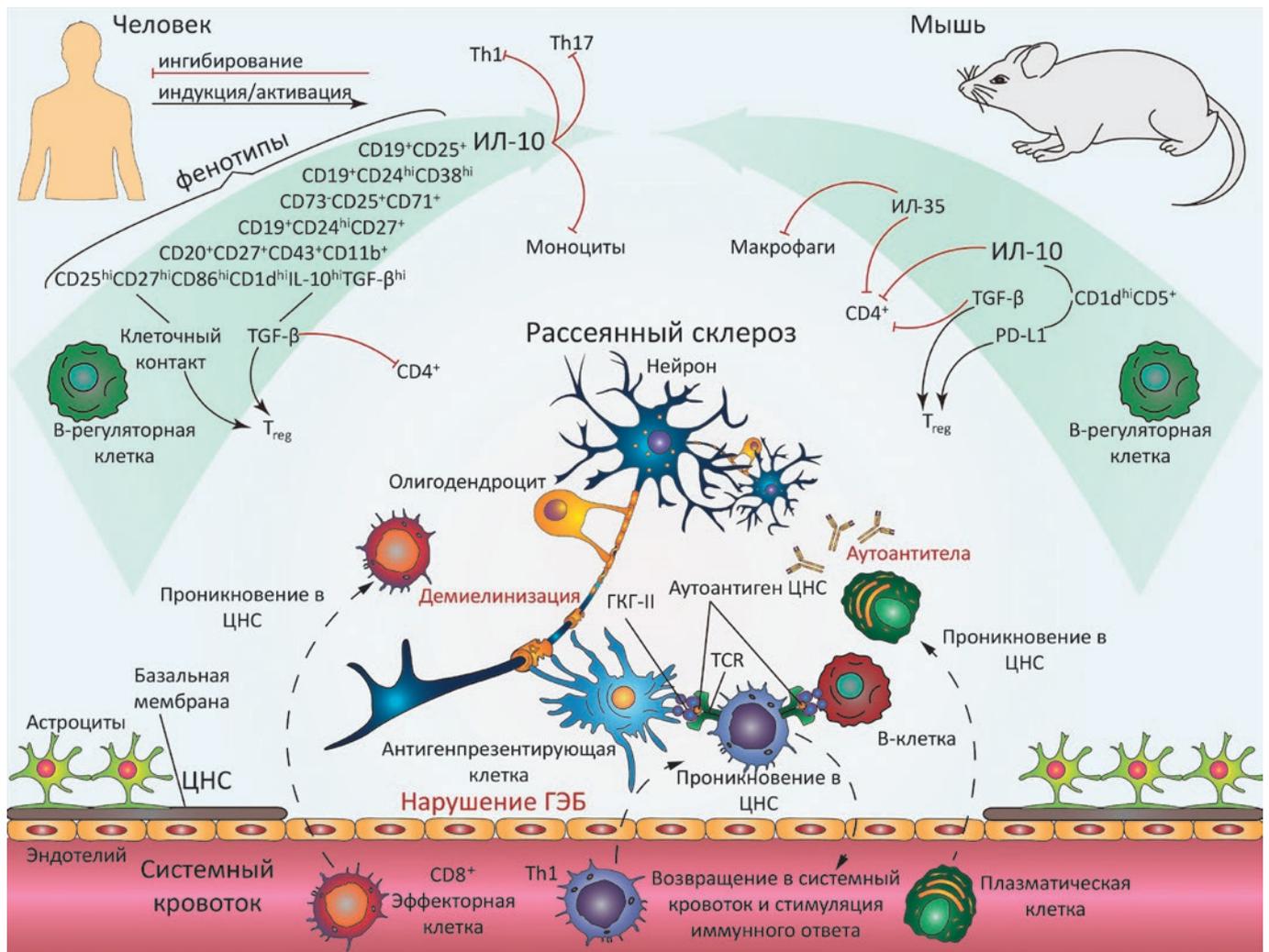


Рис. 2. Участие регуляторных В-клеток в патогенезе рассеянного склероза. При развитии заболевания В-клеточное звено наряду с продукцией аутоантител, презентацией аутоантигенов и активацией Т-клеточного ответа способно подавлять развитие аутоиммунной реакции. В мышинных моделях и у пациентов с РС выявлены различные субпопуляции регуляторных В-клеток с соответствующими поверхностными маркерами. В большинстве случаев иммуносупрессирующая функция Breg выполняется за счет продукции ИЛ-10, ИЛ-35, TGF-β и прямых межклеточных взаимодействий

На модели ЭАЭ показано, что регуляторные В-клетки вовлечены в развитие патологического процесса. Уровни продукции ИЛ-10 В-лимфоцитами периферической крови больных РС впервые были определены в 2007 г. [65]. Как в группе с рецидивно-ремиттирующим, так и со вторично-прогрессирующим РС выявлен значительно более низкий уровень выработки ИЛ-10 В-клетками, стимулированными в присутствии лиганда CD40, чем у здоровых доноров. Аналогичный эффект наблюдали при стимуляции В-клеток CpG [66]. Таким образом, установлено нарушение выработки ИЛ-10 и функций регуляторных В-клеток из периферической крови пациентов РС. Показано, что, помимо продукции ИЛ-10, регуляторные В-клетки вовлечены в развитие РС путем продукции ИЛ-35 и TGF- β , а также способны увеличивать экспрессию Foxp3 и CTLA-4 в регуляторных Т-клетках в результате прямого клеточного контакта [11, 32].

Таким образом, В-клетки могут выполнять двойственные функции в развитии процесса демиелинизации (возможно как положительное, так и отрицательное влияние на иммунные реакции), однако их роль в патогенезе РС хорошо прослеживается (рис. 2).

Системная красная волчанка (СКВ)

Системная красная волчанка – хроническое аутоиммунное заболевание соединительной ткани, характеризующееся широким спектром клинических проявлений. Опасность СКВ заключается в возможности одновременного поражения многих жизненно важных органов, что приводит либо к смерти, либо к хроническому ухудшению здоровья [67]. На разных стадиях заболевания, зачастую еще до возникновения клинических симптомов, наблюдается повышение титра аутореактивных антител, таких, как анти-ДНК-, анти-ядерные-, анти-Ro-, анти-La-, анти-Sm-, анти-RNP- и анти-фосфолипидные антитела [68, 69]. При этом обнаружение аутореактивных антител не считается достаточным критерием для начала развития заболевания, следовательно, важную роль могут играть и другие факторы – генетические и экзогенные [67]. Причины СКВ до сих пор неясны, хотя существующая точка зрения о большом вкладе апоптоза в патогенез позволяет объяснить, почему иммунная система реагирует преимущественно на внутренние антигены. Аутоантигены высвобождаются клетками, которые подверглись апоптозу и некрозу. Нарушения в устранении апоптотических клеток, описанные при данном заболевании, могут приводить к их аномальному поглощению макрофагами. Те, в свою очередь, представляют ранее внутриклеточные антигены Т- и В-клеткам, запуская тем самым аутоиммунный процесс [70]. Цитокиновый

статус организма также влияет на развитие заболевания. У большинства пациентов с активной формой СКВ наблюдается повышение экспрессии интерферона-альфа (ИФН- α), который может усиливать функционирование антигенпрезентирующих клеток и активацию Т-клеток [71].

Известно, что регуляторные В-клетки важны для подавления СКВ (рис. 3). На мышинных моделях показано, что две независимые популяции регуляторных В-клеток – CD1d^{hi}CD5⁺ и CD21^{hi}CD23^{hi} T2 MZP – играют защитную роль при развитии заболевания, а их активация способствует выживанию животных [20, 72]. При этом вопрос о участии регуляторных В-клеток в патогенезе СКВ у человека остается открытым. Показано, что количество регуляторных В-клеток при развитии патологии возрастает [22] и даже коррелирует с тяжестью заболевания [73]. Однако противовоспалительное функционирование популяции CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} нарушается по мере развития заболевания [17].

Ревматоидный артрит (РА)

Ревматоидный артрит – заболевание с неизвестной этиологией, которое проявляется поражением соединительной ткани и суставов в результате аутоиммунного воспалительного ответа. В патогенезе ревматоидного артрита участвует множество клеток иммунной системы, а также различные цитокины и метаболиты арахидоновой кислоты. Роль В-клеток в данном заболевании ассоциируется прежде всего с продукцией аутоантител к Fc-домену IgG (ревматоидные факторы), а также аутоантител к циклическому цитруллинированному пептиду, карбамиллированным белкам и др. [74, 75]. Роль же регуляторных В-клеток долгое время оставалась недостаточно изученной.

Основными эффекторными молекулами регуляторных В-клеток при развитии РА являются ИЛ-10, ИЛ-35, а также TGF- β . ИЛ-10 – типичный противовоспалительный цитокин, его влияние на течение ревматоидного артрита принято считать благоприятным, так как он ингибирует действие аутоиммунных Th17 и снижает продукцию ИЛ-17 клетками иммунной системы, препятствуя разрушению сустава [76–79]. ИЛ-35 – еще один иммуносупрессорный цитокин, однако данные о его влиянии на течение ревматоидного артрита противоречивы. В одних исследованиях выявлено протективное действие ИЛ-35 на развитие РА путем уменьшения продукции ИЛ-17 и ИФН- γ , а также ингибирования VEGF [80, 81]. В других предполагается, что ИЛ-35 обладает провоспалительным действием и напрямую участвует в патогенезе данного заболевания, причем его концентрация в плазме крови снижается при лечении

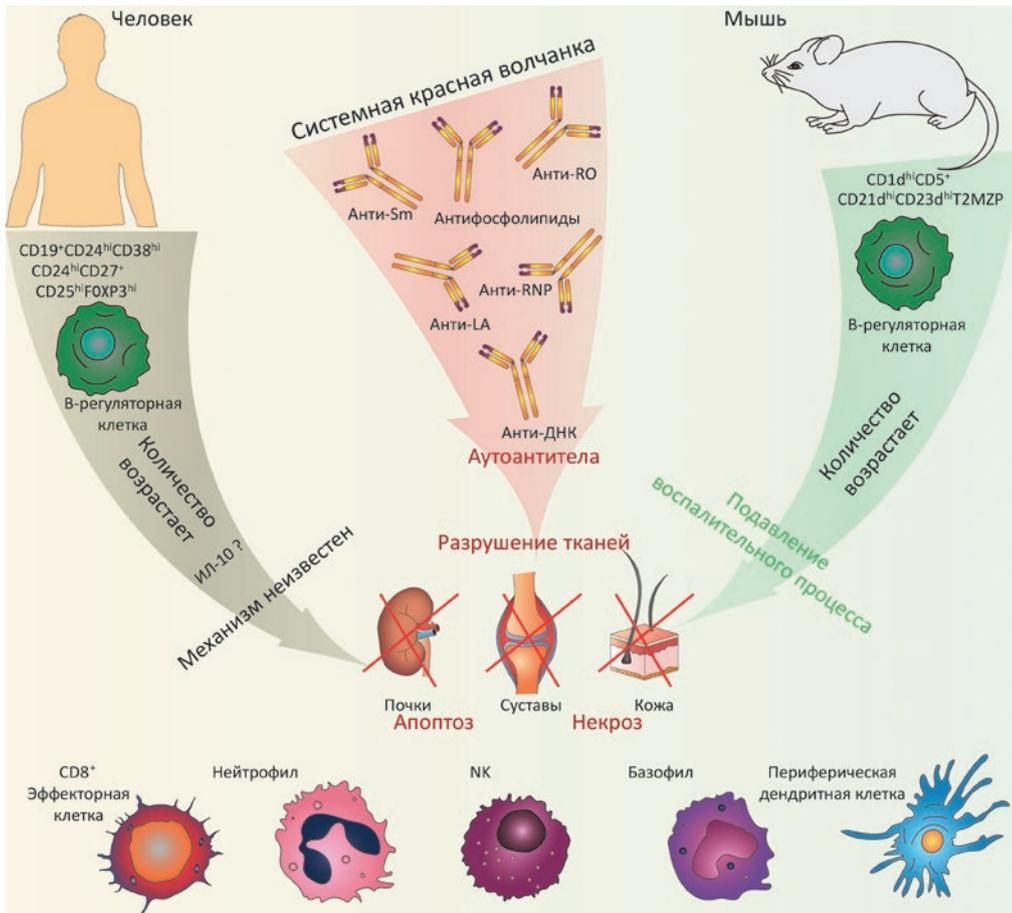


Рис. 3. Участие регуляторных В-клеток в развитии системной красной волчанки. При развитии заболевания В-клетки наряду с продукцией аутоантител к внутриядерным аутоантигенам участвуют и в регуляции аутоиммунного воспаления. В мышинных моделях и у пациентов с СКВ выявлены различные субпопуляции регуляторных В-клеток с соответствующими поверхностными маркерами, количество которых увеличивается в ходе болезни. В животных моделях выявлена протективная роль Breg. У больных СКВ механизм участия Breg в развитии воспаления пока полностью не известен

[82, 83]. Действие TGF- β нельзя назвать однозначно иммуносупрессорным и благоприятным при РА, хотя этот цитокин и характерен, например, для регуляторных Т-клеток и усиливает экспрессию их основного регулятора – транскрипционного фактора FOXP3 [84]. На животных моделях РА (коллаген-индуцированный артрит у мышей и крыс, иммунизированных коллагеном типа 2, а также трансгенные по ФНО- α мыши) обнаружено значительное повышение уровня TGF- β по сравнению с неиммунизированными контрольными животными. Более того, повышение количества данного цитокина сопровождалось привлечением и неправильной дифференцировкой мезенхимальных стволовых клеток и преостеобластов в субхондральной зоне костного мозга, что способствовало дегенерации сустава. При этом ингибирование TGF- β уменьшало количество этих клеток в данной зоне, снижало гипертрофию хондроцитов и замедляло деграцию сустава [85]. Однако в аналогичном исследовании ингибирование TGF- β в мышинной модели РА (коллаген-индуцированный артрит) практически ни на что не влияло. При этом в лимфоидных клетках из образцов тканей пациен-

тов с РА была зафиксирована повышенная активность этого цитокина [86]. В параллельных исследованиях показано, что у пациентов с РА количество регуляторных клеток CD19(+)TGF β (+) Bregs ниже, чем у здоровых доноров [87].

Оценка прямого влияния регуляторных В-клеток на течение ревматоидного артрита является непростой задачей, так как при РА, как и при других аутоиммунных заболеваниях, существуют популяции Breg, которые различаются поверхностными маркерами. При этом, по-видимому, фенотипически различные Breg могут выполнять разные функции в патогенезе РА (рис. 4). Показано, что уровень CD19⁺CD5⁺CD1d^{hi} снижен при РА. При этом гранзимпродуцирующие В-клетки CD19⁺CD5⁺GzmB⁺ могут быть участниками патогенеза данного заболевания [88]. Обнаружено, что уровень ИЛ-10⁺ В-клеток при ревматоидном артрите остается таким же, как у здоровых доноров. Однако индукция таких клеток из CD19⁺ В-лимфоцитов, отобранных у больных пациентов, при помощи CpG дезоксиолигонуклеотида и CD40L происходит легче, чем у здоровых доноров. При этом обнаружена отрица-

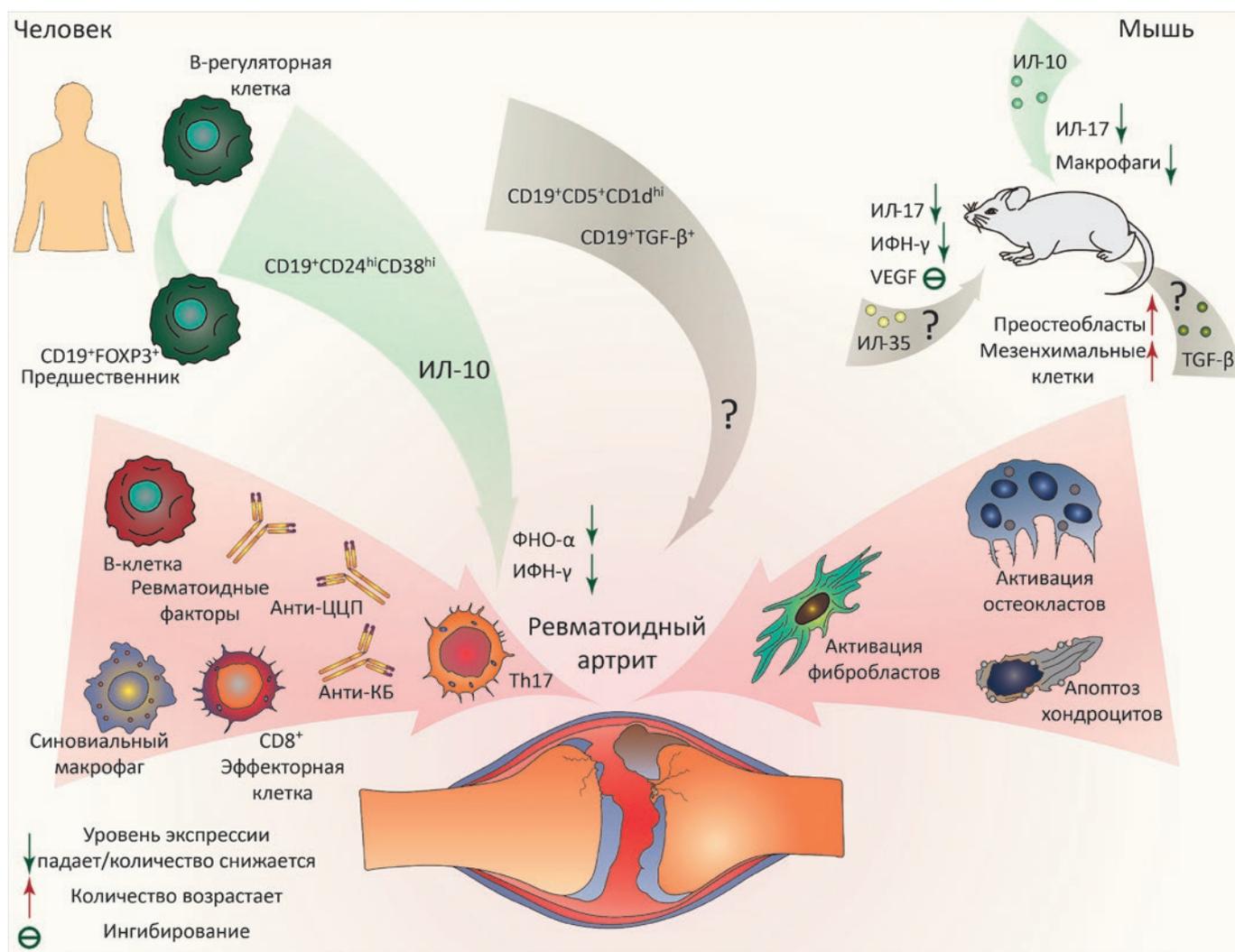


Рис. 4. Участие регуляторных В-клеток в развитии ревматоидного артрита. При развитии РА В-клетки наряду с продукцией аутоантител участвуют и в регуляции аутоиммунного воспаления. У пациентов с РА обнаружены три основных субпопуляции регуляторных В-клеток. $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ участвуют в подавлении воспалительного ответа путем ингибирования активности Th17 и снижения уровня ИФН- γ и ФНО- α ИЛ-10-зависимым путем. Механизм и роль субпопуляций $CD19^+CD5^+CD1d^{hi}$ и $CD19^+TGF-\beta^+$ в развитии РА до сих пор точно не установлены. На животных моделях показана протективная роль ИЛ-10. Участие ИЛ-35 и TGF- β остается под вопросом

тельная корреляция между количеством индуцированных ИЛ-10⁺ В-клеток и тяжестью заболевания согласно индексу DAS28 (disease activity score in 28 joints) [89]. Анализ потенциальных предшественников ИЛ-10⁺ В-клеток – популяций $CD19^+TGF-\beta^+$ и $CD19^+FOXP3^+$, выявил снижение численности обеих популяций у пациентов с ревматоидным артритом. Однако только FOXP3⁺-популяция обратно коррелировала с тяжестью заболевания [87]. Показано также, что ИЛ-10⁺ В-клетки нельзя рассматривать как отдельную популяцию, а число таких клеток обратно коррелирует с тяжестью заболевания,

особенно, в течение первых 5 лет после постановки диагноза [90]. Обнаружено, что $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ В-клетки ингибируют продукцию ИФН- γ и ФНО- α CD4⁺ Т-клетками. Более того, $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ препятствуют дифференцировке CD4⁺ Т-клеток в Th1 и Th17, ассоциированные с ревматоидным артритом. Количество регуляторных В-клеток этого фенотипа снижено в активной фазе заболевания [3]. Противоречивые результаты получены при изучении $CD19^+CD24^{hi}CD38^{hi}$ В-клеток. Уровень этих клеток повышен при ревматоидном артритом, что опять же указывает на разнообра-

зие регуляторных В-клеток и их различные функции [91]. Отметим, что повышение концентрации клеток нельзя однозначно расценивать как сигнал того, что они способствуют прогрессии заболевания, поскольку это можно трактовать как компенсаторную реакцию организма. Предполагается, что ИЛ-10⁺ В-клетки составляют часть популяции CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} В-клеток, и эти данные соответствуют ранее полученным результатам [17, 91]. Если сравнивать популяцию CD19⁺CD24^{hi}CD38^{hi} со всеми CD19⁺ В-клетками, то в этой популяции повышено количество ИЛ-10-продуцирующих клеток [17, 91]. Не найдено закономерности между уровнем ИЛ-10⁺ В-клеток и концентрацией провоспалительных цитокинов в сыворотке больных ревматоидным артритом, но количество этих клеток обратно пропорционально длительности симптомов и числу пораженных (опухших) суставов. Отметим обнаруженную гетерогенность ИЛ-10⁺ В-клеток, часть которых продуцировала меньше ИЛ-10 и слабее ингибировала пролиферацию CD3⁺ лимфоцитов [91].

Общая картина исследований регуляторных В-клеток при РА скорее свидетельствует о их иммуносупрессорной роли. Однако, принимая во внимание результаты описанных выше работ, можно сделать вывод, что регуляторные В-клетки весьма гетерогенны (даже в рамках одной популяции) и далеко не всегда однозначно влияют на течение ревматоидного артрита. Проведение дополнительных исследований позволит точно сказать о функции регуляторных В-клеток в патогенезе ревматоидного артрита. Отметим, что оценка влияния этих клеток затрудне-

на не только их гетерогенностью, но также их малым числом и комплексным действием их эффекторных молекул.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последнее десятилетие ключевая роль регуляторных элементов В-клеточного звена в поддержании иммунотолерантности, контроле и подавлении воспалительного ответа была подтверждена в многочисленных независимых исследованиях. Некоторая разрозненность данных и отсутствие однозначного фенотипического портрета этих клеток во многом обусловлены большой гетерогенностью их субпопуляций. Несмотря на множество вопросов о точном механизме регуляции, очевидно, что нарушения в количестве и функционировании Breg могут приводить к возникновению целого ряда иммунологических патологий, среди которых особенно выделяется рак, аутоиммунные и хронические инфекционные заболевания. Таким образом, дальнейшее выяснение роли В-клеточного звена в регуляции воспалительного ответа поможет не только понять этиологию аутоиммунных патологий, но и разработать подходы к терапевтическому использованию регуляторных В-клеток. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 17-74-30019 «Структурные и кинетические особенности презентации антигенов как ключ к пониманию механизмов индукции аутоиммунных патологий и лимфогенезиса».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Katz S.I., Parker D., Turk J.L. // Nature. 1974. V. 251. № 5475. P. 550–551.
- Wolf S.D., Dittel B.N., Hardardottir F., Janeway C.A. // J. Exp. Med. 1996. V. 184. № 6. P. 2271–2278.
- Flores-Borja F., Bosma A., Ng D., Reddy V., Ehrenstein M.R., Isenberg D.A., Mauri C. // Sci. Transl. Med. 2013. V. 5. № 173. P. 173ra123.
- Fillatreau S., Sweeney C.H., McGeachy M.J., Gray D., Anderson S.M. // Nat. Immunol. 2002. V. 3. № 10. P. 944–950.
- Couper K.N., Blount D.G., Riley E.M. // J. Immunol. 2008. V. 180. № 9. P. 5771–5777.
- Carter N.A., Vasconcellos R., Rosser E.C., Tulone C., Muñoz-Suano A., Kamanaka M., Ehrenstein M.R., Flavell R.A., Mauri C. // J. Immunol. 2011. V. 186. № 10. P. 5569–5579.
- Matsumoto M., Baba A., Yokota T., Nishikawa H., Ohkawa Y., Kayama H., Kallies A., Nutt S.L., Sakaguchi S., Takeda K., et al. // Immunity. 2014. V. 41. № 6. P. 1040–1051.
- Rosser E.C., Mauri C. // Immunity. 2015. V. 42. № 4. P. 607–612.
- Tian J., Zekzer D., Hanssen L., Lu Y., Olcott A., Kaufman D.L. // J. Immunol. 2001. V. 167. № 2. P. 1081–1089.
- Parekh V.V., Prasad D.V., Banerjee P.P., Joshi B.N., Kumar A., Mishra G.C. // J. Immunol. 2003. V. 170. № 12. P. 5897–5911.
- Shen P., Roch T., Lampropoulou V., O'Connor R.A., Stervbo U., Hilgenberg E., Ries S., Dang V.D., Jaimes Y., Daridon C., et al. // Nature. 2014. V. 507. № 7492. P. 366–370.
- Wang R.X., Yu C.R., Dambuza I.M., Mahdi R.M., Dolinska M.B., Sergeev Y.V., Wingfield P.T., Kim S.H., Egwuagu C.E. // Nat. Med. 2014. V. 20. № 6. P. 633–641.
- Bosma A., Abdel-Gadir A., Isenberg D.A., Jury E.C., Mauri C. // Immunity. 2012. V. 36. № 3. P. 477–490.
- Rincón-Arévalo H., Sanchez-Parra C.C., Castaño D., Yassin L., Vásquez G. // Int. Rev. Immunol. 2016. V. 35. № 2. P. 156–176.
- Wei B., Velazquez P., Turovskaya O., Spricher K., Aranda R., Kronenberg M., Birnbaumer L., Braun J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2005. V. 102. № 6. P. 2010–2015.
- Lampropoulou V., Hoehlig K., Roch T., Neves P., Calderón Gómez E., Sweeney C.H., Hao Y., Freitas A.A., Steinhoff U., Anderson S.M., et al. // J. Immunol. 2008. V. 180. № 7. P. 4763–4773.
- Blair P.A., Noreña L.Y., Flores-Borja F., Rawlings D.J., Isenberg D.A., Ehrenstein M.R., Mauri C. // Immunity. 2010. V. 32. № 1. P. 129–140.
- Mann M.K., Maresz K., Shriver L.P., Tan Y., Dittel B.N. // J. Immunol. 2007. V. 178. № 6. P. 3447–3456.
- Wei B., McPherson M., Turovskaya O., Velazquez P.,

- Fujiwara D, Brewer S, Braun J. // *Clin. Immunol.* 2008. V. 127. № 3. P. 303–312.
20. Watanabe R., Ishiura N., Nakashima H., Kuwano Y., Okochi H., Tamaki K., Sato S., Tedder T.F., Fujimoto M. // *J. Immunol.* 2010. V. 184. № 9. P. 4801–4809.
21. Mauri C., Gray D., Mushtaq N., Londei M. // *J. Exp. Med.* 2003. V. 197. № 4. P. 489–501.
22. Iwata Y., Matsushita T., Horikawa M., Dilillo D.J., Yanaba K., Venturi G.M., Szabolcs P.M., Bernstein S.H., Magro C.M., Williams A.D., et al. // *Blood.* 2011. V. 117. № 2. P. 530–541.
23. Siewe B., Wallace J., Rygielski S., Stapleton J.T., Martin J., Deeks S.G., Landay A. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 4. P. e92934.
24. Huang X., Moore D.J., Mohiuddin M., Lian M.M., Kim J.I., Sonawane S., Wang J., Gu Y., Yeh H., Markmann J.F., et al. // *Transplantation.* 2008. V. 85. № 5. P. 675–680.
25. Lee K.M., Stott R.T., Zhao G., SooHoo J., Xiong W., Lian M.M., Fitzgerald L., Shi S., Akrawi E., Lei J., et al. // *Eur. J. Immunol.* 2014. V. 44. № 6. P. 1728–1736.
26. Nouël A., Pochard P., Simon Q., Ségalen I., Le Meur Y., Pers J.O., Hillion S. // *J. Autoimmun.* 2015. V. 59. P. 53–60.
27. Reyes J.L., Wang A., Fernando M.R., Graepel R., Leung G., van Rooijen N., Sigvardsson M., McKay D.M. // *J. Immunol.* 2015. V. 194. № 1. P. 364–378.
28. Mizoguchi A., Mizoguchi E., Smith R.N., Preffer F.I., Bhan A.K. // *J. Exp. Med.* 1997. V. 186. № 10. P. 1749–1756.
29. Shimomura Y., Mizoguchi E., Sugimoto K., Kibe R., Benno Y., Mizoguchi A., Bhan A.K. // *Int. Immunol.* 2008. V. 20. № 6. P. 729–737.
30. Yanaba K., Bouaziz J.D., Haas K.M., Poe J.C., Fujimoto M., Tedder T.F. // *Immunity.* 2008. V. 28. № 5. P. 639–650.
31. Evans J.G., Chavez-Rueda K.A., Eddaoudi A., Meyer-Bahlburg A., Rawlings D.J., Ehrenstein M.R., Mauri C. // *J. Immunol.* 2007. V. 178. № 12. P. 7868–7878.
32. Kessel A., Haj T., Peri R., Snir A., Melamed D., Sabo E., Toubi E. // *Autoimmun. Rev.* 2012. V. 11. № 9. P. 670–677.
33. Ray A., Basu S., Williams C.B., Salzman N.H., Dittel B.N. // *J. Immunol.* 2012. V. 188. № 7. P. 3188–3198.
34. van de Veen W., Stanic B., Yaman G., Wawrzyniak M., Söllner S., Akdis D.G., Rückert B., Akdis C.A., Akdis M. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2013. V. 131. № 4. P. 1204–1212.
35. Huarte E., Jun S., Rynda-Apple A., Golden S., Jackiw L., Hoffman C., Maddaloni M., Pascual D.W. // *J. Immunol.* 2016. V. 196. № 12. P. 5036–5046.
36. Piancone F., Saresella M., Marventano I., La Rosa F., Zoppis M., Agostini S., Longhi R., Caputo D., Mendozzi L., Rovaris M., et al. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 29699.
37. Khan A.R., Hams E., Floudas A., Sparwasser T., Weaver C.T., Fallon P.G. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 5997.
38. Guan H., Wan Y., Lan J., Wang Q., Wang Z., Li Y., Zheng J., Zhang X., Shen Y., Xie F. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 35651.
39. Siewe B., Stapleton J. T., Martinson J., Keshavarzian A., Kazmi N., Demarais P.M., French A.L., Landay A. // *J. Leukoc. Biol.* 2013. V. 93. № 5. P. 811–818.
40. Buenafe A.C., Bourdette D.N. // *J. Neuroimmunol.* 2007. V. 182. № 1–2. P. 32–40.
41. Xiao X., Lao X.M., Chen M.M., Liu R.X., Wei Y., Ouyang F.Z., Chen D.P., Zhao X.Y., Zhao Q., Li X. F., et al. // *Cancer Discov.* 2016. V. 6. № 5. P. 546–559.
42. Bao Y., Cao X. // *J. Autoimmun.* 2014. V. 55. P. 10–23.
43. Matsushita T., Horikawa M., Iwata Y., Tedder T.F. // *J. Immunol.* 2010. V. 185. № 4. P. 2240–2252.
44. Mangan N.E., van Rooijen N., McKenzie A.N., Fallon P.G. // *J. Immunol.* 2006. V. 176. № 1. P. 138–147.
45. Yanaba K., Bouaziz J.D., Matsushita T., Tsubata T., Tedder T.F. // *J. Immunol.* 2009. V. 182. № 12. P. 7459–7472.
46. Ding Q., Yeung M., Camirand G., Zeng Q., Akiba H., Yagita H., Chalasani G., Sayegh M.H., Najafian N., Rothstein D.M. // *J. Clin. Invest.* 2011. V. 121. № 9. P. 3645–3656.
47. Maseda D., Smith S.H., DiLillo D.J., Bryant J.M., Candando K.M., Weaver C.T., Tedder T.F. // *J. Immunol.* 2012. V. 188. № 3. P. 1036–1048.
48. Mizoguchi A., Mizoguchi E., Takedatsu H., Blumberg R.S., Bhan A.K. // *Immunity.* 2002. V. 16. № 2. P. 219–230.
49. Rosser E.C., Oleinika K., Tonon S., Doyle R., Bosma A., Carter N.A., Harris K.A., Jones S.A., Klein N., Mauri C. // *Nat. Med.* 2014. V. 20. № 11. P. 1334–1339.
50. Wu H.J., Ivanov I.L., Darce J., Hattori K., Shima T., Umesaki Y., Littman D.R., Benoist C., Mathis D. // *Immunity.* 2010. V. 32. № 6. P. 815–827.
51. Rafei M., Hsieh J., Zehntner S., Li M., Forner K., Birman E., Boivin M.N., Young Y.K., Perreault C., Galipeau J. // *Nat. Med.* 2009. V. 15. № 9. P. 1038–1045.
52. Yoshizaki A., Miyagaki T., DiLillo D. J., Matsushita T., Horikawa M., Kountikov E.I., Spolski R., Poe J.C., Leonard W.J., Tedder T.F. // *Nature.* 2012. V. 491. № 7423. P. 264–268.
53. Wang B., Dai S., Dong Z., Sun Y., Song X., Guo C., Zhu F., Wang Q., Zhang L. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 1. P. e87787.
54. Li X., Mai J., Virtue A., Yin Y., Gong R., Sha X., Gutchigian S., Frisch A., Hodge I., Jiang X., et al. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 3. P. e33628.
55. Miles K., Heaney J., Sibinska Z., Salter D., Savill J., Gray D., Gray M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 3. P. 887–892.
56. Matsumoto M., Fujii Y., Baba A., Hikida M., Kurosaki T., Baba Y. // *Immunity.* 2011. V. 34. № 5. P. 703–714.
57. von Büdingen H.C., Palanichamy A., Lehmann-Horn K., Michel B.A., Zamvil S.S. // *Eur. Neurol.* 2015. V. 73. № 3–4. P. 238–246.
58. Blauth K., Owens G.P., Bennett J.L. // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. P. 565.
59. Ponomarenko N.A., Durova O.M., Vorobiev I.I., Belogurov A.A., Kurkova I.N., Petrenko A.G., Telegin G.B., Suchkov S.V., Kiselev S.L., Lagarkova M.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 2. P. 281–286.
60. Belogurov A.A., Kurkova I.N., Friboulet A., Thomas D., Misikov V.K., Zakharova M., Suchkov S.V., Kotov S.V., Alehin A.I., Avalle B., et al. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. № 2. P. 1258–1267.
61. Wekerle H., Hohlfeld R. // *N. Engl. J. Med.* 2003. V. 349. № 2. P. 185–186.
62. Lomakin Y., Arapidi G.P., Chernov A., Ziganshin R., Tcyganov E., Lyadova I., Butenko I.O., Osetrova M., Ponomarenko N., Telegin G., et al. // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. P. 777.
63. Gabibov A.G., Belogurov A.A., Lomakin Y.A., Zakharova M.Y., Avakyan M.E., Dubrovskaya V.V., Smirnov I.V., Ivanov A.S., Molnar A.A., Gurtsevitch V.E., et al. // *FASEB J.* 2011. V. 25. № 12. P. 4211–4221.
64. Yang M., Deng J., Liu Y., Ko K.H., Wang X., Jiao Z., Wang S., Hua Z., Sun L., Srivastava G., et al. // *Am. J. Pathol.* 2012. V. 180. № 6. P. 2375–2385.
65. Duddy M., Niino M., Adatia F., Hebert S., Freedman M., Atkins H., Kim H.J., Bar-Or A. // *J. Immunol.* 2007. V. 178. № 10. P. 6092–6099.
66. Hirotani M., Niino M., Fukazawa T., Kikuchi S., Yabe I., Hamada S., Tajima Y., Sasaki H. // *J. Neuroimmunol.* 2010. V. 221. № 1–2. P. 95–100.
67. D’Cruz D.P., Khamashta M.A., Hughes G.R. // *Lancet.* 2007. V. 369. № 9561. P. 587–596.
68. Arbuckle M.R., McClain M.T., Rubertone M.V., Scofield R.H.,

- Dennis G.J., James J.A., Harley J.B. // *N. Engl. J. Med.* 2003. V. 349. № 16. P. 1526–1533.
69. McClain M.T., Arbuckle M.R., Heinlen L.D., Dennis G.J., Roebuck J., Rubertone M.V., Harley J.B., James J.A. // *Arthritis Rheum.* 2004. V. 50. № 4. P. 1226–1232.
70. Munoz L.E., Gaipl U.S., Franz S., Sheriff A., Voll R.E., Kalden J.R., Herrmann M. // *Rheumatology (Oxford)*. 2005. V. 44. № 9. P. 1101–1107.
71. Hua J., Kirou K., Lee C., Crow M.K. // *Arthritis Rheum.* 2006. V. 54. № 6. P. 1906–1916.
72. Blair P.A., Chavez-Rueda K.A., Evans J.G., Shlomchik M.J., Eddaoudi A., Isenberg D.A., Ehrenstein M.R., Mauri C. // *J. Immunol.* 2009. V. 182. № 6. P. 3492–3502.
73. Vadasz Z., Peri R., Eiza N., Slobodin G., Balbir-Gurman A., Toubi E. // *J. Immunol. Res.* 2015. V. 2015. Article ID 254245.
74. Burmester G.R., Feist E., Dörner T. // *Nat. Rev. Rheumatol.* 2014. V. 10. № 2. P. 77–88.
75. Verheul M.K., Fearon U., Trouw L.A., Veale D.J. // *Clin. Immunol.* 2015. V. 161. № 1. P. 2–10.
76. Ye L., Wen Z., Li Y., Chen B., Yu T., Liu L., Zhang J., Ma Y., Xiao S., Ding L., et al. // *Arthritis Res. Ther.* 2014. V. 16. № 2. P. R96.
77. Heo Y.J., Joo Y.B., Oh H.J., Park M.K., Heo Y.M., Cho M.L., Kwok S.K., Ju J.H., Park K.S., Cho S.G., et al. // *Immunol. Lett.* 2010. V. 127. № 2. P. 150–156.
78. Greenhill C.J., Jones G.W., Nowell M.A., Newton Z., Harvey A.K., Moideen A.N., Collins F.L., Bloom A.C., Coll R.C., Robertson A.A., et al. // *Arthritis Res. Ther.* 2014. V. 16. № 4. P. 419.
79. Verhoef C.M., van Roon J.A., Vianen M.E., Bijlsma J.W., Lafeber F.P. // *J. Rheumatol.* 2001. V. 28. № 9. P. 1960–1966.
80. Nakano S., Morimoto S., Suzuki S., Tsushima H., Yamanaka K., Sekigawa I., Takasaki Y. // *Rheumatology (Oxford)*. 2015. V. 54. № 8. P. 1498–1506.
81. Wu S., Li Y., Yao L., Lin T., Jiang S., Shen H., Xia L., Lu J. // *Int. Immunopharmacol.* 2016. V. 34. P. 71–77.
82. Filková M., Vernerová Z., Hulejová H., Prajzlerová K., Veigl D., Pavelka K., Vencovský J., Šenolt L. // *Cytokine*. 2015. V. 73. № 1. P. 36–43.
83. Šenolt L., Šumová B., Jandová R., Hulejová H., Mann H., Pavelka K., Vencovský J., Filková M. // *PLoS One*. 2015. V. 10. № 7. P. e0132674.
84. Lu L., Barbi J., Pan F. // *Nat. Rev. Immunol.* 2017. V. 17. № 11. P. 703–717.
85. Xu X., Zheng L., Bian Q., Xie L., Liu W., Zhen G., Crane J.L., Zhou X., Cao X. // *J. Bone Miner Res.* 2015. V. 30. № 11. P. 2033–2043.
86. Gonzalo-Gil E., Criado G., Santiago B., Dotor J., Pablos J.L., Galindo M. // *Clin. Exp. Immunol.* 2013. V. 174. № 2. P. 245–255.
87. Guo Y., Zhang X., Qin M., Wang X. // *J. Thorac. Dis.* 2015. V. 7. № 3. P. 471–477.
88. Cui D., Zhang L., Chen J., Zhu M., Hou L., Chen B., Shen B. // *Clin. Exp. Med.* 2015. V. 15. № 3. P. 285–292.
89. Kim J., Lee H.J., Yoo I.S., Kang S.W., Lee J.H. // *Yonsei Med. J.* 2014. V. 55. № 5. P. 1354–1358.
90. Daien C.I., Gailhac S., Mura T., Audo R., Combe B., Hahne M., Morel J. // *Arthritis Rheumatol.* 2014. V. 66. № 8. P. 2037–2046.
91. Zheng Z., Li X., Ding J., Feng Y., Miao J., Luo X., Wu Z., Zhu P. // *Mol. Med. Rep.* 2015. V. 12. № 3. P. 4584–4591.

УДК 577.181

Высокопроизводительный скрининг природного биоразнообразия с целью поиска новых антибиотиков

С. С. Терехов^{1*}, И. А. Остерман^{2,3}, И. В. Смирнов^{1,2,4}¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40³Сколковский институт науки и технологий, 143025, Московская обл., Сколково⁴Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», 101000, Москва, ул. Мясницкая, 40

*E-mail: sterekhoff@mail.ru

Поступила в редакцию 01.06.2018

Принята к печати 22.08.2018

РЕФЕРАТ Рост числа случаев инфицирования антибиотикорезистентными штаммами патогенов бросает вызов современным технологиям поиска новых лекарственных препаратов. Подходы комбинаторной химии, основанные на использовании химических библиотек и направленные на создание высокоаффинных низкомолекулярных лигандов терапевтически значимых молекулярных мишеней клеток человека, успешно зарекомендовали себя в области направленного создания высокоэффективных терапевтических агентов. В то же время эти подходы зачастую сталкиваются с непреодолимыми трудностями при создании новых антибиотиков. Природные соединения, отобранные в результате эволюции по таким важным характеристикам, как широкая специфичность и эффективность, представляют собой хорошую альтернативу химическим библиотекам. Вместе с тем, неограниченное использование природных антибиотиков и их аналогов приводит к лавинообразному распространению генов устойчивости среди бактерий. Обнаружение новых природных антибиотиков, в свою очередь, чрезвычайно затрудняет проблема «переоткрытия антибиотиков», что ставит задачу поиска альтернативных высокопроизводительных платформ скрининга антибиотической активности, культивирования «некультивируемых» микроорганизмов, а также поиска новых кластеров биосинтеза антибиотиков, их активации и гетерологической экспрессии. Высокий интерес представляют микрофлюидные технологии скрининга антибиотической активности на уровне единичных клеток, которые позволяют объединить в рамках одной платформы технологии ультравысокопроизводительного скрининга, широкомасштабного секвенирования и геномного майнинга, открывая уникальные возможности для обнаружения новых антибиотиков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антибиотикорезистентность, высокопроизводительный скрининг, микрофлюидика, открытие антибиотиков.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МИК – минимальная ингибирующая концентрация; ESKAPE – *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp.; ВЭЖХ-МС – высокоэффективная жидкостная хроматография-масс-спектрометрия; ВЭЖХ-ЯМР – высокоэффективная жидкостная хроматография-спектрометрия ядерного магнитного резонанса; BioMAP – antibiotic mode of action profile (платформа для профилирования спектра активности); FACS – флуоресцентно-активированный клеточный сортинг; GFP – зеленый флуоресцентный белок; sCy5 – сульфоцианин 5; NHS – N-гидроксисукцинимид; uHT – ультравысокопроизводительный.

ВВЕДЕНИЕ

Открытие антибиотиков – это одно из величайших достижений 20 века, позволившее многократно увеличить выживаемость, продолжительность и качество жизни многих миллионов людей. Период с 1940

по 1960-е годы, когда было обнаружено большинство современных антибиотиков и их производных, принято называть «золотой эрой открытия антибиотиков» [1]. Столь фантастические результаты были достигнуты благодаря успешному сочетанию простой,

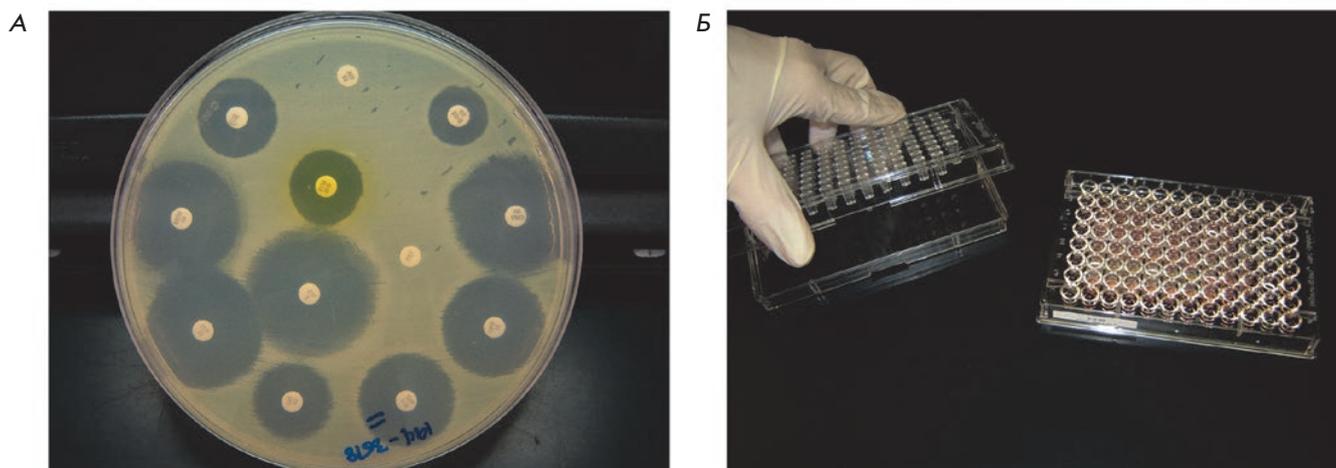


Рис. 1. Классические методы скрининга антибиотической активности: (А) поиск колоний бактерий, дающих большие зоны просветления, и (Б) последующее определение МИК (адаптировано из [4])

дешевой и в то же время эффективной платформы для скрининга и удачного выбора объекта поиска. Эта платформа, получившая впоследствии название «платформа Ваксмана» [2], заключалась в использовании чашек с агаром, на которые высевали бактерии из почвы. Бактерии-продуценты антибиотиков идентифицировали, заливая эти чашки вторым слоем агара, несущим бактерии-мишени, и выявляли клоны-кандидаты по образованию зон просветления (рис. 1), [3, 4]. Последующий отбор клонов, продуцирующих в среде антибиотики, проводили методом последовательных разведений их ростовой среды и определения минимальных ингибирующих концентраций (МИК). Дальнейший поиск новых антибиотиков с использованием платформы Ваксмана затрудняло повторное обнаружение одних и тех же антибиотиков, поскольку данная платформа позволяла выявлять только хорошо культивируемые и быстрорастущие почвенные бактерии (в большинстве своем принадлежащих роду *Streptomyces*), конститутивно продуцирующие антибиотики в больших количествах. В то же время она открывала легкий доступ к дешевым и высокоэффективным лекарственным препаратам природного и полусинтетического происхождения. Таким образом, эта платформа максимально соответствовала целям и задачам своего времени, поскольку во времена «золотой эры открытия антибиотиков» отсутствовала проблема неограниченного использования антибиотиков.

Роль антибиотиков в природе заключается в поддержании биологического разнообразия микроорганизмов за счет противостояния бактерий, продуцирующих и деградирующих антибиотики [5] с использованием разнообразных механизмов

[6–8], широко распространенных в различных экологических нишах [8–11] и появившихся задолго до возникновения человеческих цивилизаций [12]. Неконтролируемое использование больших количеств антибиотиков создало беспрецедентные условия для селекции и мобилизации генов резистентности среди популяций бактерий, а также их последующего захвата клетками патогенных микроорганизмов. Эволюция резистентности проходила с использованием трех основных механизмов [13]: первичного захвата генов устойчивости, в первую очередь, благодаря мобилизации и горизонтальному переносу генов из окружающей среды; возникновения компенсаторных мутаций, нивелирующих негативное влияние захвата генов устойчивости [14], и активации внутренних механизмов устойчивости, таких, как активный транспорт [15, 16]. Все это приводит к возникновению штаммов, обладающих множественной лекарственной устойчивостью [17], особенно характерной для так называемых ESKAPE патогенов (*Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и *Enterobacter* spp.), представляющих реальную угрозу жизни и здоровью людей [17].

ОГРАНИЧЕНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ КОМБИНАТОРНОГО РАЗНООБРАЗИЯ ХИМИЧЕСКИХ БИБЛИОТЕК ДЛЯ ПОИСКА НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ

Комбинаторная химия и высокопроизводительный скрининг библиотек химических соединений зарекомендовали себя как эффективные методы создания лекарственных препаратов, нацеленных на регуляцию различных процессов в клетках человека.

Однако множественные попытки использования высокопроизводительного комбинаторного скрининга с целью создания новых антибиотиков широкого спектра действия потерпели неудачу, несмотря на значительные финансовые и материальные вложения, а также применение всех доступных технологий [18–20].

Основные причины этих неудач связаны тем, что, во-первых, ксенобиотики плохо проникают в бактериальные клетки (особенно грамотрицательные). Во-вторых, антибиотики не подчиняются классическому «правилу пяти» Липински [21] (физико-химические свойства комбинаторных химических библиотек, подобранные для большинства препаратов, не оптимальны для антибиотиков [22]). В-третьих, химическое разнообразие существующих библиотек заметно ограничено [23]. В то же время использование химических библиотек позволяет идентифицировать различные адъюванты, значительно усиливающие антимикробные свойства известных антибиотиков [24–26], антиметаболиты [27], антивирулентные препараты [28], а также может приводить к созданию препаратов узкого спектра, направленных на конкретную мишень, что показано на примере бедаквила, селективного ингибитора F_1F_0 -АТФ-азы *Mycobacterium tuberculosis* [29]. Создание специализированных химических библиотек, направленных на повышенную способность ксенобиотиков проникать в бактериальные клетки, важно для комбинаторных методов поиска новых антибиотических препаратов. Альтернативная стратегия – поиск лигандов, ингибирующих активность бактериальных систем транспорта ксенобиотиков.

ПОИСК НОВЫХ АНТИБИОТИКОВ СРЕДИ ПРЕДСТАВИТЕЛЕЙ ПРИРОДНОГО РАЗНООБРАЗИЯ

Скрининг природных веществ приводит к значительно большей вероятности обнаружения антибиотической активности [30], по-видимому, в связи с тем, что природные вещества имеют более широкий спектр стереоселективных фармакофоров, уже отобранных на различную биологическую активность в процессе эволюции [23]. Метаболомика, лежащая в основе современных подходов к скринингу природных антибиотиков [26], представляет собой совокупность тандемных методов разделения–анализа, таких, как высокоэффективная жидкостная хроматография–масс-спектрометрия или спектрометрия ядерного магнитного резонанса (ВЭЖХ–МС или ВЭЖХ–ЯМР), и методов широкомасштабного секвенирования [31]. Метаболомика позволяет осуществить переход к функциональной геномике [32], а также идентифицировать новые рибосомные и нерибосомные пептиды [33, 34] и вторичные метаболиты [35].

Природные источники, используемые для поиска антибиотиков, весьма разнообразны и включают в себя экстракты растений, грибов, лишайников, эндофитов, морских растений, водорослей, кораллов и микроорганизмов [36]. Тем не менее, следует отметить, что многие действующие вещества из перечисленных источников действуют по неспецифическому механизму дестабилизации мембраны, что, в свою очередь, затрудняет их применение ввиду высокой токсичности, вызванной низким терапевтическим индексом. Таким образом, благодаря своему разнообразию и эволюционной предрасположенности к продукции антибиотиков для завоевания экологических ниш в процессе конкуренции друг с другом, бактерии продолжают оставаться одним из наиболее привлекательных источников антибиотической активности. Проблема «повторного открытия» антибиотиков может решаться с использованием разнообразных подходов.

СТРАТЕГИИ РЕШЕНИЯ ПРОБЛЕМЫ «ПЕРЕОТКРЫТИЯ» АНТИБИОТИКОВ

Подавление роста коллекции различных микроорганизмов может использоваться как своеобразный индивидуальный отпечаток исследуемого вещества или экстракта, что показано с помощью платформы BioMAP, позволяющей выявлять известные антибиотики, а также находить новые по индивидуальному профилю ингибирования [37]. Для обнаружения мишени действующего вещества или, наоборот, поиска веществ, обладающих специфическим механизмом действия, можно также использовать коллекции штаммов бактерий одного вида. Коллекция 245 штаммов *S. aureus* с подавленной экспрессией генов позволила идентифицировать антибиотик платенсимицин, принадлежащий к новому классу ингибиторов фермента синтеза жирных кислот FabF/B [38].

Новый взгляд на использование почвенных бактерий в качестве источника новых антибиотиков открывает новые подходы к скринингу антибиотической активности. Полногеномное секвенирование актиномицетов показало, что они обладают значительно более высокой способностью продуцировать вторичные метаболиты, чем при культивировании. Секвенирование *Streptomyces coelicolor* показало принципиальную возможность продукции более 20 вторичных метаболитов, в то время как при культивировании *in vitro* идентифицированы только три [39]. В свою очередь, активация молчащих генов бактерий–продуцентов открывает новые источники ранее неизвестных антибиотиков [40], а биоинформатический анализ и методы, основанные на кластеризации генов, позволяют предсказывать антибиотики *de novo* [41]. Таким образом, методы геномного

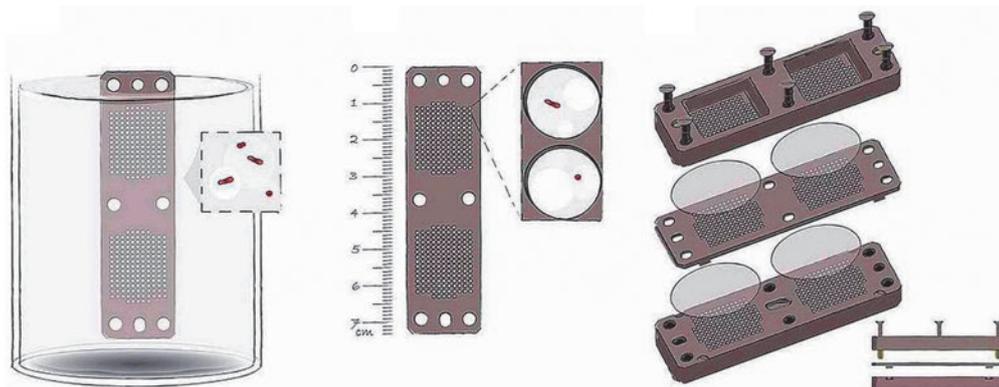


Рис. 2. Устройство для культивации «некультивируемых» бактерий почвы (адаптировано из [47]). Устройство состоит из двух частей, разделенных полупроницаемой мембраной. С одной стороны находятся индивидуальные клетки бактерий почвы в питательной среде, с другой – почва, несущая необходимые факторы роста

майнинга могут успешно использоваться с целью поиска новых вторичных метаболитов бактерий, в том числе и неизвестных ранее антибиотиков, обладающих высоким потенциалом для создания лекарственных препаратов [42].

Один из подходов к активации молчащих генов и продукции новых антибиотиков – подбор среды для культивирования клонов-продуцентов, предварительно отобранных на основании секвенирования, благодаря присутствию новых генов [43]. Использование факторов чувства кворума – это другой подход к активации молчащих генов [44], однако их эффект трудно предсказуем и, по-видимому, они не всегда представляют собой оптимальный механизм активации молчащих генов. В то же время одна из наиболее очевидных стратегий активации молчащих генов – это рекомбинантная экспрессия [45, 46]. Использование новых подходов к культивированию «некультивируемых» почвенных бактерий (рис. 2) – еще один альтернативный подход к проблеме поиска новых антибиотиков. Платформа, основанная на культивировании единичных почвенных бактерий в их природном окружении, с использованием полупроницаемой мембраны, позволила открыть новый антибиотик теиксобактин, активный по отношению к резистентным штаммам грамположительных бактерий без развития устойчивости [47], а также к идентификации нового рода *Entotheonella*, обладающего уникальным набором вторичных метаболитов и путей их синтеза [48].

Скрининг бактерий, устойчивых к антибиотикам, может использоваться для выявления новых механизмов синергического взаимодействия, открывающих возможности для поиска адъювантов антибиотиков, усиливающих их действие [26]. Использование резистентных штаммов позволило открыть новый класс антибиотиков – ацилдепсипептидов, активирующих внутриклеточную бактериальную протеазу ClpP [49], вызывающую гибель бактерий, в том числе и персистирующих, и приводящую к излечению

от хронической инфекции [50]. Предварительный отбор почвенных бактерий, устойчивых к росту на гликопептидных антибиотиках, позволил более чем в 1000 раз повысить вероятность обнаружения клонов-продуцентов новых антибиотиков этого класса и идентифицировать новый антибиотик пекискомицин, обладающий уникальной структурой [51].

Эффективным оказалось и создание бифункциональных агентов, работающих по принципу троянского коня. Конъюгат аналога антибиотика рифампицина, соединенного биodeградируемым линкером с антителом против тейхоевых кислот клеточной стенки *S. aureus*, показал свою эффективность в элиминации не только суспензионных клеток, но и внутриклеточного резервуара бактерий, устойчивого к действию ванкомицина [52]. При этом важное значение имеет правильный выбор антитела, линкера и антибиотика. Эффективным оказался рациональный дизайн высокоспецифичных антибиотиков в случае конъюгатов сидерофор-антибиотик [53].

Переход от ингибирования *in vitro* к непосредственной оценке антибиотической активности препарата *in vivo* открывает новые возможности для создания наиболее эффективных лекарственных средств. Скрининг антимикробной активности против *M. tuberculosis* с использованием зараженных макрофагов [54] позволяет максимально приблизить модель *in vitro* к условиям *in vivo*, а также исключить вещества, обладающие неспецифической цитотоксичностью и низкой способностью проникать в макрофаги. Использование моделей заражения нематоды *Caenorhabditis elegans* [55] и рыбок *Danio rerio* [56] *in vivo* позволяет отобрать соединения, приводящие к элиминации бактерий, в том числе и при помощи механизмов, отличных от классической антибиотической активности.

Высокая чувствительность аналитического сигнала является принципиальной характеристикой, необходимой для увеличения производительности скрининга. Использование бактерий, продуцирующих

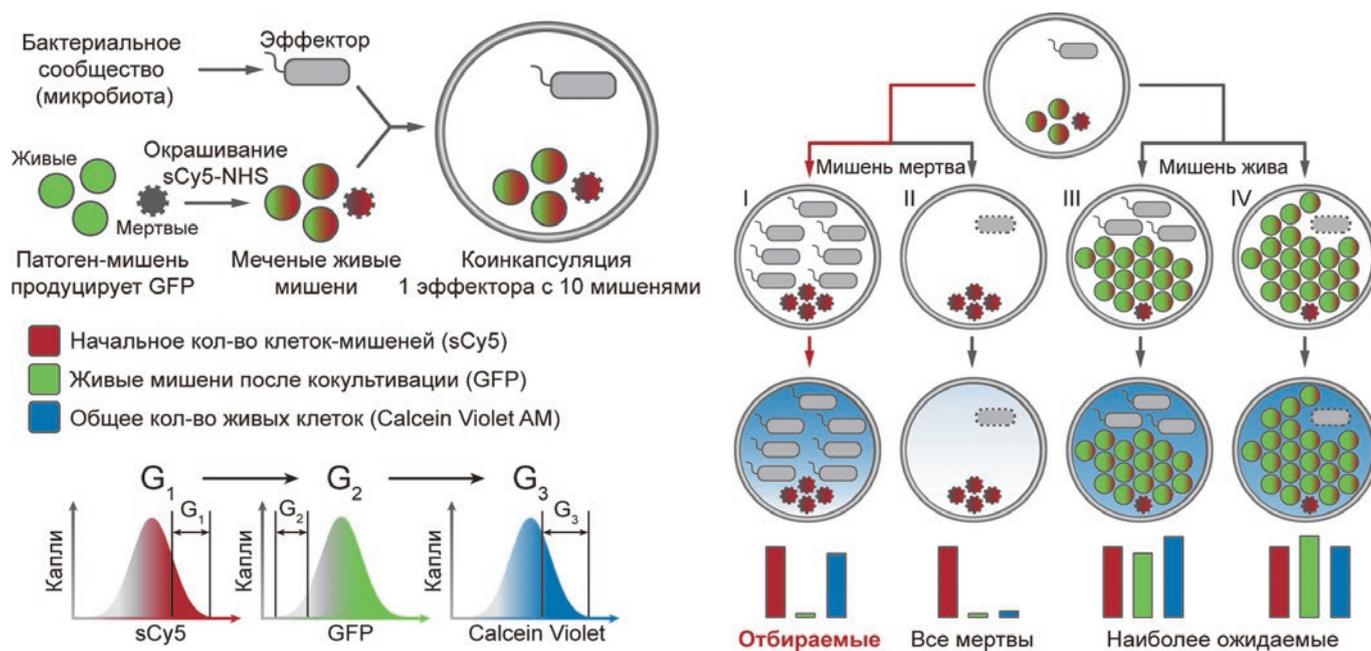


Рис. 3. Ультравысокопроизводительный (uHT) скрининг антибиотической активности в каплях биосовместимой двойной эмульсии (адаптировано из [64]). Культивация единичных клеток-эффикторов микробиоты с репортерным штаммом патогена-мишени с последующим прижизненным окрашиванием на наличие живых клеток, а также отбором целевой популяции клеток-эффикторов, обладающих антибиотической активностью с использованием FACS

рекомбинантные флуоресцентные белки-репортеры, в качестве биосенсора антибиотической активности позволяет напрямую детектировать подавление роста бактерий [57], идентифицировать антибиотики, действующие по заданному механизму ингибирования трансляции [58], а также производить скрининг комбинации антибиотиков с использованием нескольких флуоресцентных репортеров с различным спектром возбуждения/эмиссии [59].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Ввиду быстрого возникновения антибиотикорезистентности, поиск новых антибиотиков становится весьма актуальной задачей. Скрининг химических библиотек имеет крайне низкую вероятность успеха, он эффективен в основном для поиска адъювантов антибиотиков и высокоспецифичных препаратов. Классическая платформа Ваксмана для скрининга антибиотической активности микроорганизмов оказалась эффективной в прошлом, однако в дальнейшем ее применение приводило к чрезвычайно высокой вероятности повторного открытия известных антибиотиков, в то время как обнаружение антибиотиков нового класса считается возможным лишь в результате скрининга более 10^7 различных микроорганизмов [60]. Решить эту проблему можно за счет использования альтернативных платформ, основан-

ных на метаболомике, широкомасштабном секвенировании, биоинформатическом анализе, рекомбинантной экспрессии генов, а также альтернативных подходов к культивированию «некультивируемых» микроорганизмов. Свидетельства того, что физиологически значимые антибиотики могут быть найдены среди представителей микробиоты человека [61], открывают новые источники для поиска антимикробной активности. Особый интерес представляет внедрение микрофлюидных платформ, позволяющих перейти от классической 2D-платформы скрининга на чашках к эмульсионному 3D-скринингу в изолированных микрокомпартаментах. Культивирование отдельных клеток в каплях эмульсии можно использовать для скрининга резистентных бактерий [62], а также бактериолитической активности [63]. Этот альтернативный подход открывает уникальные возможности для высокопроизводительного анализа активности широких репертуаров клеток.

Инкапсуляция индивидуальных клеток в каплях биосовместимой двойной эмульсии (рис. 3) позволяет не только анализировать активность на уровне единичных клеток, но и кокультивировать представителей микробиоты с клетками-мишенями с целью идентификации антагонистических штаммов, продуцирующих антибактериальные соединения [64]. Суть метода заключается в коинкапсуляции инди-

видуальных представителей микробиоты с репортерным штаммом патогена-мишени в каплях биосовместимой двойной эмульсии вода-масло-вода, их последующем кокультивировании в каплях и отборе с использованием клеточного сортирования целевой популяции капель, в которых наблюдается ингибирование роста патогена при наличии живых клеток-эффекторов микробиоты. Одно из неоспоримых преимуществ данной технологии – это возможность отбора целевой популяции бактерий-эффекторов, что позволяет добиться ультравысокопроизводительного ($\approx 30\,000$ клеток в секунду) скрининга антибиотической активности на уровне единичных клонов. В то же время отобранные в результате скрининга бактерии могут быть представителями чрезвычайно редких, медленно растущих и «некультивируемых» микроорганизмов, которых впоследствии идентифицируют, используя широкомасштабное секвенирование и последующий биоинформатический анализ. Данная платформа может быть использована для прижизненного отбора антимикробной активности единичных клеток из популяций клеток-эффекторов представительностью порядка 0.005% за один раунд селекции.

Дальнейшее развитие ультравысокопроизводительных (uHT) методов скрининга антибиотической активности представляет чрезвычайно высокий интерес, так как необычайно широкое разнообразие бактериальных сообществ таит в себе множество загадок, требующих комплексного понимания взаимодействий на уровне как единичных бактерий, так и каждого уникального микробиома в целом [65]. Использование комбинации методов uHT скри-

нинга и геномного майнинга открывает уникальные возможности с точки зрения направленного поиска новых редких кластеров биосинтеза вторичных метаболитов бактерий с различным спектром антибиотической активности. Такие проблемы, как анализ индивидуальной активности каждого представителя микробиоты по отношению к заданной мишени, а также широкомасштабная оценка спектра активности антибиотиков на заданное микробиологическое сообщество, представляют чрезвычайно высокий интерес, так как дают нам возможность распутать клубок взаимодействий внутри микробиологического сообщества. Мы считаем, что развитие микрофлюидных технологий в комплексе с методами ультравысокопроизводительного скрининга, широкомасштабного секвенирования, протеомики и биоинформатики позволит перейти на новый уровень понимания процессов в области микробиологии. Возможности микрофлюидной технологии ультравысокопроизводительного скрининга природных источников биоразнообразия микроорганизмов или искусственных библиотек антимикробных соединений имеют очевидную перспективу открытия антибиотиков следующего поколения, а также в реализации стратегии поиска лигандов, ингибирующих факторы резистентности микроорганизмов к существующим антибиотическим препаратам. Комбинированное использование таких препаратов может иметь ключевое значение для решения проблемы лекарственной устойчивости к антибиотикам. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта
РНФ № 14-50-00131.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lewis K. // Nat. Rev. Drug Discov. 2013. V. 12. № 5. P. 371–387.
- Lewis K. // Nature. 2012. V. 485. № 7399. P. 439–440.
- Schatz A., Bugle E., Waksman S.A. // Exp. Biol. Medicine. 1944. V. 55. № 1. P. 66–69.
- Reller L.B., Weinstein M., Jorgensen J.H., Ferraro M.J. // Clin. Infectious Dis. 2009. V. 49. № 11. P. 1749–1755.
- Kelsic E.D., Zhao J., Vetsigian K., Kishony R. // Nature. 2015. V. 521. № 7553. P. 516–519.
- Wright G.D. // Nat. Rev. Microbiol. 2007. V. 5. № 3. P. 175–186.
- Perry J.A., Westman E.L., Wright G.D. // Curr. Opin. Microbiol. 2014. V. 21. P. 45–50.
- Kommineni S., Bretl D.J., Lam V., Chakraborty R., Hayward M., Simpson P., Cao Y., Bousounis P., Kristich C.J., Salzman N.H. // Nature. 2015. V. 526. № 7575. P. 719–722.
- Forsberg K.J., Reyes A., Wang B., Selleck E.M., Sommer M.O.A., Dantas G. // Science. 2012. V. 337. № 6098. P. 1107–1111.
- Finley R.L., Collignon P., Larsson D.G.J., McEwen S.A., Li X.-Z., Gaze W.H., Reid-Smith R., Timinouni M., Graham D.W., Topp E. // Clin. Infectious Dis. 2013. V. 57. № 5. P. 704–710.
- Forsberg K.J., Patel S., Gibson M.K., Lauber C.L., Knight R., Fierer N., Dantas G. // Nature. 2014. V. 509. № 7502. P. 612–616.
- D'Costa V.M., King C.E., Kalan L., Morar M., Sung W.W.L., Schwarz C., Froese D., Zazula G., Calmels F., Debruyne R., et al. // Nature. 2011. V. 477. № 7365. P. 457–461.
- Brown E.D., Wright G.D. // Nature. 2016. V. 529. № 7586. P. 336–343.
- Andersson D.I., Hughes D. // FEMS Microbiol. Rev. 2011. V. 35. № 5. P. 901–911.
- Cox G., Wright G.D. // Internat. J. Med. Microbiol. 2013. V. 303. № 6–7. P. 287–292.
- Fajardo A., Martínez-Martín N., Mercadillo M., Galán J.C., Ghysels B., Matthijs S., Cornelis P., Wiehlmann L., Tümmler B., Baquero F., et al. // PLoS One. 2008. V. 3. № 2. P. e1619.
- Davies J., Davies D. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2010. V. 74. № 3. P. 417–433.
- Payne D.J., Gwynn M.N., Holmes D.J., Pompliano D.L. // Nat. Rev. Drug Discov. 2007. V. 6. № 1. P. 29–40.
- Silver L.L. // Clin. Microbiol. Rev. 2011. V. 24. № 1. P. 71–109.
- Tommasi R., Brown D.G., Walkup G.K., Manchester J.I., Miller A.A. // Nat. Rev. Drug Discov. 2015. V. 14. № 8. P. 529–542.
- Lipinski C.A., Lombardo F., Dominy B.W., Feeney P.J. // Advanced Drug Delivery Rev. 1997. V. 23. № 1. P. 3–25.

22. O'Shea R., Moser H.E. // *J. Med. Chem.* 2008. V. 51. № 10. P. 2871–2878.
23. Harvey A.L., Edrada-Ebel R., Quinn R.J. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2015. V. 14. № 2. P. 111–129.
24. Peterson E.J.R., Ma S., Sherman D.R., Baliga N.S. // *Nat. Microbiol.* 2016. V. 1. P. 16078.
25. Taylor P.L., Rossi L., De Pascale G., Wright G.D. // *ACS Chem. Biol.* 2012. V. 7. № 9. P. 1547–1555.
26. Roemer T., Boone C. // *Nat. Chem. Biol.* 2013. V. 9. № 4. P. 222–231.
27. Zlitni S., Ferruccio L.F., Brown E.D. // *Nat. Chem. Biol.* 2013. V. 9. № 12. P. 796–804.
28. Starkey M., Lepine F., Maura D., Bandyopadhyaya A., Lesic B., He J., Kitao T., Righi V., Milot S., Tzika A., et al. // *PLoS Pathog.* 2014. V. 10. № 8. P. e1004321.
29. Koul A., Vranckx L., Dhar N., Göhlmann H.W.H., Özdemir E., Neefs J.-M., Schulz M., Lu P., Mørtz E., McKinney J.D., et al. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 3369.
30. Sukuru S.C.K., Jenkins J.L., Beckwith R.E.J., Scheiber J., Bender A., Mikhailov D., Davies J.W., Glick M. // *J. Biomol. Screening.* 2009. V. 14. № 6. P. 690–699.
31. Glassbrook N., Beecher C., Ryals J. // *Nat. Biotech.* 2000. V. 18. № 11. P. 1142–1143.
32. Jewett M.C., Hofmann G., Nielsen J. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2006. V. 17. № 2. P. 191–197.
33. Kersten R.D., Yang Y.-L., Xu Y., Cimermancic P., Nam S.-J., Fenical W., Fischbach M.A., Moore B.S., Dorrestein P.C. // *Nat. Chem. Biol.* 2011. V. 7. № 11. P. 794–802.
34. Ibrahim A., Yang L., Johnston C., Liu X., Ma B., Magarvey N.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 47. P. 19196–19201.
35. Kjer J., Debbab A., Aly A.H., Proksch P. // *Nat. Protocols.* 2010. V. 5. № 3. P. 479–490.
36. Moloney M.G. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2016. V. 37. № 8. P. 689–701.
37. Wong W.R., Oliver A.G., Lington R.G. // *Chem. Biol.* 2012. V. 19. № 11. P. 1483–1495.
38. Wang J., Soisson S.M., Young K., Shoop W., Kodali S., Galgoczi A., Painter R., Parthasarathy G., Tang Y.S., Cummings R., et al. // *Nature.* 2006. V. 441. № 7091. P. 358–361.
39. Bentley S.D., Chater K.F., Cerdeno-Tarraga A.M., Challis G.L., Thomson N.R., James K.D., Harris D.E., Quail M.A., Kieser H., Harper D., et al. // *Nature.* 2002. V. 417. № 6885. P. 141–147.
40. Peter J., Rutledge G.L.C. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2015. V. 13. № 8. P. 509–523.
41. Marnix H., Medema M.A.F. // *Nat. Chem. Biol.* 2015. V. 11. № 9. P. 639–648.
42. Metev M., Osterman I.A., Ghilarov D., Khabibullina N.F., Yakimov A., Shabalin K., Utkina I., Travin D.Y., Komarova E.S., Serebryakova M., et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2017. V. 13. P. 1129.
43. Zazopoulos E., Huang K., Staffa A., Liu W., Bachmann B.O., Nonaka K., Ahlert J., Thorson J.S., Shen B., Farnet C.M. // *Nat. Biotech.* 2003. V. 21. № 2. P. 187–190.
44. Ohnishi Y., Kameyama S., Onaka H., Horinouchi S. // *Mol. Microbiol.* 1999. V. 34. № 1. P. 102–111.
45. Ikeda H., Ishikawa J., Hanamoto A., Shinose M., Kikuchi H., Shiba T., Sakaki Y., Hattori M., Omura S. // *Nat. Biotech.* 2003. V. 21. № 5. P. 526–531.
46. Komatsu M., Uchiyama T., Ōmura S., Cane D.E., Ikeda H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 6. P. 2646–2651.
47. Ling L.L., Schneider T., Peoples A.J., Spoering A.L., Engels I., Conlon B.P., Mueller A., Schaberle T.F., Hughes D.E., Epstein S., et al. // *Nature.* 2015. V. 517. № 7535. P. 455–459.
48. Wilson M.C., Mori T., Ruckert C., Uria A.R., Helf M.J., Takada K., Gernert C., Steffens U.A.E., Heycke N., Schmitt S., et al. // *Nature.* 2014. V. 506. № 7486. P. 58–62.
49. Brotz-Oesterhelt H., Beyer D., Kroll H.-P., Endermann R., Ladel C., Schroeder W., Hinzen B., Raddatz S., Paulsen H., Henninger K., et al. // *Nat. Med.* 2005. V. 11. № 10. P. 1082–1087.
50. Conlon B.P., Nakayasu E.S., Fleck L.E., LaFleur M.D., Isabella V.M., Coleman K., Leonard S.N., Smith R.D., Adkins J.N., Lewis K. // *Nature.* 2013. V. 503. № 7476. P. 365–370.
51. Thaker M.N., Wang W., Spanogiannopoulos P., Wagglechner N., King A.M., Medina R., Wright G.D. // *Nat. Biotech.* 2013. V. 31. № 10. P. 922–927.
52. Lehar S.M., Pillow T., Xu M., Staben L., Kajihara K.K., Vandlen R., DePalatis L., Raab H., Hazenbos W.L., Hiroshi Morisaki J., et al. // *Nature.* 2015. V. 527. № 7578. P. 323–328.
53. Han S., Zaniewski R.P., Marr E.S., Lacey B.M., Tomaras A.P., Evdokimov A., Miller J.R., Shanmugasundaram V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 51. P. 22002–22007.
54. Pethe K., Bifani P., Jang J., Kang S., Park S., Ahn S., Jiricek J., Jung J., Jeon H.K., Cechetto J., et al. // *Nat. Med.* 2013. V. 19. № 9. P. 1157–1160.
55. Ewbank J.J., Zugasti O. // *Disease Models Mechanisms.* 2011. V. 4. № 3. P. 300–304.
56. Veneman W.J., Stockhammer O.W., de Boer L., Zaat S.A.J., Meijer A.H., Spaik H.P. // *BMC Genomics.* 2013. V. 14. № 1. P. 1–15.
57. Michels K., Heinke R., Schone P., Kuipers O.P., Arnold N., Wessjohann L.A. // *J. Antibiot.* 2015. V. 68. № 12. P. 734–740.
58. Osterman I.A., Komarova E.S., Shiryaev D.I., Korniltssev I.A., Khven I.M., Lukyanov D.A., Tashlitsky V.N., Serebryakova M.V., Efremenkova O.V., Ivanenkov Y.A., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. V. 60. № 12. P. 7481–7489.
59. FengTing Lv, LiBing Liu, Shu Wang // *Sci. China Chem.* 2014. V. 57. № 12. P. 1696–1702.
60. Baltz R.H. // *SIM News.* 2005. V. 55. P. 186–196.
61. Zipperer A., Konnerth M.C., Laux C., Berscheid A., Janek D., Weidenmaier C., Burian M., Schilling N.A., Slavetinsky C., Marschal M., et al. // *Nature.* 2016. V. 535. № 7613. P. 511–516.
62. Liu X., Painter R.E., Enesa K., Holmes D., Whyte G., Garlisi C.G., Monsma F.J., Rehak M., Craig F.F., Smith C.A. // *Lab on a Chip.* 2016. V. 16. № 9. P. 1636–1643.
63. Scanlon T.C., Dostal S.M., Griswold K.E. // *Biotechnol. Bioengin.* 2014. V. 111. № 2. P. 232–243.
64. Terekhov S.S., Smirnov I.V., Stepanova A.V., Bobik T.V., Mokrushina Y.A., Ponomarenko N.A., Belogurov A.A., Rubtsova M.P., Kartseva O.V., Gomzikova M.O., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 10. P. 2550–2555.
65. Terekhov S.S., Smirnov I.V., Malakhova M.V., Samoilov A.E., Manolov A.I., Nazarov A.S., Danilov D.V., Dubiley S.A., Osterman I.A., et al. // *Proceedings of the National Academy of Sciences.* 2018. doi: 10.1073/pnas.1811250115.

УДК 576.53

Возможности использования плюрипотентных стволовых клеток для восстановления поврежденного пигментного эпителия сетчатки глаза

А. Е. Харитонов, А. В. Сурдина, О. С. Лебедева, А. Н. Богомазова, М. А. Лагарькова*

Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, 119435, Москва, Малая Пироговская, 1а

*E-mail: maryalag@yahoo.com

Поступила в редакцию 19.03.2018

Принята к печати 02.07.2018

РЕФЕРАТ Пигментный эпителий сетчатки представляет собой монослой пигментированных гексагональных клеток, соединенных плотными контактами. Эти клетки составляют часть внешнего барьера между кровью и сетчаткой, защищают глаз от излишнего света, обладают важными секреторными функциями, а также поддерживают работу фоторецепторов, обеспечивая координацию множества регуляторных механизмов. Именно дегенерация пигментного эпителия является первопричиной многих дегенеративных заболеваний сетчатки глаза. Поиск надежных источников клеток для трансплантации пигментного эпителия сетчатки представляет крайне актуальную задачу. Плюрипотентные стволовые клетки (эмбриональные стволовые или индуцированные плюрипотентные) можно с высокой эффективностью дифференцировать в пигментный эпителий сетчатки, что открывает возможности для клеточной терапии при дегенерации сетчатки и может позволить замедлить развитие патологии и даже, возможно, вернуть пациенту зрение. Пионерские работы по трансплантации клеток пигментного эпителия сетчатки, дифференцированных из плюрипотентных стволовых клеток, проводимые в США и Японии, подтверждают необходимость развития и оптимизации подобных подходов к клеточной терапии. Для эффективного применения клетки пигментного эпителия, дифференцированные из плюрипотентных стволовых клеток, должны иметь набор функциональных свойств, характерный для клеток пигментного эпителия *in vivo*. В этом обзоре обобщен текущий статус доклинических и клинических исследований в области заместительной терапии пигментного эпителия сетчатки. На основании собственных и опубликованных данных проведено сравнение разных протоколов дифференцировки, обозначены медицинские проблемы, стоящие на пути к широкому применению пигментного эпителия сетчатки, дифференцированного из плюрипотентных стволовых клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА дифференцировка, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, клеточная терапия, клинические испытания, пигментный эпителий сетчатки, эмбриональные стволовые клетки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВМД – возрастная макулодистрофия; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; МКОЗ – максимально корригированная острота зрения; МСК – мезенхимальные стволовые клетки; ПДС – пигментная дистрофия сетчатки; ПСК – плюрипотентные стволовые клетки; ПЭС – пигментный эпителий сетчатки; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ABCA4 – ATP-binding cassette, sub-family A (ABC1) member 4, член 4 подсемейства А (ABC1) АТФ-связывающей кассеты; BEST-1 – bestrophin 1, бестрофин 1; CNV – copy number variations, вариация числа копий; NIC – никотинамид; NK – natural killers, естественные киллеры; PEDF – pigment epithelium-derived factor, фактор пигментного эпителия; bFGF – basic fibroblast growth factor, основной фактор роста фибробластов; VEGF – vascular endothelial growth factor, фактор роста эндотелия сосудов.

ВВЕДЕНИЕ

Пигментный эпителий сетчатки (ПЭС) образован монослоем гексагональных эпителиальных клеток с большим числом меланосом, содержащих пигмент меланин (рис. 1). Базальной мембраной для пигментного эпителия служит внутренний слой пятислой-

ной мембраны Бруха. Ядра у клеток ПЭС размещены ближе к базальному полюсу, содержащему меньше меланосом. На апикальном полюсе ПЭС расположено множество меланосом и микроворсинок (ресничек), которые «укутывают» наружные сегменты фоторецепторных клеток. Различают длинные и короткие

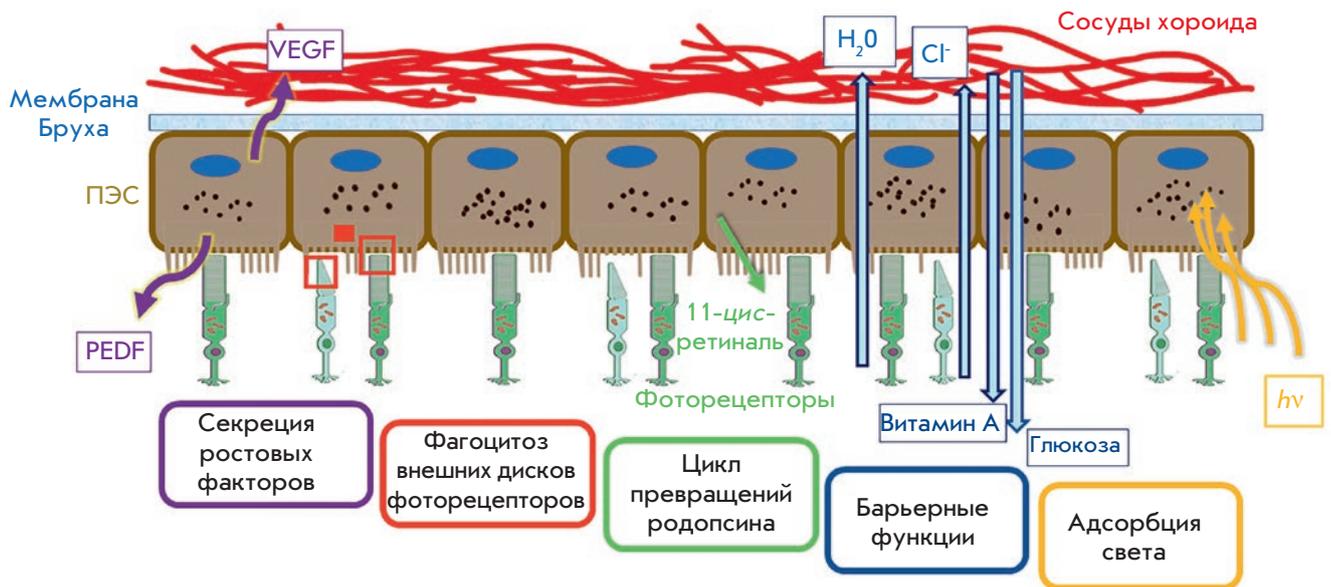


Рис. 1. Функции пигментного эпителия сетчатки глаза (по [4] с изменениями)

микроворсинки. Короткие микроворсинки соединяются с концами наружных сегментов фоторецепторов, а длинные расположены между внешними сегментами [1]. В области макулы каждая клетка ПЭС имеет контакты с 20–55 фоторецепторами [2]. Пространство между микроворсинками ПЭС и внешними сегментами фоторецепторов наполнено матриксом, который вместе с микроворсинками обеспечивает плотное прилегание сетчатки к ПЭС.

Функции ПЭС:

Поглощение света. Меланосомы ПЭС обеспечивают поглощение большей части света, не абсорбированного фоторецепторами. Поглощение света препятствует отражению и рассеиванию света по сетчатке, что позволяет сохранить контрастность и четкость изображения. Под действием света меланосомы мигрируют на апикальную сторону клеток, в микроворсинки, которые окружают внешние световоспринимающие сегменты фоторецепторов. В темноте меланосомы возвращаются обратно в центральную часть клетки при участии микрофиламентов и гормона меланотропина. Функцию поглощения света обеспечивают главным образом длинные микроворсинки [3]. Кроме того, ПЭС помогает рассеивать тепло в сетчатке, которое выделяется при поглощении света и в результате процесса зрительной фототрансдукции [2].

Фагоцитоз. Клетки ПЭС осуществляют фагоцитоз отработанных дисков фоторецепторов [5]. Каждая клетка ПЭС ежедневно фагоцитирует 2–4 тысячи отработанных дисков [6].

Осуществление зрительного цикла. Диски наружных сегментов фоторецепторов содержат белки опсины и отвечают за поглощение света. Опсин синтезируется во внутренних сегментах и транспортируется в наружные сегменты. Для осуществления зрительного цикла необходим родопсин. Он состоит из опсина, соединенного с 11-цис-ретиналем. При поглощении света ретиналь изомеризуется из 11-цис-ретиналя в *транс*-ретиналь, а затем превращается в *транс*-ретинол. В ходе зрительного цикла фоторецепторы не могут превратить *транс*-ретинол обратно в 11-цис-ретиналь, поэтому он транспортируется в ПЭС для реизомеризации, а затем возвращается в фоторецепторы [1].

Барьерная функция. Обеспечение выборочной поставки необходимых питательных веществ фоторецепторам от сосудистой оболочки и отвод продуктов распада в обратном направлении. ПЭС является второй частью гематоретинального барьера, который препятствует попаданию в сетчатку из хориокапилляров больших молекул. Первая часть этого барьера – эндотелий капилляров сетчатки [3, 5, 6].

Секреция гормонов и факторов роста. Клетки ПЭС поляризованы и секретируют различные цитокины и факторы роста в разных направлениях, что очень важно для функционирования хориокапилляров и сетчатки. Например, VEGF, который секретируется с базальной стороны клеток ПЭС, жизненно необходим хориокапиллярам, а PEDF и TGF- β , которые секретируются в основном апикальной стороной клеток ПЭС, необходимы в субретинальном пространстве [1, 2].

Несомненно, ПЭС играет важнейшую роль в обеспечении жизнедеятельности фоторецепторов, и правильное функционирование фоторецепторов возможно лишь при здоровом ПЭС.

ЗАБОЛЕВАНИЯ, СВЯЗАННЫЕ С ДЕГЕНЕРАЦИЕЙ ПЭС

Самыми распространенными заболеваниями, при которых происходит дегенерация ПЭС, являются возрастная макулярная дегенерация (ВМД) сетчатки и пигментный ретинит (ПР) [6, 7]. Эти две болезни считаются главными причинами слепоты в западных странах. На сегодняшний день не существует удовлетворительных способов борьбы с ними, так как сетчатка и ПЭС не регенерируют, и только в случае влажной формы ВМД с помощью анти-VEGF-терапии можно замедлить развитие болезни [8].

ВМД – это многофакторное заболевание, на формирование которого оказывают влияние генетические факторы, старение, образ жизни (курение, индекс массы тела, диеты) [1]. ВМД подразделяют на сухую и влажную формы. При сухой форме ВМД небольшие аморфные отложения, содержащие жиры и белки, известные как друзы, скапливаются под макулой между внутренним слоем мембраны Бруха и базальной мембраной ПЭС [9]. Это приводит к местному воспалению, вызванному окислительным стрессом [1]. Со временем теряется взаимодействие между ПЭС и фоторецепторами, и в результате снижается центральное зрение. Эта форма ВМД встречается чаще всего и возникает примерно у 90% людей с данным заболеванием. При влажной форме ВМД новые кровеносные сосуды появляются в тех участках макулы, где их не должно быть. Это вызывает разрушение структуры макулы, что приводит к скоротечной потере центрального зрения. Хотя этот вид ВМД встречается приблизительно у 10% людей с данным заболеванием, на его долю приходится 90% случаев серьезного снижения зрения, связанного с ВМД.

Пигментный ретинит (ПР) – основная причина слепоты среди детей и подростков. Распространенность ПР составляет 1 случай на 3500 человек [8, 10]. Это наследственное заболевание часто приводит к слепоте, оно характеризуется прогрессирующей дисфункцией и гибелью палочек. В некоторых случаях ПР сопровождается повреждением ПЭС. Описано около 50 генов, мутации в которых вызывают ПР. Среди них гены белков, связанных с передачей светового сигнала, ретиноидным циклом, клеточной адгезией, цитоскелетом [10]. Наиболее распространенный тип ПР вызван мутациями в гене, кодирующем опсин [11]. На ранних стадиях ПР происходит дегенерация палочек, при этом пациенты теряют ночное и периферическое зрение. На поздних стадиях ПР у них раз-

вивается туннельный синдром, а также начинают гибнуть колбочки, приводя к серьезным проблемам [1].

Болезни Штаргардта и Беста – формы наследуемой ювенильной дегенерации макулы, распространены меньше, чем ПР и ВМД. Макулодистрофия Штаргардта вызывается мутациями гена *ABCA4*, что приводит к накоплению в клетках ПЭС N-ретиноилиден-N-ретинолэтанолamina (di-retinoid-pyridinium ethanolamine, A2E) и его модификаций. Эти токсины вызывают гибель пигментного эпителия и последующую гибель фоторецепторов макулы сетчатки, сопровождающуюся потерей центрального зрения [12, 13]. На данный момент нет способов остановить потерю зрения при макулодистрофии Штаргардта [14]. Существует еще целый ряд так называемых «заболеваний, подобных болезни Штаргардта» (Stargardt's-like diseases), обусловленных мутациями в генах *CNGB3*, *ELOVL4*, *PROM1* [14, 15].

Болезнь Беста – аутосомно-доминантное наследственное заболевание, обусловленное мутациями в гене *BEST1*, кодирующем трансмембранный белок bestrophin-1 (бестрофин-1). Этот белок входит в состав базолатеральной плазматической мембраны ПЭС, но его функция ясна не до конца. Известно, что при болезни Беста изменяется транспорт хлорид-ионов, нарушен перенос жидкости через ПЭС, накопление метаболитов (например, липофусцина) и жидкости между мембраной Бруха и комплексом ПЭС/фоторецепторы. Следствием этих процессов является гибель фоторецепторов и потеря центрального зрения [1, 12]. Болезнь Беста была первой среди заболеваний сетчатки, клеточную модель которой создали с помощью пациент-специфичных ИПСК. С помощью этой модели на молекулярном уровне показано, что в мутантном ПЭС нарушена переработка внешних сегментов фоторецепторов, замедлен цикл превращений родопсина [16].

ПЕРСПЕКТИВЫ КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ ПРИ ЗАБОЛЕВАНИЯХ СЕТЧАТКИ ГЛАЗА

Существуют различные стратегии использования аутологичного и аллогенного материала для трансплантации пациентам с ВМД [6] и другими заболеваниями, связанными с дегенеративными процессами в сетчатке. Для клинических испытаний с использованием аутологичного материала используют три основные стратегии: транслокацию макулы (например, [17]), аутооттрансплантацию лоскута ПЭС-хороид (например, [18]) и субретиальную инъекцию суспензии аутологичных клеток ПЭС (например, [19]).

Меорс с соавт. (Meurs et al.) описан опыт аутооттрансплантации периферического ПЭС семи пациентам

с ВМД. Постоперационное наблюдение в течение года не выявило значимых улучшений остроты зрения, хотя три пациента положительно оценивали свое состояние. Два пациента сообщили об ухудшении зрения, что, по мнению авторов, могло быть связано с постоперационным отслоением сетчатки и пролиферативной витреоретинопатией [20].

В работе Фалкнер-Рэдлер с соавт. (Falkner-Radler et al.) сравнивали эффективность аутоотрансплантации лоскута ПЭС-хороид и субретинальной инъекции суспензии ПЭС в двух группах пациентов по семь человек каждая. По результатам 24-месячного наблюдения за пациентами обеих групп не обнаружено статистически значимых различий в тесте максималенно корригированной остроты зрения (МКОЗ). Однако индивидуальные результаты в группах оказались неоднозначными. Так, и в первой, и второй группе зафиксировано как улучшение зрительной функции у отдельных пациентов, так и ухудшение остроты зрения [21].

В 2012 году Ван Зибург с соавт. (van Zeeburg et al.) сообщили о способности трансплантированного лоскута ПЭС-хороид поддерживать функцию макулы на протяжении длительного периода наблюдения с относительно низким уровнем осложнений и рецидивов. Эта работа основана на 7-летнем постоперационным наблюдением за 130 пациентами, у которых с 2001 по 2006 год были проведены операции по аутоотрансплантации лоскута ПЭС-хороид (всего 133 глаза) [22]. Это исследование и его основные выводы критиковали в своем обзоре Сэйлер и Арамонт (Seiler and Aramant, 2012), указавшие на отсутствие контрольной группы и на незначительное количество глаз, которые действительно наблюдали после операции (9 глаз на 7-й год наблюдения) [23].

Таким образом, вопрос об эффективности и стабильности результата аутоотрансплантации ПЭС остается дискуссионным. Несомненное преимущество метода состоит в отсутствии проблем гистосовместимости и необходимости иммуносупрессивной терапии. С другой стороны, аутоотрансплантация не всегда приводит к предсказуемым результатам [24]. Не исключено, что клетки, пересаживаемые с незатронутого дегенерацией участка, уже имеют скрытые морфофункциональные изменения. Кроме того, трудность получения материала для аутоотрансплантации со здоровых участков ограничивает возможности лечения на поздних стадиях заболевания.

Другим источником клеток для трансплантации ПЭС пациентам с макулодистрофией может быть донорская ткань с учетом гистосовместимости донор-реципиент. Как правило, пересаживают фетальный материал, хотя существуют сообщения о пересадке аллогенной ткани взрослых доноров.

Впервые аллогенный фетальный материал для пересадки ПЭС был использован в 1999 году при лечении 16 пациентов [25]. Иммуносупрессивную терапию в послеоперационный период тогда не использовали, и у 75% пациентов наблюдалось медленное отторжение трансплантированной ткани. Первое сообщение о пересадке ПЭС от взрослого донора вышло в 2001 году [26]. Эта операция была проведена 85-летней пациентке, которая скончалась спустя 4 месяца после процедуры. Сама операция к улучшению показателей зрения не привела. Таким образом, первые клинические трансплантации ПЭС с использованием аллогенных донорских тканей оказались достаточно неудачными.

Первые внушающие оптимизм аллогенные трансплантации были проведены американским хирургом Норманом Радтке (Norman D. Radtke). В 2004 году им опубликовано сообщение о трансплантации комплекса фетальной нейроретины/ПЭС 64-летней женщине с пигментной дистрофией сетчатки (ПДС) [27]. Эта операция привела к улучшению остроты зрения у пациентки при 5-летнем наблюдении. Далее в 2008 году такая же операция тем же хирургом была проведена 10 пациентам с ПДС, и у семи привела к улучшению остроты зрения. При этом у одного из пациентов в послеоперационный период острота зрения не изменилась, а у двух зрение ухудшилось [28].

В 2007 году другой группой хирургов-офтальмологов была проведена пересадка аллогенной ткани ПЭС взрослого человека 12 пациентам с экссудативной макулодистрофией. Пациенты проходили курс иммуносупрессивной терапии длительностью до 6 месяцев. Постоперационное наблюдение в течение первого года показало улучшение остроты зрения, чтения и других параметров зрительной функции, хотя статистические методы этих различий не подтвердили [24].

Таким образом, несмотря на первоначально заявленную перспективность, результаты трансплантации аутологичной или донорской ткани при ВМД оказались противоречивыми. При аутоотрансплантации есть риск, связанный с хирургическим вмешательством, предполагающим получение здоровой ткани в незатронутом процессами дегенерации участке сетчатки и дальнейшие манипуляции, связанные с внедрением аутоотрансплантата в область макулы [29]. К тому же существует возможность продолжения дегенерации аутоотрансплантированной здоровой ткани. Аллогенная трансплантация неизбежно сопровождается проблемами с получением донорского материала, гистосовместимостью донор-реципиент и необходимостью иммуносупрессивной терапии, которая, в свою очередь, связана со множеством побочных эффектов.

Мы хотели бы специально отметить, что описание экспериментов с пересадкой мезенхимальных стволовых клеток (МСК) для лечения заболеваний глаз находятся за рамками данного обзора. Заметим только, что уже достаточно общепринятым считается, что МСК в этом случае могут оказывать лишь паракринный эффект, так как способностью к дифференцировке вне мезодермального зародышевого листка эти клетки не обладают [30, 31].

В конце XX века из внутренней клеточной массы бластоцист получили культуры эмбриональных стволовых клеток мыши и человека (ЭСК) [32, 33]. В 2006 году создали индуцированные плюрипотентные стволовые клетки (ИПСК) – получаемые путем генетического репрограммирования дифференцированных клеток аналоги ЭСК [34]. ЭСК и ИПСК являются плюрипотентными, т.е. они способны к неограниченному росту и самообновлению, а также к дифференцировке в клетки любых типов. Именно плюрипотентные стволовые клетки (ПСК) могут стать решением проблемы источника клеток для трансплантации, с которой столкнулись исследователи в рамках клинических испытаний по ауто- и аллогенной трансплантации ПЭС. В последние годы создано несколько протоколов направленной дифференцировки ЭСК и ИПСК в ПЭС, а некоторые были опробованы в клинических испытаниях [5, 35–39]. Стоит отметить, что анатомо-морфологические особенности глаза (относительно небольшие размеры, парность органа, хорошо разработанные методы диагностики и инструментального мониторинга, возможная иммунная привилегированность и наличие гематоретинального барьера) делают его удобной мишенью для отработки технологии доставки материала при клеточной терапии с использованием производных из плюрипотентных клеток [40].

НАПРАВЛЕННАЯ ДИФФЕРЕНЦИРОВКА ПЭС ИЗ ПСК

Направленная дифференцировка ПЭС из ИПСК и дальнейшее применение полученного материала в клинической практике представляют интерес для многих исследователей (например, [11, 41]). Сравниваются различные протоколы дифференцировки, их эффективность и временные затраты. Кратко рассмотрим некоторые протоколы, которые на сегодняшний день нам кажутся наиболее эффективными.

Незначительные количества клеток пигментного эпителия сетчатки могут образовываться при спонтанной дифференцировке плюрипотентных стволовых клеток человека [35]. При удалении из культуральной среды фактора FGF2, необходимого для поддержания плюрипотентного состояния в культуре, плюрипотентные стволовые клетки че-

ловека, культивируемые на подложке из эмбриональных фибробластов мыши, матригеле, полилизине или ламинине, способны к образованию клеток пигментного эпителия [35, 42, 43]. Через 10–12 недель спонтанной дифференцировки образуются небольшие пигментированные области, которые затем механически отделяют от остальной массы клеток, получая практически чистую культуру клеток пигментного эпителия (>99% чистоты). Различные модификации состава среды культивирования и времени дифференцировки позволяют повысить выход клеток пигментного эпителия [44, 45]. Однако для получения культур, в значительной степени обогащенных клетками пигментного эпителия сетчатки, без трудоемкого механического отбора пигментированных колоний требуются эффективные протоколы направленной дифференцировки. Как показали работы последних лет, из ИПСК и ЭСК можно получать *in vitro* клетки пигментного эпителия сетчатки, морфологически и функционально соответствующие таким клеткам *in vivo*. Так, в работе Лич с соавт. (Leach et al.) сравнивали эффективность протоколов спонтанной и направленной дифференцировки в ПЭС на пяти разных линиях ИПСК, полученных от разных доноров и различных типов клеток. Показано, что на способность к эффективной дифференцировке может влиять исходный источник донорских клеток, метод репрограммирования и используемый протокол [46], что еще раз подчеркивает необходимость стандартизации процедуры получения ПЭС из ПСК для клинического применения.

Одними из первых направленную дифференцировку ПСК в ПЭС осуществили Хирами с соавт. (Hirami et al.) [47]. ИПСК мыши и человека в суспензионной культуре обрабатывали антагонистами Wnt и Nodal, что способствовало дифференцировке в пигментный эпителий.

Поскольку клетки ПЭС дифференцируются из нейроэктодермы и имеют общие характеристики с нейрональными клетками сетчатки *in vivo*, был разработан двухстадийный протокол дифференцировки для получения клеток пигментного эпителия из нейроэпителиальных предшественников [48–51]. Агрегаты ЭСК первоначально культивировали в суспензии в среде для нейроэпителиальной дифференцировки. Затем нейроэпителиальные предшественники наращивали и дифференцировали в предполагаемые клетки пигментного эпителия, заменяя FGF2 в культуральной среде на добавку B27. Первые клетки, подобные клеткам пигментного эпителия сетчатки, появлялись через 4 недели дифференцировки, и через 8 недель количество клеток, пригодных для субкультивирования, становилось значительным. Этот двухступенчатый метод более

эффективен по сравнению с методом спонтанной дифференцировки.

Основываясь на роли никотинамида (NIC) в метаболизме, выживаемости, пластичности и дифференцировке клеток, Идельсон с соавт. (Idelson et al.) исследовали влияние NIC на дифференцировку ЭСК в клетки пигментного эпителия [5]. Для индукции дифференцировки в клетки ПЭС кластеры ЭСК, полученные с помощью коллагеназы, культивировали в суспензии в среде для ЭСК с добавлением заменителя сыворотки, NIC, и в присутствии или без активина А (член суперсемейства TGF- β , который направляет дифференцировку глазного бокала в эмбриогенезе) [52]. Пигментированные области появились через 4 недели после индукции, и примерно половина кластеров при культивировании в среде, содержащей как NIC, так и активин А, были пигментированы. Показано, что NIC в присутствии активина А эффективно индуцирует и увеличивает эффективность дифференцировки ЭСК в клетки пигментного эпителия.

Описанные протоколы предполагают длительное время дифференцировки и на выходе дают низкую чистоту популяции, при которой необходимы дополнительные трудоемкие манипуляции для очистки клеток нужного типа. Бухгольц с соавт. (Buchholz et al.) предложили более быстрый и эффективный протокол. Данный метод направленной дифференцировки ЭСК в клетки пигментного эпителия основан на сочетании факторов, индуцирующих дифференцировку сетчатки (IGF1, Noggin, Dkk1, bFGF), и других факторов (NIC, активин А, SU5402 и вазоактивный пептид кишечника (vasoactive intestinal peptide, VIP)), причем все факторы добавляли в разное строго определенное время [44]. Уже через 14 дней после начала дифференцировки около 80% клеток в культуре представляли собой клетки пигментного эпителия. Благодаря высокой эффективности и скорости этот протокол, по мнению авторов, может применяться для быстрого наращивания больших количеств клеток, необходимых для трансплантации (существуют незначительные вариации данного протокола, предложенные другими авторами, например Генг с соавт. (Geng et al.) [53]). Похожий протокол был предложен Фольтцем и Клеггом (Foltz and Clegg), однако вместо VIP они использовали CHIR99021 [54].

Чтобы идентифицировать новые соединения, которые способствуют дифференцировке ИПСК в ПЭС, методом количественного ПЦР-скрининга маркеров дифференцировки ПЭС на культуре ИПСК был проведен анализ химической библиотеки [39]. В результате нашли хетомин – вещество, потенциально активирующее дифференцировку. Затем, с помощью репортерной конструкции (GFP под контролем

ПЭС-специфического энхансера тирозиназы) подтвердили, что хетомин – ингибитор фактора, индуцируемого гипоксией (HIF), существенно увеличивает дифференцировку ПЭС из ПСК. Сочетание хетомина с никотинамидом привело к дифференцировке более 50% ИПСК в ПЭС. Молекулярные пути, по которым хетомин способствует дифференцировке ПЭС, пока остаются неизвестными.

Для получения клеток сетчатки Жу с соавт. (Zhu et al.) использовали также такие индукторы, как IWR1, SB431542 и IGF1, и получили из ИПСК функциональные фоторецепторы и пигментный эпителий сетчатки с соблюдением стандартов GMP. Показали, что полученные производные способны интегрироваться в сетчатку мышей с иммунодефицитом [55].

В нашей лаборатории было опробовано несколько методов дифференцировки ПСК в ПЭС. Сравнение нескольких протоколов дифференцировки привело нас к следующим выводам:

1. По нашему опыту, наилучшим протоколом, стабильно работающим для всех опробованных линий ИПСК и ЭСК, является протокол [39] с хетоминном и никотинамидом. Добавление активина в среду в этом случае нежелательно, так как уменьшает выживаемость клеток и эффективность направленной дифференцировки (неопубликованные данные). Дифференцировка занимает не менее 30 дней, но этот «временной проигрыш» компенсируется большим числом получаемых пигментированных клеток и их дальнейшей быстрой пролиферацией.

2. Клетки пигментного эпителия очень чувствительны к внеклеточному матриксу, от типа и качества матрикса зависит их выживаемость, скорость созревания и полнота достижения фенотипических и функциональных характеристик, свойственных этому типу клеток *in vivo* [56, 57]. Естественной подложкой для клеток пигментного эпителия сетчатки является мембрана Бруха. Согласно нашим экспериментальным данным, матригель в лабораторных условиях – самая подходящая подложка для быстрого наращивания незрелых, быстро делящихся клеток ПЭС. Для полного достижения гексагональной морфологии и правильной поляризации ПЭС, скорее всего, необходимо, чтобы жидкость омывала слой эпителиальных клеток с двух сторон – с апикальной и базальной. Для этого ПЭС обычно культивируют в камерах – трансвеллах, где среда находится и над, и под мембраной, на которой растут клетки. Репрезентативная фотография ПЭС, дифференцированных из ИПСК и имеющих характерную морфологию и пигментацию, представлена на *рис. 2*.

Одна из наиболее важных функциональных характеристик клеток пигментного эпителия сетчатки – способность секретировать PEDF и VEGF, а также

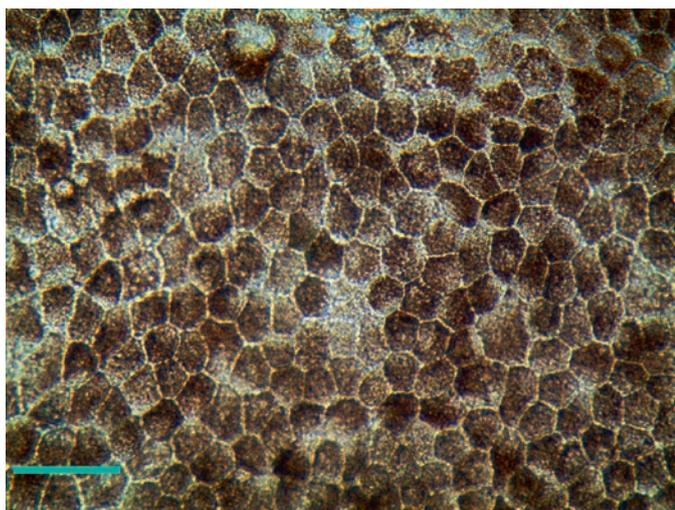


Рис. 2. Клетки ПЭС, дифференцированные из ИПСК здорового донора. Клетки культивировали в течение 3 месяцев в камере Transwell. Фазовый контраст. Масштабная линейка 100 мкм

образовывать внеклеточный матрикс [4], взаимодействовать с внешними сегментами фоторецепторов и фагоцитировать их [38]. Именно эти физиологические свойства проверяют обычно для доказательства функциональности дифференцированного ПЭС. Кроме того, проверяют экспрессию генов белков, характерных для ПЭС (например, RPE 65, BEST1, тирозиназа, MITF1, ZO-1 и др.). Очень важной характеристикой ПЭС является трансэпителиальный потенциал, отражающий барьерные свойства эпителия. Этот потенциал можно измерить с помощью кондуктометра.

Функциональность дифференцированного ПЭС *in vivo* подтверждают на животных моделях, в первую очередь, на крысах линии RCS (Royal College of Surgeons) с рецессивно наследуемой дистрофией сетчатки [5, 38, 58], а также на кроликах-альбиносах [59]. В многочисленных работах показано, что у животных после пересадки пигментного эпителия сохраняются его гистологические и физиологические признаки. При помощи электроретинографии показана функциональность пересаженного ПЭС (обзор [60]).

КЛИНИЧЕСКИЕ ИСПЫТАНИЯ ПЭС, ДИФФЕРЕНЦИРОВАННОГО ИЗ ПСК

Первые клинические испытания, в которых использовали клетки ПЭС, произведенные из плюрипотентных стволовых клеток, провели американские специалисты Шварц с соавт. (Schwartz et al.) в 2011 году. Для получения ПЭС использовали ЭСК линии MA09. Эти испытания были зарегистрированы в базе данных ClinicalTrials.gov под идентификаторами

NCT01345006 (болезнь Штаргардта) и NCT01344993 (атрофическая ВМД). На первом этапе одному пациенту с болезнью Штаргардта и одному пациенту с атрофической ВМД была проведена субретинальная инъекция 50000 клеток ПЭС. Результаты постоперационного наблюдения не выявили побочных эффектов на протяжении 4 месяцев, в том числе гиперпролиферации и онкогенности. У обоих пациентов острота зрения улучшилась по объективным показателям [61]. На следующем этапе на клинической когорте из 18 пациентов опробовали различные дозировки трансплантируемого материала: 50×10^3 , 100×10^3 и 150×10^3 клеток. В период постоперационного наблюдения в течение 22 месяцев у 13 пациентов отмечено увеличение пигментации сетчатки; у 10 – улучшение зрения [14].

Протокол Шварца с соавт. (Schwartz et al.) был использован в 2012 году корейскими офтальмологами в клиническом испытании NCT01625559. Незначительные модификации протокола касались скрининга онкогенности и схемы постоперационной иммуносупрессивной терапии. Двум пациентам с болезнью Штаргардта и двум пациентам с ВМД была осуществлена субретинальная инъекция 40×10^3 клеток ПЭС, дифференцированных из ЭСК линии MA09. С использованием таблиц Early Treatment Diabetic Retinopathy Study и теста МКОЗ улучшение зрения зафиксировано у трех пациентов. В связи с развитием побочных эффектов у одного пациента спустя 4 недели после операции была отменена иммуносупрессивная терапия, в результате состояние сетчатки вернулось на дооперационный уровень. В целом, подтверждена возможность и предварительная безопасность клеточной терапии дегенерации макулы различной этиологии с использованием ПЭС, дифференцированного из ЭСК. В то же время указано на необходимость дальнейших наблюдений, клинических испытаний и исследований [12].

В 2012 году в Университетском колледже Лондона компанией Pfizer был дан старт первой фазе клинического испытания по пересадке ЭСК-производного ПЭС, выращенного на мембране из полиэфира (NCT01691261). В этом испытании трансплантацию проводили пациентам с влажной формой ВМД с прогрессирующей потерей зрения. Сейчас проводится набор пациентов-участников первой фазы в следующее клиническое испытание (NCT03102138), в котором запланировано 4-летнее наблюдение и оценка безопасности трансплантации, проведенной ранее.

В 2015 году в Китае тремя различными университетами было объявлено о начале первой фазы клинических испытаний субретинальной трансплантации ПЭС, дифференцированного из ЭСК (NCT02749734, NCT02755428, NCT03046407). В каждом испытании

операцию проведут 10–15 пациентам с различными формами дистрофии сетчатки. Предполагается оценить безопасность и клинический эффект трансплантации.

В Федеральном университете Сан-Паулу (Бразилия) под руководством проф. Рубенса Белфорта (Rubens Belfort) с 2015 года проходит двухэтапное клиническое испытание, в котором изучают возможности трансплантации ЭСК-производного ПЭС (NCT02903576). На первом этапе запланирована трансплантация ПЭС в виде суспензии, на второй – в виде монослоя на полимерном субстрате. Цель испытания – сравнение эффективности двух способов трансплантации, а также оценка безопасности и применимости в клинике.

В настоящее время в США компанией Regenerative Patch Technologies под руководством Джейн Лебковски (Jane Lebkowski) осуществляется набор пациентов для участия в фазе I/II клинических испытаний по трансплантации ЭСК-производного ПЭС на париленовой мембране. Запланированы испытания на 20 пациентах, распределенных по двум группам в зависимости от стадии развития «сухой» ВМД (NCT02590692).

В сотрудничестве медицинских групп США и Израиля дан старт испытанию коммерческого клеточного продукта OpRegen® – суспензии клеток ПЭС, полученных из ЭСК человека. В данном испытании будут участвовать 15 пациентов с атрофической ВМД, которым проведут трансплантацию данного продукта в субретинальное пространство с последующей процедурой витрэктомии (NCT02286089).

Анализ базы данных ClinicalTrials.gov показывает, что основным объектом клинических испытаний в мире являются клетки, полученные из ЭСК. Первое и пока единственное опубликованное клиническое испытание ПЭС, дифференцированных из ИПСК, осуществлено в Японии [62]. Дисбаланс в пользу ЭСК может быть связан с большими опасениями биомедицинского сообщества в отношении ИПСК. Создание ИПСК требует гораздо большего числа воздействий на клетку, чем получение линии ЭСК. Существуют сомнения в стабильности генома ИПСК, в полноте репрограммирования и дифференцировки. ИПСК не представлены широко в клинических испытаниях также потому, что это относительно новый тип клеток, впервые полученный в 2006 году, в то время как ЭСК мыши изучают на 25 лет дольше, а ЭСК человека – на восемь. По нашему мнению, в течение трех-четырёх лет стоит ожидать увеличения числа испытаний продуктов ИПСК, особенно в Японии и Китае.

Согласно федеральному закону от 23.06.2016 г. № 180-ФЗ, ЭСК человека, наряду с фетальными

клетками, не могут использоваться в качестве источника клеточных продуктов. Как бы ни относились авторы обзора к подобному запрету, российские исследователи поставлены перед фактом, что ИПСК остаются практически единственным источником клеток для получения ПЭС.

Первое клиническое испытание ПЭС, дифференцированных из ИПСК, проведено в Японии [62]. Японские медики трансплантировали монослой ПЭС, дифференцированного из ИПСК, пациентке 70 лет с неоваскулярной возрастной ВМД. Пациентке была проведена операция, включавшая удаление неоваскулярной мембраны и трансплантацию аутологичного ПЭС под сетчатку. Через год после операции пересаженный слой ПЭС оставался интактным, острота зрения не улучшилась, но и не ухудшилась, и присутствовал цистовидный макулярный отек. Аутологичные ИПСК были получены с использованием неинтегрирующих плазмидных векторов и дифференцированы в ПЭС по ранее опубликованному протоколу, позволяющему получить функциональный ПЭС [62]. Качество, безопасность ИПСК и полученных из них клеток ПЭС подвергали тщательному анализу перед трансплантацией. Кроме анализа морфологии и экспрессии соответствующих маркеров, было проведено кариотипирование традиционным GTG-бэндингом и полногеномным SNP-анализом, а также полногеномное секвенирование, полногеномный анализ транскриптома и метилирования ДНК. В отсутствие туморогенности ПЭС убедились, трансплантируя ПЭС иммунодефицитным мышам NOG.

Пионерская трансплантация ПЭС, дифференцированного из ИПСК, безусловно, стала огромным шагом для регенеративной медицины. Тем не менее, она оставила и много нерешенных вопросов. Следует отметить, что изначально планировали трансплантацию ПЭС двум пациентам, но ИПСК одного из них не прошли контроль качества, так как в них выявили CNV, появившиеся в процессе репрограммирования. Также 10 из 20 клонов ИПСК, отобранных для дальнейшего анализа, содержали интегрированные в геном плазмиды, т.е. получение ИПСК с помощью плазмид следует признать не самым безопасным способом репрограммирования [62]. Другими способами получения могли бы стать не интегрирующиеся в геном вирусы, *in vitro* синтезированная РНК, репрограммирование с помощью малых молекул [63–65].

Пока международное сообщество не выработало однозначных рекомендаций ни по методам получения, ни по необходимым и достаточным методам характеристики клеток-производных ПСК. Необходимым условием для полномасштабного применения дифференцированных из ПСК производных

является оценка влияния различных протоколов получения и последующего культивирования на генетическую и эпигенетическую стабильность клеток с секвенированием и профилем метилирования всего генома, анализом экспрессии, а также исследования молекулярной основы возможных aberrаций [66]. Кроме того, сейчас активно отрабатываются хирургические трансплантации и инструменты, позволяющие сделать эту процедуру максимально безопасной для пациентов [67].

Аутологичная трансплантация производных ИПСК – очень дорогой и долгий метод. Аллогенная трансплантация, как уже говорилось выше, требует иммуносупрессии. Казалось, что решением вопроса могло бы стать создание банков ИПСК от здоровых доноров, гомозиготных по генам главного комплекса гистосовместимости HLA [68]. Каждая такая гомозигота подойдет любой гетерозиготе, в которой есть один аллель того же гаплотипа. Рассчитано, что 20 наиболее часто встречающихся гомозиготных HLA гаплотипа европеоидной популяции, идентифицированных после скрининга 26000 индивидов, будет подходить для 50% населения [68]. Создание банка таких линий ИПСК началось как национальная инициатива в Японии в 2012 году, и ИПСК с наиболее часто встречающимися «японскими» гаплотипами уже доступны для использования в Центре по исследованию и применению ИПСК в Киото [69]. Тем не менее, появившаяся в прошлом году работа [70] слегка снизила оптимизм по этому вопросу. Оказалось, что при взаимодействии иммунных клеток, гетерозиготных по HLA, с гомозиготными по HLA клетками трансплантата NK-клетки реципиента способны вызывать отторжение клеток, полученных из гомозиготных ИПСК, путем распознавания «отсутствия своего» [70]. Этот вопрос требует дальнейшего изучения.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Пока не существует апробированных методов, позволяющих вернуть или улучшить зрение пациентам с начавшейся дегенерацией сетчатки. Одним из таких методов может быть трансплантация тканей сетчатки глаза, в частности пигментного эпителия. Подход, связанный с трансплантацией ПЭС, полученного из ПСК человека, уже применяется в нескольких клинических испытаниях. Пигментный эпителий сетчатки может быть получен при направленной дифференцировке ЭСК и ИПСК человека и отобран на основании морфологических критериев и накопления коричневых гранул пигмента. Для широкого применения ПЭС, дифференцированного из ПСК, необходимо решить еще много вопросов. В частности, должны быть отработаны методы сортировки ПЭС, необходимые и достаточные методики доказательства соответствия дифференцированных клеток клеткам ПЭС, методы и протоколы доставки клеток, операционные технологии и критерии отбора пациентов, которым показана трансплантация ПЭС. Так, при прогрессировании заболевания наблюдается дегенерация и ПЭС, и фоторецепторов, и для получения эффективного результата возникает необходимость трансплантации и ПЭС, и фоторецепторов. Кроме того, персонализированная терапия аутологичными клетками вряд ли станет общедоступной медицинской процедурой в ближайшие десятилетия из-за трудоемкости и высокой стоимости получения и дифференцировки пациентспецифичных ИПСК. Поиск подходов к возможности аллогенной трансплантации производных ИПСК позволил бы удешевить и ускорить получение клеток ПЭС для трансплантации при дегенерации сетчатки глаза. ●

*Исследование выполнено за счет гранта
Российского научного фонда (№ 14-15-00930).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jones M.K., Lu B., Girman S., Wang S. // Prog. Retin. Eye Res. 2017. V. 57. P. 1–27.
- Nazari H., Zhang L., Zhu D., Chader G.J., Falabella P., Stefanini F., Rowland T., Clegg D.O., Kashani A.H., Hinton D.R., et al. // Prog. Retin. Eye Res. 2015. V. 48. P. 1–39.
- Diniz B., Thomas P., Thomas B., Ribeiro R., Hu Y., Brant R., Ahuja A., Zhu D., Liu L., Koss M., et al. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2013. V. 54. № 7. P. 5087–5096.
- Strauss O. // Physiol. Rev. 2005. V. 85. P. 845–881.
- Idelson M., Alper R., Obolensky A., Ben-Shushan E., Hemo I., Yachimovich-Cohen N., Khaner H., Smith Y., Wiser O., Gropp M., et al. // Cell. Stem Cell. 2009. V. 5. № 4. P. 396–408.
- Alexander P., Thomson H.A., Luff A.J., Lotery A.J. // Eye. 2015. V. 29. P. 992–1002.
- Brandl C., Zimmermann S.J., Milenkovic V.M., Rosendahl S.M., Grassmann F., Milenkovic A., Hehr U., Federlin M., Wetzel C.H., Helbig H., et al. // Neuromolecular Med. 2014. V. 16. № 3. P. 551–564.
- Tang Z., Zhang Y., Wang Y., Zhang D., Shen B., Luo M., Gu P. // J. Transl. Med. 2017. V. 15. № 1. P. 99–111.
- Parameswaran S., Krishnakumar S. // Indian J. Ophthalmol. 2017. V. 65. № 3. P. 177–183.
- Lukovic D., Artero Castro A., Delgado A.B., Bernal Mde L., Luna Pelaez N., Díez Lloret A., Perez Espejo R., Kamenarova K., Fernández Sánchez L., Cuenca N., et al. // Sci. Rep. 2015. V. 5. P. 12910.
- Zhao C., Wang Q., Temple S. // Development. 2017. V. 144. № 8. P. 1368–1381.
- Song W.K., Park K.-M., Kim H.-J., Lee J.H., Choi J., Chong S.Y., Shim S.H., Del Priore L.V., Lanza R. // Stem Cell Repts. 2015. V. 4. № 5. P. 860–872.
- Allikmets R., Shroyer N.F., Singh N., Seddon J.M., Lewis R.A., Bernstein P.S., Peiffer A., Zabriskie N.A., Li Y., Hutchin-

- son A., et al. // *Science*. 1997. V. 277. № 5333. P. 1805–1807.
14. Schwartz S.D., Regillo C.D., Lam B.L., Elliott D., Rosenfeld P.J., Gregori N.Z., Hubschman J.P., Davis J.L., Heilwell G., Spirn M., et al. // *Lancet*. 2015. V. 385. № 9967. P. 509–516.
 15. Battu R., Verma A., Hariharan R., Krishna S., Kiran R., Jacob J., Ganapathy A., Ramprasad V.L., Kumaramanickavel G., Jeyabalan N., et al. // *Biomed. Res. Int.* 2015. V. 2015. Article ID 940864.
 16. Li Y., Chan L., Nguyen H.V., Tsang S.H. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. V. 854. P. 549–555.
 17. Oshima H., Iwase T., Ishikawa K., Yamamoto K., Terasaki H. // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 5. e0177241.
 18. Алпатов С.А., Шуко А.Г., Малышев В.В. Аутоотрансплантация лоскута пигментного эпителия сетчатки и хориоидеи при экссудативной возрастной макулодистрофии // РМЖ «Клиническая офтальмология». 2007. № 1. С. 7.
 19. Binder S., Stolba U., Krebs I., Kellner L., Jahn C., Feichtinger H., Povelka M., Frohner U., Kruger A., Hilgers R.D., et al. // *Am. J. Ophthalmol.* 2002. V. 133. № 2. P. 215–225.
 20. van Meurs J.C., ter Averst E., Hofland L.J., van Hagen P.M., Mooy C.M., Baarsma G.S., Kuijpers R.W., Boks T., Stalmans P. // *British J. Ophthalmol.* 2004. V. 88. № 1. P. 110–113.
 21. Falkner-Radler C.I., Krebs I., Glittenberg C., Povazay B., Drexler W., Graf A., Binder S. // *British J. Ophthalmol.* 2011. V. 95. P. 370–375.
 22. van Zeeburg E.J., Maaijwee K.J., Missotten T.O., Heimann H., van Meurs J.C. // *Am. J. Ophthalmol.* 2012. V. 153. P. 120–127.
 23. Seiler M.J., Aramant R.B. // *Prog. Retinal Eye Res.* 2012. V. 31. № 6. P. 661–687.
 24. Tezel T.H., Del Priore L.V., Berger A.S., Kaplan H.J. // *Am. J. Ophthalmol.* 2007. V. 143. № 4. P. 584–595.
 25. Igvère P.V., Gouras P., Dafgard Kopp E. // *Eur. J. Ophthalmol.* 1999. V. 9. P. 217–230.
 26. Del Priore L.V., Kaplan H.J., Tezel T.H., Hayashi N., Berger A.S., Green W.R. // *Am. J. Ophthalmol.* 2001. V. 131. P. 472–480.
 27. Radtke N.D., Aramant R.B., Seiler M.J., Petry H.M., Pidwell D. // *Arch. Ophthalmol.* 2004. V. 122. P. 1159–1165.
 28. Radtke N.D., Aramant R.B., Petry H.M., Green P.T., Pidwell D.J., Seiler M.J. // *Am. J. Ophthalmol.* 2008. V. 146. P. 172–182.
 29. Binder S., Stanzel B.V., Krebs I., Glittenberg C. // *Prog. Retin. Eye Res.* 2007. V. 26. № 5. P. 516–554.
 30. Meyer U., Meyer T., Handschel J., Wiesmann H.P. *Fundamentals of Tissue Engineering and Regenerative Medicine*. Berlin, Heidelberg, Leipzig, Germany: Springer-Verlag, 2009. P. 179 (total 1048).
 31. Scuteri A., Miloso M., Foudah D., Orciani M., Cavaletti G., Tredici G. // *Curr Stem Cell Res Ther.* 2011. V. 6. № 2. P. 82–92.
 32. Evans M.J., Kaufman M.H. // *Nature*. 1981. V. 292. P. 154–156.
 33. Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. // *Science*. 1998. V. 282. № 5391. P. 1145–1147.
 34. Takahashi K., Yamanaka S. // *Cell*. 2006. № 126. P. 663–676.
 35. Klimanskaya I., Hipp J., Rezaei K.A., West M., Atala A., Lanza R. // *Cloning Stem Cells*. 2004. V. 6. P. 217–245.
 36. Osakada F., Ikeda H., Mandai M., Wataya T., Watanabe K., Yoshimura N., Akaike A., Sasai Y., Takahashi M. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 215–224.
 37. Lu B., Malcuit C., Wang S. // *Stem Cells*. 2009. V. 27. P. 2126–2135.
 38. Kamao H., Mandai M., Okamoto S., Sakai N., Suga A., Sugita S., Kiryu J., Takahashi M. // *Stem Cell Repts.* 2014. V. 2. № 2. P. 205–218.
 39. Maruotti J., Sripathi S.R., Bharti K., Fuller J., Wahlin K.J., Ranganathan V., Sluch V.M., Berlinicke C.A., Davis J., Kim C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. P. 10950–10955.
 40. Leach L.L., Clegg D.O. // *Stem Cells*. 2015. V. 33. P. 2363–2373.
 41. Achberger K., Haderspeck J.C., Kleger A., Liebau S. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2018. pii: S0169-409X(18)30108-X.
 42. Rowland T.J., Blaschke A.J., Buchholz D.E., Hikita S.T., Johnson L.V., Clegg D.O. // *J. Tissue Eng. Regen. Med.* 2013. V. 7. № 8. P. 642–653.
 43. Лагарькова М.А., Шилов А.Г., Губанова Н.И., Прохорович М.А., Киселев С.Л. // *Клеточные технологии в биологии и медицине*. 2011. Т. 4. С. 203–206.
 44. Buchholz D.E., Pennington B.O., Croze R.H., Hinman C.R., Coffey P.J., Clegg D.O. // *Stem Cells Transl. Med.* 2013. V. 2. № 5. P. 384–393.
 45. Shutova M.V., Surdina A.V., Ischenko D.S., Naumov V.A., Bogomazova A.N., Vassina E.M., Alekseev D.G., Lagarkova M.A., Kiselev S.L. // *Cell Cycle*. 2016. V. 15. № 7. P. 986–997.
 46. Leach L.L., Croze R.H., Hu Q., Nadar V.P., Clevenger T.N., Pennington B.O., Gamm D.M., Clegg D.O. // *J. Ocul. Pharmacol. Ther.* 2016. V. 32. № 5. P. 317–330.
 47. Hiram Y., Osakada F., Takahashi K., Okita K., Yamanaka S., Ikeda H., Yoshimura N., Takahashi M. // *Neurosci. Lett.* 2009. V. 458. № 3. P. 126–131.
 48. Cho M.S., Kim S.J., Ku S.Y., Park J.H., Lee H., Yoo D.H., Park U.C., Song S.A., Choi Y.M., Yu H.G. // *Stem Cell Res.* 2012. V. 9. № 2. P. 101–109.
 49. Lamba D.A., McUsic A., Hirata R.K., Wang P.R., Russell D., Reh T.A. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 1. P. e8763.
 50. Zhu D., Deng X., Spee C., Sonoda S., Hsieh C.L., Barron E., Pera M., Hinton D.R. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2011. V. 52. № 3. P. 1573–1585.
 51. Zhu Y., Carido M., Meinhardt A., Kurth T., Karl M.O., Ader M., Tanaka E.M. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 1. P. e54552.
 52. Fuhrmann S., Levine E.M., Reh T.A. // *Development*. 2000. V. 127. № 21. P. 4599–4609.
 53. Geng Z., Walsh P.J., Truong V., Hill C., Ebeling M., Kaphahn R.J., Dutton J.R. // *PLoS ONE*. 2017. V. 12. № 3. P. e0173575.
 54. Foltz L.P., Clegg D.O. // *J. Visual. Exp.: JoVE*. 2017. № 128. P. 56274.
 55. Zhu J., Reynolds J., Garcia T., Cifuentes H., Chew S., Zeng X., Lamba D.A. // *Stem Cells Transl. Med.* 2018. V. 7. № 2. P. 210–219.
 56. Tezel T.H., Del Priore L.V. // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 1997. V. 253. P. 41–47.
 57. Feng W., Zheng J.J., Lutz D.A., McLaughlin B.J. // *Graefes Arch. Clin. Exp. Ophthalmol.* 2003. V. 241. P. 232–240.
 58. Mullen R.J., Lavail M.M. // *Science*. 1976. V. 192. P. 799–801.
 59. Reyes A.P., Petrus-Reurer S., Antonsson L., Stenfelt S., Bartuma H., Panula S., Mader T., Douagi I., André H., Hovatta Q. // *Stem Cell Reports*. 2016. V. 6. № 1. P. 9–17.
 60. da Cruz L., Chen F.K., Ahmado A., Greenwood J., Coffey P. // *Prog. Retin. Eye Res.* 2007. V. 26. № 6. P. 598–635.
 61. Schwartz S.D., Hubschman J.P., Heilwell G., Franco-Cardenas V., Pan C.K., Ostrick R.M., Mickunas E., Gay R., Klimanskaya I., Lanza R. // *Lancet*. 2012. V. 379. № 9817. P. 713–720.
 62. Mandai M., Watanabe A., Kurimoto Y., Hirami Y., Morinaga C., Daimon T., Fujihara M., Akimaru H., Sakai N., Shibata Y., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2017. V. 376. № 11. P. 1038–1046.
 63. Fusaki N., Ban H., Nishiyama A., Saeki K., Hasegawa M. // *Proc. Jpn. Acad. Ser. B Phys. Biol. Sci.* 2009. V. 85. № 8. P. 348–362.
 64. Warren L., Manos P.D., Ahfeldt T., Loh Y.H., Li H., Lau F., Ebina W., Mandal P.K., Smith Z.D., Meissner A., et al. // *Cell Stem Cell*. 2010. № 7. P. 1–13.
 65. Hou P., Li Y., Zhang X., Liu C., Guan J., Li H., Zhao T., Ye

- J., Yang W., Liu K., et al. // *Science*. 2013. V. 341. № 6146. P. 651–654.
66. Luo M., Chen Y. // *Int. J. Ophthalmol.* 2018. V. 11. № 1. P. 150–159.
67. Kamao H., Mandai M., Ohashi W., Hiramami Y., Kurimoto Y., Kiryu J., Takahashi M. // *Invest. Ophthalmol. Vis. Sci.* 2017. V. 58. № 1. P. 211–220.
68. Taylor C.J., Peacock S., Chaudhry A.N., Bradley J.A., Bolton E.M. // *Cell Stem Cell*. 2012. V. 3. № 11. P. 147–152.
69. Okita K., Matsumura Y., Sato Y., Okada A., Morizane A., Okamoto S., Hong H., Nakagawa M., Tanabe K., Tezuka K., et al. // *Nat. Methods*. 2011. V. 8. P. 409–412.
70. Ichise H., Nagano S., Maeda T., Miyazaki M., Miyazaki Y., Kojima H., Yawata N., Yawata M., Tanaka H., Saji H., et al. // *Stem Cell Repts.* 2017. V. 9. P. 853–867.

УДК 577.2, 573.6

Получение рекомбинантных белков из молока трансгенных животных: современное состояние и перспективы

М. В. Шепелев*, С. В. Калиниченко, А. В. Дейкин, И. В. Коробко

Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

*E-mail: mshepelev@mail.ru

Поступила в редакцию 12.12.2017

Принята к печати 16.08.2018

РЕФЕРАТ Использование трансгенных животных в качестве биореакторов для синтеза рекомбинантных белков, секретируемых в молоко, является актуальным направлением биотехнологии. Прогресс генно-инженерных технологий, включая появление технологий направленного редактирования генома, существенно упрощает и повышает эффективность получения трансгенных животных, в том числе хозяйственно ценных видов. В данном обзоре рассмотрены технологии получения трансгенных животных с акцентом на животных-продуцентов рекомбинантных белков, секретируемых в молоко. Современное состояние и перспективы развития этой области биотехнологии описаны в свете появления новых технологий редактирования генома, кратко освещены экспериментальные и уже используемые на практике разработки.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гомологичная рекомбинация, молочная железа, направленное редактирование генома, рекомбинантный белок, сайт-специфическая рекомбинация, трансгенные животные.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CRISPR – clustered regularly interspaced short palindromic repeats (короткие палиндромные повторы, регулярно расположенные группами); HDR – homology-directed repair (направляемая гомологией репарация); MMEJ – microhomology-mediated end joining (опосредованное микрогомологией соединение концов); NHEJ – non-homologous end joining (негомологичное соединение концов); RMCE – recombinase-mediated cassette exchange (опосредованный рекомбиназой обмен кассетами); SCNT – somatic cell nuclear transfer (перенос ядра соматической клетки); SSA – single strand annealing (отжиг одиночных цепей); TALE – transcription activator-like effector (эффektor, подобный активатору транскрипции); TALEN – transcription activator-like effector nuclease (TALE-нуклеаза); ZFN – zinc finger nuclease (нуклеаза с цинковыми пальцами).

ВВЕДЕНИЕ

Генетически измененные лабораторные животные на протяжении многих лет остаются эффективным инструментом для изучения функциональных свойств генов, белков и иных молекул, значение которых в качестве моделей заболеваний человека при проведении биомедицинских исследований трудно переоценить. С использованием таких животных можно изучать патогенез и молекулярные особенности заболеваний, выявлять и валидировать новые терапевтические мишени, проводить эффективный поиск и разработку новых лекарственных средств, включая доклинические исследования. Наряду с этим, генетически измененные животные приобретают все большую привлекательность и в таких областях, как животноводство, где с помощью изменений генома можно корректировать хозяйственно ценные признаки животных. Наконец, трансгенные животные могут служить биореакторами для синте-

за рекомбинантных белков, секретируемых в молоко, позволяя нарабатывать рекомбинантные белки в существенно больших количествах и со значительно меньшими затратами по сравнению с получением белков в культурах эукариотических клеток [1]. По прогнозу аналитической компании RAND Corporation, опубликованному в 2006 году, использование молочной железы в качестве биореакторов для продукции рекомбинантных белков будет одним из актуальных направлений биотехнологии в период до 2020 года [2]. Об актуальности прогноза свидетельствует не только большое число экспериментальных исследований в этом направлении, но и коммерчески доступные сегодня лекарственные препараты на основе рекомбинантных белков человека. Так из молока трансгенных коз получают рекомбинантный антитромбин III человека (лекарственный препарат Atryn®), а из молока кроликов – рекомбинантный ингибитор С1-эстеразы человека (лекарственный

препарат Ruconest®) [3]. В последнее десятилетие в области модификации генома произошли революционные изменения благодаря возможности высокоэффективного направленного редактирования генома и существенному упрощению этой технологии после открытия системы CRISPR/Cas9. Это делает возможной разработку новых подходов к созданию животных, в том числе хозяйственно ценных видов, в молоке которых продуцируются рекомбинантные белки. Новые подходы позволяют кардинально упростить и повысить эффективность получения таких животных. В настоящем обзоре рассмотрены технологии получения трансгенных животных с акцентом на животных, продуцирующих рекомбинантные белки в молоке. Сегодняшний ландшафт и перспективы в этой области обрисованы в свете появления новых технологий редактирования генома, кратко освещены экспериментальные и уже используемые на практике разработки.

«КЛАССИЧЕСКИЙ» ТРАНСГЕНЕЗ ЖИВОТНЫХ И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ЭЛЕМЕНТЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОДУКЦИИ РЕКОМБИНАНТНЫХ БЕЛКОВ

«Классический» метод получения трансгенных млекопитающих, разработанный в начале 80-х годов XX века и широко применяемый до настоящего времени, предполагает микроинъекцию фрагмента ДНК, содержащего трансген, в пронуклеус оплодотворенной яйцеклетки с последующей ее трансплантацией компетентным (псевдобеременным) животным. В этой схеме фрагмент ДНК, содержащий трансген, случайным образом встраивается в геном организма-реципиента в ходе естественных процессов образования разрывов геномной ДНК и их репарации [4]. Содержащие трансген линейные фрагменты ДНК как интактные, так и претерпевшие неспецифическое расщепление в клетке могут встраиваться в различные места генома. Также в широких пределах варьирует число копий трансгена в сайте интеграции [5]. Кроме того, процесс интеграции может происходить на различных стадиях развития эмбриона, что приводит к мозаицизму первичных трансгенных животных, т.е. к присутствию трансгена не во всех клетках организма. Очевидно, что для получения линии животных, несущих трансген, важно присутствие трансгена в геноме половых клеток и передача геномной ДНК, содержащей трансген, по наследству.

Таким образом, в процессе «классического» трансгенеза трансген встраивается случайным образом в геном организма-реципиента с неконтролируемым числом копий интегрировавшего трансгена, в том числе и его неполноразмерных фрагментов. При необходимости получения рекомбинантного белка в состав трансгенной конструкции, учитывая произволь-

ную интеграцию трансгена, необходимо включать полноценный экспрессионный модуль, обеспечивающий автономную транскрипцию трансгена в целевых тканях организма и правильный процессинг мРНК. При использовании альтернативных методов трансгенеза и технологий направленного редактирования генома (см. ниже) это условие не является обязательным.

Ключевой детерминантой, обеспечивающей тканевую специфичность экспрессии трансгена, является промотор. Для продукции рекомбинантных белков в молочной железе успешно использовали ряд промоторов генов, кодирующих белки молока. Такими промоторами, позволяющими получать целевой белок в молоке на достаточно высоком уровне (до десятков граммов на литр молока), являются промоторы генов β -казеина козы и коровы, α -s1-казеина коровы, кислого сывороточного белка (WAP) кролика, α -лактальбумина человека, β -лактоглобулина овцы. Однако уровень продукции белка зависит не только от промотора, но и от ряда других факторов. При этом в силу консервативности транскрипционных факторов, регулирующих продукцию белков молока в клетках молочной железы, промоторы организма одного вида могут обеспечивать эффективную транскрипцию трансгена в клетках молочной железы организма другого вида [6–19].

Как показал опыт получения трансгенных животных, для эффективной продукции рекомбинантного белка, помимо тканеспецифичного промотора, необходимого для обеспечения высокого уровня транскрипции трансгена, часто требуется включение в трансген интронов. Включение интронов в трансген в одних экспериментальных системах позволяло увеличить уровень транскрипта трансгена до 400 раз по сравнению с неинтронированной кДНК, в то время как в других системах эффект от введения интронов был минимальным [20, 21]. Разные интроны, помещенные в одно и то же место гена, могут противоположным образом влиять на уровень экспрессии трансгена [21], и один и тот же интрон в различных позициях в трансгене может оказывать противоположные эффекты на уровень экспрессии [20, 21]. Интроны, наряду с возможным содержанием в них энхансеров, способствующих высокой тканеспецифической транскрипции трансгена, как в случае первого интрона гена β -казеина мыши [22], могут оказывать и не связанный с усилением транскрипции эффект на уровень экспрессии трансгена. Один из возможных механизмов усиления экспрессии заключается в формировании регулярно расположенных нуклеосом в гене и промоторной области благодаря присутствию интронов в последовательности ДНК. Предполагается, что нарушение распределения

нуклеосом может нарушать инициацию или элонгацию транскрипции, затрудняя доступ факторов транскрипции или продвижение РНК-полимеразы в случае слишком близко расположенных нуклеосом [23]. Еще одним механизмом интронзависимого усиления экспрессии трансгена может быть ассоциация сплайсинга с полиаденилированием транскрипта [24]. Таким образом, включение интронов в трансген в целом рассматривается как способ повышения уровня экспрессии трансгена [25]. Этот факт определяет дизайн белкокодирующей последовательности трансгена, которая может быть представлена в виде кДНК, полногеномной копии гена, содержащей эндогенные интроны, либо в виде мини-гена, включающего либо минимизированные нативные интроны гена, либо гибридные или искусственные интроны [25–28]. В ряде случаев мини-ген позволяет увеличить уровень экспрессии трансгена по сравнению с использованием в качестве трансгена кДНК при одновременном снижении общего размера генетической конструкции по сравнению с полноразмерной геномной копией, что упрощает манипуляции с ней. Стоит отметить, что, несмотря на значительное количество данных по дизайну трансгенов, тем не менее, не существует однозначного и универсального рецепта конструирования кодирующей части трансгена. В идеале, при создании животного, продуцирующего рекомбинантный белок в молоко, желателен сравнительный анализ продукции белка с использованием для трансгенеза генетических конструкций, содержащих кДНК, полноразмерный ген и мини-ген. Однако проведение таких работ, несомненно, требует существенных затрат.

Даже оптимальный дизайн экспрессионной кассеты не гарантирует эффективную экспрессию трансгена, что обусловлено случайностью места его интеграции в геном реципиента. Окружающий хроматин, в зависимости от области интеграции трансгена, может оказывать негативное влияние на его транскрипцию. Кроме того, часто встречающаяся тандемная интеграция нескольких копий трансгена может приводить к супрессии их транскрипции за счет интерференции транскрипции соседних копий [29]. Поэтому для увеличения уровня экспрессии трансгена при «классическом» трансгенезе в генетическую конструкцию часто включают *цис*-элементы, предназначенные для ограждения трансгена от влияния окружения на его транскрипцию. Одним из таких наиболее часто используемых *цис*-элементов является инсулятор HS4 β -глобинового локуса кур [30, 31]. Включение двух тандемно расположенных копий инсулятора HS4 β -глобинового локуса кур на 5'-конец генетической конструкции для трансгенеза позволяет улучшить экспрессию трансгена, однако не обе-

спечивает экспрессию, не зависящую от геномного сайта интеграции и числа копий трансгена [31, 32].

Таким образом, применяемый с начала 80-х годов XX века «классический» трансгенез имеет ряд существенных недостатков, к которым, прежде всего, относится высокая вариабельность экспрессии трансгена, обусловленная случайностью сайта его интеграции в геном. Поэтому для отбора линии животных с удовлетворительными характеристиками продукции рекомбинантного белка необходимо иметь достаточно большое число первичных трансгенных животных. При создании хозяйственно значимых трансгенных животных, продуцирующих рекомбинантные белки в молоке, это может представлять существенную техническую проблему из-за необходимости получения большого количества эмбрионов для создания линии трансгенных животных с приемлемыми показателями продукции целевого рекомбинантного белка.

Помимо этих недостатков «классического» трансгенеза, случайность интеграции трансгена в геном животного-реципиента и неконтролируемая вариабельность числа его копий создают определенные сложности, специфические для трансгенных животных, предназначенных для практического использования в реальном секторе экономики. А именно, регистрационный процесс модифицированных организмов предусматривает обязательное определение события трансформации (точного места интеграции трансгенной конструкции в геном), уникального для линии трансгенных животных. При «классическом» трансгенезе определение события трансформации для каждой линии трансгенных животных представляет отдельную экспериментальную задачу, решение которой усложняется при встраивании в геном множественных копий трансгена.

АЛЬТЕРНАТИВЫ «КЛАССИЧЕСКОМУ» ТРАНСГЕНЕЗУ ЖИВОТНЫХ

Случайность интеграции трансгена в геном животного-реципиента и неконтролируемая вариабельность числа его копий являются существенными недостатками «классического» подхода к получению трансгенных животных. Наличие этих недостатков стимулировало развитие альтернативных технологий, позволяющих осуществлять интеграцию трансгена в определенное место генома. До недавнего времени такой альтернативой была интеграция трансгена в определенное место генома с использованием гомологичной рекомбинации либо в эмбриональных стволовых клетках с последующей инъекцией генетически модифицированных клеток в бластоцисты, либо в соматических клетках с последующим переносом ядра соматической клетки в ооцит (somatic cell nucle-

ar transfer, SCNT). В обоих случаях генетические манипуляции проводят с клетками в культуре, что позволяет охарактеризовать корректность интеграции трансгена еще до получения трансгенных животных. Кроме того, качественным улучшением технологии «классического» трансгенеза стала интеграция трансгена в заранее определенное место генома с использованием гомологичной рекомбинации за счет фланкирования экспрессионной кассеты для трансгенеза геномными областями («плечами гомологии», как правило, протяженностью в несколько тысяч пар нуклеотидов). Стоит отметить, что при использовании описанных выше подходов генетические элементы, обеспечивающие получение рекомбинантного белка в молоке, будут такими же, как и при «классическом» трансгенезе. К недостаткам упомянутых подходов относятся необходимость использования селективных маркеров для отбора клонов клеток с интегрированным в геном трансгеном и трудоемкий процесс селекции клонов, требующий проведения анализа большого числа (от нескольких сотен и более) клонов клеток даже при использовании негативной селекции, что вызвано низкой эффективностью гомологичной рекомбинации. При этом даже в случае последующего удаления из экспрессионной кассеты селективного маркера, например, с использованием сайт-специфической рекомбинации при его фланкировании соответствующими сайтами рекомбинации, в геноме, помимо целевых последовательностей трансгена, неизбежно остаются экзогенные последовательности ДНК, что может быть нежелательным.

В качестве клеток-реципиентов для проведения генетических манипуляций *in vitro* можно использовать эмбриональные стволовые клетки. В этом случае для получения генетически модифицированного животного стволовые клетки, несущие генетическую модификацию, инъецируют в бластоцисты с их последующей имплантацией и получением животных, мозаичных по присутствию трансгена [33]. Потомки животных, содержащих трансген в половых клетках, будут немозаичными трансгенными животными. Недостатком этой технологии является возможность утраты плюрипотентных свойств стволовыми клетками при получении генетически модифицированных клонов в процессе культивирования. Кроме того, возможности этого подхода существенно ограничиваются доступностью эмбриональных стволовых клеток целевого вида животных. Создание модифицированных животных с использованием стволовых клеток получило относительно широкое практическое применение лишь для лабораторных животных. Соматические клетки являются альтернативой эмбриональным стволовым клеткам, исключая зависимость от сохранения плюрипотентных свойств и по-

зволяя осуществлять генетические модификации практически любых видов животных. В этом случае для получения трансгенных животных используют технологию SCNT, заменяя ядро ооцита на ядро соматической клетки, несущей генетическую модификацию, и индуцируя после этого развитие эмбриона. Несмотря на то что эпигенетические различия между геномами зиготы и соматической клетки в этом случае не оказывают существенного влияния на характеристики получаемых организмов, эффективность процедуры SCNT остается невысокой. Животные часто оказываются нежизнеспособными и преждевременно погибают, что связывают с побочными эффектами переноса ядра соматической клетки, в частности, с дефектами в развитии внеэмбриональных тканей и эпигенетическом репрограммировании [34–36]. Тем не менее, именно этот технологический подход был успешно применен при создании коз, продуцирующих рекомбинантный антитромбин III человека в молоко, который является основой одобренного к применению лекарственного препарата Atryn® [37], а также ряда других линий трансгенных животных, пригодных к промышленному использованию [8, 38, 39].

САЙТ-СПЕЦИФИЧЕСКИЕ РЕКОМБИНАЗЫ ДЛЯ НАПРАВЛЕННОЙ ВСТРОЙКИ ТРАНСГЕНА В ГЕНОМ

Помимо методов, основанных на гомологичной рекомбинации трансгена, и использовании клеток в культуре в сочетании с позитивной и негативной селекцией для отбора клонов клеток с гомологичной рекомбинацией, еще одной альтернативой, позволяющей осуществлять таргетную встройку трансгена в геном реципиента, является использование сайт-специфических рекомбиназ. В целом концепция применения сайт-специфических рекомбиназ заключается в получении линии трансгенных животных, несущих в своем геноме сайт(ы) узнавания рекомбиназ, которые могут быть интегрированы в определенное место генома в результате гомологичной рекомбинации или в случайное место генома при использовании «классического» трансгенеза. В последнем случае из линий трансгенных животных с различными вариантами локализации трансгена в геноме отбирается та, в которой трансген интегрирован в участок генома, обеспечивающий требуемые свойства его экспрессии. Такая линия животных используется затем как универсальный реципиент для встраивания различных трансгенов в определенное место генома посредством сайт-специфической рекомбинации. С этой целью генетическую конструкцию, содержащую трансген, фланкированный сайтами рекомбинации, микроинъецируют в оплодотворенную яйцеклетку трансгенного животного,

содержащего в геноме такие же сайты рекомбинации, вместе с вектором для экспрессии рекомбиназы или ее мРНК [40, 41]. В результате происходит сайт-специфическая рекомбинация, и трансген встраивается в геном животного-реципиента. Важно отметить, что таким способом можно проводить микроинъекции непосредственно в ооциты, помимо использования в качестве реципиента трансгенной конструкции линий эмбриональных стволовых или соматических клеток, несущих в геноме сайты узнавания рекомбиназ.

На практике для сайт-специфического трансгена достаточно широко используют три системы рекомбинации: на основе рекомбиназ Cre фага P1 и Flp дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* и интегразы фага ϕ C31 [42, 43]. При этом использование нативного сайта рекомбинации в паре с его вариантом с измененной последовательностью, обеспечивающим рекомбинацию только с полностью идентичным, но не нативным сайтом рекомбинации, позволяет осуществлять встройку трансгенной кассеты в заранее заданном направлении (технология опосредованного рекомбиназой обмена кассетами, Recombinase-Mediated Cassette Exchange, RMCE) [42, 44]. При интеграции кассеты с сайтами рекомбинации непосредственно в ген, кодирующий белок молока, становится возможным экспрессия целевого трансгена, обеспечивающего продукцию рекомбинантного белка в молоке под контролем эндогенного промотора, активность которого специфична для клеток молочной железы [45]. В качестве такого промотора (гена для интеграции) можно использовать ген, кодирующий β -казеин [46–48], отсутствие которого не влияет на нормальный процесс лактации [49, 50].

Альтернативный подход к обеспечению эффективной и стабильной экспрессии трансгена, в том числе в клетках молочной железы, с помощью соответствующих тканеспецифичных промоторов, состоит в использовании в качестве сайтов интеграции трансгенов так называемых «спокойных гаваней» (safe harbor). Под такими гаванями понимают геномные локусы, с одной стороны, несущественные для развития и функционирования организма, что позволяет без вреда для организма встроить в такой локус трансген, а с другой, обеспечивающие высокий уровень экспрессии трансгена при наличии соответствующих регуляторных элементов в нем. Примерами таких геномных локусов являются локусы *ROSA26*, *Cd6*, *Hipp11* и ряд других [33, 40, 51, 52].

В дополнение к перечисленным преимуществам применение сайт-специфических рекомбиназ и интеграз для направленной встройки трансгена в геном животных имеет и регуляторное значение в случае трансгенных животных, предназначенных для прак-

тического использования, поскольку существенно упрощается задача характеристики события трансформации (места интеграции трансгена в геном организма-реципиента).

ПРИМЕНЕНИЕ ТЕХНОЛОГИЙ НАПРАВЛЕННОГО РЕДАКТИРОВАНИЯ ГЕНОМА ДЛЯ ТРАНСГЕНЕЗА ЖИВОТНЫХ

К существенному прогрессу в области трансгенеза животных привело появление технологий направленного редактирования генома с использованием сайт-специфических нуклеаз, позволяющих намного более эффективно осуществлять встройку трансгена в определенное место генома организма-реципиента, по сравнению с использованием лишь последовательностей для гомологичной рекомбинации, фланкирующих трансген [53]. Ниже будут рассмотрены молекулярные механизмы, лежащие в основе технологий направленного редактирования генома, которые представляются наиболее перспективными для получения хозяйственно ценных животных, в молоке которых продуцируются рекомбинантные белки.

Таргетная интеграция трансгена с использованием сайт-специфических нуклеаз основана на значительном увеличении эффективности сайт-специфической интеграции трансгена в геном организма-реципиента в ходе процессов репарации двух- или одноцепочечных разрывов ДНК [54]. Технологии направленного редактирования генома существенно увеличивают эффективность встройки трансгена в предопределенное место генома, позволяя в ряде случаев отказаться от использования селективных маркеров и, что особенно важно, с достаточно высокой эффективностью осуществлять направленную встройку трансгена непосредственно в геном зиготы с последующим получением трансгенных животных [55–57].

Можно выделить несколько классов искусственных нуклеаз, используемых для направленного редактирования генома и получения трансгенных животных: ZFN (Zinc finger nuclease) [58], TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nuclease) [59], искусственные мегануклеазы [60], а также гибридные варианты искусственных нуклеаз на их основе, например, мега-TAL [61] и др. Однако без преувеличения революционным прорывом в этой области можно считать появление технологии направленного редактирования генома на основе системы CRISPR/Cas9 благодаря простоте ее практической реализации в сочетании с высокой эффективностью по сравнению с TALEN и ZFN [53].

ZFN была первой нуклеазой, сконструированной для применения в генной инженерии с целью направленного редактирования генома. Нуклеаза содержит

ДНК-связывающие домены цинк-пальцевого белка ZFP (zinc finger protein), обеспечивающего высоко-специфичное связывание с целевой последовательностью ДНК, и каталитический домен эндонуклеазы рестрикции FokI, вносящий в сайт связывания двухцепочечный разрыв. Каждый цинковый палец узнает определенный триплет нуклеотидов. При конструировании ДНК-связывающего домена ZFN используют от трех до шести цинковых пальцев. Комбинируя их, можно создать ZFN практически для любой последовательности ДНК [62]. Строение и применение ZFN подробно описаны в [63].

Позднее был расшифрован более простой по сравнению с ZFN код TALE (transcription activator-like effector) [64, 65]. Белки TALE патогенных бактерий растений рода *Xanthomonas* содержат ДНК-связывающий домен, состоящий из серии мономеров, каждый из которых связывается с одним нуклеотидом в целевой нуклеотидной последовательности. Мономеры представляют собой тандемные повторы из 33–35 аминокислотных остатков, кроме последнего «полуповтора», который состоит из 20 аминокислотных остатков. Аминокислотные остатки, расположенные в позициях 12 и 13 мономера, являются высоковариабельными, они отвечают за узнавание определенного нуклеотида: Asn-Ile, Asn-Gly, Asn-Asn и His-Asp связывают нуклеотиды А, Т, G и С соответственно. Как и ZFN, искусственная нуклеаза TALEN представляет собой химеру ДНК-связывающего домена TALE, состоящего из 20–30 мономеров, и каталитического домена нуклеазы FokI [66], что позволяет вносить двухцепочечный разрыв в непосредственной близости от определяемой вариабельными аминокислотными остатками мономеров TALEN целевой последовательности ДНК.

В системе CRISPR/Cas9 мишень узнается за счет комплементарного взаимодействия сrPHK (CRISPR PHK) и ДНК целевого сайта. При этом образуется комплекс tracrRNA (trans-activating crRNA), crPHK и нуклеазы Cas9, которая вносит двухцепочечный разрыв в дуплекс PHK/ДНК [67]. Таким образом, для определения специфичности и для направленного действия нуклеазы в системе CRISPR/Cas9 необходим лишь синтез PHK, комплементарной целевой ДНК в геноме, в отличие от технологий на основе ZFN и TALEN, требующих зачастую сложного и трудоемкого дизайна белков. На сегодняшний день разработан ряд модификаций и аналогов системы CRISPR/Cas9, например, CRISPR/Cpf1 и CRISPR/C2c2 [68–72], с улучшенными свойствами для редактирования генома и решения определенных целевых задач.

Необходимо отметить, что искусственные нуклеазы ZFN и TALEN не обладают абсолютной специфичностью. Еще в большей степени эта проблема

относится к системе CRISPR/Cas9. Проблемы расщепления ДНК искусственными нуклеазами в нецелевых сайтах генома могут решаться различными способами, позволяющими увеличить специфичность внесения изменений в геном и снизить вероятность возникновения незапрограммированных генетических изменений. Вместе с тем следует отметить, что проблема неспецифического внесения изменений в геном организма-реципиента не является столь острой при получении трансгенных животных по сравнению с технологиями направленного редактирования генома в области клинического применения, поскольку изменения, случайно возникшие в нецелевых сайтах генома, можно исключить в процессе скрещивания.

В эукариотических клетках двухцепочечные разрывы, вносимые сайт-специфическими нуклеазами, могут репарироваться посредством нескольких механизмов, в частности в результате гомологичной рекомбинации (homology-directed repair, HDR), при которой матрицей для репарации служит сестринская, или гомологичная хроматида, а также донорная ДНК с плечами гомологии длиной 200–800 п.н. [73], позволяя интегрировать ДНК между плечами гомологии в место разрыва в геномной ДНК [74]. Кроме того, репарация может осуществляться за счет негомологичного соединения концов (non-homologous end joining, NHEJ), при котором происходит лигирование негомологичных концов или имеющих небольшую гомологию (2–5 нуклеотидов), в результате чего могут появляться делеции или инсерции длиной несколько нуклеотидов [75]. Репарация может также происходить путем опосредованного микрогомологией соединения концов (microhomology-mediated end joining, MMEJ), которое нуждается в гомологичной ДНК длиной 5–25 нуклеотидов в месте разрыва или рядом с ним, и приводит к делециям, инсерциям и транслокациям [76], а также за счет одностороннего отжига цепи (single strand annealing, SSA), для которого необходимы гомологичные участки одноцепочечной матрицы длиной более 30 нуклеотидов [77].

Ключевым механизмом репарации разрывов, вносимых сайт-направленными нуклеазами в детерминированное место генома, является гомологичная рекомбинация, позволяющая интегрировать трансген, находящийся между плечами гомологии, в заданное место генома. Этот подход успешно реализуется при трансгенезе животных с использованием двухцепочечных матриц, содержащих трансген, фланкированный плечами гомологии длиной от 1 до 3 т.п.н., с эффективностью репарации от 0.5 до 20% [77–80]. Поскольку репарация разрывов, вносимых искусственными нуклеазами, с большей эффективностью (до 80%) происходит по механизму NHEJ [81], одним

из способов увеличения эффективности гомологичной рекомбинации и инсерции трансгена является использование ингибиторов NHEJ [82, 83], которые, однако, обладают мутагенным эффектом и увеличивают вероятность встройки трансгена в нецелевой локус генома [80]. Эффективность гомологичной рекомбинации может быть увеличена путем удлинения плечей гомологии и подбора оптимальных концентраций микроинъектируемых в зиготу компонентов для CRISPR/Cas9-опосредованной модификации генома [78], а также за счет использования мутантной формы нуклеазы Cas9 (nCas9, никаза), вносящей одноцепочечные разрывы в ДНК в плюс- и минус-цепи геномного локуса-мишени на удалении друг от друга [84].

Вместе с тем, разработаны альтернативные технологии, обеспечивающие направленное встраивание протяженных (до 10–15 т.п.н.) фрагментов ДНК в заданное место генома без использования механизма HDR. Например, одна из таких технологий основана на репарации разрывов по механизму NHEJ за счет лигирования комплементарных перекрывающихся одноцепочечных концов ДНК геномного сайта-мишени и матрицы для репарации, включающей в себя трансген, генерируемых парой нуклеаз ZFN при расщеплении целевых последовательностей генома и матрицы для репарации [85, 86]. Инсерция протяженных фрагментов ДНК в заданное место генома может происходить и по механизму MMEJ во вносимые нуклеазами TALEN или Cas9 двухцепочечные разрывы при включении в матрицу для гомологичной рекомбинации коротких последовательностей, гомологичных прилегающим к сайту расщепления нуклеаз участкам ДНК [87, 88].

Таким образом, бурное развитие технологий направленного редактирования генома позволяет избежать ряд недостатков, присущих «классическому» трансгенезу, таких, как случайное встраивание трансгена в геном и неконтролируемая вариабельность числа копий трансгена. С помощью технологии CRISPR/Cas9 можно создавать трансгенных животных с интеграцией трансгена в заданное место генома, что вместе с использованием гомологичной рекомбинации определяет контролируемое число копий трансгена. В частности, одним из наиболее перспективных подходов к созданию животных, продуцирующих рекомбинантные белки в молоке, считается таргетная интеграция трансгена с помощью системы CRISPR/Cas9 в гены, кодирующие белки молока таким образом, чтобы экспрессия трансгена контролировалась эндогенными регуляторными последовательностями гена животного-реципиента. Применение подобных технологий позволит упростить и стандартизировать технологии получения

трансгенных животных-продуцентов рекомбинантных белков. Это позволит сделать процесс трансгенеза более эффективным и снизит затраты на получение хозяйственно ценных трансгенных животных. Технологии редактирования генома позволят создавать трансгенных животных с интеграцией одной копии трансгена в определенное место генома, что позволит проводить достоверное сравнение влияния тех или иных генетических элементов, представленных в конструкции для трансгенеза, на уровень продукции рекомбинантного белка в молоке, что невозможно сделать при «классическом» трансгенезе в силу интеграции неконтролируемого количества копий трансгенов в разные геномные локусы у разных линий трансгенных животных.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие технологий направленного редактирования генома открывает перспективы для создания трансгенных животных на качественно новом уровне. Благодаря применению знаний о молекулярно-генетических механизмах регуляции экспрессии генов, функционирования генома и доступным сегодня гено-инженерным технологиям становится возможной стандартизация процесса получения трансгенных животных с заданными и стабильными целевыми характеристиками, что в полной мере относится к продукции рекомбинантных белков в молоке для производства лекарственных препаратов, биологически активных добавок и т.д.

С учетом совокупности разработанных на сегодняшний день технологий, которые продолжают активно развиваться, оптимальным направлением работ в области продукции рекомбинантных белков в молоке хозяйственно ценных животных является создание линий животных (в зависимости от потребности в целевом белке – кроликов, овец и коз, коров), геном которых модифицирован инсерцией в ген, кодирующий белок молока (например, ген β -казеина), последовательностей для асимметричной направленной рекомбинации экспрессионной кассеты. Промотор и иные регуляторные последовательности этого гена будут обеспечивать высокий уровень экспрессии трансгена. Подобная инсерция может осуществляться с высокой эффективностью путем микроинъекции в ооциты генетической конструкции с экспрессионной кассетой в смеси с соответствующей рекомбинантной интегразой или ее мРНК. Такие линии животных с недоступной ранее эффективностью могут создаваться с применением технологий редактирования генома с помощью системы CRISPR/Cas9 или ее аналогов благодаря простоте реализации и дизайна этой системы. При этом технологии синтетической биологии позволяют использовать

для обеспечения эффективной экспрессии трансгена и продукции целевого белка не полногеномные копии в качестве трансгена, а мини-гены с искусственными интронами, что упрощает дизайн и создание генетических конструкций для трансгенеза.

Перспективность развития этого направления производства рекомбинантных белков, прежде всего для нужд медицины, подтверждается присутствием на рынке двух лекарственных препаратов на основе рекомбинантных белков, получаемых из молока трансгенных животных. Необходимо отметить возможность получения значительных количеств рекомбинантных белков с затратами, существенно меньшими по сравнению с продукцией в клеточных системах.

Применение современных технологий существенно упрощает выполнение требований регулятора в части описания события трансформации. В то же время требования к биологической безопасности получения рекомбинантных белков в молоке потребуют пересмотра стандартов содержания сельскохозяйственных животных и ветеринарного контроля для исключения присутствия зоонозных и антропонозных инфекционных агентов, а также контролируемых параметров производимых лекарственных средств. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта
Российского научного фонда
(проект № 16-14-00150).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Wang Y., Zhao S., Bai L., Fan J., Liu E. // *BioMed Res. Internat.* 2013. V. 2013. P. 580463.
- The Global Technology Revolution 2020, In-Depth Analyses. Bio/Nano/Materials/Information Trends, Drivers, Barriers, and Social Implications. RAND Corp., 2006. P. 145.
- Максименко О.Г., Дейкин А.В., Ходарович Ю.М., Георгиев П.Г. // *Acta Naturae*. 2013. Т. 5. С. 33–47.
- Smith K. // *Reprod. Nutr. Dev.* 2001. V. 41. P. 465–485.
- Niemann H., Kues A.W. // *Anim. Reprod. Sci.* 2000. V. 60–61. P. 277–293.
- Levy J.H., Weisinger A., Ziomek C.A., Echelard Y. // *Semin. Thromb. Hemost.* 2001. V. 27. P. 405–416.
- Coulibaly S., Besenfelder U., Miller I., Zinovieva N., Lassnig C., Kotler T., Kotler T., Jameson J.L., Gemeiner M., Müller M., et al. // *Mol. Reprod. Dev.* 2002. V. 63. P. 3003008.
- Amiri Yekta A., Dalman A., Eftekhari-Yazdi P., Sanati M.H., Shahverdi A.H., Fakheri R., Vazirinasab H., Daneshzadeh M.T., Vojgani M., Zomorodipour A., Fatemi N., et al. // *Transgenic Res.* 2013. V. 22. P. 131–142.
- Mikus T., Malý P., Poplstein M., Landa V., Trefil P., Lidický J. // *Folia Biol. (Praha)*. 2001. V. 47. P. 187–195.
- Carver A., Wright G., Cottom D., Cooper J., Dalrymple M., Temperley S., Udell M., Reeves D., Percy J., Scott A. // *Cytotechnology*. 1992. V. 9. P. 77–84.
- Wright G., Carver A., Cottom D., Reeves D., Scott A., Simons P., Wilmot I., Garner I., Colman A. // *Nat. Biotechnol.* 1991. V. 9. P. 830–834.
- Archibald A.L., McClenaghan M., Hornsey V., Simons J.P., Clark A.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1990. V. 87. P. 5178–5182.
- Baldassarre H., Hockley D.K., Doré M., Brochu E., Hakier B., Zhao X., Bordignon V. // *Transgenic Res.* 2008. V. 17. P. 73–84.
- Baldassarre H., Hockley D.K., Olaniyan B., Brochu E., Zhao X., Mustafa A., Bordignon V. // *Transgenic Res.* 2008. V. 17. P. 863–872.
- Huang Y.-J., Huang Y., Baldassarre H., Wang B., Lazaris A., Leduc M., Bilodeau A.S., Bellemare A., Côté M., Herskovits P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 13603–13608.
- Nuijens J.H., van Berkel P.H., Geerts M.E., Hartevelt P.P., de Boer H.A., van Veen H.A., Pieper F.R. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. P. 8802–8807.
- Platenburg G.J., Kootwijk E.P., Kooiman P.M., Woloshuk S.L., Nuijens J.H., Krimpenfort P.J., Pieper F.R., de Boer H.A., Strijker R. // *Transgenic Res.* 1994. V. 3. P. 99–108.
- Wang J., Yang P., Tang B., Sun X., Zhang R., Guo C., Gong G., Liu Y., Li R., Zhang L., et al. // *J. Dairy Sci.* 2008. V. 91. P. 4466–4476.
- Li H., Liu Q., Cui K., Liu J., Ren Y., Shi D. // *Transgenic Res.* 2013. V. 22. P. 169–178.
- Buchman A.R., Berg P. // *Mol. Cell. Biol.* 1988. V. 8. P. 4395–4405.
- Bourdon V., Harvey A., Lonsdale D.M. // *EMBO Rep.* 2001. V. 2. P. 394–398.
- Kang Y.K., Lee C.S., Chung A.S., Lee K.K. // *Mol. Cells*. 1998. V. 8. P. 259–265.
- Liu K., Sandgren E.P., Palmiter R.D., Stein A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1995. V. 92. P. 7724–7728.
- Huang M.T., Gorman C.M. // *Nuc. Acids Res.* 1990. V. 18. P. 937–947.
- Palmiter R.D., Sandgren E.P., Avarbock M.R., Allen D.D., Brinster R.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1991. V. 88. P. 478–482.
- Choi T., Huang M., Gorman C., Jaenisch R. // *Mol. Cell. Biol.* 1991. V. 11. P. 3070–3074.
- Barash I., Nathan M., Kari R., Ilan N., Shani M., Hurwitz D.R. // *Nucl. Acids Res.* 1996. V. 24. P. 602–610.
- Тихонов М.В., Максименко О.Г., Георгиев П.Г., Коробко И.В. // *Молекуляр. биология*. 2017. Т. 51. С. 671–676.
- Eszterhas S.K., Bouhassira E.E., Martin D.I., Fiering S. // *Mol. Cell. Biol.* 2002. V. 22. P. 469–479.
- Emery D.W., Yannaki E., Tubb J., Nishino T., Li Q., Stamatoyannopoulos G. // *Blood*. 2002. V. 100. P. 2012–2019.
- Guglielmi L., Le Bert M., Truffinet V., Cogné M., Denizot Y. // *Biochim. Biophys. Res. Commun.* 2003. V. 307. P. 466–471.
- Truffinet V., Guglielmi L., Cogné M., Denizot Y. // *Immunol. Lett.* 2005. V. 96. P. 303–304.
- Kong Q., Hai T., Ma J., Huang T., Jiang D., Xie B., Wu M., Wang J., Song Y., Wang Y., et al. // *PLoS One*. 2014. V. 9. P. e107945.
- Eilertsen K.J., Power R.A., Harkins L.L., Misica P. // *Anim. Reprod. Sci.* 2007. V. 98. P. 129–146.
- Campbell K.H., Fisher P., Chen W.C., Choi I., Kelly R.D., Lee J.H., Xhu J. // *Theriogenology*. 2007. V. 68. Suppl 1. P. S214–231.
- Dinnyes A., Tian X.C., Yang X. // *Reprod. Domest. Anim.* 2008. V. 43. Suppl 2. P. 302–309.
- Edmunds T., van Patten S.M., Pollock J., Hanson E., Bernasconi R., Higgins E., Manavalan P., Ziomek C., Meade H., McPherson J.M., et al. // *Blood*. 1998. V. 91. P. 4561–4571.
- Yang P., Wang J., Gong G., Sun X., Zhang R., Du Z., Liu Y., Li

- R., Ding F., Tang B., et al. // *PLoS One*. 2008. V. 3. P. e3453.
39. Baldassarre H., Wang B., Kafidi N., Gauthier M., Neveu N., Lapointe J., Sneek L., Leduc M., Duguay F., Zhou J.F., et al. // *Theriogenology*. 2003. V. 59. P. 831–839.
40. Tasic B., Hippenmeyer S., Wang C., Gamboa M., Zong H., Chen-Tsai Y., Luo L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. P. 7902–7907.
41. Yu H., Wang X., Zhu L., He Z., Liu G., Xu X., Chen J., Cheng G. // *Gene*. 2013. V. 515. P. 367–371.
42. Wirth D., Gama-Norton L., Riemer P., Sandhu U., Schucht R., Hauser H. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007. V. 18. P. 411–419.
43. Bockamp E., Maringer M., Spangenberg C., Fees S., Fraser S., Eshkind L., Oesch F., Zabel B. // *Physiol. Genomics*. 2002. V. 11. P. 115–132.
44. Bode J., Schlake T., Iber M., Schübeler D., Seibler J., Snezhkov E., Nikolaev L. // *Biol. Chem.* 2000. V. 381. P. 801–813.
45. Liu X., Wang Y., Guo W., Chang B., Liu J., Guo Z., Quan F., Zhang Y. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 2565.
46. Jeong Y.H., Kim Y.J., Kim E.Y., Kim S.E., Kim J., Park M.J., Lee H.G., Park S.P., Kang M.J. // *Zygote*. 2016. V. 24. P. 442–456.
47. Lee S.M., Kim J.W., Jeong Y.H., Kim S.E., Kim Y.J., Moon S.J., Lee J.H., Kim K.J., Kim M.K., Kang M.J. // *Asian-Australas J. Anim. Sci.* 2014. V. 27. P. 1644–1651.
48. Robinson C., Kolb A.F. // *Exp. Cell. Res.* 2009. V. 315. P. 508–522.
49. Kumar S., Clarke A.R., Hooper M.L., Horne D.S., Law A.J., Leaver J., Springbett A., Stevenson E., Simons J.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. P. 6138–6142.
50. Cosenza G., Pauciullo A., Colimoro L., Mancusi A., Rando A., Di Bernardino D., Ramunno L. // *Anim. Genet.* 2007. V. 38. P. 655–658.
51. Soriano P. // *Nat. Genet.* 1999. V. 21. P. 70–71.
52. DeKolver R.C., Choi V.M., Moehle E.A., Paschon D.E., Hockemeyer D., Meijsing S.H., Sancak Y., Cui X., Steine E.J., Miller J.C., et al. // *Genome Res.* 2010. V. 20. P. 1133–1142.
53. Kasperek P., Krausova M., Haneckova R., Kriz V., Zbodakova O., Korinek V., Sedlacek R. // *FEBS Lett.* 2014. V. 588. P. 3982–3988.
54. Richardson C., Moynahan M.E., Jasin M. // *Genes Dev.* 1998. V. 12. P. 3831–3842.
55. Remy S., Tesson L., Menoret S., Usal C., De Cian A., Thepenier V., Thinard R., Baron D., Charpentier M., Renaud J.B., et al. // *Genome Res.* 2014. V. 24. P. 1371–1383.
56. Ménoret S., Fontanière S., Jantze D., Tesson L., Thinard R., Rémy S., Usal C., Ouisse L.H., Fraichard A., Anegon I. // *FASEB J.* 2013. V. 27. P. 703–711.
57. Porteus M.H., Carroll D. // *Nat. Biotechnol.* 2005. V. 23. P. 967–973.
58. Bogdanove A.J., Voytas D.F. // *Science*. 2011. V. 333. P. 1843–1846.
59. Silva G., Poirot L., Galetto R., Smith J., Montoya G., Duchateau P., Pâques F. // *Curr. Gene Ther.* 2011. V. 11. P. 11–27.
60. Boissel S., Jarjour J., Astrakhan A., Adey A., Gouble A., Duchateau P., Shendure J., Stoddard B.L., Certo M.T., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. P. 2591–2601.
61. Segal D.J., Beerli R.R., Blancafort P., Dreier B., Effertz K., Huber A., Kokschi B., Lund C.V., Magnenat L., Valente D., et al. // *Biochemistry*. 2003. V. 42. P. 2137–2148.
62. Urnov F.D., Rebar E.J., Holmes M.C., Zhang H.S., Gregory P.D. // *Nat. Rev. Genet.* 2010. V. 11. P. 636–646.
63. Boch J., Scholze H., Schornack S., Landgraf A., Hahn S., Kay S., Lahaye T., Nickstadt A., Bonas U. // *Science*. 2009. V. 326. P. 1509–1512.
64. Moscou M.J., Bogdanove A.J. // *Science*. 2009. V. 326. P. 1501.
65. Christian M., Cermak T., Doyle E.L., Schmidt C., Zhang F., Hummel A., Bogdanove A.J., Voytas D.F. // *Genetics*. 2010. V. 186. P. 757–761.
66. Gaj T., Gersbach C.A., Barbas C.F. 3rd. // *Trends Biotechnol.* 2013. V. 31. P. 397–405.
67. Nemudryi A.A., Valetdinova K.R., Medvedev S.P., Zakian S.M. // *Acta Naturae*. 2014. V. 6. P. 19–40.
68. Ruan J., Xu J., Chen-Tsai R.Y., Li K. // *Transgenic Res.* 2017. V. 26. P. 715–726.
69. Stella S., Alcón P., Montoya G. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2017. V. 24. P. 882–892.
70. Murugan K., Babu K., Sundaresan R., Rajan R., Sashital D.G. // *Mol. Cell*. 2017. V. 68. P. 15–25.
71. Mitsunobu H., Teramoto J., Nishida K., Kondo A. // *Trends Biotechnol.* 2017. V. 35. P. 983–996.
72. Chira S., Gulei D., Hajitou A., Zimta A.A., Cordelier P., Berindan-Neagoe I. // *Mol. Ther. Nucl. Acids*. 2017. V. 7. P. 211–222.
73. Urnov F.D., Miller J.C., Lee Y.L., Beausejour C.M., Rock J.M., Augustus S., Jamieson A.C., Porteus M.H., Gregory P.D., Holmes M.C. // *Nature*. 2005. V. 435. P. 646–651.
74. Moynahan M.E., Jasin M. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2010. V. 11. P. 196–207.
75. Lieber M.R. // *Annu. Rev. Biochem.* 2010. V. 79. P. 181–211.
76. McVey M., Lee S.E. // *Trends Genet.* 2008. V. 24. P. 529–538.
77. Sugawara N., Ira G., Haber J.E. // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. P. 5300–5309.
78. Wang B., Li K., Wang A., Reiser M., Saunders T., Lockey R.F., Wang J.W. // *Biotechniques*. 2015. V. 59. P. 201–208.
79. Wang H., Yang H., Shivalila C.S., Dawlaty M.M., Cheng A.W., Zhang F., Jaenisch R. // *Cell*. 2013. V. 153. P. 910–918.
80. Yang H., Wang H., Shivalila C.S., Cheng A.W., Shi L., Jaenisch L. // *Cell*. 2013. V. 154. P. 1370–1379.
81. Frit P., Barboule N., Yuan Y., Gomez D., Calsou P. // *DNA Repair (Amst.)*. 2014. V. 17. P. 81–97.
82. Maruyama T., Dougan S.K., Truttmann M.C., Bilate A.M., Ingram J.R., Ploegh H.L. // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. P. 538–542.
83. Chu V.T., Weber T., Wefers B., Wurst W., Sander S., Rajewsky K., Kühn R. // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. P. 543–548.
84. Li K., Wang G., Andersen T., Zhou P., Pu W.T. // *PLoS One*. 2014. V. 9. P. e105779.
85. Maresca M., Lin V.G., Guo N., Yang Y. // *Genome Res.* 2013. V. 23. P. 539–546.
86. Cristea S., Freyvert Y., Santiago Y., Holmes M.C., Urnov F.D., Gregory P.D., Cost G.J. // *Biotechnol. Bioeng.* 2013. V. 110. P. 871–880.
87. Nakade S., Tsubota T., Sakane Y., Kume S., Sakamoto N., Obara M., Daimon T., Sezutsu H., Yamamoto T., Sakuma T., et al. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 5560.
88. Sakuma T., Nakade S., Sakane Y., Suzuki K.T., Yamamoto T. // *Nat. Protoc.* 2016. V. 11. P. 118–133.

УДК 539.27; 577.322.54; 620.187.3

Пространственная структура цитохром с нитритредуктазы, полученная методом криоэлектронной микроскопии

Т. Н. Баймухаметов¹, Ю. М. Чесноков¹, Е. Б. Пичкур¹, К. М. Бойко^{1,2}, Т. В. Тихонова², А. Г. Мясников^{3,4,5}, А. Л. Васильев^{1,6}, А. В. Липкин¹, В. О. Попов^{1,2*}, М. В. Ковальчук^{1,6}

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», 123098, Москва, пл. Академика Курчатова, 1, Россия

²Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, стр. 2, Россия

³University of California San Francisco Mission Bay, 94158-2517, Genentech Hall, San Francisco, CA, USA

⁴Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова национального исследовательского центра «Курчатовский институт», 188300, Ленинградская обл., Гатчина, мкр. Орлова роща, 1, Россия

⁵Centre for Integrative Biology, Department of Integrated Structural Biology, Institute of Genetics and of Molecular and Cellular Biology, 67404, 1 rue Laurent Fries, Illkirch, France

⁶Федеральный научно-исследовательский центр «Кристаллография и фотоника» РАН, 119333, Москва, Ленинский просп., 59, Россия

*E-mail: vpopov@inbi.ras.ru

Поступила в редакцию 05.02.2018

Принята к печати 02.06.2018

РЕФЕРАТ Методом криоэлектронной микроскопии получена структура цитохром с нитритредуктазы из бактерии *Thioalkalivibrio nitratireducens* с разрешением 2.56 Å. Проверена возможная структурная гетерогенность фермента, показано отсутствие значимых различий как в ходе полипептидной цепи, так и в ориентации боковых групп модели, полученной на основании данных криоэлектронной микроскопии, относительно структуры высокого разрешения, полученной методом рентгеноструктурного анализа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА анализ проекций одиночных частиц, криоэлектронная микроскопия высокого разрешения, структурная биология, цитохром с нитритредуктаза.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ И ОПРЕДЕЛЕНИЙ TvNiR – цитохром с нитритредуктаза из бактерии *Thioalkalivibrio nitratireducens*; крио-ЭМ – криоэлектронная микроскопия; крио-ПЭМ – просвечивающий криоэлектронный микроскоп; РСА – рентгеноструктурный анализ; КМОП – комплементарная структура металл-оксид-полупроводник (CMOS – complementary metal-oxide-semiconductor); ФПК – функция передачи контраста (CTF – contrast transfer function); FSC (Fourier Shell Correlation) – функция корреляции, используемая для оценки разрешения. *Стек изображений* – единица исходных данных, массив из n 16-битных изображений размера 4096×4096 пикселей, детектируемых от одной области образца в течение всего времени экспозиции. В данной работе $n = 30$, типичный объем стека с учетом всех метаданных при этом составляет ~ 1 Гб. *Частица (изображение частицы)* – одиночная проекция объекта на детектируемом изображении. *Карта плотности* – функция плотности распределения эффективного рассеивающего потенциала объекта.

ВВЕДЕНИЕ

Прогресс последних лет в области криоэлектронной микроскопии (крио-ЭМ), связанный с увеличением пространственного разрешения и снижением молекулярной массы исследуемых объектов, вплотную приближает данный метод к возможностям

рентгеноструктурного анализа [1, 2]. Уникальная способность получать структурную информацию о гетерогенных объектах в состоянии, близком к нативному, относительная простота подготовки образцов [3] делают крио-ПЭМ мощным инструментом современной структурной биологии [4, 5]. Целый

ряд задач, связанных с трудностями, возникающими при кристаллизации большинства мембранных белков или при поиске различных переходных состояний молекулярных комплексов, сегодня могут быть решены только методами крио-ПЭМ, составляя при этом полную комплементарность классическим рентгеновским методам [6].

В настоящей работе с использованием приборных и вычислительных мощностей Курчатовского научного центра пространственная структура фермента цитохром с нитритредуктазы из бактерии *Thioalkalivibrio nitratireducens* (TvNiR) [7] впервые исследована методом анализа проекций одиночных частиц (Single Particle Analysis) [8] – основным подходом криоэлектронной микроскопии для объектов подобной природы. Этот фермент катализирует реакцию окисления нитрита до аммония без вывода промежуточных продуктов реакции за пределы активного центра [7]. В растворе и в кристалле фермент находится в состоянии стабильного гексамера, имеющего форму бипирамиды с характерной высотой ~150 Å и основанием ~120 Å [9]. Симметрия молекулы гексамера принадлежит группе D₃, а молекулярная масса объекта составляет ~360 кДа, что делает TvNiR весьма удобным объектом исследования методом крио-ЭМ. Задача настоящего исследования состояла в получении методом крио-ЭМ структурных данных для TvNiR и их сравнении с данными РСА высокого разрешения, полученными ранее [9–11].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение и очистка белка

Выделение и очистку нативной TvNiR проводили двустадийно в соответствии с описанной ранее процедурой [7]. Анионообменную хроматографию проводили на колонке с сорбентом DEAE-сефароза (Fast Flow) объемом 35 мл при 4°C на хроматографе BioLogic LP (BioRad, США). Колонка была предварительно уравновешена 25-мМ калий-фосфатным буфером, pH 7.0. После нанесения экстракта и промывки колонки тем же буфером белок элюировали линейным градиентом концентрации NaCl 0–1.0 М. Гель-фильтрационную хроматографию проводили на хроматографе АКТА FPLC (Amersham Biosciences, США) с использованием колонки Superdex™200 10/300, уравновешенной 50-мМ калий-фосфатным буфером, pH 7.0, содержащим 0.15 М NaCl. Для структурных экспериментов белок был сконцентрирован до концентрации 10 мг/мл.

Подготовка образцов для крио-ЭМ

При подборе оптимальной концентрации белка в растворе тестировали концентрации в диапазоне от 0.1

до 6 мг/мл, нанесенные на сетки Lacey Carbon 300 mesh (Ted Pella, США). Для сбора экспериментальных данных применяли сетки Quantifoil R1.2/1.3 300 mesh (Quantifoil, Германия) с углеродной подложкой, имеющей массив регулярных отверстий диаметром 1.2 мкм и периодом 2.5 мкм. Сетки в течение 30 с обрабатывали тлеющим разрядом в установке для гидрофилизации PELCO easyGlow (Ted Pella, США) при давлении в камере 0.26 мбар и силе тока 25 мА. Препарат (3 мкл, 6 мг/мл) наносили на сетки и замораживали в жидком этане в установке для витрификации Vitrobot Mark IV (Thermo Fisher Scientific, США) при следующих параметрах: сила сжатия при промакивании 6 у.е., время промокания 1 с, температура климатической камеры 4°C, влажность 98 ± 2%.

Криоэлектронная просвечивающая микроскопия

Подготовленные сетки были перенесены при температуре жидкого азота в криоэлектронный просвечивающий микроскоп Titan Krios 60–300 (Thermo Fisher Scientific, США), оснащенный источником полевой эмиссии электронов типа Шоттки (FEI XFEG, Нидерланды), корректором сферических аберраций (CEOS GmbH, Германия) и КМОП (CMOS) – устройством прямого детектирования электронов Falcon II (Thermo Fisher Scientific, США). В автоматическом режиме с помощью программного обеспечения EPU (версия 1.9.1.16REL) (Thermo Fisher Scientific, США) получено 3055 стеков изображений, детектируемых в течение времени экспозиции 1.5 с. Микроскоп работал при ускоряющем напряжении 300 кВ, увеличении ×75000 и соответствующем размере пикселя 0.86 Å на уровне образца, объективной линзой в режиме дефокусировки со значениями из интервала от -0.5 до -1.5 мкм с шагом 0.1 мкм и величиной суммарной дозы ~100e⁻/Å², равномерно распределенной по всему стеку изображений. Основные параметры набора данных сведены в *таблицу*, общие характеристики данных показаны на *рис. 1А–Г*.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Реконструкция карты плотности

Экспериментальные данные обрабатывали в несколько последовательных этапов, представленных на *рис. 2*, на базе высокопроизводительного вычислительного кластера Курчатовского центра обработки данных, оснащенного графическими ускорителями Nvidia Tesla K80. Для основных процедур использовали следующее программное обеспечение: Motioncor2 (версия 1.0.5) [12], Gctf (версия 1.18) [13], Gautomatch (версия 0.56) (K. Zhang, MRC Laboratory of Molecular Biology, Cambridge, UK, <http://www>.

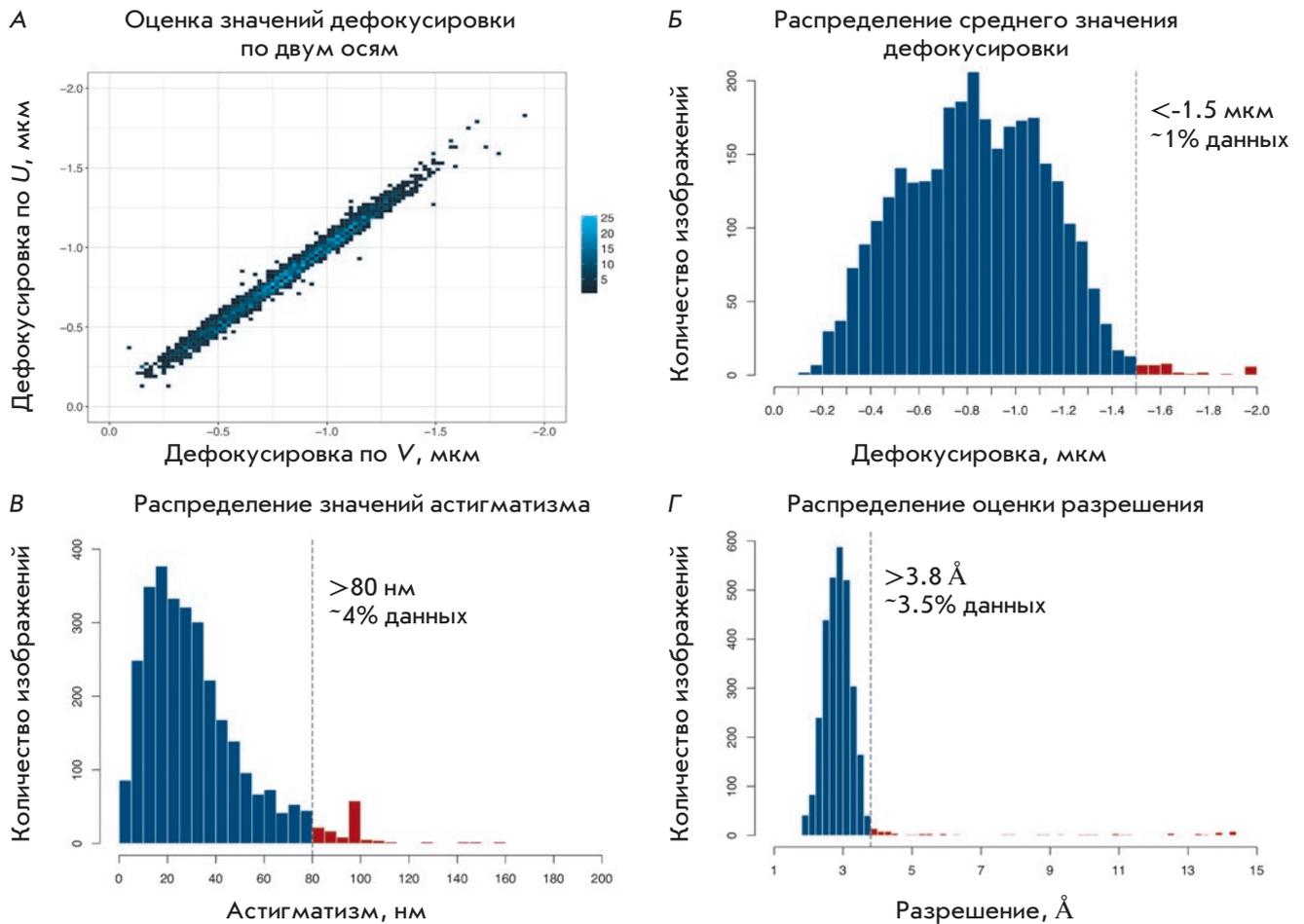


Рис. 1. Общие характеристики исходных данных по результатам оценки параметров ФПК в программе Gctf. А – распределение оценки значений дефокусировки по двум ортогональным осям, цвет соответствует плотности значений в заданной координате. Б–Г – распределения среднего значения дефокусировки, величины астигматизма и оценки максимального разрешения соответственно, а также выбранные пороговые значения. Данные с параметрами, лежащими в диапазонах, отмеченных красным, исключались из дальнейшей обработки

mrc-lmb.cam.ac.uk/kzhang/Gautomatch) и Relion (версия 2.1) [14], оптимизированное для вычислений на графических процессорах.

На первом этапе (рис. 2) для каждого из 3055 исходных стеков изображений проводилась последовательная коррекция анизотропного дрейфа в программе Motioncor2. Были получены два усредненных и скорректированных набора изображений: с учетом фильтрации сигнала в зависимости от поглощенной образцом дозы электронов (Dose Weighting) [15], используемый для процедур классификации и уточнения, а также без фильтрации, который применяли для оценки параметров функций передачи контраста (ФПК). На втором этапе (рис. 2) параметры ФПК оценивали с помощью программы Gctf. По аппроксимации колец Тона на Фурье-спектрах для каждого

изображения были определены величины информационного предела (оценка максимального разрешения), дефокусировки и астигматизма. Из дальнейшей обработки были исключены данные, лежащие на краях распределений в соответствии с пороговыми значениями, показанными на рис. 1Б–Г.

Таким образом, на всех последующих этапах использовали 2851 отобранное изображение с величинами дефокусировки, астигматизма и разрешения, не превышающими -1.5 мкм (по модулю), 80 нм и 3.8 Å соответственно. Характерное изображение после процедуры коррекции дрейфа приведено на рис. 3.

На третьем этапе (рис. 2) определяли положение частиц с помощью программы Gautomatch. Первоначально процедуру применяли для поднабора данных с высоким значением дефокусировки.

Параметры сбора экспериментальных данных, реконструкции карты плотности и статистика уточнения структуры TvNiR

Сбор данных	
Ускоряющее напряжение, кВ	300
Увеличение	75000
Размер пикселя, Å	0.86
Время экспозиции, с	1.5
Количество стеков изображений	3055
Суммарная доза на стек, $e^-/\text{Å}^2$	~100
Количество изображений в стек	30
Интервал значений дефокусировки, мкм	[-1.5; -0.5]
Шаг изменения значения дефокусировки, мкм	0.1
Параметры реконструкции карты плотности	
Финальное количество изображений частиц	33891
Группа симметрии	D3
FSC _{0.5} (с маской / без маски)	2.86 / 3.19
FSC _{0.143} (с маской / без маски)	2.56 / 2.82
Разрешение (среднее), Å	2.56
Уточнение структуры	
FSC _{average}	0.8679
R _f (взвешенный, общий), %	28.70
Средний тепловой фактор (B-factor), Å ²	80.08
Среднеквадратичное отклонение по длинам связей (R.m.s.d), Å ²	0.018
Среднеквадратичное отклонение по углам (R.m.s.d.)	1.989
Показатель MolProbity (score), %	2.55
Clashscore (по всем атомам), %	13.31
Хорошие ротамеры (Good rotamers), %	91.68
Запрещенные конформации (Ramachandran outliers), %	0.19
Код депонирования в EMDb	EMD-0020

В качестве шаблона использовали двумерную гауссову функцию с полушириной, соответствующей характерному размеру объекта. Полученный таким образом набор частиц подвергли двумерной классификации в пакете Relion. Классы, содержащие проекции объекта, использовали в качестве шаблонов для поиска на полном наборе данных. Таким образом,

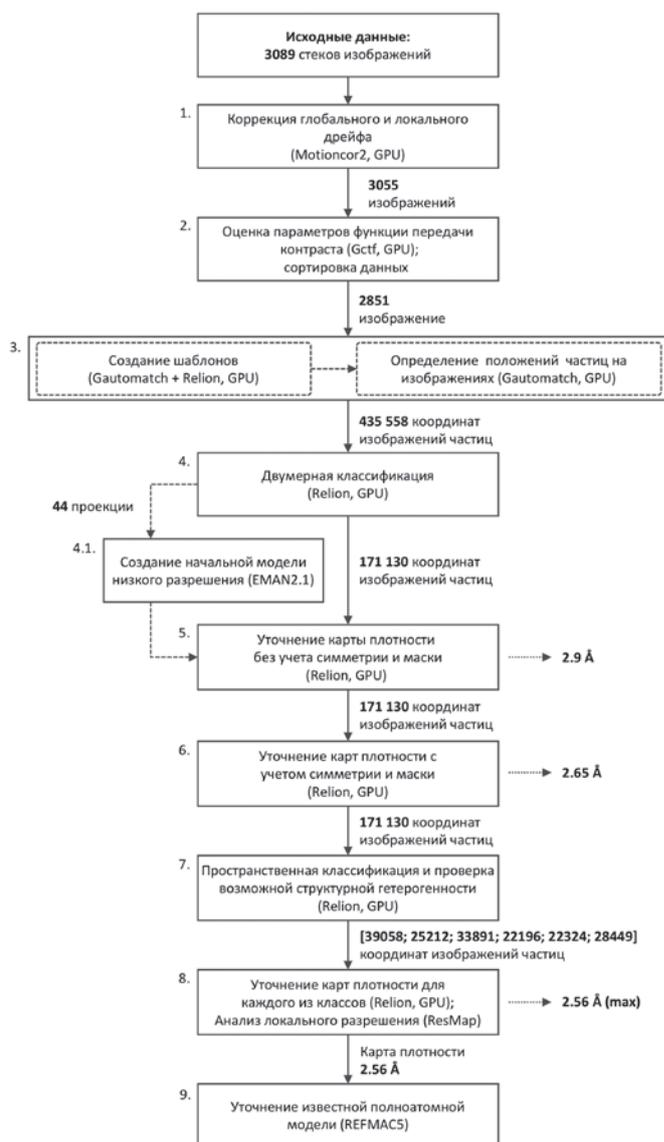


Рис. 2. Основные этапы обработки данных

было получено 435558 координат возможных положений частиц.

На четвертом этапе (рис. 2) производили две последовательные процедуры классификации. На первой изображения частиц были разбиты на 40 различных классов. Далее из набора данных исключали изображения, объединенные в классы, не содержащие проекций объекта либо содержащие изображения частиц льда, загрязнения поверхности образца, а также границы углеродной подложки. На второй процедуре классификации оставшиеся изображения разбивали на 50 классов с последующим исключением из обработки изображений частиц, принадлежащих классам, на которых не наблюдались четкие границы объекта рис. 4А,Б.

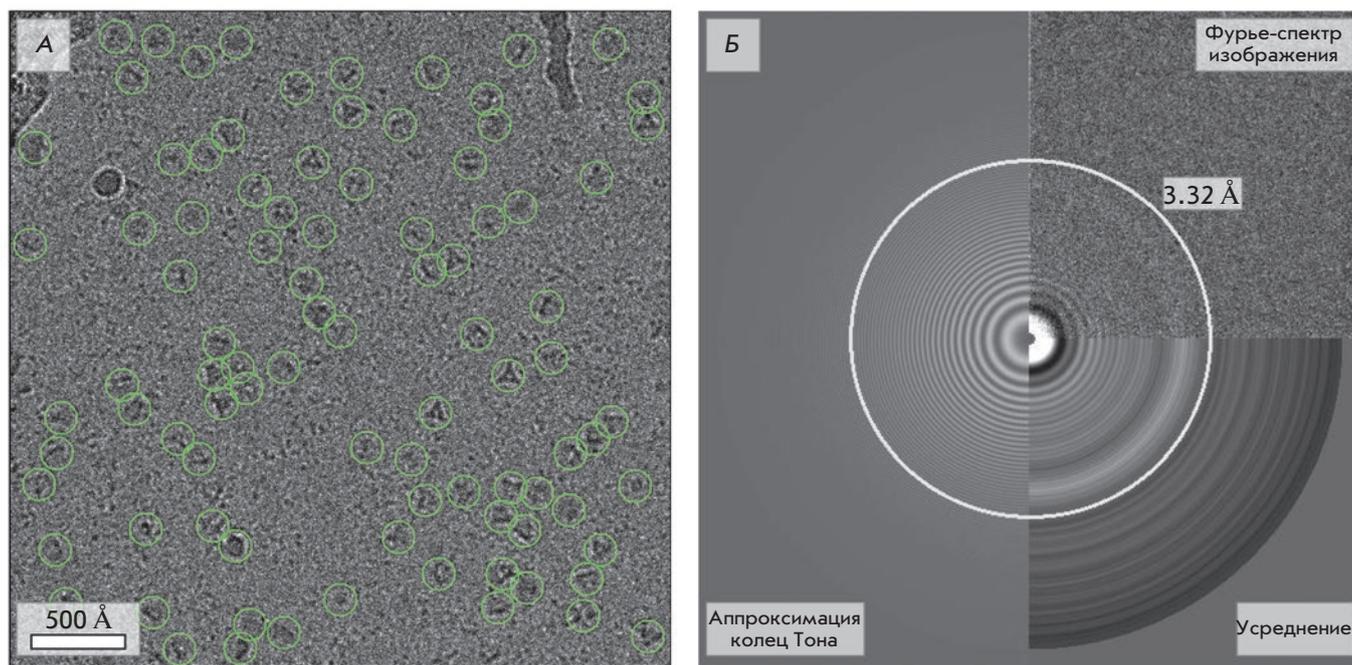


Рис. 3. Результаты первичной обработки данных после коррекции дрейфа и оценки параметров ФПК. А – пример изображения с выделенными проекциями объекта по данным *Gautomatch*. Б – в правой верхней части – Фурье-спектр данного изображения; в правой нижней – усреднение спектра (rotational average); в левой – аппроксимация колец Тона. Выделена окружность, радиус которой в прямом пространстве соответствует оценке максимального разрешения – 3.32 Å

Проведенная таким образом классификация позволила отобрать 171130 изображений частиц, несущих информацию о структуре объекта. Начальная модель с низким разрешением была построена в пакете EMAN2 [16] методом Монте-Карло с учетом известной симметрии объекта на основании 44 проекций, каждая из которых являлась усреднением изображений, содержащихся в наиболее населенных классах второй процедуры классификации (рис. 4Б).

На пятом этапе (рис. 2) модель низкого разрешения уточняли путем переопределения углов Эйлера и коррекции положения проекции объекта относительно получаемой карты плотности на каждой следующей итерации реализованного в пакете Relion EM-алгоритма [17–19]. Уточнение (3D Auto-Refine) без использования априорных знаний о симметрии объекта после операции постобработки (Postprocessing) с учетом бинарной маски, определяющей граничные условия для вычисления значений функции кросс-корреляции между двумя независимо уточняемыми картами плотности [20], позволило получить карту плотности с разрешением 2.9 Å в соответствии с критерием FSC = 0.143 [21].

Учет симметрии объекта на шестом этапе (рис. 2) привел к улучшению результата до 2.65 Å. Тот же

набор частиц на седьмом этапе (рис. 2) подвергался пространственной классификации [22, 23] на шесть классов (рис. 5) без поиска по углам и трансляциям с применением той же маски согласно процедуре, описанной в [24]. Далее на восьмом этапе (рис. 2) для каждого класса повторно уточняли карты плотности. Этот подход позволил выделить поднабор данных величиной 33891 изображение частиц (с медианным значением дефокусировки -0.86 мкм при интервале значений от -1.48 до -0.18 мкм по оценке программы Gctf), соответствующий третьему пространственному классу и приводящий к карте с наилучшим разрешением 2.56 Å (рис. 5). Для повышения разрешения этапы 6–8 (рис. 2) проводили с применением симметрии D3 и бинарной маски (рис. 6А), для создания которой использовали следующие параметры: изотропное расширение на 5 пикселей, сглаживание границ на 5 пикселей, порог построения изоповерхности 0.02.

Уточнение модели в программном пакете REFMAC5

В качестве исходной модели для уточнения использовали установленную ранее методом рентгеноструктурного анализа кристаллическую структуру TvNiR с наилучшим разрешением – 1.4 Å (код в бан-

ке данных RCSB – 3FO3). Из димера, находящегося в независимой части элементарной ячейки кристаллической структуры, были удалены молекулы растворителя за исключением тех, которые соответствовали пикам экспериментальной плотности. С использованием операций симметрии был построен гексамер TvNiR, использованный в уточнении. Уточнение проводилось в программе REFMAC5 [25] из пакета CCP-EM [26].

В качестве экспериментальной карты плотности использовали карту третьего пространственного класса (рис. 5), имеющую наилучшее разрешение. Во избежание эффекта переуточнения (overfitting) модели использовали подход [27], при котором экспериментальные данные, на которых построена суммарная карта плотности, разделялись случайным образом на два поднабора, используемых в дальнейшем для построения независимых карт и кросс-валидации. Высокое разрешение экспериментальных данных позволило проводить уточнение без введения дополнительных ограничений (restraints) за исключением ограничений на максимальные отклонения длин связей от среднего значения (опция jelly-body [25]). Для более правильной оценки стерических ограничений в процессе уточнения модель дополняли атомами водорода в фиксированных положениях. После 30 циклов уточнения проводили визуальный анализ соответствия полученной после уточнения модели и экспериментальной плотности с использованием программы Coot [28]. Оценка влияния размытия (sharpness / blur) карты плотности на ход уточнения была проведена при помощи серии уточнений с различным значением степени размытия: от -150 до +150. Последующий выбор режима уточнения был сделан на основании наилучших полученных значений R_i и FSC, которые соответствовали значению параметра blur -80. Помимо визуального анализа качество уточненной модели оценивали по данным сервиса Molprobity [29], а ее сравнение с кристаллической структурой белка проводили с использованием сервиса PDBeFOLD [30]. Анализ графика Рамачандрана показал, что остатки Gly285 и His361 во всех субъединицах лежат вне разрешенной области, однако все эти остатки описываются хорошей экспериментальной плотностью.

ОБСУЖДЕНИЕ

Пространственная классификация не показала значимой структурной гетерогенности в образце на уровне достигнутого разрешения, однако позволила выделить поднабор проекций объекта, несущий информацию о высоких пространственных частотах и обеспечивающий максимальное разрешение итоговой карты плотности (рис. 6Б,В).

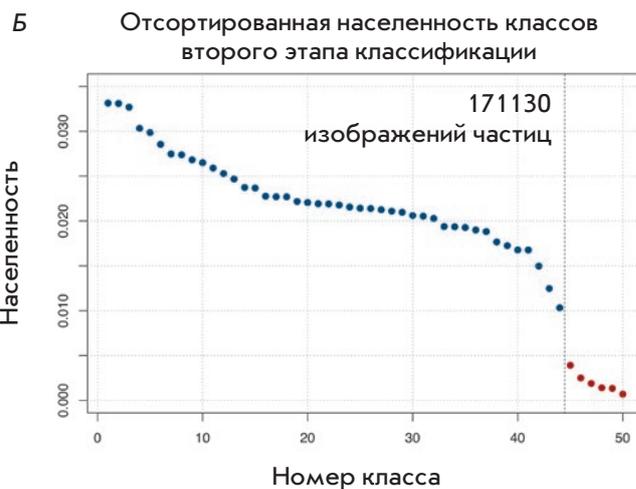
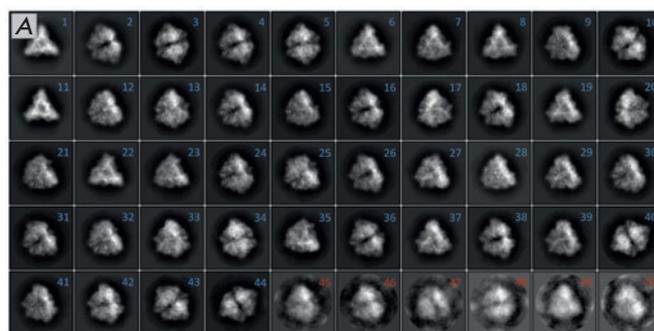


Рис. 4. Результаты четвертого этапа обработки данных. А – изображения, усредненные по каждому классу, второй процедуры классификации. Изображения частиц, принадлежащие классам с 1 по 44 (пронумерованы синим), были использованы для дальнейшего анализа и построения карты плотности. Изображения частиц, принадлежащие классам с 45 по 50 (пронумерованы красным), приводящие к эффектам переобучения алгоритмов реконструкции, исключались из дальнейшей обработки данных. Б – населенность классов. Цвет точек соответствует цвету нумерации на панели А

Распределение проекций для углового разбиения, используемого при уточнении карты плотности без учета симметрии и карты плотности 3-го пространственного класса приведено на рис. 6Г. Можно видеть, что объект не имеет предпочтительных ориентаций в слое аморфного льда. Оценка среднего разрешения на основе критериев $FSC = 0.143$ и $FSC = 0.5$ по результатам процедуры постобработки приведена на рис. 7.

Высокая симметрия объекта значительно упрощает задачу реконструкции в криоэлектронной микроскопии, компенсируя сравнительно малое количество

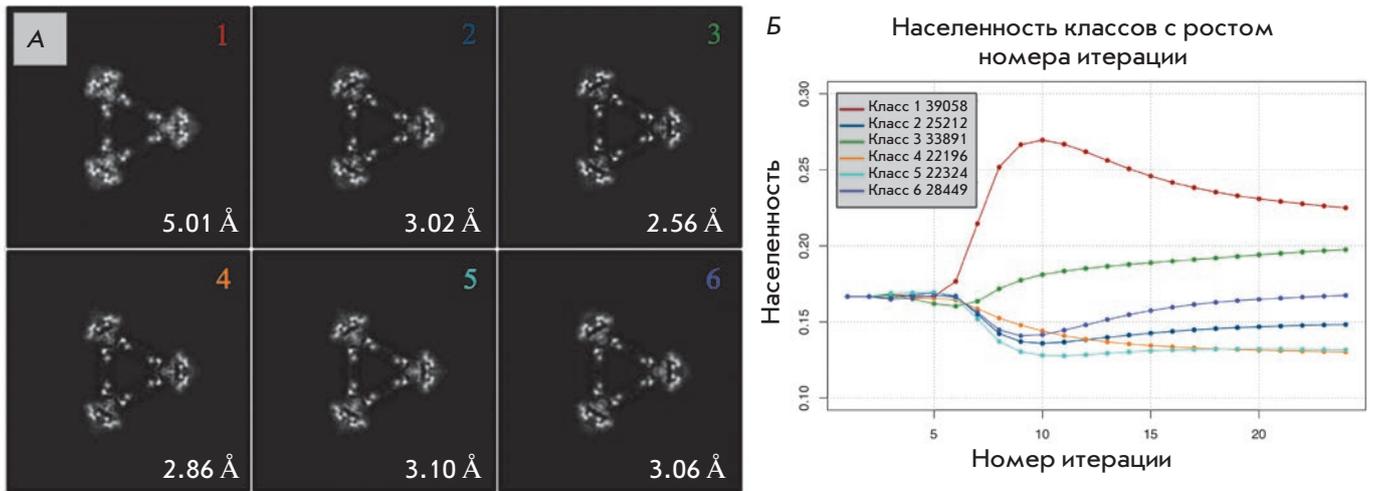


Рис. 5. Результаты пространственной классификации. А – центральные срезы полученных классов. Б – изменение населенности классов в зависимости от шага итерации

проекций с относительно высоким информационным пределом для данного эксперимента, а также низкое соотношение сигнал-шум, связанные с малой молекулярной массой объекта. Результаты уточнения в пакете Relion 2.1, выполненного после пространственной классификации, наглядно демонстрируют влияние качества данных на итоговое разрешение. С учетом симметрии объекта для создания структурной модели потребовалось порядка 34000 изображений частиц, принадлежащих к пространственному классу, имеющему максимальное разрешение 2.56 Å (рис. 5).

Докинг модели фермента, полученной на основании данных рентгеноструктурного анализа (код в банке данных RCSB – 3FO3), в экспериментальную карту плотности при разрешении 2.56 Å, полученную методом крио-ЭМ, и последующее уточнение позволили получить финальную структуру, имеющую индекс Molprobity 2.55 и следующие значения параметров: $R_f = 28.70$, $FSC_{average} = 0.8679$ (таблица). Высокое качество карты плотности позволило установить не только ход полипептидной цепи фермента, но и идентифицировать боковые группы аминокислотных остатков (рис. 8А), включая уникальную ковалентную связь между остатками тирозина и цистеина (рис. 8Б) в активном центре фермента и боковые группы ряда остатков, расположенных на поверхности молекулы и невидимых в кристаллической структуре: Arg52, Arg316 и Lys456. В активном цен-

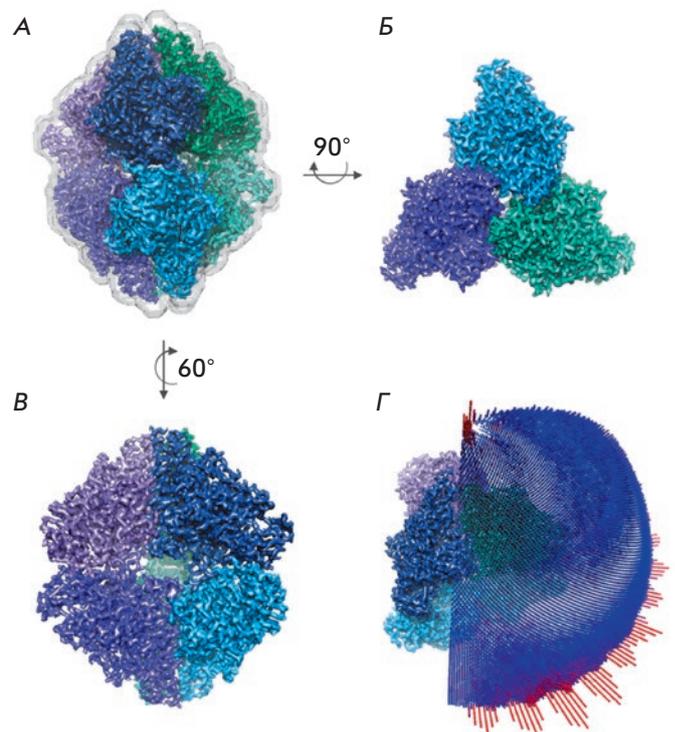


Рис. 6. Итоговая карта плотности наилучшего разрешения 2.56 Å. А – маска, используемая при реконструкции и оценке разрешения, показана серой полупрозрачной изоповерхностью. Б–В – карта плотности в различных проекциях, цветом выделены отдельные субъединицы гексамера белка. Г – распределение проекций для используемого углового разбиения

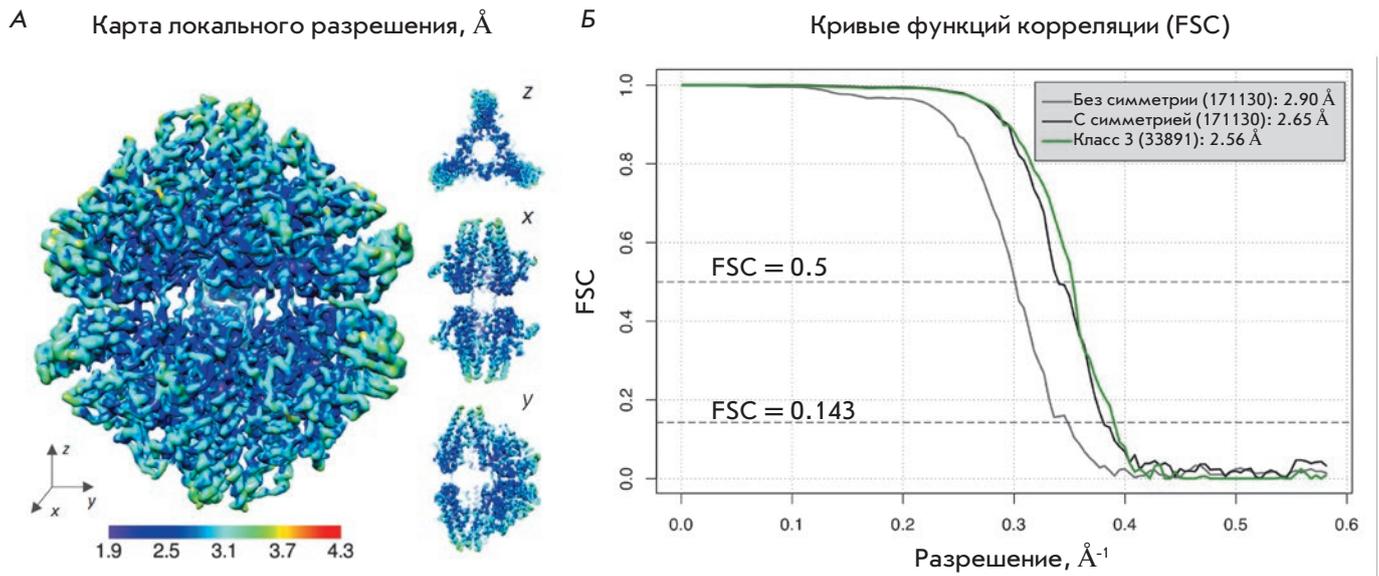
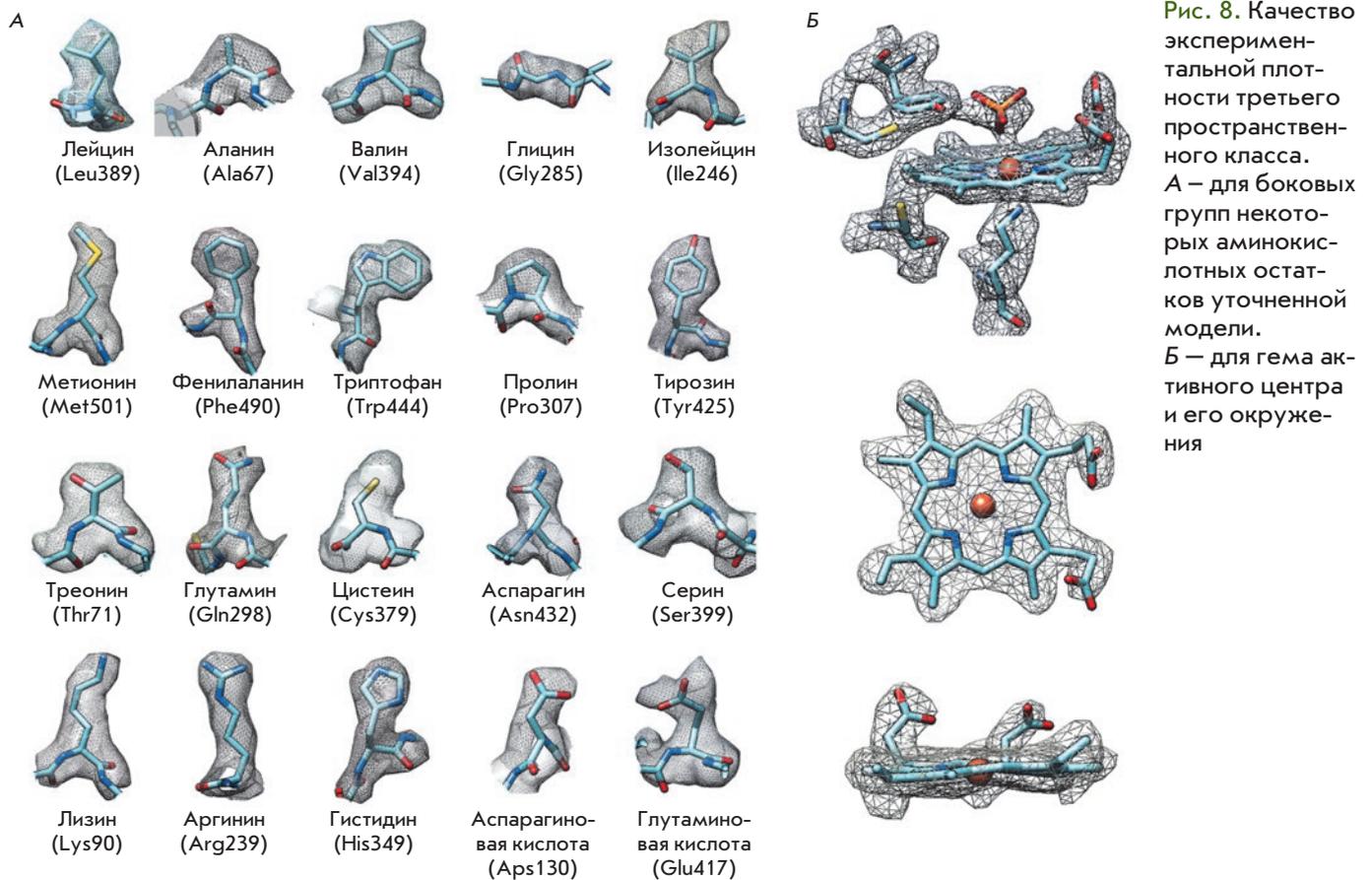


Рис. 7. Оценка разрешения. А – анализ локального разрешения для карты плотности третьего пространственного класса по данным программного пакета MonoRes [31]. Б – кривые функций корреляции (FSC) для карт плотности без учета симметрии (серая кривая), с учетом симметрии для полного набора изображений частиц (черная кривая) и для набора частиц, принадлежащего третьему классу (зеленая кривая)



тре фермента также обнаружена плотность, которая, исходя из состава буфера, идентифицирована как молекула фосфата (рис. 8Б). Связывание неорганических анионов является характерным свойством активного центра TvNiR, хорошо известным из рентгеноструктурных исследований [9, 10].

Наложение уточненной по экспериментальным данным крио-ЭМ структуры и исходной кристаллической структуры показало отсутствие значимых различий в ходе полипептидной цепи. Ориентация боковых групп также совпадает за исключением некоторых боковых групп остатков, расположенных на поверхности фермента, например Asp40, Arg51, Glu337, Glu341 и др., что может быть связано с их относительной подвижностью. Среднеквадратичные отклонения по C_α-атомам сравниваемых структур не превышают 0.36 Å. Таким образом, структура TvNiR, полученная методом крио-ЭМ, хорошо согласуется с кристаллической структурой фермента, полученной ранее и независимо методом рентгеноструктурного анализа. Экспериментальная плотность депонирована в банк данных EMDB с кодом EMD-0020.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное в настоящей работе исследование структуры цитохром с нитритредуктазы из бактерии *T. nitratireducens* методом крио-ЭМ с помощью анализа проекций одиночных частиц позволи-

ло получить карту плотности с разрешением 2.56 Å и построить соответствующую пространственную модель. Определен оптимальный алгоритм сбора и обработки данных для достижения высокого разрешения. Сравнение пространственных структур TvNiR, полученных методами рентгеноструктурного анализа (1.40 Å) и крио-ЭМ (2.56 Å), не выявило между ними значимых различий. Показано также, что на уровне достигнутого методом крио-ЭМ разрешения TvNiR не обладает структурной гетерогенностью. ●

Работа выполнена с использованием оборудования Центра коллективного пользования «Комплекс моделирования и обработки данных исследовательских установок мега-класса» НИЦ «Курчатовский институт» <http://scr.nrcki.ru> (субсидия Минобрнауки, идентификатор работ RFMEFI62117X0016), оборудования Ресурсного центра «Зондовой и электронной микроскопии» КК НБИКС-Т НИЦ «Курчатовский институт», а также при поддержке грантов Российского научного фонда № 18-41-06001 (в части получения и обработки экспериментальных данных) и № 14-24-00172 (в части очистки и выделения фермента) и Государственного задания № 01201351365 (в части наработки организма-продуцента фермента).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Callaway E. // Nature. 2015. V. 525. P. 172–174.
- Merk A., Bartesaghi A., Banerjee S., Falconieri V., Rao P., Davis M.I., Prangani R., Boxer M.B., Earl L.A., Milne J.L.S., et al. // Cell. 2016. V. 165. № 7. P. 1698–1707.
- Iancu C.V., Tivol W.F., Schooler J.B., Dias D.P., Henderson G.P., Murphy G.E., Wright E.R., Li Z., Yu Z., Briegel A., et al. // Nat. Protoc. 2007. V. 1. № 6. P. 2813–2819.
- Cheng Y. // Cell. 2015. V. 161. № 3. P. 450–457.
- Gelfand A. // Biomedical Computation Review. 2016. V. 1. P. 13–21.
- Bai X., McMullan G., Scheres S.H.W. // Trends Biochem. Sci. 2015. V. 40. № 1. P. 49–57.
- Tikhonova T.V., Slutsky A., Antipov A.N., Boyko K.M., Polyakov K.M., Sorokin D.Y., Zvyagilskaya R.A., Popov V.O. // Biochim. Biophys. Acta Proteins Proteomics. 2006. V. 1764. № 4. P. 715–723.
- Frank J., Zhu J., Penczek P., Li Y., Srivastava S., Verschoor A., Radermacher M., Grassucci R., Lata R.K., Agrawal R.K. // Nature. 1995. V. 376. № 6539. P. 441–444.
- Polyakov K.M., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Slutsky A., Antipov A.N., Zvyagilskaya R.A., Popov A.N., Bourenkov G.P., Lamzin V.S., Popov V.O. // J. Mol. Biol. 2009. V. 389. № 5. P. 846–862.
- Trofimov A.A., Polyakov K.M., Boyko K.M., Tikhonova T.V., Safonova T.N., Tikhonov A.V., Popov A.N., Popov V.O. // Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr. 2010. V. 66. № 10. P. 1043–1047.
- Trofimov A.A., Polyakov K.M., Boiko K.M., Filimonenkov A.A., Dorovatovskii P.V., Tikhonova T.V., Popov V.O., Koval'chuk M.V. // Crystallogr. Reports. 2010. V. 55. № 1. P. 61–67.
- Zheng S., Palovcak E., Armache J.-P., Cheng Y., Agard D. // bioRxiv. 2016. P. 1–30.
- Zhang K. // J. Struct. Biol. 2016. V. 193. № 1. P. 1–12.
- Kimanius D., Forsberg B.O., Scheres S.H.W., Lindahl E. // Elife. 2016. V. 5.
- Grant T., Grigorieff N. // Elife. 2015. V. 4. e06980.
- Tang G., Peng L., Baldwin P.R., Mann D.S., Jiang W., Rees I., Ludtke S.J. // J. Struct. Biol. 2007. V. 157. № 1. P. 38–46.
- Dempster A.P.A., Laird N.M.N., Rubin D.D.B. // J. Royal Statistical Society. Series B (methodological). 1977. P. 1–38.
- Scheres S.H.W. // J. Struct. Biol. 2012. V. 180. № 3. P. 519–530.
- Scheres S.H.W. // J. Mol. Biol. 2012. V. 415. № 2. P. 406–418.
- Chen S., McMullan G., Faruqi A.R., Murshudov G.N., Short J.M., Scheres S.H.W., Henderson R. // Ultramicroscopy. 2013. V. 135. P. 24–35.
- Rosenthal P.B., Henderson R. // J. Mol. Biol. 2003. V. 333. № 4. P. 721–745.
- Scheres S.H.W. // Methods in Enzymology. 2016. V. 579. P. 125–157.
- Ludtke S.J. // Methods in Enzymology. 2016. V. 579. P. 159–189.
- Hirschi M., Herzik M.A., Wie J., Suo Y., Borschel W.F., Ren D., Lander G.C., Lee S.Y. // Nature. 2017. V. 550. № 7676.
- Murshudov G.N., Skubák P., Lebedev A.A., Pannu N.S.,

- Steiner R.A., Nicholls R.A., Winn M.D., Long F., Vagin A.A.
// *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2011. V. 67. № 4.
P. 355–367.
26. Wood C., Burnley T., Patwardhan A., Scheres S., Topf
M., Roseman A., Winn M. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol.
Crystallogr.* 2015. V. 71. P. 123–126.
27. Brown A., Long F., Nicholls R.A., Toots J., Emsley P.,
Murshudov G. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*
2015. V. 71. P. 136–153.
28. Emsley P., Lohkamp B., Scott W.G., Cowtan K. // *Acta
Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.* 2010. V. 66. № 4. P. 486–
501.
29. Chen V.B., Arendall W.B., Headd J.J., Keedy D.A.,
Immormino R.M., Kapral G.J., Murray L.W., Richardson J.S.,
Richardson D.C. // *Acta Crystallogr. Sect. D Biol. Crystallogr.*
2010. V. 66. № 1. P. 12–21.
30. Krissinel E., Henrick K. // *Acta Crystallogr. Sect. D.* 2004.
V. 60. № 12-1. P. 2256–2268.
31. Vilas J.L., Gómez-Blanco J., Conesa P., Melero R., Miguel de
la Rosa-Trevín J., Otón J., Cuenca J., Marabini R., Carazo J.M.,
Vargas J., et al. // *Structure.* 2018. V. 26. № 2. P. 337–344. e4.

УДК 612.816

Lynx1 предотвращает нарушение долговременной потенциации и экспрессии нейромодулятора, вызванные $A\beta_{1-42}$ и активацией JNK

М. Л. Бычков^{1,2}, Н. А. Васильева^{1,3}, М. А. Шулепко^{1,2}, П. М. Балабан^{1,3}, М. П. Кирпичников^{1,2}, Е. Н. Люкманова^{1,2*}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

³Институт высшей нервной деятельности и нейрофизиологии человека РАН, 117485, Москва, ул. Бутлерова, 5А

*E-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

Поступила в редакцию 02.03.2018

Принята к печати 27.06.2018

РЕФЕРАТ Никотиновые ацетилхолиновые рецепторы (nAChR) являются лигандзависимыми ионными каналами, дисфункция которых ассоциирована с когнитивными нарушениями, наблюдаемыми при нейродегенеративных заболеваниях. Мембраносвязанный белок Lynx1 модулирует работу nAChR в структурах мозга человека, важных для формирования памяти и обучения. В нашей работе впервые показано, что β -амилоидный пептид $A\beta_{1-42}$ снижает уровень мРНК Lynx1 в первичных нейронах коры головного мозга крысы, и это снижение связано с активацией N-концевой киназы c-Jun (JNK). Кроме того, снижение уровня экспрессии Lynx1, равно как и нарушение долговременной потенциации, лежащей в основе механизмов синаптической пластичности, вызванные $A\beta_{1-42}$, можно предотвратить, используя водорастворимый аналог Lynx1. Полученные данные указывают на водорастворимый Lynx1 как на препарат, потенциально способный улучшать когнитивные процессы при нейродегенеративных заболеваниях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бета-амилоид, болезнь Альцгеймера, когнитивные нарушения, никотиновый ацетилхолиновый рецептор, Lu6/uPAR.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БА – болезнь Альцгеймера; ВЧС – высокочастотная стимуляция; ДВП – долговременная потенциация; ИЦЖ – искусственная цереброспинальная жидкость; фВПСП – фокальные возбуждающие постсинаптические потенциалы; $A\beta$ – бета-амилоидный пептид; nAChR – никотиновый ацетилхолиновый рецептор; siРНК – малая интерферирующая РНК; ws-Lynx1 – водорастворимый домен Lynx1.

ВВЕДЕНИЕ

Многие нейродегенеративные заболевания, например болезнь Альцгеймера (БА), характеризуются нарушениями когнитивных процессов, связанными с дисфункцией никотиновых ацетилхолиновых рецепторов (nAChR) [1]. При БА происходит формирование бляшек, состоящих из олигомеров β -амилоидного пептида ($A\beta$), самой токсичной формой которого является $A\beta_{1-42}$ [1]. $A\beta_{1-42}$ в концентрации 200 нМ ингибирует работу $\alpha 7$ -nAChR – наиболее распространеного в головном мозге никотинового холинорецептора, а взаимодействие $A\beta$ с этим рецептором при БА приводит к его интернализации [1]. Кроме того, $A\beta$ ингибирует долговременную потенциацию (ДВП) [2], лежащую в основе памяти и обучения [3].

Ранее мы показали, что водорастворимый вариант белка человека Lynx1 (ws-Lynx1) [4], модулирующе-го работу $\alpha 7$ -nAChR в мозге [5], конкурирует с $A\beta_{1-42}$ за связывание с $\alpha 7$ -nAChR [6]. На культуре нейронов коры головного мозга мыши показано, что предынкубация с ws-Lynx1 снижает цитотоксический эффект $A\beta_{1-42}$ [6]. Кроме того, с помощью Вестерн-блоттинга обнаружено, что экспрессия Lynx1 снижена в коре головного мозга трансгенных мышей, моделирующих БА (3×Tg-AD) по сравнению с мышами дикого типа [6]. Это позволило нам предположить, что Lynx1 играет важную роль при БА, и именно накопление $A\beta_{1-42}$ приводит к снижению уровня этого нейромодулятора в мозге и влечет за собой нарушение баланса $A\beta_{1-42}$ /Lynx1, вызывая нарушение работы $\alpha 7$ -

nAChR. Нами изучено влияние $A\beta_{1-42}$ на экспрессию гена *Lynx1* в первичных нейронах коры и гиппокампа крысы, на срезах гиппокампа мыши оценено влияние ws-Lynx1 и $A\beta_{1-42}$ на ДВП.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Первичную культуру нейронов получали из коры и гиппокампа новорожденных крысят линии Wistar по описанной ранее методике [7]. На 14-й день к культуре нейронов добавляли либо $A\beta_{1-42}$ (1 или 5 мкМ, Bioreptide Co), олигомеризованный по ранее описанному протоколу [8], либо 5 мкМ $A\beta_{42-1}$ (обратный пептид использовали в качестве отрицательного контроля, Bioreptide Co), либо 10 мкМ ws-Lynx1 (получали согласно [4]), либо смесь (5 мкМ $A\beta_{1-42}$ + 10 мкМ ws-Lynx1), либо 2.5 мкМ SP600125 (Tocris), либо смесь (5 мкМ $A\beta_{1-42}$ + 2.5 мкМ SP600125) и инкубировали дополнительно в течение 24 ч.

Для нокдауна JNK культуру кортикальных нейронов трансфицировали малыми интерферирующими РНК (siРНК) к JNK-1 и JNK-2. В качестве контроля использовали последовательность РНК, приведенную в табл. 1. Нейроны коры на 10-й день культивирования трансфицировали либо siРНК к генам JNK-1 и JNK-2, либо контрольной siРНК. После этого культуру нейронов инкубировали в течение 72 ч, добавляли 5 мкМ $A\beta_{1-42}$ и инкубировали в течение еще 24 ч.

Затем с помощью реактива ExtractRNA («Евроген») выделяли суммарную мРНК. мРНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Fisher Scientific, США), после чего синтезировали кДНК при помощи набора MMLV RT kit («Евроген»). ПЦР в реальном времени проводили при помощи готовой 5-кратной смеси qPCRmix-HS SYBR + HighROX («Евроген»), список праймеров приведен в табл. 2. Данные анализировали с помощью программы LinReg 2017.0. Уровень мРНК генов нормировали на уровень мРНК β -актина.

Свежеприготовленные переживающие срезы гиппокампа мышей линии C57BL/6 восьмимесячного возраста перфузировали искусственным раствором цереброспинальной жидкости (ИЦЖ) следующего состава: 124 мМ NaCl, 3 мМ KCl, 2.5 мМ CaCl₂, 1.3 мМ MgCl₂, 26 мМ NaHCO₃, 1.27 мМ NaH₂PO₄ и 10 мМ D-глюкозы, рН 7.4, непрерывно насыщаемого карбогеном (95% O₂ + 5% CO₂) при 34°C в течение 1 ч.

Таблица 1. Малые интерферирующие РНК, использованные в работе

Ген	Последовательности интерферирующих РНК
Контроль	UUCUCCGAACGUGUCACGUTT
	ACGUGACACGUCGGAGAATT
JNK-1	GGCAUGGGCUAUAAGAAATT
	UUUCUUUGUAGCCCAUGCCTT
JNK-2	GCCAGAGACUUAUUAUCAATT
	UUGAUAUAAGUCUCUGGCTT

Затем одну часть срезов перфузировали ИЦЖ, содержащей 200 нМ $A\beta_{1-42}$, а другую – ИЦЖ, содержащей 200 нМ $A\beta_{1-42}$ + 2 мкМ ws-Lynx1 в течение 1 ч. Контрольные срезы перфузировали ИЦЖ, не содержащей ни $A\beta_{1-42}$, ни ws-Lynx1. После инкубации срезы мозга помещали в камеры установки SliceMaster (Scientifica, Великобритания), предназначенные для регистрации фокальных возбуждающих постсинаптических потенциалов (фВПСП). На протяжении всей регистрации поддерживали температуру 32–34°C. С помощью стеклянного микроэлектрода, заполненного ИЦЖ (сопротивление 1–3 МОм), в пирамидном слое поля CA1 регистрировали фокальный ответ, вызываемый стимуляцией радиального слоя, используя протокол парной стимуляции (межстимульный интервал 50 мс, частота 0.033 Гц). После 20-минутной записи тестовых ответов подавался протокол высокочастотной стимуляции (ВЧС) для индукции ДВП: 10 серий с частотой 100 Гц (пять стимулов в одной серии) с интервалом между сериями 200 мс, четыре повтора с интервалом 30 с. После индукции ДВП запись фВПСП производили в течение 1.5 ч. Полученные данные записывали, отфильтровывали и анализировали с помощью программы Spike2 (Cambridge Electronic Design Limited, Великобритания) и SigmaPlot 11.0 (Systat Software Inc., США). Посттетанический тангенс угла наклона фВПСП нормировали на усредненный тангенс угла наклона всех фВПСП, записанных за 20 мин до индукции ДВП.

Статистический анализ данных записи ДВП и данных о влиянии $A\beta_{1-42}$, ws-Lynx1, SP600125 и siРНК на экспрессию генов в первичных нейронах прово-

Таблица 2. Праймеры, использованные в работе

Ген	Прямой праймер	Обратный праймер	Длина фрагмента, п.н.
β -актин	TCATGTTTGAGACSTTCAACAC	GTCTTTGCGGATGTCCACG	250
<i>Lynx1</i>	ACCACTCGAACTTACTTCACC	ATCGTACACGGTCTCAAAGC	81
$\alpha 7$ -nAChR	TGCACGTGTCCCTGCAAGGC	GTACACGGTGAGCGGCTGCG	112

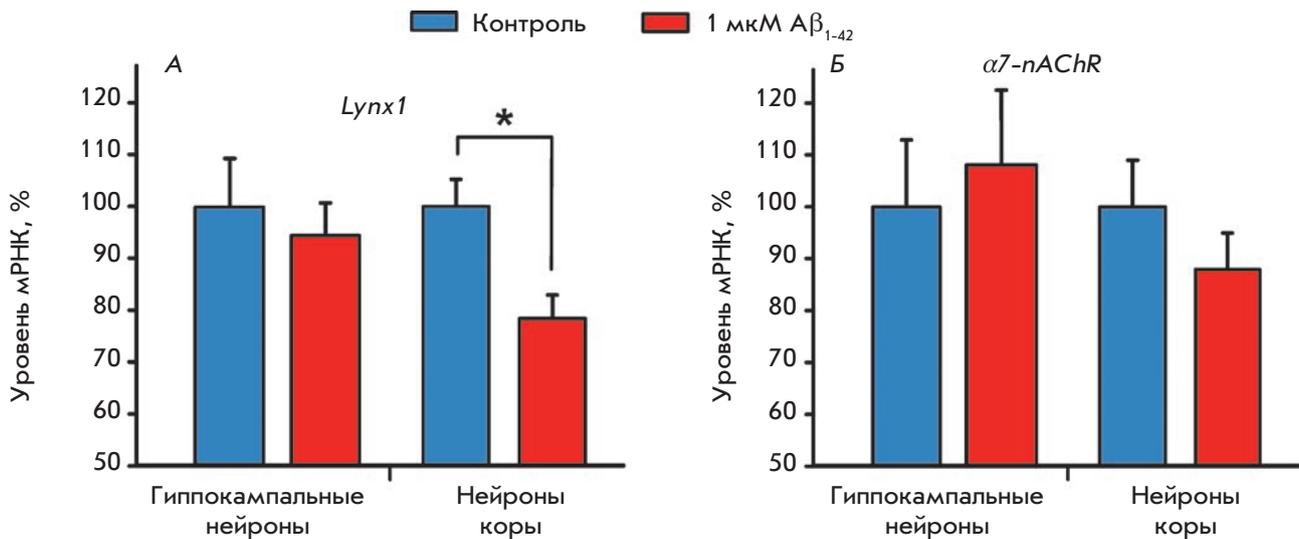


Рис. 1. Влияние $A\beta_{1-42}$ на экспрессию генов *Lynx1* (А) и $\alpha 7$ -nAChR (Б) в первичной культуре нейронов коры головного мозга и гиппокампа. Значения представлены как % от контроля \pm стандартная ошибка среднего значения ($n = 3$). * ($p < 0.05$) означает статистически значимую разницу между группами согласно двустороннему t -тесту

дили в программе GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software Inc.). Значение $p < 0.05$ считали статистически значимым. Обращение с животными и экспериментальные процедуры с ними были выполнены в соответствии с директивами совета Европейского сообщества 86/609/ЕЕС об использовании животных для экспериментальных исследований и одобрены Этическими комиссиями МГУ и ИБХ РАН.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Снижение экспрессии *Lynx1* в нейронах под действием $A\beta_{1-42}$ обусловлено активацией JNK

Для проверки гипотезы о влиянии амилоидного пептида на экспрессию *Lynx1* мы инкубировали первичные нейроны коры и гиппокампа крысы с 1 мкМ олигомерного $A\beta_{1-42}$ и анализировали уровень мРНК *Lynx1* (рис. 1А). В нейронах гиппокампа не было замечено значимого снижения экспрессии нейромодулятора, в то время как наблюдалось значительное снижение уровня мРНК *Lynx1* (до $78.4 \pm 4.4\%$ от контрольного уровня) в нейронах коры. Это согласуется с отмеченным ранее снижением экспрессии белка *Lynx1* в коре головного мозга мышей, моделирующих БА [5]. Напротив, ни в гиппокампальных, ни в кортикальных нейронах не наблюдали снижения уровня мРНК $\alpha 7$ субъединицы nAChR под действием $A\beta_{1-42}$ (рис. 1Б). Увеличение концентрации $A\beta_{1-42}$ до 5 мкМ приводило к дальнейшему снижению экспрессии гена *Lynx1* в кортикальных нейронах (до $65.8 \pm 4.9\%$ от контрольного уровня, рис. 2А).

Известно, что активация $\alpha 7$ -nAChR никотином регулирует транскрипцию генов посредством фос-

форилирования CREB и активации сигнальных путей MAP/ERK, при этом увеличивается количество транскрипционного фактора раннего ответа c-Fos [9]. С другой стороны, связывание олигомерного $A\beta_{1-42}$ с $\alpha 7$ -nAChR приводит к активации N-концевой киназы c-Jun (JNK) [10], которая играет ключевую роль в регуляции генной экспрессии и других жизненно важных процессах, в том числе в процессинге предшественника β -амилоидного пептида и образовании нейрофибриллярных клубков при БА [10]. В свою очередь, активация JNK может приводить к ингибированию фосфорилирования транскрипционного фактора CREB и, как следствие, к снижению уровня экспрессии транскрипционного фактора c-Fos [11].

Чтобы выяснить, связано ли падение уровня экспрессии *Lynx1* в нейронах коры, инкубированных с олигомерным $A\beta_{1-42}$, с активацией JNK, мы инкубировали кортикальные нейроны с $A\beta_{1-42}$ и SP600125, – селективным ингибитором JNK-1, -2 и -3, который рассматривается в настоящее время как один из возможных препаратов для лечения БА [10]. Действительно, совместная инкубация нейронов с $A\beta_{1-42}$ и SP600125 отменяла снижение экспрессии *Lynx1*, что указывает на возможную связь этого снижения с активацией JNK (рис. 2Б). Для подтверждения роли JNK в регуляции транскрипции *Lynx1* использовали технологию нокдаун генов *JNK-1* и *JNK-2* при помощи малых интерферирующих РНК. Действительно, инкубация нейронов с заблокированной экспрессией *JNK-1* и *JNK-2* в присутствии $A\beta_{1-42}$ приводила к восстановлению уровня экспрессии мРНК *Lynx1* (рис. 2Б). При этом трансфекция культуры нейронов контрольной siРНК, не ингиби-

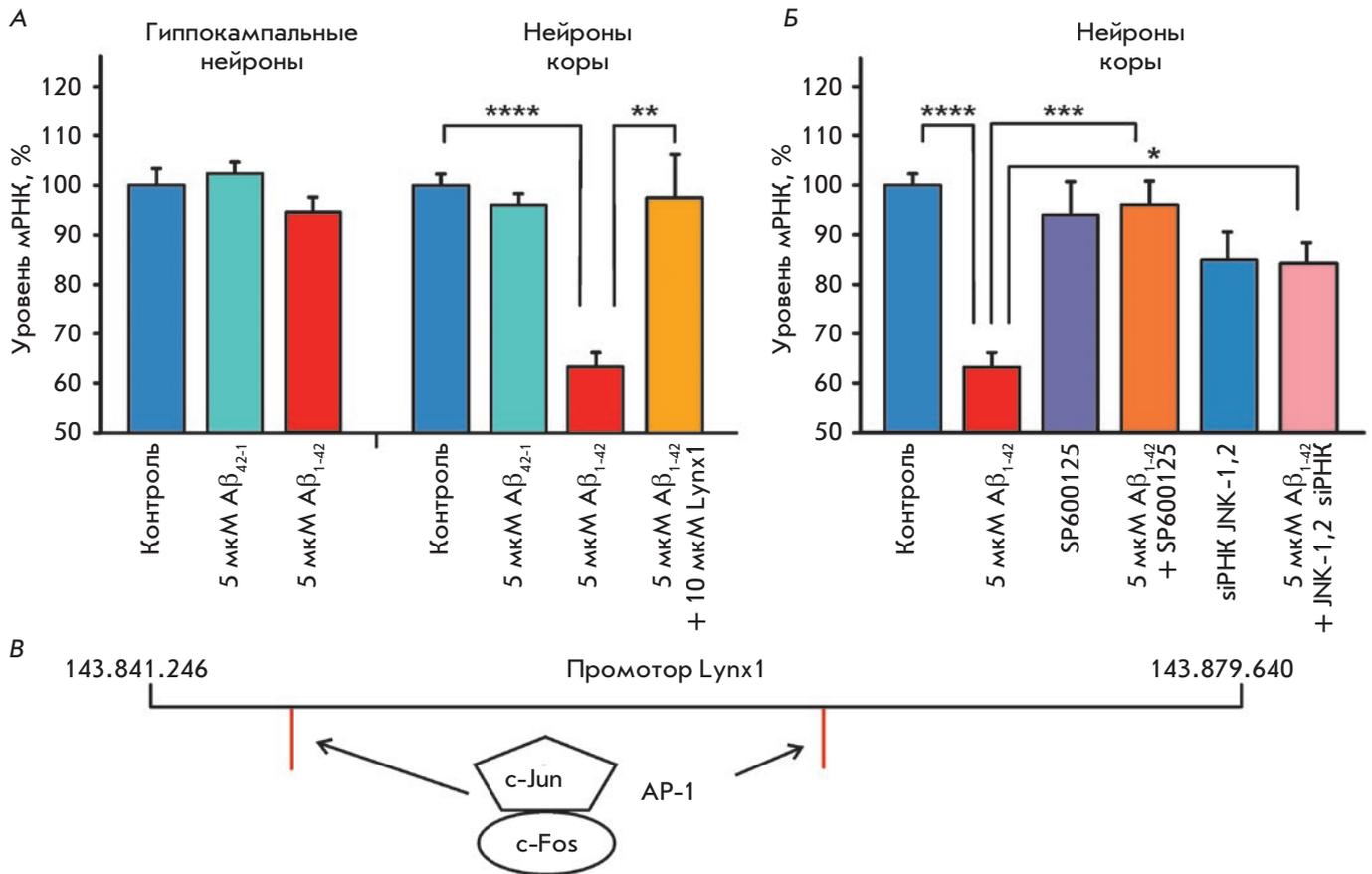


Рис. 2. ws-Lynx1 и ингибирование JNK отменяют снижение экспрессии *Lynx1* в первичной культуре кортикальных нейронов, обработанных Аβ₁₋₄₂. **А** – влияние Аβ₁₋₄₂, Аβ₄₂₋₁ и ws-Lynx1 на экспрессию *Lynx1*. **Б** – влияние Аβ₁₋₄₂ и ингибирования JNK с помощью SP600125 и нокадауна генов *JNK-1* и *JNK-2* на экспрессию *Lynx1*. Значения представлены как % от контроля ± стандартная ошибка среднего значения ($n = 4$). * ($p < 0.05$), ** ($p < 0.01$) и **** ($p < 0.0001$) означают статистически значимую разницу между группами согласно одностороннему тесту ANOVA с последующим Tukey's/пос-тестом. **В** – схематическое изображение строения гена *Lynx1*. Красными линиями показаны сайты связывания c-Jun и c-Fos

рующей транскрипцию генов, не влияла на снижение экспрессии мРНК *Lynx1*, вызванное Аβ₁₋₄₂ (данные не показаны). Нокадаун *JNK-1* и *JNK-2* в отсутствие Аβ₁₋₄₂ не вызывал значимых изменений в уровне экспрессии гена *Lynx1* (рис. 2Б), что подтверждает связь амилоидного пептида, активации JNK и снижения транскрипции нейромодулятора.

Анализ промотора гена *LYNX1* человека в браузере генома человека (chr8: 143841246 – chr8: 143879640) и промотора гена мыши *Lynx1* (chr15: 74573409 – chr15: 74603409) выявил два потенциальных сайта связывания транскрипционного комплекса AP-1, образующегося из транскрипционных факторов c-Jun и c-Fos (рис. 2В). Так как в результате активации JNK под действием Аβ₁₋₄₂ одновременно происходит активация c-Jun [10] и снижение экспрессии c-Fos [11], то дисбаланс, возникающий меж-

ду c-Jun и c-Fos, возможно, является причиной нарушения формирования транскрипционного комплекса AP-1, и, как следствие, снижения транскрипции гена *Lynx1*. В согласии с этим предположением при инкубации кортикальных нейронов совместно с препаратом ws-Lynx1 и Аβ₁₋₄₂ наблюдалось восстановление уровня мРНК *Lynx1* (рис. 2Б). По-видимому, ws-Lynx1, конкурируя с Аβ₁₋₄₂ за связывание с α7-nAChR [6], подобно никотину активирует α7-nAChR, что приводит к повышению уровня c-Fos [9] и восстановлению транскрипции гена *Lynx1*.

***Lynx1* предотвращает нарушение ДВП, вызванное Аβ₁₋₄₂**

С использованием SP600125 ранее было показано, что нарушение ДВП, наблюдаемое при инкубации срезов гиппокампа с олигомерным Аβ₁₋₄₂,

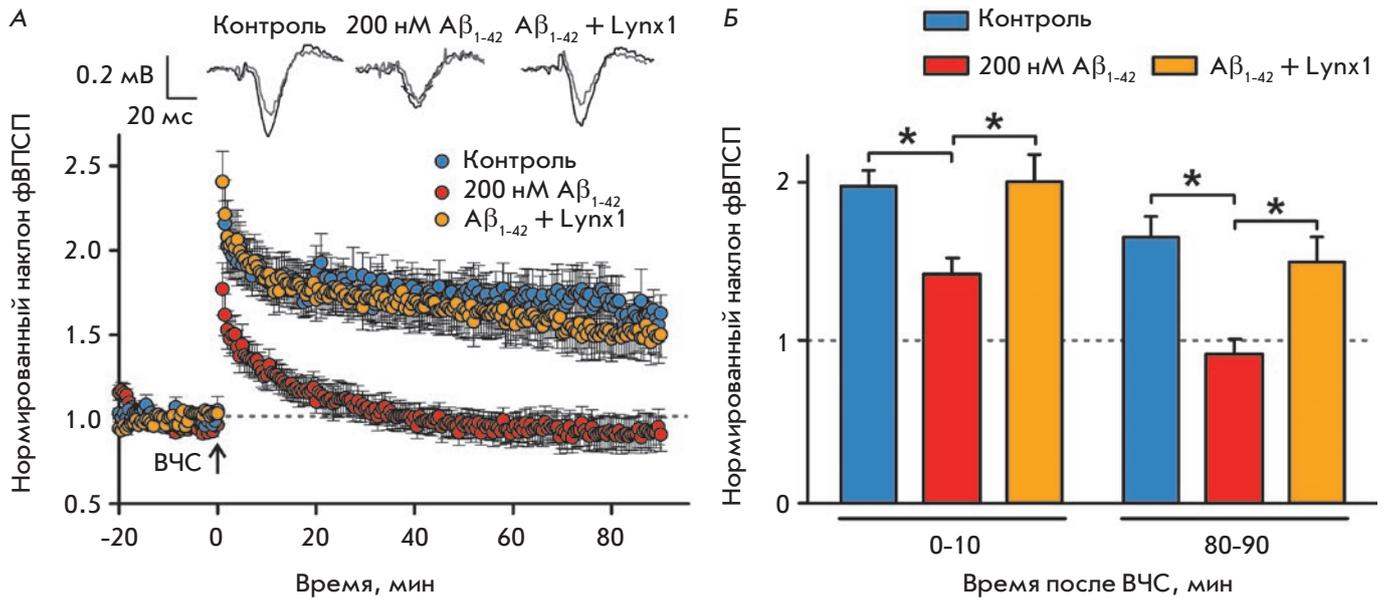


Рис. 3. ws-Lynx1 предотвращает нарушение ДВП, вызванное $A\beta_{1-42}$, на срезах гиппокампа. А – временной ход изменений наклона фВПСП, регистрируемых на срезах гиппокампа, полученных от контрольных животных и перфузированных ИЦЖ без $A\beta_{1-42}$ ($n = 8$), перфузированных ИЦЖ с 200 нМ $A\beta_{1-42}$ ($n = 6$) и перфузированных ИЦЖ с 200 нМ $A\beta_{1-42}$ + 2 мкМ ws-Lynx1 ($n = 5$). Б – усредненные значения наклона фВПСП, зарегистрированные в первые и последние 10 мин регистрации после ВЧС. * ($p < 0.05$) означает статистически значимые различия между группами согласно одностороннему тесту ANOVA с последующим Tukey's/пос-тестом

связано с активацией JNK [12]. Для изучения возможности восстановления с помощью Lynx1 синаптической пластичности, нарушенной в результате взаимодействия олигомерного $A\beta_{1-42}$ с $\alpha 7$ -nAChR и активации JNK, мы исследовали влияние 200 нМ $A\beta_{1-42}$ на ДВП на переживающих срезах гиппокампа мыши в присутствии и в отсутствие 2 мкМ ws-Lynx1. Предварительная перфузия срезов в течение 1 ч в растворе, содержащем $A\beta_{1-42}$, приводила к значительному падению посттетанического фВПСП, заметному уже на первых минутах после индукции ДВП. Наклон фВПСП, усредненный за первые 10 мин записи, в этом случае падал почти в 1.5 раза по сравнению с контрольным значением наклона фВПСП (рис. 3Б). Значительное снижение наклона фВПСП под действием $A\beta_{1-42}$, приближающееся к значениям непотенцированных фВПСП, наблюдалось в течение всего времени после индукции ДВП.

Однако совместная инкубация срезов гиппокампа в среде, содержащей и $A\beta_{1-42}$, и ws-Lynx1, восстанавливала уровень ДВП практически до контрольных значений (рис. 3). Усредненное значение наклона фВПСП при совместной аппликации $A\beta_{1-42}$ и ws-Lynx1 было значительно больше, чем у фВПСП, наблюдаемого при инкубации только с $A\beta_{1-42}$, и ста-

тистически не отличалось от усредненного значения наклона фВПСП в контроле в течение всего времени регистрации после ВЧС (рис. 3Б). Следовательно, ws-Lynx1 отменяет ингибирующее действие $A\beta_{1-42}$, полностью восстанавливая ДВП.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, присутствие олигомерного $A\beta_{1-42}$ в окружении нейронов приводит к значительному снижению экспрессии гена нейромодулятора Lynx1, регулирующего функционирование $\alpha 7$ -nAChR в мозге. Мы впервые показываем, что это снижение связано с активацией JNK и может быть предотвращено инкубацией с водорастворимым аналогом Lynx1. Кроме того, ws-Lynx1 способен корректировать нарушения синаптической пластичности в гиппокампе, вызванные $A\beta_{1-42}$ и лежащие в основе нарушения памяти и других когнитивных функций при БА. ●

Работа выполнена при поддержке РФФИ (№ 16-34-01302, Н.А.В., разработка системы регистрации токов на срезах мозга) и РНФ (№ 16-14-00102, Е.Н.Л., М.А.Ш., Н.А.В., влияние $A\beta_{1-42}$, SP600125, siРНК и ws-Lynx1 на ДВП и генную экспрессию).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Buckingham S.D., Jones A.K., Brown L.A., Sattelle D.B. // *Pharmacol. Rev.* 2009. V. 61. P. 39–61.
2. Walsh D.M., Klyubin I., Fadeeva J.V., Cullen W.K., Anwyl R., Wolfe M.S., Rowan M.J., Selkoe D.J. // *Nature.* 2002. V. 416. P. 535–539.
3. Lynch M.A. // *Physiol. Rev.* 2004. V. 84. P. 87–136.
4. Lyukmanova E.N., Shenkarev Z.O., Shulepko M.A., Mineev K.S., D'Hoedt D., Kasheverov I.E., Filkin S.Y., Krivolapova A.P., Janickova H., Dolezal V., Dolgikh D.A., et al. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 10618–10627.
5. Miwa J.M., Ibanez-Tallon I., Crabtree G.W., Sánchez R., Sali A., Role L.W., Heintz N. // *Neuron.* 1999. V. 23. P. 105–114.
6. Thomsen M.S., Arvaniti M., Jensen M.M., Shulepko M.A., Dolgikh D.A., Pinborg L.H., Härtig W., Lyukmanova E.N., Mikelsen J.D. // *Neurobiol. Aging.* 2016. V. 46. P. 13–21.
7. Suntsova M., Gogvadze E.V., Salozhin S., Gaifullin N., Eroshkin F., Dmitriev S.E., Martynova N., Kulikov K., Malakhova G., Tukhbatova G., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. 19472–19477.
8. Klein W.L. // *Neurochem. Int.* 2002. V. 41. P. 345–352.
9. Hu M., Liu Q.S., Chang K.T., Berg D.K. // *Mol. Cell. Neurosci.* 2002. V. 21. P. 616–625.
10. Yarza R., Vela S., Solas M., Ramirez M.J. // *Front. Pharmacol.* 2016. V. 6 doi: 10.3389/fphar.2015.00321.
11. Yenki P., Khodaghali F., Shaerzadeh F. // *J. Mol. Neurosci.* 2013. V. 49. P. 262–269.
12. Wang Q., Walsh D.M., Rowan M.J., Selkoe D.J., Anwyl R. // *J. Neurosci.* 2004. V. 24. P. 3370–3378.

УДК 577.175.82

Биохимические и функциональные изменения в глазу как проявление системной дегенерации нервной системы при паркинсонизме

А. Р. Ким^{1*}, Т. А. Павленко², Л. А. Катаргина², Н. Б. Чеснокова², М. В. Угрюмов^{1,3}¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26²Московский научно-исследовательский институт глазных болезней им. Гельмгольца Минздрава РФ, 105062, Москва, ул. Садовая-Черногрозская, 14/19³Национальный исследовательский университет «Высшая школа экономики», 101000, Москва, ул. Мясницкая, 20

*E-mail: alexandrrkim@gmail.com

Поступила в редакцию 23.03.2018

Принята к печати 07.06.2018

РЕФЕРАТ Болезнь Паркинсона (БП) – системное нейродегенеративное заболевание, в основе которого лежит гибель дофаминергических нейронов nigrostriatной системы мозга. Это заболевание диагностируют после потери большинства нейронов, что объясняет низкую эффективность лечения. Надежды на повышение эффективности лечения связаны с разработкой ранней диагностики БП, основанной на поиске периферических маркеров в виде ранних изменений немоторных функций. Поскольку нарушение зрительной функции считается одним из проявлений БП, в данной работе проведен поиск биохимических и физиологических изменений в глазу и веке мышей при моделировании БП на доклинической (досимптомной) и клинической (симптомной) стадиях. Обнаружено снижение содержания норадреналина, дофамина и серотонина в глазу мышей, причем не только на модели ранней клинической стадии БП, но и на модели БП на доклинической стадии, что свидетельствует о распространении патологических изменений моноаминергических систем мозга на глаз еще до появления нарушения моторики. Более того, на обеих стадиях БП у мышей было повышено внутриглазное давление, что указывает на возникновение не только метаболических, но и функциональных нарушений, которые могут быть использованы как диагностические маркеры. В отличие от глаза, содержание серотонина в веке мышей было повышено на обеих стадиях БП, причем на доклинической стадии в гораздо большей степени, чем на клинической. Учитывая, что серотонин участвует в регуляции секреторной активности слезных желез века, повышение его содержания у паркинсонических мышей должно приводить к изменению состава слезной жидкости, что может служить диагностическим маркером ранней (досимптомной) стадии БП. Таким образом, изменения метаболизма моноаминов в глазу и веке мышей, обнаруженные при моделировании БП на ранней стадии паркинсонизма, сопровождаются изменениями функционирования этих структур и поэтому могут использоваться в качестве диагностических маркеров на ранней стадии развития БП.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА болезнь Паркинсона, нейродегенерация, немоторные проявления, экспериментальные модели.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ 5-ГТФ – 5-гидрокситриптофан; L-ДОФА – L-диоксифенилаланин; БП – болезнь Паркинсона; ВГД – внутриглазное давление; МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – широко распространенное нейродегенеративное заболевание, развитие которого связано с дегенерацией nigrostriatной системы мозга – ключевого звена регуляции двигательной функции. В настоящее время БП диагностируется по нарушению моторной функции в виде

тремора или акинетико-ригидности, которые появляются только через много лет после начала патологического процесса и гибели большей части nigrostriatных дофаминергических нейронов. Высокая степень дегенерации nigrostriatной системы и истощение компенсаторных резервов мозга к моменту постановки диагноза обуславливают низкую эффек-

тивность традиционной заместительной фармако-терапии с использованием агонистов дофамина [1]. Отсюда следует необходимость разработки ранней (доклинической) диагностики БП – задолго до появления моторных симптомов, что позволило бы использовать нейропротекторную терапию, направленную на замедление или даже остановку нейродегенерации [1].

В основе существующей методологии разработки ранней диагностики БП лежат представления о том, что это заболевание носит системный характер, причем немоторные симптомы, обусловленные нарушением функций как отделов мозга за пределами nigrostriatной системы, так и периферической нервной системы, появляются задолго до моторных нарушений [1, 2]. Предполагается, что на основе ранних изменений немоторных функций и соответствующих изменений в биологических жидкостях (ликвор, кровь) может быть создана комплексная доклиническая диагностика БП [1].

Одно из системных проявлений БП – нарушение функций зрительного анализатора и вспомогательного аппарата глаза. Так, на клинической стадии у больных возникают галлюцинации, нарушение движения глаза и века, снижение количества и изменение состава слезной жидкости [3–5]. Кроме того, при БП часто наблюдаются симптом «сухого глаза» и блефарит (двустороннее рецидивирующее воспаление ресничной кромки век), изменение аккомодации (реакции зрачка на свет), нарушение образования и оттока внутриглазной жидкости, снижение остроты зрения, появление скотом (участков поля зрения, в котором зрение отсутствует или ослаблено), истончение слоев сетчатки, в частности за счет уменьшения количества нервных волокон [5–7].

Значительную роль в патологических изменениях зрительной системы при БП играют нарушения нейротрансмиссии и метаболизма моноаминов, в первую очередь катехоламинов, что отражается в изменении их содержания в тканях и жидких средах глаза [8–12]. Эти изменения вполне закономерны, поскольку моноамины обеспечивают передачу зрительной информации в сетчатке, а также влияют на тонус сосудов сетчатки и хориоидеи [13–15]. Кроме того, катехоламины в переднем отделе глаза обеспечивают регуляцию скорости аккомодации [16, 17] и уровня внутриглазного давления (ВГД), контролируя секрецию и отток внутриглазной жидкости [18, 19]. Помимо глаз, при БП претерпевают изменения и веки, содержащие многочисленные железы (Краузе, Вольфринга, мейбомиевые железы и т.д.), секреторный продукт которых входит в состав слезной жидкости. Конъюнктивы, выстилающая внутреннюю поверхность век, и находящиеся в ней железы имеют симпатическую иннер-

вацию [20, 21], которая нарушается при БП [2], что, возможно, является причиной развития блефарита и изменения состава слезной жидкости.

Можно предположить, что хотя бы часть из перечисленных выше изменений глаза и век, обнаруженных на клинической стадии БП, т.е. после появления нарушений моторной функции, характерна и для больных с доклинической стадией – до нарушения моторики, что позволило бы использовать эти изменения в качестве диагностических маркеров доклинической стадии заболевания. Это предположение может быть проверено только на экспериментальной модели БП, поскольку идентифицировать больных на доклинической стадии пока не удается. При этом необходимо моделировать не только доклинические, но и клинические стадии БП, чтобы быть уверенными в том, что используемая модель корректно воспроизводит, по крайней мере, биохимические и физиологические изменения в глазу и веках, обнаруженные у больных.

Цель данной работы состояла в поиске ранних биохимических и физиологических изменений в глазу на экспериментальной модели БП. Для этого в разработанной нами нейротоксической мышинной модели доклинической и ранней клинической стадии БП проведено измерение ВГД и оценено содержание моноаминов и метаболитов в тканях глаза и века.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 98 самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 2–2.5 месяцев массой 22–26 г, полученных из питомника «Пушино». Животных содержали в стандартных условиях вивария ($22 \pm 1^\circ\text{C}$, свет с 8.00 до 20.00 ч) со свободным доступом к пище и воде. Модель доклинической стадии БП воспроизводили двукратным подкожным введением 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) (Sigma, США) в разовой дозе 8 мг/кг, модель ранней клинической стадии – четырехкратным подкожным введением МФТП в разовой дозе 10 мг/кг. В обоих случаях интервал между инъекциями составлял 2 ч [22]. Животным контрольных групп вводили 0.9% NaCl по аналогичным схемам.

Перед введением МФТП или NaCl мышшей оценивали по показателю пройденного пути в тесте «открытое поле» с помощью установки для анализа поведения животных PhenoMaster (TSE Systems, Германия). Через 2 недели после введения МФТП или NaCl повторно измеряли моторное поведение животных.

Через 2 недели после введения МФТП с помощью автоматического тонометра для ветеринарии Tonovet (Icare, Финляндия) у животных измеряли 3 раза ВГД и рассчитывали среднее значение. После измерения ВГД осуществляли сбор материала для биохими-

ческого анализа: животных декапитировали, выделяли веки (верхнее и нижнее), далее препарировали глаза, удаляя хрусталик и стекловидное тело. Препарированные глаза и веки взвешивали, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до биохимического анализа.

Для оценки степени снижения уровня дофамина в nigrostriatной системе экспериментальных животных из мозга мышей выделяли дорсальный стриатум согласно ранее описанной методике [22]. Пробы стриатума взвешивали, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C до биохимического анализа.

Содержание биогенных аминов и их метаболитов: норадреналина, дофамина, серотонина, L-диоксифенилаланина (L-ДОФА) и 5-гидрокси-триптофана (5-ГТФ), измеряли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД). Пробы гомогенизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора Labsonic M (Sartorius, Франция) в 200 мкл 0.1 н. HClO_4 (Sigma, США), содержащих внутренний стандарт 3,4-дигидроксибензиламин (ДГБА, Sigma) в концентрации 25 пмоль/мл, после чего центрифугировали в течение 20 мин при 2000 g.

ВЭЖХ-разделение осуществляли на обращенно-фазовой колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4×100 мм с диаметром пор 3 мкм (Dr. Majsch GmbH, Германия) при температуре $+30^{\circ}\text{C}$ и скорости подвижной фазы 1.2 мл/мин, поддерживаемой жидкостным хроматографом LC-20ADsp (Shimadzu, Япония). В состав мобильной фазы входили: 0.1 М цитратно-фосфатный буфер, 0.3 мМ октансульфат натрия, 0.1 мМ EDTA и 9% ацетонитрил (все – Sigma), pH 2.5. Электрохимический детектор Decade II (Antec Leyden, Нидерланды) был укомплектован стеклоуглеродным рабочим электродом ($+0.85$ V) и Ag/AgCl-электродом сравнения. Пики биогенных аминов и метаболитов идентифицировали по времени их выхода в стандартном растворе. Содержание веществ рассчитывали методом внутреннего стандарта, используя отношение площадей пиков в стандартной смеси и в образце с помощью программного обеспечения LabSolutions (Shimadzu, Япония).

Статистическую обработку результатов проводили с помощью *t*-критерия Стьюдента в программном пакете Statistica. Критерием значимости считали $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Концентрация дофамина в стриатуме мышей снизилась по сравнению с контрольными значениями – до 43.3% при моделировании доклинической БП и до 20.1% – при моделировании ранней клинической стадии БП (таблица).

При этом анализ двигательной активности показал, что до введения МФТП или NaCl группы животных – контрольная и обе экспериментальные – не различались по показателю пройденного пути в тесте «открытое поле» (таблица), а после введения в группе с моделью БП на ранней клинической стадии произошло снижение пройденного пути на 48.2% по сравнению с контролем (таблица).

При моделировании БП на доклинической стадии в глазу мышей выявлено снижение содержания норадреналина и дофамина в среднем на 37 и 29%, серотонина – на 26%, а также наблюдалась тенденция ($p \leq 0.12$) к снижению содержания L-ДОФА по сравнению с контролем (рис. 1). На модели ранней клинической стадии БП эти изменения становились еще более выраженными: содержание норадреналина уменьшалось на 44%, дофамина – на 34%, серотонина – на 36% и L-ДОФА – на 40% по сравнению с контролем. При этом концентрация L-ДОФА была достоверно ниже в группе мышинной модели ранней клинической стадии БП по сравнению с моделью доклинической стадии БП (рис. 1). Кроме описанных биохимических изменений, выявлено небольшое, но статистически значимое повышение ВГД у мышей, моделирующих обе стадии БП (рис. 2).

В веках мышей при моделировании БП и на доклинической, и на ранней клинической стадиях обнаружено повышение содержания серотонина, при этом выраженное в разной степени. На доклинической стадии содержание серотонина возрастало в 3 раза, а на клинической стадии примерно на 56% (рис. 3). При этом содержание дофамина и предшественника серотонина – 5-ГТФ, в веках мышей, моделирующих

Концентрация дофамина в стриатуме и пройденный путь у животных при моделировании БП на доклинической и ранней клинической стадиях

Группа	Дофамин в стриатуме	Пройденный путь	
		до введения МФТП/NaCl	после введения МФТП/NaCl
% от контроля			
Контроль (0.9% NaCl)	100 ± 2.0	100 ± 7.0	95.4 ± 8.8
Модель БП	на доклинической стадии (2×8 мг/кг МФТП)	43.3 ± 2.4*	101 ± 5.6
	на ранней клинической стадии (4×10 мг/кг МФТП)	20.1 ± 2.5*	98 ± 6.1
		51.8 ± 6.3*	

* $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем.

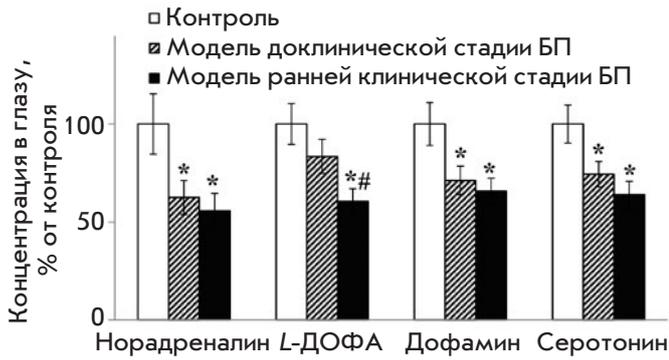


Рис. 1. Концентрация норадреналина, L-диоксифенилаланина (L-ДОФА), дофамина и серотонина в глазу мышинных моделей доклинической и ранней клинической стадий БП. * $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем; # $p \leq 0.05$ по сравнению с моделью БП на доклинической стадии

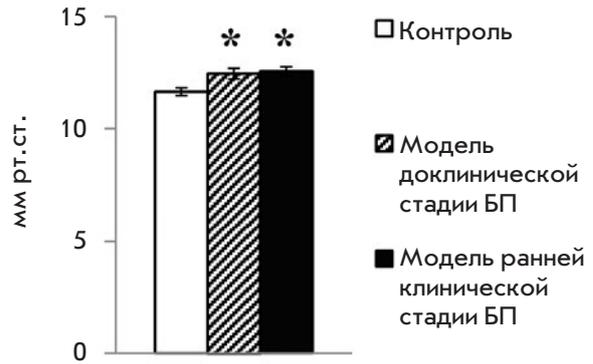


Рис. 2. Внутриглазное давление у мышей – моделей БП на доклинической и ранней клинической стадиях. * $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем

обе стадии БП, не отличалось от значений в контроле (рис. 3).

ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика экспериментальной модели болезни Паркинсона

Важной особенностью БП является то, что для нее определен порог нейродегенерации, при котором возникают моторные нарушения, т.е. осуществляется переход от доклинической стадии заболевания к клинической. Этот порог равен гибели 50–60% тел дофаминергических нейронов в черной субстанции, 70–80% их аксонов в стриатуме и потерю 70–80% дофамина в стриатуме по сравнению с контролем [1]. Поскольку гибель аксонов дофаминергических нейронов в стриатуме предшествует потере тел этих нейронов в черной субстанции [1], можно выделить следующие ключевые характеристики экспериментальной модели БП на различных стадиях:

Для доклинической стадии – отсутствие изменений пройденного пути в тесте «открытое поле» и снижение уровня дофамина в стриатуме менее чем на 70%.

Для ранней клинической стадии – снижение пройденного пути в тесте «открытое поле» и снижение уровня дофамина в стриатуме более чем на 80%.

Ранее при моделировании БП на продвинутой доклинической стадии с помощью двукратного введения МФТП в разовой дозе 12 мг/кг мы показали снижение дофамина в стриатуме на 56%, а при моделировании БП на ранней клинической стадии (четырёхкратное введение МФТП в той же разовой дозе) – на 75% по сравнению с контролем [22]. Дозы МФТП, использованные в данной работе для моделирования

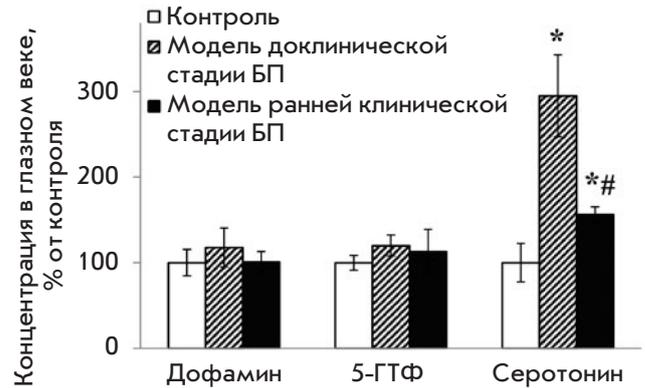


Рис. 3. Концентрация дофамина, 5-гидрокситриптофана (5-ГТФ) и серотонина в веках мышей – моделях БП на доклинической и ранней клинической стадиях. * $p \leq 0.5$ по сравнению с контролем, # $p \leq 0.05$ по сравнению с моделью БП на доклинической стадии

БП на мышах из питомника «Пушино», незначительно отличаются от предложенных нами ранее для животных из питомника «Столбовая» [22]. Как известно, мыши даже одной и той же линии, полученные из разных питомников, могут отличаться чувствительностью к МФТП [23]. В связи с этим мы дополнительно определили вышеуказанные ключевые характеристики у использованной в данной работе модели, чтобы подтвердить ее полное соответствие ранее описанной модели.

При моделировании доклинической стадии БП уровень дофамина в стриатуме мышей снизился на 57% в сравнении с контрольной группой, и на 80% – при моделировании клинической стадии (таблица), что практически полностью совпадает с ранее полученными данными [22]. При моделиро-

вании БП на клинической стадии также обнаружено снижение пройденного пути в тесте «открытое поле» на 48% в сравнении с контролем (*таблица*), что повторяет двигательные нарушения, наблюдавшиеся в предыдущей работе [22]. В свою очередь, ни в настоящей, ни в предыдущей работе не выявлено изменений моторной активности у животных, моделирующих доклиническую стадию БП (*таблица*) [22].

Таким образом, использованные нами дозы и схемы введения МФТП полностью воспроизводят ранее описанную мышиную модель БП доклинической и ранней клинической стадий.

Изменение метаболизма моноаминов в тканях глаза и физиологические проявления

Обнаруженное нами снижение содержания моноаминов – норадреналина, дофамина и серотонина – в глазу мышей не только в модели БП на ранней клинической, но и на доклинической стадии свидетельствует о том, что системные патологические процессы, развивающиеся при БП [2], распространяются на глаз и начинаются уже на ранней стадии БП – до появления моторных нарушений. Полученные результаты хорошо согласуются с опубликованными данными, согласно которым уровень дофамина снижается в сетчатке глаза мышей с МФТП-индуцированным паркинсонизмом [24]. Интересно, что, в отличие от глаза, мы не обнаружили изменения уровня норадреналина в плазме крови мышей, моделирующих обе стадии БП, по сравнению с контролем [25]. Это указывает на то, что снижение содержания норадреналина в глазу при моделировании БП носит региональный характер.

В отличие от моноаминов, концентрация L-ДОФА была снижена только на клинической стадии БП. Отсутствие изменения содержания L-ДОФА на доклинической стадии БП означает, что ранние патологические изменения в глазу не отражаются на продукции ключевого предшественника катехоламинов.

Особого внимания заслуживает корреляция между снижением уровня дофамина в стриатуме в результате деградации дофаминергических аксонов и в глазу мышей с доклинической и клинической стадиями БП, что косвенно подтверждает системный характер патогенеза БП. Содержание дофамина у этих же животных снижается не только в стриатуме, но и в черной субстанции – в области локализации тел дофаминергических нейронов, хотя дегенерация нейронов в этой области мозга происходит у мышей только на клинической стадии БП [1, 22].

С физиологической точки зрения большой интерес представляет то, что на обеих стадиях БП у мышей наблюдается незначительное, но статистически значимое повышение ВГД ($p \leq 0.015$), что указывает

на появление функциональных нарушений в глазу еще до возникновения моторных нарушений. Вполне вероятно, что повышение ВГД может быть следствием снижения содержания катехоламинов в тканях глаза. Действительно, уровень ВГД определяется скоростью образования и оттока внутриглазной жидкости. В регуляции этих процессов участвует дофамин, который, воздействуя на рецепторы DA2 и DA3, экспрессирующиеся в постганглионарных симпатических нервных окончаниях, снижает секрецию внутриглазной жидкости, а воздействуя на рецепторы DA1, локализованные в цилиарном теле, повышает секрецию внутриглазной жидкости [19]. Весьма вероятно, что повышение внутриглазного давления может быть одним из ранних признаков развития БП у людей, что заманчиво было бы использовать в качестве одного из маркеров для ранней диагностики этого заболевания. Косвенно такая возможность подтверждается повышенной частотой возникновения глаукомы, сопровождающейся увеличением внутриглазного давления, у пациентов с БП по сравнению с возрастным контролем [7].

В настоящее время невозможно понять, характерно ли повышение ВГД, обнаруженное в мышинных моделях БП, для больных, поскольку этот показатель у больных оценивали только на продвинутой клинической стадии после длительного лечения агонистами дофамина [26]. При этом у больных, в отличие от мышей, ВГД было понижено. Окончательный ответ на вопрос об изменении ВГД у больных при БП и о направлении изменений можно получить только при оценке этого показателя у нелеченых больных на ранней клинической стадии БП.

Изменения метаболизма моноаминов в тканях века

Обнаруженное нами существенное повышение содержания серотонина в веке подтверждает предположение о его важной роли в развитии нейровоспаления при БП [27, 28]. Существуют два возможных объяснения такого повышения. Во-первых, синтез серотонина, источником которого в веке являются тучные клетки [29], может усиливаться под влиянием «субстанции Р» – фактора нейровоспаления, содержание которого в центральной нервной системе повышается при БП [30, 31]. Во-вторых, повышение уровня серотонина в веке может быть обусловлено нарушением его метаболизма, например, в результате снижения активности N-ацетилтрансферазы – скоростьюлимитирующего фермента превращения серотонина в мелатонин. Действительно, понижение активности этого фермента рассматривается как фактор риска развития БП [32].

Серотонин участвует в регуляции микроциркуляции слезной жидкости и секреторной активности слезных желез, локализованных в конъюнктиве века

[33–36]. В связи с этим выявленное нами значительное повышение содержания серотонина в веке мышей может приводить к изменению состава слезы и к патологическим нарушениям ее микроциркуляции [36] вплоть до возникновения симптома «сухого глаза», характерного для БП [37, 38]. Исходя из этого, при разработке доклинической диагностики БП особое внимание необходимо уделить оценке состава слезной жидкости. Пока имеются только сведения об увеличении содержания TNF- α в слезе пациентов с БП [39]. Учитывая, с одной стороны, важную роль серотонина в регуляции состава слезной жидкости, а с другой, существенное (многократное) различие в повышении уровня серотонина в веке мышей, моделирующих доклинические и клинические стадии БП, можно предположить, что состав слезной жидкости на доклинической и клинической стадиях у больных будет существенно различаться. Если это предпо-

ложение подтвердится на моделях доклинической и клинической стадий БП, то особенности состава слезной жидкости на доклинической стадии могут рассматриваться как потенциальные диагностические маркеры ранней стадии БП.

Таким образом, в результате нейротоксического моделирования доклинической и клинической стадий БП у мышей выявлено изменение метаболизма моноаминов в глазу и веке, что сопровождается изменением функционирования этих структур и может использоваться в качестве диагностических маркеров БП на ранней стадии развития – до появления нарушений двигательной функции. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН № 41 ФИМТ (проект № 0108-2018-0014).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Угрюмов М.В. // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015. Т. 115. С. 4–14.
2. Goldstein D.S. // Compr. Physiol. 2013. V. 3. P. 1569–1610.
3. Armstrong R.A. // J. Parkinsons Dis. 2015. V. 5. P. 715–726.
4. Archibald N.K., Clarke M.P., Mosimann U.P., Burn D.J. // Mov. Disord. 2011. V. 26. P. 2387–2395.
5. Nowacka B., Lubinski W., Honczarenko K., Potemkowski A., Safranow K. // Med. Sci. Monit. 2014. V. 20. P. 2243–2249.
6. Литвиненко И.В., Бойко Э.В., Куликов А.Н., Дынин П.С., Труфанов А.Г., Мальцев Д.С., Юрин А.А. // Анналы клинической и экспериментальной неврологии. 2016. Т. 10. С. 11–16.
7. Чеснокова Н.Б., Павленко Т.А., Угрюмов М.В. // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2017. Т. 117. С. 124–131.
8. Nakahara T., Mori A., Kurauchi Y., Sakamoto K., Ishii K. // J. Pharmacol. Sci. 2013. V. 123. P. 79–84.
9. Dong F., An J.H., Ren Y.P., Yan D.S., Zhou X.T., Lü F., Hu D.N., Chen J.F., Qu J. // Zhonghua Yan Ke Za Zhi. 2007. V. 43. P. 1110–1113.
10. Ding C., Walcott B., Keyser K.T. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2003. V. 44. P. 1513–1520.
11. Qi J.H., Li B.H. // Zhongguo Yao Li Xue Bao. 1992. V. 13. P. 153–156.
12. Hiromatsu S., Araie M., Fujimori K. // Jpn. J. Ophthalmol. 1994. V. 38. P. 123–128.
13. Firsov M.L., Astakhova L.A. // Neurosci. Behav. Physiol. 2016. V. 46. P. 138–145.
14. Lopatina E.V., Penniyaynen V.A., Tsyrlina V.A. // Bull. Exp. Biol. Med. 2012. V. 153. P. 48–50.
15. Smith C.P., Sharma S., Steinle J.J. // Exp. Eye Res. 2007. V. 84. P. 75–81.
16. Okuda T., Tokutomi N., Tokutomi Y., Murai Y., Negi A., Nishi K. // Curr. Eye Res. 2001. V. 23. P. 455–462.
17. Wiederholt M., Schäfer R., Wagner U., Lepple-Wienhues A. // Ger. J. Ophthalmol. 1996. V. 5. P. 146–153.
18. Reitsamer H.A., Bogner B., Tockner B., Kiel J.W. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2009. V. 50. P. 2301–2307.
19. Pescosolido N., Parisi F., Russo P., Buomprisco G., Nebbioso M. // Biomed. Res. Int. 2013. № 193048.
20. Dartt D.A., McCarthy D.M., Mercer H.J., Kessler T.L., Chung E.H., Zieske J.D. // Curr. Eye Res. 1995. V. 14. P. 993–1000.
21. Diebold Y., Ríos J.D., Hodges R.R., Rawe I., Dartt D.A. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2001. V. 42. P. 2270–2282.
22. Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A., Kucheryanu V.G., Bocharov E.V., Kryzhanovsky G.N., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Klodt P.M., Rayevsky K.S., Pronina T.S. // Neurosci. 2011. V. 181. P. 175–188.
23. Jackson-Lewis V., Przedborski S. // Nat. Protoc. 2007. V. 2. P. 141–151.
24. Hamilton W.R., Trickler W.J., Robinson B.L., Paule M.G., Ali S.F. // Neurosci. Lett. 2012. V. 515. P. 107–110.
25. Ким А.Р., Угрюмов М.В. // ДАН. 2015. Т. 464. С. 494.
26. Nucci C., Martucci A., Cesareo M., Garaci F., Morrone L.A., Russo R., Corasaniti M.T., Bagetta G., Mancino R. // Prog. Brain Res. 2015. V. 221. P. 49–65.
27. Politis M., Niccolini F. // Behav. Brain Res. 2015. V. 277. P. 136–145.
28. Kempuraj D., Thangavel R., Selvakumar G., Zaheer S., Ahmed M., Raikwar S., Zahoor H., Saeed D., Natteru P., Iyer S., Zaheer A. // Front. Cell. Neurosci. 2017. V. 11. P. 216.
29. Conti P., Shaik-Dasthagirisaheb Y.B. // Neurotox. Res. 2015. V. 28. P. 147–153.
30. Thornton E., Vink R. // PLoS One. 2012. V. 7. № e34138.
31. Coleman J.W., Huang Q., Stanworth D.R. // Peptides. 1986. V. 7. P. 171–175.
32. Singh M., Khanna V.K., Shukla R., Parmar D. // Dis. Markers. 2010. V. 28. P. 87–93.
33. Turner H.C., Alvares L.J., Candia O.A., Bernstein A.M. // Curr. Eye Res. 2003. V. 27. P. 205–215.
34. Kirch W., Hornereber M., Tamm E.R. // Anat. Embryol. 1996. V. 193. P. 365–375.
35. Diebold Y., Ríos J.D., Hodges R.R., Rawe I., Dartt D.A. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2001. V. 42. P. 2270–2282.
36. Coman O.A., Savu O.R., Ghita I., Paunescu H., Coman L., Fulga I. // Oftalmologia. 2007. V. 51. P. 126–133.
37. Kwon O.Y., Kim S.H., Kim J.H., Kim M.H., Ko M.K. // J. Korean Med. Sci. 1994. V. 9. P. 239–242.
38. Chhadva P., Lee T., Sarantopoulos C., Hackam A., McClellan A., Felix E., Levitt R., Galor A. // Ophthalmology. 2015. V. 122. P. 1675–1680.
39. Çomoğlu S.S., Güven H., Acar M., Öztürk G., Koçer B. // Neurosci. Lett. 2013. V. 553. P. 63–67.

УДК 577.212.3; 579.61

Полногеномное секвенирование российских штаммов *Neisseria gonorrhoeae*, отнесенных к геногруппе ST 1407

А. А. Кубанов¹, А. В. Рунина¹, А. В. Честков¹, А. В. Кудрявцева², Ю. А. Пеков³, И. О. Корвиго³, Д. Г. Дерябин^{1*}

¹Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии Минздрава России, 107076, Москва, ул. Короленко, 3/6

²Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

³Студия анализа данных «Ксивелью», 119049, Москва, Ленинский просп., 30А

* E-mail: dgderyabin@yandex.ru

Поступила в редакцию 23.11.2017

Принята к печати 27.06.2018

РЕФЕРАТ Представлены данные полногеномного секвенирования трех антибиотикорезистентных штаммов *Neisseria gonorrhoeae*, выделенных в Российской Федерации в 2015 году и по результатам NG-MAST-типирования отнесенных к широко распространенной геногруппе ST 1407. Анализ резистомы этих штаммов выявил отсутствие генов *ermA/B/C/F*, а также сохранение аллелей дикого типа генов *rpsE*, *rrs*, *rml*, *rplD*, *rplV*, *macAB* и *mefA*, что объясняет чувствительность к аминоциклитолам (спектиномицин) и макролидам (азитромицин). На фоне отсутствия детерминант резистентности с конъюгативным механизмом передачи (*blaTEM*, *tetM*), а также аллелей дикого типа генов *penC/pilQ*, *parE* и *norM* в ряде генов, кодирующих мишени антимикробных препаратов, выявлены одиночные или множественные полиморфизмы, обуславливающие устойчивость к β-лактамам (penA, penA), тетрациклинам (*rpsJ*) и фторхинолонам (*gyrA*, *parC*). Присутствие полиморфизмов дополнялось мутациями в гене *porB* и промоторе гена *mtrR*, неспецифически повышающими устойчивость к антибиотикам за счет нарушения их поступления в бактериальную клетку или усиления обратного трансмембранного транспорта. Различия в спектре подобных мутаций потребовали ревизии представлений о степени филогенетической близости исследованных штаммов, выполненной на основе сравнения более 790 групп генов домашнего хозяйства. Подтверждена высокая степень гомологии геномов *N. gonorrhoeae* ST 1407 и *N. gonorrhoeae* ST 12556, последний из которых дивергировал, по-видимому, от общего предшественника в результате одиночных мутационных событий. *N. gonorrhoeae* ST 12450 оказался примером фено- и генотипической конвергенции с геногруппой ST 1407, независимо сформировавшим собственные, хотя и частично идентичные, механизмы антибиотикорезистентности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА *Neisseria gonorrhoeae*, полногеномное секвенирование, антимикробные препараты, детерминанты резистентности, филогенетический анализ.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МИК – минимальная ингибирующая концентрация; MLST – мультилокусное типирование ДНК; NG-MAST – мультиантигенное типирование ДНК; PBP – пенициллинсвязывающий белок; QRDR – участки, определяющие устойчивость к антибиотикам-хинолонам; ST – сиквенс-тип.

ВВЕДЕНИЕ

Гонококковая инфекция остается одним из наиболее распространенных заболеваний, передающихся половым путем. В 2012 году ВОЗ сообщила о 78.3 млн новых случаев гонореи среди лиц репродуктивного возраста [1]. В Российской Федерации в 2015 году зарегистрировано 27056 случаев гонококковой инфекции, что соответствует 18.5 на 100 000 населения [2]. И если российские показатели снижаются на 10–20%

в год, то мировой тенденцией стал устойчивый рост заболеваемости.

Это обстоятельство в значительной степени связано с появлением и распространением эпидемически значимых клонов *Neisseria gonorrhoeae*, проявляющих множественную устойчивость к антимикробным препаратам (в том числе к препаратам выбора – цефалоспорином III поколения) [3]. Среди них в настоящее время наибольшее значение приобрел

генетический вариант, который в соответствии с протоколом молекулярного типирования NG-MAST (от англ. *Neisseria gonorrhoeae* Multi Antigen Sequence Typing) [4] описан как ST 1407 [5]. К 2010 году этот ST-тип обнаружен в 20 из 21 страны Европейского союза, составляя более 10% изолятов в 13 из них (в том числе в Австрии, Бельгии, Италии, Голландии, Португалии, Румынии, Словении, Испании и Великобритании) [6]. При этом генетический анализ выявил у *N. gonorrhoeae* ST 1407 множественные детерминанты резистентности к антимикробным препаратам [7], что объясняет участвовавшие случаи неэффективной терапии гонококковой инфекции [3, 5].

Эпидемическая значимость ST 1407 дополнительно определяется существованием филогенетически связанных с ним молекулярных типов *N. gonorrhoeae*, имеющих более чем на 99% идентичные нуклеотидные последовательности генов *porB* или *tbpB*, используемых при проведении NG-MAST-типирования, и в этой связи обозначаемых как представители геногруппы ST 1407. С их учетом доля *N. gonorrhoeae*, выделенных в странах Европейского союза, достигает 23% [6], а на Тайване один из представителей данной геногруппы – ST 4378 – занял доминирующее положение [8].

В Российской Федерации случаи гонококковой инфекции, вызванной *N. gonorrhoeae* ST 1407, имеют спорадический характер и регистрируются в городах с интенсивной туристической (Москва) или экономической (Калуга, Мурманск) миграцией из стран Европейского союза [9]. Немногочисленные вероятные представители геногруппы ST 1407, выявленные на территории Российской Федерации, впервые были описаны нами ранее [10]. Цель данной работы состояла в углубленной генетической характеристике подобных изолятов с использованием метода полногеномного секвенирования, в настоящее время ставшего востребованным инструментом анализа молекулярных механизмов антибиотикорезистентности и филогении патогенных микроорганизмов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы *N. gonorrhoeae*

Объектом исследования стали три штамма *N. gonorrhoeae*, выделенные в 2015 году от пациентов с диагнозом «Гонококковая инфекция нижних отделов мочеполового тракта» (A54.0 по МКБ-10) и депонированные в специализированной коллекции ФГБУ «ГНЦДК» Минздрава России под номерами 20/15/004, 41/15/003 и 19/15/005.

N. gonorrhoeae 20/15/004 выделен в Калуге от 41-летнего мужчины и при NG-MAST-типировании [4] охарактеризован как представитель эпидеми-

чески значимого типа ST 1407 (аллель 908 гена *porB* и аллель 110 гена *tbpB* согласно номенклатуре базы NG-MAST). Штамм *N. gonorrhoeae* 41/15/003 выделен в Томске от мужчины 19 лет и описан как новый сиквенс-тип ST 12556, имеющий ранее неизвестную комбинацию аллеля 6 гена *tbpB* и аллеля 971 гена *porB*, последний из которых характеризовался гомологией 99.97% с сиквенс-типом ST 1407. Штамм *N. gonorrhoeae* 19/15/005 выделен в Омске от женщины 31 года и также описан как новый ST 12450, особенности которого определялись сочетанием аллеля 931 гена *porB* с ранее неизвестным аллелем 2097 гена *tbpB*, имеющим гомологию 99.74% с шестью другими описанными ранее аллелем 6 этого гена. Анализ данных штаммов в составе выборки из 124 культур *N. gonorrhoeae*, проведенный на основе сравнения слитых последовательностей генов *porB* и *tbpB* с использованием программы MEGA 6 (Molecular Evolutionary Genetics Analysis version 6.0) [11], объединял их в единую геногруппу, соотносимую с ST 1407 [10].

Анализ чувствительности исследуемых штаммов к шести антимикробным препаратам, ранее или в настоящее время рекомендованных при гонококковой инфекции, показал их устойчивость или умеренную чувствительность к бензилпенициллину, тетрациклину и ципрофлоксацину, дополняемую у *N. gonorrhoeae* 41/15/003 умеренной чувствительностью к азитромицину (табл. 1).

Секвенирование генома *N. gonorrhoeae*

Геномную ДНК выделяли с использованием набора «Проба-НК» («ДНК-Технология», Россия) из чистых культур *N. gonorrhoeae*, выращенных в течение 18–24 ч на шоколадном агаре с добавлением 1% ростовой добавки ISOVitalex (Becton Dickinson, США). Библиотеку случайных фрагментов ДНК размером 400–700 п.н. готовили по стандартному протоколу GS Rapid Library. Библиотеки амплифицировали с использованием эмульсионной ПЦР и комплекта реагентов GS Junior emPCR kit. Полногеномное секвенирование выполнено с применением 454 пиросеквенирующей технологии на приборе GS Junior (Roche, Швейцария). Каждый геном секвенирован в течение отдельного запуска с использованием набора реагентов GS Junior Titanium Sequencing Kit. Средняя кратность покрытия генома составляла не менее 20.

Биоинформатические методы исследования

Аннотацию секвенированных геномов *N. gonorrhoeae* проводили при помощи приложения Prokka [12] с использованием общедоступных референсных наборов аминокислотных последовательностей

Таблица 1. Показатели чувствительности исследуемых штаммов *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам и их интерпретация в соответствии с МУК 4.2.1890–04*

Антимикробный препарат (области чувствительности – Ч, умеренной чувствительности – УЧ и резистентности – Р; мкг/мл)	МИК, мкг/мл		
	20/15/004	41/15/003	19/15/005
Бензилпенициллин (Ч ≤ 0.06; УЧ = 0.12–1; Р ≥ 2)	0.5 (УЧ)	2 (Р)	1 (УЧ)
Цефтриаксон (Ч ≤ 0.25; УЧ > 0.25)	0.015 (Ч)	0.03 (Ч)	0.015 (Ч)
Тетрациклин (Ч ≤ 0.25; УЧ = 0.5–1; Р ≥ 2)	2 (Р)	4 (Р)	2 (Р)
Спектиномицин (Ч ≤ 32; УЧ = 64; Р ≥ 128)	32 (Ч)	32 (Ч)	16 (Ч)
Азитромицин** (Ч ≤ 0.25; УЧ = 0.5; Р ≥ 1)	0.25 (Ч)	0.5 (УЧ)	0.25 (Ч)
Ципрофлоксацин (Ч ≤ 0.06; УЧ = 0.12–0.5; Р ≥ 1)	16 (Р)	8 (Р)	16 (Р)

*Методические указания МУК 4.2.1890–04. Определение чувствительности микроорганизмов к антибактериальным препаратам: Методические указания. М.: Федеральный центр госсанэпиднадзора Минздрава России, 2004. С. 91.

**В связи с отсутствием критериев чувствительности к азитромицину в МУК 4.2.1890–04 оценка проведена по критериям European Committee for Antimicrobial Susceptibility Testing (www.eucast.org).

Swiss-Prot и UniProt. Кластеризацию осуществляли с использованием приложения CD-HIT [13] при 90% уровне сходства белков по длине и аминокислотной последовательности. Аннотацию рибосомных генов осуществляли при помощи программы Barrnap (<https://github.com/tseemann/barrnap>), поиск геномных островов – с использованием сервиса IslandViewer4 [14].

Поиск генетических детерминант устойчивости *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам осуществляли при помощи сервиса RGI базы данных CARD [15].

Для NG-MAST-типирования *N. gonorrhoeae* использовали программу NGMASTER [16], для мультилокусного MLST-типирования – программу SRST2 [17]. На основании аминокислотных последователь-

ностей белков трех исследуемых изолятов и 24 ранее секвенированных штаммов *N. gonorrhoeae*, а также *N. meningitidis*, *N. lactamica* и *N. elongata*, в приложении OrthoFinder [18] были выделены ортологические группы белков рода *Neisseria*. Проведено множественное корректирующее выравнивание каждой из 790 отобранных ортологических групп в программе MAFFT [19]. Отфильтрованные и конкатенированные выравнивания использованы для построения филогенетического дерева *N. gonorrhoeae* методом максимального правдоподобия в программе RAxML [20] с последующей визуализацией в графическом редакторе FigTree (<http://tree.bio.ed.ac.uk/software/figtree/>).

Для оценки взаимосвязи между общей эволюцией кодирующих последовательностей и последовательностей, связанных с развитием устойчивости к антимикробным препаратам, были сформированы две выборки конкатенированных множественных выравниваний соответствующих ортогрупп, проведено вычисление *p*-дистанции в пределах каждой выборки. Соответствие между значениями в ячейках двух полученных матриц оценено с использованием коэффициента корреляции Спирмена.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Общая характеристика геномов *N. gonorrhoeae*

Сборка геномов штаммов *N. gonorrhoeae* выявила у каждого из них по одной кольцевой хромосоме размером от 2223815 до 2271213 п.н., доля G+C в которых составляла 52.5–52.7% (табл. 2).

Общее количество идентифицированных открытых рамок считывания составило 2448 (*N. gonorrhoeae* 20/15/004), 2297 (*N. gonorrhoeae* 41/15/003) и 2293 (*N. gonorrhoeae* 19/15/005), из которых 1332 (54.4%), 1266 (55.1%) и 1281 (55.9%) соответственно были аннотированы как белоккодирующие гены с известной функцией.

В анализируемых геномах обнаружены по 49 (*N. gonorrhoeae* 20/15/004 и *N. gonorrhoeae* 41/15/003) или 47 (*N. gonorrhoeae* 19/15/005) генов тРНК, одному гену тмРНК, а также по четыре копии оперона 16S–23S–5S рРНК.

У каждого штамма идентифицированы криптические плазмиды размером от 4556 (*N. gonorrhoeae* 20/15/004) до 5266 п.н. (*N. gonorrhoeae* 19/15/005), содержащие характерный для конъюгативных плазмид ген релаксомы *MobC*, гены криптических плазмидных белков А, В и С, а также по пять открытых рамок считывания с неизвестными функциями. Соотнесение среднего значения покрытия плазмиды, деленного на среднее покрытие хромосомы, у штаммов 20/15/004 и 41/15/003 приводило к показате-

Таблица 2. Общая характеристика геномов исследуемых штаммов *N. gonorrhoeae*

Характеристика	Штаммы		
	20/15/004	41/15/003	19/15/005
Размер генома, п.н.	2271213	2236575	2223815
Доля G+C, %	52.6	52.5	52.7
Число белоккодирующих генов	2448	2297	2293
Число белоккодирующих генов с известной функцией	1332	1266	1281
Количество генов 16S-23S-5S рРНК	4	4	4
Количество генов тРНК	49	49	47
Количество генов тмРНК	1	1	1
Количество «геномных островов» на бактериальной хромосоме	12	22	17
Размер плазмиды, п.н.	4556	5233	5266
Значение покрытия плазмиды относительно хромосомы	18.4	12.3	33.6

лям 18.4 и 12.3 соответственно против 33.6 у штамма 19/15/005, что характеризовало обнаруженные плазмиды как многокопийные (> 10 копий на клетку).

В целом на первом этапе биоинформатического анализа было выявлено сходство исследуемых геномов с референсным FA1090 (GenBank: AE004969) и некоторыми другими ранее секвенированными штаммами *N. gonorrhoeae* [21], в том числе относящимися к ST 1407 [22]. Некоторые количественные вариации сравниваемых геномов могли быть обусловлены их высокой пластичностью, традиционно объясняемой наличием профагов, транспозонов и инсерционных элементов IS110 и IS1016 [23], в значительном количестве обнаруженных в составе «геномных островов» у всех трех штаммов *N. gonorrhoeae* (табл. 2).

Собранные *de novo* геномы депонированы в базу данных GenBank NCBI под номерами NTCT00000000 (*N. gonorrhoeae* 20/15/004), NTCS00000000 (*N. gonorrhoeae* 41/15/003) и NTCTU00000000 (*N. gonorrhoeae* 19/15/005).

Генетические детерминанты устойчивости *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам

На следующем этапе биоинформатического анализа проведен поиск и изучение четырех групп генов, кодирующих: 1) ферменты инактивации антибиотиков или модификации их мишеней; 2) белки-мишени, му-

тации в которых могут приводить к снижению их аффинности к соответствующим антимикробным препаратам; 3) транспортные белки, осуществляющие поступление антибиотиков в бактериальную клетку; 4) системы эффлюкса антибиотиков (табл. 3).

Детерминанты устойчивости к β-лактамам (пенициллинам и цефалоспорином)

Проведенный поиск не выявил в составе анализируемых последовательностей *N. gonorrhoeae* генов *blaTEM-1* или *blaTEM-135*, кодирующих ферменты β-лактамазы, гидролизующие лактамное кольцо в молекуле пенициллина и других структурно близких антибиотиков [24].

С другой стороны, последовательности хромосомных генов, кодирующих пенициллинсвязывающие белки (PBP, penicillin binding proteins), содержали ряд нуклеотидных замен, значимо снижающих чувствительность к β-лактамам антибиотикам. Так, в гене *penA* (кодирует PBP₁) во всех трех штаммах обнаружена мутация, приводящая к аминокислотной замене L421P и в 3–4 раза снижающая аффинность к пенициллинам в сравнении с белком дикого типа [25]. Еще более выраженные изменения выявлены при анализе гена *penA* (кодирует PBP₂), структура которого у штаммов *N. gonorrhoeae* 20/15/004 и *N. gonorrhoeae* 41/15/003 соответствовала представлениям о мозаичном характере организации, возникшей в результате вероятной генетической рекомбинации с синантропными комменсалами видов *N. cinerea* и *N. perflava* [26]. Эта особенность сопровождалась появлением аминокислотных замен F504L, N512Y, G545S на С-концевом участке белка PBP₂, значимо снижающих скорость связывания его пептидилтрансферазного центра с антибиотиком и препятствующих функционально важным конформационным переходам [27]. В свою очередь, две другие аминокислотные замены, I312M и V316T, оцениваются как значимые при формировании устойчивости к цефалоспорином, особенно в сочетании с G545S [28]. На этом фоне особенностью аллеля *penA* у *N. gonorrhoeae* 19/15/005 было наличие только двух аминокислотных замен – F504L и P551S, способных снижать уровень ацилирования PBP₂ почти в такой же степени, как и несколько других мутаций на С-концевом участке данного белка [29].

Еще одним геном, вовлеченным в развитие устойчивости *N. gonorrhoeae* к β-лактамам антибиотикам, стал *penB* (в настоящее время чаще обозначаемый как *porB*), кодирующий порин PorB1b наружной мембраны. Аминокислотные замены G120K и A121N в данном белке, ведущие к снижению проницаемости мембраны для гидрофильных антибиотиков [30], обнаружены у *N. gonorrhoeae* 20/15/004 и *N. gonorrhoeae*

Таблица 3. Генетические детерминанты устойчивости *N. gonorrhoeae* к антимикробным препаратам

Гены (белки)	Устойчивость к анти-микробным препаратам	Гены и нуклеотидные полиморфизмы (аминокислотные замены)		
		20/15/004	41/15/003	19/15/005
Ферменты инактивации антибиотиков или модификации их мишеней				
<i>blaTEM</i> (β-лактамаза)	β-лактамы	-	-	-
<i>ermA/B/C/F</i> (pPHK-метилазы)	макролиды	-	-	-
Белки-мишени антибиотиков				
<i>ponA</i> (PBP ₁)	β-лактамы	L421P	L421P	L421P
<i>penA</i> (PBP ₂)	β-лактамы	I312M V316T F504L N512Y G545S	I312M V316T F504L N512Y G545S	F504L P551S
<i>tetM</i>	тетрациклины	-	-	-
<i>rpsJ</i> (S10)	тетрациклины	V57M	V57M	V57M
<i>rpsE</i> (S5)	спектиномицин	wt	wt	wt
<i>rrs</i> (16S-PHK)	спектиномицин	wt	wt	wt
<i>rrl</i> (23S-PHK)	макролиды	wt	wt	wt
<i>rplD</i> (L4)	макролиды	wt	wt	wt
<i>rplV</i> (L22)	макролиды	wt	wt	wt
<i>gyrA</i>	фторхинолоны	S91F D95G	S91F D95G	S91F D95G
<i>parC</i>	фторхинолоны	S87R E91A	S87R E91A	wt
<i>parE</i>	фторхинолоны	wt	wt	wt
Транспортные белки, обеспечивающие поступление антибиотиков				
<i>penB / porB</i> (PorB1b)	β-лактамы тетрациклины	G120K A121N	G120K A121N	G120D
<i>penC / pilQ</i>	β-лактамы	wt	wt	wt
Ферментные системы эффлюкса антибиотиков				
<i>mtrCDE</i>	β-лактамы тетрациклины макролиды	wt	wt	wt
<i>mtrRpro</i>		A35del	A35del	wt
<i>macAB</i>	макролиды	wt	wt	wt
<i>macABpro</i>		wt	wt	wt
<i>mefA</i>	макролиды	wt	wt	wt
<i>norM</i>	фторхинолоны	wt	wt	wt
<i>norMpro</i>		wt	wt	wt

Примечание. «-» – ген не найден; «wt» – последовательность дикого типа.

ae 41/15/003, в то время как штамм *N. gonorrhoeae* 19/15/005 содержал одиночную замену G120D.

Другой анализируемый ген, также имеющий отношение к устойчивости *N. gonorrhoeae* к β-лактамам и другим гидрофильным антибиотикам – ген *pilQ* (ранее известный как *penC*), продукт которого формирует во внешней мембране дополнительные поры, обеспечивающие возможность диффузии антибиотиков в периплазматическое пространство бактериальной клетки. Мутация в триplete, кодирующем 666 аминокислоту (Gly), или полная делеция гена *pilQ* способны еще более повысить уровень антибиотикоустойчивости *N. gonorrhoeae*, особенно в тех случаях,

когда она сочетается с детерминантами устойчивости в генах *penA* и *penB* [31], однако в анализируемых нами геномах этот ген имел последовательность дикого типа.

Завершая анализ детерминант устойчивости *N. gonorrhoeae* к β-лактамам, следует отметить три сцепленных гена, представленных у всех проанализированных штаммов, которые входят в состав Mtr-локуса (multiple transferable resistance), контролируемого репрессором MtrR, и кодируют систему эффлюкса MtrC-MtrD-MtrE. При этом анализ промоторной области гена *mtrR* позволил выявить в нем делецию A35del, обуславливающую снятие подобной ре-

прессии с увеличением резистентности к антибиотику [32]. Эта мутация обнаружена в штамме *N. gonorrhoeae* 20/15/004 (ST 1407) и близкого к нему по структуре гена *porB* *N. gonorrhoeae* 41/15/003 (ST 12556), что согласуется с представлениями о наличии обсуждаемого механизма антибиотикорезистентности у гонококков, относящихся к NG-MAST-типу 1407 [5].

Детерминанты устойчивости к тетрациклинам

Во всех трех анализируемых геномах в хромосомном гене *rpsJ* обнаружена точечная мутация, ведущая к аминокислотной замене V57M в рибосомном белке S10 30S субчастицы рибосомы. Эта замена приводит к нарушению связывания рибосомы с антибиотиком, что позволяет рассматривать указанный механизм как базовый в определении устойчивости *N. gonorrhoeae* к тетрациклинам [33].

С другой стороны, голландский или американский варианты гена *tetM* [34], белковые продукты которых интерферируют с факторами элонгации EF-G и EF-Tu и делают рибосому недоступной для взаимодействия с антибиотиком, не обнаружены в геномах трех исследованных штаммов.

В свою очередь, неспецифические механизмы устойчивости анализируемых штаммов к тетрациклинам (как и в случае β-лактамов) включали мутации в белке PorB1b и систему эффлюкса MtrC-MtrD-MtrE, эффективно дополняющие специфический механизм устойчивости, определяемый мутацией в гене *rpsJ* [33].

Детерминанты устойчивости к спектиномицину

Нуклеотидная последовательность гена *rrs* соответствовала последовательности гена дикого типа с сохранением остатка цитозина в положении 1186 (соответствует позиции 1192 у *Escherichia coli*), ключевого нуклеотида сайта связывания аминоклитолов на спирали 34 16S РНК [35].

Другая проанализированная хромосомная детерминанта – ген *rpsE*, кодирующий рибосомный белок S5 30S субъединицы рибосомы, мутации в котором способны вести к устойчивости к спектиномицину при сохранении гена *rrs* дикого типа. Однако поиск возможных аминокислотных замен T24P [36] и K28E, а также делеции кодона 27 (Val) [37] заставил констатировать соответствие *rpsE* гену дикого типа.

Детерминанты устойчивости к макролидам

Генетический кластер *ermA/B/C/F*, кодирующий рРНК-метилазы, модифицирующие сайты связывания макролидов с молекулой 23S рРНК, не обнаружен ни в одном из проанализированных геномов.

Поиск мутаций A2059G и C2611T в гене *rml*, нарушающих взаимодействие макролидных антибиоти-

ков с мишенью – пептидилтрансферазным центром в домене V 23S рРНК [38], заставил отнести все три штамма к дикому типу.

Дикому типу соответствовали также гены *rplD* и *rplV*, продукты которых – рибосомные белки L4 и L22 – первично связаны с доменом I 23S рРНК, однако имеют множественные сайты взаимодействия с другими доменами 23S рРНК. Мутации в белках L4 и L22 приводят к изменениям конформации доменов II, III и V, что, в свою очередь, может повлиять на чувствительность микроорганизмов к макролидам [39].

Анализ механизмов устойчивости *N. gonorrhoeae* к макролидам позволил выявить во всех трех геномах функциональные аллели генов *macA* и *macB*, кодирующих комплекс MacA–MacB, специфично распознающий и удаляющий антибиотик из периплазмы бактериальных клеток [40]. Однако анализ позиции -10 промоторов этих генов указывал на его соответствие дикому типу без дополнительного усиления эффлюкса. Дикому типу в исследуемых геномах соответствовал и ген *mefA*, кодирующий другой транспортный белок, обуславливающий устойчивость к макролидам [41].

Детерминанты устойчивости к фторхинолонам

Поиск хромосомных мутаций, определяющих устойчивость *N. gonorrhoeae* к фторхинолонам, проводили путем анализа участков QRDR (quinolone resistance-determining regions) в генах *gyrA*, *parC* и *parE*, кодирующих субъединицу А ДНК-гиразы, а также субъединицы С и Е топоизомеразы IV – мишени фторхинолонов.

Во всех трех штаммах в гене *gyrA* обнаружены однонуклеотидные полиморфизмы TCC → TTC и GAC → GGC, ведущие к аминокислотным заменам S91F и D95G, связанным с устойчивостью *N. gonorrhoeae* к фторхинолонам [42].

Ген *parC* у *N. gonorrhoeae* 20/15/004 и *N. gonorrhoeae* 41/15/003 содержал триплеты дикого типа (86(D) и 88(S)), что свидетельствовало о наличии двойной мутации, приводящей к заменам S87R и E91A. В сочетании с изменениями в ДНК-гиразе такая мутация существенно модифицировала структуру так называемого хинолонового кармана [43] и исключала возможность взаимодействия антимикробного препарата с мишенью. Анализ всех четырех аминокислотных замен показал, что геном *N. gonorrhoeae* 19/15/005 содержит ген *parC* дикого типа. В свою очередь, установлено, что во всех исследованных штаммах *N. gonorrhoeae* сохранен ген *parE* дикого типа.

При характеристике неспецифического механизма устойчивости *N. gonorrhoeae* к фторхинолонам

следует указать на присутствие в геноме каждого из исследованных штаммов по одной функциональной копии гена *porM*, кодирующего мембранный транспортер, удаляющий катионные антибактериальные препараты из бактериальной клетки [44]. В то же время анализ промоторной области в позиции -35 указывает на этот ген как на ген дикого типа, что не предполагает дополнительного усиления эффлюкса.

Молекулярное типирование и филогенетический анализ *N. gonorrhoeae*

Различия в детерминантах антибиотикорезистентности в геномах исследуемых штаммов *N. gonorrhoeae* потребовали ревизии представлений о степени их филогенетической близости. С этой целью использовали сочетание типирования NG-MAST и MLST (multi locus sequence typing), а также построение дендрограммы, основанной на сопоставлении всей совокупности генов домашнего хозяйства.

Результаты анализа секвенированных геномов с использованием программы NGMASTER [16] выявили полное совпадение с исходными данными, согласно которым анализируемые штаммы относятся к типам ST 1407, ST 12556 и ST 12450 (табл. 4).

В свою очередь, SRST2-анализ [17] нуклеотидных последовательностей консервативных генов *abcZ*, *adk*, *aroE*, *fumC*, *gdh*, *pdhC* и *pgm* [45] идентифицировал штаммы *N. gonorrhoeae* 20/15/004 и *N. gonorrhoeae* 41/15/003 как штаммы, относящиеся к MLST-типу 1901, который, согласно данным NG-MAST-типирования, соответствует эпидемически значимому ST 1407 [5]. С другой стороны, характери-

стики нуклеотидных последовательностей четырех из семи аллелей *N. gonorrhoeae* 19/15/005 позволили отнести данный штамм к MLST-типу 6721, ранее не упоминаемому в публикациях по проблеме антибиотикорезистентности и не имеющему описания филогенетической общности с ST 1407.

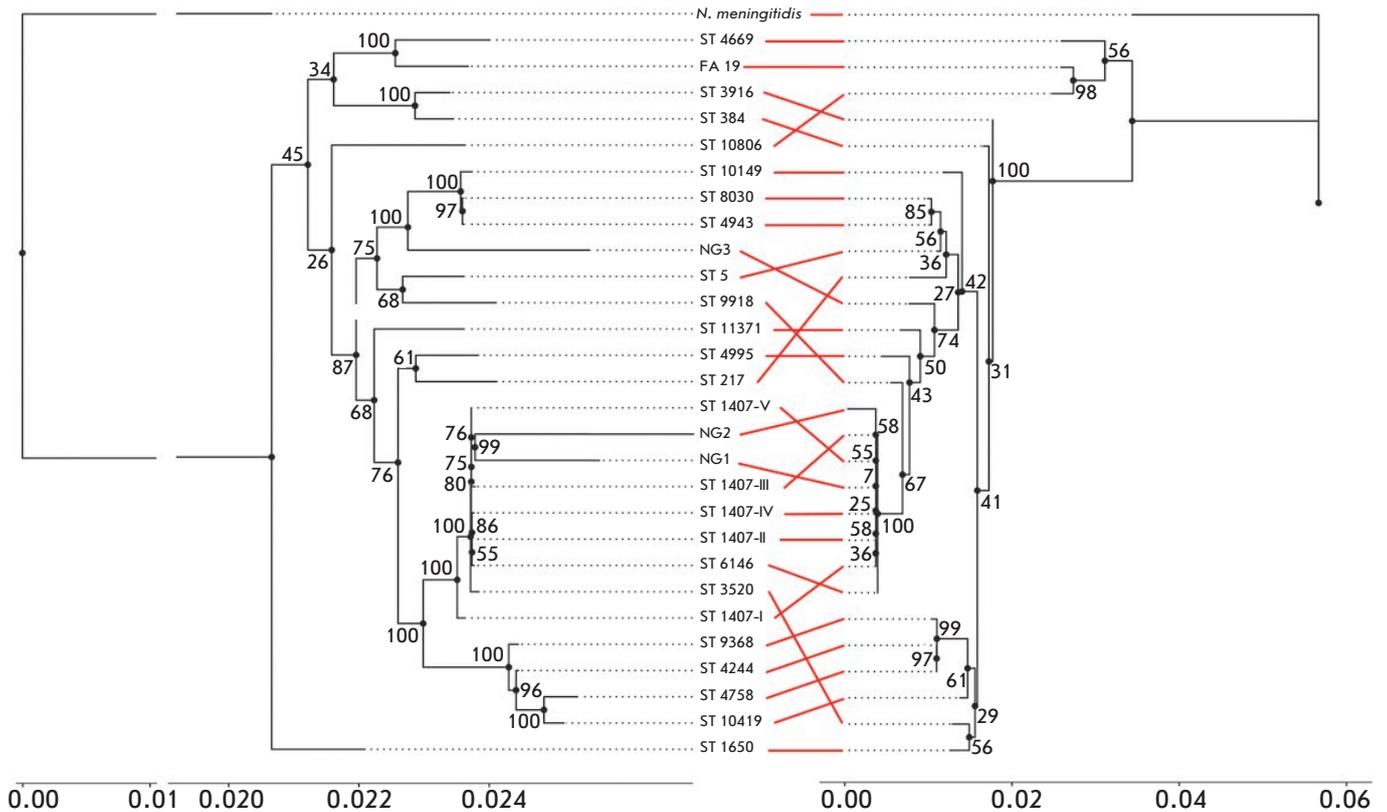
Филогенетические взаимоотношения между штаммами оценивали на основе сравнения всей совокупности 790 ортологических групп генов домашнего хозяйства у представителей семейства *Neisseriaceae*. Дополнительно использовали представленные в базе данных NCBI сведения о геномах *N. meningitidis* и 24 штаммов *N. gonorrhoeae*, в том числе референсного штамма FA 19, пяти ранее секвенированных штаммов ST 1407 и 18 штаммов других NG-MAST-типов. Филогенетическое дерево, построенное по методу максимального подобия с использованием программы RAxML [20] на основе модели замен Gamma в сочетании с матрицей весов BLOSUM62, представлено на рисунке. Для оценки взаимосвязи эволюции нейтральных кодирующих последовательностей и последовательностей, вовлеченных в развитие антибиотикорезистентности, данному дереву была противопоставлена дендрограмма, построенная для ортогрупп, связанных с устойчивостью к антимикробным препаратам.

Полученные данные указывали на чрезвычайно высокую степень генотипического подобия штаммов 20/15/004 (ST 1407) и 41/15/003 (ST 12556) на основе совокупности генов домашнего хозяйства, объединяемых в единый кластер с другими ранее секвенированными представителями ST 1407, а также ST 6146 и ST 3520. Тем самым результаты проведенного исследования подтверждали версию о тесной генетической связи между анализируемыми штаммами, первый из которых появился в российской популяции *N. gonorrhoeae* при вероятной трансграничной миграции, а второй произошел от их общего предка в результате единичных мутационных событий. С другой стороны, на филогенетическом дереве генов домашнего хозяйства третий исследуемый штамм 19/15/005 (ST 12450) был достаточно удален от геногруппы ST 1407, не обладая выраженной генотипической близостью с какой-либо из сформированных геногрупп. Соответственно установлено выраженное расхождение между первичным молекулярным типированием и результатами полногеномного секвенирования данного штамма, что указывает на полифилетичность антибиотикорезистентных штаммов в современной российской популяции *N. gonorrhoeae*.

Сопоставление конкатенированных множественных выравниваний нейтральных кодирующих последовательностей и последовательностей, связанных с развитием устойчивости к антимикробным препа-

Таблица 4. Результаты молекулярного типирования *N. gonorrhoeae*

Гены и определяемые ими молекулярные типы (NG-MAST и MLST)	ST-типы и номера аллелей штаммов <i>N. gonorrhoeae</i>		
	20/15/004	41/15/003	19/15/005
NG-MAST	1407	12556	12450
<i>porB</i>	908	971	931
<i>tbpB</i>	110	6	2097
MLST	1901	1901	6721
<i>abcZ</i>	109	109	126
<i>adk</i>	39	39	39
<i>aroE</i>	170	170	67
<i>fumC</i>	111	111	111
<i>gdh</i>	148	148	146
<i>pdhC</i>	153	153	153
<i>pgm</i>	65	65	133



Филогенетическое положение исследуемых штаммов (NG 1 = 20/15/004; NG2 = 41/15/003; NG3 = 19/15/005) относительно других ранее секвенированных штаммов *N. gonorrhoeae*, оцененное на основе сравнения генов домашнего хозяйства (слева) и ортологичных групп, связанных с развитием устойчивости к анти-микробным препаратам (справа). Соответствие нумерации геномов в базе данных NCBI: ST 1407-I = SRR3349203; ST 1407-II = SRR3349826; ST 1407-III = SRR3357181; ST 1407-IV = SRR3357194; ST 1407-V = PMC3486552; ST 5 = SRR3349550; ST 217 = SRR3349568; ST 384 = SRR3350138; ST 1650 = SRR3343502; ST 3520 = SRR3357021; ST 3916 = SRR3343568; ST 4244 = SRR3350168; ST 4669 = SRR1661263; ST 4758 = SRR3343553; ST 4943 = SRR3349831; ST 4995 = SRR3349564; ST 6146 = SRR3349969; ST 8030 = SRR3349209; ST 9368 = SRR2736298; ST 9918 = SRR3349572; ST 10149 = SRR3349522; ST 10419 = SRR3343607; ST 10806 = SRR3349206; ST 11371 = SRR3349525.

Длина ветвей филогенетического дерева (по оси абсцисс) соответствует количеству ожидаемых аминокислотных замен на одну позицию. Значения около узлов ветвления представляют уровень поддержки. Красные линии соединяют одноименные ветви деревьев.

ратам, позволило выявить статистически значимую ($p < 0.001$) положительную корреляцию (коэффициент Пирсона 0.44) между ними. В частности, подобное соответствие показано для представителей генотипа ST 1407 (в том числе штаммов 20/15/004 и 41/15/003), за исключением ST 3520, описываемого так же, как изолят с мозаичной структурой гена *penA* [46], но, вероятно, относительно независимо сформировавшим собственными механизмами антибиотикорезистентности. Анализ *N. gonorrhoeae* 19/15/005

(ST 12450) подтвердил его относительно независимое филогенетическое положение.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами проведено полногеномное секвенирование трех штаммов *N. gonorrhoeae*, выделенных на территории Российской Федерации в 2015 году [10]. Эти штаммы обладают множественной устойчивостью к анти-микробным препаратам и по результатам NG-MAST-типирования предварительно отнесены к эпидеми-

чески значимой геногруппе ST 1407, получившей в настоящее время глобальное распространение [6, 8].

Анализ геномов этих штаммов выявил их принципиальное соответствие референсному штамму *N. gonorrhoeae* FA1090 [21] и ранее секвенированным представителям ST 1407 [22]. Обнаруженное отсутствие генов *ermA/B/C/F*, а также сохранение аллелей дикого типа генов *rpsE*, *rrs*, *rml*, *rplD*, *rplV*, *macAB* и *mefA*, мутации в которых связаны с формированием устойчивости к аминоциклитолам (спектиномицин) и макролидам (азитромицин), объясняет чувствительность исследуемых штаммов к названным группам антимикробных препаратов. С другой стороны, на фоне отсутствия детерминант резистентности с конъюгативным механизмом передачи (*blaTEM*, *tetM*) и аллелей дикого типа *penC/pilQ*, *parE* и *norM* в ряде генов, кодирующих мишени антимикробных препаратов, выявлены одиночные или множественные полиморфизмы. Эти полиморфизмы, обуславливающие устойчивость к β-лактамам (*ponA*, *penA*), тетрациклинам (*rpsJ*) и фторхинолонам (*gyrA*, *parC*), дополняют мутации в гене *porB* и промоторе гена *mtrR*, неспецифически повышающие устойчивость к антибиотикам за счет нарушения их поступления в бактериальную клетку или усиления эффлюкса. Таким образом, результаты полногеномного секвенирования достаточно хорошо согласуются с предварительно полученными данными фенотипического анализа. Одновременно следует отметить, что анализ генетических детерминант резистентности позволил лишь прогнозировать чувствительность или устойчивость к определенным группам антимикробных препаратов, не позволяя конвертировать полученные данные в значения их МПК. В частности, при высоком сходстве генотипов *N. gonorrhoeae* 20/15/004 (ST 1407) и 41/15/003 (ST 12556) необъясненным

остается 2–4-кратный рост устойчивости последнего к пенициллину, цефтриаксону, тетрациклину и азитромицину. С другой стороны, на фоне различий в спектрах мутаций в генах, вовлеченных в формирование антибиотикорезистентности у *N. gonorrhoeae* 20/15/004 (ST 1407) и 19/15/005 (ST 12450), параметры их устойчивости к антимикробным препаратам оказались достаточно близкими. Указанное обстоятельство определяет актуальность поиска дополнительных механизмов антибиотикорезистентности *N. gonorrhoeae*, а также значимость разработки компьютерных алгоритмов, призванных обеспечить достаточную сходимость результатов генотипического и фенотипического анализа [47].

Другим важным результатом стала ревизия представлений о степени филогенетической близости исследуемых клинических изолятов, изначально сформированных на основе данных NG-MAST-типирования. Проведенное исследование подтвердило высокую степень гомологии геномов *N. gonorrhoeae* 20/15/004 (ST 1407) и *N. gonorrhoeae* 41/15/003 (ST 12556), последний из которых, вероятно, сформировался в Российской Федерации вследствие дивергенции от представителя глобально распространенного клона ST 1407. С другой стороны, штамм *N. gonorrhoeae* 19/15/005 (ST 12450) можно рассматривать как пример фено- и генотипической конвергенции с названной выше геногруппой, у которого независимо выработались собственные, хотя и частично сходные, механизмы антибиотикорезистентности. Полученный результат свидетельствует о полифилетичности антибиотикорезистентных штаммов в российской популяции *N. gonorrhoeae*, что определяет необходимость выявления и учета расширенного перечня эпидемически значимых генотипов. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Newman L., Rowley J., Vander Hoorn S., Wijesooriya N.S., Unemo M., Low N., Stevens G., Gottlieb S., Kiarie J., Temmerman M. // PLoS One. 2015. V. 10. e0143304.
2. Кубанова А.А., Кубанов А.А., Мелехина Л.Е., Богданова Е.В. // Вестник дерматологии и венерологии. 2016. № 3. С. 12–28.
3. Ohnishi M., Golparian D., Shimuta K., Saika T., Hoshina S., Iwasaku K., Nakayama S., Kitawaki J., Unemo M. // Antimicrob. Agents Chemother. 2011. V. 55. № 7. P. 3538–3545.
4. European centre for disease prevention and control. Molecular typing of *Neisseria gonorrhoeae* – results from a pilot study 2010–2011. 2012. Stockholm. ECDC.
5. Unemo M., Golparian D., Sary A., Eigntler A. // Euro Surveill. 2011. V. 16. № 43. Pii. 19998.
6. Chisholm S.A., Unemo M., Quaye N., Johansson E., Cole M.J., Ison C.A., van de Laar M.J. // Euro Surveill. 2013. V. 18. № 3. Pii. 20358.
7. Unemo M. // BMC Infect. Dis. 2015. V. 15. P. 364.
8. Chen C.C., Yen M.Y., Wong W.W., Li L.H., Huang Y.L., Chen K.W., Li S.Y. // J. Antimicrob. Chemother. 2013. V. 68. № 7. P. 1567–1571.
9. Воробьев Д.В., Соломка В.С., Плахова К.И., Дерябин Д.Г., Кубанов А.А. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2016. № 4. С. 42–50.
10. Kubanov A., Vorobyev D., Chestkov A., Leinsoo A., Shaskolskiy B., Dementieva E., Solomka V., Plakhova X., Gryadunov D., Deryabin D. // BMC Infect. Dis. 2016. V. 16. P. 389.
11. Tamura K., Stecher G., Peterson D., Filipski A., Kumar S. // Mol. Biol. Evol. 2013. V. 30. № 12. P. 2725–2729.
12. Seemann T. // Bioinformatics. 2014. V. 30. № 14. P. 2068–2069.
13. Fu L., Niu B., Zhu Z., Wu S., Li W. // Bioinformatics. 2012. V. 28. № 23. P. 3150–3152.
14. Bertelli C., Laird M.R., Williams K.P., Lau B.Y., Hoad G., Winsor G.L., Brinkman F.S. // Nucl. Acids Res. 2017. V. 45. W30–W35.
15. McArthur A.G., Waglechner N., Nizam F., Yan A., Azad

- M.A., Baylay A.J., Bhullar K., Canova M.J., De Pascale G., Ejim L., et al. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. V. 57. № 7. P. 3348–3357.
16. Kwong J.C., Gonçalves da Silva A., Dyet K., Williamson D.A., Stinear T.P., Howden B.P., Seemann T. // *Microb. Genom.* 2016. V. 2. № 8. e000076.
17. Inouye M., Dashnow H., Raven L.A., Schultz M.B., Pope B.J., Tomita T., Zobel J., Holt K.E. // *Genome Med.* 2014. V. 6. № 11. P. 90.
18. Emms D.M., Kelly S. // *Genome Biol.* 2015. V. 16. № 1. P. 157.
19. Katoh K., Standley D.M. // *Mol. Biol. Evol.* 2013. V. 30. № 4. P. 772–780.
20. Stamatakis A. // *Bioinformatics.* 2014. V. 30. № 9. P. 1312–1313.
21. Abrams A.J., Trees D.L., Nicholas R.A. // *Genome Announc.* 2015. V. 3. № 5. e01052–15.
22. Anselmo A., Ciammaruconi A., Carannante A., Neri A., Fazio C., Fortunato A., Palozzi A.M., Vacca P., Fillo S., Lista F., et al. // *Genome Announc.* 2015. V. 3. № 4. e00903–15.
23. Бодоев И.Н., Ильина Е.Н. // *Мол. генет. микробиол. вирусол.* 2015. Т. 33. № 3. С. 22–27.
24. Muhammad I., Golparian D., Dillon J.A., Johansson A., Ohnishi M., Sethi S., Chen S.C., Nakayama S., Sundqvist M., Bala M., et al. // *BMC Infect. Dis.* 2014. V. 14. P. 454.
25. Ropp P.A., Hu M., Olesky M., Nicholas R.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. V. 46. № 3. P. 769–777.
26. Ameyama S., Onodera S., Takahata M., Minami S., Maki N., Endo K., Goto H., Suzuki H., Oishi Y. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2002. V. 46. № 12. P. 3744–3749.
27. Takahata S., Senju N., Osaki Y., Yoshida T., Ida T. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2006. V. 50. № 11. P. 3638–3645.
28. Tomberg J., Unemo M., Davies C., Nicholas R.A. // *Biochemistry.* 2010. V. 49. № 37. P. 8062–8070.
29. Powell A.J., Tomberg J., Deacon A.M., Nicholas R.A., Davies C. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 2. P. 1202–1212.
30. Olesky M., Zhao S., Rosenberg R.L., Nicholas R.A. // *J. Bacteriol.* 2006. V. 188. № 7. P. 2300–2308.
31. Helm R.A., Barnhart M.M., Seifert H.S. // *J. Bacteriol.* 2007. V. 189. № 8. P. 3198–3207.
32. Veal W.L., Nicholas R.A., Shafer W.M. // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. № 20. P. 5619–5624.
33. Hu M., Nandi S., Davies C., Nicholas R.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2005. V. 49. № 10. P. 4327–4334.
34. Turner A., Gough K.R., Leeming J.P. // *Sex Transm. Infect.* 1999. V. 75. № 1. P. 60–66.
35. Galimand M., Gerbaud G., Courvalin P. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2000. V. 44. № 5. P. 1365–1366.
36. Iina E.N., Malakhova M.V., Bodoev I.N., Oparina N.Y., Filimonova A.V., Govorun V.M. // *Front. Microbiol.* 2013. V. 4. P. 186.
37. Unemo M., Golparian D., Skogen V., Olsen A.O., Moi H., Syversen G., Hjelmevoll S.O. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2013. V. 57. № 2. P. 1057–1061.
38. Jacobsson S., Golparian D., Cole M., Spiteri G., Martin I., Bergheim T., Borrego M.J., Crowley B., Crucitti T., van Dam A.P., et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2016. V. 71. № 11. P. 3109–3116.
39. Gregory S.T., Dahlberg A.E. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 289. № 4. P. 827–834.
40. Rouquette-Loughlin C.E., Balthazar J.T., Shafer W.M. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2005. V. 56. № 5. P. 856–860.
41. Cousin S.J., Whittington W.L., Roberts M.C. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2003. V. 47. № 12. P. 3877–3880.
42. Shultz T.R., Tapsall J.W., White P.A. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. V. 45. № 3. P. 734–738.
43. Su X., Lind I. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2001. V. 45. № 1. P. 117–123.
44. Rouquette-Loughlin C., Dunham S.A., Kuhn M., Balthazar J.T., Shafer W.M. // *J. Bacteriol.* 2003. V. 185. № 3. P. 1101–1106.
45. Jolley K.A., Maiden M.C. // *Future Microbiol.* 2014. V. 9. № 5. P. 623–630.
46. Ison C.A., Town K., Obi C., Chisholm S., Hughes G., Livermore D.M., Lowndes C.M.; GRASP collaborative group. // *Lancet Infect. Dis.* 2013. V. 13. № 9. P. 762–768.
47. Eyre D.W., De Silva D., Cole K., Peters J., Cole M.J., Grad Y.H., Demczuk W., Martin I., Mulvey M.R., Crook D.W., et al. // *J. Antimicrob. Chemother.* 2017. V. 72. № 7. P. 1937–1947.

УДК 577.181.5

Антибактериальное действие тиосульфидов на мультирезистентные штаммы бактерий, выделенные от больных муковисцидозом

В. В. Куликова¹, М. Ю. Чернуха², Е. А. Морозова¹, С. В. Ревтович¹, А. Н. Родионов¹, В. С. Коваль¹, Л. Р. Аветисян², Д. Г. Кулястова², И. А. Шагинян², Т. В. Демидкина^{1*}

¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

²Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

*E-mail: tvd@eimb.ru, tvdemidkina@yandex.ru

Поступила в редакцию 11.10.2017

Принята к печати 26.06.2018

РЕФЕРАТ Установлена мультирезистентность штаммов *Achromobacter ruhlandii* 155В, *Burkholderia cepacia* 122 и *Pseudomonas aeruginosa* 48В, выделенных от больных муковисцидозом. Показан антибактериальный эффект аллицина, диметилтиосульфидата и дипропилтиосульфидата на мультирезистентные штаммы. В зависимости от микроорганизма и концентрации тиосульфидаты могут оказывать как бактериостатическое, так и бактерицидное действие. Исследованные тиосульфидаты могут рассматриваться в качестве кандидатов для разработки альтернативных лекарственных препаратов, эффективных при инфекциях, вызванных возбудителями, мультирезистентными к антибиотикам.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аллицин, антибактериальная активность, метионин- γ -лиаза, муковисцидоз, тиосульфидаты.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МГЛ – метионин- γ -лиаза; МПК – минимальная подавляющая концентрация; МБК – минимальная бактерицидная концентрация.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка новых подходов к созданию эффективных антибактериальных препаратов актуальна из-за широкого распространения антибиотикорезистентных штаммов бактерий. Мультирезистентные микроорганизмы вызывают внутрибольничные инфекции, которые могут быть причиной осложнений у ослабленных больных. Серьезную проблему представляет хроническая легочная инфекция у больных муковисцидозом, вызванная ассоциацией таких возбудителей, как *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Burkholderia cepacia complex* и др. [1], при которой под воздействием длительной антибиотикотерапии происходит формирование мультирезистентных штаммов микроорганизмов, что обуславливает неэффективность терапии антибиотиками.

Тиосульфидаты, обнаруженные в растениях рода *Allium*, обладают антимикробным действием [2].

Антибактериальный эффект аллицина, основного тиосульфидата чеснока, обусловлен сочетанием снижения уровня клеточного глутатиона и инактивации ключевых метаболических ферментов вследствие модификации их тиоловых групп [3, 4]. Поскольку аллицин, окисляющий тиоловые группы ферментов и белков, имеет много мишеней в клетке, аллицин и другие тиосульфидаты, скорее всего, не должны вызывать резистентность [5].

В растениях рода *Allium* аллииназа [КФ 4.4.1.4] катализирует разложение сульфоксидов S-замещенных аналогов L-цистеина с образованием тиосульфидатов. Нами показано, что тиосульфидаты могут быть получены при помощи метионин- γ -лиазы (МГЛ, [КФ 4.4.1.11]) (схема). Тиосульфидаты, образующиеся при расщеплении сульфоксидов S-аллил-L-цистеина, S-метил-L-цистеина и S-этил-L-цистеина, катализируемом как МГЛ дикого типа, так и ее более эффективной мутантной

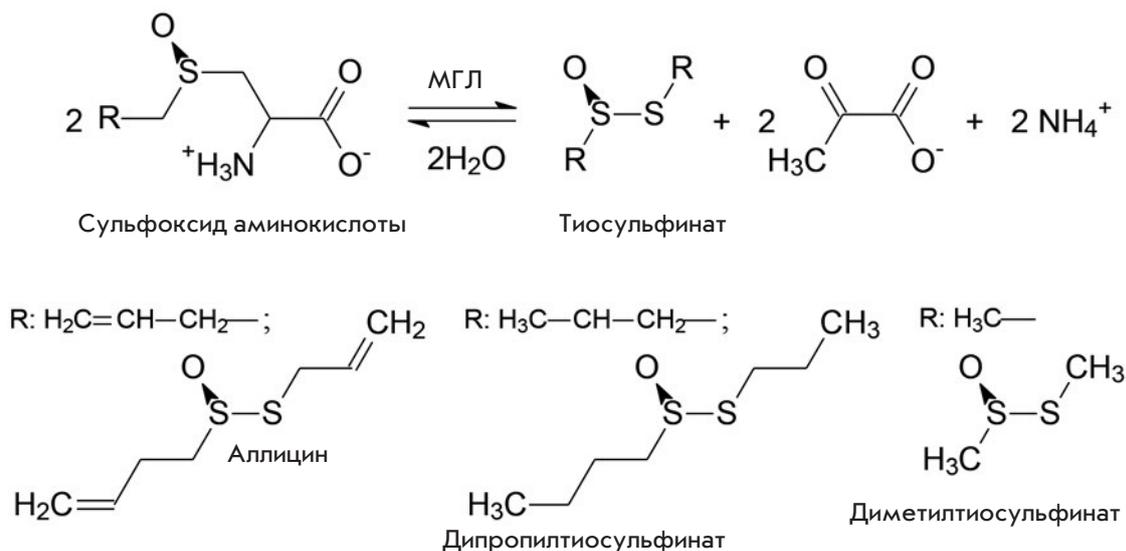


Схема. Реакция β-элиминирования сульфоксидов S-замещенных аналогов L-цистеина

формой С115Н, ингибируют рост грамположительных и грамотрицательных бактерий [6], в том числе *P. aeruginosa*, выделенной из кишечника мышей [7].

Целью данной работы было исследование антибактериального действия тиосульфатов, полученных в реакции β-элиминирования трех сульфоксидов S-замещенных аналогов L-цистеина (схема), катализируемой С115Н МГЛ, на мультирезистентные штаммы грамотрицательных бактерий *Achromobacter ruhlandii* 155В, *B. cenocepacia* 122 и *P. aeruginosa* 48В, выделенных от больных муковисцидозом.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение фермента, определение его активности, синтез сульфоксидов S-замещенных аналогов L-цистеина и получение тиосульфатов проводили как описано ранее [6]. Концентрацию тиосульфатов определяли согласно [8].

Антибактериальную активность тиосульфатов определяли методом двукратных серийных разведений и методом диффузии в агаре.

При определении антибактериальной активности тиосульфатов методом двукратных серийных разведений [9] использовали бульон Мюллера–Хинтона и разведение культур штаммов 10⁵ КОЕ/мл с добавлением препаратов в концентрациях от 1 до 0.0039 мг/мл с последующим высевом на плотную питательную среду (среда № 1 для *P. aeruginosa* 48В и кровяной агар для *A. ruhlandii* 155В и *B. cenocepacia* 122).

Антибактериальную активность препаратов на твердой среде определяли при концентрации от 2 до 0.05 мг/мл путем посева из разведений культур

штаммов от 10⁴ до 10⁷ КОЕ/мл на агар Мюллера–Хинтона диско-диффузионным методом и методом непосредственного нанесения исследуемых образцов в объеме 10 мкл.

Резистентность штаммов к действию стандартных антибиотиков, назначаемых при муковисцидозе, определяли методом серийных разведений согласно клиническим рекомендациям о пограничных значениях МПК для каждого антибиотика [10].

Антибактериальную эффективность тиосульфатов и антибиотиков сравнивали, используя диско-диффузионный метод при высеве из разведений культур штаммов 10⁶ КОЕ/мл на агар Мюллера–Хинтона.

Время инкубации культур на твердой питательной среде во всех экспериментах составляло 24–48 ч.

В работе использовались штаммы *A. ruhlandii* 155В, *B. cenocepacia* 122 и *P. aeruginosa* 48В из коллекции культур лаборатории молекулярной эпидемиологии госпитальных инфекций, НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ, выделенные от больных муковисцидозом.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определяли антибактериальную активность аллицина, диметил- и дипропилтиосульфатов против штаммов *A. ruhlandii* 155В, *B. cenocepacia* 122 и *P. aeruginosa* 48В, выделенных от больных муковисцидозом (табл. 1). Выявлены различия в характере и степени выраженности антимикробного действия тиосульфатов.

Наиболее активными в отношении *B. cenocepacia* 122 и *P. aeruginosa* 48В оказались аллицин и диме-

тилтиосульфидат, дипропилтиосульфидат был менее активным.

Величины МПК и МБК тиосульфидатов при действии на *B. ceposercacia* оказались равными или близкими, что свидетельствует о бактерицидном действии этих двух соединений. Значение МПК аллицина лежит в диапазоне, полученном для коммерческого аллицина против нескольких штаммов *B. seracia complex* (0.008–0.062 мг/мл) [11].

На штамм *P. aeruginosa* 48В тиосульфидаты оказывают бактериостатическое действие, поскольку в исследуемом диапазоне концентраций тиосульфидатов значение МБК (1 мг/мл) определяется только для аллицина. Значения МПК и МБК аллицина для штамма *P. aeruginosa* 48В соответствуют величинам МПК (0.064–0.512 мг/мл) и МБК (0.128–1.024 мг/мл) аллицина против трех клинических штаммов *P. aeruginosa* [12].

Антибактериальное действие тиосульфидатов на штамм *A. ruhlandii* 155В было наименее значимым. Значения МПК, полученные в опыте по определению антибактериальной активности на твердой питательной среде диско-диффузионным методом (табл. 1), составили 2 мг/мл для диметил- и дипропилтиосульфидатов, что превышало максимальную концентрацию, используемую в методе серийных разведений. Наиболее эффективным против *A. ruhlandii* 155В оказался аллицин, обладающий бактерицидным действием в концентрации 1 мг/мл.

Изменение антибактериальной эффективности тиосульфидатов определяли в зависимости от концентрации бактериальных клеток. Эксперимент был проведен диско-диффузионным методом (табл. 2) и методом нанесения образцов на твердую питатель-

Таблица 1. Значения МПК и МБК тиосульфидатов

Бактериальный штамм	Тиосульфидат	МПК	МБК
		мг/мл	
<i>A. ruhlandii</i> 155В	Аллицин	0.50	1
	Диметилтиосульфидат	2.00*	-
	Дипропилтиосульфидат	2.00*	-
<i>B. ceposercacia</i> 122	Аллицин	0.03	≥0.03**
	Диметилтиосульфидат	0.03	≥0.03**
	Дипропилтиосульфидат	0.25	0.5
<i>P. aeruginosa</i> 48В	Аллицин	0.06	1
	Диметилтиосульфидат	0.06	-
	Дипропилтиосульфидат	0.50	-

Примечание. «-» – отсутствие бактерицидного действия.

*Данные получены из эксперимента по определению антибактериальной активности на твердой питательной среде диско-диффузионным методом.

**Но не более 0.06.

ную среду. Результаты, полученные обоими методами, совпали.

Тиосульфидаты в концентрации 2 мг/мл эффективно подавляют рост *A. ruhlandii* 155В и *B. ceposercacia* 122 при концентрации клеток до 10⁷ КОЕ/мл включительно. Антибактериальное действие тиосульфидатов на *P. aeruginosa* 48В выражено слабо. Аллицин в максимальной концентрации незначительно подавляет рост *P. aeruginosa* 48В даже при минимальной концентрации клеток. Интересно, что среди тиосульфидатов только диметилтиосульфидат в концентрации 0.4 мг/мл (табл. 2) подавляет рост *P. aeruginosa*. Результаты, полученные для ал-

Таблица 2. Антибактериальная эффективность тиосульфидатов при различных концентрациях клеток

Бактериальный штамм	Тиосульфидат	Диаметр зон ингибирования (мм) при концентрации клеток, КОЕ/мл							
		10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷	10 ⁴	10 ⁵	10 ⁶	10 ⁷
		и концентрации тиосульфидата*, мг/мл							
		2				0.4			
<i>A. ruhlandii</i> 155В	Аллицин	30	30	30	30	0	0	0	0
	Диметилтиосульфидат	30	30	30	30	0	0	0	0
	Дипропилтиосульфидат	30	30	30	30	0	0	0	0
<i>B. ceposercacia</i> 122	Аллицин	25	25	25	25	0	0	0	0
	Диметилтиосульфидат	25	25	25	25	0	0	0	0
	Дипропилтиосульфидат	20	20	20	20	0	0	0	0
<i>P. aeruginosa</i> 48В	Аллицин	10	0	0	0	0	0	0	0
	Диметилтиосульфидат	15	15	15	15	10	-	-	-
	Дипропилтиосульфидат	15	15	0	0	0	0	0	0

*Концентрации тиосульфидатов 0.2, 0.1 и 0.05 мг/мл в таблице не представлены, так как при этих концентрациях антибактериальный эффект отсутствовал.

Таблица 3. Резистентность (+) бактериальных штаммов к антибиотикам

Штамм	Азтреонам	Амикацин	Гентамицин	Доксициклин	Имипенем	Колистин	Левифлоксацин	Норфлоксацин	Офлоксацин	Тобрамицин	Хлорамфеникол	Цефепим	Цефтаксим	Цефтазидим	Цефтриаксон	Цефуроксим	Ципрофлоксацин
<i>A. ruhlandii</i> 155В	+		+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+	+
<i>B. cenoseracia</i> 122		+	+							+		+		+			+
<i>P. aeruginosa</i> 48В			+				+		+	+	+		+	+	+		+

Таблица 4. Антибактериальная эффективность тиосульфидов и антибиотиков при концентрации клеток 10⁶ КОЕ/мл

Концентрация, мкг/диск	Тиосульфид	Диаметр зоны ингибирования, мм		
		<i>A. ruhlandii</i> 155В	<i>B. cenoseracia</i> 122	<i>P. aeruginosa</i> 48В
20	Аллицин	25	20	0
20	Диметилтиосульфидат	16	30	30
20	Дипропилтиосульфидат	30	5	0
5	Имипенем	0	30	30
10	Тобрамицин	0	0	0
10	Ципрофлоксацин	0	0	0

лицина и диметилтиосульфидата, хорошо соотносятся с данными для *P. aeruginosa* из кишечного тракта мышей [7].

Отсутствие зон задержки роста в опыте на твердой среде при низких концентрациях аллицина и диметилтиосульфидата, вероятно, обусловлено медленной диффузией веществ в агар Мюллера–Хинтона. Таким образом, оптимальным методом определения антибактериальной активности исследуемых тиосульфидов является метод серийных разведений.

Резистентность штаммов *A. ruhlandii* 155В, *B. cenoseracia* 122 и *P. aeruginosa* 48В оценивали с использованием 17 антибиотиков, наиболее часто назначаемых при муковисцидозе (табл. 3). Штамм *A. ruhlandii* 155В оказался резистентным к 16 антибиотикам, штамм *B. cenoseracia* 122 – к шести, а *P. aeruginosa* 48В – к девяти антибиотикам. Полученные данные подтвердили формирование резистентности у этих штаммов после длительной антибиотикотерапии. Примечательно, что ни один из протестированных антибиотиков не оказывал антибактериального действия на все три бактериальных штамма.

Мы сравнили эффективность антибактериального действия тиосульфидов и антибиотиков широкого спектра действия, принадлежащих к трем различным группам, наиболее часто назначаемым при муковисцидозе: имипенема из группы карбапенемов,

тобрамицина из группы аминогликозидов и ципрофлоксацина из группы фторхинолонов (табл. 4). Как и в случае двукратных серийных разведений, при определении антибактериальной активности диско-диффузионным методом на плотной питательной среде три штамма оказались резистентными к тобрамицину и ципрофлоксацину в стандартных концентрациях 10 мкг/диск. Диаметры зон ингибирования имипенема при действии на *B. cenoseracia* 122 и *P. aeruginosa* 48В сравнимы со значениями для диметилтиосульфидата и незначительно больше зоны ингибирования *B. cenoseracia* 122 аллицином. Аллицин и диметилтиосульфидат подавляют рост *A. ruhlandii* 155В, в то время как к действию имипенема данный штамм резистентен.

Полученные данные открывают возможность разработки препаратов для антибактериальной терапии хронической легочной инфекции у больных муковисцидозом. ●

Авторы благодарят НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи Минздрава РФ за возможность проведения экспериментов по определению антимикробной активности препаратов на клинических изолятах.

Работа поддержана грантом РНФ № 15-14-00009.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Шагинян И.А., Капранов Н.И., Чернуха М.Ю., Алексеева Г.В., Семькин С.Ю., Аветисян Л.Р., Каширская Н.Ю., Пивкина Н.В., Данилина Г.А., Батов А.Б., Бусуек Г.П. // Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии. 2009. № 5. С. 15–20.
2. Cavallito C.J., Bailey J.H. // J. Am. Chem. Soc. 1944. V. 66. P. 1950–1951.
3. Rabinkov A., Miron T., Konstantinovski L., Wilchek M., Mirelman D., Weiner L. // Biochim. Biophys. Acta. 1998. V. 1379. P. 233–244.
4. Muller A., Eller J., Albrecht F., Prochnow P., Kuhlmann K., Bandow J.E., Slusarenko A.J., Leichert L.I.O. // J. Biol. Chem. 2016. V. 291. P. 11477–11490.
5. Ankri S., Mirelman D. // Microb. Infect. 1999. V. 2. P. 125–129.
6. Morozova E.A., Kulikova V.V., Rodionov A.N., Revtovich S.V., Anufrieva N.V., Demidkina T.V. // Biochimie. 2016. V. 128–129. P. 92–98.
7. Kulikova V.V., Anufrieva N.V., Revtovich S.V., Chernov A.S., Telegin G.B., Morozova E.A., Demidkina T.V. // IUBMB Life. 2016. V. 68. P. 830–835.
8. Miron T., Rabinkov A., Mirelman D., Weiner L., Wilchek M. // Anal. Biochem. 1998. V. 265. P. 317–325.
9. Миронов А.Н., Бунатян Н.Д., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журавлева М.В., Лепяхин В.К., Коробов Н.В., Меркулов В.А., Орехов С.Н., Сакаева И.В. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. Часть первая. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
10. Клинические рекомендации «Определение чувствительности микроорганизмов к антимикробным препаратам» (версия 2015–02). М.: Межрегиональная ассоциация по клинической микробиологии и антимикробной химиотерапии, 2015.
11. Wallock-Richards D., Doherty C.J., Doherty L., Clarke D.J., Place M., Govan J.R.W., Campopiano D.J. // PLoS One. 2014. V. 9. № 12. e112726.
12. Reiter J., Levina N., van der Linden M., Gruhlke M., Martin C., Slusarenko A.J. // Molecules. 2017. V. 22. P. 1711.

УДК 577.112.6:615.214.31

Дипептидный миметик мозгового нейротрофического фактора обладает свойствами антидепрессанта при пероральном введении

П. Ю. Поварнина*, Т. Л. Гарибова, Т. А. Гудашева, С. Б. Середенин

Научно-исследовательский институт фармакологии им. В.В. Закусова, 125315, Москва, ул. Балтийская, 8

*E-mail: povarnina@gmail.com

Поступила в редакцию 05.07.2017

Принята к печати 06.06.2018

РЕФЕРАТ Участие BDNF в регуляции нейропластичности и нейрогенеза в гиппокампе, нарушение которой лежит в основе патофизиологии депрессии, позволяет рассматривать этот эндогенный белок как перспективный объект для разработки нового поколения антидепрессантов с нейрофизиологически обоснованным механизмом действия. В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова сконструирован и синтезирован низкомолекулярный миметик BDNF ГСБ-106, представляющий собой замещенный димерный дипептид, гексаметилендиамид бис(*N*-моносулцинил-*L*-серил-*L*-лизина). Установлено, что ГСБ-106 активирует специфические для BDNF рецепторы TrkB и их основные пострецепторные сигнальные пути MAPK/ERK и PI3K/AKT. ГСБ-106 проявил выраженную антидепрессивную активность в батарее тестов на грызунах при внутривнутрибрюшинном введении в дозах 0.1–1.0 мг/кг. Поскольку при депрессии предпочтительной является пероральная лекарственная форма, что обусловлено длительностью курса фармакотерапии и проведением ее во внебольничных условиях, нами изучены антидепрессивные свойства ГСБ-106, перорально вводимого в виде фармацевтической субстанции и таблетированной лекарственной формы (ЛФ). В тесте вынужденного плавания по Порсолту проведено сравнительное исследование ГСБ-106 и классического антидепрессанта амитриптилина у крыс. Установлено, что антидепрессивная активность ГСБ-106 сохраняется при пероральном введении и проявляется в дозах 0.5–5.0 мг/кг для фармацевтической субстанции и 0.01–5.0 мг/кг для таблетированной формы. Таблетированная форма была активна в 50 раз более низких дозах, чем фармацевтическая субстанция, и по выраженности эффектов превосходила амитриптилин – «золотой стандарт» антидепрессантов. Таким образом, можно заключить, что как в виде субстанции, так и в виде таблетированной лекарственной формы ГСБ-106 обладает антидепрессивными свойствами, что позволяет рассматривать его в качестве перспективного антидепрессивного лекарственного средства, первого в классе – миметиков BDNF.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ГСБ-106, депрессия, димерный дипептидный миметик BDNF, пероральная лекарственная форма.

ВВЕДЕНИЕ

Экспериментальные и клинические данные свидетельствуют о центральной роли мозгового нейротрофического фактора (brain derived neurotrophic factor, BDNF) в патогенезе депрессии [1]. Проявление антидепрессивных свойств наблюдали в экспериментах при внутримозговом введении BDNF [2–4]. Содержание BDNF снижено в плазме крови больных депрессией, а после лечения антидепрессантами возвращается к нормальным значениям [5]. Кроме того, сниженный уровень BDNF зарегистрирован в гиппокампе людей, страдавших депрессией, а также

у жертв суицида [6, 7]. Научно обосновано предположение, что патогенетическая роль BDNF в депрессии связана с регуляцией нейропластичности и нейрогенеза в гиппокампе [8], нарушение которых считается ведущим этиопатогенетическим фактором заболевания [9].

Очевидно, что BDNF является важным объектом для разработки антидепрессантов с патофизиологически обоснованным механизмом действия.

Физиологические эффекты BDNF, включая регуляцию нейрогенеза и поддержание нейропластичности, опосредованы рецепторами TrkB и основны-

ми путями трансдукции их сигнала – MAPK/ERK и PI3K/AKT [10, 11]. Нами созданы низкомолекулярные соединения, имитирующие бета-изгибы отдельных петлеобразных структур BDNF, и экспериментально доказана селективность вызываемой ими активации пострецепторных каскадов [12, 13]. При этом установлено, что миметики BDNF, селективно активирующие либо PI3K/AKT, либо MAPK/ERK, не обладают антидепрессивной активностью, что доказывает необходимость обоих пострецепторных сигнальных путей для проявления такой активности.

Рассматривая проблему с фармакологических позиций, следует отметить, что клиническое использование нативного BDNF ограничено его неудовлетворительными фармакокинетическими свойствами.

В связи с этим в качестве перспективного антидепрессанта в НИИ фармакологии им. В.В. Закусова отобран дипептид ГСБ-106, миметик бета-изгиба четвертой петли BDNF, представляющий собой гексаметилендиамид бис(N-моносукцинил-L-серил-L-лизина) [14, 15]. Методом Вестерн-блот-анализа установлено, что ГСБ-106 активирует специфические для BDNF рецепторы TrkB и их пострецепторные сигнальные пути MAPK/ERK и PI3K/AKT [12, 16]. ГСБ-106 проявлял выраженную антидепрессивную активность в батарее валидированных фармакологических тестов на грызунах при внутрибрюшинном (в/б) введении в дозах 0.1–1 мг/кг [15, 17]. Предположительно, механизмы антидепрессивного действия ГСБ-106, как и полноразмерного белка, связаны с нейрогенезом и синаптогенезом. Влияние ГСБ-106 на нейрогенез доказано ранее на модели стресса у мышей, вызванного контактом с хищником [18].

Очевидно, что при депрессии предпочтительной является лекарственная форма для приема внутрь, что обусловлено длительностью курса фармакотерапии и ее проведением во внебольничных условиях. Поэтому в настоящем исследовании изучены антидепрессивные свойства ГСБ-106, вводимого перорально в виде как фармацевтической субстанции (ФС), так и созданной в Институте таблетированной лекарственной формы (ЛФ).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Лекарственные средства

ФС ГСБ-106 синтезирована в отделе химии лекарственных средств НИИ фармакологии им. В.В. Закусова как описано ранее [15]. ЛФ ГСБ-106 для перорального применения разработана и произведена в опытно-технологическом отделе НИИ фармакологии им. В.В. Закусова и содержала 1% ФС

ГСБ-106 и 99% наполнителя, состоящего из лактозы, микрокристаллической целлюлозы, сополимера полиэтиленгликоля-поливинилового спирта и стеарата магния.

Амитриптилин в инъекционной ЛФ произведен на Московском эндокринном заводе (Россия).

Животные

Эксперименты выполнены на 188 белых беспородных крысах-самцах массой 240–270 г, полученных в филиале «Столбовая» Научного центра биомедицинских технологий Федерального медико-биологического агентства. Животных содержали в условиях вивария при естественной смене светового режима со свободным доступом к стандартному гранулированному корму и воде в соответствии с СП 2.2.1.3218-14 «Санитарно-эпидемиологические требования к устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник (вивариев)» от 29 августа 2014 г. № 51. Организация и проведение работ осуществлялись в соответствии с приказом Минздрава России № 199 от 01 апреля 2016 г. «Об утверждении правил надлежащей лабораторной практики». Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике НИИ фармакологии им. В.В. Закусова (протокол № 2 от 20 февраля 2017 г.).

Изучение антидепрессивной активности

Антидепрессивную активность ГСБ-106 у крыс определяли в тесте вынужденного плавания по Порсолту [19, 20]. Установка для оценки антидепрессивной активности представляла собой шесть сосудов цилиндрической формы диаметром 20 см и высотой 60 см, разделенных непрозрачными перегородками. Сосуды наполняли водой температурой 22°C на 40 см. Предварительно каждое животное помещали в сосуд с водой на 15 мин, после чего давали обсохнуть и возвращали в домашнюю клетку. Через 24 ч животных помещали в сосуд с водой на 5 мин, в течение которых оценивали время сохранения характерной позы иммобильности (отказ от активно-оборонительного и исследовательского поведения). Поведение животных регистрировали с помощью видеокамеры. Видеозапись эксперимента обрабатывали в полуавтоматическом режиме с помощью программы RealTimer («НПК Открытая Наука»).

Дизайн эксперимента

ФС ГСБ-106 растворяли в дистиллированной воде и вводили крысам ежедневно в течение 14 сут в дозах 0.1; 0.5; 1; 5 и 10 мг/кг перорально в объеме 1 мл/кг. Контрольные животные получали в том же

режиме дистиллированную воду. ЛФ ГСБ-106 суспендировали в 1% растворе крахмала и вводили крысам ежедневно в дозах 0.001; 0.01; 0.05 и 0.1 и 5.0 мг/кг перорально в объеме 1 мл/кг в течение 14 дней. Контрольные животные получали в том же режиме плацебо, представляющее собой суспензию наполнителя ЛФ в 1% растворе крахмала. В качестве препарата сравнения использовали классический трициклический антидепрессант amitриптилин, который разводили в дистиллированной воде и вводили крысам перорально в дозе 5.0 мг/кг [21] в объеме 1.0 мл/кг в течение 14 дней. Контрольным животным вводили дистиллированную воду в том же режиме. Через 24 ч после последнего введения препаратов проводили предварительную посадку крыс в цилиндры с водой для формирования депрессивноподобного состояния, еще через 24 ч осуществляли тестирование.

Статистический анализ

Межгрупповые различия оценивали с помощью *t*-критерия Стьюдента и *U*-теста Манна–Уитни (при сравнении более двух групп использовали поправку Бонферрони). Различия считали статистически значимыми при $p \leq 0.05$. Данные представляли в форме средних и стандартных ошибок среднего.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Антидепрессивная активность ФС ГСБ-106 при пероральном введении

Установлено, что крысы контрольной группы, получавшие дистиллированную воду, при тестировании в условиях вынужденного плавания по Порсолту после периода активности принимали характерную позу иммобильности (отказ от активно-оборонительного поведения) и сохраняли ее, с небольшими перерывами, до конца опыта. Время иммобильности у животных контрольной группы составило в разных экспериментах в среднем от 178 до 216 с. ГСБ-106 в виде ФС в дозах 0.5, 1.0 и 5.0 мг/кг статистически значимо ($p \leq 0.05$) снижал время иммобильности в 1.5, 1.2 и 1.6 раза соответственно по сравнению с контролем (таблица), что указывает на наличие антидепрессивной активности. В дозах 0.1 и 10 мг/кг ГСБ-106 не оказывал антидепрессивного действия, что свидетельствует о дозозависимости эффекта. При этом выраженность эффекта ФС ГСБ-106 в дозе 0.5 мг/кг была сравнима с выраженностью эффекта amitриптилина в дозе 5.0 мг/кг (перорально) (таблица).

Таким образом, установлено, что ГСБ-106 в виде ФС обладает антидепрессивной активностью при пероральном введении в дозе 0.5–5 мг/кг.

Антидепрессивная активность ЛФ ГСБ-106 при пероральном введении

Время иммобильности у крыс контрольной группы, получавших плацебо, составило в двух экспериментах 245.7 и 201 с. ЛФ ГСБ-106 при пероральном введении в дозе 0.01, 0.05, 0.1 и 5.0 мг/кг статистически значимо ($p < 0.01$) снижала время иммобильности у крыс в тесте вынужденного плавания по Порсолту в 1.6, 1.8, 1.5 и 2.2 раза соответственно по сравнению с контролем (таблица). Эффект ЛФ ГСБ-106 был дозозависимым и не проявлялся в дозе 0.001 мг/кг.

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании установлено, что антидепрессивная активность дипептидного миметика BDNF ГСБ-106, выявленная ранее при в/б введении в интервале доз 0.1–1.0 мг/кг, сохранялась при пероральном введении и проявлялась в дозах 0.5–5.0 мг/кг для ФС и 0.01–5.0 мг/кг для ЛФ ГСБ-106. ЛФ ГСБ-106 была активна в 50 раз более низких дозах, чем ФС ГСБ-106, и по выраженности эффектов превосходила amitриптилин – «золотой стандарт» антидепрессантов.

Важно, что активность ГСБ-106 при пероральном введении сравнима с таковой при внутрибрюшинном введении. Такая устойчивость ГСБ-106 в биологических средах обусловлена отсутствием связей-мишеней протеаз, аминоклонидаз и карбоксипептидаз благодаря дипептидной природе, наличию защиты на N- и C-концах соответственно. Это подтверждает перспективность и преимущество использования замещенных дипептидов в качестве пероральных лекарственных средств в сравнении с олигопептидами, которые легко деградируют в желудочно-кишечном тракте и не проникают через гастроинтестинальный барьер. Терапевтические олигопептиды, влияющие на ЦНС, применяются преимущественно в интраназальной форме, а олигопептиды с периферическими эффектами – в инъекционной форме. Однако показано, что дипептидные препараты, например ноотроп Ноопепт (этиловый эфир N-фенилацетил-L-пролилглицина), антипсихотик Дилепт (метиловый эфир N-капроил-L-пролил-L-тирозина) и анксиолитик ГБ-115 (амид N-фенилгексаноил-L-пролил-L-триптофана), сохраняют активность при пероральном введении [22, 23]. Как установлено ранее [24, 25], существуют специфические транспортные системы переноса дипептидов через энтеральную слизистую желудочно-кишечного тракта PEPT-1 и через гематоэнцефалический барьер PEPT-2.

Таким образом, можно заключить, что дипептид ГСБ-106 и его таблетированная лекарственная форма обладают антидепрессивными свойствами, что позволяет рассматривать ГСБ-106 в качестве

Антидепрессивные эффекты перорального введения ГСБ-106 у крыс, определенные в тесте вынужденного плавания по Порсолту

Антидепрессивный эффект ФС ГСБ-106				
Группа	n	Доза, мг/кг	Иммобильность, с	Время иммобильности, снижение по сравнению с контролем, разы
Контроль (вода)	8		177.9 ± 9.3	
Амитриптилин	8	5.0	134.5 ± 10.1*#	1.3
ГСБ-106	8	0.1	184.8 ± 16.6	
	8	0.5	116.9 ± 21.6#	1.5
Контроль (вода)	18		199.2 ± 10.0	
ГСБ-106	18	1.0	163.2 ± 7.9#	1.2
Контроль (вода)	10		216.3 ± 13.8	
ГСБ-106	10	5.0	137.1 ± 12.3*#	1.6
Контроль (вода)	10		190.8 ± 9.8	
ГСБ-106	10	10.0	202.2 ± 14.9	
Антидепрессивный эффект ЛФ ГСБ-106				
Группа	n	Доза, мг/кг	Иммобильность, с	Время иммобильности, снижение по сравнению с контролем, разы
Контроль (плацебо)	10		245.7 ± 13.4	
ГСБ-106	10	0.001	192.5 ± 13.2	
ГСБ-106	10	0.01	155.2 ± 20.3**	1.6
ГСБ-106	10	0.05	134.9 ± 18.8***	1.8
ГСБ-106	10	0.1	165.4 ± 15.1**	1.5
Контроль (плацебо)	10		201.2 ± 12.1	
ГСБ-106	10	1.0	159.9 ± 23.6#	1.3
ГСБ-106	10	5.0	92.8 ± 17.2***	2.2

Примечание. n – количество животных в группе. Данные представлены в виде средних и стандартных ошибок среднего. * – $p \leq 0.05$, ** – $p < 0.01$; *** – $p < 0.001$ по сравнению с контролем (U-тест Манна–Уитни); # – $p \leq 0.05$ по сравнению с контролем (t-критерий Стьюдента).

оригинального антидепрессивного лекарственного средства, первого в классе.

ВЫВОДЫ

Димерный дипептидный миметик BDNF, ГСБ-106, обладает антидепрессивной активностью при пероральном введении. Разработанная лекарственная форма ГСБ-106 превосходит субстанцию как по дозам, так и по выраженности антидепрессивного эффекта.

Результаты настоящего исследования показывают целесообразность создания на основе дипептида

ГСБ-106 лекарственного средства, которое по дипептидной структуре и BDNF-ергическому механизму действия может быть отнесено к первому в классе. ●

Работа выполнена при поддержке гранта Президиума РАН «Изучение роли синаптогенеза и нейрогенеза в механизме антидепрессивной активности мозгового нейротрофического фактора с использованием его дипептидных миметиков – первых в классе потенциальных антидепрессантов» и при поддержке РНФ (проект № 18-15-00381).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Castrén E., Kojima M. // Neurobiol. Dis. 2017. V. 97. Pt B. P. 119–126.
- Shirayama Y., Chen A.C., Nakagawa S., Russell D.S., Duman R.S. // J. Neurosci. 2002. V. 22. № 8. P. 3251–3261.
- Hoshaw B.A., Malberg J.E., Lucki I. // Brain Res. 2005. V. 1037. № 1–2. P. 204–208.
- Hu Y., Russek S.J. // J. Neurochem. 2008. V. 105. № 1. P. 1–17.
- Polyakova M., Stuke K., Schuemberg K., Mueller K., Schoenknecht P., Schroeter M.L. // J. Affect. Disord. 2015. V. 174. P. 432–440.
- Karege F., Vaudan G., Schwald M., Perroud N., La Harpe R. // Mol. Brain Res. 2005. V. 136. № 1–2. P. 29–37.
- Thompson R.M., Weickert C.S., Wyatt E., Webster M.J. // J.

- Psychiatry Neurosci. 2011. V. 36. № 3. P. 195–203.
8. Autry A.E., Monteggia L.M. // *Pharmacol. Rev.* 2012. V. 64. № 2. P. 238–258.
9. Wainwright S.R., Galea L.A. // *Neural Plast.* 2013. V. 2013. P. 805497.
10. Jiang C., Salton R. // *Transl. Neurosci.* 2013. V. 4. № 1. P. 46–58.
11. Islam O., Loo T.X., Heese K. // *Curr. Neurovasc. Res.* 2009. V. 6. № 1. P. 42–53.
12. Gudasheva T.A., Povarnina P., Logvinov I.O., Antipova T.A., Seredenin S.B. // *Drug Des. Dev. Ther.* 2016. V. 10. P. 3545–3553.
13. Gudasheva T.A., Tarasiuk A.V., Sazonova N.M., Povarnina P.Y., Antipova T.A., Seredenin S.B. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2017. V. 476. № 1. P. 291–295.
14. Середенин С.Б., Гудашева Т.А. Патент № 2410392 РФ. 2011.
15. Гудашева Т.А., Тарасюк А.В., Помогайбо С.В., Логвинов И.О., Поварнина П.Ю., Антипова Т.А., Середенин С.Б. // *Биоорган. химия.* 2012. Т. 38. № 3. С. 280–290.
16. Гудашева Т.А., Логвинов И.О., Антипова Т.А., Середенин С.Б. // *Докл. Акад. наук.* 2013. Т. 451. № 5. С. 577–580.
17. Середенин С.Б., Воронина Т.А., Гудашева Т.А., Гарибова Т.Л., Молодавкин Г.М., Литвинова С.А., Елизарова О.А., Посева В.И. // *Acta Naturae.* 2013. Т. 5 № 4(19). С. 116–120.
18. Гудашева Т.А., Поварнина П.Ю., Середенин С.Б. // *Бюл. эксп. биологии и медицины.* 2016. Т. 162. № 10. С. 448–451.
19. Porsolt R.D., Anton G., Blavet N., Jalfre M. // *Eur. J. Pharmacol.* 1978. V. 47. № 4. P. 379–391.
20. Buccafusco J.J. *Methods of Behavior Analysis in Neuroscience*, 2nd edition. Boca Raton (FL): CRC Press/Taylor & Francis, 2009. 360 p.
21. Takamori K., Yoshida S., Okuyama S. // *Pharmacology.* 2001. V. 63. № 3. P. 147–153.
22. Gudasheva T.A. // *Russ. Chem. Bull. Internat. Ed.* 2015. V. 64. № 9. P. 2012–2021.
23. Жердев В.П., Бойко С.С., Шевченко Р.В., Гудашева Т.А. // *Фармакокинетика и фармакодинамика.* 2017. № 1. С. 3–10.
24. Sala-Rabanal M., Loo D.D., Hirayama B.A., Turk E., Wright E.M. // *J. Physiol.* 2006. V. 574. Pt 1. P. 149–166.
25. Ganapathy M.E., Prasad P.D., Mackenzie B., Ganapathy V., Leibach F.H. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1997. V. 1324. № 2. P. 296–308.

УДК 576.52:57.085.23:616-006.66

Новый подход к противоопухолевой терапии: направленная доставка HSP70 к поверхности раковых клеток с помощью супрамолекулярных конструкций на основе пары барстар:барназа

А. М. Сапожников*, А. В. Клинова, О. А. Шустова, М. В. Гречихина, М. С. Килячус, О. А. Стрёмовский, Е. И. Коваленко, С. М. Деев

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: amsap@ibch.ru

Поступила в редакцию 20.06.2018

Принята к печати 25.08.2018

РЕФЕРАТ Одним из принципиальных отличий многих типов опухолевых клеток от клеток нормальных тканей является транслокация на поверхность плазматической мембраны ряда внутриклеточных протеинов, в частности белка теплового шока 70 кДа (HSP70). Продемонстрировано, что такая необычная поверхностная локализация HSP70 распознается цитотоксическими эффекторами иммунной системы и приводит к усилению их цитолитического действия на данные клетки-мишени. Механизмы этого взаимодействия до конца не раскрыты, однако феномен поверхностной локализации HSP70 на раковых клетках может быть использован для разработки новых подходов к противоопухолевой иммунотерапии. В то же время известно, что присутствие HSP70 на клеточной поверхности не является универсальным признаком раковых клеток. Многие разновидности опухолевых тканей не экспрессируют мембрано-ассоциированные HSP70, что ограничивает потенциальные клинические возможности указанных подходов. В связи с этим в качестве одного из перспективных направлений противоопухолевой иммунотерапии можно рассматривать направленную доставку на поверхность раковых клеток экзогенных HSP70 с целью привлечения и активации цитотоксических эффекторов иммунной системы. Для осуществления адресной доставки HSP70 в опухолевые ткани можно использовать молекулярные конструкции, содержащие рекомбинантные мини-антитела к опухолеассоциированным антигенам, в частности, к HER2/neu-антигену и другим маркерам, высоко экспрессирующимся на поверхности широкого спектра раковых клеток. С целью оценки возможности и эффективности применения указанного подхода, в данном исследовании были созданы двухмодульные рекомбинантные конструкции, содержащие в первом модуле мини-антитела к HER2/neu-антигену, а во втором модуле – молекулу HSP70 или ее фрагмент. Избирательное взаимодействие белковых модулей обеспечивалось состыковочным звеном, образуемым входящей в состав молекулярной конструкции парой барназа:барстар – гетеродимером с уникально высокой константой взаимодействия. Результаты, полученные при тестировании указанных препаратов в моделях *in vitro*, продемонстрировали селективное связывание разработанных конструкций с опухолевыми клетками, экспрессирующими HER2/neu-антиген, и достоверное стимулирующее действие этих препаратов на цитотоксическую активность клеток-эффекторов иммунной системы по отношению к соответствующим клеткам-мишеням.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА барназа:барстар, белок теплового шока 70 кДа, иммунотерапия рака, мини-антитела, НК-клетки, направленная доставка, HER2/neu-антиген.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ HSP70 – белок теплового шока 70 кДа; Hsp70 – индуцируемая форма HSP70 человека; Hsp70/16 – С-концевой фрагмент Hsp70 с молекулярной массой 16 кДа; 4D5 scFv – анти-HER2/neu мини-антитела.

ВВЕДЕНИЕ

Поиск новых подходов к иммунотерапии рака, несмотря на огромное число исследований в этой области, по-прежнему остается актуальной задачей [1–3]. Хорошо известно, что одна из причин появления и развития в организме злокачественных новообразований связана с отсутствием на поверхности опухолевых клеток антигенов, активирующих цитотоксические эффекторы системы иммунологического надзора, ответственные за элиминацию трансформированных клеток. В связи с этим одним из перспективных подходов к противоопухолевой иммунотерапии является направленная модификация поверхности опухолевых клеток молекулярными структурами, распознающимися клетками-киллерами и индуцирующими их цитолитическую реакцию. В последние годы было показано, что к числу таких структур относятся белки теплового шока (heat shock proteins, HSP) с молекулярной массой 70 кДа (HSP70).

Семейство белков теплового шока включает в себя широкий спектр высококонсервативных внутриклеточных протеинов, характеризующихся как гетерогенностью физико-химических свойств, так и разнообразием функций. HSP экспрессируются в клетках всех типов, причем уровень этой экспрессии увеличивается во много раз под действием различных повреждающих агентов. Увеличение внутриклеточного содержания HSP является универсальной защитной реакцией клеток, связанной с уникальной способностью данных белков предотвращать индуцированную стрессом агрегацию внутриклеточных протеинов, их денатурацию, обеспечивать репарацию частично поврежденных протеинов или их корректную утилизацию в случае необратимых повреждений. Перечисленные функции, а также участие в процессах фолдинга вновь синтезируемых полипептидов и транспорта внутриклеточных протеинов относят к так называемым «шаперонным» свойствам конститутивного пула HSP, экспрессирующегося в клетках в нормальных физиологических условиях, в отсутствие стресса [4, 5]. Однако локализация HSP не ограничивается внутриклеточным пространством. В большой серии работ было зарегистрировано присутствие этих протеинов на клеточной поверхности. Так, поверхностные HSP обнаружены на плазматической мембране нормальных [6, 7] и опухолевых клеток [8–14], вирус-инфицированных лимфоцитов [15] и Т-клеток, погибающих по программе апоптоза [16–18]. В этих работах было показано, что на клеточной поверхности экспрессируются HSP с различной молекулярной массой, однако наиболее типичны для поверхностной локализации HSP с молекулярной массой 70 кДа (HSP70). Феномен необыч-

ной поверхностной экспрессии HSP описан не только для клеток, культивируемых *in vitro*, но и для клеток различных тканей, полученных от пациентов [12, 14].

Функции HSP, экспонированных на клеточной поверхности, практически не изучены. Вместе с тем было высказано обоснованное предположение об иммунологической значимости этих поверхностных протеинов, заключающееся в том, что их появление на плазматической мембране может служить сигналом для иммунной системы, активирующей цитотоксические эффекторы и обеспечивающей элиминацию инфицированных, трансформированных и поврежденных клеток [19]. Это обстоятельство позволяет рассматривать HSP как поверхностные маркеры, вовлеченные в систему иммунологического надзора. Действительно, в настоящее время хорошо известно, что различные субпопуляции Т-лимфоцитов и NK-клеток способны распознавать высококонсервативные детерминанты различных HSP. В частности, мембранные HSP70 и Grp75 могут распознаваться $\gamma\delta$ -Т-клетками нерестриктированно по молекулам главного комплекса гистосовместимости [20], а индуцируемая форма HSP70 – Hsp70 нерестриктированно распознается NK-клетками [21, 22]. Поверхностные HSP опухолевых клеток привлекают NK-клетки, количество которых в опухолях, экспрессирующих эти протеины на своей поверхности, может увеличиваться в 500 раз [23]. Литературные данные свидетельствуют о МНС класса I-нерестриктированном распознавании *in vitro* Hsp70 человеческими NK-клетками на поверхности клеток эритролейкемической линии K562 и человеческой саркомы, подвергнутых тепловому шоку [24]. Вместе с тем показано, что поверхностные HSP70 вызывают выраженный гуморальный и клеточный ответ системы адаптивного иммунитета. В ряде работ было продемонстрировано, что HSP70 можно отнести к опухолеассоциированным антигенам, распознаваемым различными типами Т-лимфоцитов, например CD4⁺ CD8⁻ [25], $\alpha\beta$ - и $\gamma\delta$ -лимфоцитами [26, 27], а также естественными киллерами (NK-клетками) [10, 11, 21]. Зарегистрированное в этих работах распознавание как конститутивной, так и индуцируемой форм HSP70, МНС-рестриктированными и нерестриктированными Т-лимфоцитами свидетельствует о важной роли поверхностных HSP70 в противоопухолевых иммунных реакциях. Основываясь на этом, была предложена модель иммунологического надзора, в которой указанные лимфоциты обеспечивают первую линию защиты от инфекционных агентов, несущих на своей поверхности HSP, защиты от вирус-инфицированных и трансформированных клеток, а также от поврежденных аутологических клеток. Пул лимфоцитов, распознающих консервативные HSP,

возможно, индуцируется в онтогенезе во время развития естественной микрофлоры кожи и кишечника. Периодическая реактивация таких лимфоцитов может быть обусловлена обычными вирусными и бактериальными инфекциями, равно как и различными стрессорирующими стимулами [19].

Применение HSP70 для противоопухолевой терапии давно привлекает внимание исследователей, использующих разнообразные подходы к данной проблеме [28–32]. Однако большинство этих подходов основаны на способности HSP70 образовывать прочные комплексы с опухолеспецифичными пептидами, а не на прямом распознавании цитотоксическими эффекторами иммунной системы мембрано-ассоциированных HSP70. Возможно, это связано с тем, что экспрессия этих протеинов на раковых клетках *in vivo* наблюдается не во всех типах опухолевых тканей. Данное обстоятельство служит основанием для предположения, что индукция транлокации HSP70 на поверхность опухолевых клеток или направленная доставка в злокачественные новообразования таких молекул с целью привлечения и активации цитотоксических эффекторов иммунной системы является новым перспективным направлением для противоопухолевой иммунотерапии [33].

В недавних исследованиях ряда авторов и в наших предварительных экспериментах было установлено, что активирующим влиянием на натуральные киллеры обладают не только полноразмерные молекулы HSP70, но и синтетические аналоги некоторых фрагментов HSP70. В частности, внесение синтетических фрагментов HSP70 в культуру NK-клеток человека, как и в опытах с рекомбинантным HSP70, существенно стимулирует продукцию клетками-киллерами интерферона гамма [34, 35]. Таким образом, молекулы HSP70 и фрагменты этого протеина можно рассматривать как перспективные структуры для биоинженерного создания молекулярных конструкций, предназначенных для направленной модификации поверхности опухолевых клеток с целью усиления противоопухолевого цитотоксического иммунного ответа. Адресная доставка подобных «цитолитических маркеров» может осуществляться с помощью включения в разрабатываемые рекомбинантные конструкции модуля рекомбинантных мини-антител (не вызывающих прямой цитотоксической реакции иммунной системы) к опухолеспецифическим антигенам, в частности, антител к HER2/neu-антигену (p185^{HER2}) и другим раковым маркерам, экспрессирующимся на поверхности широкого спектра злокачественных новообразований.

Данное исследование было направлено на разработку способа адресной HER-2/neu направленной доставки HSP70 или фрагмента этой молекулы

к поверхности опухолевых клеток с помощью двухмодульной конструкции с использованием пары барназа:барстар в качестве состыковочного звена белковых модулей. В указанной конструкции функция первого модуля, имеющего в своем составе высокоспецифичное противораковое мини-антитело и барназу, заключается в прицельном связывании с поверхностью раковых клеток. В свою очередь, экспонированная на опухолевых клетках в результате этого взаимодействия барназа служит сайтом селективного связывания с клетками-мишенями второго модуля, составленного из барстара и HSP70 (или его фрагмента). Избирательное взаимодействие первого и второго модулей в разрабатываемом подходе обеспечивается уникально высокой константой связывания барстара с барназой; этот белковый гетеродимер образует комплекс с $K_d \sim 10^{-14}$ М, сравнимый только со стрептавидин-биотиновой системой ($K_d \sim 10^{-15}$ М). В ходе наших предыдущих исследований была доказана перспективность применения комплекса барназа:барстар для адресной доставки различных препаратов к раковым клеткам [36–39].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Принципы создания двухмодульных молекулярных конструкций для адресной доставки HSP70 к опухолевым клеткам

Для создания надмолекулярного комплекса, содержащего белок HSP70 и адресующее мини-антитело, с помощью модуля барназа:барстар необходимо было присоединить HSP70 к одному из компонентов модуля – барстару. Из экспериментальных данных [10] известно, что за стимуляцию цитотоксической и пролиферативной активности NK-клеток отвечает С-концевой домен HSP70. Поэтому в конструируемом рекомбинантном белке необходимо было оставить С-конец HSP70 свободным и доступным для взаимодействия с естественными киллерами, а барстар присоединять к N-концу с помощью гибкого линкерного пептида, обеспечивающего свободу вращения функциональных доменов в целевом рекомбинантном белке. На основе этих теоретических предпосылок была сконструирована плазмида, кодирующая целевой рекомбинантный белок His₆-барстар-HSP70, представляющий собой белок HSP70 (индуцируемая форма HSP70 человека – Hsp70), соединенный N-концом с барстаром через шарнирный пептид иммуноглобулина IgG3 человека (ThrProLeuGlyAspThrThrHisThrSerGly) и содержащий гексагистидиновый хвост на N-конце (рис. 1). Аналогичные процедуры были проведены для получения второй разновидности эффекторного модуля, содержащего в своем составе не полноразмерную

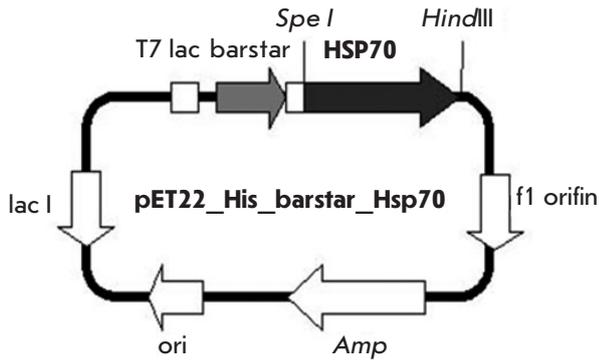


Рис. 1. Схема плазмиды pET22_His_barstar_Hsp70, кодирующей второй модуль молекулярной конструкции, содержащий эффекторный белок Hsp70. T7 lac – ранний промотор РНК-полимеразы фага T7, HSP70 – ген *Hsp70*, Amp – ген устойчивости к антибиотик ампициллину

молекулу Hsp70, а ее С-концевой фрагмент с молекулярной массой 16 кДа – His₆-барстар-Hsp70/16. В качестве первого, направляющего, модуля с адресными анти-HER2/neu мини-антителами в работе использовалась созданная ранее конструкция 4D5 scFv-дибарназа [36].

Культуры опухолевых клеток-мишеней

В качестве клеток-мишеней, обрабатываемых разработанными конструкциями, были выбраны клетки аденокарциномы яичника SKOV3 и клетки карциномы молочной железы человека BT 474, сверхэкспрессирующие HER-2/neu-антиген. Клетки культивировали в 6-луночных планшетах (Nunk, США) и в культуральных флаконах (25 см², Costar, США) в питательной среде RPMI 1640 (Flow Laboratories, Великобритания), содержащей 10% фетальной сыворотки теленка (FCS), 50 мкг/мл стрептомицина («Синтез», Россия) и 50 мкг/мл пенициллина («Биосинтез», Россия) в 5% CO₂ при +37°C. Адгезионные клетки, прикрепляющиеся к подложке флаконов для культивирования, снимали с подложки раствором Версена. В качестве контроля использовали клетки линии HEK-293 – клетки эмбриональной почки, культивируемые в таких же условиях.

Проверку уровня экспрессии опухолеспецифического антигена HER-2/neu на поверхности культивируемых клеточных линий проводили с помощью флуоресцентной микроскопии и ранее созданных нами рекомбинантных конструкций для визуализации раковых клеток, экспрессирующих антиген HER-2/neu (анти-HER2/neu-мини-антитело-барстар•GFP – барназа) [36, 37]. В результате было продемонстриро-

вано, что образцы используемых клеточных культур характеризуются необходимым высоким уровнем экспрессии поверхностного антигена HER-2/neu (данные не приведены).

Обработка клеток-мишеней тестируемыми конструкциями

Доставку Hsp70 и его фрагмента Hsp70/16 к опухолевым клеткам осуществляли в составе рекомбинантных белков барстар-Hsp70 и барстар-Hsp70/16. Первым этапом адресной доставки являлось связывание анти-HER2/neu-мини-антитела (белок 4D5 scFv), входящего в состав первого модуля разработанного надмолекулярного комплекса, с соответствующим опухолеспецифическим антигеном на клеточной поверхности (20 мкг/мл, 60 мин). Затем за счет взаимодействия барназа-барстар рекомбинантные белки барстар-Hsp70 и барстар-Hsp70/16 также прочно адсорбировались на клеточной мембране (50 мкг/мл, 60 мин).

Оценка эффективности связывания разработанных конструкций с клетками-мишенями

Для оценки эффективности адресной доставки белка теплового шока на поверхность клеток-мишеней применяли метод проточной цитофлуориметрии. Окрашивание образцов клеток, провзаимодействовавших с первым и вторым модулями разработанного надмолекулярного комплекса, проводили по стандартной методике [14]. В работе использовали антитела BRM22 к С-концу HSP70 и вторые антитела – anti-mouse IgG-FITC (Sigma, США). Измерения проводили на проточном лазерном цитофлуориметре FACSscan (Becton Dickinson, США). В каждом образце анализировали не менее 10000 клеток. Статистический анализ проводили с использованием компьютерной программы WinMDI для обработки гистограмм, полученных во время цитофлуориметрического анализа.

В опытах по визуализации адресной доставки Hsp70 и его фрагмента Hsp70/16 на поверхность опухолевых клеток-мишеней была использована лазерная конфокальная микроскопия. В этих экспериментах клетки-мишени, последовательно обработанные первым и вторым модулями разработанных конструкций, окрашивали по стандартной методике анти-HSP70-антителами и вторыми антителами, конъюгированными с флуорохромом AF488 (Molecular Probes, США). Полученный после центрифугирования осадок этих клеток помещали на предметное стекло с последующим нанесением специальной полимеризующейся гелеобразной среды Mowiol, сохраняющей морфологию клеток и предохраняю-

щей флуорохром от выгорания (Biomed, США), накрывали покровным стеклом и оставляли в темноте до микроскопического анализа. Фотографирование клеток проводили на конфокальном микроскопе ECLIPSE TE2000-E (Nikon, Япония).

Оценка влияния обработки опухолевых клеток разработанными конструкциями на цитотоксическую активность НК-клеток по отношению к этим клеткам-мишеням

В серии экспериментов *in vitro*, направленных на анализ противоопухолевого эффекта разработанных конструкций, в качестве цитотоксических клеток-эффекторов использовали НК-клетки, выделенные из периферической крови человека. Для изоляции НК-клеток из фракции мононуклеаров, полученной с помощью седиментации донорской крови на градиенте плотности, использовали метод магнитной сепарации с применением набора для выделения НК-клеток (MACS NK cell isolation kit II, Miltenyi Biotec, Германия). Оценку уровня цитотоксичности, опосредованной НК-клетками, проводили с помощью нерадиоактивной тест-системы CytoTox96 (Promega, США), основанной на количественном определении выхода лактатдегидрогеназы (ЛДГ) из клеток-мишеней, обусловленного цитолитическим действием естественных киллеров на опухолевые клетки. Эксперименты проводили в соответствии с протоколом компании-производителя тест-системы. Каждую экспериментальную точку повторяли в трех репликах. НК-клетки вносили в лунки в соотношении 7:1 к клеткам-мишеням. В качестве мишеней использовали клетки линии BT 474, внесенные в лунки за 4 ч до эксперимента с последующей их обработкой тестируемыми рекомбинантными конструкциями. На каждом этапе описываемой процедуры после внесения в лунки компонентов надмолекулярного комплекса и последующей инкубации клеток-мишеней в их присутствии (30 мин при 4°C) клетки осаждали на центрифуге с последующим удалением супернатанта и отмывкой лунок от несвязавшихся рекомбинантных протеинов.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведенный цитофлуориметрический анализ продемонстрировал эффективность использования разработанных конструкций для доставки Hsp70 и Hsp70/16 на поверхность опухолевых клеток-мишеней. В опытах, проведенных с линиями клеток BT 474 и SKOV3, были получены аналогичные данные, характеризующие связывание Hsp70 и Hsp70/16 с клеточной поверхностью. Поэтому ниже представлены результаты взаимодействия разработанных конструкций с клеточной линией BT 474.

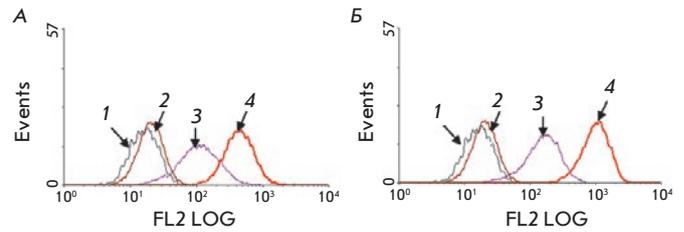


Рис. 2. Цитофлуориметрический анализ связывания комплекса 4D5 scFv-дибарназа – барстар-Hsp70 (А) и 4D5 scFv-дибарназа – барстар-Hsp70/16 (Б) с поверхностью клеток BT 474. Клетки инкубировали с компонентами конструкций, затем образцы окрашивали по стандартной методике первыми (BRM22) и вторыми антителами, мечеными флуорохромом FITC. По оси абсцисс – интенсивность флуоресценции, по оси ординат – количество событий. 1 – контроль: аутофлуоресценция; 2 – контроль: 4D5 scFv-дибарназа; 3 – контроль: барстар-Hsp70 (А) или барстар-Hsp70/16 (Б); 4 – 4D5 scFv-дибарназа – барстар-Hsp70 (А) или барстар-Hsp70/16 (Б)

Было продемонстрировано, что компоненты надмолекулярной структуры 4D5 scFv-дибарназа – барстар-Hsp70(Hsp70/16) эффективно связываются с поверхностью клеток: 4D5 scFv-дибарназа с антигеном p185^{HER2}, а затем барстар-Hsp70(Hsp70/16) взаимодействует с 4D5 scFv-дибарназой (рис. 2). Кроме этого, наши данные свидетельствуют о способности белков барстар-Hsp70 и барстар-Hsp70/16 самостоятельно взаимодействовать с клеточной мембраной, что приводит к смещению пиков на гистограммах соответствующих контрольных образцов в область повышенного уровня флуоресценции. По литературным данным, некоторые типы опухолевых клеток способны адсорбировать на своей поверхности экзогенные HSP70 [15, 16].

Клетки линии BT 474 экспрессируют антиген p185^{HER2}, к которому направлено мини-антитело первого модуля. В качестве контроля на неспецифическое связывание 4D5 scFv-дибарназы с поверхностью клеток использовали линию эмбриональных клеток почки HEK-293. Результаты цитофлуориметрического анализа показали отсутствие неспецифического связывания с клеточной мембраной как первого модуля (4D5 scFv-дибарназа), так и второго (барстар-Hsp70(Hsp70/16)) (данные не приведены).

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют о том, что использование системы барназа – барстар обеспечивает высокоспецифичную и эффективную доставку конструкций, содержащих Hsp70 или его С-концевой фрагмент, на поверх-

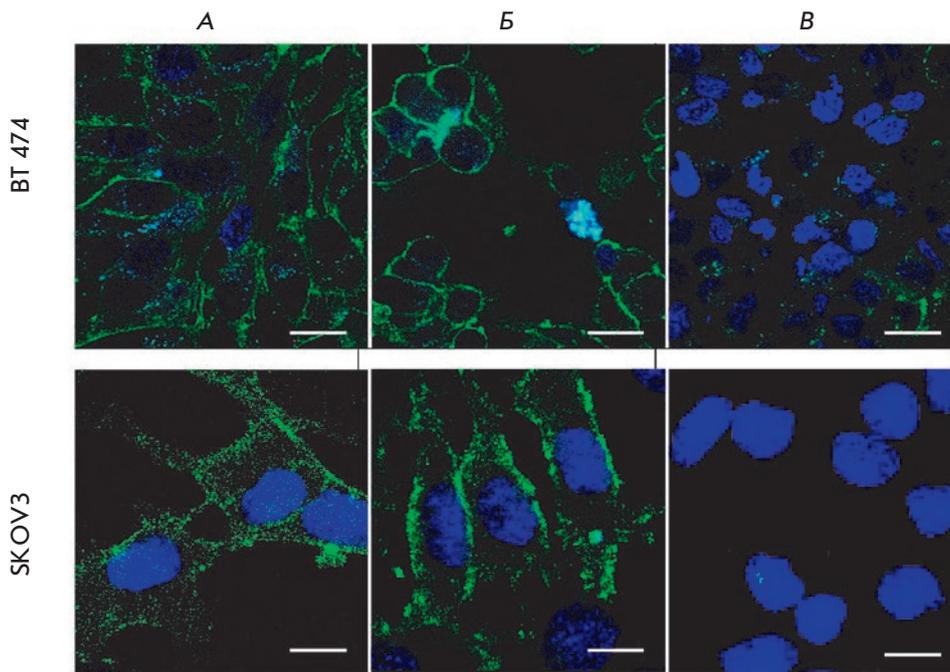


Рис. 3. Визуализация комплекса 4D5 scFv-дибарназа – барстар-Hsp70 (А) и 4D5 scFv-дибарназа – барстар-Hsp70/16 (Б) на поверхности клеток BT 474 (верхний ряд) и SKOV3 (нижний ряд). Клетки последовательно инкубировали с компонентами комплексов, затем образцы окрашивали антителами по стандартной методике. Первые антитела – BRM22 к С-домену HSP70, вторые – антитела, меченные флуорохромом Alexa Fluor 488. Ядра клеток окрашены DAPI. В – контроль: клетки окрашены вторыми антителами. Размер масштабной шкалы – 10 мкм

ность опухолевых клеток, экспрессирующих маркер HER2/neu.

С целью визуализации эффективности использования разработанных конструкций для адресной доставки Hsp70 и фрагмента этой молекулы Hsp70/16 на поверхность клеток BT 474 и SKOV3 была использована лазерная конфокальная микроскопия. Клетки-мишени, последовательно обработанные первым и вторым модулями разработанных конструкций, окрашивали по стандартной методике анти-HSP70-антителами и вторыми антителами, конъюгированными с флуорохромом AF488. Уровень флуоресцентного окрашивания клеток анализировали на конфокальном микроскопе ECLIPSE TE2000-E. Полученные результаты подтвердили присутствие Hsp70 и Hsp70/16 на поверхности обработанных клеток-мишеней (рис. 3).

Влияние разработанных конструкций на активацию цитотоксических эффекторов иммунной системы проводили в *in vitro* модели взаимодействия НК-клеток с опухолевыми клетками-мишенями. В качестве мишеней использовали клетки линии BT 474. Оценка взаимодействия клеток-эффекторов с клетками-мишенями в этой модели показала, что адресная доставка как молекул Hsp70, так и Hsp70/16 к поверхности опухолевых клеток значительно увеличивает противоопухолевый цитолитический эффект НК-клеток. В наших экспериментах адресная доставка к клеткам линии BT 474 полноразмерной молекулы Hsp70 приводила к усилению цитолитического действия НК-клеток

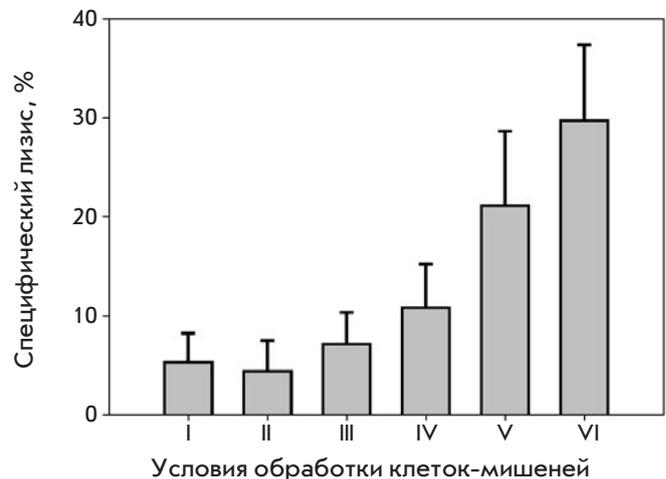


Рис. 4. Сравнение влияния обработки клеток-мишеней рекомбинантными конструкциями, содержащими Hsp70 и Hsp70/16, на цитолитическую активность НК-клеток. Условия обработки: I – контроль (без обработки); II – 4D5 scFv-дибарназа; III – барстар-Hsp70/16; IV – барстар-Hsp70; V – 4D5 scFv-дибарназа + барстар-Hsp70/16; VI – 4D5 scFv-дибарназа + барстар-Hsp70

более чем в 5 раз, а доставка Hsp70/16 – С-концевого фрагмента этой молекулы – более чем в 4 раза. Обработка клеток-мишеней отдельными составляющими разработанного надмолекулярного комплекса («нацеливающий» модуль – 4D5 scFv-барназа и «эф-

факторные» модули – барстар-Hsp70 и барстар-Hsp70/16) не оказывала существенного влияния на цитолитическое действие НК-клеток. Полученные результаты представлены на рис. 4.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование продемонстрировало эффективность разработанной нами двухмодульной молекулярной конструкции для адресной доставки к опухолевым клеткам-мишеням белка теплового шока Hsp70 и его С-концевого фрагмента – молекул, активирующих цитотоксические эффекторы иммун-

ной системы. Предлагаемый подход может стать основой для создания новых препаратов для противоопухолевой иммунотерапии. ●

Работа поддержана грантом РФФ № 14-24-00106 (конструирование генов и получение рекомбинантных белков) и программой Президиума РАН «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий» (исследование цитотоксической активности клеток-эффекторов иммунной системы).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shilova O.N., Shilov E.S., Lieber A., Deyev S.M. // J. Control Release. 2018. V. 286. P. 125–136. doi: 10.1016/j.jconrel.2018.07.030.
- Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. // Russian Chemical Reviews. 2015. V. 84. № 1. P. 1–26.
- Polanovski O.L., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // Biochemistry (Moscow). 2012. V. 77. № 3. P. 227–245.
- Craig E.A., Weissman J.S., Horwich A.L. // Cell. 1994. V. 78. P. 365–372.
- Hartl F.U. // Nature. 1996. V. 381. P. 571–580.
- Erkeller-Yeksel F.M., Isenberg D.A., Dhillon V.B., Latchman D.S., Lydyard P.M. // J. Autoimmun. 1992. V. 5. P. 803–814.
- Ishiyama T., Koike M., Akimoto Y., Fukuchi K., Watanabe K., Yoshida M., Wakabayashi Y., Tsuruoka N. // Clin. Exp. Immunol. 1996. V. 106. P. 351–356.
- Ferrarini M., Heltai S., Zocchi M.R., Rugarli C. // Int. J. Cancer. 1992. V. 51. P. 613–619.
- Altmeyer A., Maki R.G., Feldweg A.M., Heike M., Protopopov V.P., Masur S.K., Srivastava P.K. // Int. J. Cancer. 1996. V. 69. P. 340–349.
- Multhoff G., Hightower L.E. // Cell Stress Chaperones. 1996. V. 1. P. 167–176.
- Multhoff G., Botzler C., Jennen L., Schmidt J., Ellwart J., Issels R. // J. Immunol. 1997. V. 158. P. 4341–4350.
- Rogias J., Wallen E.S., Loening S.A., Moseley P.L. // Adv. Exp. Med. Biol. 1998. V. 451. P. 225–229.
- Sapozhnikov A.M., Ponomarev E.D., Tarasenko T.N., Telford W.G. // Cell Prolif. 1999. V. 32. P. 363–378.
- Hantschel M., Pfister K., Jordan A., Scholz R., Andreesen R., Schmitz G., Schmetzer H., Hiddenman W., Multhoff G. // Cell Stress Chaperones. 2000. V. 5. P. 438–442.
- Di Cesare S., Poccia F., Mastino A., Colizzi V. // Immunology. 1992. V. 76. P. 341–343.
- Poccia F., Piselli P., Vendetti S., Bach S., Amendola A., Placido R., Colizzi V. // Immunology. 1996. V. 88. P. 6–12.
- Sapozhnikov A.M., Gusarova G.A., Ponomarev E.D., Telford W.G. // Cell Proliferation. 2002. V. 35. P. 193–206.
- Tórk Z., Horváth I., Goloubinoff P., Kovács E., Glatz A., Balogh G., Vígh L. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1997. V. 94. P. 2192–2197.
- Multhoff G., Botzler C., Issels R. // Biol. Chem. 1998. V. 379. P. 295–300.
- Breloer M., Fleischer B., Bonin A. // J. Immunol. 1999. V. 162. P. 3141–3147.
- Multhoff G., Botzler C., Wiesnet M., Eissner G., Issels R. // Blood. 1995. V. 86. P. 1374–1382.
- Ponomarev E.D., Tarasenko T.N., Sapozhnikov A.M. // Immunol. Lett. 2000. V. 74. P. 133–139.
- Hightower L.E., Hendershot L.M. // Cell Stress Chaperones. 1997. V. 2. P. 1–11.
- Multhoff G. // Int. J. Hyperthermia. 1997. V. 13. P. 39–48.
- Tamura Y., Tsuboi N., Sato N., Kikuchi K. // J. Immunol. 1993. V. 151. P. 5516–5524.
- Menoret A., Patry Y., Burg C., Le Pendu J. // J. Immunol. 1995. V. 155. P. 740–747.
- Wei Y-g., Zhao X., Karuya Y., Fukata H., Teshigawara K., Uchida A. // Cancer Res. 1996. V. 56. P. 1104–1110.
- Srivastava P.K., Amato R.J. // Vaccine. 2001. V. 19. P. 2590–2597.
- Sashchenko L.P., Dukhanina E.A., Yashin D.V., Shatalov Y.V., Romanova E.A., Korobko E.V., Demin A.V., Lukyanova T.I., Kabanova O.D., Khaidukov S.V., Kiselev S.L., Gabibov A.G., Gnuchev N.V., Georgiev G.P. // J. Biol. Chem. 2004. V. 279. P. 2117–2124.
- Shevtsov M.A., Komarova E.Y., Meshalkina D.A., Bychkova N.V., Aksenov N.D., Abkin S.V., Margulis B.A., Guzhova I.V. // Oncotarget. 2014. V. 5. P. 3101–3114.
- Yuan J., Kashiwagi S., Reeves P., Nezivar J., Yang Y., Arrifin N.H., Nguyen M., Jean-Mary G., Tong X., Uppal P., et al. // J. Hematol. and Oncol. 2014. V. 7. P. 15.
- Yashin D.V., Ivanova O.K., Soshnikova N.V., Sheludchenkov A.A., Romanova E.A., Dukhanina E.A., Tonevitsky A.G., Gnuchev N.V., Gabibov A.G., Georgiev G.P., Sashchenko L.P. // J. Biol. Chem. 2015. V. 290. P. 21724–21731.
- Guzhova I.V., Margulis B.A. // Hum. Vaccin. Immunother. 2016. V. 12. P. 2529–2535.
- Kovalenko E.I., Vlaskin P.A., Kanevskii L.M., Strel'nikova Y.I., Sapozhnikov A.M. // Dokl. Biol. Sci. 2006. V. 406. P. 4–6.
- Multhoff G., Pfister K., Gehrmann M., Hantschel M., Gross C., Hafner M., Hiddemann W. // Cell Stress Chaperones. 2001. V. 6. P. 337–344.
- Deyev S.M., Waibel R., Lebedenko E.N., Schubiger A.P., Plückthun A. // Nature Biotechnology. 2003. V. 21. P. 1486–1492.
- Shipunova V.O., Zelepukin I.V., Stremovskiy O.A., Nikitin M.P., Care A., Sunna A., Zvyagin A.V., Deyev S.M. // ACS Appl. Mater. Interfaces. 2018. V. 10. № 20. P. 17437–17447. doi: 10.1021/acsami.8b01627
- Martsev S.P., Chumanevich A.A., Vlasov A.P., Dubnovitsky A.P., Tsybovsky Y.I., Kravchuk Z.I., Cozzi A., Arosio P., Deyev S.M. // Biochemistry. 2000. V. 39. № 27. P. 8047–8057.
- Generalova A.N., Sizova S.V., Zdobnova T.A., Zarifullina M.M., Oleinikov V.A., Zubov V.P., Deyev S.M., Artemyev M.V., Baranov A.V. // Nanomedicine. 2011. V. 6. № 2. P. 195–209.

УДК 577.112.7

Экспрессия и внутриклеточная локализация параоксоназы 2 в опухолевых клетках различного типа

М. И. Шахпаронов, Н. В. Антипова, В. О. Шендер, П. В. Шнайдер, Г. П. Арапиди, Н. Б. Пестов, М. С. Павлюков*

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

*E-mail: marat.pav@mail.ru

Поступила в редакцию 07.12.2017

Принята к печати 05.06.2018

РЕФЕРАТ Белок PON2 принадлежит к семейству параоксоназ – лактонгидролизующих ферментов с различной субстратной специфичностью. В отличие от других членов этого семейства, PON2 обладает выраженной антиоксидантной активностью, локализуется преимущественно внутри клетки и экспрессируется практически во всех типах тканей человека. Ранее предполагалось, что основная функция параоксоназ заключается в защите организма от таких патогенов, как *Pseudomonas aeruginosa*. Однако последние данные говорят о важной роли PON2 в предотвращении окислительного стресса и апоптоза, а также в опухолевых клетках. В данной работе мы впервые провели биоинформатический анализ данных секвенирования РНК и ДНК в образцах опухолей, полученных более чем от 10 000 пациентов, и сравнили экспрессию и мутации гена PON2 более чем в 30 типах злокачественных новообразований. Кроме того, изучена внутриклеточная локализация PON2 в различных опухолевых клеточных линиях и, наконец, с помощью масс-спектрометрии определены белки, способные взаимодействовать с PON2 в раковых клетках. Полученные нами результаты говорят о том, что высокий уровень экспрессии PON2 является значимым диагностическим признаком многих видов солидных опухолей, а также позволяют предположить, что PON2, локализованная на ядерной мембране и эндоплазматическом ретикулуме, играет важную роль в защите опухолевых клеток от неблагоприятных воздействий, таких, как противоопухолевая терапия.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА апоптоз, белок-белковые взаимодействия, глиобластома, параоксоназа, рак.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ PON2 – параоксоназа 2; TCGA – The Cancer Genome Atlas; а.о. – аминокислотный остаток.

ВВЕДЕНИЕ

Семейство параоксоназ включает три фермента – PON1, PON2 и PON3. Филогенетический анализ этих белков показал, что PON2, по-видимому, является самым древним представителем этой группы, от которого позднее в ходе эволюции произошли PON1 и PON3 [1]. Все эти параоксоназы обладают выраженной лактоназной активностью, однако отличаются друг от друга субстратной специфичностью. Кроме того, параоксоназы различаются по профилю экспрессии. Так PON1 и PON3 синтезируются на высоком уровне в печени и секретируются в плазму крови в комплексе с липопротеинами высокой плотности. В отличие от них, PON2 экспрессируется фактически во всех тканях человека и находится преимущественно внутри клетки. Интересно отметить, что в некоторых типах клеток основная функция PON2 связана именно с его антиоксидантной активностью [2]. Так, PON2 значительно снижает продукцию супероксид-ио-

нов, взаимодействуя с первым и третьим комплексом электрон-транспортной цепи на внутренней митохондриальной мембране, а также ингибирует перекисное окисление липидов плазматической мембраны [3]. Важно отметить, что антиоксидантная активность PON2 не зависит от лактоназной активности [4].

Детальные исследования структуры показали, что PON2 имеет массу около 40 кДа, содержит два сайта гликозилирования, короткий внутриклеточный участок (1–5 а.о.), трансмембранный домен из одной альфа-спирали (6–24 а.о.), а также гидрофобный участок (67–81 а.о.) и ферментативный домен (168–246 а.о.), расположенные с наружной стороны клеточной мембраны. Благодаря трансмембранному домену в процессе трансляции PON2 встраивается в липидный бислой и распределяется между эндоплазматическим ретикулумом, перинуклеарной областью, митохондриями и плазматической мембраной. Однако данные о преимущественной лока-

лизации PON2 внутри клетки достаточно противоречивы [3, 5–7].

В настоящее время интерес к параоксоназе 2 существенно возрос, поскольку установлено, что она связана с прогрессией злокачественных новообразований. За последний год описана важная роль PON2 в опухолевых клетках. Так, показано, что PON2 способствует росту и метастазированию рака поджелудочной железы, стимулируя захват глюкозы [8], также ускоряет пролиферацию и устойчивость клеток рака мочевого пузыря к окислительному стрессу [9], защищает от апоптоза клетки глиобластомы [10] и понижает чувствительность к радиотерапии клеток карциномы ротовой полости [11]. Однако точная роль PON2 в других видах опухолей пока не установлена.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток

Различные клеточные линии культивировали в CO₂-инкубаторе в среде DMEM с 10% фетальной сыворотки коровы, 2 мМ L-глутамина и смеси пенициллина (100 ед/мл) и стрептомицина (100 мкг/мл). Для трансфекции использовали Lipofectamin LTX (Thermo Fisher Scientific, США) в соответствии с инструкцией производителя.

Иммунофлуоресцентная микроскопия

Клетки трижды промывали фосфатным буфером (ФСБ) и фиксировали 4% раствором формальдегида в ФСБ при комнатной температуре в течение 15 мин. После фиксации клетки 2 раза промывали ФСБ и инкубировали с пермеабилизирующим буфером (0.2% Triton X100 в ФСБ) в течение еще 15 мин. Далее в лунки на 30 мин добавляли 1% раствор бычьего сывороточного альбумина в буфере ФСБТ (0.1% Tween 20 в ФСБ). После этого клетки инкубировали с раствором антител к PON2 (разведение 1 : 200; HPA029193, Sigma) или к CRM1 (разведение 1 : 200; NB100-79802, Novus Biologicals) в ФСБТ в течение 1 ч. Затем клетки промывали 5 раз ФСБТ и инкубировали еще 1 ч с раствором вторичных антител, конъюгированных с флуоресцентным красителем Alexa Fluor 555 (разведение 1 : 500; A32732, Thermo Fisher Scientific), в буфере ФСБТ. Для отмывки не связавшихся антител клетки промывали ФСБТ еще 6 раз. После этого, отобрав из лунок весь буфер, добавляли к клеткам раствор DAPI (4',6-diamidino-2-phenylindole). Через 10 мин клетки анализировали под флуоресцентным микроскопом.

Создание плазмидных векторов

Фрагмент ДНК, кодирующий полноразмерный PON2, был амплифицирован с полученной ранее

плазмиды с помощью ПЦП с праймерами BglII-PON2 (AAA AAG ATC TAT GGG GCG GCT GGT GGC-TGT G) и PON2-SalI (AAA AGT CGA CAG TTC ACA-ATA CAA GGC TCT GTG GTA), а затем клонирован в вектор pTurboGFP-N (Evrogen) или pTagRFP-C (Evrogen) по сайтам рестрикции BglII и SalI. Полученные плазмиды были названы pTurboGFP-N-PON2 и pTagRFP-C-PON2 соответственно. Фрагмент ДНК, кодирующий 1–27 а.о. PON2, был амплифицирован с полученной ранее плазмиды с помощью ПЦП с праймерами BglII-PON2 и PON2_rev2 (TAT-TGT CGA CAG TCG ATT TCT GAG TGC CA) и клонирован в вектор pTurboGFP-N по сайтам рестрикции BglII и SalI, полученная плаزمид была названа pTurboGFP-N-PON2-1. Фрагмент ДНК, кодирующий 1–83 а.о. PON2, был амплифицирован с полученной ранее плазмиды с помощью ПЦП с праймерами BglII-PON2 и PON2_rev3 (AAT TGT CGA CCC TCC-AGG CTT ATC T) и клонирован в вектор pTurboGFP-N по сайтам рестрикции BglII и SalI, полученная плазмид была названа pTurboGFP-N-PON2-2. Фрагмент ДНК, кодирующий 1–168 а.о. PON2, был амплифицирован с полученной ранее плазмиды с помощью ПЦП с праймерами BglII-PON2 и PON2_rev4 (ATT TGT CGA CAT GTC ATT CAC ACT TGG A) и клонирован в вектор pTurboGFP-N по сайтам рестрикции BglII и SalI, полученная плазмид была названа pTurboGFP-N-PON2-3. Для экспрессии PON2 с последовательностью HALO-tag фрагмент ДНК, кодирующий HALO-tag, был амплифицирован с плазмиды pFC20K HaloTag T7 SP6 Flexi (Promega) с помощью ПЦП с праймерами SalI-Halo (AGG AGT-CGA CTG AGG ATC TGT ACT TTC A) и Halo-NotI (GAG GGC GGC CGC TTA ACC GGA AAT CTC CAG-AGT A) и клонирован в вектор pTurboGFP-N-PON2 по сайтам рестрикции SalI и NotI. В результате последовательность, кодирующая зеленый флуоресцентный белок, была заменена последовательностью, кодирующей HALO-tag. Полученная плазмид была названа pTurboHALO-N-PON2. Во всех случаях отсутствие мутаций, а также правильность лигирования вектора и вставки подтверждали с помощью секвенирования.

Выделение белков, взаимодействующих с PON2

Клетки линии U87-MG, культивируемые на 75 см² матрасе, трансфицировали плазмидой pTurboHALO-N-PON2. Через 48 ч после трансфекции клетки диссоциировали раствором трипсина-Версена и дважды промывали холодным ФСБ. Далее клетки лизировали в буфере, содержащем 50 мМ Tris, 150 мМ NaCl, 1% Triton X100, 0.1% дезоксихолат натрия, 1 мМ PMSF, pH 7.5. Лизат центрифугировали в течение 15 мин при 15000 об/мин и 4°С. После этого PON2

вместе с взаимодействующими с ним белками выделяли с помощью магнитных частиц с иммобилизованным лигандом Halo-Tag (Promega) по инструкции производителя.

Трипсинолиз в растворе

Все фракции белков элюировали с магнитных частиц в 100 мкл денатурирующего буфера (8 М мочевины, 2 М тиомочевины, 10 мМ Трис-НСl, рН 7.5), после чего образцы инкубировали в течение 20 мин при 24°C. Концентрацию белка в каждом образце измеряли с помощью Quick Start Bradford protein assay (Bio-Rad Laboratories, США) по стандартному протоколу производителя (бычий сывороточный альбумин использовали в качестве стандарта). Далее для восстановления дисульфидных связей белков образцы инкубировали в растворе 5 мМ DTT (дитиотреитола) при 24°C в течение 30 мин, затем проводили алкилирование, инкубируя образцы в растворе 10 мМ йодацетамида при комнатной температуре в течение 20 мин в темноте. Алкилированные образцы разбавляли раствором 50 мМ бикарбоната аммония в соотношении 1 : 4; добавляли раствор трипсина (0.01 мкг трипсина на 1 мкг белка) и инкубировали их при 37°C в течение 12 ч. После проведения гидролиза реакцию останавливали, добавляя муравьиную кислоту до ее концентрации в растворе 5%. Далее триптические пептиды обессоливали с использованием микроколонок Discovery DSC-18 (пробирки объемом 1 мл, с допустимой нагрузкой 50 мг) (Sigma-Aldrich, США), высушивали в вакуумном испарителе и хранили при -80°C до проведения LC-MS/MS-анализа.

LC-MS/MS-анализ

Анализ проводили на масс-спектрометре TripleTOF 5600+, оснащенном источником ионов NanoSpray III (ABSciex, Канада) и совмещенном с нанопоточной хроматографической системой NanoLC Ultra 2D+ (Eksigent, США). Буфер для нанесения образца и буфера А содержал: 98.9% воды, 1% метанола, 0.1% муравьиной кислоты (об/об). Буфер В представлял собой смесь 99.9% ацетонитрила и 0.1% муравьиной кислоты (об/об). Пептиды разделяли на колонке 3С18-CL-120 (Eksigent, ublin, США) при скорости потока 300 нл/мин в линейном повышающемся градиенте буфера В (от 5 до 40% в течение 90 мин). Для идентификации пептидов использовали зависимый от данных режим работы масс-спектрометра (IDA). Каждый цикл включал один обзорный MS1-спектр с последующими 50 зависимыми MS2-спектрами. В MS1-анализе использовали следующие параметры работы прибора: диапазон масс для анализа и последующего отбора ионов для фрагментационного анализа – 300–1250 m/z, время накопления

сигнала 250 мс. Ионы для MS2-анализа выбирали на основании интенсивности ионного тока с пороговым значением 200 импульсов в секунду и зарядом от +2 до +5. В MS2-анализе использовали следующие параметры: разрешение квадрупольного UNIT (0.7 Да), диапазон масс 200–1800 m/z, оптимизация фокусировки ионного пучка для получения максимальной чувствительности (разрешение ~20000), время накопления сигнала 50 мс для каждого иона. Раствор триптического гидролизата β-галактозидазы (20 фмоль) использовали с 15-минутным градиентом (5–25% буфера В) для калибровки масс-спектрометра и контроля производительности, стабильности и воспроизводимости системы.

Анализ LC-MS/MS-данных

Данные были конвертированы в mgf-файл с помощью программы ProteinPilot (version 4.5). С этой целью программа ProteinPilot была запущена в режиме идентификации со следующими параметрами: алкилирование цистеинов йодацетамидом, гидролиз трипсином, прибор TripleTOF 5600 и поиск белков, детектируемых с порогом 95.0%, по базе данных SwissProt, таксон HomoSapiens (<http://www.uniprot.org> с 176397 элементами). Для более тщательной идентификации белков был сгенерирован список пиков, который проанализировали программами MASCOT (версия 2.5.1) и X! Tandem (CYCLONE, 2013.2.01) с использованием базы данных SwissProt, таксон HomoSapiens (версия 2013 03) Статистическую значимость идентификаций проверяли на основании поиска по реверсированной базе данных последовательностей белков (decoy reversed database). Допустимые отклонения от массы иона предшественника и фрагмента составляли 20 ppm и 0.04 Да соответственно. Использовали следующие параметры поиска по базе данных: допущение одного пропущенного сайта специфического расщепления трипсином, фиксированная модификация – карбамидометилирование (С), и динамическая модификация – окисление (М). Для программы X! Tandem были также выбраны параметры, позволяющие осуществлять быструю проверку ацетилирования N-концевых остатков белков, потери молекулы аммиака N-концевых глутаминов пептидов или потери молекулы воды N-концевой глутаминовой кислоты пептидов. Результирующие файлы были загружены в программу Scaffold 4 (версия 4.2.1) для валидации и метаанализа. В качестве достоверно идентифицированных пептидов рассматривали компоненты, попадающие по уровню достоверности в массив идентификаций с Global FDR 5%. Список белков-предшественников составляли на основании списка достоверно идентифицированных пептидов (FDR 5%).

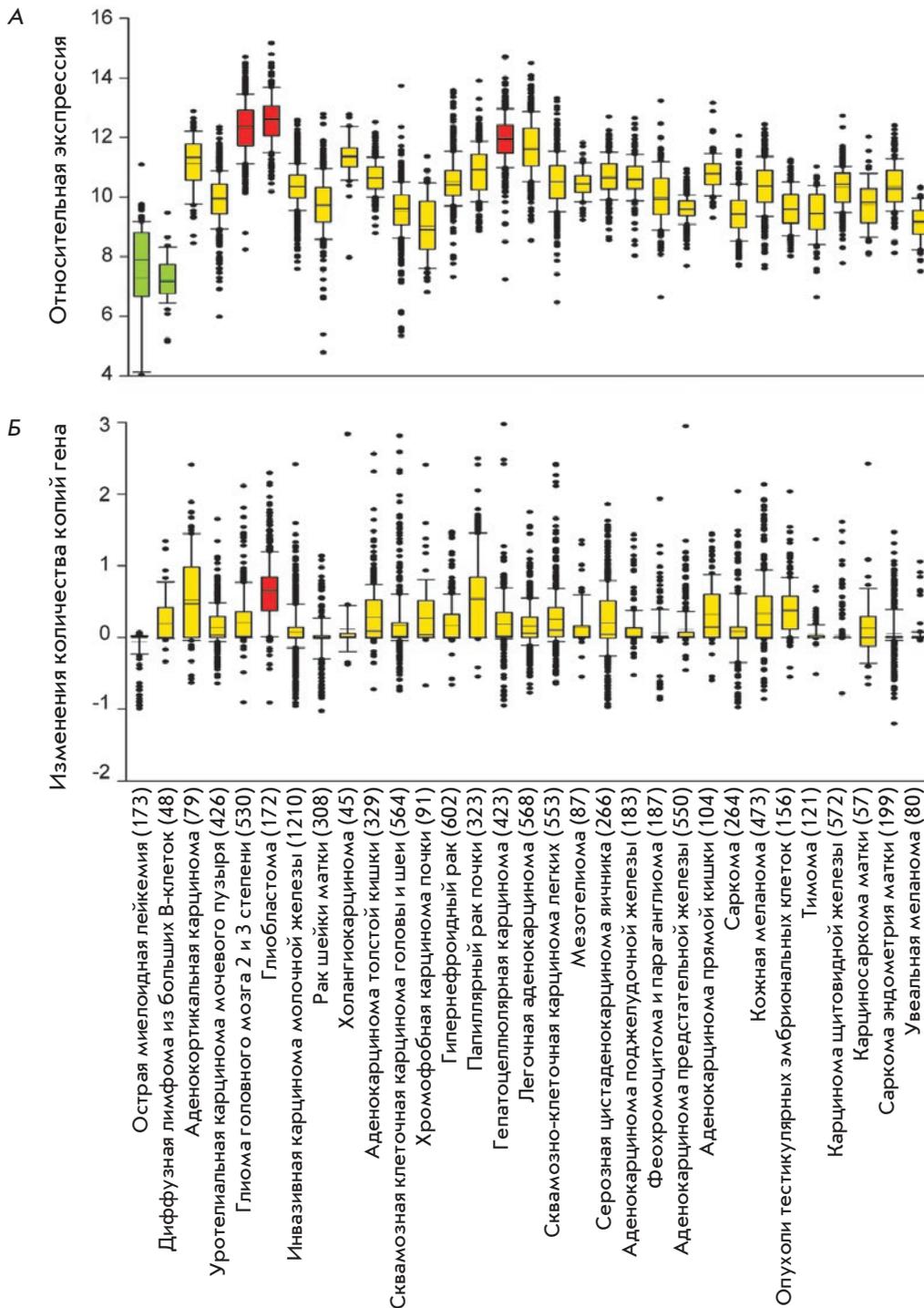


Рис. 1. Относительный уровень экспрессии (А) и изменение числа копий (Б) гена *PON2* в раковых опухолях различного вида. Результаты получены с помощью биоинформатического анализа базы данных TCGA. В скобках указано число образцов каждого вида опухолей

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Чтобы определить, в каких видах злокачественных опухолей *PON2* может играть потенциально важную онкогенную роль, мы сравнили экспрессию этого белка в различных опухолях, используя результаты РНК-секвенирования, представленные в базе данных TCGA (The Cancer Genome Atlas). Проанализировав данные, полученные более чем от 10 000 пациентов

со злокачественными опухолями 31 вида, мы обнаружили, что наибольший уровень экспрессии *PON2* наблюдается при раке печени и раке головного мозга (глиома, стадии 1–3 и глиобластома, стадия 4), а самый низкий уровень этого белка характерен для рака крови (миелоидного лейкоза и В-клеточной лимфомы) (рис. 1А). Вызваны ли наблюдаемые нарушения экспрессии *PON2* мутациями в соответствующем

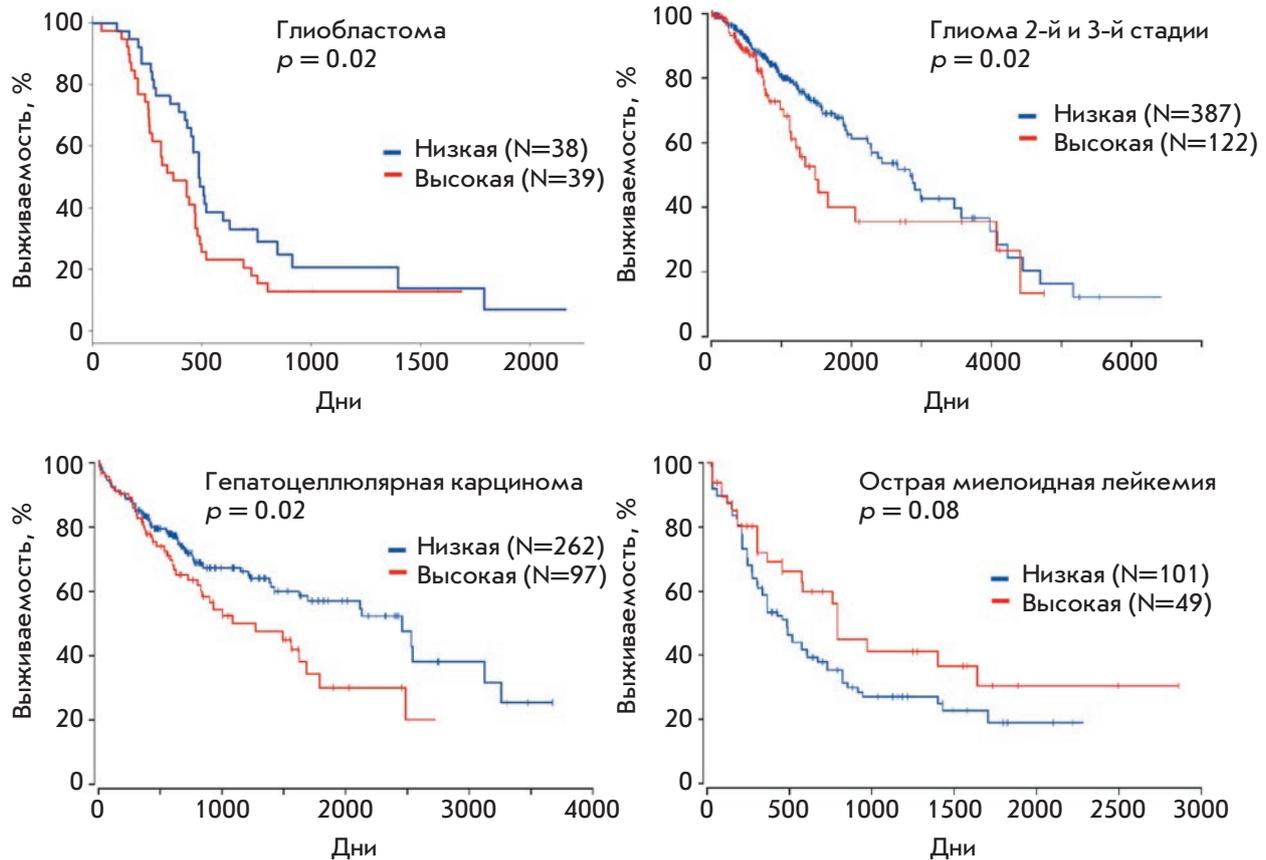


Рис. 2. Кривые Каплан–Майера, показывающие выживаемость больных глиобластомой, глиомой (стадии 2 и 3), гепатоцеллюлярной карциномой и острым миелоидным лейкозом. По уровню экспрессии PON2 выделяли две группы пациентов. Результаты получены с помощью биоинформатического анализа базы данных TCGA. На графиках указано количество пациентов в каждой группе, а также значения p , определенные с помощью логарифмического рангового t -теста

гене? Чтобы понять это, мы проанализировали данные секвенирования геномной ДНК, рассчитывая выявить возможные амплификации или делеции этого гена в опухолях различного типа. Как видно из рис. 1Б, для глиобластомы характерна амплификация гена *PON2*, а для лейкоза, напротив, делеция. Такой результат хорошо согласуется с данными нашего анализа экспрессии *PON2*.

Чтобы оценить влияние *PON2* на пролиферацию и устойчивость опухолевых клеток к терапии, мы проанализировали связь между уровнем экспрессии этого белка и выживаемостью пациентов с различными видами рака. Данные, представленные на рис. 2, убедительно показывают, что при раке печени, глиоме и глиобластоме высокий уровень *PON2* коррелирует с плохим прогнозом для пациентов, в то время как при лейкозе наблюдается противоположная картина – повышенное количество параок-

соназы 2 является хорошим прогностическим фактором. Такие результаты полностью согласуются с нашими данными об уровне экспрессии и мутациях в гене *PON2*.

Отличительная клиническая особенность рака головного мозга – большая некротическая зона, возникающая в центре опухоли, объем которой зачастую может во много раз превышать количество живой опухолевой ткани [12]. Столь высокий уровень гибели раковых клеток связан с недостаточным кровоснабжением глиобластом и крайне ограниченным пространством для роста. По этой причине клетки глиобластомы постоянно находятся в условиях стресса, вызванного нехваткой питательных веществ и токсичными компонентами, выделяемыми соседними погибающими клетками. Аналогичная ситуация наблюдается в печени, так как именно в этот орган поступают потенциально опасные соединения из кро-

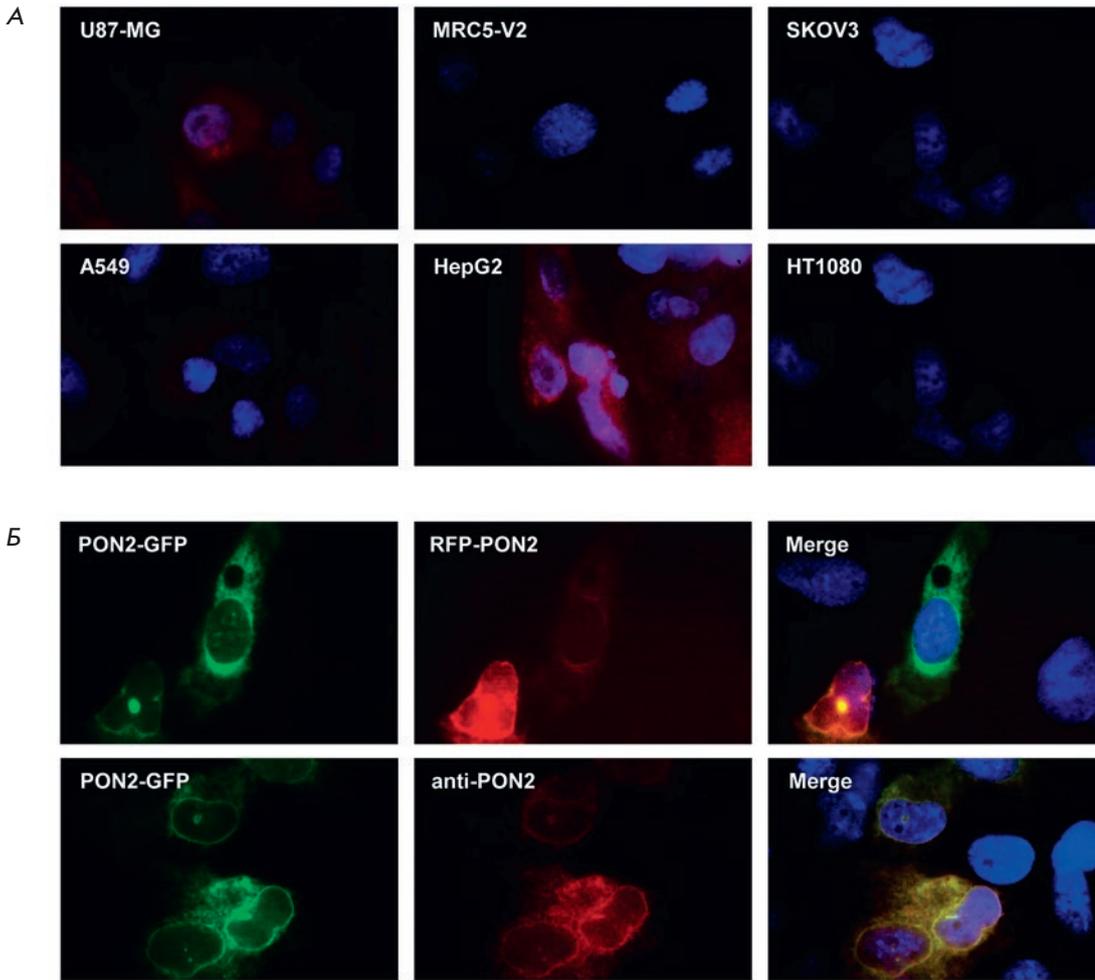


Рис. 3. Иммунофлуоресцентное окрашивание различных клеточных линий антителами на PON2 (А) и флуоресцентная микрофотография клеток, котрансфицированных плазмидами рTagRFP-С-PON2 и рTurboGFP-N-PON2 (верхняя панель), или клеток, трансфицированных плазмидой рTurboGFP-N-PON2, а затем окрашенных антителами на PON2 (нижняя панель) (Б)

ви. Таким образом, можно предположить, что PON2 имеет крайне важное значение для клеток рака печени и мозга, так как помогает им приспособиться к существованию в среде с высокой концентрацией токсичных продуктов метаболизма и недостатком питательных веществ. Поэтому при развитии этих опухолей может происходить отбор клеток с повышенной экспрессией PON2, в том числе и благодаря амплификации соответствующего гена. Напротив, клетки рака крови существуют в благоприятной среде, богатой кислородом и питательными веществами, которая не содержит потенциально токсичных соединений. Вследствие этого они не нуждаются в высоком уровне PON2. По-видимому, наоборот, пониженное содержание PON2 способствует более агрессивному фенотипу таких опухолевых клеток.

Чтобы получить больше информации о функциях PON2 в опухолевых клетках, мы окрасили шесть клеточных линий (U87-MG – глиобластома; MRC5-V2 – эмбриональное легкое; SKOV3 – рак яичников; A549 – карцинома легкого; HepG2 – карцинома печени; HT1080 – фибросаркома) антителами

на этот белок. Наибольшую интенсивность окраски мы наблюдали в клетках глиобластомы и карциномы печени, что согласуется с данными биоинформатического анализа (рис. 3А). Во всех исследованных типах клеток PON2 локализовалась в области вокруг ядра. Поскольку качество иммуноцитофлуоресцентного окрашивания не позволяло точно определить локализацию PON2 в клетках, следующим шагом было изучение локализации экзогенно-экспрессированной параоксоназы 2. С этой целью мы котрансфицировали клетки линии U87-MG плазмидами рTagRFP-С-PON2 (кодирует красный флуоресцентный белок, присоединенный к N-концу PON2) и рTurboGFP-N-PON2 (кодирует зеленый флуоресцентный белок, присоединенный к С-концу PON2), а также окрасили трансфицированные клетки антителами на PON2. Из рис. 3Б видно, что независимо от того, к какому концу PON2 был присоединен флуоресцентный белок, PON2 локализовался преимущественно вокруг ядра.

Для определения точной локализации PON2 мы окрасили трансфицированные клетки антителами

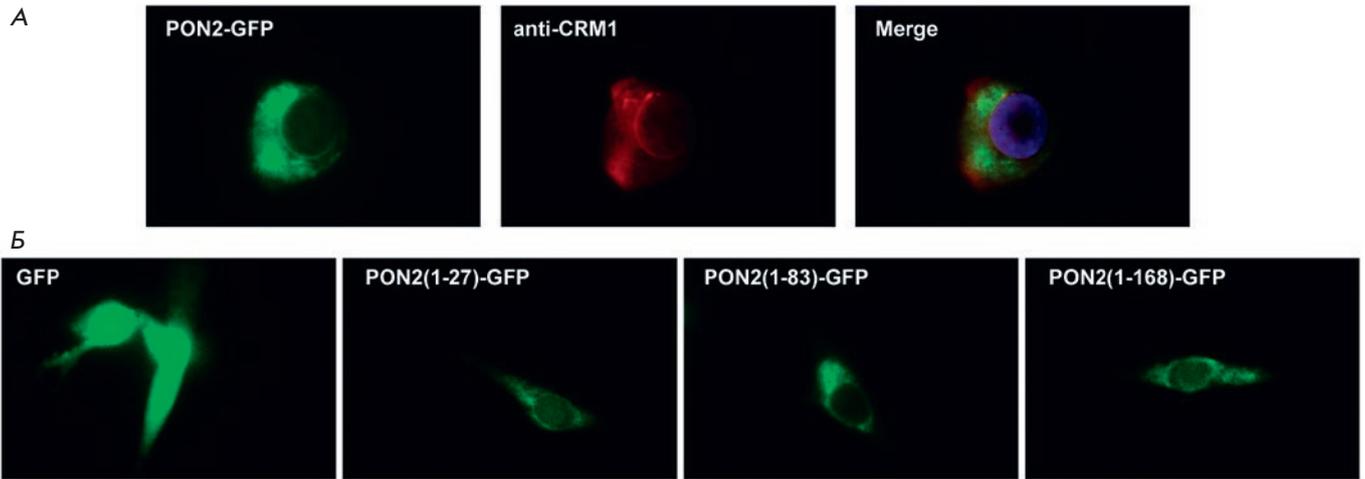


Рис. 4. Флуоресцентная микрофотография клеток, трансфицированных плазмидой pTurboGFP-N-PON2, а затем окрашенных антителами на CRM1 (А), и клеток, трансфицированных плазмидами, кодирующими различные участки PON2 (1–27 а.о.; 1–83 а.о.; 1–168 а.о.) или зеленый флуоресцентный белок (GFP) в качестве контроля (Б)

ми на CRM1 – маркер ядерной мембраны. Из рис. 4А видно, что вокруг ядра PON2 полностью колокализуется с CRM1. Это говорит о том, что существенная фракция PON2 в клетке расположена на ядерной мембране.

Далее мы попытались определить аминокислотную последовательность PON2, необходимую для локализации этого белка на ядерной мембране. С этой целью мы создали плазмиды, кодирующие три фрагмента PON2 (1–27 а.о.; 1–83 а.о.; 1–168 а.о.), несущие на своем N-конце зеленый флуоресцентный белок. Как видно из рис. 4Б, для локализации PON2 на ядерной мембране достаточно первых 27 аминокислот PON2, кодирующих трансмембранный сегмент.

В заключение определения внутриклеточных белков, взаимодействующих с PON2, мы использовали метод LC-MS/MS масс-спектрометрии. Мы трансфицировали клетки плазмидой, кодирующей PON2 или контрольный белок с последовательностью Halo-tag на С-конце, и, используя магнитные частицы с лигандом для Halo-tag, выделили экзогенный PON2 и взаимодействующие с ним белки. Последующий LC-MS/MS-анализ позволил определить 286 белков, копреципитирующих с PON2. Из этих белков 168 обнаружены и в контрольном образце, а 119 взаимодействовали исключительно с PON2, но не с контрольным белком (таблица). Среди белков, уникально взаимодействующих с PON2, шесть локализовались на ядерной мембране (CACYBP, TMPO, S100A6, RAN, UBXN4, TOR1AIP1). Важно отметить, что у белка CACYBP идентифицировано наибольшее (за исключением PON2) количество пептидов, что может говорить о высокой интенсивности взаимодействия CACYBP и PON2.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

За последний год опубликовано значительное количество работ, описывающих функции PON2 в нескольких типах раковых опухолей. Чтобы получить более общую информацию о роли этого белка в различных видах новообразований, мы впервые проанализировали экспрессию и мутации гена *PON2* в злокачественных опухолях 31 типа, а также изучили связь между экспрессией PON2 и выживаемостью пациентов. Наибольшая экспрессия PON2 была выявлена в солидных опухолях, особенно при раке головного мозга и печени. Для этих опухолей также характерна амплификация гена *PON2* и корреляция его экспрессии с плохим прогнозом для выживаемости пациентов. Напротив, гематологические опухоли характеризовались низким уровнем этого белка, делециями соответствующего гена и корреляцией экспрессии *PON2* с хорошим терапевтическим прогнозом. Известно, что PON2 в клетке может выполнять разнообразные функции, такие, как расщепление лактонов, снижение продукции свободных радикалов в митохондриях и защита мембранных липидов от перекисного окисления. Основываясь на полученных нами результатах о локализации этого белка в клетке, а также о его взаимодействии с другими белками, можно предположить, что в опухолевых клетках основное количество PON2 защищает внутриклеточные мембраны от окисления, а также, возможно, не позволяет свободным радикалам проникнуть сквозь ядерную мембрану и повредить генетический материал клеток. Однако для более детального подтверждения такой гипотезы необходимы дальнейшие исследования. ●

Работа поддержана грантом Российского научного фонда № 16-14-10335.

Список белков, копреципитирующихся с PON2

Ген	MW	N	Ген	MW	N	Ген	MW	N	Ген	MW	N
PON2	39	9	RPS20	13	2	RPS18	18	1	SNU13	14	1
CACUYBP	26	7	RPS7	22	2	RPL12	18	1	HNRNPD	31	1
RPS10	19	6	RPL11	20	2	RPL14	23	1	FKBP3	25	1
RPS19	16	6	RPL30	13	2	ADD3	74	1	PTRF	43	1
HSPA1A	70	6	NARS	63	2	AIDA	35	1	DHX15	91	1
PARP1	113	6	DTD1	23	2	CTNNBL1	65	1	PSME3	30	1
RPS5	23	5	EIF2S2	38	2	FLJ51636	12	1	DEK	43	1
EIF3A	75	5	EIF3G	36	2	CCDC124	26	1	DR1	19	1
EIF5	49	5	EXOSC2	33	2	COL12A1	333	1	S100A11	12	1
MANF	21	5	FARSLA	58	2	CSTB	11	1	S100A6	10	1
NELFE	43	5	GTF2F2	28	2	DCD	11	1	SEC61G	8	1
AHNAK	629	5	HDGF	27	2	MCM4	97	1	PTD004	20	1
FLJ20643	32	5	CDC37	44	2	DNAJC17	35	1	SARNP	24	1
ERP29	29	4	HYPK	15	2	DNAH10	515	1	SRSF1	28	1
EIF3J	29	4	IMPDH2	56	2	EEF1B2	25	1	SRSF3	19	1
EIF4B	69	4	TIMM8B	9	2	GTF2F1	58	1	STK10	112	1
FEN1	43	4	PYM1	23	2	GAPDHS	45	1	STK24	23	1
METAP1	43	4	CWC27	54	2	RAN	24	1	SARS	59	1
RPL9	22	3	PABPC1	71	2	HNRNPUL1	96	1	SNRPF	10	1
ATP5O	23	3	PTBP1	57	2	HIST1H2AB	14	1	CWC15	27	1
DNAJB1	38	3	PAWR	37	2	HIST1H4A	11	1	STMN1	17	1
HNRNPA1	39	3	PDIA3	57	2	IGF2BP1	63	1	TOR1AIP1	66	1
KRT2	65	3	MAGOHB	17	2	ITIH3	100	1	TCEAL4	25	1
TMPO	75	3	PBDC1	26	2	LIMS1	38	1	TUBA1C	50	1
TIMM8A	11	3	SNRPB	25	2	ZFYVE28	96	1	PTPN1	50	1
PA2G4	45	3	TARS	83	2	MESDC2	26	1	YARS	59	1
FAM50A	40	3	NSUN2	86	2	METAP2	53	1	UBXN1	33	1
SKIV2L2	118	3	MRPS11	21	1	MAPRE1	30	1	UBXN4	57	1
TCEA1	34	3	RPS16	16	1	DNAJC19	12	1	HDLBP	141	1
RPS15	17	2	RPS17	16	1	NAA50	19	1			

Примечание. Указано название гена (Ген), молекулярная масса белка в кДа (MW) и количество уникальных пептидов данного белка, идентифицированных с помощью LC-MS/MS масс-спектрометрии (N).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Costa L.G., de Laat R., Dao K., Pellacani C., Cole T.B., Furlong C.E. // *Neurotoxicology*. 2014. V. 43. P. 3–9.
- Ng C.J., Wadleigh D.J., Gangopadhyay A., Hama S., Grijalva V.R., Navab M., Fogelman A.M., Reddy S.T. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 44444–44449.
- Hagmann H., Kuczkowski A., Ruehl M., Lamkemeyer T., Brodesser S., Horke S., Dryer S., Schermer B., Benzing T., Brinkkoetter P.T. // *FASEB J.* 2014. V. 28. P. 1769–1779.
- Altenhöfer S., Witte I., Teiber J.F., Wilgenbus P., Pautz A., Li H., Daiber A., Witan H., Clement A.M., Förstermann U., et al. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. P. 24398–24403.
- Aviram M., Rosenblat M. // *Free Radic. Biol. Med.* 2004. V. 37. P. 1304–1316.
- Horke S., Witte I., Wilgenbus P., Krüger M., Strand D., Förstermann U. // *Circulation*. 2007. V. 115. P. 2055–2064.
- Rothem L., Hartman C., Dahan A., Lachter J., Eliakim R., Shamir R. // *Free Radic. Biol. Med.* 2007. V. 43. P. 730–739.
- Nagarajan A., Dogra S.K., Sun L., Gandotra N., Ho T., Cai G., Cline G., Kumar P., Cowles R.A., Wajapeyee N. // *Mol. Cell.* 2017. V. 67. P. 685–701.
- Bacchetti T., Sartini D., Pozzi V., Cacciamani T., Ferretti G., Emanuelli M. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. P. 28785–28795.
- Tseng J.H., Chen C.Y., Chen P.C., Hsiao S.H., Fan C.C., Liang Y.C., Chen C.P. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. P. 14666–14679.
- Krüger M., Amort J., Wilgenbus P., Helmstädter J.P., Grechowa I., Ebert J., Tenzer S., Moergel M., Witte I., Horke S. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. P. 51082–51095.
- Brat D.J., Castellano-Sanchez A.A., Hunter S.B., Pecot M., Cohen C., Hammond E.H., Devi S.N., Kaur B., van Meir E.G. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 920–927.

УДК 612.816:612.822.2

Влияние активации NMDA-рецепторов на мембранный потенциал покоя мышечной клетки в нервно-мышечном синапсе в условиях наличия или отсутствия ионов магния

С. Е. Проскурина^{2*}, К. А. Петров^{1,2,3}, Е. Е. Никольский^{1,2,3,4}¹Казанский институт биохимии и биофизики РАН, 420111, Казань, ул. Лобачевского, 2/31²Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18³Институт органической и физической химии им. академика А.Е. Арбузова РАН, 420029, Казань, ул. Академика Арбузова, 8⁴Казанский государственный медицинский университет, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49

*E-mail: svetlana-proskurina@mail.ru

Поступило в редакцию 23.06.2017

Принято к печати 26.06.2018

РЕФЕРАТ Нарушение работы или недостаточный уровень экспрессии глутаматных N-метил-D-аспарататных рецепторов лежат в основе многих патологий работы головного мозга. Поскольку функционирование рецепторов глутамата данного типа в ЦНС влияет на процессы нейронального возбуждения, синаптической пластичности, эксайтотоксичности при нейродегенеративных расстройствах, а также может приводить к развитию эпилепсии и судорог, эти рецепторы активно рассматриваются в качестве мишени для многих нейроактивных фармакологических препаратов. Однако функция периферических NMDA-рецепторов, в отличие от центральных, остается актуальным вопросом для исследования. В данной работе показано, что активация NMDA-рецепторов в нервно-мышечном синапсе взрослых млекопитающих приводит к изменению величины мембранного потенциала покоя постсинаптической клетки вследствие входящего тока катионов через ионный канал, ассоциированный с NMDA-рецептором.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА глицин, глутамат, нервно-мышечный синапс, NMDA-рецептор, электрофизиология.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АХ – ацетилхолин; ГАМК – гамма-аминомасляная кислота; NMDAR – N-метил-D-аспарататный рецептор; МПП – мембранный потенциал покоя; ЦНС – центральная нервная система; 5,7-ДСКА – 5,7-дихлоркинуреновая кислота; AP5 – DL-2-амино-5-фосфоновалериановая кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Преобразование команд центральной нервной системы в мышечные сокращения невозможно без процесса нервно-мышечной передачи. Нервно-мышечный синапс состоит из трех функциональных частей: пресинаптической терминали мотонейрона, синаптической щели и постсинаптической области на мембране мышечного волокна. Нервно-мышечное соединение – это синапс химического типа, в котором передача сигнала происходит с помощью химического трансмиттера – ацетилхолина (АХ), однако в этом преимущественно холинергическом синапсе присутствуют и другие нейромедиаторы (глутамат, АТР, ГАМК) [1–3]. Наличие механизмов синтеза, транспорта и выделения глутамата в нервно-мышечном синапсе также предполагает возможность модуляции процессов синаптической

передачи этой аминокислотой [4]. Показано, что выделение глутамата играет важную роль в незрелых периферических синапсах млекопитающих, в частности, на различных этапах развития и созревания нервно-мышечного соединения [5], а также в усилении секреции АХ в эмбриональных синапсах [6]. Не так давно транспортеры АХ и глутамата были обнаружены в мембране одних и тех же синаптических везикул в центральных нейронах [7], что указывает на возможность выделения этих медиаторов одной и той же пресинаптической клеткой. Также известно, что в области нервно-мышечного синапса концентрация глутамата в момент нейрональной активности довольно высока и может достигать миллимолярных значений [1]. Глутамат может влиять на активность синаптической ацетилхолинэстеразы [8], модулиро-

вать квантовое высвобождение медиатора [9], а также снижать некантовую секрецию АХ в нервно-мышечном синапсе [10]. Несмотря на то что существует немало исследований, показывающих наличие NMDAR в нервно-мышечном синапсе, а также эффекты их активации, например посредством флуоресцентных методов, электрофизиологических доказательств функционирования постсинаптических NMDAR у взрослых млекопитающих до сих пор недостаточно.

NMDAR представляют собой ионотропные лиганд-активируемые рецепторы, для активации которых необходимы два условия: наличие агонистов – глутамата и глицина, а также устранение иона магния, который в покое блокирует пору канала [11]. Показано, что магниевую блокаду можно снять с помощью деполяризации в естественных условиях либо применением безмагниевого раствора Рингера.

В исследовании Malomouzh и соавт. [12] показано, что облигатная субъединица NMDAR NR1 локализована на постсинаптической мембране нервно-мышечного синапса. Такое расположение предполагает, что при воздействии агонистов этих рецепторов возбудимость мембраны (а именно, мембранный потенциал покоя) может измениться вследствие развития деполяризации.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Эксперименты проводили на изолированных нервно-мышечных препаратах (m. EDL – extensor digitorum longus) крыс породы Wistar обоих полов весом 250–300 г. Изолированную мышцу с подходящим к ней нервом помещали в экспериментальную ванночку, через которую протекал аэрированный карбагеном (O₂ 95%, CO₂ 5%) раствор Рингера–Кребса для тепловых следующего состава (ммоль/л): NaCl – 120.0, KCl – 5.0, CaCl₂ – 2.0, MgCl₂ – 1.0, NaHCO₃ – 11.0, NaH₂PO₄ – 1.0, глюкоза – 11.0; в экспериментах с безмагниевым раствором (ммоль/л): NaCl – 121.0, KCl – 5.0, CaCl₂ – 2.0, MgCl₂ – 0.0, NaHCO₃ – 11.0, NaH₂PO₄ – 1.0, глюкоза – 11.0; pH раствора поддерживали на уровне 7.2–7.4 при температуре 20 ± 2°C (скорость перфузии 2–3 мл/мин). Все эксперименты проводили в соответствии с директивой European Communities Council Directive от 24 ноября 1986 года (86/609/ЕЕС).

Изменения мембранного потенциала концевой пластинки регистрировали с помощью стандартной микроэлектродной техники с использованием микроэлектродов с сопротивлением 5–10 МОм из стекла Pixex, заполненных раствором KCl (3 моль/л).

Реактивы

Глутамат, глицин, AP5 и 5,7-ДСКА предоставлены Sigma-Aldrich (St Louis, MO США), μ-конотоксин

предоставлен Alamone Lab (Израиль). Все препараты вводили через систему перфузии.

Статистическую значимость результатов оценивали с использованием непарного теста Стьюдента, различие между двумя совокупностями считали значимым при $p < 0.05$, ошибки представлены в виде стандартных отклонений (SD).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Так как NMDA-рецептор представляет собой ионный канал, проницаемый для катионов, можно предположить, что активация функциональных NMDA-рецепторов, представленных на постсинаптической мембране, вызовет входящий ток катионов, следовательно, приведет к деполяризации мембраны клетки. Выраженность этой деполяризации будет зависеть от количества активированных рецепторов и от концентрации ионов в среде. Однако при мембранном потенциале покоя показано наличие магниевого блока NMDA-рецепторов, который снимается деполяризацией мембраны или, в экспериментальных условиях, использованием безмагниевого раствора.

В безмагниевом растворе добавление глутамата в концентрации 100 мкмоль/л и коагониста NMDAR глицина в концентрации 700 мкмоль/л приводило к статистически значимому падению мембранного потенциала на 6.5% (рисунок), при этом контрольное значение составило 79.37 ± 0.24 мВ ($n = 270$), а после аппликации аминокислот мембранный потенциал составил 74.18 ± 0.32 мВ ($n = 140$, рисунок). Эффект глутамата и глицина был обратимым, поскольку полностью исчезал после отмывки препарата. Изменение МПП во внесинаптической области не наблюдалось при аппликации аминокислот в указанных выше концентрациях (78.9 ± 0.3 мВ, $n = 110$ против 79.4 ± 0.2 мВ в контроле, $n = 270$, данные не представлены).

Чтобы выяснить, действительно ли данный эффект связан с активацией NMDA-рецепторов, проведена серия экспериментов с использованием селективного обратимого блокатора NMDA-рецепторов AP5. Добавление только AP5 в концентрации 500 мкмоль/л не влияло статистически значимо на мембранный потенциал покоя клетки. Однако последующая аппликация глутамата и глицина вызывала значимо меньшую деполяризацию в присутствии блокатора, которая составила лишь 1.5% (78.15 ± 0.39 мВ против 79.37 ± 0.24 мВ в контроле), однако была статистически значимой ($n = 127$).

Отсутствие полного блокирующего эффекта AP5 может объясняться тем, что действие данного блокатора обратимо, он конкурентно связывается с участком связывания глутамата, и степень его сродства к NMDA-рецептору сходна с аффинностью глутамата

та, вследствие чего аминокислота может вытеснять блокатор [13]. Чтобы добиться полного устранения эффекта аминокислот, мы использовали блокатор глицинового сайта NMDAR 5,7-ДСКА (натриевая соль) в концентрации 100 мкмоль/л. Добавление 5,7-ДСКА не приводило к статистически значимому изменению мембранного потенциала ($n = 79$). При совместной аппликации AP5 и 5,7-ДСКА также не возникало деполяризации постсинаптической мембраны ($n = 79$). При этом на фоне этих двух блокаторов аминокислоты не вызывали достоверного падения мембранного потенциала (78.8 ± 0.22 мВ против 79.37 ± 0.24 мВ в контроле; $n = 85$, рисунок).

Альтернативный, физиологический способ блокады NMDA-рецепторов – это магниевый блок. Если наблюдаемый эффект на мембранный потенциал обусловлен работой этих рецепторов, то присутствие магния в растворе должно блокировать развитие деполяризации при аппликации агонистов. И действительно, в присутствии Mg^{2+} аминокислоты не влияли на мембранный потенциал покоя мышечного волокна, в магнийсодержащем растворе в контроле он составил 78.91 ± 0.32 мВ, после добавления глицина и глутамата – 78.26 ± 0.31 мВ ($n = 105$, рисунок).

Из полученных результатов можно сделать вывод, что на постсинаптической мембране имеются функциональные NMDAR, активация которых вызывает статистически значимые сдвиги мембранного потенциала покоя постсинаптической клетки в положительную сторону. Такая деполяризация обеспечивается входящим током катионов через канал рецептора, блокируется селективными блокаторами глутаматного и глицинового сайта связывания и не наблюдается в условиях сохранения магниевых блока.

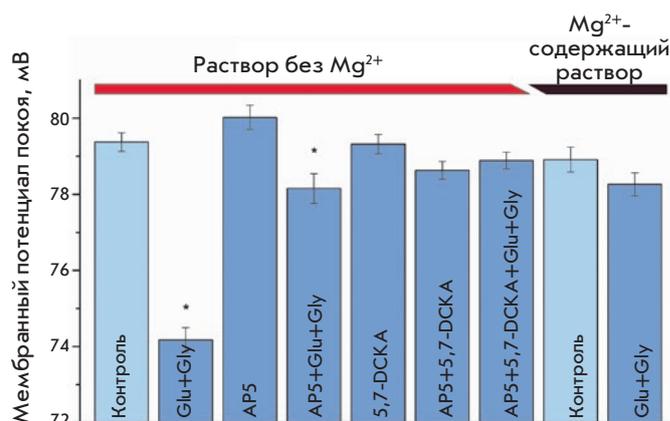
Данное исследование является электрофизиологическим доказательством потенциальной модуляторной роли NMDAR постсинаптической мембраны в нервно-мышечных синапсах взрослых млекопитающих.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на постсинаптической мембране мышечного волокна млекопитающего присутствует популяция функционально активных NMDA-рецепторов, активация которой может изменять мембранный потенциал покоя мышечного волокна в отсутствие магниевых блока рецепторов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Waerhaug O., Ottersen O. P. // *Anatomy and Embryology* (Berlin). 1993. V. 188. № 5. P. 501–513.
2. Silinsky E.M., Redman R.S. // *J. Physiol.* 1996. V. 492 (Pt 3). P. 815–822.



Влияние активации NMDA-рецепторов на мембранный потенциал покоя постсинаптической клетки. При аппликации глутамата (100 мкмоль/л) и глицина (700 мкмоль/л) в безмагниевом растворе наблюдалось падение мембранного потенциала покоя клетки. Добавление блокаторов NMDA-рецепторов – AP5 (500 мкмоль/л) и 5,7-ДСКА (100 мкмоль/л), а также их совместное применение не оказывали эффекта на МПП. Добавление глутамата и глицина на фоне AP5 незначительно снижало МПП, однако этот эффект полностью блокировался при аппликации двух блокаторов – и AP5, и 5,7-ДСКА. В растворе, содержащем ионы магния, аппликация глутамата и глицина не влияла на МПП постсинаптической клетки. * Значимое отличие от контроля ($p < 0.05$)

Электрофизиологические методы, имеющие высокую чувствительность, позволяют регистрировать даже небольшие флуктуации мембранного потенциала под воздействием входящего тока через NMDAR и локализовать наблюдаемые эффекты именно на постсинаптической мембране.

Вполне вероятно, что влияние активации NMDAR на возбудимость постсинаптической мембраны не так велико для здоровой мышцы, однако в условиях недостаточности синаптической передачи снижен, вклад возбуждающего тока, опосредованного NMDAR может стать намного более значимым. Учитывая множество процессов, опосредуемых активацией NMDAR, многие из которых обусловлены высокой проницаемостью этих рецепторов для кальция, дальнейшее изучение их роли в нервно-мышечном синапсе представляется актуальным. ●

3. Malomuzh A.I., Nurullin L.F., Nikolsky E.E. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2015. V. 463. P. 236–238. doi: 10.1134/S1607672915040092.
4. Berger U.V., Carter R.E., Coyle J.T. // *Neuroscience.* 1995. V. 64. № 4. P. 847–850.

5. Personius K.E., Slusher B.S., Udin S.B. // *J. Neurosci.* 2016. V. 36. № 34. P. 8783–8789.
6. Fu W.M., Liou J.C., Lee Y.H., Liou H.C. // *J. Physiol.* 1995. V. 489 (Pt 3). P. 813–823.
7. Frahm S., Antolin-Fontes B., Görlich A., Zander J.F., Ahnert-Hilger G., Ibañez-Tallon I. // *Elife.* 2015. V. 4. P. 1–31.
8. Petrov K.A., Malomouzh A.I., Kovyazina I.V., Krejci E., Nikitashina A.D., Proskurina S.E., Zobov V.V., Nikolsky E.E. // *Eur. J. Neurosci.* 2013. V. 37. № 2. P. 181–189.
9. Pinard A., Lévesque S., Vallée J., Robitaille R. // *Eur. J. Neurosci.* 2003. V. 18. № 12. P. 3241–3250.
10. Malomouzh A.I., Mukhtarov M.R., Nikolsky E.E., Vyskocil F., Lieberman E.M., Urazaev A.K. // *J. Neurochem.* 2003. V. 85. № 1. P. 206–213.
11. Evans R.H., Francis A.A., Watkins J.C. // *Experientia.* 1977. V. 33. № 4. P. 489–491.
12. Malomouzh A.I., Nurullin L.F., Arkhipova S.S., Nikolsky E.E. // *Muscle Nerve.* 2011. V. 44. № 6. P. 987–989.
13. Lowe G. // *J. Neurophysiol.* 2003. V. 90. № 3. P. 1737–1746.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал *Acta Naturae* публикует экспериментальные и обзорные статьи, посвященные наиболее актуальным вопросам фундаментальных и прикладных наук о живом и биотехнологий. Журнал выпускается на русском и английском языках. Журнал *Acta Naturae* входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России, включен в базы данных PubMed, Web of Science, Scopus, РИНЦ.

Редакция журнала *Acta Naturae* просит авторов руководствоваться приведенными ниже правилами. Статьи, не соответствующие профилю журнала или не соответствующие его требованиям, отклоняются Редакционным советом и Редколлегией без рецензирования. Редакция не рассматривает работы, результаты которых уже были опубликованы или находятся на рассмотрении в других изданиях.

Максимальный объем обзора вместе с таблицами и списком литературы не должен превышать 50 000 знаков с пробелами (примерно 30 страниц формата А4, напечатанных через 1.5 интервала, шрифт Times New Roman, 12 размер) и 16 рисунков.

Объем экспериментальной статьи не должен превышать 30 000 знаков с пробелами (примерно 15 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы). Число рисунков не должно превышать 10.

Новые приоритетные данные, требующие срочного опубликования, могут быть напечатаны в разделе «Краткие сообщения». Краткое сообщение должно содержать постановку задачи, экспериментальный материал и выводы. Объем краткого сообщения не должен превышать 12 000 знаков (5–6 страниц формата А4 вместе с таблицами и списком литературы не больше 12 источников). Число рисунков не должно превышать трех.

Рукопись и сопроводительные документы следует присылать в редакцию в электронном виде:

- 1) текст в формате Word 2003 for Windows;
- 2) рисунки в формате TIFF;
- 3) текст статьи с рисунками в едином pdf-файле;
- 4) перевод на английский язык названия статьи, фамилий и инициалов авторов, названий организаций, реферата, ключевых слов, сокращений, подписей к рисункам, русскоязычных ссылок;
- 5) сопроводительное письмо, в котором надо указать, что представленный материал ранее нигде не был опубликован и не находится на рассмотрении на предмет публикации в других изданиях;
- 6) лицензионный договор (форму договора можно скачать с сайта www.actanaturae.ru).

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

- УДК в левом верхнем углу. Шрифт – курсив, размер 9.
- Название статьи. Шрифт – полужирный. Заглавие не должно быть слишком длинным или коротким и малоинформативным. Оно должно отражать главный результат, суть и новизну работы. Название не должно превышать 100 знаков.
- Инициалы и фамилии авторов (в обзорах не более 5 авторов).

- Указывается электронный адрес автора, ответственного за переписку с редакцией, включая работу с корректурой. Автор, ответственный за переписку, выделяется значком *.
- Приводится полное название научной организации и ее ведомственная принадлежность. Если научных учреждений два и более, необходимо цифровыми надстрочными индексами связать название учреждения и фамилии авторов, в нем работающих.
- Реферат. Структура реферата должна быть четкой и отражать следующее: постановка проблемы, описание экспериментальных методов, возможность практических приложений, возможность постановки новых задач. Средний объем реферата составляет 20 строк (примерно 1500 знаков).
- Ключевые слова (3–6). В них следует отразить: предмет исследования, метод, объект, специфику данной работы.
- Список сокращений.
- Введение.
- Раздел «Экспериментальная часть».
- Раздел «Результаты».
- Раздел «Обсуждение» (или «Результаты и обсуждение»).
- Раздел «Выводы» (или «Заключение»). В конце раздела указываются названия организаций, финансировавших работу, в скобках – номера грантов.
- Раздел «Список литературы».

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

- Рекомендуется использование редактора Microsoft Word 2003 for Windows.
- Шрифт – Times New Roman. Стандартный размер шрифта – 12.
- Интервал между строками 1.5.
- Нецелесообразно использовать более одного пробела между словами.
- Запрещено использовать при наборе текста автоматическое создание сносок, автоматический перенос или автоматический запрет переносов, создание списков, автоматический отступ и т.п.
- При создании таблицы рекомендуется использовать возможности Word (Таблица – Добавить таблицу) или MS Excel. Таблицы, набранные вручную (с помощью большого числа пробелов, не используя ячейки), не могут быть использованы.
- Между инициалами и фамилией всегда ставится пробел: А.А. Иванов (кроме перечисления авторов в заглавии статьи, где пробелы ставятся и между инициалами – А. А. Иванов).
- Все даты в виде «число.месяц.год» набиваются следующим образом: 02.05.1991.
- Точка не ставится после: УДК, заглавия статьи, авторов, адресов, заголовков и подзаголовков, названий таблиц, подписей к рисункам, размерностей (с – секунда, г – грамм, мин – минута, ч – час, сут – сутки, град – градус).
- Точка ставится после: сносок (в том числе в таблицах), примечаний к таблице, краткой аннотации, сокращений (мес. – месяц, г. – год, т. пл. – температура плавления), но не ставится в подстрочных индексах: $T_{\text{пл}}$ – температура плавления, $T_{\text{ф.п}}$ – температура фазового перехода. Исключение: млн – миллион – без точки.

- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не μM ; нм, но не nm).
- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только « \times ». Знак « \times » ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом « \cdot » обозначаются комплексы соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК:РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (ATP, AMP и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (T34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

- Рисунки к статьям приводятся отдельными файлами в формате TIFF, при необходимости – в заархивированном виде.
- Иллюстрации должны иметь разрешение не ниже 300 dpi для цветных и полутоновых изображений и не менее 600 dpi для черно-белых иллюстраций.
- Недопустимо использование дополнительных слоев.

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

Статьи публикуются по мере поступления. Члены редколлегии имеют право рекомендовать к ускоренной публикации статьи, отнесенные редколлегией к приоритетным и получившие высокую оценку рецензентов.

Статьи, поступившие в редакцию, проходят экспертизу членов редколлегии и направляются на внешнее рецензирование. Выбор рецензента является прерогативой ре-

дакции. Рукопись направляется на отзыв специалистам в данной области исследований, и по результатам рецензирования редколлегией определяется дальнейшая судьба рукописи: принятие к публикации в представленном виде, необходимость доработки или отклонение.

Возвращение рукописи авторам на доработку не означает, что статья принята к печати. После получения доработанного текста рукопись вновь рассматривается редколлегией. Доработанный текст автор должен вернуть вместе с ответами на все замечания рецензента.

Переработанная рукопись должна быть возвращена в редакцию в течение одной недели после получения авторами отзывов.

На всех стадиях работы с авторами, редакторами и рецензентами редакция использует электронно-почтовую связь, поэтому авторы должны быть очень внимательны к указанному в рукописи электронному адресу и должны своевременно сообщать о произошедших изменениях.

Корректуры статей редакция рассылает авторам по электронной почте в виде pdf-файла. На стадии корректуры не допускаются замены текста, рисунков или таблиц. Если это все же необходимо, то данный вопрос решается с редколлегией.

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

Ссылки на цитируемую литературу приводятся в тексте в порядке их цитирования, нумеруются и приводятся в квадратных скобках. Ссылке на работу в таблице или в подписи к рисунку присваивается порядковый номер, соответствующий расположению данного материала в тексте статьи.

Для книг: фамилия и инициалы автора, полное название книги, место издания, издательство, год издания, том или выпуск и общее количество страниц.

Кулаев И.С., Вагабов В.М., Кулаковская Т.В. Высокомолекулярные неорганические полифосфаты: биохимия, клеточная биология, биотехнология. М.: Научный мир, 2005. 216 с.

Ссылки на книги, переведенные на русский язык, должны сопровождаться ссылками на оригинальные издания с указанием выходных данных.

Для периодических изданий: фамилия и инициалы автора, название журнала, год издания, том, номер, первая и последняя страницы статьи. Указываются фамилии первых 10 авторов, например:

Ross M.T., Grafham D.V., Coffey A.J., Scherer S., McLay K., Muzny D., Platzer M., Howell G.R., Burrows C., Bird C.P., et al. // Nature. 2005. V. 434. № 7031. P. 325–337.

Ссылки на *авторефераты* диссертаций должны содержать фамилию и инициалы автора, название диссертации, место выполнения работы, год защиты диссертации.

Шкурников М.Ю. Влияние нагрузок различной интенсивности на концентрацию белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа. М.: ФГУ ВНИИФК, 2009.

Ссылки на *патенты* должны содержать фамилии и инициалы авторов, вид патентного документа (авторское свидетельство или патент), номер, название страны, выдавшей документ, индекс международной классификации изобретений, год выдачи патента.

Для связи с редакцией следует использовать следующий электронный адрес: actanaturae@gmail.com, телефон: (495) 727-38-60.