

Acta Naturae

Опухолевые модели организменного уровня на основе *Danio rerio*



МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ПОДХОДЫ
К БЕЗОПАСНОЙ И
КОНТРОЛИРУЕМОЙ
Т-КЛЕТОЧНОЙ ТЕРАПИИ
СТР. 17

ОБРАТИМАЯ ЦИКЛИЧЕСКАЯ
ТЕРМОИНАКТИВАЦИЯ
ОЛИГОПЕПТИДАЗЫ В
ИЗ *Serratia proteamaculans*
СТР. 70

MERCK

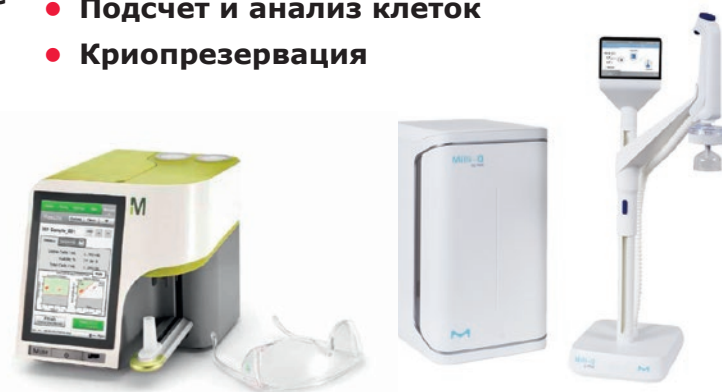
КОМПЛЕКСНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ КЛЕТОЧНОГО АНАЛИЗА



- 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):

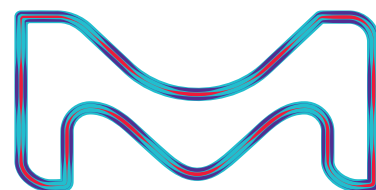
- 4000 клеточных линий животных и человека;
- Клетки 45 видов животных и 50 типов тканей;
- 370 эталонных В-лимфобластных клеточных линий с данными о типе лейкоцитарного антигена человека (HLA);
- 480 гибридомных клеточных линий, секретирующих моноклональные антитела;
- ДНК, РНК, кДНК, экстрагированные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

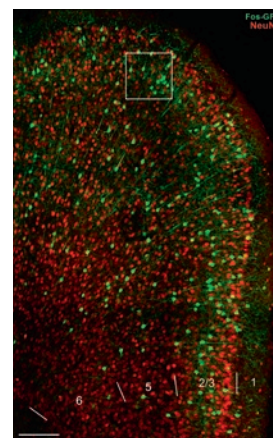


SIGMA-ALDRICH® is now MERCK

Когнитивная индексация нейронов: Cre-управляемое генетическое маркирование и изучение клеток, участвующих в обучении и памяти

О. И. Ивашкина, Н. С. Воробьева, А. М. Груздева, М. А. Рощина, К. А. Торопова, К. В. Анохин

В работе описано выявление когнитивных нейронных сетей мозга животных методом опыт-зависимой Cre-Lox-рекомбинации. Обучение трансгенных мышей Fos-Cre-eGFP ведет к опосредуемой промотором c-fos Cre-рекомбинации и перманентному синтезу зеленого флуоресцентного белка только в тех нейронах, которые вовлекались в изучаемый когнитивный эпизод. Сочетание такого генетического маркирования с иммуногистохимической окраской на разные типы нейронов и эндогенный белок c-Fos открывает новые возможности для визуализации и анализа когнитивных клеточных сетей головного мозга.



Опыт-зависимая Cre-рекомбинация происходит только в нейронах

Получение и исследование свойств рекомбинантного иммуноглобулина А, специфичного к гемагглютиниnam вируса гриппа

Т. К. Алиев, И. Г. Дементьева, В. А. Топорова, В. В. Аргентова, Л. П. Позднякова, М. Н. Боков, Ю. А. Вотчицева, Д. А. Долгих, С. Д. Варфоломеев, П. Г. Свешников, М. П. Кирпичников

Получены рекомбинантные варианты человеческого антитела F16, проявляющие широкую специфичность к гемагглютиниnam вируса гриппа А. На основе бипромоторного вектора (CMV, hEF1-HTLV) получены генетические конструкции, экспрессирующие тяжелую и легкую цепи иммуноглобулинов IgA1-, IgA2m1- и IgG-изотипов. Определены иммунохимические характеристики антител, изучено взаимодействие рекомбинантных иммуноглобулинов со штаммами вируса гриппа А подтипов H1N1 и H3N2.

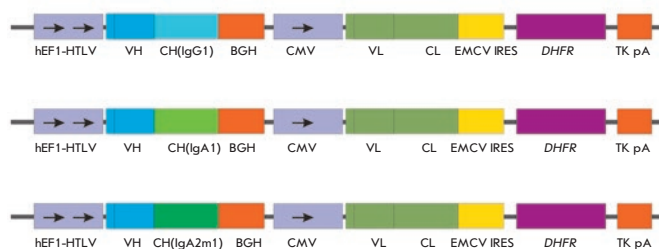


Схема экспрессионных кассет бипромоторных плазмид для получения антител F16 различных изотипов

Роль адаптерного белка MIM в актин-зависимой регуляции эпителиальных натриевых каналов (ENaC)

Л. С. Шуйский, В. В. Левченко, Ю. А. Негуляев, А. В. Старуценко, Д. В. Илатовская

Эпителиальные натриевые каналы (ENaC) экспрессируются в собирательных трубочках почки, где обеспечивают регулируемую реабсорбцию ионов натрия. Одним из механизмов регуляции каналов являются динамические перестройки актинового цитоскелета, опосредованные актинсвязывающими белками кортактином и комплексом Arp2/3. Высказано предположение, что новым участником цитоскелет-зависимой регуляции каналов является белок MIM (missing-in-metastasis).

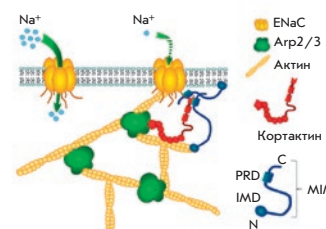


Схема актин-зависимой регуляции ENaC с участием актинсвязывающих белков MIM

Acta Naturae

ТОМ 10, № 2 (37), АПРЕЛЬ—ИЮНЬ 2018

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. Шведас (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 июня 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: 1.667

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Л. А. Добрынина, М. Р. Забитова, Л. А. Калашникова,
Е. В. Гнедовская, М. А. Пирадов
**Артериальная гипертензия и церебральная
микроангиопатия: генетические
и эпигенетические аспекты взаимосвязи 4**
- Р. С. Калинин, А. В. Петухов, В. Д. Кнорре,
М. А. Масчан, А. В. Степанов, А. Г. Габибов
**Молекулярные подходы к безопасной
и контролируемой Т-клеточной терапии 17**
- И. В. Мизгирев, Д. Р. Сафина, И. В. Демидюк,
С. В. Костров
**Опухолевые модели организменного
уровня на основе *Danio rerio*. 26**

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Т. К. Алиев, И. Г. Дементьева, В. А. Топорова, В. В. Аргентова, Л. П. Позднякова, М. Н. Боков, Ю. А. Вотчицева, Д. А. Долгих, С. Д. Варфоломеев, П. Г. Свешников, М. П. Кирпичников
- Получение и исследование свойств рекомбинантного иммуноглобулина А, специфичного к гемагглютиниnam вируса гриппа** 32
- О. И. Ивашкина, Н. С. Воробьева, А. М. Груздева, М. А. Рощина, К. А. Торопова, К. В. Анохин
- Когнитивная индексация нейронов: Cre-управляемое генетическое маркирование и изучение клеток, участвующих в обучении и памяти.** 40
- Е. А. Комеч, И. В. Звягин, М. В. Погорельый, И. З. Мамедов, Д. А. Федоренко, Ю. Б. Лебедев
- Исследование репертуара Т-лимфоцитов после аутологичной ТГСК у пациентов с анкилозирующим спондилитом** 52
- Н. А. Никитенко, Е. С. Гуреева, А. А. Озеров, А. И. Тухватулин, Ф. М. Ижаева, В. С. Прасолов, П. Г. Дерябин, М. С. Новиков, Д. Ю. Логунов
- 1-(4-Феноксibenзил)-производные 5-аминоурацила и их аналоги — новые ингибиторы репликации аденовирусов человека** 62
- М. В. Овчинникова, А. Г. Михайлова, Д. М. Карлинский, В. А. Горленко, Л. Д. Румш
- Обратимая циклическая термоинактивация олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans*** ... 70
- И. В. Рыжова, А. Д. Ноздрачев, Т. В. Тобиас, Е. А. Вершинина
- Растворимая гуанилатциклаза как ключевой фермент в модулирующем влиянии NO на метаболотропные глутаматные рецепторы** ... 76

А. А. Стахеев, Л. В. Самохвалова, О. Д. Микитюк, С. К. Завриев

Филогенетический анализ и молекулярное типирование трихотеценпродуцирующих грибов рода *Fusarium* из российских коллекций 85

Э. Ф. Хазиев, Д. В. Самигуллин, А. Н. Ценцевицкий, Э. А. Бухараева, Е. Е. Никольский

АТР уменьшает вход ионов кальция в нервную терминаль, блокируя кальциевые каналы L-типа. 100

Л. С. Шуйский, В. В. Левченко, Ю. А. Негуляев, А. В. Старущенко, Д. В. Илатовская

Роль адаптерного белка MIM в актин-зависимой регуляции эпителиальных натриевых каналов (ENaC) 104

Правила для авторов 111



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

УДК 616.8-056.7

Артериальная гипертензия и церебральная микроангиопатия: генетические и эпигенетические аспекты взаимосвязи

Л. А. Добрынина*, М. Р. Забитова, Л. А. Калашникова, Е. В. Гнедовская, М. А. Пирадов

Научный центр неврологии, 125367, Москва, Волоколамское ш., 80

*E-mail: dobrla@mail.ru

Поступила в редакцию 03.05.2017

Принята к печати 24.04.2018

РЕФЕРАТ Артериальная гипертензия (АГ) и ассоциированные с ней церебральные осложнения являются крайне значимой медицинской и социальной проблемой. Несмотря на очевидную связь АГ с клиническими и нейровизуализационными проявлениями церебральной микроангиопатии (ЦМА, cerebral small vessel disease), причинно-следственные взаимоотношения между ними неоднозначны. Антигипертензивная терапия не всегда оказывается эффективной для предотвращения поражения головного мозга. Значение универсальных факторов развития АГ и ЦМА важно для прогнозирования возникновения церебральных осложнений и разработки новых направлений их профилактики и лечения. В настоящее время на основе полногеномных исследований ассоциаций и других современных подходов осуществляется поиск общих наследственно обусловленных механизмов развития АГ и ЦМА, позволяющих объяснить значительное число случаев ЦМА без АГ, несоответствие между тяжестью АГ и выраженностью церебрального поражения, неэффективность антигипертензивной терапии в сдерживании прогрессирования ЦМА. Определенная роль в развитии заболеваний отводится эпигенетическим маркерам, по всей видимости, играющим важную модулирующую роль.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА артериальная гипертензия, генетика, церебральная микроангиопатия, эпигенетика.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АГ – артериальная гипертензия; ГИБВ – гиперинтенсивность белого вещества; ЛИ – лакунарные инфаркты; ЦМА – церебральная микроангиопатия; GWAS – полногеномный поиск ассоциаций; РААС – ренин-ангиотензин-альдостероновая система; CADASIL – cerebral autosomal dominant arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (церебральная аутосомно-доминантная артериопатия с субкортикальными инфарктами и лейкоэнцефалопатией); CARASIL – cerebral autosomal recessive arteriopathy with subcortical infarcts and leukoencephalopathy (церебральная аутосомно-рецессивная артериопатия с субкортикальными инфарктами и лейкоэнцефалопатией), RVCL – retinal vasculopathy with cerebral leukodystrophy (васкулопатия сетчатки с церебральной лейкодистрофией).

ВВЕДЕНИЕ

Артериальная гипертензия (АГ) на протяжении многих десятилетий занимает ведущее положение в структуре заболеваемости и смертности населения во всем мире. АГ диагностируется в среднем у каждого третьего взрослого, имеет возрастзависимый характер и тенденцию к продолжению роста в ближайшие десятилетия [1–4]. Церебральные осложнения АГ возникают наиболее рано, доминируют и вносят наибольший вклад в структуру смертности, связанной с АГ [5–7]. Ассоциированное с АГ поражение мелких артерий, артериол, капилляров и венул головного мозга приводит к развитию прогрессирующей церебральной микроангиопатии (ЦМА) (в России

входит в более широкое понятие дисциркуляторной энцефалопатии, в зарубежной литературе обозначается как small vessel disease) – одной из основных причин инсультов и деменции [5, 8–14]. В настоящее время установлена связь гиперинтенсивности белого вещества (ГИБВ, ранее лейкоареоз) – признанного нейровизуализационного маркера ЦМА, с длительностью и профилем АГ, когнитивными нарушениями/деменцией, инвалидизацией, риском инсульта и смерти [10, 15–24], а также возможность замедления прогрессирования ГИБВ и когнитивных нарушений при адекватной антигипертензивной терапии [11, 25, 26]. Косвенным подтверждением последнего могли бы стать и недавние результаты Фремингемского

исследования, показавшие снижение частоты сосудистой деменции у лиц со средним и высшим образованием, что, предположительно, обусловлено их большей информированностью, доступностью медицинской помощи и приверженностью терапии. Однако уменьшение распространенности большинства сосудистых факторов риска в данной группе лиц, включая контроль АД, не смогло в должной мере объяснить снижение частоты деменции [27]. Кроме того, хорошо известное из клинической практики отсутствие прямых корреляций между тяжестью АД и выраженностью клинических и нейровизуализационных проявлений ЦМА, а также возможность развития ЦМА у лиц среднего и пожилого возраста без АД, указывают на неоднозначность взаимоотношений ЦМА и АД и невозможность рассмотрения гипотензивной терапии как единственной стратегии при ведении больных с ЦМА с целью предотвращения ее прогрессирования.

Эпидемиологический анализ выявляет высокий коэффициент наследуемости лейкоареоза при семейных и близнецовых исследованиях (55–71%) [28], а также перекрытие более чем на 1/3 (36%) наследственных факторов контроля пульсового артериального давления и показателей фракционной анизотропии белого вещества головного мозга [29]. В этой связи можно предположить, что тесную взаимосвязь АД и ЦМА можно объяснить общими генетическими нарушениями.

Влияние на развитие обоих заболеваний общих факторов внешней среды, включая питание и образ жизни, может указывать на участие единых эпигенетических механизмов регуляции экспрессии генов. С этим согласуются уже упоминавшиеся результаты Фремингемского исследования [27]. Приверженность здоровому образу жизни и питанию, более ожидаемое среди лиц с высоким образованием, может быть одним из объяснений снижения деменции в данной популяции.

ГЕНЕТИКА АД И ЦМА

К основным направлениям генетических исследований АД и ЦМА относятся:

- изучение моногенных (менделевских) форм;
- анализ генов-кандидатов, ассоциированных с известными признаками/механизмами развития заболеваний;
- полногеномный поиск ассоциаций (GWAS, Genome Wide Association Studies) – уточнение нуклеотидных вариантов, ассоциированных с АД и ЦМА.

Моногенные формы АД и ЦМА

Число моногенных (менделевских) форм АД и ЦМА, известных к настоящему времени, невелико.

Моногенные формы АД имеют крайне низкую встречаемость в популяции [30]. Несмотря на патогенетическую гетерогенность, все они связаны с мутациями в компонентах ренин-ангиотензин-альдостероновой системы (РААС), конечной точкой действия которых является нарушение экскреции натрия с мочой. Ниже перечислены основные гены, мутационные повреждения которых ассоциированы с конкретными формами ЦМА (табл. 1). К наиболее известным моногенным формам ЦМА относятся CADASIL, обусловленный мутацией в гене рецептора NOTCH3, локализованном на хромосоме 19q12; CARASIL (мутации в кодирующей сериновую пептидазу 1 гене HTRA1, локализованном на хромосоме 10q25), аутосомно-доминантная форма COL4A1 (картированный на хромосоме 13q34 ген COL4A1, кодирующий α 1-коллаген типа IV), RVCL (хромосома 3p21, ген TREX1, кодирующий ДНК-азу III, обладающую 3'–5'-экзонуклеазной активностью) и болезнь Фабри (X-сцепленное заболевание, вызывается мутациями в гене GLA, кодирующем α -галактозидазу А, хромосома Xq22) [31]. При всех этих формах ЦМА измененный белковый продукт приводит к потере структурно-функциональной целостности мелких артерий с последующим вторичным поражением вещества головного мозга. CADASIL – наиболее часто диагностируемая наследственная ЦМА. Ее ориентировочная распространенность составляет 4,6/100000 взрослого населения, а частота мутаций в гене NOTCH3 – 10,7/100000 взрослых [32]. У большинства больных CADASIL АД отсутствует, однако при ее наличии у носителей определенных полиморфизмов в гене NOTCH3 повышен риск поражения белого вещества головного мозга [33]. Точная информация о распространенности других моногенных ЦМА неизвестна, и анализ встречаемости АД отсутствует.

Гены-кандидаты АД и ЦМА

Основные направления поиска генов-кандидатов, определяющих индивидуальный риск развития заболеваний, включают исследование генов ключевых компонентов РААС, эндотелия, гемостаза, воспаления и иммунного ответа, нейротрофических факторов и некоторых других (табл. 2) (названия генов/полиморфизмов/белков приведены в соответствии с международной номенклатурой <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/guide/human/>).

По всей видимости, исключительную значимость для развития АД имеет нарушение функционирования РААС. Дисбаланс в работе звеньев РААС ассоциирован с вазоконстрикцией, нарушением электролитного баланса с задержкой натрия и воды, ремоделированием сосудов [30]. Наиболее хорошо изучена роль в этих процессах генов ангиотензиногена

Таблица 1. Моногенные формы ЦМА

Заболевание	Локус	Ген	Белковый продукт	Тип наследования	Клинические проявления	Картина МРТ	Морфологические изменения в сосудистой стенке
CADASIL	19q12	<i>NOTCH3</i>	NOTCH3-рецептор	Аутосомно-доминантный	Мигрень с аурой, лакунарные инсульты, когнитивные нарушения/деменция, психические расстройства	ГИБВ в полюсах височных долей, наружных капсулах, субкортикальные ЛИ	Накопление осmioфильных депозитов
CARASIL	10q25	<i>HTRA1</i>	HtrA, сериновая пептидаза 1	Аутосомно-рецессивный	Когнитивные нарушения, лакунарные инсульты, алопеция, боль в нижней части спины	Субкортикальные ЛИ	Распространенная дегенерация гладкомышечных клеток
COL4A1	13q34	<i>COL4A1</i>	α 1-коллаген типа IV	Аутосомно-доминантный	Порэнцефалия, детские церебральные параличи, аномалия Аксенфельда-Ригера, нефропатия, крампи, катаракта, ретинальные кровоизлияния	ГИБВ, ЛИ, субкортикальные микрокровоизлияния	Повреждение базальной мембраны
RVCL	3p21	<i>TREX1</i>	ДНК-аза III с 3'-5'-экзонуклеазной активностью	Аутосомно-доминантный	Васкулопатия сетчатки, мигрень, когнитивные нарушения, психические расстройства, феномен Рейно, цирроз печени, нефропатия, остеонекроз	Субкортикальные ЛИ, ГИБВ	Повреждение базальной мембраны
Болезнь Фабри	Xq22	<i>GLA</i>	α -галактозидаза А	X-сцепленный	Ангиокератомы, акропарестезии, поражение почек и сердца, изменения лицевого черепа	ГИБВ, ЛИ в вертебрально-базиллярной системе, долихоэктазия основной артерии	Накопление лизосомальных депозитов в эндотелиальных и гладкомышечных клетках

(AGT), ангиотензинпревращающего фермента (ACE), альдостеронсинтазы (*CYP11B2*). Результаты, полученные при изучении значимости генов рецепторов типа 1 и 2 ангиотензина II (*AGTR1*, *AGTR2*) и ренина, противоречивы [34–36].

Ген AGT ангиотензиногена (хромосома 1q42). Ген *AGT* относится к суперсемейству генов серпинов, экспрессируется в мозге, печени, сердце, жировой ткани, в почках и стенках сосудов и кодирует предшественник ангиотензина II (AGTII) – физиологического регулятора артериального давления (АД) и водно-солевого обмена. Показано, что среди значительного числа молекулярных вариантов гена *AGT* только полиморфизмы rs699C > T (кодон M235T) и rs4762C > T (кодон T174M) связаны с АД и уровнем ангиотензиногена в плазме крови европейцев и бе-

лых американцев [37, 38]. Следует отметить неоднозначные результаты, полученные при попытках повторения этих исследований [39, 40].

Согласно [41], гомозиготный генотип кодона M235T гена *AGT* значимо и независимо от АД связан с прогрессированием поражения мозга при ЦМА, но не с каротидным атеросклерозом, что позволило предложить этот генотип в качестве генетического маркера прогрессирующего поражения мозга при ЦМА. В то же время число лакун, выявляемых в мозге носителей данного генотипа, было значительно меньше, чем у гетерозиготных носителей [35]. Последнее объясняют вероятным участием ангиотензиногена в процессах тромбообразования. Косвенным подтверждением может быть независимая от повышения АД связь полиморфизма гена *AGT* с развитием лакунарного инфаркта [35]. Исследование по-

Таблица 2. Взаимосвязь генов-кандидатов с МРТ-маркерами ЦМА и/или АГ

Ген	Полиморфизм	Взаимосвязь	
		МРТ-маркеры ЦМА	АГ
<i>AGT</i>	rs699	Лакуны [35, 41], ГИБВ [41] Потеря микроструктуры трактов белого вещества [46] Не подтверждена [42, 45]	Установлена [37, 8] Не подтверждена [39, 40]
<i>AGT</i>	rs4762	Не подтверждена [42]	Установлена [37, 38] Не подтверждена [39, 40]
<i>AGT</i>	-20A>C	ГИБВ [45]	Установлена [45]
<i>ACE</i>	I/D Alu-последовательности	ГИБВ [52–55] Не подтверждена [46]	Установлена [47–52]
<i>CYP11B2</i>	rs1799998	ГИБВ, расширение периваскулярных пространств [36, 56]	Нет данных
<i>NOS1</i>	rs3782218	Данные противоречивы	Установлена [59]
<i>NOS3</i>	rs3918226	Данные противоречивы	Установлена [59]
<i>NOS3</i>	rs3918227	Данные противоречивы	Установлена [59]
<i>EDN1</i>	rs5370	Не подтверждена [45]	Установлена [63, 64]
<i>MTHFR</i>	rs1801133	ГИБВ, ЛИ [65, 66] Не подтверждена [55, 67, 68]	Установлена [65, 66]
<i>PLAT</i>	rs2020918	ЛИ [71, 72]	Нет данных
<i>FGB</i>	rs1800790	ЛИ [73]	Нет данных
<i>IL1B</i>	rs16944	ЛИ [78], ГИБВ [81]	Нет данных
<i>IL6</i>	rs1800795	ЛИ [79], ГИБВ [80]	Не подтверждена [74]
<i>IL6</i>	rs1800796	ЛИ [80]	Установлена [75]
<i>TNFA</i>	rs1800629	Нет данных	Установлена [75]
<i>MMP2</i>	rs243865	ГИБВ [85]	Нет данных
<i>MMP2</i>	rs1030868 rs2241145 rs2287074 rs2287076 rs7201	ЛИ [84]	Нет данных
<i>MMP9</i>	rs3918242	Нет данных	Установлена [78]
<i>CRP</i>	rs3091244	ГИБВ [81]	Нет данных
<i>VEGF</i>	rs2010963	ЛИ [86]	Установлена [86]
<i>BDNF</i>	rs6265	ГИБВ [87]	Нет данных

лиморфизмов С521Т (Т174М, Т207М), rs699 (Т704С) гена *AGT* в популяции Забайкалья не выявило их связи с развитием хронической ишемии мозга, наиболее вероятно связанной с ЦМА [42]. Анализ группы из 410 взрослых 50–75 лет с характерными для ЦМА изменениями, выявленными методом МРТ, показал, что четыре наиболее частые мутации в промоторной части гена комбинируются в гаплотипы. При этом В-гаплотип (-6:А, -20:С, -153:G, -218:G) независимо от АГ является фактором риска изменений в головном мозге. Установлено, что гомозиготность (В/В) данного гаплотипа в восемь и более раз повышает риск поражения головного мозга при ЦМА [43]. В-гаплотип, как показано в дальнейшем, усиливает основную транскрипционную активность про-

мотора *AGT* в астроцитах – основном месте синтеза *AGT* в головном мозге, что указывает на возможную связь поражения белого вещества с нарушением активности РААС [44]. В более позднем исследовании взаимосвязь отдельных полиморфизмов в генах *ACE* и *AGT* с поражением белого вещества при ЦМА не была выявлена. Исключение составил полиморфизм -20А > С в промоторной области гена *AGT*, ассоциированный с лейкоареозом у больных с АГ [45]. Недавно у здоровых лиц пожилого возраста была установлена связь между полиморфизмом М268Т (ранее М235Т) гена *AGT* и потерей микроструктуры некоторых участков белого вещества головного мозга, оцениваемой по фракционной анизотропии при проведении МРТ [46].

Ген ACE ангиотензинпревращающего фермента (хромосома 17q23). Ангиотензинпревращающий фермент осуществляет превращение ангиотензина-1 в мощный вазопрессор ангиотензин-2; расщепляет брадикинин – стимулятор образования эндотелиального NO – до неактивных метаболитов; регулирует выделение альдостерона. Наиболее устойчиво с АГ связан инсерционно-делеционный (I/D) полиморфизм в интроне 16 гена ACE, определяемый по наличию/отсутствию Alu-повтора. Установлено, что сочетание аллелей II+ID I/D-полиморфизма с ежедневным употреблением более 2300 мг соли сопряжено с АГ и последующим ожирением [47]. Установлена связь D-аллеля I/D-полиморфизма с диастолической и систолической АГ, суточной вариабельностью АД, а также с поражением органов-мишеней [48–52]. Показана значимость D/D-генотипа в развитии поражений головного мозга при ЦМА [53, 54] и для прогнозирования развития данного поражения [55].

Ген альдостеронсинтазы (CYP11B2, хромосома 8q24.3). Альдостеронсинтаза катализирует синтез альдостерона из дезоксикортикостерона. Альдостерон увеличивает канальцевую реабсорбцию Na^+ и выведение K^+ , что повышает способность тканей удерживать воду. Протективное действие С-аллеля полиморфизма rs1799998 (-344Т > С) CYP11B2 проявляется при лейкоареозе и расширении периваскулярных пространств [36, 56].

Гены, влияющие на функцию эндотелия

В число этих генов входят ген *NOS1*, кодирующий нейрональную (nNOS) NO-синтазу (хромосома 12q24.2–q24.3), и ген *NOS3* эндотелиальной (eNOS) NO-синтазы (хромосома 7q35–q36). Важную роль в поддержании гомеостаза эндотелия играет NO. Нарушение продукции NO приводит к срыву физиологической вазодилатации, повышению агрегации и адгезии тромбоцитов, пролиферации и миграции гладкомышечных клеток, воспалению – главных патофизиологических механизмов АГ и ЦМА. Ингибирование гена *NOS1* в продолговатом мозге и гипоталамусе связано с патогенезом системной гипертензии [57]. Полногеномный поиск ассоциаций факторов риска ишемического инсульта указывает на *NOS1* как на потенциальный ген-кандидат [58]. Среди 58 однонуклеотидных замен в генах *NOS* ассоциированными с АГ оказались полиморфные сайты rs3782218 в *NOS1*, rs3918226 и rs3918227 в *NOS3* [59]. Данные российских исследователей, изучавших связь полиморфизма rs1799983 (G298A, G894T) и 4a/4b гена *NOS3* с АГ и ремоделированием стенки крупных церебральных артерий, противоречивы [60–62]. Устойчиво

воспроизводимые результаты, касающиеся значения полиморфизмов *NOS* в развитии ЦМА, не получены.

Ген эндотелина-1 (EDN1, хромосома 6p24.1). Установлена связь полиморфизмов rs5370G > T (кодон K198N) гена *EDN1*, кодирующего мощный вазоконстриктор эндотелин, с развитием АГ [63, 64]. Роль полиморфизмов в генах эндотелинов и их рецепторов при ЦМА не подтверждена [45].

Ген метилентетрагидрофолатредуктазы (MTHFR, хромосома 1p36.22). Метилентетрагидрофолатредуктаза участвует в превращении гомоцистеина в метионин в присутствии кофакторов – витаминов В6, В12, и субстрата – фолиевой кислоты. Большинство популяционных исследований подтверждает связь полиморфизма rs1801133C > T (С677Т) в гене *MTHFR* с гипергомоцистеинемией и развитием ЦМА (объемом ГИБВ или лакунарными инфарктами) у больных с АГ и без нее [65, 66]. Однако в значительной части работ не выявлено отсутствия связи полиморфизма С677Т с ГИБВ [55, 67, 68]. Исследования, оценивавшие суммарный эффект носительства нескольких полиморфизмов, обнаружили значимое нарастание ЦМА (ГИБВ, лакунарные инфаркты) при сочетании варианта С677Т гена *MTHFR* с D/D-генотипом I/D-полиморфизма гена ACE. В то же время комбинация одного из генотипов 2/2, 2/3, 4/4, 4/3 гена APOE (хромосома 19q13, белковый продукт аполипопротеин E) с *MTHFR* С677Т или D/D-генотипа ACE может выступать в качестве независимого генетического фактора риска лейкоареоза [69, 70].

Гены системы гемостаза

Противоречивые данные получены о связи полиморфизма rs2020918 (-7351C/T) в гене тканевого активатора плазминогена (*PLAT*, или *TPA*) с развитием лакунарных инфарктов [71, 72]. Показана взаимосвязь AA-генотипа полиморфизма rs1800790 (455G/A) гена фибриногена (*FGB*) с повышенным риском развития множественных лакунарных инфарктов [73].

Гены иммунного ответа и воспаления

Наибольшее число работ по изучению патогенетической значимости мутаций в генах показателей воспаления посвящено генетическим вариантам цитокинов. Установлена связь полиморфизмов rs1800796 (-572G > C) гена интерлейкина-6 (*IL6*) [74] и rs1800629 (308G > A) гена *TNFA*, кодирующего фактор некроза опухоли альфа, с развитием АГ в азиатской популяции [75]. Полиморфизмы гена *TNFA* влияют на течение АГ и в популяции Центрального Черноземья России [76]. Полиморфизм rs3918242

(-1562C > T) в гене матриксной металлопротеиназы-9 (*MMP9*) ассоциирован с риском развития АГ [77].

Исследование полиморфизма rs16944 (-511C > T) в гене интерлейкина-1 β (*IL1B*) выявило преобладание генотипа Т/Т у пациентов с лакунарными инсультами по сравнению с другими подтипами инсультов. Анализ с учетом сопутствующих факторов позволил сделать заключение о Т/Т-генотипе гена *IL1B* (полиморфизм -511C > T) как о независимом факторе риска инсульта при ЦМА [78]. Показана также связь С/С-генотипа полиморфизма rs1800795 (-174G > C) гена *IL6* с лакунарным инсультом и повышенным риском ГИБВ [79, 80], а полиморфизма rs1800796 (-572G > C) – с развитием бессимптомных инфарктов [80]. Нарастание ГИБВ выявлено у лиц старшего и пожилого возраста без неврологического дефицита, гомозиготных носителей Т-аллеля гена *IL1B* rs16944 (-511C > T) и Т-аллеля в положении -286 (rs3091244) гена *CRP* С-реактивного белка (СРБ) [81]. Установлено повышение частоты носительства гомозиготных вариантов полиморфизмов: -31СС гена *IL1B*, -174GG гена *IL6*, -197AA гена *IL17A*, -166ArgArg гена *IL17F*; аллелей IL-1 β -31C гена *IL1B*, IL17F-166Arg гена *IL17F* у пожилых больных с хронической ишемией, с наибольшей вероятностью связанной с ЦМА, в популяции Забайкалья России [82]. Не обнаружено ассоциации гаплотипов/полиморфизмов гена *CRP* с ЦМА [83]. Показано, что носительство аллельных вариантов rs1030868:g.T, rs2241145:g.C, rs2287074:g.A, rs2287076:g.C и rs7201:g.C гена *MMP2* сопряжено с риском развития лакунарных инфарктов, аллель rs7201:g.C является независимым фактором риска их развития [84], а генотип С/С гена *MMP2* (rs243865, 1306T > C) играет независимую предиктивную роль в развитии лейкоареоза [85].

Гены трофических факторов

Установлена связь полиморфизма rs2010963 (-634G > C) гена фактора роста эндотелия сосудов (*VEGF*) с развитием лакунарного инсульта [86]. Выявлена разнонаправленность влияния гомозиготного носительства различных аллелей кодона Val66Met (rs6265) гена нейротрофического фактора мозга (*BDNF*) при ГИБВ и когнитивных нарушениях: аллель Met является защитным, аллель Val – повреждающим [87].

Таким образом, к настоящему времени изучено значительное число генов, отобранных на основе данных о причинах и механизмах развития заболеваний. Установленные и воспроизводимые взаимосвязи полиморфизмов этих генов с АГ и ЦМА позволяют рассматривать их в качестве факторов риска заболеваний. Однако большинство исследователей ука-

зывают, что совокупные данные объясняют лишь небольшую часть случаев АГ и ЦМА и особенности их течения, а нередкие противоречия в результатах обусловлены невозможностью их повторения на других выборках [88]. Данные о независимой от АГ связи мутаций в ключевых факторах патогенеза, например, ТТ-генотипа (полиморфизм М235Т) и В-гаплотипа гена *AGT* с развитием и прогрессированием ЦМА подтверждают неоднозначность взаимоотношений ЦМА и АГ. Кроме того, зависимость клинической значимости мутаций от факторов внешней среды, в частности, развитие АГ и ожирения у носителей I/D-полиморфизма в гене *ACE* и влияние ежедневного употребления высокосолевого диеты [47] подтверждают необходимость уточнения воздействия факторов внешней среды на генную экспрессию при изучении механизмов АГ и ЦМА. Подход, основанный на изучении генов-кандидатов, имеет определенные ограничения в оценке многообразия возможных вариантов взаимодействия и перекрытия наследуемых особенностей.

ПОЛНОГЕНОМНЫЙ ПОИСК АССОЦИАЦИЙ (GWAS)

К настоящему времени проведено несколько полногеномных исследований, направленных на уточнение локусов, связанных с АГ и ЦМА (табл. 3). Однако лишь немногие из таких исследований обнаружили локусы с полногеномной значимостью ($p < 5 \times 10^{-8}$).

Консорциум BPGen (Global Blood Pressure Genetics) и консорциум CHARGE (the Cohorts for Heart and Ageing Research in Genome Epidemiology) в результате анализа 34433 и 29136 лиц соответственно выявили восемь локусов, связанных с АГ, три из которых оказались общими в обоих исследованиях [89, 90]. В последующем консорциум ICBP GWAS (International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies) проанализировал данные 200000 лиц и выявил 29 локусов, шесть из которых были определены ранее как значимые для АГ [91]. Многие из этих локусов рассматриваются как вероятные кандидаты, включая гены *NPPA* и *NPPB*, кодирующие натрийуретические пептиды.

В 2011 году консорциум CHARGE провел первый полногеномный поиск ассоциаций с ГИБВ среди 9361 лица европейского происхождения без инсульта в анамнезе (средний возраст 69.5 лет, 42.6% мужчины) [92]. Выявлено шесть однонуклеотидных полиморфизмов с полногеномным уровнем значимости, ассоциированных с высоким риском развития ГИБВ. Из них наибольшую связь с выраженностью ГИБВ показал rs3744028 в гене *TRIM65*. Полиморфизмы были картированы в едином генетическом локусе – участке хромосомы 17q25, содержащем семь основных генов – *WBP2*, *TRIM65*, *TRIM47*, *MRPL38*, *FBF1*,

Таблица 3. Результаты полногеномных исследований ассоциаций (GWAS) АГ и ЦМА

Исследование	Однонуклеотидный полиморфизм	Локус	P-значение	
			Систолическое АД	Диастолическое АД
АГ				
Global BPGen (Global Blood Pressure Genetics) [89] Размер выборки – 34 433 человека	rs17367504 rs11191548 rs12946454 rs16998073 rs1530440 rs653178 rs1378942 rs16948048	1p36 10q24 17q21 4q21 10q21 12q24 15q24 17q21	1×10^{-5} 3×10^{-17} 4×10^{-6}	7×10^{-9} 3×10^{-6} 1×10^{-7} 6×10^{-8} 5×10^{-6}
CHARGE (The Cohorts for Heart and Ageing Research in Genome Epidemiology) [90] Размер выборки – 29 136 человек	rs1004467 rs381815 rs2681492 rs2681472 rs3184504 rs9815354 rs11014166 rs2384550 rs6495122	10q24 11p15 12q21 12q21 12q24 3p22 10p12 12q24 15q24	1.99×10^{-6} 5.76×10^{-7} 3.01×10^{-11} 5.73×10^{-7}	3.74×10^{-8} 1.68×10^{-8} 7.88×10^{-7} 8.82×10^{-7} 1.32×10^{-7} 8.10×10^{-7}
ICBP GWAS (International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies) [91] Размер выборки – 200 000 человек	rs2932538 rs13082711 rs419076 rs13107325 rs13139571 rs1173771 rs11953630 rs1799945 rs805303 rs4373814 rs932764 rs7129220 rs633185 rs2521501 rs17608766 rs1327235 rs6015450 rs17367504 rs3774372 rs1458038 rs1813353 rs4590817 rs11191548 rs381815 rs17249754 rs3184504 rs10850411 rs1378942 rs12940887	1p13 3p24 3q26 4q24 4q32 5p13 5q33 6p22 6p21 10p12 10q23 11p15 11q22 15q26 17q21 20p12 20q13 1p36 3p22 4q21 10p12 10q21 10q24 11p15 12q21 12q24 12q24 12q24 17q21	1.2×10^{-9} 1.5×10^{-6} 1.8×10^{-13} 3.3×10^{-14} 1.2×10^{-6} 1.8×10^{-16} 3.0×10^{-11} 7.7×10^{-12} 1.5×10^{-11} 4.8×10^{-11} 7.1×10^{-16} 3.0×10^{-12} 1.2×10^{-17} 5.2×10^{-19} 1.1×10^{-10} 1.9×10^{-8} 3.9×10^{-23} 8.7×10^{-22} 0.39 1.5×10^{-23} 2.6×10^{-12} 4.0×10^{-12} 6.9×10^{-26} 5.3×10^{-11} 1.8×10^{-18} 3.8×10^{-18} 5.4×10^{-8} 5.7×10^{-23} 1.8×10^{-10}	9.9×10^{-10} 3.8×10^{-9} 2.1×10^{-12} 2.3×10^{-17} 2.2×10^{-10} 9.1×10^{-12} 3.8×10^{-11} 1.5×10^{-15} 3.0×10^{-11} 4.4×10^{-10} 8.1×10^{-7} 6.4×10^{-8} 2.0×10^{-15} 1.9×10^{-15} 0.017 1.4×10^{-15} 5.6×10^{-23} 3.5×10^{-19} 9.0×10^{-14} 8.5×10^{-25} 2.3×10^{-15} 1.3×10^{-12} 9.4×10^{-13} 5.3×10^{-10} 1.2×10^{-14} 3.6×10^{-25} 5.4×10^{-10} 2.7×10^{-26} 2.3×10^{-14}
ГИБВ				
CHARGE (The Cohorts for Heart and Ageing Research in Genome Epidemiology) [92] Размер выборки – 9 361 человек	rs3744028 rs1055129 rs3744017 rs936393 rs9894383 rs11869977	17q25	4.0×10^{-9} 4.1×10^{-8} 7.3×10^{-9} 6.8×10^{-9} 5.3×10^{-9} 5.7×10^{-9}	
Мультиэтническое GWAS-исследование [96] Размер выборки – 21 079 человек	rs72848980 rs7894407 rs7214628 rs12357919 rs7909791 rs78857879 rs2984613 rs11679640	17q25 17q25 17q25 10q24.33 10q24.33 2p16.1 1q22 2p21	2.6×10^{-9} 2.6×10^{-8} 5.1×10^{-9} 1.5×10^{-8} 2.9×10^{-9} 1.5×10^{-8} 2.0×10^{-8} 2.1×10^{-6}	

*Жирным шрифтом выделены локусы, которые установлены при разных исследованиях.

ASOX1, UNC13D. Все эти гены вовлечены в процессы нейровоспаления и функционирования иммунной системы. Результаты данного мета-анализа были воспроизведены в последующих исследованиях [93–95].

В 2015 году были опубликованы результаты мультиэтнического полногеномного исследования ассоциаций с ГИБВ [96], в котором приняли участие 21079 лиц среднего возраста без деменции и инсульта, отобранных из 29 популяционных когорт: 17936 – европейского, 1943 – африканского, 795 – латиноамериканского, 405 – азиатского происхождения. Полученные данные подтвердили связь участка хромосомы 17q25 с риском развития ГИБВ, также выявлены три локуса (хромосомы 10q24, 1q22, 2p16.1), связанных с ГИБВ более чем в одной популяции. Показано, что генетические локусы, регулирующие систолическое и диастолическое АД, связаны и с возникновением ГИБВ. Новый локус на хромосоме 10q24, содержащий в интронах генов *PDCD11, NEURL, SH3PXD2A, TAF5, CALHM1* полиморфизмы, которые характеризуются полногеномным уровнем значимости, также ассоциирован с возникновением новообразований головного мозга (медуллобластомы, астроцитомы, глиомы), а *CALHM1* – и с регуляцией кальциевого гомеостаза, и с образованием амилоида А-бета. Ранее была установлена связь полиморфизма rs2984613 (хромосома 1q22, гены *PMF1* и *SLC25A44*) с нелобарным внутримозговым кровоизлиянием [97].

В 2015 году были опубликованы также результаты полногеномного анализа ассоциаций с прогрессирующим поражением белого вещества у пожилых лиц европейского происхождения [98]. Прогрессирование поражения белого вещества наблюдали у 1085 (14%) участников исследования, что позволило сделать вывод о невысокой значимости генетических факторов в прогрессировании этого поражения у пожилых. Полученные данные объяснили возможным упущением значимых полиморфизмов, относительно небольшим периодом наблюдения для суждения о вкладе генетических факторов в прогрессирование, а также возрастом участников исследования. Высказано предположение о возможной роли генетических факторов в прогрессировании поражений белого вещества у лиц молодого возраста.

Таким образом, проведенные полногеномные исследования ассоциаций ГИБВ и АД позволили выявить локусы, гены которых связаны одновременно и с ГИБВ, и с вариабельностью АД. Понимание биологических функций данных генов, оценка их перекрывания и взаимодействия позволят приблизиться к пониманию молекулярных механизмов ГИБВ и их взаимоотношений с АД, их участия в старении и развитии дегенеративного поражения. Полученные

результаты подтверждают многофакторность заболеваний, зависимость их течения от комбинации факторов и их взаимодействия. Однако в настоящее время совокупный эффект локусов АД, идентифицированных методом GWAS, способен объяснить лишь менее 3% клинически значимой вариабельности АД [99].

ЭПИГЕНЕТИКА АД И ЦМА

Эпигенетические исследования при АД и ЦМА многочисленны и посвящены преимущественно влиянию потенциально модифицируемых факторов внешней среды, образа жизни и питания на экспрессию генов [100].

Известно, что к основным механизмам эпигенетической модуляции экспрессии генов относятся метилирование ДНК, модификации хроматина (в том числе гистонов), регуляция микроРНК [101–103].

Метилирование ДНК

Метилирование позволяет регулировать активность генов путем присоединения к цитозиновым основаниям ДНК метильной группы, что нарушает синтез РНК и соответственно трансляцию. Функционально гиперметилирование должно приводить к «выключению» (silencing), а гипометилирование – к активации гена [100].

Установлено, что дефицит белка в корме беременных крыс приводит к гипометилированию промотора гена *ACE*, вызывая у потомков этих крыс предрасположенность как к АД, так и к когнитивным нарушениям [104]. Обратная корреляция между метилированием гена *ACE*, активностью ангиотензин-превращающего фермента и систолическим АД наблюдается у детей. При этом у детей с DD-генотипом и низким весом уровень метилирования значительно ниже, чем у детей с нормальным весом [105]. На китайской популяции показана зависимость риска АД от уровня метилирования сайтов CpG1 и CpG2-5 гена *ADD1* (аддуцина) у женщин и мужчин соответственно, а также промотора данного гена при отсутствии гендерных различий [106]. Гиперметилирование промотора гена *HSD11B2* (11β-гидроксистероид-дегидрогеназа) приводит к нарушению превращения кортизола в кортизон, повышению индекса тетрагидрокортизол/тетрагидрокортизон (активные метаболиты кортизола и кортизона) и развитию АД у людей [107, 108]. Гипометилирование гена *NKCC1* (Na-K-2Cl котранспортер-1) у гипертензивных крыс сопряжено с повышением активности NKCC1 и развитием АД [109]. Установлена взаимосвязь между метилированием и экспрессией гена *NET* (транспортер норэпинефрина) у пациентов с АД и паническими атаками [110].

В единственном микроматричном анализе метилирования ДНК при ЦМА были выявлены в разной степени метилированные гены, связанные с возникновением и прогрессированием лейкоареоза. Так, обнаружено гиперметилирование локализованного на хромосоме 8q24 гена *NDRG1* (цитоплазматический белок, кодируемый этим геном, участвует в процессах защиты миелиновой оболочки в периферической нервной системе, дифференцировке клеток, метастировании опухолей и гипоксии, воспалительном ответе и др.), а ген *BRUNOL4*, или *CELF4* (хромосома 18q12, белок BRUNO-like 4, определяющий стабильность мРНК), был гипометилирован по сравнению с контрольной группой с нормальной нейровизуализационной картиной [111].

Модификация гистонов

Гистоны (H1/H5, H2A, H2B, H3, H4) – основные белки хроматина, участвующие в упаковке ДНК в ядре посредством формирования нуклеосом. Участие гистонов в механизмах эпигенетической регуляции ядерных процессов обеспечивается наличием подвижного N-концевого фрагмента («хвоста») нуклеосомы, состоящего из 20 аминокислот. Модификация N-концевого фрагмента при участии различных ферментов (метилование аргинина, ацетилирование лизина, фосфорилирование серина и треонина, убиквитинирование и др.) влияет на взаимодействие гистонов с ДНК. Отделение гистона делает упаковку ДНК менее плотной и доступной для белков-регуляторов, что приводит к повышению активности гена, тогда как более плотная упаковка снижает активность гена. Так, ацетилирование гистонов усиливает транскрипцию, в то время как деацетилирование ее угнетает; метилирование лизина ингибирует, а аргинина – активизирует транскрипцию; гиперметилирование или монометилирование лизина может оказывать противоположный эффект – выключать или активировать гены-мишени [112].

Ферментативные каскады, запускаемые альдостероном при гипометилировании Lys79 гистона H3, сопряжены с активацией промотора гена эпителиальных Na⁺-каналов, что приводит к увеличению Na-каналов в дистальных отделах нефрона, сАМР-опосредованной реабсорбции натрия и развитию АГ [113]. Гиперметилирование гистона H3, обусловленное дефицитом лизин-специфической деметилазы-1 (LSD-1), приводило к развитию АГ у мышей, получавших высокосолевого корм [114]. На модели трансгенных мышей показана возможность запуска симпатической активации при первичной стимуляции В2-адренорецепторов посредством ацетилирования гистонов H3 и H4 с последующим «выключением» промотора гена *WNK4* (серин-треониновая киназа).

Это приводит к сверхэкспрессии Na⁺Cl⁻котранспортера, а также эпителиальных Na⁺-каналов, реабсорбции натрия и развитию АГ [115]. Показано, что ацетилирование H3 в нейронах *area postrema* сопряжено с изменением чувствительности катехоламинергических нейронов сосудистого центра продолговатого мозга, последующей стволовой симпатической активацией и АГ [116].

Регуляция микроРНК

МикроРНК (miR) – эндогенные, некодирующие РНК длиной ~ 22 нуклеотида, которые регулируют активность генов как на транскрипционном уровне, препятствуя переносу информации с ДНК на мРНК, так и на стадии трансляции, что приводит к разрушению уже синтезированной мРНК. Считается, что не менее 30% генов человека регулируется при помощи микроРНК [117]. На клетках надпочечника человека показано, что активация экспрессии miR-21 ангиотензином II приводит к повышению секреции альдостерона и усилению клеточной пролиферации [118]. MiR-124 и miR-135a влияют на экспрессию гена рецептора минералокортикоидов – *NR3C2*, вовлеченного в механизмы формирования семейной гипертензии и поддержания солевого баланса почками [119]. Повышение уровней miR-320 и miR-26b и снижение уровня miR-21 наблюдается у соль-чувствительных крыс Dahl. Предполагаемой мишенью miR-320 является рецептор инсулиноподобного фактора роста-1. Сосудистое ремоделирование, наблюдаемое при высокосолевого диете, связывают с инактивацией этих рецепторов [120]. Обнаружена взаимосвязь miR-143, miR-145, miR-21, miR-133, miR-1 с изменением гладкомышечных клеток сосудов и ремоделированием сосудистого русла при АГ. Мононуклеарные клетки периферической крови больных АГ характеризуются низким уровнем miR-143, miR-145, miR-133 и высоким miR-21, miR-1 по сравнению с контрольной группой. Показана корреляция экспрессии miR-143, miR-145, miR-133 с суточным диастолическим АД при АГ [121]. На культуре клеток коры надпочечников человека установлено, что miR-24 участвует в эпигенетической регуляции синтеза альдостерона и кортизола путем воздействия на 11β-гидроксилазу (CYP11B) – ключевой фермент синтеза этих гормонов [122].

Изучение роли микроРНК в развитии лейкоареоза при ЦМА [111] выявило восемь дифференциально экспрессирующихся микроРНК, связанных с регуляцией активности патогенетических генов и молекулярными механизмами лейкоареоза. Следует отметить, что значимость этих предполагаемых патогенетических генов подтверждена результатами GWAS (*TRIM65*, *ACOX1*), поисками генов-кандида-

тов (*AGTR2*, *MTHFR*, *BDNF*, *MMP3*, *MMP13*), профилем экспрессии генов (*CCR5*, *IL6*, *MAF*, *CALM1*, *COL24A1*, *EPHB2*, *MAP1B*, *CYB5A*, *CDC6*, *CTSC*) и эпигенетическими исследованиями (*HLA-DQA1*, *TGFBR3*, *CD80*, *WDR41*, *RNF39*, *KIAA1199*, *AAK1*). Большинство из указанных генов связано с воспалением в ЦНС [111].

Изучение роли механизмов эпигенетической дисрегуляции, приводящих к нарушению экспрессии генов при АГ и ЦМА, только начинается. Учитывая их прямую связь с факторами цереброваскулярно-го риска, можно предполагать особую значимость эпигенетических механизмов в развитии данных возраст-зависимых многофакторных заболеваний. Правомерность такого заключения подтверждается перекрываемостью результатов эпигенетических исследований с данными изучения генов-кандидатов, полногеномных исследований значимости воспаления и иммунного ответа, а также компонентов РААС в развитии ЦМА. Крайне важным представляется уточнение патогенетически важных эпигенетических маркеров в крови и цереброспинальной жидкости, возможность их использования для оценки поражения мозга и мелких сосудов, учитывая невозможность прямой прижизненной визуализации и значимость косвенных методов оценки прогрессирующего поражения мозга и мелких сосудов. Актуальность изучения механизмов эпигенетической дисрегуляции определяется не только высокой социальной значимостью заболеваний, которая будет только возрастать в условиях тенденции к старению населения, но и их потенциальной обратимостью вследствие связи с модифицируемыми факторами цереброваскулярного риска. Мы предполагаем, что важную роль

в развитии ЦМА могут играть процессы, регулируемые микроРНК. Это предположение основано на ведущей роли эндотелиальных нарушений в развитии ЦМА [10] и зависимости экспрессии основных регуляторов эндотелиальной функции от активности рибонуклеазы Dicer и соответственно микроРНК [123].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение генетической обусловленности АГ и ЦМА позволило идентифицировать новые молекулярные мишени, потенциально важные для понимания патогенетических механизмов развития этих заболеваний и их терапевтической коррекции. Однако в настоящее время невозможно объяснить, почему при очевидной роли наследственности генетические данные не вполне объясняют закономерности формирования предрасположенности к этим заболеваниям и не позволяют прогнозировать их развитие. Одним из подходов к разрешению данного противоречия может стать изучение взаимодействия гено-метаболических и иных регуляторных сетей с генами, ассоциированными с изучаемыми заболеваниями. Ближайшей задачей должен стать поиск эпигенетических маркеров, ассоциированных с различными вариантами течения АГ и ЦМА, что позволит дифференцировать значимые факторы внешней среды на индивидуальном уровне. Это станет основой поиска новых направлений профилактики и лечения данных заболеваний. Воспроизводимость результатов может быть достигнута формированием однородных групп больных, использованием единых стандартов в оценке поражения головного мозга (нейровизуализационных феноменов и терминов), методов лабораторной диагностики и постобработки. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Оганов Р.Г., Тимофеева Т.Н., Колтунов И.Е., Константинов В.В., Баланова Ю.А., Капустина А.В., Лельчук И.Н., Шальнова С.А., Деев А.Д. // Кардиоваскулярная терапия и профилактика. 2011. Т. 10. № 1. С. 9–13.
- Чазова И.Е., Ощепкова Е.В. // Вестник РАМН. 2013. № 2. С. 4–11.
- Lewington S., Clarke R., Qizilbash N., Peto R., Collins R., Prospective Studies Collaboration. // *Lancet*. 2002. V. 360. P. 1903–1913.
- Mancia G., Fagard R., Narkiewicz K., Redón J., Zanchetti A., Böhm M., Christiaens T., Cifkova R., De Backer G., Dominiczak A., et al. // *J. Hypertension*. 2013. V. 31. № 7. P. 1281–1357.
- Dahlöf B. // *Am. J. Cardiol*. 2007. V. 100. № 3. P. 17J–24J.
- Feigin V.L., Abajobir A.A., Abate K.H., Abd-Allah F., Abdulle A.M., Abera S.F., Abyu G.Y., Ahmed M.B., Aichour A.N., Akinyemi R.O., et al. // *Lancet Neurol*. 2017. V. 16. № 11. P. 877–897.
- Feigin V.L., Krishnamurthi R., Bhattacharjee R., Parmar P., Theadom A., Hussein T., Purohit M., Hume P., Abbott M., Rush E., et al. // *Stroke*. 2015. V. 46. № 6. P. 1740–1747.
- Шмидт Е.В., Максудов Г.А. // Журн. неврологии и психиатрии им С.С. Корсакова. 1971. № 71 (1). С. 3–11.
- Верещагин Н.В., Моргунов В.А., Гулевская Т.С. Патология головного мозга при атеросклерозе и артериальной гипертензии. М.: Медицина, 1997. 228 с.
- Pantoni L., Gorelick F.B. *Cerebral Small Vessel Disease*. UK: Cambridge Univ. Press, 2014. P. 1–360.
- Gorelick P.B., Scuteri A., Black S.E., Decarli C., Greenberg S.M., Iadecola C., Launer L.J., Laurent S., Lopez O.L., Nyenhuis D., et al. // *Stroke*. 2011. V. 42. № 9. P. 2674–2701.
- Meissner A. // *Cerebrovascular Diseases*. 2016. V. 42. № 3–4. P. 255–262.
- Perrotta M., Lembo G., Carnevale D. // *Int. J. Mol. Sci*. 2016. V. 17. № 347. P. 1–11.
- Gakidou E., Afshin A., Abajobir A.A., Abate K.H., Ababafati C., Abbas K.M., Abd-Allah F., Abdulle A.M., Abera S.F., Aboyans V., et al. // *Lancet*. 2017. V. 16. № 90 (10100). P. 1345–1422.
- Dufouil C., de Kersaint-Gilly A., Besançon V., Levy C., Auffray E., Brunnereau L., Alperovitch A., Tzourio C. // *Neurology*. 2001. V. 56. № 7. P. 921–926.
- de Leeuw F.E., de Groot J.C., Oudkerk M., Wittteman J.C., Hofman A., van Gijn J., Breteler M.M., et al. // *Brain*. 2002. V. 125. № 4. P. 765–762.
- van Dijk E.J., Breteler M.M., Schmidt R., Berger K., Nilsson

- L.G., Oudkerk M., Pajak A., Sans S., de Ridder M., Dufouil C., et al. // *Hypertension*. 2004. V. 44. № 5. P. 625–630.
18. van Dijk E.J., Prins N.D., Vrooman H.A., Hofman A., Koudstaal P.J., Breteler M.M. // *Stroke*. 2008. V. 39. № 10. P. 2712–2719.
19. Firbank M.J., Wiseman R.M., Burton E.J., Saxby B.K., O'Brien J.T., Ford G.A. // *J. Neurol.* 2007. V. 254. № 6. P. 713–721.
20. Dobbie S., Markus H.S. // *British Medical J.* 2010. V. 341. № c3666. P. 1–9.
21. LADIS Study Group, Poggesi A., Pantoni L., Inzitari D., Fazekas F., Ferro J., O'Brien J., Hennerici M., Scheltens P., Erkinjuntti T., et al. // *Cerebrovasc. Dis.* 2011. V. 32. № 6. P. 577–588.
22. Verhaaren B.F., Vernooij M.W., de Boer R., Hofman A., Niesse W.J., van der Lugt A., Ikram M.A. // *Hypertension*. 2013. V. 61. № 6. P. 1354–1359.
23. Abraham H.M., Wolfson L., Moscufo N., Guttmann C.R., Kaplan R.F., White W.B. // *J. Cereb. Blood Flow Metab.* 2016. V. 36. № 1. P. 132–142.
24. Filomena J., Riba-Liena I., Vinyoles E., Tovar J.L., Mundet X., Castañé X., Vilar A., López-Rueda A., Jiménez-Baladó J., Cartanyà A., et al. // *Hypertension*. 2015. V. 66. № 3. P. 634–640.
25. Godin O., Tzourio C., Maillard P., Mazoyer B., Dufouil C. // *Circulation*. 2011. V. 123. № 3. P. 266–273.
26. Chang-Quan H., Hui W., Chao-Min W., Zheng-Rong W., Jun-Wen G., Yong-Hong L., Yan-You L., Qing-Xiu L. // *Int. J. Clin. Pract.* 2011. V. 65. № 12. P. 1295–1305.
27. Satizabal C.L., Beiser A.S., Chouraki V., Chêne G., Dufouil C., Seshadri S. // *N. Engl. J. Med.* 2016. V. 374. № 6. P. 523–532.
28. Hara K. // *Rinsho Shinkeigaku*. 2010. V. 50. № 11. P. 852–854.
29. Kochunov P., Glahn D.C., Lancaster J., Winkler A., Karlsgodt K., Olvera R.L., Curran J.E., Carless M.A., Dyer T.D., Alamy L., et al. // *Hypertension*. 2011. V. 57. № 2. P. 330–335.
30. Singh M., Singh A.K., Pandey P., Chandra S., Singh K.A., Gambhir I.S. // *Clin. Exp. Hypertension*. 2016. V. 38. № 3. P. 268–277.
31. Choi J.C. // *J. Stroke*. 2015. V. 17. № 1. P. 7–16.
32. Moreton F.C., Razvi S.S., Davidson R., Muir K.W. // *Acta Neurol. Scand.* 2014. V. 130. № 3. P. 197–203.
33. Schmidt H., Zeginigg M., Wiltgen M., Freudenberg P., Petrovic K., Cavalieri M., Gider P., Enzinger C., Fornage M., Dobbie S., et al. // *Brain*. 2011. V. 134. № 11. P. 3384–3397.
34. Sierra C., Coca A., Gómez-Angelats E., Poch E., Sobrino J., de la Sierra A. // *Hypertension*. 2002. V. 39. № 2. P. 343–347.
35. Takami S., Imai Y., Katsuya T., Ohkubo T., Tsuji I., Nagai K., Satoh H., Hisamichi S., Higaki J., Ogihara T. // *Am. J. Hypertens.* 2000. V. 13. № 2. P. 121–127.
36. Brenner D., Labreuche J., Genc F., Scheltens P., Poirier O., Cambien F., Amarencu P., GENIC Investigators. // *J. Neurol.* 2008. V. 255. № 7. P. 993–1000.
37. Jeunemaitre X., Soubrier F., Kotelevtsev Y.V., Lifton R.P., Williams C.S., Charru A., Hunt S.C., Hopkins P.N., Williams R.R., Lalouel J.M., et al. // *Cell*. 1992. V. 71. № 1. P. 169–180.
38. Jeunemaitre X., Inoue I., Williams C., Charru A., Tichet J., Powers M., Sharma A.M., Gimenez-Roqueplo A.P., Hata A., Corvol P., Lalouel J.M. // *Am. J. Hum. Genet.* 1997. V. 60. № 6. P. 1448–1460.
39. Kunz R., Kreutz R., Beige J., Distler A., Sharma A.M. // *Hypertension*. 1997. V. 30. № 6. P. 1331–1337.
40. Staessen J.A., Kuznetsova T., Wang J.G., Emelianov D., Vlietinck R., Fagard R. // *J. Hypertens.* 1999. V. 17. № 1. P. 9–17.
41. Schmidt R., Schmidt H., Fazekas F., Launer L.J., Niederkorn K., Kapeller P., Lechner A., Kostner G.M. // *Hypertension*. 2001. V. 38. № 1. P. 110–115.
42. Страбмовская Н.Н. // *Сиб. мед. журн.* 2014. № 1. С. 72 – 75.
43. Schmidt H., Fazekas F., Kostner G.M., van Duijn C.M., Schmidt R. // *Stroke*. 2001. V. 32. № 2. P. 405–412.
44. Schmidt H., Aulchenko Y.S., Schweighofer N., Schmidt R., Frank S., Kostner G.M., Ott E., van Duijn C. // *Stroke*. 2004. V. 35. № 11. P. 2592–2597.
45. Gormley K., Bevan S., Markus H.S. // *Cerebrovasc. Dis.* 2007. V. 23. № 2–3. P. 148–155.
46. Salminen L.E., Schofield P.R., Pierce K.D., Zhao Y., Luo X., Wang Y., Laidlaw D.H., Cabeen R.P., Conturo T.E., Tate D.F., et al. // *Behav. Brain Res.* 2016. V. 296. P. 85–93.
47. Zhang L., Miyaki K., Araki J., Song Y., Kimura T., Omae K., Muramatsu M. // *Hypertens. Res.* 2006. V. 29. № 1. P. 751–758.
48. Pontremoli R., Ravera M., Viazzi F., Nicoletta C., Berruti V., Leoncini G., Giacomelli F., Bezante G.P., Sacchi G., Ravazzolo R., et al. // *Kidney Int.* 2000. V. 57. № 2. P. 561–569.
49. Julve R., Chaves F.J., Rovira E., Pascual J.M., Miralles A., Armengod M.E., Redon J. // *Blood Press. Monit.* 2001. V. 6. № 1. P. 27–32.
50. Jimenez P.M., Conde C., Casanegra A., Romero C., Tabares A.H., Orias M. // *J. Renin Angiotensin Aldosterone Syst.* 2007. V. 8. № 1. P. 42–44.
51. Cosenso-Martin L.N., Vaz-de-Melo R.O., Pereira L.R., Cesarino D.R., Yugar-Toledo J.C., Cipullo J.P., de Souza Pinhel M.A., Souza D.B., Vilela-Martin J.F. // *Eur. J. Med. Res.* 2015. V. 20. № 1. P. 1–9.
52. Орлова Н.В., Ситников В.Ф., Чукаева И.И., Прохин А.В. // *Мед. альманах.* 2011. № 3 (16). С. 81–84.
53. Amar K., MacGowan S., Wilcock G., Lewis T., Scott M. // *Int. J. Geriatr. Psychiatry.* 1998. V. 13. № 9. P. 585–590.
54. Purandare N., Oude Voshaar R.C., Davidson Y., Gibbons L., Hardicre N., Byrne J., McCollum C., Jackson A., Burns A., Mann D.M. // *J. Am. Geriatr. Soc.* 2006. V. 54. № 9. P. 1395–1340.
55. Paternoster L., Chen W., Sudlow C.L. // *Stroke*. 2009. V. 40. № 6. P. 2020–2026.
56. Tran T., Cotlarciuc I., Yadav S., Hasan N., Bentley P., Levi C., Worrall B.B., Meschia J.F., Rost N., Sharma P. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2016. V. 87. № 3. P. 260–266.
57. Toda N., Ayajiki K., Okamura T. // *J. Hypertens.* 2009. V. 27. № 10. P. 1929–1940.
58. Meschia J.F., Nalls M., Matarin M., Brott T.G., Brown R.D. Jr., Hardy J., Kissela B., Rich S.S., Singleton A., Hernandez D., et al. // *Stroke*. 2011. V. 42. № 10. P. 2726–2732.
59. Levinsson A., Olin A.C., Björck L., Rosengren A., Nyberg F. // *Nitric Oxide*. 2014. V. 39. P. 1–7.
60. Яковлева О.И., Вахрамеева Н.В., Ларионова В.И., Богданова М.А., Конради О.А. // *Артериальная гипертензия*. 2005. Т. 11. № 3. С. 195–200.
61. Байрова Т.А., Долгих В.В., Бимбаев А.Б.-Ж., Тугутова И.А., Хойкова О.Ч. // *Бюлл. ВСНЦ СО РАМН*. 2007. № 3 (55). С. 64–65.
62. Кузнецова Т.Ю., Гаврилов Д.В., Самоходская Л.М., Постнов А.Ю., Бойцов С.А. // *Сиб. мед. журн.* 2010. № 2. Т. 25. Вып. 1. С. 33–38.
63. Jin J.J., Nakura J., Wu Z., Yamamoto M., Abe M., Tabara Y., Yamamoto Y., Igase M., Kohara K., Miki T. // *Hypertension*. 2003. V. 41. № 1. P. 163–167.
64. Tiret L., Poirier O., Hallet V., McDonagh T.A., Morrison C., McMurray J.J., Dargie H.J., Arveiler D., Ruidavets J.B., Luc G., et al. // *Hypertension*. 1999. V. 33. № 5. P. 1169–1174.
65. Hassan A., Hunt B.J., O'Sullivan M., Bell R., D'Souza R., Jeffery S., Bamford J.M., Markus H.S. // *Brain*. 2004. V. 127. № 1. P. 212–219.
66. Hong E.D., Taylor W.D., McQuoid D.R., Potter G.G., Payne

- M.E., Ashley-Koch A., Steffens D.C. // *Am. J. Geriatr. Psychiatry*. 2009. V. 17. № 10. P. 847–855.
67. Rutten-Jacobs L.C., Traylor M., Adib-Samii P., Thijs V., Sudlow C., Rothwell P.M., Boncoraglio G., Dichgans M., Meschia J., Maguire J., et al. // *Stroke*. 2016. V. 47. № 3. P. 646–651.
68. Lau L.M., van Meurs J.B., Uitterlinden A.G., Smith A.D., Refsum H., Johnston C., Breteler M.M. // *Neurobiol. Aging*. 2010. V. 31. № 11. P. 2020–2022.
69. Szolnoki Z., Somogyvári F., Kondacs A., Szabó M., Fodor L. // *Acta Neurol. Scand.* 2001. V. 104. № 5. P. 281–287.
70. Szolnoki Z., Somogyvári F., Kondacs A., Szabó M., Fodor L., Bene J., Melegh B. // *Acta Neurol. Scand.* 2004. V. 109. № 3. P. 222–227.
71. Jannes J., Hamilton-Bruce M.A., Pilotto L., Smith B.J., Mullighan C.G., Bardy P.G., Koblar S.A. // *Stroke*. 2004. V. 35. № 5. P. 1090–1094.
72. Sun X., Lai R., Li J., Luo M., Wang Y., Sheng W. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 1. P. 1–8.
73. Martiskainen M., Pohjasvaara T., Mikkelsen J., Mäntylä R., Kunnas T., Laippala P., Ilveskoski E., Kaste M., Karhunen P.J., Erkinjuntti T. // *Stroke*. 2003. V. 34. № 4. P. 886–891.
74. Ma H., Sun G., Wang W., Zhou Y., Liu D., Tong Y., Lu Z. // *Medicine (Baltimore)*. 2016. V. 95. № 2. P. 1–15.
75. Li Y.Y. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 4. P. 1–7.
76. Кривошей И.В. // *Научные ведомости*. 2013. № 25 (168). Вып. 24. С. 165–169.
77. Yang W., Lu J., Yang L., Zhang J. // *Iran J. Public Health*. 2015. V. 44. № 11. P. 1445–1452.
78. Dziedzic T., Slowik A., Pera J., Szczudlik A. // *Cerebrovasc. Dis.* 2005. V. 20. № 5. P. 299–303.
79. Chamorro A., Revilla M., Obach V., Vargas M., Planas A.M. // *Cerebrovasc. Dis.* 2005. V. 19. № 2. P. 91–95.
80. Fornage M., Chiang Y.A., O'Meara E.S., Psaty B.M., Reiner A.P., Siscovick D.S., Tracy R.P., Longstreth W.T. Jr. // *Stroke*. 2008. V. 39. № 7. P. 1952–1959.
81. Raz N., Yang Y., Dahle C.L., Land S. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2012. V. 1822. № 3. P. 361–369.
82. Князева А.С., Страмбовская Н.Н. // *Бюлл. ВНИИ СО РАМН*. 2014. № 1(95). С. 30–34.
83. Reitz C., Berger K., de Maat M.P., Stoll M., Friedrichs F., Kardys I., Wittman J.C., Breteler M.M. // *Stroke*. 2007. V. 38. № 8. P. 2356–2359.
84. Fatar M., Strock M., Steffens M., Senn E., Reuter B., Bukow S., Griebel M., Alonso A., Lichtner P., Bugert P. // *Cerebrovasc. Dis.* 2008. V. 26. № 2. P. 113–119.
85. Zhang M., Zhu W., Yun W., Wang Q., Cheng M., Zhang Z., Liu X., Zhou X., Xu G. // *J. Neurol. Sci.* 2015. V. 356. № 1–2. P. 61–64.
86. Kim O.J., Hong S.H., Oh S.H., Kim T.G., Min K.T., Oh D., Kim N.K. // *Stroke*. 2011. V. 42. № 9. P. 2393–2402.
87. Huang C.C., Liu M.E., Chou K.H., Yang A.C., Hung C.C., Hong C.J., Tsai S.J., Lin C.P. // *Psychoneuroendocrinology*. 2014. V. 39. P. 94–103.
88. Lupton S.J., Chiu C.L., Lind J.M. // *Twin Res. Hum. Genet.* 2011. V. 14. № 4. P. 295–304.
89. Newton-Cheh C., Johnson T., Gateva V., Tobin M.D., Bochud M., Coin L., Najjar S.S., Zhao J.H., Heath S.C., Eyheramendy S., et al. // *Nat. Genet.* 2009. V. 41. № 6. P. 666–676.
90. Levy D., Ehret G.B., Rice K., Verwoert G.C., Launer L.J., Dehghan A., Glazer N.L., Morrison A.C., Johnson A.D., Aspelund T., et al. // *Nat. Genet.* 2009. V. 41. № 6. P. 677–687.
91. International Consortium for Blood Pressure Genome-Wide Association Studies, Ehret G.B., Munroe P.B., Rice K.M., Bochud M., Johnson A.D., Chasman D.I., Smith A.V., Tobin M.D., Verwoert G.C., et al. // *Nature*. 2011. V. 478. № 7367. P. 103–109.
92. Fornage M., Debette S., Bis J.C., Schmidt H., Ikram M.A., Dufouil C., Sigurdsson S., Lumley T., DeStefano A.L., Fazekas F., et al. // *Ann. Neurol.* 2011. V. 69. № 6. P. 928–939.
93. Verhaaren B.F., de Boer R., Vernooij M.W., Rivadeneira F., Uitterlinden A.G., Hofman A., Krestin G.P., van der Lugt A., Niessen W.J., Breteler M.M., et al. // *Stroke*. 2011. V. 42. № 11. P. 3297–3299.
94. Adib-Samii P., Rost N., Traylor M., Devan W., Biffi A., Lanfranconi S., Fitzpatrick K., Bevan S., Kanakis A., Valant V., et al. // *Stroke*. 2013. V. 44. № 6. P. 1609–1615.
95. Tabara Y., Igase M., Okada Y., Nagai T., Uetani E., Kido T., Ochi N., Takita R., Yamamoto M., Kohara K., et al. // *Eur. J. Neurol.* 2013. V. 20. № 5. P. 860–862.
96. Verhaaren B.F., Debette S., Bis J.C., Smith J.A., Ikram M.K., Adams H.H., Beecham A.H., Rajan K.B., Lopez L.M., Barral S., et al. // *Circ. Cardiovasc. Genet.* 2015. V. 8. № 2. P. 398–409.
97. Woo D., Falcone G.J., Devan W.J., Brown W.M., Biffi A., Howard T.D., Anderson C.D., Brouwers H.B., Valant V., Battey T.W., et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 2014. V. 94. № 4. P. 511–521.
98. Hofer E., Cavalieri M., Bis J.C., DeCarli C., Fornage M., Sigurdsson S., Srikanth V., Trompet S., Verhaaren B.F., Wolf C., et al. // *Stroke*. 2015. V. 46. № 11. P. 3048–3057.
99. Munroe P.B., Barnes M.R., Caulfield M.J. // *Circ. Res.* 2013. V. 112. № 10. P. 1365–1379.
100. Raftopoulos L., Katsi V., Makris T., Tousoulis D., Stefanadis C., Kallikazaros I. // *Life Sci.* 2015. V. 129. P. 22–26.
101. Liang M., Cowley A.W.Jr, Mattson D.L., Kotchen T.A., Liu Y. // *Semin. Nephrol.* 2013. V. 33. № 4. P. 392–399.
102. Wang J., Gong L., Tan Y., Hui R., Wang Y. // *J. Hum. Hypertens.* 2015. V. 29. № 10. P. 575–582.
103. Wise I.A., Charchar F.J. // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. № 4. P. 2–14.
104. Goyal R., Goyal D., Leitzke A., Gheorghie C.P., Longo L.D. // *Reprod. Sci.* 2010. V. 17. № 3. P. 227–238.
105. Rangel M., dos Santos J.C., Ortiz P.H., Hirata M., Jasiulionis M.G., Araujo R.C., Ierardi D.F., Franco Mdo C., et al. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 8. P. 1–8.
106. Zhang L.N., Ji L.D., Fei L.J., Yuan F., Zhang Y.M., Xu J., et al. // *Biomed. Res. Int.* 2013. V. 2013. P. 1–5.
107. Friso S., Pizzolo F., Choi S.-W., Guarini P., Castagna A., Ravagnani V., Carletto A., Pattini P., Corrocher R., Olivieri O. // *Atherosclerosis*. 2008. V. 199. № 2. P. 323–327.
108. Udali S., Guarini P., Moruzzi S., Choi S.W., Friso S. // *Mol. Aspects Med.* 2013. V. 34. № 4. P. 883–901.
109. Lee H.A., Baek I., Seok Y.M., Yang E., Cho H.M., Lee D.Y., Hong S.H., Kim I.K. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 396. № 2. P. 252–257.
110. Esler M., Eikelis N., Schlaich M., Lambert G., Alvarenga M., Kaye D., El-Osta A., Guo L., Barton D., Pier C., et al. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1148. P. 338–348.
111. Lin Q., Huang W.Q., Tzeng C.M. // *Rev. Neurosci.* 2015. V. 26. № 3. P. 343–358.
112. Millis R.M. // *Curr. Hypertens. Rep.* 2011. V. 13. № 1. P. 21–28.
113. Zhang D., Yu Z.Y., Cruz P., Kong Q., Li S., Kone B.C. // *Kidney Int.* 2009. V. 75. № 3. P. 260–267.
114. Pojoga L.H., Williams J.S., Yao T.M., Kumar A., Raffetto J.D., do Nascimento G.R., Reslan O.M., Adler G.K., Williams G.H., Shi Y., et al. // *Am. J. Physiol. Heart Circ. Physiol.* 2011. V. 301. № 5. P. H1862–H1871.
115. Mu S., Shimosawa T., Ogura S., Wang H., Uetake Y., Kawakami-Mori F., Marumo T., Yatomi Y., Geller D.S., Tanaka H., et al. // *Nat. Med.* 2011. V. 17. № 5. P. 573–580.
116. Irmak M.K., Sizlan A. // *Med. Hypotheses*. 2006. V. 66. № 5. P. 1000–1007.

117. Ouyang Y.B., Stary C.M., Yang G.Y., Giffard R. // *Curr. Drug Targets*. 2013. V. 14. № 1. P. 90–101.
118. Romero D.G., Plonczynski M.W., Carvajal C.A., Gomez-Sanchez E.P., Gomez-Sanchez C.E. // *Endocrinology*. 2008. V. 149. № 5. P. 2477–2483.
119. Söber S., Laan M., Annilo T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 391. № 1. P. 727–732.
120. Ling S., Nanhwan M., Qian J., Kodakandla M., Castillo A.C., Thomas B., Liu H., Ye Y. // *J. Mol. Cell Cardiol.* 2013. V. 65. P. 127–136.
121. Kontaraki J.E., Marketou M.E., Zacharis E.A., Parthenakis F.I., Vardas P.E. // *J. Hum. Hypertens.* 2014. V. 28. № 8. P. 510–516.
122. Robertson S., MacKenzie S.M., Alvarez-Madrado S., Diver L.A., Lin J., Stewart P.M., Fraser R., Connell J.M., Davies E. // *Hypertension*. 2013. V. 62. № 3. P. 572–578.
123. Suárez Y., Fernández-Hernando C., Pober J.S., Sessa W.C. // *Circ. Res.* 2007. V. 100. № 8. P. 1164–1173.

УДК 571.27

Молекулярные подходы к безопасной и контролируемой Т-клеточной терапии

Р. С. Калинин¹, А. В. Петухов¹, В. Д. Кнорре¹, М. А. Масчан², А. В. Степанов^{1*}, А. Г. Габибов¹¹Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Национальный медицинский исследовательский центр детской гематологии, онкологии и иммунологии им. Дмитрия Рогачева, 117997, Москва, ул. Саморы Машела, 1

*E-mail: stepanov.aleksei.v@gmail.com

Поступила в редакцию 07.12.2017

Принята к печати 14.05.2018

РЕФЕРАТ Введение Т-клеток, модифицированных химерными антигенными рецепторами (САРТ), является одним из наиболее активно развивающихся направлений иммуноонкологии. За последнее десятилетие данная область клеточной терапии совершила значительный скачок от оптимизации структуры химерных антигенных рецепторов и экспериментов на модельных животных до успешного клинического применения. Изначально вектор развития САРТ был направлен на увеличение активации, цитотоксичности и персистенции модифицированных Т-клеток. Однако первые же попытки клеточной терапии выявили необходимость создания безопасных и контролируемых САРТ Т-клеток. В представленном обзоре детально рассмотрены современные принципиально различные подходы к созданию и применению безопасных химерных антигенных рецепторов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА клеточная терапия, опухолевые клетки, Т-клетки, химерные антигенные рецепторы.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день одним из наиболее перспективных направлений в терапии онкологических заболеваний является адоптивная клеточная иммунотерапия, впервые примененная при метастатической саркоме в 1985 году [1, 2]. При проведении такой терапии выделяют, активируют и размножают аутологичные Т-лимфоциты, а затем их вводят обратно пациенту, что приводит к частичной регрессии или эрадикации опухоли [3–6]. Применение аутологичных Т-лимфоцитов позволяет избежать реакции «трансплантат против хозяина» (РТПХ) и, что немаловажно, увеличивает персистенцию терапевтически активных клеток [7–9], однако, в большинстве случаев эффективность адоптивной иммунотерапии оказывается недостаточной [10]. Следующим витком в развитии данного направления было получение Т-лимфоцитов, способных направленно узнавать опухолевые клетки и преодолевать иммуносупрессорные механизмы раковых клеток. Одна из модификаций лимфоцитов – введение искусственного Т-клеточного рецептора (TCR), специфичного к опухолевым антигенам (ТАА – tumour-associated antigens) [11]. К сожалению, Т-клетки, модифицированные TCR, способны распознавать только

процессированные протеасомой антигены, презентированные в контексте главного комплекса гистосовместимости класса I (MHC I). Перечисленных недостатков лишен наиболее современный подход – модификация Т-клеток генами химерных антигенных рецепторов (chimeric antigen receptor, CAR), которая помогает лимфоцитам распознавать нативные антигены на мембране раковых клеток независимо от MHC I. Структурно CAR состоит из трех функциональных частей: внеклеточного домена, распознающего антиген, трансмембранного домена и внутриклеточной части, включающей домен активации Т-клеток CD3 ζ и в зависимости от поколения рецептора различные костимулирующие домены (рисунков А) [12]. Впервые метод использования MHC I независимых рекомбинантных антигенных рецепторов был описан Eshhar Z. и его коллегами в Институте науки имени Вейцмана в конце 1980-х [13]. С использованием этого подхода, эволюционировавшего в CART-терапию, получены обнадеживающие результаты при гематологических опухолевых заболеваниях. Так, клинические испытания CART, направленных против В-лимфоцитарного антигена CD19, показали их эффективность при лечении резистентных к химиотерапии опухолей В-клеточного проис-

хождения [14–18]. Наконец, в 2017 году Управление по надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) одобрило применение CART (препараты Kymriah от компании Novartis и Yescarta от компании Kite Pharma), направленных против CD19, при остром лимфобластном лейкозе (ОЛЛ).

ОПАСНОСТИ CART-ТЕРАПИИ

Отличительной особенностью CART, обнаруженной уже при первых клинических испытаниях, оказалась их исключительная эффективность. Введение модифицированных Т-клеток привело к экспоненциальному росту их численности и активной элиминации опухолевых клеток в течение нескольких недель [19]. Обратной стороной такой эффективной терапии является высокий риск возникновения системных и опасных для жизни побочных эффектов, в первую очередь, гиперцитокинемии (цитокиновый шторм, цитокиновый каскад, синдром выброса цитокинов (CRS)) и синдрома лизиса опухоли [20–23]. Эти осложнения могут спровоцировать развитие синдрома полиорганной недостаточности и, как следствие, привести к летальному исходу. Купировать осложнения, вызванные Т-клетками, можно кортикостероидами цитостатического и цитотоксического действия [24], что, однако, приводит к подавлению всех Т-клеток и вызывает ряд побочных эффектов, в частности, системные повреждения органов [25]. Еще одна существенная проблема применения CART – неспецифическая цитотоксичность, которая особенно актуальна в случае терапии солидных опухолей, к которым крайне сложно подобрать специфичные ТАА [26–29]. Так, проведение клинических испытаний CART, специфичных к карбоангидразе IX, которая сверхэкспрессируется в клетках рака почки, но присутствует также и в нормальных тканях, включая печень, выявило неспецифическую цитотоксичность CART, приведшую к появлению осложнений у пациентов [26, 28]. Кроме того, использование CAR, специфичного к HER2, при метастатическом раке толстой кишки привело к возникновению сразу после инфузии CART интенсивной и быстрой кросс-реакции на здоровые клетки легких, экспрессирующих HER2 в малых количествах, и гибели пациента [30]. Для повышения безопасности терапии и устранения существующих недостатков, таких, как отложенная перекрестная реактивность и токсичность уже после успешно проведенной CART-терапии, необходима дальнейшая разработка методов контроля экспансии и цитотоксичности лимфоцитов уже введенных пациенту [6, 31]. В настоящем обзоре суммированы различные молекулярные подходы к безопасной и контролируемой Т-клеточной терапии.

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ГЕНА ТИМИДИНКИНАЗЫ ВИРУСА ПРОСТОГО ГЕРПЕСА (HSV-TK)

Тимидинкиназа вируса простого герпеса на протяжении многих лет активно применяется как в лабораторных, так и в клинических исследованиях для индукции гибели клеток. Тимидинкиназа HSV-TK фосфорилирует ганцикловир до монофосфатной формы, который клеточные киназы последовательно превращает в ди- и трифосфатные (рисунок Б) [32–34]. Трифосфатная форма ганцикловира включается в ДНК при элонгации и репликации, нарушая работу ДНК-полимеразы, что приводит к гибели клетки [35, 36]. Фосфорилированный вирусной тимидинкиназой ганцикловир независимо от CD95-L приводит к агрегации CD95, которая индуцирует формирование Fas-ассоциированного белка с доменом смерти (FADD) и активации каспазы-8 [37]. Элиминация модифицированных клеток с использованием ганцикловира и клеток, несущих ген вирусной тимидинкиназы, является наиболее изученной методикой с доказанной безопасностью и эффективностью [34, 38]. Однако у этого подхода есть недостатки, заключающиеся в иммуногенности вирусной HSV-TK [39]. В ходе клинических испытаний была выявлена недостаточно быстрая элиминация Т-лимфоцитов, что обусловлено необходимостью в репликации ДНК для встраивания токсичного нуклеотидного аналога в геном [38, 40]. Кроме того, проведению подобной терапии может препятствовать наличие герпесвирусной инфекции. Несмотря на очевидные ограничения этого подхода, использование в клиническом испытании аллогенных лимфоцитов, модифицированных HSV-TK, показало отсутствие острой токсичности и иммуногенного ответа на HSV-TK [41]. У двух пациентов ганцикловир применяли для терапии РТПХ, и в обоих случаях была достигнута полная элиминация клеток HSV-TK⁺, однако РТПХ удалось устранить лишь у одного из них. Развития иммунного ответа на HSV-TK не наблюдали и в клиническом испытании NCT01204502 [42], но РТПХ при этом также отсутствовала (возможно, в связи с иммунодепрессивным состоянием пациентов и низкой дозой вводимых Т-лимфоцитов).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ХИМИЧЕСКИ ИНДУЦИРУЕМОЙ КАСПАЗЫ-9

Интересным и перспективным подходом к контролируемому запуску апоптоза у CART является применение химерных молекул на основе проапоптотических сигнальных белков, способных к димеризации и активации в присутствии низкомолекулярных соединений [43, 44]. Один из ярчайших примеров – химерная каспаза-9 (iCasp9) [45], состоящая из двух ключевых компонентов: усеченного варианта ка-

спазы-9 и фрагмента FKPB12-связывающего белка с мутацией F36V (FK506). Этот химерный белок димеризуется в присутствии римидуцида (AP1903), что приводит к запуску апоптотического каскада (рисунки А, Б). Система iCasp9 имеет ряд безусловных преимуществ перед HSV-TK. Во-первых, она состоит из продуктов генов человека с низкой потенциальной иммуногенностью. Во-вторых, введение лекарственного средства не вызывает выраженных побочных эффектов и приводит к селективной элиминации исключительно CART [46]. Также iCasp9 сохраняет функциональную активность даже в Т-клетках с повышенной экспрессией антиапоптотических белков [43, 47–49]. Основное преимущество iCasp9 перед системой HSV-TK – ее быстрое действие. Введение AP1903 приводит к элиминации CART в течение нескольких часов. Эффективность iCasp9 подтверждена для CART различной специфичности (CD19, CD20, CD30). Эффективность и безопасность подхода доказаны также в ходе клинических испытаний (NCT02274584), в которых принимали участие больные лимфомой [50].

ЭЛИМИНАЦИЯ CART С ПОМОЩЬЮ МОНОКЛОНАЛЬНЫХ АНТИТЕЛ

За последнее десятилетие применение моноклональных антител (монАт) в терапии онкологических заболеваний стало распространенной практикой. Именно на основе вариабельных доменов терапевтических антител создают новые химерные антигенные рецепторы. Интересно, что некоторые антитела, уже прошедшие все необходимые клинические испытания и одобренные FDA, могут быть использованы для элиминации CART при возникновении осложнений, вызванных клеточной терапией [51–53]. Чтобы элиминировать Т-клетки с помощью монАт, поверхность CART должна содержать соответствующий антиген (рисунки В, Г). Этот же антиген может быть использован для селекции клеток CART⁺ после модификации лимфоцитов [9]. Одними из первых работ в этом направлении стали эксперименты по трансдукции Т-клеток молекулой CD20 с дальнейшей инфузией анти-CD20-моноклональных антител, которые хорошо зарекомендовали себя в терапии лимфопролиферативных заболеваний В-клеточной природы [54–56]. Аналогичная система разработана для укороченной формы рецептора эпидермального фактора роста (tEGFR), которая служит мишенью для коммерчески доступного препарата цетуксимаб [52]. Было проведено несколько клинических испытаний tEGFR, однако применение цетуксимаба в них для элиминации CART не сочли достаточно обоснованным. Проведены также работы, в которых эпитоп монАт был внесен в последовательность внеклеточ-

ного домена CAR. Подобный подход был применен в доклиническом исследовании, в котором использовали рекомбинантный TCR с добавленной 10-аминокислотной последовательностью эпитопа с-тус [9, 51]. Однако в случае клинического использования монАт для элиминации CART следует учитывать собственную цитотоксичность антитела и возможные осложнения [9].

РАСПОЗНАВАНИЕ «СВОЙ-ЧУЖОЙ»

Проблема подбора ТАА, специфичного только для опухолевых клеток, стоит давно, поскольку крайне сложно подобрать уникальные антигены для большого количества раковых клеток. Однако можно подобрать детерминированные паттерны антигенов, характерных для здоровых и опухолевых клеток. В своей работе Федоров с соавт. [57] предложили использовать дополнительный химерный рецептор, который защищает нормальные клетки от неспецифической цитотоксичности CART за счет передачи ингибирующего сигнала при взаимодействии химерного рецептора с антигенами здоровых клеток (iCAR) (рисунки Д, Е). Клетки, модифицированные iCAR, ингибируют стимулирующие сигналы основного CAR через внутриклеточные домены PD-1 или CTLA-4. Главное преимущество подхода заключается в том, что это ингибирование обратимо и позволяет Т-клеткам функционировать при последующей встрече с опухолевой клеткой [57]. Существенными ограничениями для клинического применения iCAR являются корректный подбор уровня экспрессии химерного рецептора, баланс аффинности распознающих доменов, вариативность набора антигенов на раковых и здоровых клетках, а также индивидуальные особенности каждого пациента [57].

ЭЛИМИНАЦИЯ КЛЕТКИ, НЕСУЩЕЙ ОПРЕДЕЛЕННУЮ КОМБИНАЦИЮ АНТИГЕНОВ

Особенно остро проблема поиска опухолеспецифичных антигенов выражена у солидных опухолей [58]. Поэтому для повышения избирательности и безопасности CART предложено экспрессировать два рецептора, специфичных к разным опухолевым антигенам. И только если все CAR (у одного рецептора может быть стимулирующий домен CD3 ζ , а у другого CD28) распознали свою мишень, Т-клетка получает уровень стимуляции, достаточный для активации (рисунки Ж, З) [59–63]. Применение системы «двойного наведения» позволяет существенно снизить выраженность побочных эффектов даже в отсутствие специфичного опухолевого антигена [62]. При сравнении CART, несущих два рецептора, и контрольных CART, имеющих единый рецептор со всеми внутри-

клеточными доменами, показано, что при одинаковой эффективности *in vivo* уровень секреции интерлейкина-2 в них существенно ниже [63]. Однако при использовании двойных CAR необходимо учитывать, что эффективность элиминации и пролиферации клеток будет прямо зависеть от баланса сигналов двух рецепторов, оптимум которого находится в довольно узком диапазоне. Сильное различие в количестве двух целевых антигенов на опухолевой клетке или полное отсутствие одного может нивелировать эффективность клеточной терапии.

Другой стратегией стало создание синтетического рецептора Notch (synNotch), который связывается со вторым антигеном на опухолевой клетке, после чего запускает через транскрипционные факторы экспрессию CAR внутри Т-клетки (рисунки Д) [64]. CAR в свою очередь связывается со своим антигеном на опухолевой клетке и активирует цитотоксичность этой CART. Благодаря такому механизму достигается локализованное подавление опухолевых клеток без риска неспецифической цитотоксичности по отношению к здоровым тканям.

Таким образом, включение в распознавание двух различных антигенов на опухолевых клетках увеличивает выбор целевых антигенов для CART, одновременно уменьшая токсичность, получаемую от использования традиционных CART-клеток. Тем не менее таким способом, а также модификацией iCARs нельзя контролировать CART лимфоциты в режиме реального времени и интенсивность их активности [65]. Еще одним из возможных решений задачи поиска антигена, специфичного для здоровых клеток, могут быть постоянно расширяющиеся базы данных белков человека [66]. Перспективным антигеном, отличающим здоровые клетки от опухолевых, может быть также МНС, который присутствует почти на всех здоровых клетках, тогда как на раковых клетках экспрессия МНС снижается для ухода от иммунного ответа [67].

КОНТРОЛЬ ЭКСПРЕССИИ ГЕНА ХИМЕРНОГО АНТИГЕННОГО РЕЦЕПТОРА

Так как активация и цитотоксичность модифицированных Т-клеток непосредственно зависят от количества рецептора на мембране клетки, то, регулируя экспрессию гена химерного антигенного рецептора, можно контролировать эффективность клеточной терапии. Индуцибельные промоторы активно применяются для регуляции экспрессии генов на протяжении нескольких десятилетий. Удобным инструментом регуляции экспрессии генов в эукариотических клетках служит система тетрациклин-активируемого промотора. С помощью дозированного введения регуляторной молекулы можно контролировать экспрес-

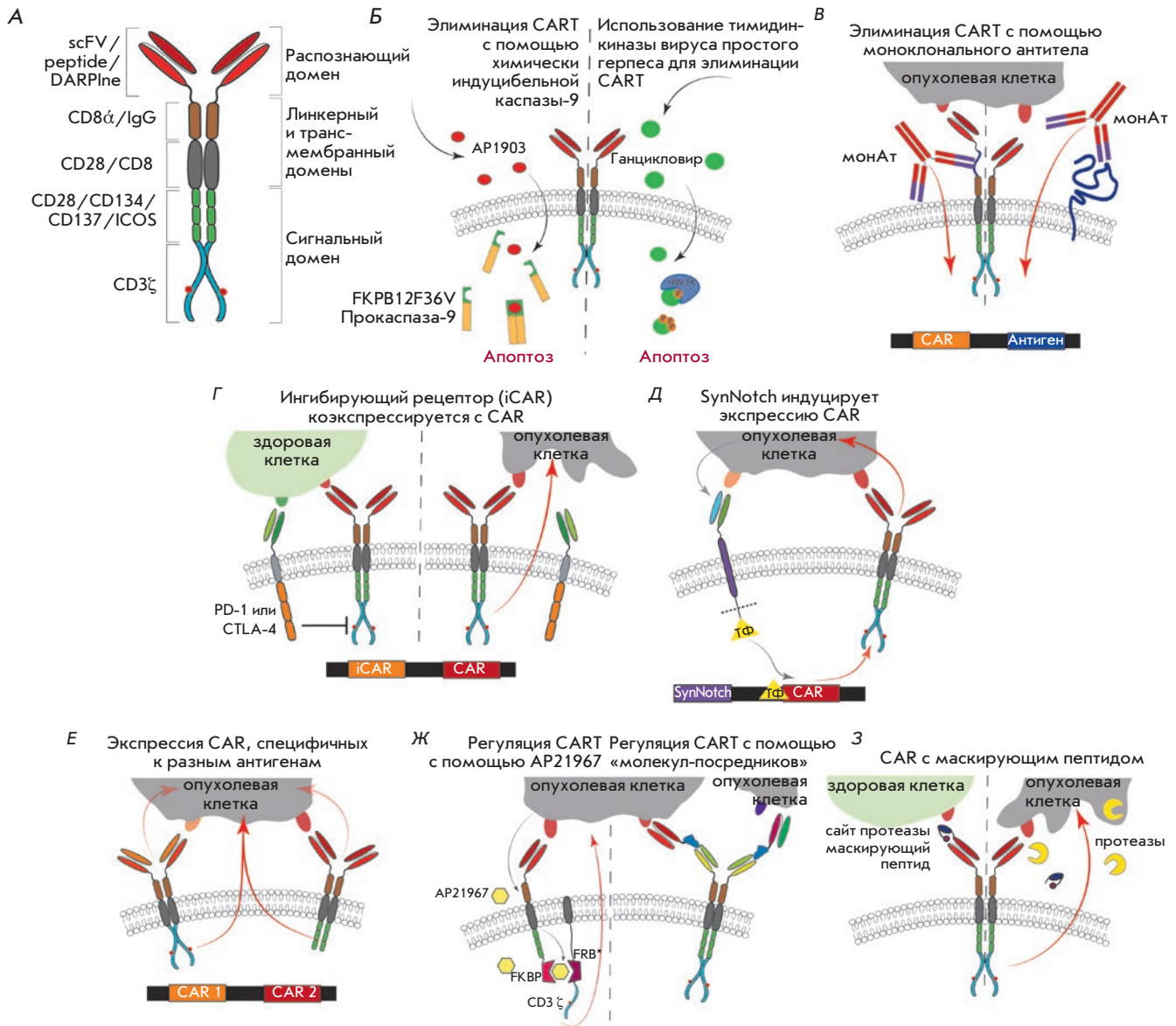
сию CAR в модифицированных Т-клетках. В первом случае доксициклин блокирует экспрессию CAR [68]. Во-втором, наоборот, – CAR экспрессируется только в присутствии доксициклина [69]. Удобство такого метода не только в регуляции цитотоксичности, но и в культивировании CART *ex vivo*, где на функциональное состояние и фенотип не влияет присутствие CAR, в отличие от постоянной экспрессии CAR. Однако эксперименты *in vivo* показали иммуногенность компонентов системы тетрациклин-активируемого промотора [68].

КОНТРОЛЬ АКТИВАЦИИ ХИМЕРНОГО АНТИГЕННОГО РЕЦЕПТОРА

Как уже упоминалось, химерные антигенные рецепторы состоят из трех ключевых доменов: распознающего, трансмембранного и сигнального. Прямая связь между связыванием антигена и активацией рецептора обеспечивает высокую эффективность CART. Для контроля интенсивности передачи сигнала от распознающего домена к сигнальному структуру рецептора значительно изменили, разбив его на две части: антигенсвязывающую внеклеточную и внутриклеточную с сигнальными доменами. Обе части рецептора содержат домены гетеродимеризации (FKBP и FRB*), которые гибридизуются в присутствии AP21967, аналога рапамицина, обладающего меньшей иммуносупрессивной активностью по сравнению с рапамицином [70, 71]. Таким образом, иммунореактивность терапевтических CART-клеток зависит от опухолевого антигена и низкомолекулярного агента, концентрацию которого можно дозировать (рисунки Ж). Анализ терапевтического потенциала показал, что AP21967-зависимые CART и обычные CART не отличаются по своей эффективности *in vitro* и *in vivo* [65]. Между тем, использование такой технологии требует разработки новых классов лекарственных средств – контроллеров, оптимизированных для клинического применения в сочетании с терапевтическими модифицированными клетками [65, 72–74].

«МОЛЕКУЛЫ-ПОСРЕДНИКИ», ГИБРИДИЗУЮЩИЕСЯ С ВНЕКЛЕТОЧНЫМИ ДОМЕНОМ CAR И ОПУХОЛЕВЫМ АНТИГЕНОМ

Модулировать можно не только интенсивность передачи сигнала от распознающего домена к сигнальному, но и уровень распознавания антигена. Наиболее перспективным представляется применение так называемых «молекул-посредников» (рисунки Ж) – белков или низкомолекулярных соединений, которые одним концом взаимодействуют с опухолевым антигеном, а другим с CAR-модифицированными Т-клетками, так называемыми переключаемыми



Способы регуляции CART. А – общая структура CAR. Б – элиминация CART посредством экзогенных молекул. На правой стороне рисунка HSV-TK фосфорилирует ганцикловир до монофосфатной формы, которую клеточные киназы последовательно превращают в ди- и трифосфатную. Трифосфатная форма ганцикловира включается в ДНК при элонгации и репликации, что приводит к гибели клетки. На левой стороне рисунка – укороченный вариант каспазы-9 и фрагмент FK506 димеризуются в присутствии препарата римиудцида (AP1903), что приводит к запуску апоптотического каскада. В – на поверхность CART или в линкерную область CAR добавляют антиген к моноклональному антителу, с помощью которого можно элиминировать CART. Г – iCAR взаимодействует с антигеном на здоровой клетке и через внутриклеточные домены PD-1 или CTLA-4 ингибирует работу CAR. Это ингибирование обратимо, что позволяет Т-клеткам функционировать при последующей встрече с опухолевой клеткой. Д – после взаимодействия дополнительного рецептора (synNotch) с одним опухолевым антигеном, с помощью транскрипционных факторов (ТФ), происходит запуск экспрессии CAR, который распознает второй опухолевый антиген и индуцирует цитотоксичность. Е – достаточная активация CART происходит только при взаимодействии двух CAR с двумя разными опухолевыми антигенами. Ж – модульные CAR. На левой стороне рисунка – активационная способность CAR восстанавливается только при димеризации белка, связывающего FK 506 (FKBP), с мутантом T2089L FKBP-рапамидин (FRB*) через вводимый экзогенно аналог рапамидина (AP21967). На правой стороне рисунка – активация CAR происходит только через экзогенную «молекулу-посредник». З – модификация внеклеточной области CAR маскирующим пептидом, который отщепляется в микроокружении опухоли, что позволяет CAR взаимодействовать со своим антигеном

(универсальными) CART [75, 76]. Модульность такого подхода позволяет увеличить диапазон антигенов при использовании одних и тех же CART, а за счет дозирования «молекул-посредников» можно регулировать интенсивность Т-клеточного ответа и не допускать гиперцитокинемии или синдрома лизиса опухоли [77]. Подобная стратегия может оказаться крайне перспективной при поликлональных и рецидивирующих опухолях, когда необходимо переключить направленность Т-клеточного ответа [78, 79]. В качестве «молекул-посредников» могут быть использованы антитела, слитые с неиммуногенным антигеном, к которому специфичны CART, либо CAR, специфичные к Fc-фрагменту терапевтического моноклонального антитела [75–77, 80–84]. Данный подход был реализован с помощью рекомбинантных анти-CD19-антител, содержащих неиммуногенный эпитоп дрожжевого фактора транскрипции GCN4, к которому, в свою очередь, был специфичен антигенраспознающий домен CART [77]. Эти же CART удалось перенаправить с помощью антител, специфичных к CD20, модифицированных эпитопом GCN4 [77]. Интересной оказалась прямая зависимость фенотипа CART от концентрации «молекул-посредников» – при низких дозах количество центральных клеток памяти значительно увеличивается. Помимо антител для распознавания ТАА можно использовать модифицированные природные полипептиды или их фрагменты с гипервариабельными пептидными сегментами, отвечающими за молекулярное узнавание [85]. Также можно использовать уже хорошо известные аффинные пары, например биотин и авидин [76]. По такому же принципу созданы антитела, специфичные к CD19, конъюгированные с флуоресцеин-5-изотиоцианатом (FITC), или фолиевую кислоту, слитую с FITC. Такие «молекулы-посредники» распознаются универсальными анти-FITC-CAR Т-клетками [83, 86]. В качестве универсальных CART также разрабатываются CD16-CAR, специфичные к Fc-домену антител, что позволит применять моноклональные антитела в такой терапии [80–82].

Таким образом, переключаемые CART представляют собой перспективную новую парадигму клеточной терапии, которая потенциально повысит безопасность и универсальность CART. Этот подход позволит упростить производство CART-клеток и снизить стоимость лечения. Имея возможность переключения направления терапии за счет смены «молекул-посредников», врачи смогут незамедлительно вносить коррективы в план лечения. Особенно актуален такой метод для предотвращения рецидивов после возникновения мутаций, которые приводят к исчезновению целевого опухолевого антигена,

а также для эффективной терапии опухолей с гетерогенной экспрессией антигенов [77, 79, 83]. Тем не менее возможность использования «молекул-посредников» в терапии солидных опухолей остается под вопросом, так как их способность к проникновению в ткань опухоли ограничена, что снижает эффективность локальной активации и функционирования CART, в то время как классические CART способны мигрировать в ткань опухоли [87, 88].

МАСКИРОВАНИЕ АНТИГЕНРАСПОЗНАЮЩЕГО ДОМЕНА ХИМЕРНОГО АНТИГЕННОГО РЕЦЕПТОРА

Снизить токсичность при терапии солидных опухолей можно за счет модификации антигенсвязывающего домена CAR маскирующим пептидом [89], расположенным на N-конце химерного антигенного рецептора перед антигенсвязывающим доменом и экранирующим распознающую функцию CAR (рис. 3). Отличительной особенностью микроокружения некоторых типов опухолей являются специфические протеазы, которые гидролизуют линкер, соединяющий маскирующий пептид и распознающий домен CAR. После расщепления CART могут распознать антиген, представленный на поверхности опухолевых клеток [89]. Данный подход позволяет применять для терапии генно-модифицированными клетками антигены, представленные на здоровых клетках.

ПРИМЕНЕНИЕ мРНК ДЛЯ МОДИФИКАЦИИ Т-КЛЕТОК

После введения пациенту, CART активно пролиферируют и дифференцируют в Т-клетки различной специализации. Новые Т-клетки также несут ген CAR, который стимулирует их активацию. Для большинства типов онкологических заболеваний нет необходимости в постоянном присутствии терапевтических Т-клеток в течение всей жизни пациента. Более того, это может вызвать дополнительные осложнения и расходы на восстановление иммунного статуса больного после терапии. Одним из способов временной модификации лимфоцитов CAR является трансфекция Т-клеток мРНК, кодирующей CAR [90]. Такой подход успешно использовали *in vitro* и *in vivo* при изучении CAR, специфичных к CD19 и мезотелину [90, 91]. Впоследствии CART, специфичные к мезотелину, успешно применяли при раке поджелудочной железы [92, 93]. Электропорацию клеток мРНК проводят *in vitro*, что позволяет избежать потенциально опасной интеграции вирусного вектора в геном человека [90, 91]. К сожалению, однократной инфузии мРНК CART бывает недостаточно, что увеличивает стоимость и сложность лечения. Однако многократное введение CART позволяет регулировать количество персистирующих клеток и ин-

тенсивность терапии [90], избегая чрезмерного высвобождения цитокинов, синдрома лизиса опухоли и цитотоксичности в отношении здоровых клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Успехи применения CART *in vivo*, а также выданное FDA разрешение на применение при остром лимфобластном лейкозе, поставили клеточную терапию модифицированными лимфоцитами на место самой обсуждаемой и перспективной панацеи от всех видов рака и даже аутоиммунных заболеваний. Однако при ближайшем рассмотрении и массовом проведении клинических испытаний оказалось, что химерные антигенные рецепторы не лишены недостатков и несут опасность для пациента. На первое место ста-

ла выдвигаться не столько эффективность, сколько безопасность и контроль над терапией. Множество биотехнологических приемов и ухищрений были применены для создания CAR новых поколений – более безопасных и контролируемых. Каждый из описанных подходов обладает как рядом преимуществ, так и недостатков. Однако новые подходы позволили существенно приблизить клеточную терапию к применению на более ранних этапах развития опухолевого заболевания, что значительно повышает вероятность благоприятного исхода для пациента и снижает риск потенциальных осложнений. ●

*Работа выполнена при поддержке РФФ
(грант № 17-74-30019).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Rosenberg S.A., Lotze M.T., Muul L.M., Leitman S., Chang A.E., Ettinghausen S.E., Matory Y.L., Skibber J.M., Shiloni E., Vetto J.T. // *N. Engl. J. Med.* 1985. V. 313. № 23. P. 1485–1492.
- Rosenberg S.A., Mulé J.J. // *Surgery.* 1985. V. 98. № 3. P. 437–444.
- Galluzzi L., Vacchelli E., Eggermont A., Fridman W.H., Galon J., Sautès-Fridman C., Tartour E., Zitvogel L., Kroemer G. // *Oncoimmunology.* 2012. V. 1. № 3. P. 306–315.
- Restifo N.P., Dudley M.E., Rosenberg S.A. // *Nat. Rev. Immunol.* 2012. V. 12. № 4. P. 269–281.
- Rosenberg S.A., Restifo N.P. // *Science.* 2015. V. 348. № 6230. P. 62–68.
- Kalos M., June C.H. // *Immunity.* 2013. V. 39. № 1. P. 49–60.
- de Bueger M., Bakker A., van Rood J.J., van der Woude F., Goulmy E. // *J. Immunol. Baltim. Md 1950.* 1992. V. 149. № 5. P. 1788–1794.
- Ringdén O., Labopin M., Gorin N.C., Schmitz N., Schaefer U.W., Prentice H.G., Bergmann L., Jouet J.P., Mandelli F., Blaise D., et al. // *Br. J. Haematol.* 2000. V. 111. № 4. P. 1130–1137.
- Minagawa K., Zhou X., Mineishi S., Di Stasi A. // *Pharm. Basel Switz.* 2015. V. 8. № 2. P. 230–249.
- Kershaw M.H., Westwood J.A., Darcy P.K. // *Nat. Rev. Cancer.* 2013. V. 13. № 8. P. 525–541.
- Schumacher T.N.M. // *Nat. Rev. Immunol.* 2002. V. 2. № 7. P. 512–519.
- Ramos C.A., Dotti G. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2011. V. 11. № 7. P. 855–873.
- Gross G., Waks T., Eshhar Z. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. № 24. P. 10024–10028.
- Porter D.L., Levine B.L., Kalos M., Bagg A., June C.H. // *N. Engl. J. Med.* 2011. V. 365. № 8. P. 725–733.
- Porter D.L., Kalos M., Zheng Z., Levine B., June C. // *J. Cancer.* 2011. V. 2. P. 331–332.
- Kochenderfer J.N., Dudley M.E., Feldman S.A., Wilson W.H., Spaner D.E., Maric I., Stetler-Stevenson M., Phan G.Q., Hughes M.S., Sherry R.M., et al. // *Blood.* 2012. V. 119. № 12. P. 2709–2720.
- Brentjens R.J., Davila M.L., Riviere I., Park J., Wang X., Cowell L.G., Bartido S., Stefanski J., Taylor C., Olszewska M., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2013. V. 5. № 177. P. 177ra38.
- Grupp S.A., Kalos M., Barrett D., Aplenc R., Porter D.L., Rheingold S.R., Teachey D.T., Chew A., Hauck B., Wright J.F., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2013. V. 368. № 16. P. 1509–1518.
- Kalos M., Levine B.L., Porter D.L., Katz S., Grupp S.A., Bagg A., June C.H. // *Sci. Transl. Med.* 2011. V. 3. № 95. P. 95ra73.
- Brentjens R.J., Riviere I., Park J.H., Davila M.L., Wang X., Stefanski J., Taylor C., Yeh R., Bartido S., Borquez-Ojeda O., et al. // *Blood.* 2011. V. 118. № 18. P. 4817–4828.
- Xu X.-J., Zhao H.-Z., Tang Y.-M. // *Leuk. Lymphoma.* 2013. V. 54. № 2. P. 255–260.
- Xu Y., Zhang M., Ramos C.A., Durett A., Liu E., Dakhova O., Liu H., Creighton C.J., Gee A.P., Heslop H.E., et al. // *Blood.* 2014. V. 123. № 24. P. 3750–3759.
- Davila M.L., Riviere I., Wang X., Bartido S., Park J., Curran K., Chung S.S., Stefanski J., Borquez-Ojeda O., Olszewska M., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2014. V. 6. № 224. P. 224ra25.
- Akpek G., Lee S.M., Anders V., Vogelsang G.B. // *Biol. Blood Marrow Transplant. J. Am. Soc. Blood Marrow Transplant.* 2001. V. 7. № 9. P. 495–502.
- Ferrara F., Mele G., Palmieri S., Pedata M., Copia C., Riccardi C., Izzo T., Criscuolo C., Musto P. // *Hematol. Oncol.* 2009. V. 27. № 4. P. 198–202.
- Lamers C.H.J., Langeveld S.C.L., Groot-van Ruijven C.M., Debets R., Sleijfer S., Gratama J.W. // *Cancer Immunol. Immunother. CII.* 2007. V. 56. № 12. P. 1875–1883.
- Johnson L.A., Morgan R.A., Dudley M.E., Cassard L., Yang J.C., Hughes M.S., Kammula U.S., Royal R.E., Sherry R.M., Wunderlich J.R., et al. // *Blood.* 2009. V. 114. № 3. P. 535–546.
- Lamers C.H., Sleijfer S., van Steenbergen S., van Elzakker P., van Krimpen B., Groot C., Vulto A., den Bakker M., Oosterwijk E., Debets R., et al. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2013. V. 21. № 4. P. 904–912.
- Sadelain M., Brentjens R., Riviere I. // *Cancer Discov.* 2013. V. 3. № 4. P. 388–398.
- Morgan R.A., Yang J.C., Kitano M., Dudley M.E., Laurencot C.M., Rosenberg S.A. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2010. V. 18. № 4. P. 843–851.
- Uttenthal B.J., Chua I., Morris E.C., Stauss H.J. // *J. Gene Med.* 2012. V. 14. № 6. P. 386–399.
- Moolten F.L. // *Cancer Res.* 1986. V. 46. № 10. P. 5276–5281.
- Tiberghien P., Reynolds C.W., Keller J., Spence S., Deschaseaux M., Certoux J.M., Contassot E., Murphy W.J., Lyons R., Chiang Y. // *Blood.* 1994. V. 84. № 4. P. 1333–1341.
- Bonini C., Ferrari G., Verzeletti S., Servida P., Zappone E., Ruggieri L., Ponzoni M., Rossini S., Mavilio F., Traversari C., et al. // *Science.* 1997. V. 276. № 5319. P. 1719–1724.

35. Oliveira G., Greco R., Lupo-Stanghellini M.T., Vago L., Bonini C. // *Curr. Opin. Hematol.* 2012. V. 19. № 6. P. 427–433.
36. Greco R., Oliveira G., Stanghellini M.T.L., Vago L., Bondanza A., Peccatori J., Cieri N., Markt S., Mastaglio S., Bordignon C., et al. // *Front. Pharmacol.* 2015. V. 6. P. 95.
37. Beltinger C., Fulda S., Kammertoens T., Meyer E., Uckert W., Debatin K.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 15. P. 8699–8704.
38. Traversari C., Markt S., Magnani Z., Mangia P., Russo V., Ciceri F., Bonini C., Bordignon C. // *Blood.* 2007. V. 109. № 11. P. 4708–4715.
39. Riddell S.R., Elliott M., Lewinsohn D.A., Gilbert M.J., Wilson L., Manley S.A., Lupton S.D., Overell R.W., Reynolds T.C., Corey L., et al. // *Nat. Med.* 1996. V. 2. № 2. P. 216–223.
40. Ciceri F., Bonini C., Stanghellini M.T.L., Bondanza A., Traversari C., Salomoni M., Turchetto L., Colombi S., Bernardi M., Peccatori J., et al. // *Lancet Oncol.* 2009. V. 10. № 5. P. 489–500.
41. Maury S., Rosenzweig M., Redjoul R., Marcais A., Xhaard A., Cherai M., Cabanne L., Churlaud G., Suarez F., Socié G., et al. // *Leukemia.* 2014. V. 28. № 12. P. 2406–2410.
42. Zhan H., Gilmour K., Chan L., Farzaneh F., McNicol A.M., Xu J.-H., Adams S., Fehse B., Veys P., Thrasher A., et al. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 10. P. e77106.
43. Di Stasi A., Tey S.-K., Dotti G., Fujita Y., Kennedy-Nasser A., Martinez C., Straathof K., Liu E., Durett A.G., Grilley B., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2011. V. 365. № 18. P. 1673–1683.
44. Zhou X., Di Stasi A., Tey S.-K., Krance R.A., Martinez C., Leung K.S., Durett A.G., Wu M.-F., Liu H., Leen A.M., et al. // *Blood.* 2014. V. 123. № 25. P. 3895–3905.
45. Iulucci J.D., Oliver S.D., Morley S., Ward C., Ward J., Dalgarno D., Clackson T., Berger H.J. // *J. Clin. Pharmacol.* 2001. V. 41. № 8. P. 870–879.
46. Straathof K.C., Pulè M.A., Yotnda P., Dotti G., Vanin E.F., Brenner M.K., Heslop H.E., Spencer D.M., Rooney C.M. // *Blood.* 2005. V. 105. № 11. P. 4247–4254.
47. Quintarelli C., Vera J.F., Savoldo B., Giordano Attianese G.M.P., Pule M., Foster A.E., Heslop H.E., Rooney C.M., Brenner M.K., Dotti G. // *Blood.* 2007. V. 110. № 8. P. 2793–2802.
48. Ramos C.A., Asgari Z., Liu E., Yvon E., Heslop H.E., Rooney C.M., Brenner M.K., Dotti G. // *Stem Cells Dayt. Ohio.* 2010. V. 28. № 6. P. 1107–1115.
49. Gargett T., Brown M.P. // *Cytotherapy.* 2015. V. 17. № 4. P. 487–495.
50. Budde L.E., Berger C., Lin Y., Wang J., Lin X., Frayo S.E., Brouns S.A., Spencer D.M., Till B.G., Jensen M.C., et al. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 12. P. e82742.
51. Kieback E., Charo J., Sommermeyer D., Blankenstein T., Uckert W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 2. P. 623–628.
52. Wang X., Chang W.-C., Wong C.W., Colcher D., Sherman M., Ostberg J.R., Forman S.J., Riddell S.R., Jensen M.C. // *Blood.* 2011. V. 118. № 5. P. 1255–1263.
53. Philip B., Kokalaki E., Mekkaoui L., Thomas S., Straathof K., Flutter B., Marin V., Marafioti T., Chakraverty R., Linch D., et al. // *Blood.* 2014. V. 124. № 8. P. 1277–1287.
54. Introna M., Barbui A.M., Bambacioni F., Casati C., Gaipa G., Borleri G., Bernasconi S., Barbui T., Golay J., Biondi A., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2000. V. 11. № 4. P. 611–620.
55. Serafini M., Manganini M., Borleri G., Bonamino M., Imberti L., Biondi A., Golay J., Rambaldi A., Introna M. // *Hum. Gene Ther.* 2004. V. 15. № 1. P. 63–76.
56. Griffioen M., van Egmond E.H.M., Kester M.G.D., Willemze R., Falkenburg J.H.F., Heemskerk M.H.M. // *Haematologica.* 2009. V. 94. № 9. P. 1316–1320.
57. Fedorov V.D., Themeli M., Sadelain M. // *Sci. Transl. Med.* 2013. V. 5. № 215. P. 215ra172.
58. Zhang E., Xu H. // *J. Hematol. Oncol. J Hematol Oncol.* 2017. V. 10. № 1. P. 1.
59. Grada Z., Hegde M., Byrd T., Shaffer D.R., Ghazi A., Brawley V.S., Corder A., Schönfeld K., Koch J., Dotti G., et al. // *Mol. Ther. Nucleic Acids.* 2013. V. 2. P. e105.
60. Maher J., Brentjens R.J., Gunset G., Rivière I., Sadelain M. // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. № 1. P. 70–75.
61. Seton-Rogers S. // *Nat. Rev. Cancer.* 2016. V. 16. № 3. P. 128–129.
62. Kloss C.C., Condomines M., Cartellieri M., Bachmann M., Sadelain M. // *Nat. Biotechnol.* 2013. V. 31. № 1. P. 71–75.
63. Wilkie S., van Schalkwyk M.C.I., Hobbs S., Davies D.M., van der Stegen S.J.C., Pereira A.C.P., Burbidge S.E., Box C., Eccles S.A., Maher J. // *J. Clin. Immunol.* 2012. V. 32. № 5. P. 1059–1070.
64. Morsut L., Roybal K.T., Xiong X., Gordley R.M., Coyle S.M., Thomson M., Lim W.A. // *Cell.* 2016. V. 164. № 4. P. 780–791.
65. Wu C.-Y., Roybal K.T., Puchner E.M., Onuffer J., Lim W.A. // *Science.* 2015. V. 350. № 6258. P. aab4077.
66. Uhlen M., Oksvold P., Fagerberg L., Lundberg E., Jonasson K., Forsberg M., Zwahlen M., Kampf C., Wester K., Hober S., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2010. V. 28. № 12. P. 1248–1250.
67. Campoli M., Ferrone S. // *Oncogene.* 2008. V. 27. № 45. P. 5869–5885.
68. Ginhoux F., Turbant S., Gross D.A., Poupiot J., Marais T., Lone Y., Lemonnier F.A., Firat H., Perez N., Danos O., et al. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2004. V. 10. № 2. P. 279–289.
69. Sakemura R., Terakura S., Watanabe K., Julamanee J., Takagi E., Miyao K., Koyama D., Goto T., Hanajiri R., Nishida T., et al. // *Cancer Immunol. Res.* 2016. V. 4. № 8. P. 658–668.
70. Choi J., Chen J., Schreiber S.L., Clardy J. // *Science.* 1996. V. 273. № 5272. P. 239–242.
71. Bayle J.H., Grimley J.S., Stankunas K., Gestwicki J.E., Wandless T.J., Crabtree G.R. // *Chem. Biol.* 2006. V. 13. № 1. P. 99–107.
72. Bishop A., Buzko O., Heyeck-Dumas S., Jung I., Kraybill B., Liu Y., Shah K., Ulrich S., Witucki L., Yang F., et al. // *Annu. Rev. Biophys. Biomol. Struct.* 2000. V. 29. P. 577–606.
73. Banaszynski L.A., Chen L.-C., Maynard-Smith L.A., Ooi A.G.L., Wandless T.J. // *Cell.* 2006. V. 126. № 5. P. 995–1004.
74. Park J.S., Rhau B., Hermann A., McNally K.A., Zhou C., Gong D., Weiner O.D., Conklin B.R., Onuffer J., Lim W.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 16. P. 5896–5901.
75. Tamada K., Geng D., Sakoda Y., Bansal N., Srivastava R., Li Z., Davila E. // *Clin. Cancer Res. Off. J. Am. Assoc. Cancer Res.* 2012. V. 18. № 23. P. 6436–6445.
76. Urbanska K., Lanitis E., Poussin M., Lynn R.C., Gavin B.P., Kelderman S., Yu J., Scholler N., Powell D.J. // *Cancer Res.* 2012. V. 72. № 7. P. 1844–1852.
77. Rodgers D.T., Mazagova M., Hampton E.N., Cao Y., Ramadoss N.S., Hardy I.R., Schulman A., Du J., Wang F., Singer O., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 4. P. E459–468.
78. Lee D.W., Kochenderfer J.N., Stetler-Stevenson M., Cui Y.K., Delbrook C., Feldman S.A., Fry T.J., Orentas R., Sabatino M., Shah N.N., et al. // *Lancet Lond. Engl.* 2015. V. 385. № 9967. P. 517–528.
79. Evans A.G., Rothberg P.G., Burack W.R., Huntington S.F., Porter D.L., Friedberg J.W., Liesveld J.L. // *Br. J. Haematol.* 2015. V. 171. № 2. P. 205–209.
80. Clémenceau B., Congy-Jolivet N., Gallot G., Vivien R., Gaschet J., Thibault G., Vié H. // *Blood.* 2006. V. 107. № 12. P. 4669–4677.

81. Kudo K., Imai C., Lorenzini P., Kamiya T., Kono K., Davidoff A.M., Chng W.J., Campana D. // *Cancer Res.* 2014. V. 74. № 1. P. 93–103.
82. D'Aloia M.M., Caratelli S., Palumbo C., Battella S., Arriga R., Lauro D., Palmieri G., Sconocchia G., Alimandi M. // *Cytotherapy.* 2016. V. 18. № 2. P. 278–290.
83. Ma J.S.Y., Kim J.Y., Kazane S.A., Choi S.-H., Yun H.Y., Kim M.S., Rodgers D.T., Pugh H.M., Singer O., Sun S.B., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 4. P. E450–458.
84. Cao Y., Rodgers D.T., Du J., Ahmad I., Hampton E.N., Ma J.S.Y., Mazagova M., Choi S.-H., Yun H.Y., Xiao H., et al. // *Angew. Chem. Int. Ed Engl.* 2016. V. 55. № 26. P. 7520–7524.
85. Skerra A. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2007. V. 18. № 4. P. 295–304.
86. Kim M.S., Ma J.S.Y., Yun H., Cao Y., Kim J.Y., Chi V., Wang D., Woods A., Sherwood L., Caballero D., et al. // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. V. 137. № 8. P. 2832–2835.
87. Shimizu Y., van Seventer G.A., Horgan K.J., Shaw S. // *Immunol. Rev.* 1990. V. 114. P. 109–143.
88. Salmon H., Franciszkiewicz K., Damotte D., Dieu-Nosjean M.-C., Validire P., Trautmann A., Mami-Chouaib F., Donnadieu E. // *J. Clin. Invest.* 2012. V. 122. № 3. P. 899–910.
89. Han X., Bryson P.D., Zhao Y., Cinay G.E., Li S., Guo Y., Siriwon N., Wang P. // *Mol. Ther. J. Am. Soc. Gene Ther.* 2017. V. 25. № 1. P. 274–284.
90. Zhao Y., Moon E., Carpenito C., Paulos C.M., Liu X., Brennan A.L., Chew A., Carroll R.G., Scholler J., Levine B.L., et al. // *Cancer Res.* 2010. V. 70. № 22. P. 9053–9061.
91. Barrett D.M., Zhao Y., Liu X., Jiang S., Carpenito C., Kalos M., Carroll R.G., June C.H., Grupp S.A. // *Hum. Gene Ther.* 2011. V. 22. № 12. P. 1575–1586.
92. Maus M.V., Haas A.R., Beatty G.L., Albelda S.M., Levine B.L., Liu X., Zhao Y., Kalos M., June C.H. // *Cancer Immunol. Res.* 2013. V. 1. P. 26–31.
93. Beatty G.L., Haas A.R., Maus M.V., Torigian D.A., Soulen M.C., Plesa G., Chew A., Zhao Y., Levine B.L., Albelda S.M., et al. // *Cancer Immunol. Res.* 2014. V. 2. № 2. P. 112–120.

УДК 76.00.00

Опухолевые модели организменного уровня на основе *Danio rerio*

И. В. Мизгирев¹, Д. Р. Сафина², И. В. Демидюк², С. В. Костров²¹Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Петрова Министерства здравоохранения Российской Федерации, 197758, Санкт-Петербург, п. Песочный, ул. Ленинградская, 68²Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Академика Курчатова, 2

E-mail: nauruz@mail.ru

Поступила в редакцию 15.11.2017

Принята к печати 14.05.2018

РЕФЕРАТ Разработка и использование адекватных моделей организменного уровня являются одним из ключевых элементов развития различных направлений медико-биологических исследований, в том числе в области экспериментальной онкологии. В последнее десятилетие все большую популярность приобретают работы, основанные на использовании *Danio rerio*. Данный обзор посвящен описанию различных подходов к созданию на основе *D. rerio* высокоэффективных моделей для онкологических исследований. Основное внимание уделено различным трансплантационным моделям и перспективам их сочетания с оптически прозрачными (в том числе клональными) линиями *D. rerio* и опухолями различной природы, несущими флуоресцентные метки. Комбинация трансплантационной организменной модели на основе прозрачных клональных линий *D. rerio* с методами флуоресцентной микроскопии, FACS-фракционирования клеточных популяций и транскрипционным анализом может стать одним из наиболее эффективных подходов к получению принципиально новых данных о процессах возникновения и развития опухолей.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аллогенная и ксеногенная трансплантация, биоимиджинг, молекулярная онкология, прозрачные линии, *Danio rerio*.

ВВЕДЕНИЕ

Рак представляет собой одну из наиболее серьезных проблем современной медицины. Смертность от рака занимает второе место в индустриальных странах и, по прогнозам, имеет весомую перспективу перейти на первое [1]. В связи с этим разработка биологических моделей, позволяющих создавать новые подходы к изучению механизмов возникновения и прогрессии злокачественных новообразований, а также к повышению эффективности поиска путей противоопухолевой терапии, остается одной из актуальных проблем современной онкологии.

Реализуемые в настоящее время подходы базируются преимущественно на использовании клеток человека и других млекопитающих *in vitro*. Несмотря на очевидные достоинства, эти модели имеют и ряд существенных ограничений. В первую очередь, это связано с тем, что получаемые с их использованием результаты находятся вне контекста организма как единого целого. Например, модели *in vitro* не отражают стадии развития или возраст организма, не позволяют оценить такие опосредованные организмом эффекты, как влияние тканевого микроокружения, гормонального статуса, иммунной системы

и др. Очевидно, что исследования, проводимые *in vitro*, должны быть дополнены организменными моделями *in vivo*. Центральной моделью такого уровня является модель с использованием грызунов. Перевиваемые опухолевые штаммы, которые могут быть трансплантированы инбредным линиям млекопитающих, считаются «золотым стандартом» экспериментальной онкологии, так как позволяют быстро получать необходимое количество синхронно развивающихся опухолей. С другой стороны, стандартные модели опухолевого роста *in vivo* с использованием грызунов оказались мало совместимыми с современными технологиями высокопроизводительного скрининга противоопухолевых средств по причине высокой стоимости и трудоемкости таких исследований. Необходимо также подчеркнуть, что эта модель не позволяет осуществлять высокоэффективный биоимиджинг развития опухоли и изменений в окружающих тканях организма, что является существенным недостатком при анализе тонких механизмов прогрессии опухоли. Поэтому внимание исследователей привлекает поиск альтернативных моделей опухолевого роста, способных, с одной стороны, составить конкуренцию грызунам в плане трансляции

результатов в клиническую практику, а с другой, обладающих существенно большей информативностью и производительностью.

В последние годы все более популярной моделью становится пресноводная рыба *Danio rerio* (полосатый данио, или рыба-зебра). Это обусловлено небольшими размерами (2.5–4 см), коротким жизненным циклом этой рыбы, а также возможностью получать от одной самки до нескольких сотен икринок в неделю, развитием *ex utero*, прозрачностью эмбрионов и личинок, относительной простотой содержания и разведения и существованием множества мутантных и трансгенных линий.

Необходимо подчеркнуть, что модель *D. rerio* прекрасно адаптирована к использованию современных молекулярно-генетических подходов. Расшифрован и достаточно подробно аннотирован геном этого организма [www.ncbi.nlm.nih.gov/genom/GRCz11]. Детально отработаны методы введения генетического материала в эмбрионы рыб, в том числе разработаны подходы к направленному введению мутаций с использованием платформы ZFNs (zinc finger nucleases) [2–4]. Отработан метод высокоэффективного инсерционного мутагенеза с использованием ретровирусов [5] и транспозонных элементов [6, 7]. Активно ведутся эксперименты по редактированию генома *D. rerio* с использованием системы CRISPR/Cas9 [8]. Сконструированы разнообразные генетически маркированные линии *D. rerio*, разрабатываются трансплантационные модели, включая модели ксеногенной трансплантации тканей человека в организм рыб.

МОДЕЛИ НА ОСНОВЕ ИНДУЦИРОВАННЫХ ОПУХОЛЕЙ *D. rerio*

Начало моделированию опухолевого роста у *D. rerio* положили пионерские работы Stanton [9] и Khudoley [10] по индукции опухолей печени химическими канцерогенами. Эта модель до сих пор остается одним из наиболее востребованных инструментов изучения различных аспектов опухолевого роста у рыб (рис. 1).

Кроме того, путем введения в зиготы *D. rerio* векторной ДНК, содержащей различные онкогены, управляемые тканеспецифическими промоторами, создано множество новых моделей, основанных на индукции опухолей [11]. Таким способом получены эмбриональные рабдомиосаркомы [12], меланомы [13], гепатоцеллюлярные карциномы [14], а также различные типы лейкоза [15–17].

Важно отметить, что многие генетически индуцированные опухоли несут гены флуоресцентных белков-репортеров, что дает возможность определять время возникновения опухоли и отслеживать ее рост по нарастанию флуоресценции опухолевых клеток [18]. В некоторых из этих моделей используются



Рис. 1. *D. rerio* с индуцированной канцерогеном опухолью печени. А – здоровая рыба. Б – рыба с индуцированной гепатокарциномой. В – эта же рыба со вскрытой в процессе аутопсии брюшной полостью. Индукция опухоли проведена по методике, описанной в работе Khudoley [10]

генетические конструкции с регуляторными элементами, позволяющими управлять временем возникновения опухолей. В частности, разработаны подходы к индукции образования гепатоцеллюлярных карцином доксициклином [19] и мифепристоном [20]. Однако недостатком большинства указанных выше моделей остается их низкая частота и длительный латентный период возникновения опухолей, что затрудняет их использование, например, для скрининга потенциальных лекарственных средств.

ТРАНСПЛАНТАЦИОННЫЕ МОДЕЛИ НА ОСНОВЕ *D. rerio*

В настоящее время исследования, направленные на создание моделей злокачественного роста, основанных на трансплантации маркированных опухолевых

клеток млекопитающих или рыб в организм *D. rerio*, ведутся во многих лабораториях мира [21–25].

Однако до последнего времени все попытки использования в онкологических исследованиях трансплантационных моделей на основе *D. rerio* сталкивались с рядом существенных ограничений. В частности, долгое время опухоли удавалось перевивать только сублетально облученным рыбам или эмбрионам на самых ранних этапах развития.

При этом подход, связанный с использованием сублетального гамма-облучения [26], оказался не очень удобным из-за высокой смертности рыб, а также достаточно быстрого восстановления иммунной системы у выживших особей.

Технология аллогенной или ксеногенной трансплантации опухолевых клеток, в том числе клеток человека [27] или грызунов [28], в эмбрионы *D. rerio* выглядит более привлекательно и интенсивно развивается в последние годы. Трансплантаты, пересаженные эмбрионам на ранних стадиях развития (до возраста 48 часов), не отторгаются из-за незрелости иммунной системы эмбрионов и способны выживать в организме реципиента. В ряде случаев такие клетки могут мигрировать на некоторое расстояние от места инъекции [29] и индуцировать рост кровеносных сосудов, продуцируя ангиогенные факторы [30–32]. Тем не менее трансплантационные модели этого типа имеют и ряд ограничений, связанных, например, с не оптимальными для роста клеток млекопитающих температурными условиями в организме эмбрионов рыб, культивируемых при 28°C. Однако следует отметить, что в течение некоторого времени культивировать эмбрионы *D. rerio* без существенно ущерба для их выживаемости можно и при более высокой температуре (до 35°C), более физиологичной для клеток млекопитающих [33]. Недавно ксенотрансплантацию опухолей в эмбрионы *D. rerio* успешно использовали для оценки чувствительности опухолей, полученных от пациентов, к действию различных препаратов и их комбинаций с целью подбора оптимальной стратегии лекарственной терапии [34]. Ранее подобного рода исследования проводили исключительно на бестимусных мышцах, однако в силу высокой стоимости и трудоемкости этот подход имеет крайне ограниченные перспективы для широкого использования в клинической онкологии.

К сожалению, все попытки создания инбредных линий *D. rerio*, аналогичных инбредным линиям млекопитающих, используя стандартную генетическую технику, потерпели неудачу из-за падения фертильности рыб после нескольких раундов близкородственного скрещивания.

В настоящее время проблема трансплантации чужеродных тканей в организм *D. rerio* в значительной

степени преодолена в связи с развитием трех новых экспериментальных подходов. Первый из них основан на получении гомозиготных диплоидных клональных линий *D. rerio* [35], что впервые позволило осуществить перенос опухолевых или нормальных клеток от одной рыбы к другой в пределах линии без отторжения трансплантата. Принципиальная возможность конструирования таких линий впервые была показана Streisinger и соавт. [36]. Для конструирования клональных линий используется метод двойного теплового шока [37]. При этом яйцеклетки *D. rerio* оплодотворяют *in vitro* инактивированными УФ-облучением сперматозоидами, после чего подвергают короткому тепловому шоку для блокирования первого деления дробления. Выжившие эмбрионы (приблизительно 0.5% от подвергнутых тепловому шоку зигот) выращивают до взрослого состояния. Эта процедура приводит к созданию полностью гомозиготных диплоидных рыб, которые, тем не менее, генетически различаются между собой. На втором этапе яйцеклетки, полученные от каждой из гомозиготных самок, подвергают следующему раунду оплодотворения УФ-облученными сперматозоидами с последующим тепловым шоком. Потомки, полученные от каждой гомозиготной самки, являются полной генетической копией (клоном) этой самки, а также друг друга по причине изначальной гомозиготности материнского организма. Дальнейшее поддержание клональных линий осуществляется скрещиванием рыб одного клона друг с другом. Следует отметить, что пол у *D. rerio* определяется не половыми хромосомами, а физиологическими факторами, действующими на ранних этапах развития, поэтому в потомстве от скрещивания клональных рыб будут появляться как самцы, так и самки. Эти линии характеризуются полной генетической идентичностью и гомозиготностью особей внутри каждого клона и являются прямыми аналогами инбредных линий грызунов.

Клональные линии, состоящие из генетически идентичных особей, оказались удобной моделью для серийных трансплантаций опухолевых клеток. Некоторые опухолевые штаммы, ведущие свое начало от индуцированных нитрозодиэтиламиноом карцином печени и поджелудочной железы клональных рыб, прошли более 20 последовательных пассажей без признаков отторжения. В более поздних исследованиях клональные рыбы линий CG1 и CG2 были использованы для индукции и последующей перевивки сингенным реципиентам меченных флуоресцентными репортерами рабдомиосаркомы [38] и лейкозных клеток [39]. При этом небольшие размеры личинок и эмбрионов *D. rerio* делают их идеальным объектом массовой трансплантации опухолевых клеток сотням

сингенных реципиентов в течение короткого промежутка времени.

Второй подход, который начал развиваться совсем недавно, основан на использовании иммунодефицитных линий рыб [40], аналогичных бестимусным мышам NOD/SCID [41]. Такая модель позволяет осуществлять достаточно эффективную аллогенную трансплантацию реципиенту опухолевых и нормальных тканей. Однако необходимо подчеркнуть, что использование животных с иммунодефицитом не позволяет, в частности, изучать целый ряд аспектов взаимодействия опухоли с организмом хозяина.

В этой связи особенно перспективным представляется еще один подход, основанный на разработанной недавно технике двойной трансплантации [42]. В основе этого подхода лежит введение в эмбрионы *D. rerio* на самых ранних стадиях развития (до 48 ч после оплодотворения) летально облученных опухолевых клеток. Показано, что такие клетки персистируют в организме реципиента около 2 недель, не влияют на его жизнеспособность, однако приводят к развитию специфической иммунологической толерантности к данной опухоли, не вызывая при этом глобального иммунодефицита. Через 3 месяца после первичной трансплантации таким животным могут быть введены необлученные клетки соответствующей опухоли. Такие опухоли эффективно развиваются, формируют опухолевые узлы, способны к метастазированию. Подход опробован на различных опухолях человека, в том числе гепатокарциноме и опухоли предстательной железы. Таким образом, эта модель позволяет перевивать аллогенные и ксеногенные опухоли взрослым рыбам и достаточно точно имитирует процесс развития опухоли в организме.

ТРАНСПЛАНТАЦИОННЫЕ МОДЕЛИ НА ОСНОВЕ ТРАНСПАРЕНТНЫХ ЛИНИЙ *D. rerio*

Еще одно ограничение на использование *D. rerio* в качестве организменной опухолевой модели – потеря по мере взросления рыбы прозрачности стенок тела из-за появления в коже, глазах и перитонеальной выстилке пигментных клеток – хромофоров, продуцирующих черный (меланофоры), светоотражающий (иридофоры) и желтый (ксантофоры) пигменты. Это существенно затрудняет биоимиджинговый анализ развития трансплантированных или индуцированных опухолей в организме животного. Однако в настоящее время получены оптически прозрачные линии (*ruby*, *casper*, *sheer*) [43, 44], которые утратили большинство пигментных клеток и, как следствие, имеют прозрачные стенки тела, через которые можно видеть все висцеральные органы, а также трансплантированные нормальные и опухолевые ткани (рис. 2, 3). Таким образом, прозрачные линии

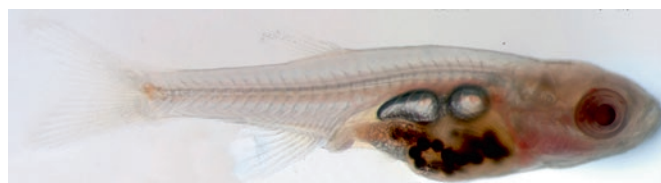


Рис. 2. *D. rerio* прозрачной линии *sheer*. Возраст 3 недели



Рис. 3. Индуцированная канцерогеном гепатоцеллюлярная карцинома у *D. rerio* прозрачной линии *sheer*. Индукция опухоли проведена по методике, описанной в работе Khudoley [10]

представляют собой практически идеальную модель для неинвазивного изучения опухолевого роста *in vivo* в реальном масштабе времени и с уровнем пространственного разрешения, достаточным для выявления даже одной опухолевой клетки. Очевидно, что следующим шагом станет конструирование клональных оптически прозрачных линий, а также сочетание прозрачных линий с технологией двойной трансплантации.

Конструирование оптически прозрачных, в первую очередь клональных, линий *D. rerio* придает особые перспективы использованию для трансплантации флуоресцентно меченных опухолей. Получение таких опухолей посредством введения в зиготы генетических конструкций, содержащих различные онкогены в комбинации с флуоресцентными белками-репортерами, отработано, как сказано выше, на клональных линиях *D. rerio* [38, 39]. В то же время опухоли, индуцированные канцерогенами у обычных не трансгенных рыб, и по своим биологическим особенностям наиболее сходные с опухолями человека, не способны к экспрессии флуоресцентных репортеров. Для преодоления этого ограничения в последнее время разрабатываются подходы, позволяющие получать трансплантабельные флуоресцентные опухоли и при действии химических канцерогенов. В частности, с этой целью созданы трансгенные сублинии *D. rerio*, ведущие свое происхождение от клональной линии CG2 и способные к экспрессии флуоресцентных маркеров во всех клетках тела. Любые опухоли, индуцированные



Рис. 4. Рост меченной зеленым флуоресцентным белком рабдомиосаркомы, перевиваемой на клональной линии *D. rerio*. Внутримышечная трансплантация, 4-й пассаж

у рыб одной из этих сублиний, будут нести флуоресцентную метку и смогут перевиваться рыбам исходной клональной линии (рис. 4). Реализация подобной техники на клональных транспарентных линиях *D. rerio* позволит получить трансплантационную модель, предоставляющую совершенно исключительные возможности для детального биоимиджингового исследования опухолевого роста.

ПЕРСПЕКТИВЫ РАЗВИТИЯ МОДЕЛИ

Одна из наиболее интересных стратегий в развитии моделей на основе *D. rerio* – ее комбинирование с современными подходами к транскриптомному анализу. В настоящее время с использованием технологии микрочипов и РНК-секвенирования получены данные транскриптомного анализа целого ряда опухолей *D. rerio* различного генеза (гепатоцеллюлярной карциномы, меланомы, рабдомиосаркомы и др.). Эти результаты были сопоставлены с результатами анализа соответствующих опухолей человека. Основным выводом из этих исследований стала констатация консервативности транскриптомных изменений, сопровождающих опухолевую трансформацию у человека и *D. rerio* [45, 46]. Этот вывод крайне важен для дальнейшего развития данной системы, поскольку указывает на возможность ее использования для детального анализа механизмов возникновения и развития опухолей человека и высокоэффективного скрининга противоопухолевых средств. Одно из наиболее перспективных направлений, позволяющее надеяться на создание новых подходов к терапии опухолевых заболеваний, – детальное изучение взаимодействия опухоли с окружающей стромальной тканью [47]. К настоящему моменту очевидно, что микроокружение, представленное, в пер-

вую очередь фибробластами, клетками эндотелия, перицитами, лейкоцитами и внеклеточным матриксом, составляет интегральную часть опухоли и непосредственно вовлечено в контроль ее образования, роста и прогрессии. В свою очередь, клетки опухоли оказывают активное ремоделирующее действие на окружающую ткань. Таким образом, процесс опухолевого роста включает в себя сложный набор различных взаимодействий, меняющихся в ходе прогрессии новообразования. Очевидно, что анализ взаимодействия опухоли со стромальной тканью невозможен без использования организменных моделей. Используемые в настоящее время ключевые системы основаны на иммунодефицитных линиях грызунов. При этом методология исследований предполагает сочетание организменной модели, флуоресцентной микроскопии, FACS-фракционирования клеточных популяций и транскрипционного анализа [48]. Однако все большую популярность приобретает модель *D. rerio* [49, 50]. Представляется весьма вероятным, что реализация такого подхода в комбинации с трансплантационной моделью на основе оптически транспарентных линий *D. rerio* позволит получить принципиально новые данные как о процессах развития опухолей, так и о механизмах их взаимодействия с окружающей тканью. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научных проектов № 18-04-00319 и 17-00-00189, Президиума Российской академии наук в рамках Программы научных исследований «Фундаментальные исследования для биомедицинских технологий» и «Молекулярная и клеточная биология».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jemal A., Siegel R., Ward E., Hao Y., Xu J., Murray T., Thun M.J. // *CA Cancer J. Clin.* 2008. V. 58. № 2. P. 71–96.
2. Reyon D., Kirkpatrick J.R., Sander J.D., Zhang F., Voytas D.F., Joung J.K., Dobbs D., Coffman C.R. // *BMC Genomics.* 2011. V. 12. P. 83.
3. Cifuentes D., Xue H., Taylor D.W., Patnode H., Mishima Y., Cheloufi S., Ma E., Mane S., Hannon G.J., Lawson N.D., et al. // *Science.* 2010. V. 328. № 5986. P. 1694–1698.
4. Siekmann A.F., Standley C., Fogarty K.E., Wolfe S.A., Lawson N.D. // *Genes Dev.* 2009. V. 23. № 19. P. 2272–2277.
5. Amsterdam A., Nissen R.M., Sun Z., Swindell E.C., Farrington S., Hopkins N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 35. P. 12792–12797.
6. Kwan K.M., Fujimoto E., Grabher C., Mangum B.D., Hardy M.E., Campbell D.S., Parant J.M., Yost H.J., Kanki J.P., Chien C.B. // *Dev. Dyn.* 2007. V. 236. № 11. P. 3088–3099.
7. Villefranc J.A., Amigo J., Lawson N.D. // *Dev. Dyn.* 2007. V. 236. № 11. P. 3077–3087.
8. Li M., Zhao L., Page-McCaw P.S., Chen W. // *Trends Genet.* 2016. V. 32. № 12. P. 815–827.
9. Stanton M.F. // *J. Natl. Cancer Inst.* 1965. V. 34. P. 117–130.
10. Khudoley V.V. // *Natl. Cancer Inst. Monogr.* 1984. V. 65. P. 65–70.
11. Etchin J., Kanki J.P., Look A.T. // *Methods Cell Biol.* 2011. V. 105. P. 309–337.
12. Chen E.Y., Langenau D.M. // *Methods Cell Biol.* 2011. V. 105. P. 383–402.
13. Bootorabi F., Manouchehri H., Changizi R., Barker H., Palazzo E., Saltari A., Parikka M., Pincelli C., Aspatwar A. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. № 7. P. 1550.
14. Nguyen A.T., Emelyanov A., Koh C.H., Spitsbergen J.M., Lam S.H., Mathavan S., Parinov S., Gong Z. // *Dis. Model Mech.* 2011. V. 4. № 6. P. 801–813.
15. Langenau D.M., Traver D., Ferrando A.A., Kutok J.L., Aster J.C., Kanki J.P., Lin S., Prochownik E., Trede N.S., Zon L.I., et al. // *Science.* 2003. V. 299. № 5608. P. 887–890.
16. Teittinen K.J., Grönroos T., Parikka M., Rämetsä M., Lohi O. // *Leuk. Res.* 2012. V. 36. № 9. P. 1082–1088.
17. Moore F.E., Langenau D.M. // *Adv. Hematol.* 2012. V. 2012. P. 478164.
18. Ignatius M.S., Langenau D.M. // *Methods Cell Biol.* 2011. V. 105. P. 437–459.
19. Li Z., Zheng W., Wang Z., Zeng Z., Zhan H., Li C., Zhou L., Yan C., Spitsbergen J.M., Gong Z. // *Dis. Model Mech.* 2013. V. 6. № 2. P. 414–423.
20. Nguyen A.T., Emelyanov A., Koh C.H., Spitsbergen J.M., Parinov S., Gong Z. // *Dis. Model Mech.* 2012. V. 5. № 1. P. 63–72.
21. Le X., Pugach E.K., Hettmer S., Storer N.Y., Liu J., Wills A.A., DiBiase A., Chen E.Y., Ignatius M.S., Poss K.D., et al. // *Development.* 2013. V. 140. № 11. P. 2354–2356.
22. Li Z., Zheng W., Li H., Li C., Gong Z. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 7. P. e0132319.
23. Kaufman C.K., Mosimann C., Fan Z.P., Yang S., Thomas A.J., Ablain J., Tan J.L., Fogley R.D., van Rooijen E., Hagedorn E.J., et al. // *Science.* 2016. V. 351(6272). P. 2197.
24. Moore F.E., Garcia E.G., Lobbardi R., Jain E., Tang Q., Moore J.C., Cortes M., Molodtsov A., Kasheta M., Luo C.C., et al. // *J. Exp. Med.* 2016. V. 213. № 6. P. 979–992.
25. Tulotta C., He S., van der Ent W., Chen L., Groenewoud A., Spaik H.P., Snaar-Jagalska B.E. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2016. V. 916. P. 239–263.
26. Langenau D.M., Ferrando A.A., Traver D., Kutok J.L., Hezel J.P., Kanki J.P., Zon L.I., Look A.T., Trede N.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 19. P. 7369–7374.
27. Jung D.W., Oh E.S., Park S.H., Chang Y.T., Kim C.H., Choi S.Y., Williams D.R. // *Mol. Biosyst.* 2012. V. 8. № 7. P. 1930–1939.
28. Nicoli S., Ribatti D., Cotelli F., Presta M. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. № 7. P. 2927–2931.
29. Marques I.J., Weiss F.U., Vlecken D.H., Nitsche C., Bakkers J., Lagendijk A.K., Partecke L.I., Heidecke C.D., Lerch M.M., Bagowski C.P. // *BMC Cancer.* 2009. V. 9. P. 128.
30. Tran T.C., Sneed B., Haider J., Blavo D., White A., Aiyerorun T., Baranowski T.C., Rubinstein A.L., Doan T.N., Dingleline R., et al. // *Cancer Res.* 2007. V. 67. № 23. P. 11386–11392.
31. Rouhi P., Lee S.L., Cao Z., Hedlund E.M., Jensen L.D., Cao Y. // *Cell Cycle.* 2010. V. 9. № 5. P. 913–917.
32. Zhao C., Wang X., Zhao Y., Li Z., Lin S., Wei Y., Yang H. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 7. P. e21768.
33. Marques I.J., Weiss F.U., Vlecken D.H., Nitsche C., Bakkers J., Lagendijk A.K., Partecke L.I., Heidecke C.D., Lerch M.M., Bagowski C.P. // *BMC Cancer.* 2009. V. 9. P. 128.
34. Fior R., Póvoa V., Mendes R.V., Carvalho T., Gomes A., Figueiredo N., Ferreira M.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 39. P. 8234–8243.
35. Mizgirev I.V., Revskoy S.Y. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. № 6. P. 3120–3125.
36. Streisinger G., Walker C., Dower N., Knauber D., Singer F. // *Nature.* 1981. V. 291. № 5813. P. 293–296.
37. Mizgirev I., Revskoy S. // *Nat. Protocols.* 2010. V. 5. № 3. P. 383–394.
38. Ignatius M.S., Chen E., Elpek N.E., Fuller A., Tenente I.M., Clagg R., Liu S., Blackburn J.S., Linardic C.M., Rosenberg A., et al. // *Cancer Cell.* 2012. V. 21. № 5. P. 680–693.
39. Mizgirev I.V., Revskoy S. // *Cancer Biol. Ther.* 2010. V. 9. № 11. P. 895–902.
40. Moore J.C., Tang Q., Yordan N.T., Moore F.E., Garcia E.G., Lobbardi R., Ramakrishnan A., Marvin D.L., Anselmo A., Sadreyev R.I., et al. // *J. Exp. Med.* 2016. V. 213. № 12. P. 2575–2589.
41. Ito M., Hiramatsu H., Kobayashi K., Suzue K., Kawahata M., Hioki K., Ueyama Y., Koyanagi Y., Sugamura K., Tsuji K., et al. // *Blood.* 2002. V. 100. P. 3175–3182.
42. Zhang B., Shimada Y., Hirota T., Ariyoshi M., Kuroyanagi J., Nishimura Y., Tanaka T. // *Transl. Res.* 2016. V. 170. P. 89–98. e3.
43. White R.M., Sessa A., Burke C., Bowman T., LeBlanc J., Ceol C., Bourque C., Dovey M., Goessling W., Burns C.E., et al. // *Cell Stem Cell.* 2008. V. 2. № 2. P. 183–189.
44. Ren J.Q., McCarthy W.R., Zhang H., Adolph A.R., Li L. // *Vision Res.* 2002. V. 42. № 3. P. 293–299.
45. Lam S.H., Wu Y.L., Vega V.B., Miller L.D., Spitsbergen J., Tong Y., Zhan H., Govindarajan K.R., Lee S., Mathavan S., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. № 1. P. 73–75.
46. Lam S.H., Gong Z. // *Cell Cycle.* 2006. V. 5. № 6. P. 573–577.
47. Pietras K., Östman A. // *Exp. Cell Res.* 2010. V. 316. № 8. P. 1324–1331.
48. Yang N., Huang B., Tsinkalovsky O., Brekkå N., Zhu H., Leiss L., Enger P.Ø., Li X., Wang J. // *Cancer Cell Int.* 2014. V. 14. № 1. P. 541.
49. Wang J., Cao Z., Zhang X.M., Nakamura M., Sun M., Hartman J., Harris R.A., Sun Y., Cao Y. // *Cancer Res.* 2015. V. 75. № 2. P. 306–315.
50. Vittori M., Breznik B., Gredar T., Hrovat K., Bizjak Mali L., Lah T.T. // *Radiol. Oncol.* 2016. V. 50. № 2. P. 159–167.

УДК 57.083.3

Получение и исследование свойств рекомбинантного иммуноглобулина А, специфичного к гемагглютинином вируса гриппа

Т. К. Алиев^{1*}, И. Г. Дементьева², В. А. Топорова³, В. В. Аргентова⁴, Л. П. Позднякова², М. Н. Боков², Ю. А. Вотчицева⁴, Д. А. Долгих^{3,4}, С. Д. Варфоломеев¹, П. Г. Свешников², М. П. Кирпичников^{3,4}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

²Всероссийский научный центр молекулярной диагностики и лечения, 117149, Москва, Симферопольский бульвар, 8

³Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

*E-mail: ta12345@list.ru

Поступила в редакцию 13.06.2017

Принята к печати 16.04.2018

РЕФЕРАТ Получены рекомбинантные варианты человеческого антитела F16, проявляющие широкую специфичность к гемагглютинином вируса гриппа А. На основе бипромоторного вектора (CMV, hEF1-HTLV) получены генетические конструкции, экспрессирующие тяжелую и легкую цепи иммуноглобулинов IgA1-, IgA2m1- и IgG-изотипов. В результате трансфекции и селекции клеток СНО яичников китайского хомячка получены клеточные линии, стабильно экспрессирующие указанные антитела. Иммуноглобулины изотипов IgA1, IgA2m1 и IgG выделены из культуральной жидкости. Определены иммунохимические характеристики антител, изучено взаимодействие рекомбинантных иммуноглобулинов со штаммами вируса гриппа А подтипов H1N1 и H3N2. Показано, что рекомбинантные варианты F16 IgA-изотипа проявляют, как и исходное антитело, специфичность в отношении всех исследуемых штаммов. При этом наибольший уровень связывания достигается для подтипа H1N1, относящегося к гемагглютинином филогенетической группы I. **КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** вирус гриппа А, широко нейтрализующие антитела, иммуноглобулин А, IgA1, IgA2m1, рекомбинантные антитела.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВГА – вирус гриппа А; MES – 2-(N-морфолино)этансульфоновая кислота; ИФА – иммуноферментный анализ; K_d – константа диссоциации.

ВВЕДЕНИЕ

Пассивная иммунотерапия с использованием антител к компонентам вирусного капсида является перспективным направлением разработки новых лекарственных средств для борьбы с гриппом [1, 2]. Этот подход приобретает особое значение в связи с высокой изменчивостью поверхностных антигенов вируса гриппа А (ВГА), приводящей к уменьшению эффективности вакцин и низкомолекулярных терапевтических средств. С целью создания универсальных препаратов широкой специфичности на протяжении последних лет ведется активный поиск нейтрализующих моноклональных антител (мАТ), проявляю-

щих перекрестную реактивность в отношении различных серотипов ВГА [3–7]. Наибольший успех был достигнут в результате масштабного скрининга более 100000 отдельных культивированных антителопродуцирующих В-клеток нескольких доноров, у которых наблюдали значительную гетеротипичность иммунного ответа в отношении ряда подтипов ВГА [8]. Найдено уникальное антитело F16, обладающее способностью связывать рекомбинантные и природные гемагглютинином филогенетических групп I и II. Широкая специфичность данного антитела, по видимому, обусловлена тем, что оно взаимодействует с консервативным эпитопом в субдомене F молекулы

гемагглютина, менее подверженном мутагенезу, чем домен HA1. На мышцах и хорьках, инфицированных штаммами ВГА H1N1 и H5N1 в летальной дозе, показано, что полная защита достигается при введении данного антитела в дозе 2–20 мг/кг веса. Открытие подобного универсального антитела открывает широкие возможности для создания на его основе различных рекомбинантных вариантов иммуноглобулинов.

Дыхательные пути представляют основной путь проникновения ВГА в организм, поэтому интраназальное введение нейтрализующих антител может значительно способствовать повышению эффективности пассивной иммунотерапии [9, 10]. В случае интраназального введения препаратов значительный интерес вызывает возможность использования рекомбинантного иммуноглобулина А, наиболее представительного класса антител на слизистых оболочках человека [11]. Иммуноглобулины класса А присутствуют в различных изоформах (мономер, димер, секреторная форма), в зависимости от структуры они способны задействовать различные механизмы нейтрализации вируса. Антитела IgA-изотипа способны блокировать взаимодействие вирусов с поверхностью клеток человека, осуществлять внутриклеточную нейтрализацию вирусных частиц, посредством привлечения и активации нейтрофилов способствовать уничтожению зараженных клеток [12].

Цель настоящего исследования заключалась в получении рекомбинантных аналогов антитела FI6 в формате иммуноглобулина А и сравнение его иммунохимических свойств со свойствами аналогичного антителам IgG-изотипа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Конструирование бипромоторной плазмиды для экспрессии рекомбинантного антитела FI6 IgG1-изотипа

Ранее мы синтезировали [13] нуклеотидные последовательности кДНК переменных доменов FI6VHv3 тяжелой и FI6VKv2 легкой цепей антитела FI6 [8].

К 5'-концевой области полученной ранее кДНК переменного домена тяжелой цепи антитела FI6VHv3 методом полимеразной цепной реакции с использованием набора олигонуклеотидных праймеров с попарно перекрывающимися концевыми частями (SOE-PCR) присоединяли фрагмент, содержащий нуклеотидную последовательность, кодирующую лидерный пептид MAWVWTLFLMAAAQSAQA и не транскрибируемую регуляторную область. Для создания бипромоторной системы экспрессии полученный в результате SOE-PCR фрагмент ДНК обрабатывали рестриктазами NheI и Bsp120I и клонировали в пред-

обработанную теми же рестриктазами плазмиду pSK+/hEF1-HTLV-BGH [14], содержащую гибридный промотор hEF1-HTLV, полноразмерную константную область IgG1 и сайт полиаденилирования BGH, все вместе фланкированные сайтами узнавания рестриктазы MluI. Таким образом была получена плазида pSK+/hEF1-HTLV-FI6HG1-BGH.

По аналогии с тяжелой цепью получали кДНК легкой цепи антитела человека, адаптированную к экспрессии в клетках эукариот. Методом SOE-PCR объединяли кДНК лидерного пептида MKSQTQVFVFLLLCVSGANG, полученную ранее кДНК переменного домена легкой цепи антитела FI6VKv2 и кДНК константного домена каппа-изотипа человека. Полученный фрагмент ДНК обрабатывали рестриктазами NheI и Sfr274I и клонировали в предобработанную теми же рестриктазами плазмиду pOptiVEC (Invitrogen, США) с предварительно введенным рядом с 5'-концом промотора сайтом узнавания рестриктазы MluI. Таким способом была получена плазида pOpti-FI6L, содержащая ген легкой цепи антитела FI6 под контролем цитомегаловирусного промотора (CMV).

На заключительном этапе получения бипромоторной плазмиды pBiPr-ABIgG1FI6 фрагмент MluI-MluI (2500 п.н.) из плазмиды pSK+/hEF1-HTLV-FI6HG1-BGH встраивали в предобработанный рестриктазой MluI и дефосфорилированный вектор pOpti-FI6L.

Конструирование бипромоторных плазмид для экспрессии рекомбинантных антител FI6 IgA1- и IgA2m1-изотипов

Константные домены тяжелой цепи IgA1- и IgA2m1-изотипов получали следующим образом. Экзоны соответствующих генов амплифицировали с использованием хромосомной ДНК человека в качестве матрицы и специфических олигонуклеотидных праймеров и клонировали в промежуточный вектор pAL-TA («Евроген», Россия). Экзоны, принадлежащие константным доменам одинаковых изотипов, объединяли с помощью метода SOE-PCR. Полученные фрагменты обрабатывали рестриктазами SacI и Sfr274I, и каждый из них клонировали совместно с фрагментом NheI-SacI из pSK+/hEF1-HTLV-FI6HG1-BGH, содержащим кДНК лидерного пептида MAWVWTLFLMAAAQSAQA и переменной области тяжелой цепи антитела FI6, в предобработанный рестриктазами NheI и Sfr274I вектор pSK+/hEF1-HTLV-BGH. Таким образом были получены плазмиды pSK+/hEF1-HTLV-FI6HA1-BGH и pSK+/hEF1-HTLV-FI6HA2m1-BGH, содержащие промотор hEF1-HTLV, кДНК лидерного пептида MAWVWTLFLMAAAQSAQA, переменную область тяжелой цепи антитела FI6, кДНК констант-

ного домена IgA1- или IgA2m1-изотипа человека (соответственно) и нетранслируемой области, включающей сайт полиаденилирования BGH, фланкированные сайтами узнавания рестриказы MluI.

На заключительном этапе получения бипромоторных плазмид pBiPr-ABIgA1FI6 и pBiPr-ABIgA2m1FI6 фрагменты MluI-MluI (2500 п.н.) из плазмид pSK+/hEF1-HTLV-FI6HA1-BGH и pSK+/hEF1-HTLV-FI6HA2m1-BGH соответственно встраивали в предобработанный рестриктазой MluI и дефосфорилированный вектор pOpti-FI6L.

Получение клеточных линий-продуцентов рекомбинантных антител

Клетки CHO DG44 (Invitrogen, США) трансфицировали линейаризованными плазмидами pBiPr-ABIgA1FI6, pBiPr-ABIgA2m1FI6 и pBiPr-ABIgA2m1FI6 с использованием реагента Lipofectamine 3000 (Invitrogen, США) по стандартному протоколу. Первичную селекцию трансфектантов проводили на среде CD OptiCHO (Invitrogen, США) с добавлением 8 мМ L-глутамин (Gibco, США), 0.1% Pluronic F-68 (Gibco, США) и однократного раствора антибиотика/антимикотика (Gibco, США). Для получения стабильной клеточной линии проводили флуоресцентный скрининг и отбор клонов-продуцентов. С этой целью клетки высевали на полутвердую среду CloneMedia (Molecular Devices, США) с добавлением в зависимости от изотипа получаемых рекомбинантных антител, меченных FITC, антител мыши к константным доменам человеческих иммуноглобулинов G (Molecular Devices, США) или A (ВНЦМДЛ, Россия). После 14-дневного культивирования клеток проводили отбор отдельных продуцирующих клонов с использованием установки ClonePix FL (Molecular Devices, США) по интенсивности их флуоресценции. Для дальнейшего повышения продуктивности выбранные клоны культивировали в присутствии увеличивающихся концентраций метотрексата в диапазоне от 20 до 500 нМ.

Выделение и очистка рекомбинантных антител

Культуру клеток, продуцирующих рекомбинантные антитела, выращивали в колбах-спиннерах с рабочим объемом 500 мл. Для этого в среду CD OptiCHO объемом 300 мл высевали $2.5-3.0 \times 10^5$ клеток/мл и выращивали в течение 14-18 дней в CO₂-инкубаторе при 37°C, 8% CO₂ при скорости перемешивания спиннера 50-70 об/мин.

Культуральную жидкость центрифугировали при 4000 g, к супернатанту добавляли 2-(N-морфолино)этансульфоновую кислоту (MES) до концентрации 50 мМ и NaCl до концентрации 150 мМ, pH 5.7.

Культуральную жидкость, содержащую FI6-IgG, наносили на колонку Protein G-Sepharose 4B Fast Flow (диаметр 2.5 см, высота геля 3.5 см, объем 17 мл), предварительно уравновешенную раствором MES pH 5.7, со скоростью рециркуляции 42 мл/ч (8.6 мл/ч × см²) в течение 21 ч при 4°C. Антитела элюировали 0.1 М глициновым буфером pH 2.7, скорость элюции 70 мл/ч. Сразу же после получения элюата доводили pH до ~7.5 при помощи 2 М Трис и концентрировали в ультрафильтрационной ячейке (мембрана 30000 NMWL) до объема ~1.5-2 мл, затем диализовали против фосфатного буфера (200-кратный объем), pH 7.4 в течение ночи.

Для аффинной хроматографии FI6-IgA1 и FI6-IgA2m1 получали иммуносорбент на основе моноклональных антител (мАТ) мыши FabH A3 (ВНЦМДЛ, Россия) против каппа-цепи иммуноглобулинов человека. Антитела пришивали к активированной BrCN-сефарозе по методу Каврана [15]. Степень пришивки антител FabH A3 составляет 5 мг на 1 мл сефарозы. pH культуральной жидкости, содержащей антитела FI6-IgA, доводили до 8.0 с помощью 1 М раствора Трис и наносили на колонку рециркуляцией в течение 18 ч со скоростью 15 мл/ч. Для элюции антител FI6-IgA1 и FI6-IgA2m1 последовательно использовали 0.1 М натрий-ацетатный буфер, pH 3.0, 0.5 М NaCl; 0.1 М глициновый буфер, pH 2.5, 0.5 М NaCl; 0.1 М глициновый буфер, pH 2.0, 0.5 М NaCl. Все элюаты нейтрализовали с помощью 1 М раствора Трис.

Иммунохимический анализ рекомбинантных антител

В данной работе использовали набор высокоочищенных реликтовых и актуальных штаммов ВГА производства компании Hytest Ltd. (Турку, Финляндия) и НИИ гриппа РАМН (Санкт-Петербург, Россия), полученных из зараженных куриных эмбрионов методом последовательного ультрацентрифугирования с использованием градиента плотности сахарозы с последующей инактивацией мертиолатом в течение 24 ч (табл. 1). Инактивация вирусов подтверждена на культуре клеток MDCK.

Титрование рекомбинантных антител проводили методом непрямого иммуноферментного анализа (ИФА). Инактивированные штаммы ВГА сорбировали в концентрации 5 мкг/мл при температуре 4°C в течение ночи в 0.1 М карбонатном буфере pH 9.2-9.4 объемом 50 мкл в лунках 96-луночных планшетов с высокой связывающей способностью (Corning-Costar, Нидерланды). В качестве вторичного антитела для детекции использовали конъюгат мАТ FabH A3 с пероксидазой хрена.

Для проведения иммуноблоттинга проводили электрофоретическое разделение вируса гриппа

Таблица 1. Характеристика использованных вирусных препаратов

Поставщик	Серотип	Штамм/год выделения
Hytest Ltd 8IN73	Influenza A (H1N1)	A/Taiwan/1/86
Hytest Ltd 8IN73-2	Influenza A (H1N1)	A/Beijing/262/95
Hytest Ltd 8IN73-3	Influenza A (H1N1)	A/New Caledonia/20/99
Hytest Ltd 8IN73-4	Influenza A (H1N1)	A/Solomon Islands/03/06
НИИ гриппа	Influenza A (H1N1)	A/California/07/09
Hytest Ltd 8IN74	Influenza A (H3N2)	A/Samara/222/99=A/Shangdong/9/93
Hytest Ltd 8IN74-1	Influenza A (H3N2)	A/Panama/2007/99
Hytest Ltd 8IN74-2	Influenza A (H3N2)	A/Kiev/301/94
Hytest Ltd 8IN74-3	Influenza A (H3N2)	A/Wisconsin/67/05
Hytest Ltd 8IN74-4	Influenza A (H3N2)	A/Brisbane/10/07
НИИ гриппа	Influenza A (H3N2)	A/Sydney/5/97
Hytest Ltd 8IN75-2	Influenza B	B/Tokio/53/99

А штамм A/Solomon Islands/03/06 в 10% полиакриламидном геле в невозстанавливающих условиях. Затем осуществляли электрофоретический перенос (электроблот) белков из геля на нитроцеллюлозную мембрану S045A330R (Advantec MFS, Inc., США). Перенесенные белки выявляли на нитроцеллюлозной мембране с помощью непрямого ИФА. Для этого мембрану блокировали раствором 5% казеина в течение 1 ч при комнатной температуре на шейкере и трижды промывали PBS-T (10 mM K_2HPO_4 , pH 7.5, 0.145 M NaCl, 0.1% Tween 20). Инкубировали в течение 1 ч на шейкере при комнатной температуре. После трехкратной промывки мембрану инкубировали с раствором соответствующих рекомбинантных антител в концентрации 1 мкг/мл в фосфатно-солевом буфере в течение 1 ч при 37°C. После трехкратной промывки PBS-T мембрану инкубировали с конъюгатом мАТ FabH A3 с пероксидазой хрена в течение 1 ч при 37°C. Иммуноблот окрашивали, добавляя субстрат (3,3-диаминобензидин, 4-хлор-1-нафтол и пероксид водорода).

K_d комплекса антиген-антитело определяли по методу Фриге [16]. На первом этапе мАТ в постоянной концентрации 1 нМ (150 нг/мл) инкубировали с антигеном, инактивированным штаммом ВГА A(H1N1)/Solomon Islands/03/06, в диапазоне концентраций 0.1–10 нМ (10–1000 нг/мл) в течение 2 ч при комнатной температуре с постоянным перемешиванием на шейкере для достижения термодинамического равновесия в трехкомпонентной системе: свободный антиген, свободное антитело и комплекс антиген-антитело. На втором этапе измеряли концентрации свободных антител методом твердофазного ИФА с иммобилизованным на планшет антигеном. На заключительном этапе рассчитывали величину

K_d по уравнению Клотца [17] с использованием значений общей концентрации антигена и концентрации свободных рекомбинантных антител.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Рекомбинантные иммуноглобулины получали с использованием нуклеотидных последовательностей, кодирующих переменные домены FI6VHv3 тяжелой и FI6VKv2 легкой цепей нейтрализующего антитела FI6 широкой специфичности [8]. Такие модифицированные последовательности отличаются от последовательностей, кодирующих тяжелую и легкую цепи иммуноглобулина FI6 тем, что содержат меньше соматических мутаций и в большей степени соответствуют последовательностям переменных доменов зародышевых линий иммуноглобулинов человека.

Для изучения способности антитела FI6 взаимодействовать с ВГА в формате иммуноглобулина А было решено получить рекомбинантные антитела IgA1- и IgA2m1-изотипов. В качестве положительного контроля получено антитело FI6 IgG1-изотипа.

Имуноглобулин А человека представлен двумя изотипами – IgA1 и IgA2. IgA1 превалирует в сыворотке, в то время как в секреторных выделениях выше процентная доля IgA2 [18]. Наиболее существенные структурные отличия между данными изотипами антител связаны с шарнирным участком. Шарнирный участок IgA1 на 13 аминокислотных остатков длиннее, чем у IgA2. Вследствие этого антитела IgA1-изотипа обладают большей подвижностью антигенсвязывающих участков. Такое преимущество IgA1 сопряжено с большей по сравнению с IgA2 уязвимостью к протеолизу в области шарнирных участков [12]. Антитело IgA2-изотипа встречается

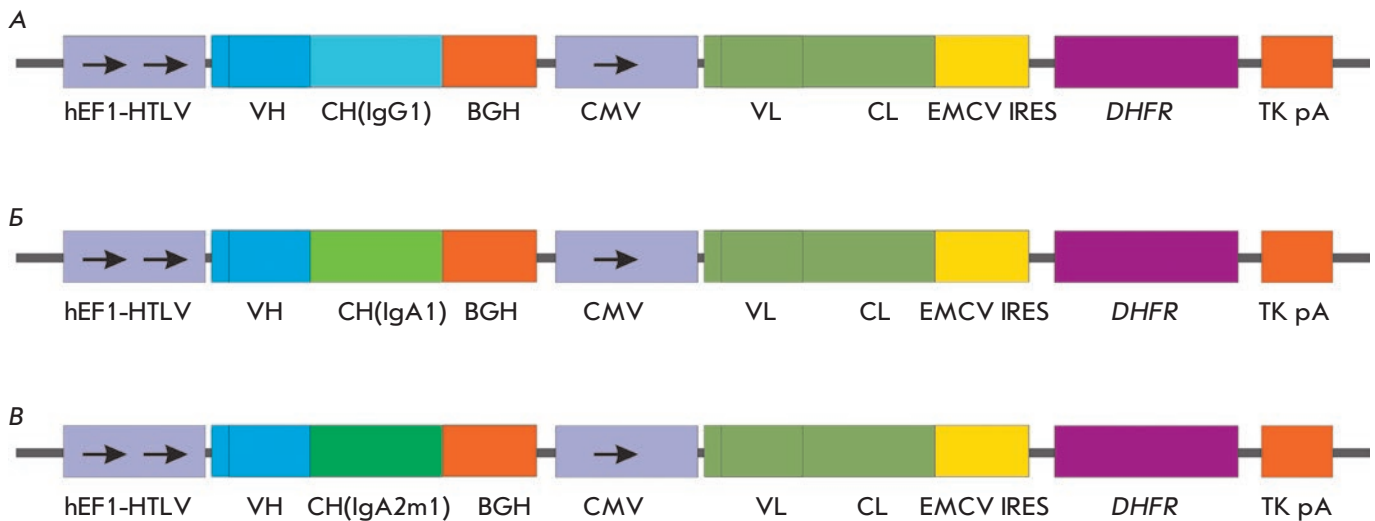


Рис. 1. Схема экспрессионных кассет бипромоторных плазмид для получения антител F16 различных изотипов. А – плазида pBiPr-ABlgG1F16. Б – плазида pBiPr-ABlgA1F16. B – плазида pBiPr-ABlgA2m1F16. hEF1-HTLV – гибридный промотор из плазмиды pMG, состоящий из промотора фактора элонгации EF-1а и 5'-нетранслируемой области вируса Т-клеточного лейкоза человека HTLV; VH – вариабельный домен тяжелой цепи антител; CH(IgG1), CH(IgA1), CH(IgA2m1) – константные домены тяжелой цепи иммуноглобулинов человека IgG1-, IgA1-, IgA2m1-изотипов соответственно; BGH – сайт полиаденилирования; CMV – промотор/энхансер ранних генов цитомегаловируса человека; VL – вариабельный домен легкой цепи антител; CL – константный домен легкой цепи антитела; EMCV IRES – внутренний сайт связывания рибосом (IRES) вируса энцефаломиокардита, DHFR – ген дигидрофолатредуктазы; TK pA – сигнал полиаденилирования тимидинкиназы вируса герпеса

в виде двух аллотипов: IgA2m1 и IgA2m2, которые различаются количеством сайтов гликозилирования и, что весьма существенно, расположением межцепочечных дисульфидных связей [19, 20]. В IgA2m1 отсутствуют типичные для структуры иммуноглобулинов дисульфидные связи между константным доменом легкой и константным доменом тяжелой цепей (CH1). При этом дисульфидная связь образуется между константными доменами легких цепей, а взаимодействие между легкой и тяжелой цепью носит нековалентный характер.

Для экспрессии рекомбинантных антител в клетках CHO предложен бипромоторный вектор, разработанный нами ранее и хорошо зарекомендовавший себя при получении антител. Этот экспрессионный вектор содержит две транскрипционные единицы, промоторы pCMV и hEF1-HTLV, контролирующие транскрипцию тяжелой и легкой цепей антител в одной плазмиде. Плазида также содержит ген дигидрофолатредуктазы (DHFR), который транслируется через независимый сайт связывания рибосом. Такой вектор позволяет при амплификации копий гена DHFR в хромосоме линий-продуцентов методом селективного давления метотрексата (MTX) одновременно увеличивать копияность генов легкой и тяжелой цепей антител. Получены три экспрессионные

плазмиды, отличающиеся константными доменами тяжелых цепей иммуноглобулинов (рис. 1).

Для наработки рекомбинантных иммуноглобулинов на основе клеток CHO DG44 получены стабильные клеточные линии. Рекомбинантные антитела IgG- и IgA-изотипов выделяли из бессывороточной культуральной среды. После проведения аффинной хроматографии рекомбинантные антитела IgG- и IgA-изотипов анализировали с помощью полиакриламидного гель-электрофореза в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях (рис. 2).

Размер обнаруживаемых фрагментов белков, как показывает анализ гель-электрофореграмм, отражает особенности расположения межцепочечных дисульфидных связей в каждом из исследуемых изотипов. Так, на электрофореграммах антител IgG- и IgA1-изотипов в восстанавливающих условиях появляются две полосы, соответствующие легкой и тяжелой цепям иммуноглобулинов. У антитела IgA2m1-изотипа выявлено свойственное данному изотипу уникальное расположение межцепочечных дисульфидных связей. Как упоминалось ранее, у антител IgA2m1-изотипа отсутствует характерная для большинства иммуноглобулинов межцепочечная дисульфидная связь между константным доменом легкой и CH1-доменом тяжелой цепи. При этом

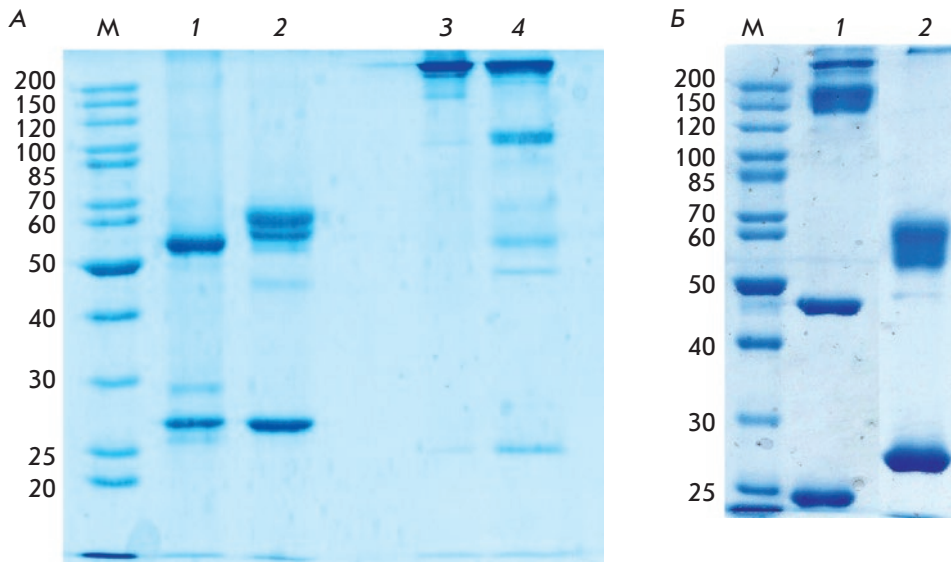


Рис. 2. Гель-электрофореграмма антител FI6 в восстанавливающих и невосстанавливающих условиях. А – 1, 3 – антитела IgG; 2, 4 – антитела IgA1. 1, 2 – в присутствии β-меркаптоэтанола. 3, 4 – в отсутствие β-меркаптоэтанола. Б – антитела IgA2m1 в отсутствие (1) и в присутствии (2) β-меркаптоэтанола. М – маркеры мол. массы, кДа

константные домены легких цепей соединены между собой дисульфидной связью. В невосстанавливающих условиях на гель-электрофореграмме (рис. 2Б) присутствуют димеры легких (~ 46 кДа) и тяжелых цепей (~ 105 кДа).

Антигенсвязывающую активность рекомбинантных белков исследовали методом иммуноблотинга по отношению к инактивированному штамму гриппа A/Solomon Islands/03/06, относящегося к подтипу H1N1 (рис. 3).

Данные иммуноблотинга подтверждают способность полученных рекомбинантных антител узнавать нативный гемагглютинин ВГА. При этом подтверждаются результаты, полученные нами ранее на примере Fab-фрагмента антитела FI6 IgG1-изотипа [13], свидетельствующие о том, что антитело FI6 способно взаимодействовать как с цельным гемагглютинином HA0, так и с фрагментами HA1 и HA2, которые

образуются в результате гидролиза целого белка при гель-электрофорезе в восстанавливающих условиях [21]. Эти результаты согласуются с данными эпитопного картирования антитела FI6, приведенными в работе [8]. Широкая специфичность FI6 обусловлена тем, что оно взаимодействует с консервативным эпитопом в F-субдомене гемагглютинаина, расположенного на стыке доменов H1 и H2. При этом тяжелая цепь антитела взаимодействует с доменом H1, а легкая цепь – с альфа-спиралью из домена H2.

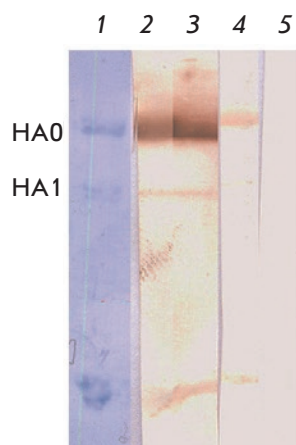
Представляла интерес способность антител IgA-изотипа взаимодействовать с различными подтипами ВГА. Антитела IgA1- и IgA2m1-изотипов сравнивали методом непрямого ИФА с использованием различных инактивированных штаммов ВГА подтипов H1N1 и H3N2, иммобилизованных на твердой фазе.

Проведенный иммунохимический анализ (рис. 4 и 5) свидетельствует о том, что рекомбинантные антитела IgA1- и IgA2m1-изотипов обладают способностью узнавать штаммы обоих изотипов, относящихся к различным филогенетическим группам. При этом сродство рекомбинантных антител IgA1- и IgA2m1-изотипов к некоторым штаммам исследованных подтипов отличается. Наибольшее отличие наблюдается в отношении штаммов подтипа H3N2, интенсивность взаимодействия которых с антителами IgA2m1-изотипа значительно ниже, чем с антителами IgA1-изотипа.

Полученные результаты согласуются с данными [8], из которых следует, что антитела FI6, обладая способностью узнавать 16 подтипов ВГА, характеризуются различной силой связывания штаммов разных подтипов.

Для трех полученных рекомбинантных антител определены константы диссоциации комплекса

Рис. 3. Иммуноблот рекомбинантных антител FI6 с белками штамма ВГА A/Solomon Islands/03/06 (H1N1). 1 – результаты электрофореза белков ВГА до переноса на мембрану. 2 – иммуноблот с антителами FI6 IgG1-изотипа. 3 – иммуноблот с антителами FI6 IgA1-изотипа. 4 – иммуноблот с антителами FI6 IgA2m1-изотипа. 5 – контроль вторичного конъюгата (иммуноблот в отсутствие рекомбинантных антител)



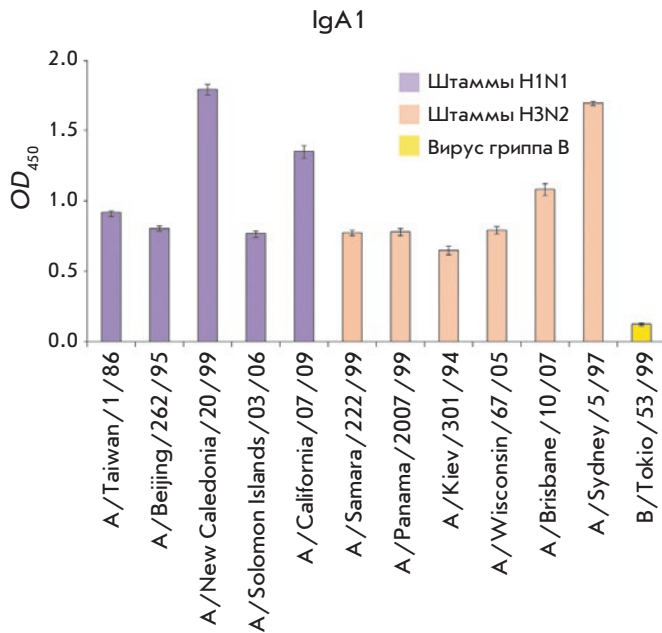


Рис. 4. Непрямой иммуноферментный анализ взаимодействия штаммов ВГА Н1Н1 и Н3Н2 с рекомбинантными антителами FI6 IgA1-изотипа

антиген-антитело применительно к штамму ВГА А(Н1Н1)/ Solomon Islands/03/06 в качестве антигена (табл. 2).

Значения K_d рекомбинантных антител IgA1 и IgA2m1 отличаются в 4 раза. При этом у IgA1 значение K_d даже несколько меньше, чем у IgG1, что свидетельствует о большей силе связывания и, возможно, вызвано большей подвижностью антигенсвязывающих участков переменных доменов, обусловленной, в свою очередь, уникальной структурой шарнирного участка IgA1. В целом, проведенные исследования показывают, что получение антитела FI6 в формате IgA не ухудшает его антигенсвязывающих свойств. Необходимо отметить, что неизменность антигенсвязывающих и нейтрализующих свойств при изменении изотипа антитела не является само собой разумеющимся, о чем свидетельствуют данные [22]. Показано, что химерное (мышь-человек) антитело 9F4 к гемагглютинуину подтипа Н5Н1 в формате IgA1 характеризуется меньшей нейтрализующей активностью по сравнению с исходным антителом мыши и химерным аналогом IgG-изотипа.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основе переменных доменов антитела FI6 к гемагглютинуину вируса гриппа А, проявляющего широкую специфичность, получены рекомбинантные мономерные антитела IgA1- и IgA2m1-изотипов. Эти антитела распознают 10 реликтовых и актуальных

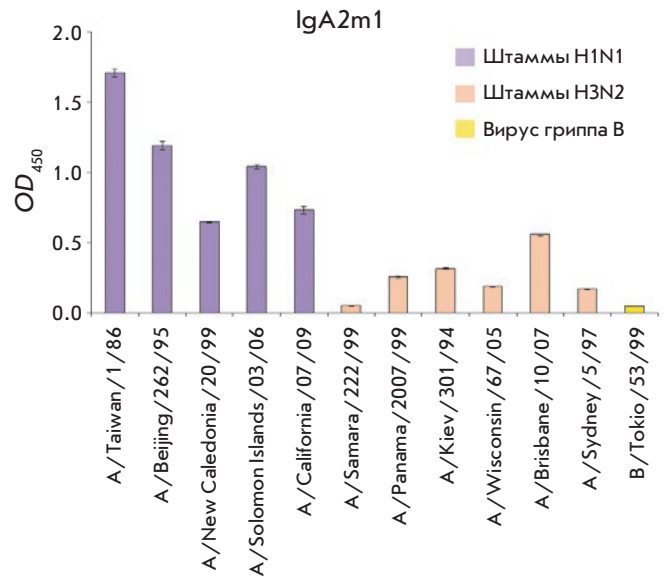


Рис. 5. Непрямой иммуноферментный анализ взаимодействия штаммов ВГА подтипов Н1Н1 и Н3Н2 с рекомбинантными антителами FI6 IgA2m1-изотипа

Таблица 2. Сравнение K_d рекомбинантных антител FI6 IgG- и IgA-изотипов

Антитело	K_d , нМ
IgG1	1.2–1.8
IgA1	0.7–1.5
IgA2m1	3.3–3.9

штаммов ВГА в непрямом ИФА и характеризуются значением константы диссоциации комплекса антиген-антитело не выше 4 нМ. Аффинность исследованных образцов антител по отношению к штаммам ВГА подтипа Н1Н1 выше, чем по отношению к штаммам подтипа Н3Н2. Данные проведенного исследования показывают, что получение антитела FI6 в формате мономерной формы иммуноглобулина А не приводит к изменению его антигенсвязывающих свойств, что является важной предпосылкой для использования антител IgA-изотипа в терапевтических целях. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке субсидии (соглашение № 14.607.21.0060), выделяемой Министерством образования и науки Российской Федерации в рамках реализации Федеральной целевой программы «Исследования и разработки по приоритетным направлениям развития научно-технологического комплекса России на 2014–2020 годы» (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60714X0060).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gerhard W. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2001. V. 260. P. 171–190.
2. Lachmann P. // *Emerging Microbes Infections.* 2012. V. 1. e11; doi: 10.1038/emi.2012.2
3. Throsby M., van den Brink E., Jongeneelen M., Poon L.L., Alard P., Cornelissen L., Bakker A., Cox F., van Deventer E., Guan Y., et al. // *PLoS One.* 2008. V. 3. e3942.
4. Sui J., Hwang W.C., Perez S., Wei G., Aird D., Chen L.M., Santelli E., Stec B., Cadwell G., Ali M., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2009. V. 16. P. 265–273.
5. Friesen R.H., Koudstaal W., Koldijk M.H., Weverling G.J., Brakenhoff J.P., Lenting P.J., Stittelaar K.J., Osterhaus A.D., Kompier R., Goudsmit J. // *PLoS One.* 2010. V. 5. e9106.
6. Wrammert J., Koutsonanos D., Li G.M., Edupuganti S., Sui J., Morrissey M., McCausland M., Skountzou I., Hornig M., Lipkin W.I., et al. // *J. Exp. Med.* 2011. V. 208. № 1. P. 181–193.
7. Grandea A.G., Olsen O.A., Cox T.C., Renshaw M., Hammond P.W., Chan-Hui P.Y., Mitcham J.L., Cieplak W., Stewart S.M., Grantham M.L., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 28. P. 12658–12663.
8. Corti D., Voss J., Gamblin S.J., Codoni G., Macagno A., Jarrossay D., Vachieri S.G., Pinna D., Minola A., Vanzetta F., et al. // *Science.* 2011. V. 333. № 6044. P. 850–856.
9. Tamura S., Kurata T. // *Jpn J. Infect. Dis.* 2004. V. 57. № 6. P. 236–247.
10. Weltzin R., Monath T.P. // *Clin. Microbiol. Rev.* 1999. V. 12. № 3. P. 383–393.
11. Jianqiang Y., Hongxia S., Perez D.R. // *Immunotherapy.* 2012. V. 4. № 2. P. 175–186.
12. Bakema J.E., van Egmond M. // *MAbs.* 2011. V. 3. № 4. P. 352–361.
13. Алиев Т.К., Дементьева И.Г., Топорова В.А., Боков М.Н., Позднякова Л.П., Рыбченко В.С., Долгих Д.А., Свешников П.Г., Кирпичников М.П. // *Вестн. Моск. ун-та. Серия 16. Биология.* 2016. № 2. С. 25–31.
14. Алиев Т.К., Балабашин Д.С., Долгих Д.А., Кирпичников М.П., Панина А.А., Топорова В.А. Патент Российской Федерации на изобретение № 2555533. 2015.
15. Kavran J.M., Leahy D.J. // *Methods Enzymol.* 2014. V. 541. P. 27–34.
16. Friguet B., Chaffotte A.F., Djavadi-Ohanian L., Goldberg M.E. // *J. Immunol. Methods.* 1985. V. 77 (2). P. 305–319.
17. Klotz I.M. // *Arch. Biochem.* 1946. V. 9. P. 109–117.
18. Delacroix D.L., Dive C., Rambaud J.C., Vaerman J.P. // *Immunology.* 1982. V. 47. № 2. P. 383–385.
19. Tomana M., Niedermeier W., Mestecky J., Skvaril F. // *Immunochemistry.* 1976. V. 13. № 4. P. 325–328.
20. Chintalacheruvu K.R., Raines M., Morrison S.L. // *J. Immunol.* 1994. V. 152. № 11. P. 5299–5304.
21. Feshchenko E., Rhodes D.G., Felberbaum R., McPherson C., Rininger J.A., Post P., Cox M.M.J. // *BMC Biotechnology.* 2012. 12:77 <http://www.biomedcentral.com/1472-6750/12/77>.
22. Mak T.-M., Hanson B.J., Tan Y.-J. // *Antiviral Res.* 2014. V. 107. P. 76–83.

УДК 612.82, 57.086.2

Когнитивная индексация нейронов: Cre-управляемое генетическое маркирование и изучение клеток, участвующих в обучении и памяти

О. И. Ивашкина^{1,2}, Н. С. Воробьева¹, А. М. Груздева¹, М. А. Рощина³, К. А. Торопова^{1,2},
К. В. Анохин^{1,2,4*}

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт», отдел нейронаук, 123182, Россия, Москва, пл. Академика Курчатова, 1

²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Центр нейронаук и когнитивных наук, 119991, Россия, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 27

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

⁴Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина, лаборатория нейробиологии памяти, 125315, Россия, Москва, ул. Моховая, 11, стр. 4

*E-mail: k.anokhin@gmail.com

Поступила в редакцию 27.11.2017

Принята к печати 26.03.2018

РЕФЕРАТ Описан и апробирован метод Cre-опосредуемого перманентного генетического маркирования нейронных сетей головного мозга, активных в ходе приобретения животным нового опыта. Метод основан на использовании двойных трансгенных мышей Fos-Cre-eGFP, у которых в результате управляемой тамоксифеном Cre-рекомбинации зеленый флуоресцентный белок экспрессируется только в тех клетках, в которых в результате получения животным нового опыта происходила экспрессия непосредственного раннего гена *c-fos*. Визуализация белка eGFP на срезах мозга мышей Fos-Cre-eGFP позволила выявить нейроны, подвергнувшиеся Cre-рекомбинации в момент обучения животных условному рефлексу замирания. С помощью двойного иммуногистохимического окрашивания охарактеризованы типы нейронов неокортекса и гиппокампа, в которых в ходе обследования животными новой обстановки происходила индуцированная опытом Cre-рекомбинация. При этом генетически маркированные нейроны относились к типу пирамидных возбуждающих нейронов, но не к различным типам тормозных нейронов. Показано, что сочетание генетического Cre-eGFP-маркирования с иммуногистохимическим мечением эндогенного белка *c-Fos* дает возможность выявлять и сравнивать две популяции нейронов мозга, активных во время двух различных эпизодов получения животным нового опыта. Описанный подход может найти широкое применение в визуализации и сравнительном анализе различных когнитивных клеточных сетей головного мозга.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА генетическое маркирование нейронов, мозг, нейронные сети, обучение, непосредственно ранние гены, Cre-рекомбинация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ eGFP – усиленный зеленый флуоресцентный белок; GFAP – глиальный фибриллярный кислый белок; NeuN – нейрон-специфический ядерный белок; CaMKII – кальций-кальмодулин-зависимая протеинкиназа типа 2; SOM – соматостатин; NPY – нейропептид Y; PV – парвальбумин; NPГ – непосредственно ранние гены; ПЦР – полимеразная цепная реакция; УРЗ – условно-рефлекторное замирание; ЭКР – электрокожное раздражение.

ВВЕДЕНИЕ

Исследование механизмов формирования и работы нейронных сетей, обеспечивающих когнитивные функции головного мозга, является одним из главных направлений современной нейронауки. Решение этих задач требует создания новых экспериментальных

методов, позволяющих визуализировать нейронные субстраты когнитивных процессов в масштабе целого мозга с клеточным разрешением. Принципиальной при этом является необходимость сравнения клеточных популяций, отвечающих за различные когнитивные функции.

Классическим методом выявления нейронных популяций, вовлекаемых в различные типы когнитивной активности животных, служит детекция экспрессии непосредственно ранних генов (НРГ, *immediately early*) [1–3]. НРГ – семейство генов, быстро активирующихся в клетке через внутриклеточные сигнальные каскады в ответ на те или иные внешние воздействия. К этому семейству относятся гены, которые кодируют транскрипционные факторы, структурные синаптические белки, цитоплазматические ферменты и др. [4]. Экспрессия некоторых НРГ, например *c-fos*, *zif268* и *arc*, индуцируется новым для животного опытом и критически необходима для пластических перестроек и формирования долговременной памяти, хранящей следы индивидуального опыта [1, 3, 5, 6]. На этих свойствах НРГ основаны методы иммуногистохимического и *in situ* гибридизационного картирования мозга, позволяющие выявлять когнитивные нейронные сети, активные во время обучения [2, 7–9].

Однако выявление продуктов НРГ с помощью иммуногистохимии или *in situ* гибридизации трудоемко и ограничено узким временным окном после когнитивного воздействия. Перспективным способом решения части этих проблем является визуализация популяций когнитивно активных нейронов с помощью экспрессии генов флуоресцентных белков под контролем промоторов НРГ. Использование управляемых трансгенных систем дает возможность получать мышей, у которых флуоресцентный белок синтезируется только в тех нейронах, в которых в определенный момент времени происходила экспрессия НРГ, например, *c-fos* [10]. Такие технологии получают в последние годы все большее распространение. Однако они имеют существенное ограничение: мечение популяции когнитивно активных нервных клеток ограничено сроком жизни флуоресцентного белка.

Способом решения этой проблемы может стать перманентное генетическое маркирование популяции нервных клеток мозга, отвечающих за решение определенной когнитивной задачи. С этой целью может быть использована широко применяемая в нейробиологии система сайт-специфических рекомбиназ [11–13], в частности, система с модифицированной Cre-рекомбиназой бактериофага P1, которая соединена с мутантным лигандсвязывающим доменом рецептора эстрогена [14, 15]. В присутствии тамоксифена, синтетического антагониста эстрогена, Cre-рекомбиназа распознает гомотипические loxP-сайты и вырезает ДНК, фланкированную этими сайтами. Сайты loxP обычно ограничивают STOP-кодон, расположенный перед последовательностью репортерного гена, кодирующего флуоресцент-

ный белок (GFP, tdTomato и др.), β-галактозидазу или каналородопсин [13, 16]. В настоящее время созданы десятки трансгенных линий мышей, у которых Cre-рекомбиназа экспрессируется избирательно в разных тканях или разных типах клеток, например, в отдельных типах интернейронов [17], или на определенных стадиях развития нейрональных предшественников [13]. Таким образом, технология генетического маркирования нейронов с помощью Cre-рекомбиназы в настоящее время хорошо развита, однако применяется преимущественно для анатомического картирования нервной системы или для эмбриональных исследований.

Методической инновацией стала работа Guenther и соавт. [18], которые создали линии трансгенных мышей, экспрессирующих Cre-рекомбиназу под управлением промоторов НРГ – *c-fos* и *arc*. Скрещивание мышей линии Fos-Cre или Arc-Cre с мышами репортерной линии, несущей красный флуоресцентный белок tdTomato, дало возможность впервые получить перманентное генетическое маркирование нейронов, в которых активируются НРГ [18].

Нами получены двойные трансгенные мыши Fos-Cre-eGFP, которые были использованы в настоящей работе для исследования морфологического и молекулярного фенотипа нейронов различных структур головного мозга, подвергающихся Cre-рекомбинации при приобретении животными нового опыта. Мы также впервые апробировали возможность использования трансгенных мышей Fos-Cre-eGFP для маркирования и сравнения двух популяций нейронов, активных у одного и того же животного в двух разных ситуациях нового опыта.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение двойных трансгенных мышей линии Fos-Cre-eGFP

Для получения мышей линии Fos-Cre-eGFP проводили скрещивание трансгенных мышей линий B6.129(Cg)-Fostm1.1(cre/ERT2)Luo/J (The Jackson Laboratory, стоковый номер: 021882), несущих Cre-рекомбиназу под промотором *c-fos*, с линией Tg(CAG-Bgeo/GFP)21Lbe/J (The Jackson Laboratory, стоковый номер 003920), несущей ген усиленного зеленого флуоресцентного белка eGFP под loxP-сайтами. Мышей содержали в индивидуально вентилируемых клетках по пять животных со свободным доступом к воде и пище при световом цикле 12/12 ч. Все эксперименты проводили в соответствии с требованиями приказа № 267 МЗ РФ (19.06.2003 г.), а также с постановлением локального этического комитета по вопросам биомедицин-

ских исследований НИЦ «Курчатовский институт» (Протокол № 1 от 09.07.2015).

Генотипирование

У обеих родительских линий трансген находится в гетерозиготном состоянии, поэтому для выявления двойных трансгенных животных использовали генотипирование по каждому трансгену. В возрасте двух месяцев у мышей собирали образцы тканей и выделяли ДНК путем лизирования раствором протеиназы К (Sigma) в 1% SDS-буфере (Хеликон) с последующим осаждением 96% этанолом. Осадок ДНК растворяли в ТЕ-буфере. Полученную ДНК использовали для проведения полимеразной цепной реакции (ПЦР) с праймерами к Cre-рекомбиназе и eGFP в среде ScreenMix (ЗАО «Евроген»). Использовали следующие праймеры: для Cre – CACCAGTGTCTACCCCTGGA (общая прямая последовательность для дикого типа и трансгена), CGGCTACACAAAGCCAAACT (обратная последовательность дикого типа), CGCGCCTGAAGATATAGAAGA (обратная последовательность трансгена); для GFP – TGGACGGC-GACGTA AACGGC (первая последовательность трансгена), GGCGGTCACGAACTCCAGCA (вторая последовательность трансгена), CTAGGCCAC-AGAATTGAAAGATCT (прямая последовательность внутреннего позитивного контроля), GTAGGTGGA-AATTCTAGCATCATCC (обратная последовательность внутреннего позитивного контроля). Условия ПЦР указаны в *таблице*. Продукты ПЦР выявляли в 2.5% агарозном геле в ТАЕ-буфере с бромистым этидием.

Условия проведения полимеразной цепной реакции при генотипировании

Этап	Температура, °С	Время	Примечание
1	94	2 мин	
2	94	20 с	
3	65	15 с	Снижение температуры на 0.5°C за цикл
4	68	10 с	
5			Повторение этапов 2–4 в течение 10 циклов
6	94	15 с	
7	60	15 с	
8	72	10 с	
9			Повторение этапов 6–8 в течение 28 циклов
10	72	2 мин	
11	10		Остановка

Индукция Cre-рекомбинации тамоксифеном

Для индукции Cre-рекомбинации использовали однократную внутривенную инъекцию тамоксифена (Sigma) в дозе 150 мг/кг, растворенного в кукурузном масле (Sigma), согласно описанной ранее методике [18]. Для опыт-индуцируемой Cre-рекомбинации инъекцию тамоксифена проводили за 24 ч до получения животным нового опыта.

Обследование обстановки

При обследовании обстановки мышей помещали в экспериментальную камеру на 5 мин и давали свободно ее обследовать. Известно, что такое обследование приводит к формированию у животных долговременной памяти [19].

В работе использовали две обстановки. Обстановка А представляла собой освещенную диффузным белым светом камеру (средний уровень освещенности 87 лк) размером 20 × 30 × 20 см, снабженную с электродным полом; уровень шума в камере составлял 7 дБ. Перед помещением каждого животного камеру протирали 40% раствором этилового спирта. Обстановка В представляла собой камеру размером 20 × 15 × 20 см с электродным полом; камера была освещена только источником ближнего инфракрасного света, невидимого для мышей; уровень шума в камере составлял 25 дБ. Перед помещением каждого животного камеру протирали 3% раствором уксусной кислоты.

Нанесение немедленного электрокожного раздражения

Нанесение электрокожного раздражения (ЭКР) проводили через 3 дня после обследования обстановки А. Для этого мышей помещали в обстановку А или обстановку В и немедленно наносили ЭКР силой 1 мА и длительностью 2 с, после чего сразу же возвращали в домашнюю клетку.

Обучение в задаче условно-рефлекторного замирания (УРЗ)

Для обучения УРЗ мышей помещали в обстановку А и через 120 с подавали звуковой сигнал (90 дБ, 5 кГц) длительностью 30 с. Последние 2 с звука сочетали с подачей ЭКР силой 1 мА. Через 30 с после окончания ЭКР мышей возвращали в домашнюю клетку.

Экспериментальные группы

Для оценки фоновой и опыт-индуцированной экспрессии eGFP использовали две группы животных: мышей группы «Обучение» ($n = 4$) обучали в задаче УРЗ как описано выше; мыши из группы «Контроль» ($n = 4$) при этом оставались в домаш-

них клетках и не подвергались каким-либо воздействиям.

Для определения фенотипа клеток, проходящих опыт-зависимую Cre-рекомбинацию, брали животных, которые обследовали обстановку А в течение 5 мин ($n = 5$).

Для выявления двух популяций когнитивно активных нейронов в одном мозге использовали группы «А – А + ЭКР» ($n = 5$) и «А – В + ЭКР» ($n = 5$). Мыши группы «А – А + ЭКР» обследовали обстановку А и затем через 3 дня получали немедленное ЭКР в той же обстановке; мыши группы «А – В + ЭКР» обследовали обстановку В и через 3 дня получали немедленное ЭКР в обстановке В.

Взятие образцов мозга и изготовление плавающих срезов

Образцы мозга мышей забирали через 3 дня после предъявления животным нового опыта, сопровождавшегося Cre-рекомбинацией. В экспериментах по выявлению двух популяций активных нейронов образцы мозга мышей брали через 90 мин после второго когнитивного эпизода (нанесения ЭКР).

Мышей наркотизировали внутрибрюшинной инъекцией 15% хлоралгидрата в физиологическом растворе. После этого проводили интракардиальную перфузию растворами фосфатного буфера и 4% параформальдегида в фосфатном буфере и извлекали мозг. Полученные образцы мозга постфиксировали 4% раствором параформальдегида в фосфатном буфере: 2 ч при комнатной температуре и 14–18 ч при +4 °С. После этого образцы переносили в фосфатный буфер на 2 ч и изготавливали фронтальные срезы мозга толщиной 50 мкм с помощью вибратора Leica VT1200S (Leica). Срезы брали на расстоянии +2.46 и –1.34 мм от брегмы. Координаты срезов определяли с помощью стереотаксического атласа мозга мыши [20].

Выявление флуоресцентного белка eGFP и двойное иммуногистохимическое окрашивание

В экспериментах по определению фоновой и опыт-индуцированной экспрессии eGFP клетки, подвергшиеся Cre-рекомбинации, выявляли по собственной флуоресценции белка eGFP. Изготовленные срезы мозга заключали под покровные стекла с помощью водной среды Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma-Aldrich) и проводили оцифровку как описано ниже.

В экспериментах по определению фенотипа и доли клеток, проходящих опыт-зависимую Cre-рекомбинацию, а также выявлению двух популяций когнитивно активных нейронов, подвергшиеся Cre-рекомбинации клетки выявляли иммуногистохими-

чески при помощи окраски на белок eGFP. Срезы мозга подвергали процедуре пермеабиллизации в 1% растворе Triton-X100 (Sigma) в фосфатном буфере с 5% нормальной сывороткой осли (Sigma) и 5% нормальной сывороткой козла (Abcam) в течение 60 мин. После этого срезы трижды отмывали 0.2% раствором Triton-X100 в фосфатном буфере по 5 мин. Затем проводили инкубацию с первичными антителами в течение 18 ч при +4 °С. В разных реакциях использовали следующие первичные антитела для выявления различных маркеров: eGFP (Rabbit Anti-GFP Antibody, Life Technologies; разведение 1 : 250), eGFP (Chicken Anti-GFP Antibody, Aves Labs; разведение 1 : 500), c-Fos (Goat Anti-c-Fos Antibody, Santa Cruz Biotechnology; разведение 1 : 150), GFAP (Chicken Anti-GFAP Antibody, Abcam; разведение 1 : 500), NeuN (Mouse Anti-NeuN Antibody, EMD Millipore; разведение 1 : 500), CaMKII (Mouse Anti-CaMKII Antibody, EMD Millipore; разведение 1 : 200), SOM (Rabbit Anti-Somatostatin Antibody, Santa Cruz Biotechnology; разведение 1 : 1000), NPY (Rabbit Anti-Neuropeptide Y Antibody, Novus Biologicals; разведение 1 : 10000) и PV (Rabbit Anti-Parvalbumin Antibody, Abcam; разведение 1 : 10000). По окончании инкубации срезы отмывали 0.2% раствором Triton-X100 в фосфатном буфере 3 раза по 5 мин. Далее инкубировали срезы с вторичными антителами в течение 2 ч при комнатной температуре в темноте. В разных реакциях были использованы следующие вторичные антитела: AlexaFluor® 488 Donkey Anti-Goat Antibody (Life Technologies; разведение 1 : 500), AlexaFluor® 488 Goat Anti-Chicken Antibody (Life Technologies; разведение 1 : 500), AlexaFluor® 568 Donkey Anti-Rabbit Antibody (Life Technologies; разведение 1 : 500), AlexaFluor® 568 Goat Anti-Chicken Antibody (Life Technologies; разведение 1 : 500) или AlexaFluor® 568 Donkey Anti-Mouse Antibody (Life Technologies; разведение 1 : 500). После инкубации с вторичными антителами срезы отмывали 3 раза по 5 мин в 0.2% растворе Triton-X100 в фосфатном буфере. После окончания окраски срезы заключали под покровные стекла с помощью водной среды Fluoromount™ Aqueous Mounting Medium (Sigma-Aldrich). Оцифровку срезов проводили на конфокальном микроскопе Olympus FV1000BW61WI (Olympus) при увеличении $\times 20$. С каждого среза мозга получали 10–13 оптических срезов с шагом 5 мкм по оси Z.

Подсчет eGFP-положительных клеток и анализ колокализаций

Обработку полученных изображений и дальнейший анализ проводили в программе Imaris 7.1.0 (Bitplane). Поскольку окраска на eGFP является цитоплазматиче-

ческой и выявляет не только тела, но и отростки клеток, автоматический подсчет eGFP-положительных нейронов затруднителен. В связи с этим, eGFP-положительные клетки отмечали вручную, а затем подсчитывали их количество автоматически. Окраски на NeuN и c-Fos являются ядерными, поэтому NeuN-положительные и c-Fos-положительные клетки выделяли и подсчитывали автоматически на основании размера и порогового уровня интенсивности окраски в красном канале. Для окрасок на eGFP, NeuN и c-Fos отмечали все положительные клетки, сомы которых полностью помещались в глубине среза по оси Z; клетки, сомы которых лежали на верхней и нижней границах срезов мозга по Z, не отмечали. Колокализацию eGFP с NeuN или c-Fos оценивали экспертно для каждой клетки в трех проекциях. Двойными положительными считали клетки, у которых NeuN- или c-Fos-положительное ядро было полностью окружено окрашенной на eGFP цитоплазмой. Двойные положительные клетки отмечали вручную и затем подсчитывали автоматически. Подсчет положительных клеток проводили по всей площади фронтальной ассоциативной коры на срезе мозга, а для совместной окраски с NeuN – также отдельно в слоях 1, 2/3, 5 и 6. Границы фронтальной ассоциативной коры определяли с помощью стереотаксического атласа мозга мыши [20]. Границы слоев определяли в соответствии с Алленовским атласом мозга мыши (Allen Mouse Brain Atlas, <http://mouse.brain-map.org/static/atlas>). От каждого животного анализировали по 3 среза фронтальной ассоциативной коры. Результаты подсчета положительных клеток усредняли для правого и левого полушария на одном срезе и трех срезов с одного мозга.

Статистический анализ данных

Статистическую обработку данных проводили с помощью пакета Prism 7 (GraphPad) с использованием двухвыборочного *t*-критерия, а также двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA или дисперсионного анализа ANOVA с повторными измерениями и *t*-теста Сидака. Критический уровень значимости принимали равным $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Фоновая и опыт-индуцированная экспрессия зеленого флуоресцентного белка в мозге двойных трансгенных мышей Fos-Cre-eGFP

В результате скрещивания мышей линий B6.129(Cg)-Fostm1.1(cre/ERT2)Luo/J и Tg(CAG-Vgeo/GFP)21Lbe/J получено потомство, часть которого была двойными трансгенными животными, несущими одновременно ген Cre-рекомбиназы

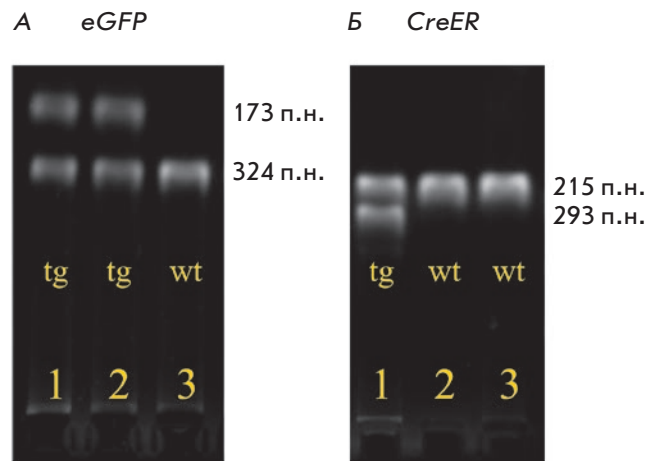


Рис. 1. Электрофоретический анализ продуктов ПЦР для выявления двойных трансгенных мышей линии Fos-Cre-eGFP, несущих одновременно гены eGFP (A) и Cre-рекомбиназы (B). 173 п.н. – фрагмент, соответствующий трансгену по гену eGFP; 324 п.н. – внутренний позитивный контроль; 215 п.н. – фрагмент, соответствующий дикому типу по гену Cre-рекомбиназы; 293 п.н. – фрагмент, соответствующий трансгену по гену Cre-рекомбиназы; wt – животное дикого типа по данному гену, tg – трансгенное животное по данному гену; 1, 2, 3 – номер животного. Двойным трансгенным животным является только мышь № 1

под промотором *c-fos* и ген усиленного флуоресцентного белка eGFP под loxP-фланкированным стоп-сигналом (рис. 1). Для оценки базового уровня Cre-рекомбинации и опыт-зависимой индукции рекомбинации трансгенным мышам вводили тамоксифен и через 24 ч после инъекции обучали в задаче УРЗ (группа «Обучение») или оставляли в домашних клетках (группа «Контроль»). Через 3 дня на срезах мозга мышей выявляли eGFP (рис. 2). Нейроны, в которых выявлялся зеленый флуоресцентный белок – это нейроны, в которых происходила активация промотора гена *c-fos* и следующая за ней Cre-рекомбинация.

У мышей из группы «Обучение» выявлено большое количество eGFP-положительных нейронов во всех структурах, специфически связанных с обучением УРЗ [21], а именно: в обонятельных ядрах, гиппокампе, миндалине, вентральном таламусе, а также в различных областях неокортекса – фронтальной ассоциативной, прелимбической, инфраламбической, цингулярной, ретроспленальной, теменной ассоциативной, височной ассоциативной, энторинальной, соматосенсорной, слуховой, зрительной, моторной, инсулярной и орбитальной (рис. 2Б,Г,Е,З). При этом

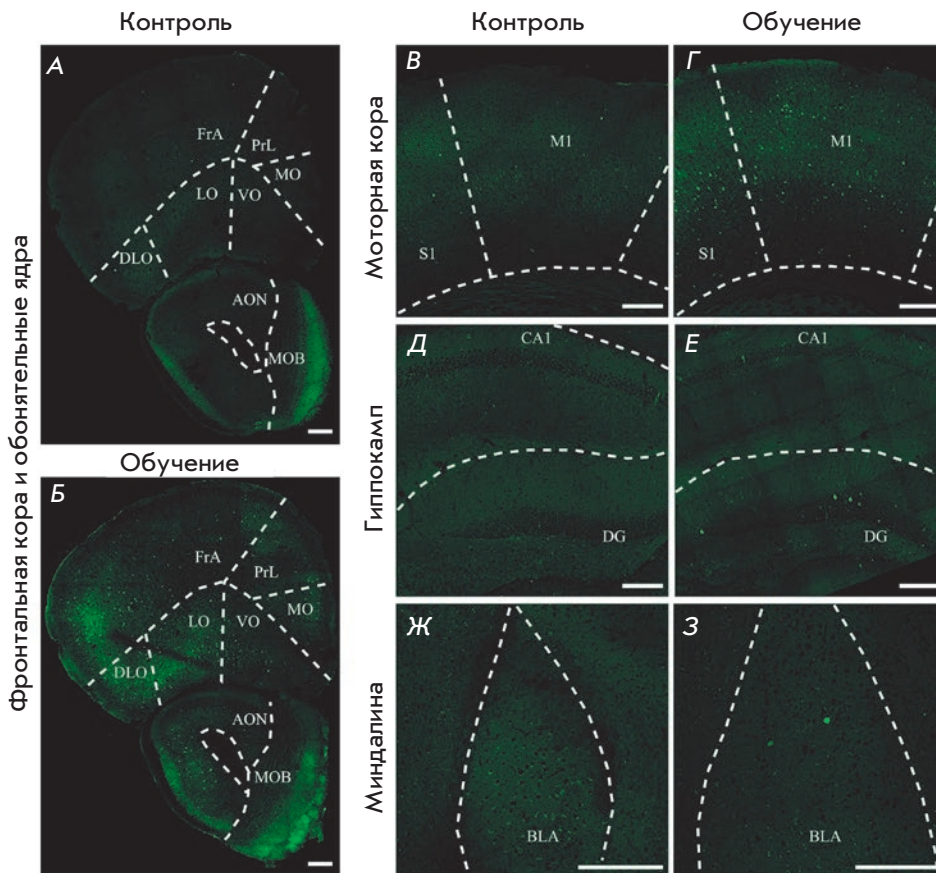


Рис. 2. Сопоставление базового уровня Cre-рекомбинации у мышей группы «Контроль», не получавших никаких поведенческих воздействий (А, В, Д, Ж), и опыт-индуцированной Cre-рекомбинации у мышей группы «Обучение», прошедших обучение УРЗ (Б, Г, Е, З). АОН – передняя обонятельная область; BLA – базолатеральное ядро миндалины; CA1 – зона CA1 гиппокампа; DG – зубчатая фасция гиппокампа; DLO – дорсолатеральная орбитальная кора; FrA – фронтальная ассоциативная кора; LO – латеральная орбитальная кора; M1 – первичная моторная кора; MO – медиальная орбитальная кора; MOB – основная обонятельная луковица; PrL – прелимбическая кора; S1 – первичная соматосенсорная кора; VO – вентральная орбитальная кора. Шкала – 100 мкм

у контрольных мышей eGFP-положительные клетки в перечисленных выше областях мозга почти не выявлялись (рис. 2А,В,Д,Ж). Единичные eGFP-положительные клетки у контрольных животных отмечены только в некоторых областях неокортекса: в фронтальной ассоциативной, дорсолатеральной орбитальной, моторной, соматосенсорной, пириформной и экторинальной. Эти результаты свидетельствуют о том, что метод генетического маркирования активных нейронов у мышей Fos-Cre-eGFP позволяет успешно визуализировать активацию широко распространенной популяции нейронов, захватывающей большое число разнообразных структур головного мозга.

Определение фенотипа клеток, проходящих опыт-зависимую Cre-рекомбинацию

В эксперименте по определению типа клеток, проходящих опыт-зависимую Cre-рекомбинацию, мышей после инъекции тамоксифена помещали в новую для них обстановку А и через 3 дня выявляли пары маркеров: eGFP и одного из специфических маркеров типов клеток.

В качестве маркера зрелых нейронов был выбран белок NeuN, который локализуется в ядрах практически всех типов нейронов в центральной нервной системе млекопитающих, за исключением клеток Пуркинье мозжечка, митральных клеток обонятельной луковицы и фоторецепторных клеток сетчатки [22]. В качестве клеточного маркера астроцитов был выбран белок GFAP [23]. Во всех исследованных структурах все eGFP-положительные клетки были также NeuN-положительными (рис. 3А,Б); при этом не выявлено ни одного случая колокализации eGFP с белком GFAP (рис. 3В).

Нейроны головного мозга можно разделить на возбуждающие (пирамидные) и тормозные (интернейроны). Маркером возбуждающих нейронов может служить СаМКII. Данный фермент принимает участие в организации возбуждающих синапсов и никогда не синтезируется в ГАМКэргических интернейронах [24]. Интернейроны очень вариабельны по своим морфологическим, электрофизиологическим и биохимическим свойствам, в связи с чем их подразделяют на несколько разных типов, например, на основании синтеза специфических биохимических

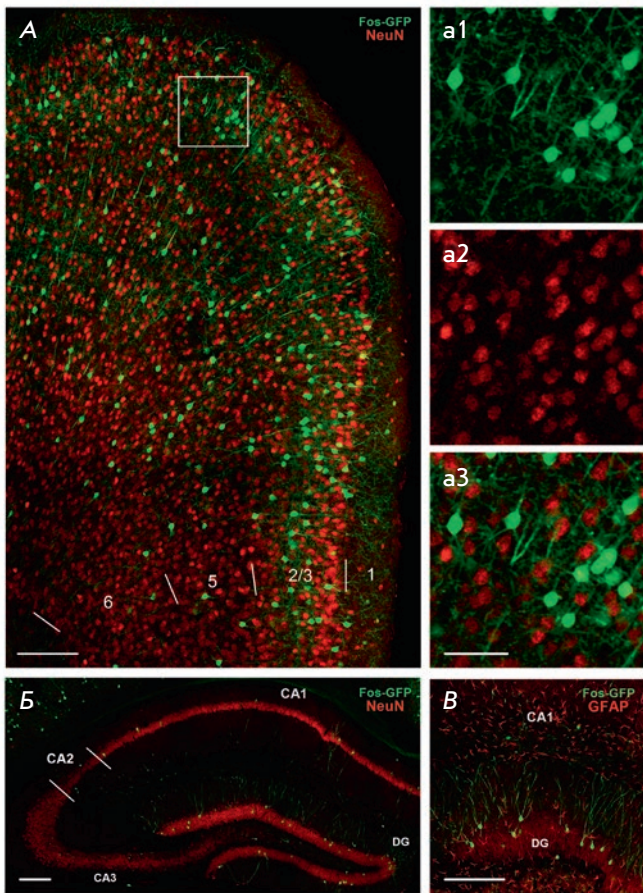


Рис. 3. Опыт-зависимая Cre-рекомбинация происходит только в нейронах. Зеленый канал – eGFP. Красный канал – маркер нейронов NeuN (A, B) или астроцитов GFAP (B). A – неокортекс (фронтальная ассоциативная кора); B, B' – дорсальный гиппокамп; шкала: 150 мкм. На микрофотографиях a1, a2, a3 показана область, выделенная рамкой на A, отдельно по каналам: a1 – цитоплазматическая окраска на eGFP, a2 – ядерная окраска на NeuN, a3 – их наложение; шкала: 70 мкм

маркеров: PV, SOM и NPY [25]. Чтобы определить, к какому типу нейронов относятся клетки, проходящие Cre-рекомбинацию, мы оценили колокализацию белка eGFP и маркера возбуждающих пирамидных нейронов CaMKII или одного из маркеров тормозных интернейронов (PV, SOM и NPY).

Нами не обнаружено колокализации eGFP ни с одним из маркеров интернейронов (рис. 4–6). При этом eGFP-положительные нейроны были также CaMKII-положительными, т.е. относились к возбуждающим пирамидным клеткам (рис. 7). CaMKII-положительные eGFP-положительные нейроны были выявлены в различных слоях неокортекса (рис. 7A), а также в пирамидном слое зоны CA1

и гранулярном слое зубчатой фасции гиппокампа (рис. 7B). При иммуногистохимическом выявлении белка eGFP окрашивались не только тела клеток, но и значительная часть отростков. Визуальный анализ анатомии таких eGFP-положительных клеток также подтвердил заключение о том, что опыт-зависимая Cre-рекомбинация происходила именно в пирамидных клетках (рис. 7B,Г).

Таким образом, по результатам молекулярного фенотипирования клеток было установлено, что опыт-зависимая Cre-рекомбинация у мышей Fos-Cre-eGFP происходит только в нейронах, но не в глиальных клетках. При этом нейроны, проходящие Cre-рекомбинацию, относятся к возбуждающим пирамидным клеткам.

Определение доли клеток, проходящих Cre-рекомбинацию после обследования животным новой обстановки

Для того чтобы определить, какая доля нейронов подвергается опыт-зависимой Cre-рекомбинации после получения животным нового опыта, а также проанализировать паттерны распределения таких клеток в мозге, оценивали количество eGFP-положительных нейронов в различных слоях фронтальной ассоциативной коры у мышей, обследовавших обстановку на фоне действия тамоксифена ($n = 5$). Для оценки доли eGFP-положительных клеток от всех нейронов данного слоя проводили совместное выявление eGFP и маркера зрелых нейронов NeuN [22].

eGFP-положительные клетки обнаружены во всех слоях фронтальной ассоциативной коры, однако их количество было наибольшим в слоях 2/3 и 5 ($F(1.298,5.191) = 41.47$, $p = 0.0009$; попарные сравнения слоев 2/3 и 5 с другими слоями: $p < 0.02$), тогда как в слое 1 выявлялись только единичные нейроны, прошедшие Cre-рекомбинацию (рис. 8A). При этом доля eGFP-положительных клеток от всех нейронов, помеченных NeuN, также была наибольшей в слоях 2/3 и 5 ($F(1.203,4.812) = 7.122$, $p = 0.0425$; попарные сравнения слоев 2/3 и 5 со слоем 6: $p < 0.02$), и для всей фронтальной ассоциативной коры составляла в среднем 11.0% (рис. 8B).

Использование Cre-рекомбинации для выявления двух популяций когнитивно активных нейронов в одном мозге

Активность Cre-рекомбиназы приводит к перманентному маркированию нейронов, активных во временном окне, ограниченном действием тамоксифена. Это открывает возможность повторно помещать такое животное с генетически маркированными нейронами в ситуацию приобретения нового или реактивации прошлого опыта, и затем выявлять в одном мозге две

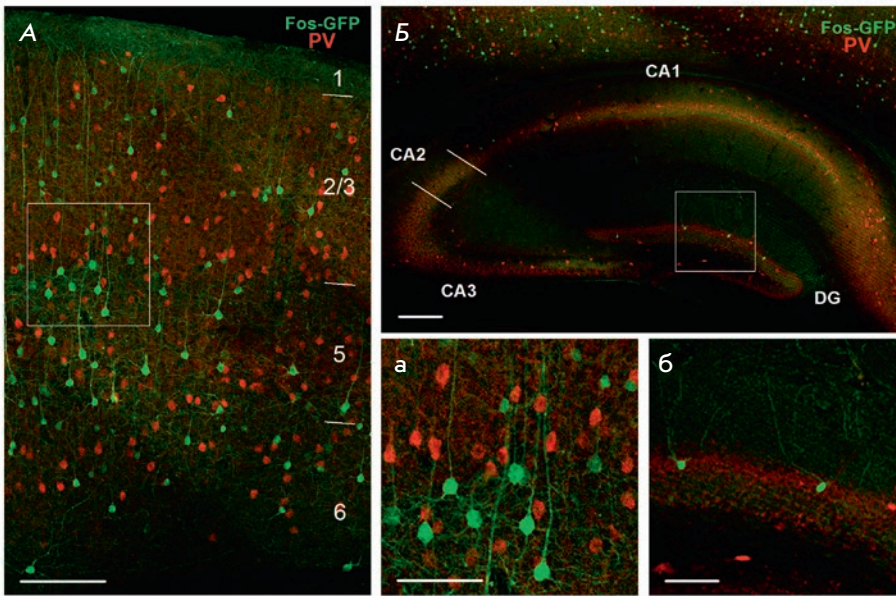


Рис. 4. Совместная окраска на eGFP (нейроны, прошедшие опыт-зависимую Cre-рекомбинацию, зеленый канал) и маркер интернейронов парвальбумин (PV, красный канал). А – неокортекс (фронтальная ассоциативная кора), цифрами отмечены слои неокортекса; Б – дорсальный гиппокамп; шкала: 150 мкм. На микрофотографиях а и б показаны выделенные рамками на А и Б области в неокортексе и гиппокампе соответственно; шкала: 70 мкм. CA1 – зона CA1 гиппокампа; CA2 – зона CA2 гиппокампа; CA3 – зона CA3 гиппокампа; DG – зубчатая фасция гиппокампа

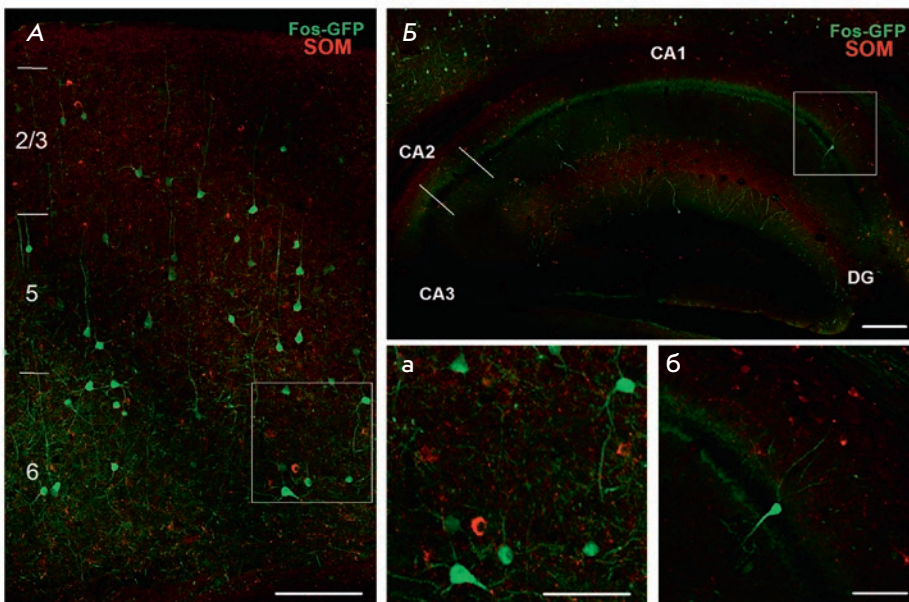


Рис. 5. Совместная окраска на eGFP (нейроны, прошедшие опыт-зависимую Cre-рекомбинацию, зеленый канал) и маркер интернейронов соматостатин (SOM, красный канал). А – неокортекс (фронтальная ассоциативная кора), цифрами отмечены слои неокортекса; Б – дорсальный гиппокамп; шкала: 150 мкм. На микрофотографиях а и б показаны выделенные рамками на А и Б области в неокортексе и гиппокампе соответственно; шкала: 70 мкм. CA1 – зона CA1 гиппокампа; CA2 – зона CA2 гиппокампа; CA3 – зона CA3 гиппокампа; DG – зубчатая фасция гиппокампа

отдельные популяции нейронов, активные при двух разных когнитивных нагрузках. При этом нейроны, прошедшие Cre-рекомбинацию после первого когнитивного эпизода, можно выявить по наличию белка eGFP, а нейроны, активированные после второго эпизода, можно визуализировать иммуногистохимически по присутствию белка c-Fos.

Ранее во фронтальной ассоциативной коре выявлен высокий уровень перекрытия популяций нейронов, помеченных при обследовании мышами новой обстановки (первый когнитивный эпизод) и после-

дующем нанесении немедленного ЭКР в этой же обстановке через 25 мин после ее обследования (второй когнитивный эпизод) [26]. В связи с этим в нашем эксперименте для визуализации двух популяций нейронов, вовлеченных в различные когнитивные эпизоды, мышам давали обследовать новую обстановку на фоне действия тамоксифена и через 3 дня наносили немедленное ЭКР. Двойное иммуногистохимическое окрашивание образцов мозга позволило выявить нейроны активные при обследовании обстановки (по белку eGFP) или при нанесении немедленного ЭКР

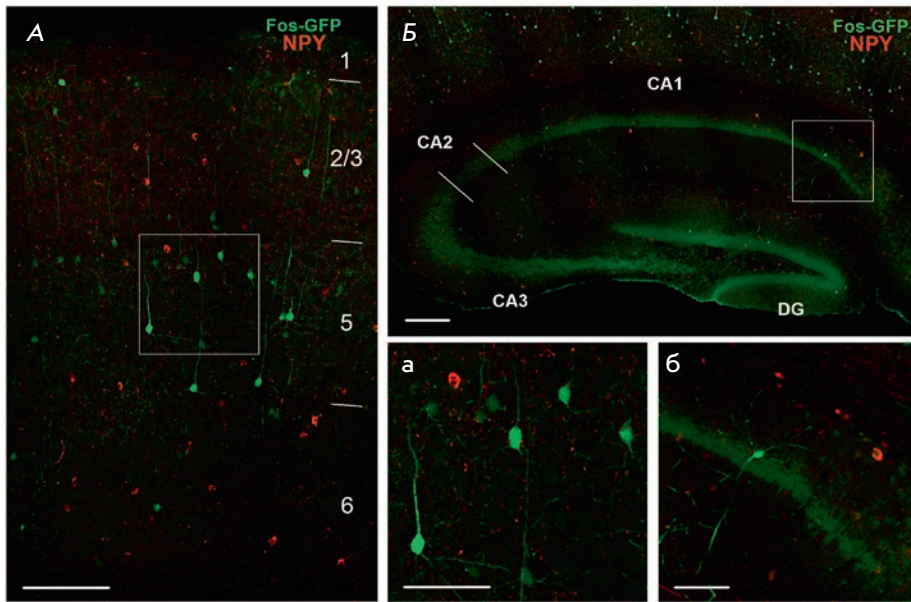


Рис. 6. Совместная окраска на eGFP (нейроны, прошедшие опыт-зависимую Cre-рекомбинацию, зеленый канал) и маркер интернейронов нейропептид Y (NPY, красный канал). А – неокортекс (фронтальная ассоциативная кора), цифрами отмечены слои неокортекса; Б – дорсальный гиппокамп; шкала: 150 мкм. На микрофотографиях а и б показаны выделенные рамками на А и Б области соответственно; шкала: 70 мкм. CA1 – зона CA1 гиппокампа; CA2 – зона CA2 гиппокампа; CA3 – зона CA3 гиппокампа; DG – зубчатая фасция гиппокампа

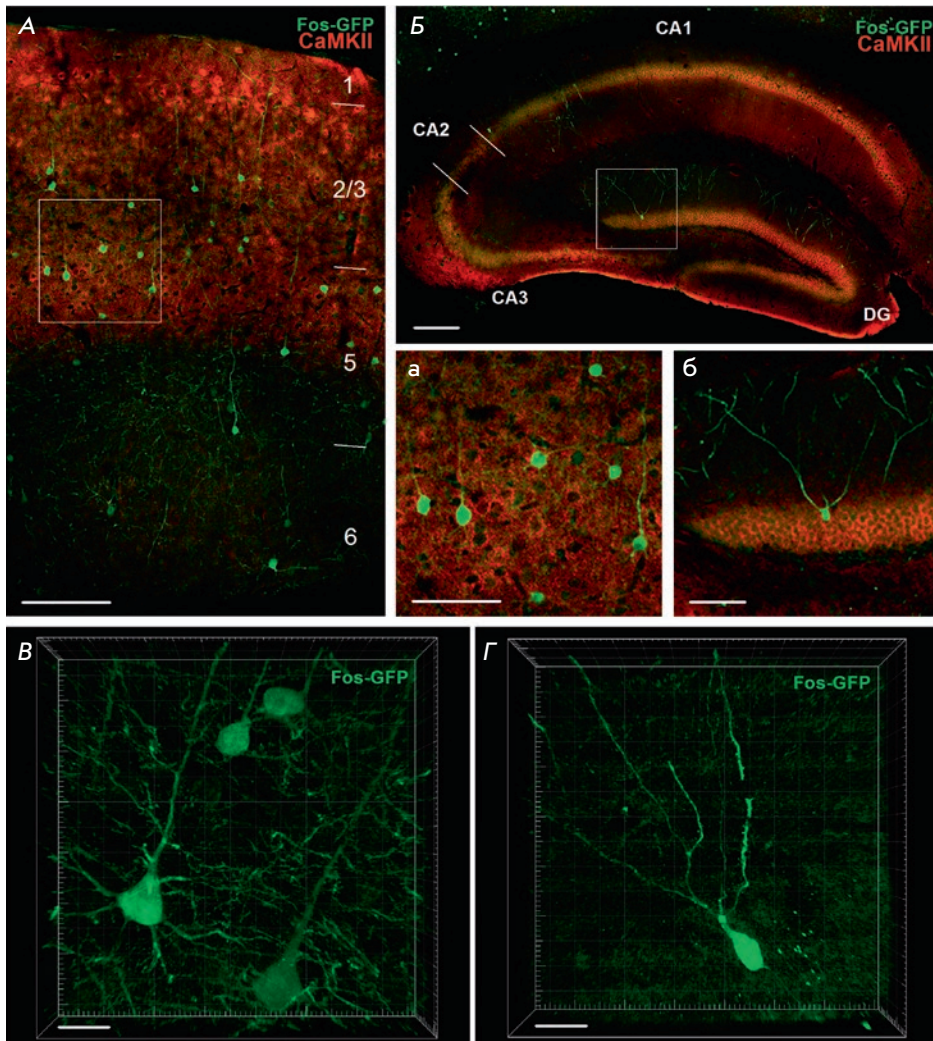


Рис. 7. Колокализация eGFP-положительных нейронов, прошедших опыт-зависимую Cre-рекомбинацию (зеленый канал), с маркером пирамидных нейронов CaMKII (красный канал). А – неокортекс (фронтальная ассоциативная кора), цифрами отмечены слои неокортекса; Б – дорсальный гиппокамп, отмечены зоны CA1, CA2, CA3 и зубчатая фасция (DG); шкала: 150 мкм. На микрофотографиях а и б показаны выделенные рамками на А и Б области соответственно; шкала: 70 мкм. В и Г – микрофотографии отдельных нейронов, прошедших опыт-зависимую Cre-рекомбинацию в неокортексе и гиппокампе соответственно. Видны дендритные деревья клеток и отходящие от сомы аксоны; шкала: 20 мкм

(по белку *c-Fos*), а также нейроны, которые были активны в обоих когнитивных эпизодах (eGFP и *c-Fos*) в различных областях мозга мышей (рис. 9).

Нами проведена оценка количества нейронов, активированных при обследовании обстановки и последующем нанесении немедленного ЭКР, а так-

же степени перекрытия этих популяций нейронов, во фронтальной ассоциативной коре мышей группы «А – А + ЭКР» и контрольных мышей из группы «А – В + ЭКР» (рис. 10). Обследование новой обстановки и нанесение немедленного ЭКР активировали сходные по объему популяции нейронов фронтальной ассоциативной коры, однако большее число нейронов активировалось в том случае, если ЭКР наносили в ранее обследованной обстановке А, чем в новой обстановке В (фактор «группа»: $F(1,8) = 12.33, p = 0.0080$; фактор «когнитивный эпизод»: $F(1,8) = 11.37, p = 0.0098$; взаимодействие факторов: $F(1,8) = 3.947, p = 0.0404$; сравнение количества *c-Fos*-положительных клеток у групп «А – А + ЭКР» и «А – В + ЭКР»: $p = 0.0212$) – см. рис. 10А. Кроме того, нанесение ЭКР в знакомой обстановке активировало больше нейронов, чем ее изначальное обследование (сравнение количества *c-Fos*-положительных и eGFP-положительных клеток у группы «А – А + ЭКР»: $p = 0.01924$). При этом доля нейронов, активных во время обследования новой обстановки и затем повторно активировавшихся при нанесении ЭКР, была значимо выше у группы «А – А + ЭКР» (48.8%), чем у группы «А – В + ЭКР» (4.2%) – $p < 0.0001$. Аналогичный результат получен и для доли нейронов, активных в обоих когнитивных эпизодах, от всех нейронов, активируемых при нанесении ЭКР (рис. 10Б).

Результаты этого эксперимента указывают на возможность использования метода Cre-управляемого

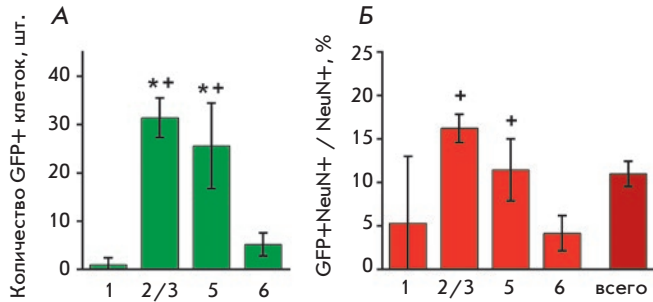


Рис. 8. Анализ паттернов распределения нейронов, прошедших опыт-зависимую Cre-рекомбинацию после обследования животным новой обстановки, по слоям фронтальной ассоциативной коры. А – количество eGFP-положительных клеток; Б – доля eGFP-положительных клеток от всех нейронов, выявленных по окраске на NeuN. Цифрами обозначены слои неокортекса, столбец «всего» – среднее значение по всей фронтальной ассоциативной коре. * – $p < 0.02$, + – $p < 0.02$ при сравнении со слоями 1 и 6 соответственно, *t*-тест Сидака. Данные представлены как среднее \pm 95% доверительный интервал

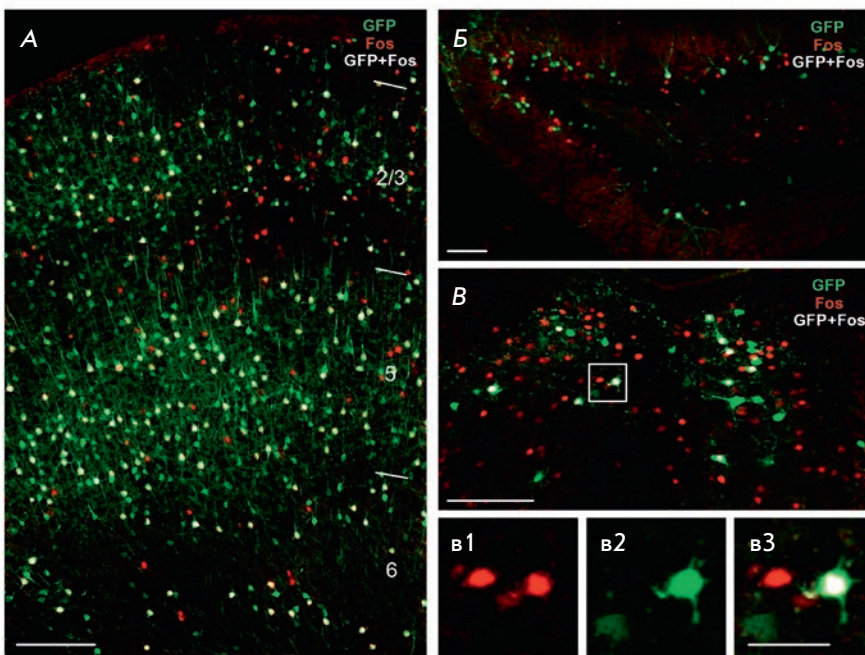


Рис. 9. Иммуногистохимическое выявление нейронов, активных во время двух когнитивных эпизодов. Нейроны, активные во время первого эпизода, обследования новой обстановки, помечены eGFP (зеленый канал); клетки, активные во время второго эпизода, нанесения ЭКР, помечены эндогенным белком *c-Fos* (красный канал). Белым псевдоцветом окрашены клетки, положительные как по eGFP, так и по *c-Fos* – т.е. активные в обоих когнитивных эпизодах. А – фронтальная ассоциативная кора, цифрами отмечены слои неокортекса; Б – зубчатая фасция гиппокампа; В – паравентрикулярное ядро таламуса; шкала: 100 мкм. На микрофотографиях в1, в2, в3 показана область, выделенная рамкой на В, отдельно по каналам: в1 – цитоплазматическая окраска на eGFP; в2 – ядерная окраска на *c-Fos*; в3 – их наложение; шкала: 70 мкм

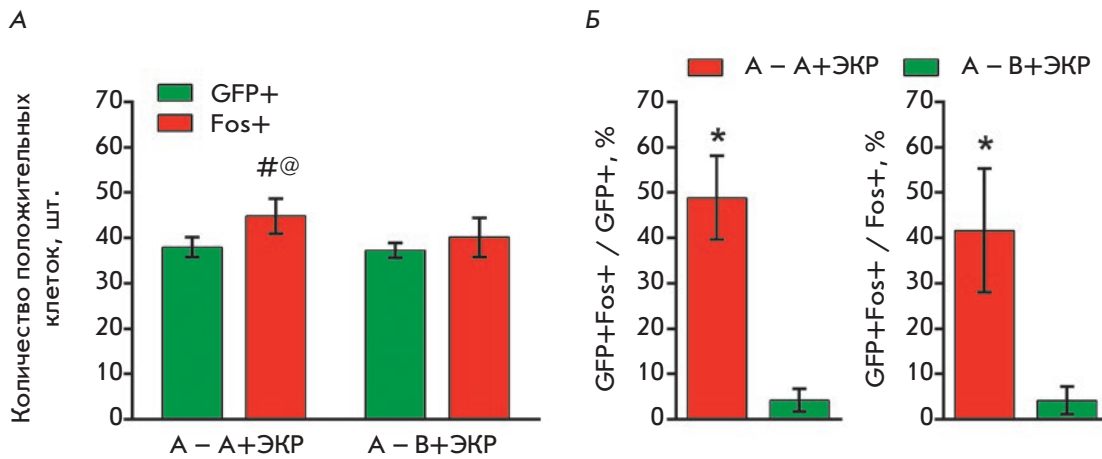


Рис. 10. Количественный анализ перекрытия популяций нейронов фронтальной ассоциативной коры, активных во время двух когнитивных эпизодов. А – популяции нейронов, активных при обследовании обстановки А (клетки, положительные по eGFP) и нанесении немедленного ЭКР (клетки, положительные по c-Fos); Б – доля нейронов, активных в обоих когнитивных эпизодах, от всех нейронов, вовлекшихся в обследование новой обстановки (GFP+Fos+ / GFP+), или от всех нейронов, вовлекшихся в нанесение немедленного ЭКР (GFP+Fos+ / Fos+). # – $p = 0.0192$ при сравнении количества c-Fos-положительных и eGFP-положительных клеток у группы «А – А + ЭКР», @ – $p = 0.0212$ при сравнении количества c-Fos-положительных клеток у групп «А – А + ЭКР» и «А – В + ЭКР», t -тест Сидака; * – $p < 0.0001$ при сравнении с группой «А – В + ЭКР», двухвыборочный t -критерий. Данные представлены как среднее \pm 95% доверительный интервал

генетического маркирования нейронов для выявления и последующего анализа популяций нейронов, активных в одном мозге во время двух разных когнитивных эпизодов.

Ранее для мечения двух популяций когнитивно активных нейронов была применена трансгенная технология, основанная на использовании системы tTA-tetO. В статье Reijmers и соавт. систему tTA-tetO использовали для анализа перекрытий популяций нейронов, активных во время формирования и реактивации памяти [27]. При этом для сопоставления этих популяций использовали два разных генетических маркера транскрипционной активации клеток – *c-fos* и *zif268*. Однако известно, что эти два гена имеют различный базовый уровень экспрессии, различные клеточные функции, разную специфичность по отношению к типам клеток мозга и активируются в ответ на различающиеся типы когнитивной активности животных [28]. Поэтому соотнесение вовлечения популяций нейронов в два эпизода когнитивной активности по этим двум различающимся маркерам представляет большие теоретические сложности и вызывает серьезные возражения. Кроме того, система tTA-tetO имеет и ряд методических ограничений: трансгенным мышам tTA-tetO в течение всей жизни необходимо вводить доксициклин, а генетическое маркирование нейронов возможно только в пе-

риод отмены препарата. При этом временное окно активации системы после отмены доксициклина может занимать несколько дней, что приводит к большому числу неспецифически маркированных нейронов [27, 29]. Таким образом, трансгенная система с Cre-рекомбиназой представляется более адекватной для применения в экспериментах по выявлению в одном мозге двух нейрональных сетей, активных в разных когнитивных эпизодах.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе получены двойные трансгенные мыши Fos-Cre-eGFP, у которых в результате опыт-зависимой Cre-рекомбинации происходит генетическое маркирование нейронов, активных в период действия тамоксифена. У данных мышей наблюдали низкий фоновый уровень Cre-рекомбинации в спокойном состоянии и значительное увеличение количества eGFP-экспрессирующих генетически маркированных нейронов после эпизода приобретения нового опыта. Опыт-индуцированная Cre-рекомбинация у этих мышей проходит в большом числе структур головного мозга, принадлежащих к разным функциональным группам. При этом Cre-рекомбинация проходит в пирамидных возбуждающих нейронах, но не в тормозных интернейронах. Также показано, что метод Cre-опосредованного генетического мар-

кирования нейронных сетей может быть успешно применен для выявления в одной нервной системе активности двух разных популяций нейронов, связанных с разными когнитивными эпизодами, а также для анализа степени перекрытия этих популяций нейронов. ●

Исследование выполнено за счет гранта Российского научного фонда (проект № 14-15-00685). Работа проведена с использованием оборудования Ресурсного центра нейрокогнитивных исследований Курчатковского комплекса НБИКС-технологий.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Анохин К.В. // Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 1997. Т. 47. № 2. С. 262–286.
2. Kaczmarek L. // Handbook of Chem. Neuroanatomy. Amsterdam: Elsevier, 2002. V. 19. P. 189–215.
3. Korb E., Finkbeiner S. // Trends Neurosci. 2011. V. 34. № 11. P. 591–598.
4. Pérez-Cadahía B., Drobic B., Davie J.R. // Biochem. Cell Biol. 2011. V. 89. № 1. P. 61–73.
5. Anokhin K.V., Rose S.P. // Eur. J. Neurosci. 1991. V. 3. № 2. P. 162–167.
6. Alberini C.M. // Physiol. Rev. 2009. V. 89. P. 121–145.
7. Abramova A.B., Anokhin K.V. // Neurosci. Behav. Physiol. 1998. V. 28. № 6. P. 616–619.
8. Zvorykina S.V., Anokhin K.V. // Neurosci. Behav. Physiol. 2004. V. 34. № 8. P. 869–872.
9. Kuptsov P.A., Pleskacheva M.G., Voronkov D.N., Lipp Kh.P., Anokhin K.V. // Neurosci. Behav. Physiol. 2006. V. 36. № 4. P. 341–350.
10. Barth A.L., Gerkin R.C., Dean K.L. // J. Neurosci. 2004. V. 24. № 29. P. 6466–6475.
11. Branda C.S., Dymecki S.M. // Dev. Cell. 2004. V. 6. P. 7–28.
12. Nagy A. // Genesis. 2000. V. 26. P. 99–109.
13. Wu S., Ying G., Wu Q., Capecchi M.R. // Nat. Genet. 2007. V. 39. P. 922–930.
14. Metzger D., Clifford J., Chiba H., Chambon P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1995. V. 92. P. 6991–6995.
15. Feil R., Wagner J., Metzger D., Chambon P. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1997. V. 237. P. 752–757.
16. Imayoshi I., Sakamoto M., Kageyama R. // Front. Neurosci. 2011. V. 5. № 64. P. 1–11.
17. Taniguchi H., He M., Wu P., Kim S., Paik R., Sugino K., Kvitsani D., Fu Y., Lu J., Lin Y., et al. // Neuron. 2011. V. 71. P. 998–1013.
18. Guenther C.J., Miyamichi K., Yang H.H., Heller H.C., Luo L. // Neuron. 2013. V. 78. № 5. P. 773–784.
19. Воробьева Н.С., Ивашкина О.И., Торопова К.А., Анохин К.В. // Журн. высш. нервн. деят. им. И.П. Павлова. 2016. Т. 66. № 3. С. 352–360.
20. Franklin K.B.J., Paxinos G. The mouse brain in stereotaxic coordinates. 3rd ed. N.Y.: Acad. Press, 2007. 346 p.
21. Tovote P., Fadok J.P., Lüthi A. // Nat. Rev. Neurosci. 2015. V. 16. P. 317–331.
22. Mullen R.J., Buck C.R., Smith A.M. // Development. 1992. V. 116. № 1. P. 201–211.
23. Funchs E., Weber K. // Annu. Rev. Biochem. 1994. V. 63. P. 345–382.
24. Liu X.B., Murray K.D. // Epilepsia. 2012. V. 53. P. 45–52.
25. Markram H., Toledo-Rodriguez M., Wang Y., Gupta A., Silberberg G., Wu C. // Nat. Rev. Neurosci. 2004. V. 5. № 10. P. 793–807.
26. Nakayama D., Baraki Z., Onoue K., Ikegaya Y., Matsuki N., Nomura H. // Curr. Biol. 2015. V. 25. № 1. P. 117–123.
27. Reijmers L.G., Perkins B.L., Matsuo N., Mayford M. // Science. 2007. V. 317. P. 1230–1233.
28. Lee J.L., Everitt B.J., Thomas K.L. // Science. 2004. V. 304. № 5672. P. 839–843.
29. Glazewski S., Bejar R., Mayford M., Fox K. // Neuropharmacology. 2001. V. 41. P. 771–778.

УДК 571.27

Исследование репертуара Т-лимфоцитов после аутологичной ТГСК у пациентов с анкилозирующим спондилитом

Е. А. Комеч^{1*}, И. В. Звягин¹, М. В. Погорельный¹, И. З. Мамедов¹, Д. А. Федоренко², Ю. Б. Лебедев¹

¹Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

²Клиника гематологии и клеточной терапии им. А.А. Максимова, Национальный медико-хирургический центр им. Н.И. Пирогова Минздрава России, 105203, Москва, ул. Нижняя Первомайская, 70

*E-mail: ekomech@gmail.com

Поступила в редакцию 24.10.2017

Принята к печати 16.04.2018

РЕФЕРАТ Аутологичная трансплантация гемопоэтических стволовых клеток (ТГСК), более безопасная по сравнению с аллогенной трансплантацией, является перспективным методом терапии при тяжелых формах аутоиммунных заболеваний (АЗ). Несмотря на достаточно длительную историю применения, вопрос о структурных изменениях системы адаптивного иммунитета в результате аутологичной ТГСК у пациентов с различными типами АЗ остается малоизученным. С помощью массированного секвенирования нами изучены изменения структуры клонального репертуара Т-лимфоцитов периферической крови у взрослых пациентов с анкилозирующим спондилитом (АС) в результате аутологичной ТГСК на протяжении 2 лет восстановительного периода. Применение техники молекулярного баркодирования позволило в существенной степени снизить влияние искажений, возникающих в ходе пробоподготовки, провести сравнительный анализ различных характеристик Т-клеточного репертуара между разными временными точками и отследить динамику отдельных групп клонотипов и субпопуляций Т-лимфоцитов. Клональное разнообразие Т-клеточного репертуара оставалось значительно сниженным по сравнению с исходным в течение первого года восстановительного периода у обоих пациентов, продолжив увеличиваться на протяжении всех 24 мес. наблюдения, и у одного пациента достигло нормального значения для данной возрастной группы. Рост разнообразия связан с появлением большого числа низкопредставленных клонотипов, которые не были выявлены в образцах до трансплантации. Детектируемость клонотипов после ТГСК в значительной степени зависела от их представленности в исходном репертуаре. Практически все из 100 клонотипов, наиболее высокопредставленных до ТГСК, обнаружены в репертуаре 2 года спустя и остались при этом высокопредставленными независимо от принадлежности к CD8⁺ или CD4⁺ субпопуляции Т-лимфоцитов. До 25% Т-клеток периферической крови через 2 года после ТГСК были представлены клонотипами первоначального репертуара.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА анкилозирующий спондилит, аутологичная ТГСК, репертуар TCR, NGS.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АС – анкилозирующий спондилит; ЗД – здоровые доноры; РС – рассеянный склероз; ТГСК – трансплантация гемопоэтических стволовых клеток крови; TCR – Т-клеточный рецептор (T-cell receptor); RepSeq – секвенирование репертуаров иммунорецепторов (repertoire sequencing); TNF α – фактор некроза опухоли альфа (tumor necrosis factor alpha).

ВВЕДЕНИЕ

Анкилозирующий спондилит (АС, или болезнь Бехтерева) – хроническое заболевание суставов осевого скелета аутоиммунной природы. Сильная ассоциация риска развития АС с аллелем HLA-B*27,

а также с аллелями других генов, вовлеченных в презентацию антигена Т-лимфоцитам, позволяет предполагать активное участие Т-клеток в патогенезе заболевания. На сегодняшний день для терапии АС применяют нестероидные противовоспалительные

препараты, а также их комбинацию с препаратами моноклональных антител, чаще всего против TNF α . Однако такая терапия оказывается неэффективной для 40% пациентов [1]. В последние два десятилетия при тяжелых аутоиммунных заболеваниях начинают применять аутологичную трансплантацию гемопоэтических стволовых клеток крови (ТГСК), показавшую высокую эффективность у пациентов с рассеянным склерозом (РС), системной красной волчанкой, ювенильным идиопатическим артритом, системной склеродермией [2–5]. Полученные к настоящему времени сведения указывают, что клинический эффект такой терапии основан на существенной реформе репертуара Т- и В-лимфоцитов в результате глубокой иммуносупрессии и последующего формирования нового репертуара лимфоцитов. Решающая роль Т-клеток в нормальном функционировании и регуляции иммунной системы, а также их участие в аутоиммунных процессах подчеркивают важность изучения реформирования Т-клеточного репертуара в ходе ТГСК. Исследование клонального репертуара гипервариабельных рецепторов лимфоцитов с помощью массивированного параллельного секвенирования (RepSeq) является наиболее современным и информативным подходом к мониторингу динамики пула Т-клеток на уровне отдельных клонов. К настоящему времени опубликованы результаты лишь нескольких исследований процесса восстановления иммунной системы после аутологичной ТГСК с помощью анализа состояния Т-клеточного репертуара [4, 6], включая две работы, в которых анализировали репертуар пациента с АС после аутологичной ТГСК [7, 8]. В настоящей работе мы провели более длительное и подробное исследование реформы репертуара Т-клеток у пациентов с АС после аутологичной ТГСК, впервые проследив клональную динамику Т-лимфоцитов на протяжении 2 лет после трансплантации. Применение технологии молекулярного баркодирования позволило более корректно, чем в предыдущих исследованиях, оценить разнообразие клонального репертуара образцов за счет выравнивания глубины анализа и элиминирования большинства ошибочных последовательностей, возникающих в ходе ПЦР и секвенирования.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациенты

Образцы периферической крови получены от двух пациентов с АС в нескольких временных точках: до ТГСК (точка 0), 4, 12 и 24 мес. после ТГСК. Диагноз АС устанавливали на основе модифицированного нью-йоркского критерия [9]. Все пациенты дали письменное согласие на участие в исследовании, ра-

бота проведена с соблюдением действующих этических и правовых норм.

Пациент ash-110: мужчина, 26 лет, HLA-B*27+. До ТГСК: длительность болезни более 3 лет, терапия включала метотрексат (7.5 мг/неделя, внутримышечно) и нестероидные противовоспалительные препараты (НПВП). На момент ТГСК состояние пациента характеризовалось как вторая степень активности АС и вторая степень функциональной недостаточности. Через месяц после ТГСК состояние пациента охарактеризовано как «улучшение», пациент выписан на амбулаторное лечение. Через год после ТГСК зафиксировано первое обострение (точка 12), после которого пациент находится на постоянной терапии адалимумабом (Хумира). Через 2 года после ТГСК зафиксировано еще одно обострение (точка 24).

Пациент ash-111: женщина, 28 лет, HLA-B*27+. До ТГСК: длительность болезни более 10 лет, терапия включала инфликсимаб (Ремикейд). На момент ТГСК состояние характеризовалось как 2–3-я степень активности АС и вторая степень функциональной недостаточности. Через месяц после ТГСК состояние пациентки охарактеризовано как «улучшение», и она была выписана на амбулаторное лечение. Через год после ТГСК зафиксировано обострение болезни (точка 12), после которого пациентка находится на постоянной терапии этанерцептом (Энбрел).

ТГСК

Аутологичную ТГСК проводили в соответствии со следующим протоколом: иммуносупрессивная химиотерапия циклофосфамидом (200 мг/кг в течение 4-х дней) с последующим введением ранее полученного аутологичного изолята гемопоэтических стволовых клеток крови (2.4×10^6 стволовых клеток крови на 1 кг массы тела). Аутологичный трансплантат стволовых клеток крови мобилизован с использованием гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (Г-КСФ, 10 мг/кг массы тела), обогащение трансплантата по популяции CD34+ не проводили. Для *in vivo* Т-клеточной деплеции при введении трансплантата одновременно вводили антигемоциттарный глобулин.

Выделение лимфоцитарной фракции клеток и сортировка клеток

Образцы периферической крови (8 мл) собирали в вакуумные пробирки с K₃EDTA (Vacutainer, BD Biosciences) в точках: 0 (до ТГСК и химиотерапии), 4, 9 (ash-111) или 12 (ash-110) и 24 мес. после ТГСК. Мононуклеарную фракцию выделяли стандартным методом центрифугирования в градиенте плотности фиколла (1.077 г/см³, «ПанЭко», Россия). Для анализа

воспроизводимости в точке «24 мес.» у обоих пациентов отбирали по два образца периферической крови одинакового объема (R1 и R2). В этот же период (24 мес. после ТГСК) одновременно с образцами R1 и R2 с помощью наборов реактивов Dynabeads для иммуномагнитной селекции (Invitrogen, США) получали отдельные фракции CD4+ и CD8+ Т-клеток.

Подготовка библиотек кДНК TCRβ и секвенирование

РНК выделяли с использованием реагента TRIzol (Invitrogen, США) в соответствии с инструкцией производителя. Библиотеки кДНК подготавливали по ранее описанной технологии [10] с модификациями: после синтеза кДНК проводили предварительную амплификацию кДНК бета-цепей TCR с праймерами BCuni2R TGCTTCTGATGGCTCAAACAC и M1S AAGCAGTGGTATCAACGCAGAGT (94°C, 20 с; 60°C, 15 с; 72°C, 60 с – 18 циклов). Каждая реакционная смесь содержала по 5 пмоль олигонуклеотидов BCuni2R и M1S, 1× буфер Tersus, 0.1 мМ каждого dNTP и 0.2 мкл полимеразы Tersus («Евроген», Россия), объем смеси 15 мкл. Продукт амплификации очищали с помощью набора реактивов QIAquick PCR Purification Kit (Qiagen, США) согласно инструкции производителя. В последующую реакцию амплификации брали весь объем очищенного ПЦР-продукта.

Секвенирование проводили на Illumina HiSeq 2000/2500 2 × 100 нт.

Обработка результатов секвенирования

Предварительная обработка результатов секвенирования включала коррекцию ошибок секвенирования и подсчет числа молекулярных событий (UMI) в библиотеке с помощью программного обеспечения MiGEC [11]. Для определения V-, D- и J-сегментов, последовательностей CDR3, подсчета численности клонотипов и формирования листа клонотипов для каждого образца использовали программное обеспечение MiTCR [12]. При восстановлении клонового репертуара образца использовали последовательности кДНК TCR, прочитанные минимум дважды по результатам анализа UMI, что позволяло устранить большую часть ошибочных последовательностей [11, 13]. Статистика секвенирования приведена в *таблице*. Дальнейшую биоинформатическую и статистическую обработку результатов проводили с помощью языка программирования R и пакета tcR [14, 15].

Определение принадлежности клонотипа к популяции CD4 или CD8, а также поиск отдельных клонотипов в индивидуальных репертуарах разных временных точек проводили по совпадению нуклеотидной последовательности участка CDR3 и V-сегмента TCR в восстановленных репертуарах.

Статистика секвенирования

Пациент	Точка / Субпопуляция Т-клеток	Количество прочтений	Количество UMI ^{§, #}	Суммарное количество клонотипов [#]	Количество клонотипов на 90 000 UMI [#]
ash-110	0/F*	10671513	301277	226383	77160
	4/F	13657155	90985	47119	46803
	12/F	1011932	125640	72925	55413
	24/R1**	7366741	964274	519425	69397
	24/R2**	7533711	1263464	625152	69244
	24/CD4+	2776546	587713	329331	71870
	24/CD8+	2964049	653168	183735	42679
ash-111	0/F	11194792	308159	222555	74115
	4/F	17725492	138299	68398	48533
	12/F	23807978	225397	134596	61615
	24/R1	7366741	957406	414203	63755
	24/R2	4597521	367849	210597	64547
	24/CD4+	3144715	435297	218230	64026
	24/CD8+	2850176	552005	163602	43519

*F – фракция мононуклеарных клеток периферической крови.

**R1, R2 – фракции мононуклеарных клеток периферической крови из двух параллельных образцов крови.

§ UMI (unique molecular identifier) – уникальный молекулярный баркод.

Каждый UMI прочитан минимум 2 раза.

Для расчета клонального разнообразия, оценки нижней границы представленности стабильно попадающих в выборку клонотипов и степени обновления репертуара глубину анализа репертуара сравниваемых образцов выравнивали с помощью случайного отбора 90000 UMI из массива данных секвенирования каждого образца.

Клональное разнообразие Т-клеточного репертуара оценивали с использованием индекса видового разнообразия Chao1 [16].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Динамика восстановления клонального репертуара Т-лимфоцитов

При исследовании изменений репертуара Т-лимфоцитов с помощью массивированного параллельного секвенирования важным аспектом является максимальное снижение искусственного разнообразия последовательностей, возникающего в результате ошибок секвенирования, а также сопоставимость глубины анализа репертуара у сравниваемых образцов [17]. В данной работе для высокопроизводительного секвенирования клональных репертуаров Т-лимфоцитов периферической крови двух пациентов с анкилозирующим спондилитом до и после аутологичной ТГСК использована технология подготовки библиотек кДНК TCR с применением баркодирования молекул кДНК [18, 19]. Использование уникальных молекулярных баркодов (UMI) при обработке результатов секвенирования позволяет элиминировать большинство ошибок ПЦР и секвенирования, снижая искусственное разнообразие, и количественно оценивать представленность клонотипов Т-клеток в образце [11, 13]. Получены пять образцов периферической крови каждого пациента в четырех временных точках: за неделю до ТГСК (точка 0) и спустя 4, 12 и 24 (пара параллельных образцов) мес. после ТГСК. В результате секвенирования для каждого образца получено от 1×10^6 до 23×10^6 последовательностей, соответствующих по меньшей мере 9×10^4 уникальных молекул кДНК бета-цепей TCR при минимальном пороге два прочтения на каждую молекулу кДНК TCR (таблица). Выбранный порог позволяет исключить из дальнейшего анализа большинство ошибочных последовательностей кДНК, возникающих в ходе ПЦР и секвенирования [20].

В качестве меры разнообразия клонального репертуара в нашей работе применен индекс Chao1, основанный на оценке количества малопредставленных видов в выборке и, таким образом, учитывающий богатство образца клонотипами наивных Т-лимфоцитов, составляющих основу разнообразия Т-клеточного репертуара [16, 21]. Учитывая чувстви-

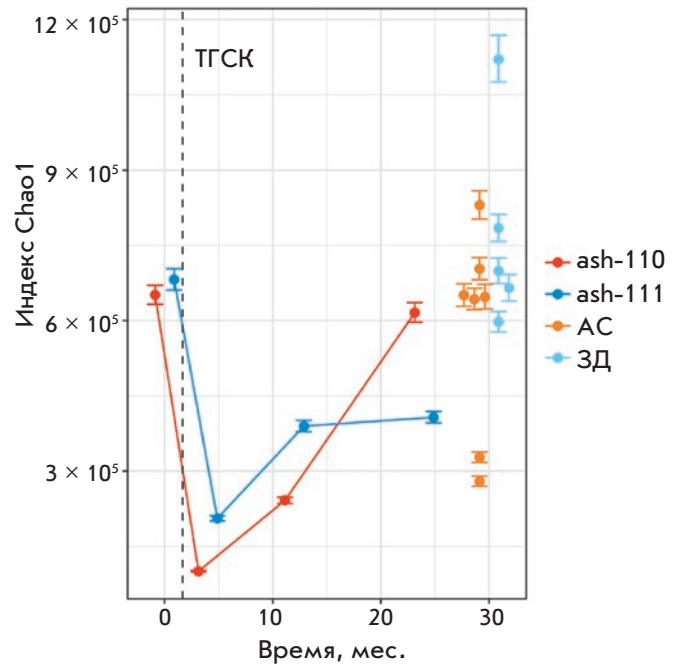


Рис. 1. Динамика клонального разнообразия репертуара Т-лимфоцитов в течение 2 лет после ТГСК. Оценка нижней границы клонального разнообразия TCRβ с использованием индекса Chao1 [16]. Голубые точки соответствуют здоровым донорам ($n = 6$, возраст 22–34 г.; данные из [21]), оранжевые — пациентам с AC ($n = 5$, возраст 22–34 г.; данные из [22]). Вертикальная пунктирная линия отражает момент проведения ТГСК. Для каждого значения отмечен 95% доверительный интервал

тельность данной метрики к глубине анализа, при исследовании динамики клонального разнообразия из массива данных для каждого образца случайным образом отбирали по 90000 последовательностей кДНК TCR с уникальными молекулярными баркодами. Исходя из проведенной ранее оценки эффективности примененной в работе технологии реконструкции Т-клеточных репертуаров, отобранное число приблизительно соответствует анализу 90000 клеток Т-лимфоцитов [13, 21].

Через 4 мес. после ТГСК индекс разнообразия был существенно снижен ($p < 2.2 \times 10^{-16}$, U-критерий Манна–Уитни) относительно исходного значения у обоих пациентов (рис. 1). Общее количество идентифицированных клонотипов TCRβ было более чем в 2 раза ниже, чем до ТГСК (77391 и 46797, 73880 и 48505 клонотипов в образцах 0 и 4 мес. у пациентов ash-110 и ash-111 соответственно). В течение года восстановительного периода разнообразие клонального репертуара не достигло первоначального уровня у обо-

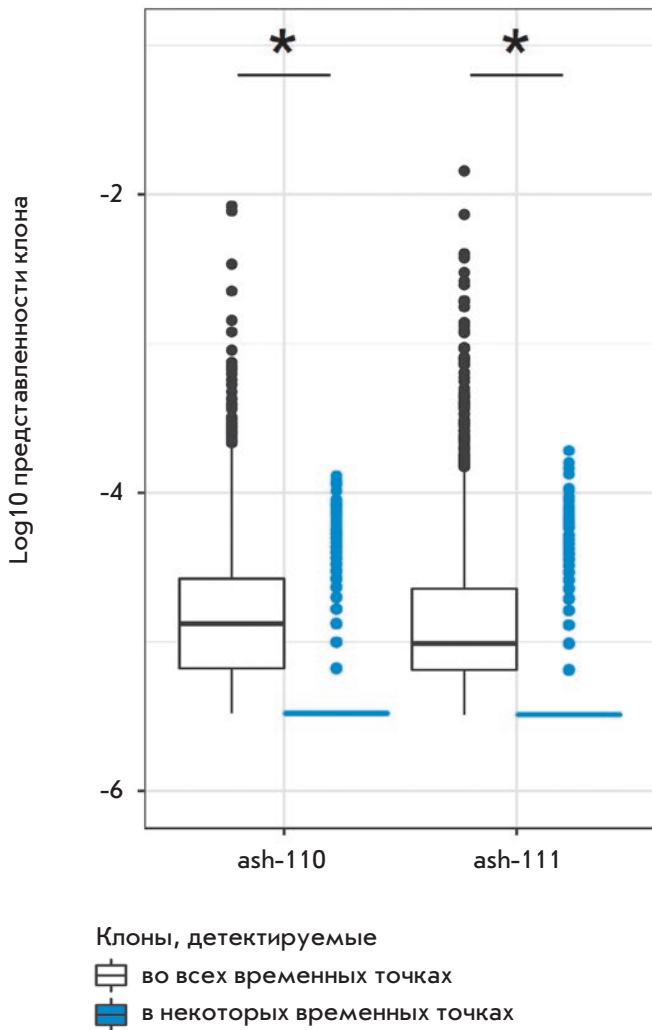


Рис. 2. Распределение представленности клонотипов в первоначальном репертуаре Т-лимфоцитов в зависимости от их обнаружения в образцах пациентов после ТГСК. Белый цвет – распределение численности клонотипов, обнаруженных во всех проанализированных образцах, включая образцы до ТГСК; синий – распределение для клонотипов, присутствовавших в точке 0, но не найденных в каком-либо из образцов после ТГСК (точки 4, 12 или 24). * $p < 2.2 \times 10^{-16}$ (U-критерий Манна–Уитни)

их пациентов. Скорость восстановления клонального разнообразия у пациентов различалась. Через 2 года после ТГСК клональное разнообразие репертуара у пациента ash-110 достигло исходного уровня и соответствовало разнообразию у здоровых доноров того же возраста (рис. 1). У пациента ash-111 через год после ТГСК клональное разнообразие составляло лишь половину от первоначального и не измени-

лось существенно в течение второго года восстановительного периода, так и не достигнув нормального значения. Стоит отметить, что, в отличие от других аутоиммунных заболеваний, где разнообразие клонального репертуара Т-клеток до ТГСК существенно снижено [2, 4], исходное разнообразие клональных репертуаров у обоих пациентов в данном исследовании было таким же, как у здоровых доноров и пациентов с АС соответствующего возраста ($p = 0.284$ и $p = 0.06$ соответственно, U-критерий Манна–Уитни).

Влияние ТГСК на клонотипы первоначального репертуара Т-лимфоцитов

При изучении динамики исходного репертуара в течение 2 лет после ТГСК мы проследили встречаемость клонотипов из репертуара точки 0 во всех последующих образцах, т.е. через 4, 12 и 24 мес. после ТГСК. По результатам такого анализа клонотипы первоначального репертуара были условно разделены на две группы: постоянно присутствующие во всех точках после ТГСК и обнаруживаемые лишь в некоторых временных точках. В первую группу вошли 3188 клонотипов у ash-110 и 6126 клонотипов у ash-111 (1.4 и 3.0% от общего разнообразия соответственно) и занимали около 10% (ash-110) или 15% (ash-111) от Т-клеток периферической крови до ТГСК (рис. 2). Клонотипы второй группы, т.е. не детектируемые или наблюдающиеся только в некоторых временных точках после ТГСК, составляли большую часть Т-клеток периферической крови до ТГСК (порядка 90%). Исходная представленность этих групп существенно различалась: в первой группе оказалось большинство высокопредставленных клонотипов репертуара (медиана частоты клонотипа в репертуаре 0.001%, интерквартильный размах 0.0007–0.003% для каждого пациента), а во второй – в среднем малочисленные клонотипы (медиана частоты 0.0003%, интерквартильный размах 0.0003–0.0003%). Интересно, что некоторая часть исходно малочисленных клонотипов тем не менее вошла в состав первой группы, т.е. присутствует во всех репертуарах после ТГСК, а среди высокопредставленных в первоначальном репертуаре есть исчезнувшие после ТГСК клонотипы.

При исследовании динамики отдельных клонотипов на протяжении длительного периода времени необходимо учитывать, что вероятность детекции клонотипа в образце определяется численностью клеток данного клонотипа в репертуаре: клонотипы, представленные большим количеством клеток, т.е. так называемые высокопредставленные клонотипы, имеют большую вероятность быть обнаруженными в нескольких независимо отобранных образцах крови, в отличие от клонотипов с низкой численностью.

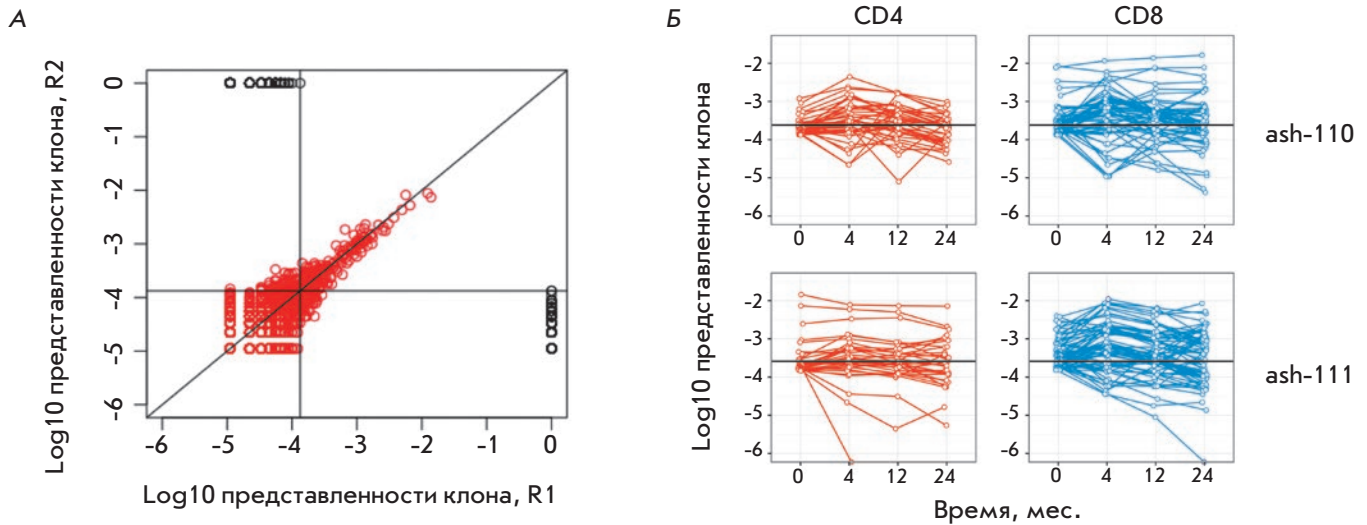


Рис. 3. Динамика клонотипов первоначального репертуара Т-лимфоцитов. А – воспроизводимость численности клонотипов, обнаруженных в двух одновременно взятых образцах крови одного пациента. Точками отмечены отдельные клонотипы TCRβ. Черные точки отображают клонотипы, не воспроизводимые в реплике. Б – динамика «топ 100» клонотипов первоначального репертуара. Красным – CD4+ клонотипы, синим – CD8+ клонотипы. Черная горизонтальная линия отражает минимальную представленность клонотипа из «топ 100» точки 24

Для определения границы численности клонотипов, которые стабильно попадают в анализируемый образец и обнаруживаются в данных секвенирования, мы провели сравнительный анализ клональных репертуаров параллельных образцов крови, взятых в один момент времени. Чтобы устранить влияние различий по глубине анализа репертуара образцов, из каждого массива данных секвенирования были случайно отобраны 90000 последовательностей кДНК TCR. У обоих пациентов при одинаковой глубине анализа в каждой из реплик наблюдались только клонотипы с представленностью > 0.01%, составляющие 100–150 наиболее высокопредставленных клонотипов репертуара (рис. 3А). Основываясь на данной оценке воспроизводимости, для характеристики степени обновления первоначального репертуара мы проследили 100 наиболее высокопредставленных клонотипов («топ 100») из точки 0 во всех точках после ТГСК у каждого пациента, предполагая, что отсутствие или присутствие этих клонотипов в образце после ТГСК будет отражать изменения численности клеток данного клонотипа. В полном соответствии с их высокой представленностью все клонотипы из «топ 100», за исключением двух у пациента ash-111, относятся к группе клонотипов, постоянно присутствующих в течение восстановительного периода. При этом около половины клонотипов из «топ 100» у каждого пациента (45 у ash-110 и 52 у ash-111) сохранили высокую численность и остались среди

100 наиболее высокопредставленных через 2 года после ТГСК. Аналогичным образом мы проследили динамику 100 наиболее высокопредставленных клонотипов у трех здоровых доноров соответствующего возраста на протяжении 2 лет. У здоровых доноров в отсутствие ТГСК из исходных 100 наиболее высокопредставленных клонотипов от 85 до 95 клонотипов сохраняются в «топ 100» через 2 года.

С помощью анализа клональных репертуаров отдельных фракций Т-клеток была определена принадлежность каждого клонотипа из «топ 100» к субпопуляциям CD8+ цитотоксических или CD4+ хелперных Т-лимфоцитов. Выраженных различий сохранения клонотипов в «топ 100» спустя 2 года после ТГСК в зависимости от принадлежности к цитотоксической или хелперной субпопуляциям не выявлено (рис. 3Б).

Полученные результаты позволяют заключить, что у исследованных пациентов аутологичная ТГСК не привела к полному обновлению состава высокопредставленных клонотипов, более половины из которых остались в репертуаре и сохранили высокую численность. Однако перегруппировка высокопредставленных клонотипов в результате проведенной ТГСК оказалась более существенной, чем динамика этой части репертуара здоровых доноров за такой же период времени. Детектируемость клонотипов первоначального репертуара после трансплантации в основном зависела от представленности клонотипа

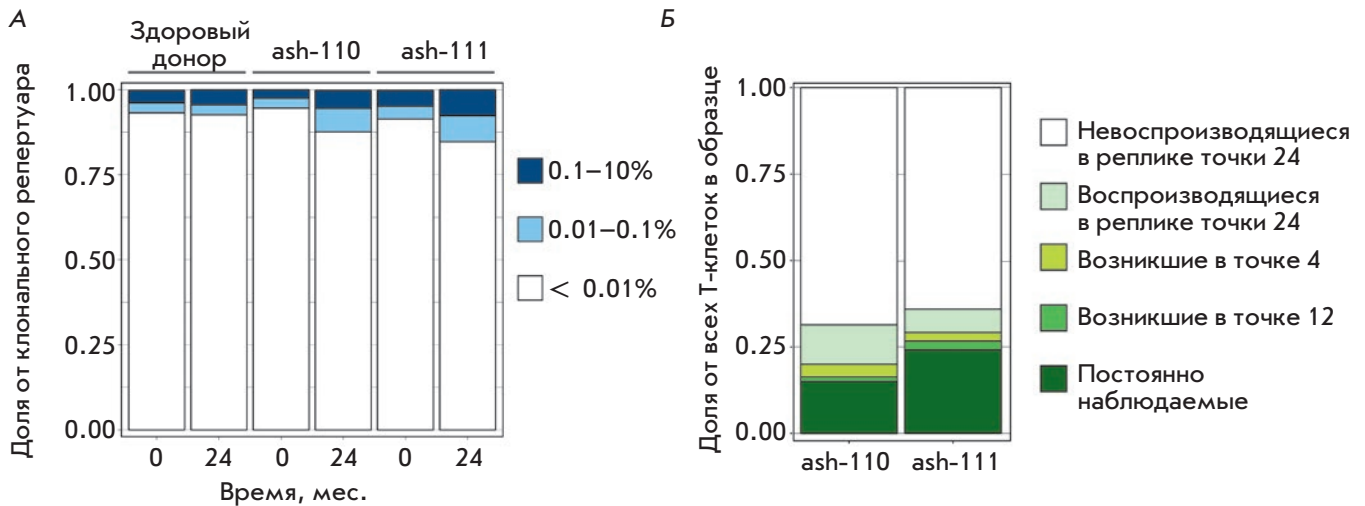


Рис. 4. Структура репертуара Т-лимфоцитов через 2 года после ТГСК. А – доля клонотипов, принадлежащих к разным группам по численности, от общего числа клонотипов образца: высокопредставленные (0.1–10%), со средней численностью (0.01–0.1%) и с низкой численностью (0.001–0.01%). Приведены структуры репертуаров Т-клеток у двух пациентов до и через 2 года после ТГСК (точки 0 и 24), а также у одного здорового донора. Б – все клонотипы в точке 24 разбиты на группы в зависимости от того, в какой временной точке они были впервые детектированы. По оси Y отложена суммарная доля клонотипов каждой группы от всех Т-клеток в образце через 2 года после ТГСК

в исходном репертуаре. Вместе с тем, часть клонотипов с низкой численностью до ТГСК обнаруживается в репертуаре у обследованных пациентов и через 2 года после терапии, что предполагает влияние других факторов, помимо исходной численности, на судьбу клонов Т-лимфоцитов после ТГСК.

Структура клонального репертуара спустя 2 года после ТГСК

Одним из предполагаемых следствий проведения ТГСК, влияющих на терапевтическую эффективность процедуры, является обновление клонального состава репертуара Т-лимфоцитов. Чтобы оценить изменения, произошедшие в структуре репертуара через 2 года после ТГСК, мы проанализировали клональный состав репертуара в точках 0 и 24 у обоих пациентов. Для сравнения аналогичным образом исследовали структуры репертуаров здоровых доноров соответствующего возраста ($n = 3$) (рис. 4А, слева приведены структуры репертуаров одного репрезентативного донора). Через 2 года после ТГСК структура клонального репертуара пациентов практически не отличалась от нормальной: малая часть (до 10%) репертуара образована высокопредставленными и среднечисленными клонотипами, а остальную часть (около 90%) занимают малочисленные клонотипы. В то же время репертуары пациентов после трансплантации являются более олигоклональными, чем до ТГСК (рис. 4А).

Для оценки степени обновления репертуаров мы проанализировали клональный состав репертуара через 2 года после ТГСК во всех предыдущих точках. 15 и 24% (ash-110 и ash-111 соответственно) клеток от репертуара занимают клонотипы, которые присутствовали в репертуаре до ТГСК, а также прослеживались во всех точках после трансплантации (рис. 4Б). Источником происхождения клеток таких клонотипов в равной степени может быть пул Т-клеток, оставшихся в организме пациента после подготовительной химиотерапии, и Т-клетки трансплантата, представлявшего собой практически исходный репертуар пациента до ТГСК, поскольку специфической деплеции зрелых Т-клеток не проводилось. Высокая представленность данных клонотипов после ТГСК обусловлена интенсивной пролиферацией клеток данных клонотипов, что позволило им преодолеть существенное снижение численности в результате предтрансплантационной химиотерапии. В то же время у обоих доноров, наряду с ростом разнообразия в течение 2 лет после ТГСК, доля клонотипов, пришедших из исходного репертуара, снижается (рис. 5А). При этом количество общих клонотипов между репликами точки 24 (p24_R1R2 на рис. 5А), в которых клональное разнообразие сопоставимо с точкой 0, существенно больше, чем между точками 0 и 24, что может объясняться появлением новых клонов Т-лимфоцитов в ходе восстановительного периода.

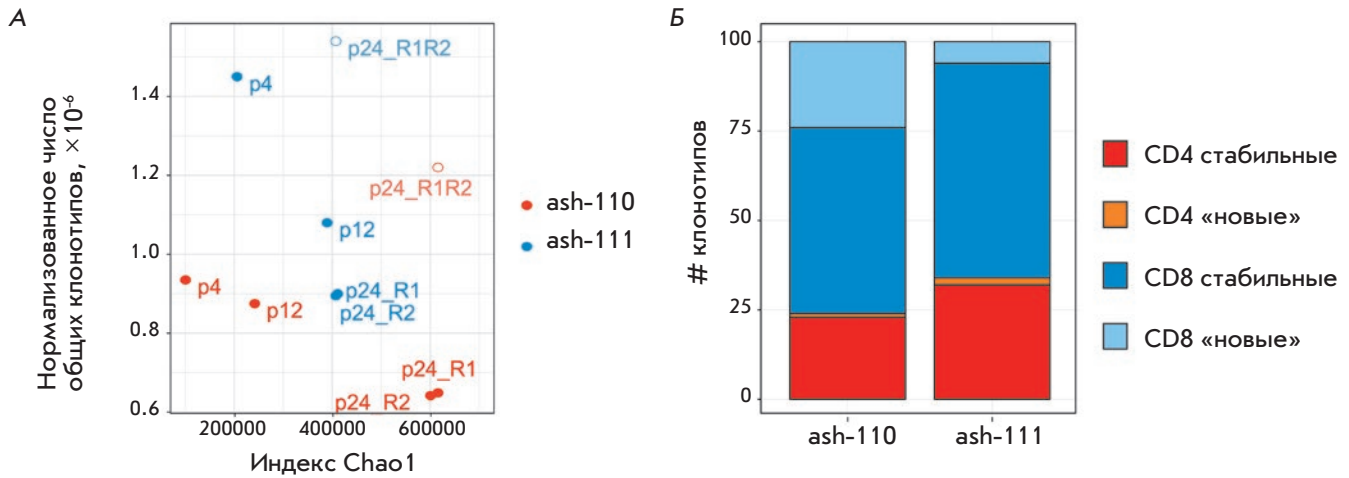


Рис. 5. Степень обновления клонального репертуара Т-лимфоцитов после ТГСК. А – зависимость нормализованного числа общих клонотипов между репертуаром точки 0 и репертуарами точек 4 (p4), 12 (p12), а также репертуарами реплик образцов крови в точке 24 (p24_R1 и p24_R2), от разнообразия образца сравнения. Точки p24_R1R2 представляют собой результат сравнения репертуаров параллельных образцов точки 24 между собой. Б – состав ста наиболее высокопредставленных клонотипов Т-лимфоцитов в репертуаре точки 24. Синим и голубым отображены клонотипы цитотоксических Т-лимфоцитов (CD8+), красным и оранжевым – клонотипы Т-хелперов (CD4+)

С целью анализа степени обновления репертуара высокочисленных клонов мы проследили присутствие 100 наиболее высокопредставленных клонотипов репертуара точки 24 в репертуарах всех предыдущих точек. В репертуаре до ТГСК у пациентов ash-110 и ash-111 из 100 клонотипов найдены 75 и 92 соответственно (рис. 5Б). Новые, недетектируемые до ТГСК, клонотипы среди «топ 100» составили 24 CD8+ и один CD4+ у пациента ash-110 и шесть CD8+ и два CD4+ у ash-111.

Таким образом, спустя 2 года после ТГСК в клональном репертуаре Т-лимфоцитов пациентов увеличилась доля средне- и высокопредставленных клонотипов и произошло существенное обновление клонального состава низкопредставленных клонотипов Т-клеток. Вместе с тем, основная часть наиболее высокопредставленных клонотипов происходит из исходного репертуара Т-лимфоцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ

Анкилозирующий спондилит, или болезнь Бехтерева, – хроническое системное аутоиммунное заболевание с периодическими стадиями ремиссии и обострения. Специфической терапии АС не существует, а базисная терапия заключается в применении неспецифических нестероидных противовоспалительных препаратов. В последнее время стандартный метод терапии комбинируют с применением моноклональных антител про-

тив TNF α – инфликсимаб (Ремикейд), адалимумаб (Хумира). Однако до 40% пациентов оказываются невосприимчивыми или перестают отвечать на терапию антителами [23]. В случае неэффективности базисной терапии одним из перспективных методов лечения пациентов с прогрессирующим АС может стать аутологичная трансплантация гемопоэтических клеток крови. Вместе с тем, вопросы подбора эффективного протокола ТГСК и общей эффективности такого способа терапии АС остаются открытыми.

Продолжая наши работы [7, 24], мы исследовали динамику клонального репертуара Т-лимфоцитов периферической крови в течение 2 лет после аутологичной ТГСК у двух пациентов с АС. На протяжении всего периода восстановления из тимуса выходят новые наивные Т-лимфоциты, что увеличивает разнообразие репертуара TCR: после существенного снижения на ранних сроках после ТГСК у обоих пациентов к концу первого года разнообразие репертуара TCR достигло половины от начального уровня и продолжало возрастать в течение второго года (рис. 1). Сходную динамику восстановления репертуаров у взрослых пациентов с иными аутоиммунными заболеваниями наблюдали и другие авторы [2, 25]. По нашим наблюдениям скорость восстановления клонального разнообразия у двух пациентов заметно отличалась: спустя 2 года пациент ash-110 обладал практически исходным количеством клонотипов,

в то время как у ash-111 количество клонотипов достигло лишь половины начального уровня.

Молекулярные механизмы, обуславливающие эффективность ТГСК для терапии аутоиммунных заболеваний, на данный момент остаются невыясненными. В нескольких исследованиях показано, что, несмотря на химиотерапию, некоторая часть Т-клеток оставалась в репертуаре после ТГСК, но не оказывала влияния на развитие устойчивой ремиссии основного заболевания в течение 2–5 лет после ТГСК [4–7]. У пациентов, описанных в нашей работе, пережившие ТГСК клоны составили до 25% Т-клеток в репертуаре через 2 года после ТГСК. Большинство переживших ТГСК клонотипов относились к высокопредставленным клонотипам исходного репертуара со средней численностью $> 0.001\%$ (рис. 2). Эти клонотипы могли остаться в организме после курса химиотерапии или произойти из клеток трансплантата, в ходе подготовки которого не проводилось Т-клеточной деплеции. Интересно, что небольшая фракция исходно малочисленных клонотипов также выявлена во всех репертуарах после ТГСК, а некоторые высокопредставленные клонотипы полностью исчезли после трансплантации, т.е. «выживание» клонотипа зависит не только от его численности, но и от функционального состояния Т-клеток. Kanakry и соавт. показали, что регуляторные CD4+CD25+FoxP3+ Т-лимфоциты устойчивы к средним дозам (50–100 мг/кг) циклофосфамида *in vitro* за счет повышенной экспрессии альдегиддегидрогеназы, которая нейтрализует токсическое действие циклофосфамида [26]. Можно предположить, что малочисленные клонотипы, детектируемые после ТГСК в нашем исследовании, представляют субпопуляцию регуляторных Т-лимфоцитов.

Сконцентрировавшись на клонотипах, стабильно попадающих в образцы, мы оценили степень обновления репертуара Т-лимфоцитов в результате ТГСК. В нашей работе около половины клонотипов из «топ 100» первоначального репертуара остались в «топ 100» через 2 года после ТГСК. При этом эффект не зависел от принадлежности клонотипа к CD4+ или CD8+ субпопуляции. Спустя 2 года у обоих пациентов среди «топ 100» обнаружены новые клонотипы, не найденные до ТГСК и представленные по большей части CD8+ Т-лимфоцитами. Еще у одного пациента с АС более старшего возраста (45 лет), которому ТГСК проводили по идентичному протоколу и наблюдали длительную ремиссию (более 5 лет), более трети высокопредставленных до ТГСК клонотипов сохранились среди «топ 100» через 2 года после трансплантации (данные из [7]). Таким образом, у пациентов, репертуары Т-лимфоцитов которых исследованы в настоящей работе, не произошло

глубокой реаранжировки высокопредставленных клонотипов Т-клеток. Восстановление исходной клонональной структуры репертуара может быть связано с выбранным протоколом ТГСК, в рамках которого при подготовке трансплантата не проводилось деплеции зрелых Т-лимфоцитов и обогащения по CD34+ клеткам. Вместе с тем, идентичный протокол ТГСК позволил достичь длительной ремиссии у пациента более старшего возраста. Сходная степень обновления высокопредставленных клонотипов описана у пациентов с рассеянным склерозом (возраст 27–53 года) при использовании другого протокола аутологичной ТГСК с обогащением трансплантата по CD34+ клеткам (около 40% клонотипов Т-лимфоцитов из «топ 1000» CD4+ и CD8+ субпопуляций остались в «топ 1000» соответствующих фракций спустя год после трансплантации) вне зависимости от достижения ремиссии [4]. Таким образом, можно предполагать существенную роль иных факторов в терапевтической эффективности ТГСК.

Одной из субпопуляций Т-лимфоцитов, важная роль которой показана в патогенезе многих аутоиммунных заболеваний (обобщено в [27, 28]), является субпопуляция регуляторных Т-клеток (T_{reg}). В частности, значимость ее обновления для терапевтической эффективности ТГСК недавно была показана при ювенильном идиопатическом артрите и дерматомиозите: длительную ремиссию наблюдали исключительно у тех пациентов, у которых разнообразие клононального репертуара T_{reg} существенно увеличилось после ТГСК [29]. Можно предположить, что отсутствие длительного терапевтического эффекта ТГСК у двух пациентов с АС, наблюдавшихся в нашей работе, связано со слабой реформой репертуара субпопуляции регуляторных Т-лимфоцитов. Дальнейшие исследования, направленные на изучение динамики клононального состава различных субпопуляций Т-лимфоцитов в сочетании с различными протоколами ТГСК, проведенные на репрезентативной выборке больных АС, позволят уточнить эффективность аутологичной ТГСК как метода терапии тяжелых форм АС.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

ТГСК все чаще применяется для лечения пациентов с тяжелым течением аутоиммунных заболеваний, не отвечающих на стандартную терапию. С помощью широкомасштабного секвенирования с использованием молекулярного баркодирования мы смогли определить количественную представленность клонотипов Т-клеток периферической крови и впервые проследить динамику восстановления клононального репертуара Т-лимфоцитов на протяжении 2 лет по-

сле аутологичной ТГСК у двух пациентов с анкилозирующим спондилитом. Восстановление разнообразия репертуара Т-клеток у пациентов с АС заняло больше года, что согласуется с динамикой восстановления репертуара у взрослых пациентов, описываемой другими авторами. При этом спустя 2 года после ТГСК до 25% клеток в репертуаре обследованных пациентов оказались представлены клонотипами из репертуара до трансплантации. Нам удалось показать, что практически все высокопредставленные и небольшая фракция низкопредставленных клонотипов первоначального репертуара пережили ТГСК.

Результаты нашей работы существенно расширяют данные о функционировании иммунной системы при ТГСК и могут быть использованы для оптимизации и разработки новых эффективных протоколов аутологичной ТГСК, применяемой для терапии тяжелых форм АС. ●

*Работа поддержана РФФИ
(гранты № 16-04-01881 и 17-04-01568)
и стипендией Президента РФ для Е.А. Комеч
(№ СП-1264.2016.4).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sieper J., Poddubnyy D. // *Nat. Rev. Rheumatol.* 2016. V. 12. № 5. P. 282–295.
2. Farge D., Arruda L.C.M., Brigant F., Clave E., Douay C., Marjanovic Z., Deligny C., Maki G., Gluckman E., Toubert A., et al. // *J. Hematol. Oncol.* 2017. V. 10. № 1. P. 21.
3. Leone A., Radin M., Almarzooqi A.M., Al-Saleh J., Roccatello D., Sciascia S., Khamashta M. // *Autoimmun. Rev.* 2017. V. 16. № 5. P. 469–477.
4. Muraro P.A., Robins H., Malhotra S., Howell M., Phippard D., Desmarais C., de Paula Alves Sousa A., Griffith L.M., Lim N., Nash R.A., et al. // *J. Clin. Inv.* 2014. V. 124. № 3. P. 1168–1172.
5. Wu Q., Pesenacker A.M., Stansfield A., King D., Barge D., Foster H.E., Abinun M., Wedderburn L.R. // *Immunology.* 2014. V. 142. № 2. P. 227–236.
6. van Heijst J.W.J., Ceberio I., Lipuma L.B., Samilo D.W., Wasilewski G.D., Gonzales A.M.R., Nieves J.L., van den Brink M.R.M., Perales M.A., Pamer E.G., et al. // *Nat. Med.* 2013. V. 19. № 3. P. 372–377.
7. Britanova O.V., Bochkova A.G., Staroverov D.B., Fedorenko D.A., Bolotin D.A., Mamedov I.Z., Turchaninova M.A., Putintseva E.V., Kotlobay A.A., Lukyanov S.A., et al. // *Bone Marrow Transplant.* 2012. P. 1–3.
8. Mamedov I.Z., Britanova O.V., Chkalina A.V., Staroverov D.B., Amosova A.L., Mishin A.S., Kurnikova M.A., Zvyagin I.V., Mutovina Z.Y., Gordeev A.V., et al. // *Autoimmunity.* 2009. V. 42. № 6. P. 525–536.
9. van der Linden S., Valkenburg H.A., Cats A. // *Arthritis Rheum.* 1984. V. 27. № 4. P. 361–368.
10. Zvyagin I.V., Mamedov I.Z., Tatarinova O.V., Komech E.A., Kurnikova E.E., Boyakova E.V., Brilliantova V., Shelikhova L.N., Balashov D.N., Shugay M., et al. // *Leukemia.* 2017. V. 31. № 5. P. 1145–1153.
11. Shugay M., Britanova O.V., Merzlyak E.M., Turchaninova M.A., Mamedov I.Z., Tuganbaev T.R., Bolotin D.A., Staroverov D.B., Putintseva E.V., Plevova K., et al. // *Nat. Methods.* 2014. V. 11. № 6. P. 653–655.
12. Bolotin D.A., Shugay M., Mamedov I.Z., Putintseva E.V., Turchaninova M.A., Zvyagin I.V., Britanova O.V., Chudakov D.M. // *Nat. Methods.* 2013. V. 10. № 9. P. 813–814.
13. Egorov E.S., Merzlyak E.M., Shelenkov A.A., Britanova O.V., Sharonov G.V., Staroverov D.B., Bolotin D.A., Davydov A.N., Barsova E., Lebedev Y.B., et al. // *J. Immunol.* 2015. V. 194. № 12. P. 6155–6163.
14. R Core Team // *R Foundation for Statistical Computing.* Vienna, Austria. 2015.
15. Nazarov V.I., Pogorelyy M.V., Komech E.A., Zvyagin I.V., Bolotin D.A., Shugay M., Chudakov D.M., Lebedev Y.B., Mamedov I.Z. // *BMC Bioinformatics.* 2015. V. 16. № 1. P. 175.
16. Hughes J.B., Hellmann J.J., Ricketts T.H., Bohannon B.J. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2001. V. 67. № 10. P. 4399–4406.
17. Hou X.-L., Wang L., Ding Y.-L., Xie Q., Diao H.-Y. // *Genes Immun.* 2016. V. 17. № 3. P. 153–164.
18. Kivioja T., Vähärautio A., Karlsson K., Bonke M., Enge M., Linnarsson S., Taipale J. // *Nat. Methods.* 2011. V. 9. № 1. P. 72–74.
19. Mamedov I.Z., Britanova O.V., Zvyagin I.V., Turchaninova M.A., Bolotin D.A., Putintseva E.V., Lebedev Y.B., Chudakov D.M. // *Front. Immunol.* 2013. V. 4. P. 456.
20. Britanova O.V., Shugay M., Merzlyak E.M., Staroverov D.B., Putintseva E.V., Turchaninova M.A., Mamedov I.Z., Pogorelyy M.V., Bolotin D.A., Izraelson M., et al. // *J. Immunol.* 2016. V. 196. № 12. P. 5005–5013.
21. Britanova O.V., Putintseva E.V., Shugay M., Merzlyak E.M., Turchaninova M.A., Staroverov D.B., Bolotin D.A., Lukyanov S., Bogdanova E.A., Mamedov I.Z., et al. // *J. Immunol.* 2014. V. 192. № 6. P. 2689–2698.
22. Komech E.A., Pogorelyy M.V., Egorov E.S., Britanova O.V., Rebrikov D.V., Bochkova A.G., Schmidt E.I., Shostak N.A., Shugay M., Lukyanov S., et al. // *Rheumatology (Oxford).* 2018. <https://doi.org/10.1093/rheumatology/kex517>
23. Deodhar A., Yu D. // *Semin. Arthritis Rheum.* 2017. V. 47. № 3. P. 343–350.
24. Mamedov I.Z., Britanova O.V., Bolotin D.A., Chkalina A.V., Staroverov D.B., Zvyagin I. V., Kotlobay A.A., Turchaninova M.A., Fedorenko D.A., Novik A.A., et al. // *EMBO Mol. Med.* 2011. V. 3. № 4. P. 201–207.
25. Swart J.F., Delemarre E.M., van Wijk F., Boelens J.-J., Kuball J., van Laar J.M., Wulfraat N.M. // *Nat. Rev. Rheumatol.* 2017. V. 13. № 4. P. 244–256.
26. Kanakry C.G., Ganguly S., Luznik L. // *Oncoimmunology.* 2015. V. 4. № 3. P. e974393.
27. van Wijk F., Roord S.T., Vastert B., de Kleer I., Wulfraat N., Prakken B.J. // *Autoimmunity.* 2008. V. 41. № 8. P. 585–591.
28. Grant C.R., Liberal R., Mieli-Vergani G., Vergani D., Longhi M.S. // *Autoimmun. Rev.* 2015. V. 14. № 2. P. 105–116.
29. Delemarre E.M., van den Broek T., Mijnheer G., Meerding J., Wehrens E.J., Olek S., Boes M., van Herwijnen M.J.C., Broere F., van Royen A., et al. // *Blood.* 2016. V. 127. № 1. P. 91–101.

УДК 577.21

1-(4-Феноксibenзил)-производные 5-аминоурацила и их аналоги – новые ингибиторы репликации аденовирусов человека

Н. А. Никитенко^{1*}, Е. С. Гуреева², А. А. Озеров², А. И. Тухватулин¹, Ф. М. Ижаева¹, В. С. Прасолов³, П. Г. Дерябин¹, М. С. Новиков², Д. Ю. Логунов¹

¹Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф. Гамалеи, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

²Волгоградский государственный медицинский университет, 400131, Волгоград, пл. Павших Борцов, 1

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

*E-mail: nanthalia@gmail.com

Поступила в редакцию 11.10.2017

Принята к печати 26.04.2018

РЕФЕРАТ Отсутствие эффективных способов лечения широко распространенных аденовирусных инфекций делает необходимой разработку новых терапевтических средств. Нами изучено ингибиторное действие новых производных 5-аминоурацила в отношении аденовирусов человека. Выявлена противоаденовирусная активность [4-(фенокси)бензил]-5-(фениламино)-6-азаурацила, 1-[4-(фенокси)бензил]-5-(морфолино)урацила, 1-[4-(4-хлорфенокси)бензил]-5-(морфолино)урацила и 1-[4-(4-фторфенокси)бензил]-5-(морфолино)урацила.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аденовирусы человека, аденовирусная инфекция, ингибиторы репликации аденовирусов, производные 5-аминоурацила, репликация аденовирусов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ HAdV – аденовирус человека; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ГМДС – гексаметилдисульфид.

ВВЕДЕНИЕ

Аденовирусы человека (HAdV) – безоболочечные вирусы, геном которых представлен линейной несегментированной двухцепочечной ДНК [1]. Аденовирусные инфекции, которым подвержены люди всех возрастных групп, характеризуются широким распространением и высокой контагиозностью. Аденовирусы человека чаще всего поражают слизистые оболочки дыхательных путей [2, 3], глаз [4], желудочно-кишечного тракта [5] и мочеполовой системы [6]. Наибольшую опасность аденовирусные инфекции представляют для пациентов с нарушениями иммунной системы (реципиентов трансплантатов гемопоэтических стволовых клеток, ВИЧ-инфицированных и др.) [7, 8], у которых аденовирусы могут вызывать развитие острых инфекционных заболеваний, приводящих к летальному исходу [9].

Селективные химиотерапевтические средства, высокоэффективные при аденовирусных инфекциях, в настоящее время отсутствуют [10]. Как правило, используют противовирусные средства широкого

спектра действия, такие, как интерферон или индукторы интерферона и препараты на основе кортикостероидов [11]. Однако лекарственные средства, относящиеся к группе индукторов интерферона, недостаточно эффективны из-за нечувствительности аденовирусов к интерферону. Невысокой активностью обладают и производные ацикло-нуклеотидов, например цидофовира – (S)-1-(3-гидрокси-2-фосфонилметоксипропил)цитозин [12], применение которого ограничивает высокая нефротоксичность [13]. Таким образом, актуальным остается поиск нетоксичных химиопрепаратов, эффективных при аденовирусных инфекциях.

Цель представленной работы состояла в изучении ингибиторных свойств новых 5-аминопроизводных урацила [14] в отношении аденовирусов человека. В результате анализа взаимосвязи структуры и биологической активности производных урацила, изученных ранее [15], были сконструированы и синтезированы новые производные 5-аминоурацила, предположительно являющиеся ингибиторами ДНК-

содержащих вирусов. Показано, что эти соединения с высокой эффективностью подавляют репликацию аденовирусов человека *in vitro*. Кроме того, изучена зависимость противоаденовирусного действия от наличия различных заместителей в структуре соединения. Так, определена ключевая роль ароматического фрагмента в выраженности ингибиторной активности исследованных соединений. Таким образом, выявлен новый тип ингибиторов репликации аденовирусов человека. Полученные данные могут послужить основой для исследований в области разработки новых средств противовирусной терапии *in vivo*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Спектры ЯМР ^1H и ^{13}C регистрировали на спектрометре Bruker Avance 400 (Bruker, Германия) (400 МГц для ^1H и 100 МГц для ^{13}C) в ДМСО- D_6 , внутренний стандарт тетраметилсилан. Тонкослойную хроматографию выполняли на пластинах TLS Silica gel 60 F₂₅₄ (Merck, Германия), используя в качестве элюента этилацетат. Пластины проявляли с помощью УФ-лампы VL-6.LC (Vilber, Франция). Температуры плавления измеряли в стеклянных капиллярах на приборе Mel-Temp 3.0 (Laboratory Devices Inc., США).

Исходные 5-(фениламино)урацилы и -6-азаурацилы синтезировали согласно [16], 5-(морфолино)урацил – в соответствии с [17], 4-(фенокси)бензилбромиды получены путем бромирования исходных 4-(фенокси)толуолов молекулярным бромом при облучении светом в кипящем хлороформе в соответствии с [14]. Синтез исходных 1-[ω -(фенокси)алкил]-5-бромурацилов осуществляли путем конденсации эквимольных количеств 2,4-бис(триметилсилилокси)-5-бромпиримидина и 1-бром- ω -(фенокси)алкана при нагревании до 160–170°C в течение 1 ч согласно [18].

Общий метод получения 1-[4-(фенокси)бензил]-5-амино-производных 6-азаурацила (1), (2) и урацила (соединения (3)–(5))

Суспензию 4.90 ммоль 5-амино-6-азаурацила или 5-аминоурацила и 0.1 г (1.87 ммоль) NH_4Cl в 30 мл гексаметилдисилазана (ГМДС) кипятили в течение 12 ч до образования прозрачного раствора. Избыток ГМДС удаляли при пониженном давлении, остаток растворяли в 50 мл безводного 1,2-дихлорэтана, добавляли 4.94 ммоль 4-(фенокси)бензилбромида, после чего полученную смесь кипятили с защитой от влаги воздуха в течение 24 ч. Реакционную массу охлаждали до комнатной температуры, обрабатывали 10 мл изопропилового спирта, упаривали при пониженном давлении, остаток чистили флэш-хроматографией, элюируя смесью хлороформ–метанол (10 : 1).

Фракции, содержащие продукт, объединяли и упаривали досуха при пониженном давлении. Твердый остаток перекристаллизовывали из смеси этилацетат–гексан (2 : 1).

1-[4-(Фенокси)бензил]-5-(фениламино)-6-азаурацил (1). Выход 67%, $T_{\text{пл}}$ 264–266°C, R_f 0.76 (этилацетат). ^1H -ЯМР (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 4.95 (2H, с, CH_2); 6.89–7.03 (5H, м, H-2', H-3', H-4', H-5', H-6'); 7.10 (1H, т, $J = 7.1$ Гц, H-4''); 7.22 (2H, т, $J = 7.6$ Гц, H-3'', H-5''); 7.33 (2H, т, $J = 7.7$ Гц, H-3'', H-5''); 7.38 (2H, д, $J = 8.2$ Гц, H-2'', H-6''); 7.61 (2H, д, $J = 7.8$ Гц, H-2'', H-6''); 8.33 (1H, с, N^3H); ^{13}C -ЯМР (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 52.7; 119.0; 119.1; 119.3; 122.4; 123.9; 128.9; 130.3; 130.4; 132.5; 139.8; 140.0; 148.0; 154.7; 156.8; 157.3.

1-[4-(Фенокси)бензил]-5-[[3,5-дихлорфенил]амино]-6-азаурацил (2). Выход 56%, $T_{\text{пл}}$ 224.5–226°C, R_f 0.78 (этилацетат). ^1H -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 4.95 (2H, с, CH_2); 6.93–6.98 (4H, м, H-2'', H-4'', H-6'', NH); 7.10 (1H, т, $J = 6.9$ Гц, H-4'); 7.22 (2H, т, $J = 7.6$ Гц, H-3', H-5'); 7.33 (2H, д, $J = 7.5$ Гц, H-2', H-6'); 7.39 (2H, д, $J = 8.2$ Гц, H-3'', H-5''); 7.61 (2H, д, $J = 7.8$ Гц, H-2'', H-6''); 8.33 (1H, с, N^3H); ^{13}C -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 31.1; 36.1; 40.3; 51.9; 116.9; 118.9; 120.9; 123.8; 130.3; 130.5; 132.0; 134.2; 139.6; 142.1; 147.9; 154.3.

1-[4-(Фенокси)бензил]-5-(морфолино)урацил (3). Выход 68%, $T_{\text{пл}}$ 182–184°C, R_f 0.41 (этилацетат). ^1H -ЯМР (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 2.82 (4H, с, $2 \times \text{CH}_2$); 3.64 (4H, т, $J = 4.4$ Гц, $2 \times \text{CH}_2$); 4.82 (2H, с, CH_2); 6.96 (2H, д, $J = 8.3$ Гц, H-2', H-6'); 6.98 (2H, д, $J = 8.0$ Гц, H-3'', H-5''); 7.13 (1H, т, $J = 8.0$ Гц, H-4'); 7.18 (1H, с, H-6); 7.32–7.36 (4H, м, H-3', H-5', H-2'', H-6''); 11.37 (1H, с, N^3H). ^{13}C -ЯМР (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 40.3; 50.2; 50.4; 66.3; 118.9; 119.0; 123.9; 127.2; 129.7; 130.2; 130.4; 132.3; 150.1; 156.5; 156.8; 161.2.

1-[4-(4-Хлорфенокси)бензил]-5-(морфолино)урацил (4). Выход 81%, $T_{\text{пл}}$ 204–206°C, R_f 0.32 (этилацетат). ^1H -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 2.82 (4H, с, $2 \times \text{CH}_2$); 3.64 (4H, с, $2 \times \text{CH}_2$); 4.80 (2H, с, CH_2); 6.80 (2H, д, $J = 7.6$ Гц, H-2', H-6'); 7.12 (2H, д, $J = 7.4$ Гц, H-3', H-5'); 7.39 (2H, д, $J = 8.2$ Гц, H-3'', H-5''); 7.61 (2H, д, $J = 7.8$ Гц, H-2'', H-6''); 7.70 (1H, с, H-6); 11.42 (1H, с, N^3H). ^{13}C -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 50.1; 50.5; 67.0; 118.8; 121.1; 122.5; 123.2; 124.5; 134.0; 134.1; 138.5; 149.8; 154.2; 160.1; 164.2.

1-[4-(4-Фторфенокси)бензил]-5-(морфолино)урацил (5). Выход 74%, $T_{\text{пл}}$ 220–222°C, R_f 0.34 (этилацетат). ^1H -ЯМР-спектр (ДМСО- D_6), δ , м.д.: 2.85 (4H, с, $2 \times \text{CH}_2$); 3.66 (4H, с, $2 \times \text{CH}_2$); 4.79 (2H, с, CH_2); 6.79 (2H, д, $J = 7.9$ Гц, H-2', H-6'); 7.11 (2H, д, $J = 7.4$ Гц,

H-3', H-5'); 7.36 (2H, д, $J = 8.2$ Гц, H-3'', H-5''); 7.60 (2H, д, $J = 7.9$ Гц, H-2'', H-6''); 7.69 (1H, с, H-6); 11.47 (1H, с, N³H). ¹³C-ЯМР-спектр (DMCO-D₆), δ, м.д.: 50.2; 50.6; 67.0; 118.8; 121.1; 122.5; 123.2; 124.5; 134.0; 134.1; 138.5; 149.8; 154.0; 154.2; 158.8; 160.1; 164.2.

Общий метод получения 1-[ω-(фенокс)алкил]-5-(морфолино)урацила (соединения (6)–(8))

Смесь 4.61 ммоль 5-бром-1-[ω-(фенокс)алкил]урацила и 1 мл (11.56 ммоль) морфолина кипятили в растворе 50 мл безводного этиленгликоля в течение 2 ч, охлаждали до комнатной температуры, добавляли к 250 мл холодной воды и оставляли на ночь при температуре 4°C. Образовавшийся осадок отфильтровывали и перекристаллизовывали из смеси этилацетат–гексан (3 : 1).

1-[3-(Фенокс)пропил]-5-(морфолино)урацил (6). Выход 66%, $T_{\text{пл}}$ 169–170°C, R_f 0.31 (этилацетат). ¹H-ЯМР-спектр (DMCO-D₆), δ, м.д.: 2.04 (2H, кв, $J = 6.3$ Гц, CH₂); 3.77 (2H, т, $J = 6.0$ Гц, NCH₂); 3.87 (2H, т, $J = 5.7$ Гц, CH₂); 2.82 (4H, с, 2 × CH₂); 3.69 (4H, с, 2 × CH₂); 6.82–6.86 (3H, м, H-2', H-4', H-6'); 7.19 (2H, т, $J = 8.0$ Гц, H-3', H-5'); 7.63 (1H, с, H-6); 11.37 (1H, с, N³H). ¹³C-ЯМР-спектр (DMCO-D₆), δ, м.д.: 28.0; 45.4; 50.1; 50.5; 64.6; 100.9; 112.2; 122.3; 138.6; 145.8; 151.0; 158.4; 163.9.

1-[4-(Фенокс)бутил]-5-(морфолино)урацил (7). Выход 78%, $T_{\text{пл}}$ 156–159°C, R_f 0.65 (этилацетат). ¹H-ЯМР-спектр (DMCO-D₆), δ, м.д.: 1.64 (4H, с, CH₂); 3.67 (2H, т, $J = 6.2$ Гц, CH₂); 3.89 (2H, т, $J = 6.2$ Гц, CH₂); 2.85 (4H, с, 2 × CH₂); 3.66 (4H, с, 2 × CH₂); 6.79–6.83 (3H, м, H-2', H-4', H-6'); 7.13 (2H, т, $J = 8.1$ Гц, H-3', H-5'); 7.64 (1H, с, H-6); 11.41 (1H, с, N³H). ¹³C-ЯМР-спектр (DMCO-D₆), δ, м.д.: 25.3; 25.7; 47.3; 50.4; 51.0; 66.8; 100.9; 114.4; 120.5; 129.5; 145.7; 151.0; 158.6; 165.8.

1-[5-(Фенокс)пентил]-5-(морфолино)урацил (8). Выход 71%, $T_{\text{пл}}$ 162–163.5°C, R_f 0.78 (этилацетат). ¹H-ЯМР-спектр (DMCO-D₆), δ, м.д.: 1.39 (2H, кв, $J = 5.3$ Гц, CH₂); 1.63 (2H, кв, $J = 7.2$ Гц, CH₂); 1.72 (2H, кв, $J = 7.2$ Гц, CH₂); 3.67 (2H, т, $J = 7.2$ Гц, CH₂); 3.93 (2H, т, $J = 6.5$ Гц, CH₂); 2.88 (4H, с, 2 × CH₂); 3.67 (4H, с, 2 × CH₂); 6.83–6.88 (3H, м, H-2', H-4', H-6'); 7.22 (2H, т, $J = 8.0$ Гц, H-3', H-5'); 7.55 (1H, с, H-6); 11.29 (1H, с, N³H). ¹³C-ЯМР-спектр (DMCO-D₆), δ, м.д.: 22.9; 28.6; 28.7; 47.8; 50.5; 51.0; 67.5; 101.2; 114.8; 120.8; 129.9; 146.2; 151.4; 159.0; 164.3.

Вирусы

В работе использовали рекомбинантный аденовирус человека типа 5, экспрессирующий усиленный зеленый флуоресцентный белок (HAdV5-eGFP) [19, 20].

Культура клеток

В работе использовали перевиваемые клетки эмбриона почки человека HEK293 [21]. Клетки линии HEK293 культивировали на среде DMEM (Life Technologies, Великобритания), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (Life Technologies, Великобритания), 4 mM L-глутамина, 1 mM пирувата натрия, стрептомицин/пенициллин в концентрации 100 мкг/мл и 100 ед./мл соответственно при температуре 37°C в атмосфере 5% CO₂.

Тест МТТ

Клетки линии HEK293 инкубировали в отсутствие (контроль) или в присутствии различных концентраций исследуемых соединений. Через 24–72 ч к клеткам добавляли 3-[4,5-диметилтиазолил-2-ел]-2,5-дифенилтетразолийбромид (МТТ); итоговая концентрация МТТ составляла 0.5 мг/мл. После 2 ч экспозиции при 37°C живые клетки восстанавливали желтый МТТ до темно-фиолетовых гранул формазана. Культуральную среду убирали. Гранулы формазана растворяли в ДМСО, количество восстановленного продукта измеряли фотометрически на мультифункциональном планшетном ридере Synergy 2 Multi-Mode Reader (BioTek Instruments, США) при длинах волн 540 и 630 нм [22].

Резазуриновый метод

Клетки линии HEK293 инкубировали в отсутствие (контроль) или в присутствии различных концентраций исследуемых соединений. Через 24–72 ч к клеткам добавляли краситель резазурин (Sigma, США), который восстанавливается митохондриальными дегидрогеназами живых клеток до флуоресцирующего продукта резаруфина (при длинах волн возбуждения и эмиссии 530 и 590 нм). Интенсивность флуоресценции регистрировали на мультифункциональном планшетном ридере Synergy 2 Multi-Mode Reader (BioTek Instruments, США).

Определение количества копий генома аденовируса человека

Для оценки репликации HAdV5-eGFP через 24 ч после инфекции клетки собирали, выделяли суммарную ДНК с помощью набора QIAamp DNA Mini Kit (QIAGEN, Германия) согласно рекомендациям производителя. Количественную ПЦР проводили согласно [23] на приборе CFX96™ Real-Time PCR Detection System (Bio-Rad, США) с использованием реагента iTaq™ Universal Probes Supermix (Bio-Rad, США).

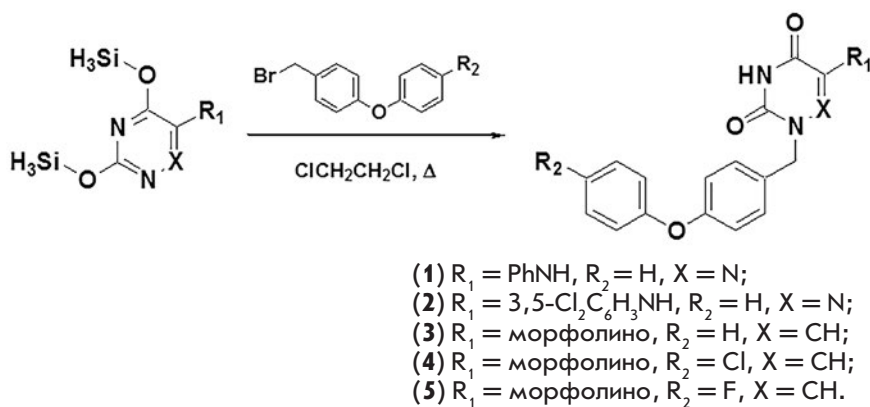


Рис. 1. Схема синтеза 1-[4-(фенокси)бензил]-производных 5-(фениламино)-6-азаурацила (1), 5-[(3,5-дихлорфенил)амино]-6-азаурацила (2), а также 1-[4-(фенокси)бензил]- (3), 1-[4-(4-хлорфенокси)бензил]- (4) и 1-[4-(4-фторфенокси)бензил]-производных 5-(морфолино)урацила (5)

Определение инфекционности аденовирусного потомства

Клетки линии HEK293 заражали HAdV5-eGFP с множественностью инфекции 1 и 10 БОЕ/клетку. Через 3 ч после инфекции добавляли растворы соединений (1) и (3) (примеры 1 и 3 соответственно) в ДМСО в концентрации 25 мкМ. В качестве контроля использовали ДМСО, конечная концентрация которого в культуральной среде не превышала 0.1%. Через 48 ч культуральную среду собирали в микропробирки и замораживали при температуре -70°C . С целью разрушения клеток вирусосодержащую среду размораживали при комнатной температуре и снова замораживали при -70°C . После повторного размораживания аликвоты 10-кратных разведений вирусосодержащих стоков добавляли к клеткам линии HEK293.

Статистическая обработка данных

Все данные представлены в виде средних значений \pm стандартное отклонение (СО). Статистическую значимость определяли с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 6 (GraphPad Software, США). Значение $p < 0.05$ считали статистически значимым.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Синтез соединений

Наиболее близкими по химическому строению к синтезированным соединениям являются 1-бензил-5-(ариламино)-производные урацила [15]. Эти соединения проявляют активность в отношении вируса иммунодефицита человека типа 1 (ВИЧ-1) и вируса Эпштейна–Барр. Это позволило нам предположить, что производные 5-аминоурацила и 5-амино-6-азаурацила, содержащие заместитель у N^1 и являющиеся аналогами описанных соединений, могут проявлять ингибиторную активность в отношении ДНК-содержащих вирусов, в частности аденовирусов.

Синтез 1-[4-(фенокси)бензил]-производных 5-(фениламино)-6-азаурацила (1), 5-[(3,5-дихлорфенил)амино]-6-азаурацила (2), а также 1-[4-(фенокси)бензил]- (3), 1-[4-(4-хлорфенокси)бензил]- (4) и 1-[4-(4-фторфенокси)бензил]-производных 5-(морфолино)урацила (5) был осуществлен путем конденсации 6-амино-3,5-бис(триметилсилилокси)-1,2,4-триазина или 2,4-бис(триметилсилилокси)-5-(морфолино)пиримидина с эквимолярным количеством соответствующих 4-(фенокси)бензилбромидов при кипячении в растворе безводного 1,2-дихлорэтана в соответствии с ранее описанным методом [24]. При этом выход соединений (1)–(5) составил 56–81% (рис. 1).

С целью изучения закономерности структура–противовирусная активность нами были синтезированы аналоги 5-(морфолино)-производного (3), у которых 4-(фенокси)бензильный фрагмент у N^1 был заменен на ω -(фенокси)алкильный заместитель. Синтез соединений данной группы осуществлен путем аминирования морфолином 5-бром-1-[ω -(фенокси)алкил]урацила при кипячении в растворе этиленгликоля в соответствии с ранее описанным методом [15]. Выход целевых 5-(морфолино)-производных урацила (6)–(8) составил 66–78% (рис. 2).

Цитотоксичность исследуемых соединений

Цитотоксичность соединений оценивали с помощью прижизненного окрашивания клеток линии HEK293

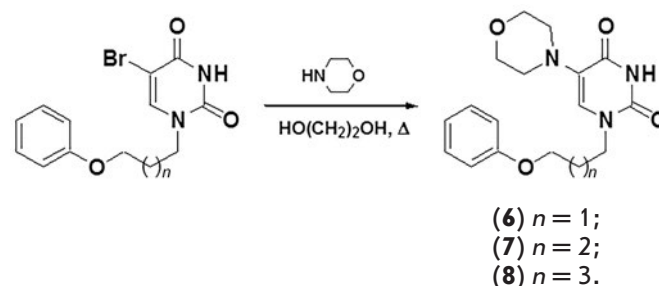


Рис. 2. Схема синтеза 5-(морфолино)-производных урацила (6)–(8)

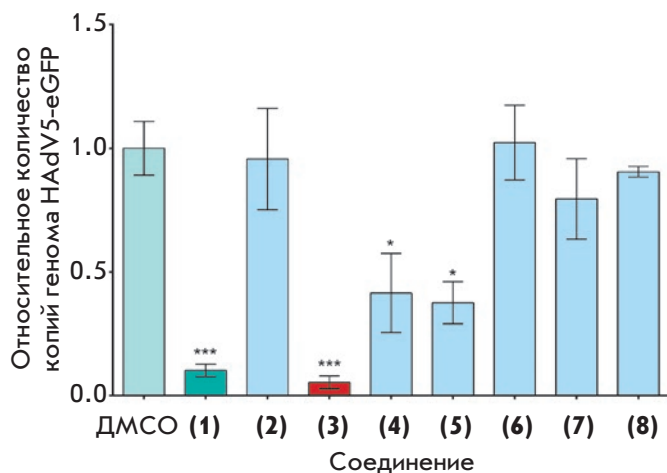


Рис. 3. Оценка относительного количества копий генома HAdV5-eGFP в клетках HEK293 в присутствии исследуемых соединений (25 мкМ). Различия между опытными и контрольными образцами статистически значимы при * $p < 0.05$; *** $p < 0.001$

МТТ или трипановым синим [25]. К клеткам добавляли исследуемые соединения, растворенные в диметилсульфоксиде, в диапазоне концентраций 2.5–200 мкМ. Контролем служили клетки, к которым вместо исследуемых соединений добавляли соответствующее количество ДМСО.

Прижизненное окрашивание клеток HEK293 МТТ проводили через 48 ч после внесения веществ. Токсичность различных доз препарата определяли по жизнеспособности клеток относительно контроля. Все соединения в концентрациях до 25 мкМ не оказывали токсического действия на клетки HEK293. Кроме того, была определена концентрация соединений, проявляющих ингибиторную активность в отношении аденовирусов человека, при которой количество живых клеток сокращается на 50% (TC_{50}). С этой целью подсчитывали клетки, селективно окрашенные трипановым синим, через 48 ч после добавления соединений. Результаты представлены в *табл. 1*.

Исследование противоаденовирусной активности 5-аминопроизводных урацила

В ходе оценки противоаденовирусной активности 5-аминопроизводных урацила клетки линии HEK293 заражали рекомбинантным аденовирусом человека типа 5, экспрессирующим усиленный зеленый флуоресцентный белок HAdV5-eGFP с множественностью инфекции 1 БОЕ/клетку. Через 3 ч после инфекции добавляли исследуемые соединения в концентрации 25 мкМ: этого времени достаточно для завершения начальной стадии инфекционного цикла аденовиру-

Таблица 1. Противоаденовирусная активность производных 5-аминоурацила

Соединение	IC_{50} , мкМ ^а	TC_{50} , мкМ ^б	SI ^в
(1)	9.2	53.6	5.8
(3)	0.5	47.6	95
(4)	8.7	103.1	11.9
(5)	13.1	64.8	4.9

^аКонцентрация полумаксимального ингибирования, при которой наблюдается снижение относительного количества копий генома HAdV5-eGFP на 50% по сравнению с контролем.

^бКонцентрация, при которой количество живых клеток сокращается на 50%.

^вОтношение TC_{50} соединения к его IC_{50} .

са человека (взаимодействия вируса с рецепторами клеточной поверхности и проникновения в клетку). В качестве отрицательного контроля использовали ДМСО. Концентрация ДМСО во всех образцах не превышала 0.1%. Через 24 ч ингибиторную активность соединений оценивали по количеству копий генома HAdV5-eGFP методом количественной ПЦР [23]. Показано, что соединения (1), (3), (4) и (5) проявляют выраженную ингибиторную активность в отношении репликации HAdV5-eGFP (*рис. 3*).

Для соединений (1), (3), (4) и (5), обладающих ингибиторной активностью в отношении аденовирусов человека, была определена концентрация полумаксимального ингибирования (IC_{50}), при которой наблюдается снижение относительного количества копий генома HAdV5-eGFP на 50% по сравнению с контролем. Клетки линии HEK293 заражали HAdV5-eGFP с множественностью инфекции 1 БОЕ/клетку. Через 3 ч после инфекции добавляли исследуемые соединения в концентрации 0.5, 2.5, 5, 10, 15 и 25 мкМ. Концентрация ДМСО во всех образцах не превышала 0.1%. Через 24 ч ингибиторную активность соединений оценивали по количеству копий генома HAdV5-eGFP, которое определяли с помощью количественной ПЦР (*рис. 4*). Индекс селективности (SI) рассчитывали как отношение TC_{50} соединения к его IC_{50} (*табл. 1*). На основании количественных показателей ингибирования можно судить об эффективности противовирусного действия ряда соединений, т.е. о степени подавления репликации HAdV5-eGFP в культуре клеток HEK293.

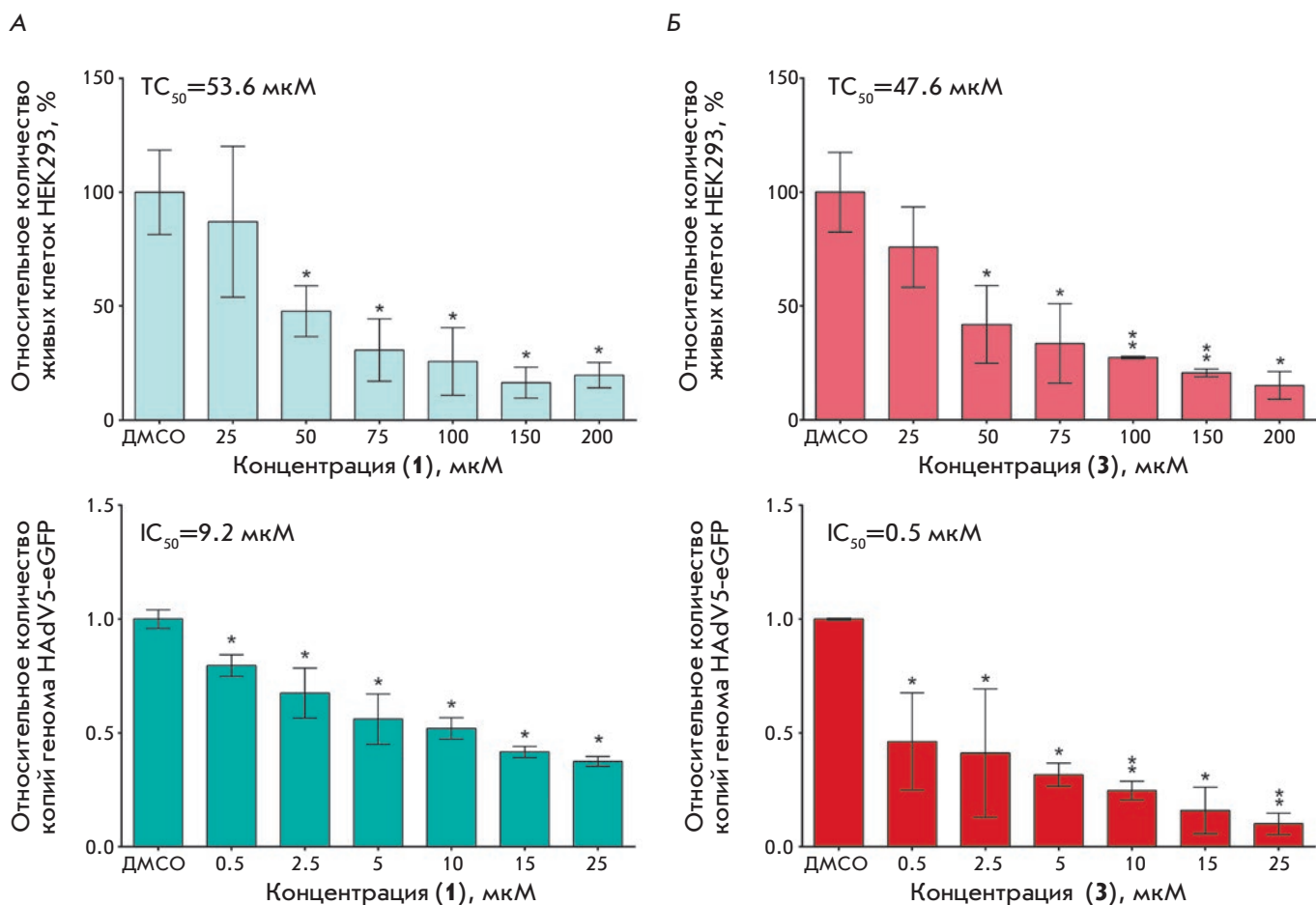


Рис. 4. Противoadеновирусная активность производных 5-аминоурацила. TC_{50} и IC_{50} соединений (1) (А) и (3) (Б). Различия между опытными и контрольными образцами статистически значимы при * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$

Обнаружено, что наибольший противовирусный эффект проявляет 5-(морфолино)-производное (3), IC_{50} которого составила 0.5 мкМ, а $SI = 95$. Производные 6-азаурацила оказались либо на порядок менее активны (соединение (1)), либо вообще не проявляли ингибиторных свойств (соединение (2)). Также показано, что введение атома хлора (соединение (4)) или атома фтора (соединение (5)) в *para*-положение 4-(фенокси)бензильного фрагмента существенно понижает ингибиторную активность. В то же время замена бензила в 4-(фенокси)бензильном фрагменте на алифатическую цепь привела к получению соединений (6)–(8), у которых полностью отсутствует противoadеновирусное действие. Данный факт свидетельствует о высокой значимости ароматического фрагмента в обеспечении противовирусных свойств исследованного ряда соединений.

Кроме того, было оценено влияние наиболее эффективных производных 5-аминоурацила – соединений (1) и (3), на инфекционность аденовирусного

Таблица 2. Титр потомства HAdV5-eGFP в клетках линии HEK293

Множественность инфекции	Соединение		
	DMCO	(1)	(3)
MOI 1	1×10^4	5.1×10^3	2.3×10^3
MOI 10	2.7×10^6	1.7×10^5	3.7×10^5

потомства HAdV5-eGFP. Наблюдали снижение титра вирусного потомства под воздействием указанных веществ (табл. 2).

На основании приведенных данных можно предположить, что механизм действия соединений исследуемого класса связан с ингибированием ключевых факторов репликации аденовирусов человека, таких,

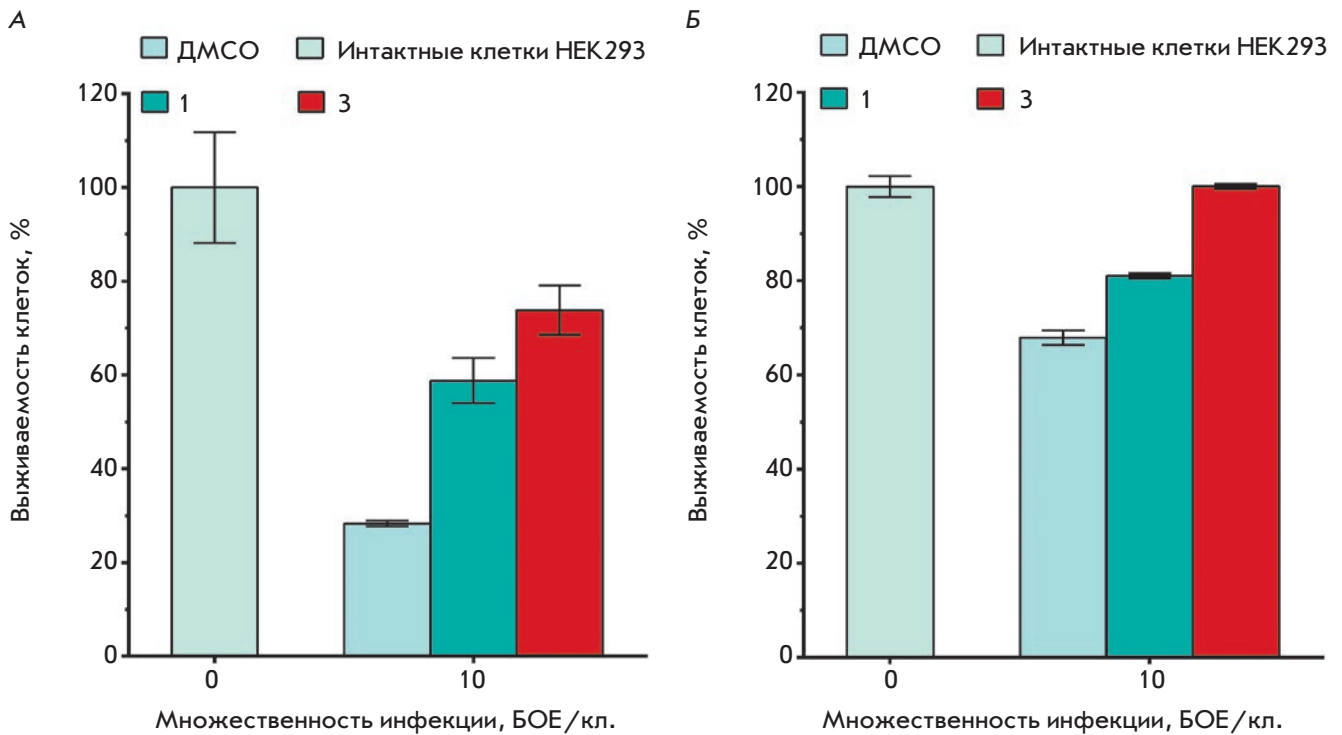


Рис. 5. Выживаемость клеток линии HEK293, инфицированных HAdV5-eGFP, в присутствии 5-аминопроизводных урацила (1) и (3). А – данные, полученные с помощью МТТ-теста. Величина оптической плотности в контрольном образце интактных клеток линии HEK293 принята за 100%. Все данные получены в ходе трех независимых экспериментов. Различия между опытными и контрольными образцами статистически значимы во всех случаях ($p < 0.05$). Б – данные, полученные резазуриновым методом. Интенсивность флуоресценции в контрольном образце интактных клеток линии HEK293 принята за 100%. Все данные получены в ходе трех независимых экспериментов. Различия между образцами группы «ДМСО» и остальными образцами статистически значимы во всех случаях ($p < 0.05$). Статистически значимые различия между образцами интактных клеток и образцами группы «3» отсутствуют

как вирусная ДНК-полимераза и продукты гена *E1A* [26, 27].

В ходе эксперимента была оценена также выживаемость клеток линии HEK293, зараженных HAdV5 с множественностью инфекции 10 БОЕ/клетку, в присутствии веществ (1) и (3) (рис. 5). Через 3 ч после заражения к клеткам добавляли растворы соединений (1) и (3) в ДМСО в концентрации 25 мкМ. Через 48 ч по данным теста МТТ выживаемость клеток при множественности инфекции 10 БОЕ/клетку составляла 74 и 59% в присутствии веществ (1) и (3) соответственно по сравнению с контролем. Эти данные согласуются с результатами, полученными при аналогичном анализе выживаемости клеток в ходе аденовирусной инфекции (МОИ 10 БОЕ/клетку) с использованием резазурина. Так, под действием соединений (1) и (3) доля живых клеток не отличалась статистически значимо от доли в контрольном

образце (рис. 5). Полученные данные указывают на наличие противовирусного эффекта у исследуемых соединений.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, открыт новый тип противоаденовирусных агентов ненуклеозидной природы, которые проявляют ингибирующий эффект в отношении аденовирусов человека. Возможно, соединения данного ряда окажутся перспективными в плане создания на их основе лекарственных средств, эффективных при аденовирусных инфекциях. ●

Работа поддержана грантами Президента Российской Федерации для государственной поддержки молодых российских ученых – кандидатов наук (гранты МК-1746.2017.7 и МК-2480.2017.7).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ghebremedhin B. // *Eur. J. Microbiol. Immunol.* 2014. V. 4. № 1. P. 26–33.
2. Gupta P., Tobias J.D., Goyal S., Hervie P., Harris J.B., Sadot E., Noviski N. // *J. Intensive Care Med.* 2011. V. 26. № 4. P. 267–272.
3. Lu X., Trujillo-Lopez E., Lott L., Erdman D.D. // *J. Clin. Microbiol.* 2013. V. 51. № 4. P. 1089–1093.
4. Gonzalez-Lopez J.J., Morcillo-Laiz R., Munoz-Negrete F.J. // *Arch. Soc. Esp. Oftalmol.* 2013. V. 88. № 3. P. 108–115.
5. Eckardt A.J., Baumgart D.C. // *Recent Pat Antiinfect Drug Discov.* 2011. V. 6. № 1. P. 54–63.
6. Lynch J.P., 3rd, Fishbein M., Echavarría M. // *Semin. Respir. Crit. Care Med.* 2011. V. 32. № 4. P. 494–511.
7. Echavarría M. // *Clin. Microbiol. Rev.* 2008. V. 21. № 4. P. 704–715.
8. Florescu D.F., Hoffman J.A., the AST Infectious Diseases Community of Practice // *Am. J. Transplant.* 2013. V. 13 Suppl 4. P. 206–211.
9. Robinson C.M., Seto D., Jones M.S., Dyer D.W., Chodosh J. // *Infect. Genet. Evol.* 2011. V. 11. № 6. P. 1208–1217.
10. Pihos A.M. // *J. Optometry.* 2013. V. 6. № 2. P. 69–74.
11. Meyer-Rusenberг B., Loderstadt U., Richard G., Kaufers P.M., Gesser C. // *Dtsch Arztebl. Int.* 2011. V. 108. № 27. P. 475–480.
12. De Clercq E. // *Antiviral Res.* 2007. V. 75. № 1. P. 1–13.
13. Piscitelli S.C., Penzak S.R., Flexner C. // *AIDS and Other Manifestations of HIV Infection* / Ed. Wormser G. San Diego: Acad. Press, 2004. P. 913–930.
14. Новиков М.С., Никитенко Н.А., Озеров А.А., Гуреева Е.С., Прасолов В.С., Прокофьева М.М., Джаруллаева А.Ш., Тухватулин А.И., Логунов Д.Ю. // Пат. 2628456 Российская Федерация. С07D 239/545 (2006.01), А61К 31/513 (2006.01), А61Р 31/14 (2006.01) 2016.
15. Novikov M.S., Buckheit R.W., Jr., Temburnikar K., Khandazhinskaya A.L., Ivanov A.V., Seley-Radtke K.L. // *Bioorg. Med. Chem.* 2010. V. 18. № 23. P. 8310–8314.
16. Gerns F.R., Perrotta A., Hitchings G.H. // *J. Med. Chem.* 1966. V. 9. № 1. P. 108–115.
17. Phillips A.P. // *J. Am. Chem. Soc.* 1951. V. 73. № 3. P. 1061–1062.
18. Novikov M.S., Babkov D.A., Paramonova M.P., Khandazhinskaya A.L., Ozerov A.A., Chizhov A.O., Andrei G., Snoeck R., Balzarini J., Seley-Radtke K.L. // *Bioorganic Med. Chem.* 2013. V. 21. № 14. P. 4151–4157.
19. Шмаров М.М., Черенова Л.В., Шашкова Е.В., Логунов Д.Ю., Верховская Л.В., Капитонов А.В., Неугодова Г.Л., Доронин К.К., Народицкий Б.С. // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология.* 2002. № 2. P. 30–35.
20. Logunov D.Y., Zubkova O.V., Karyagina-Zhulina A.S., Shuvalova E.A., Karpov A.P., Shmarov M.M., Tutykhina I.L., Alyapkina Y.S., Grezina N.M., Zinovieva N.A., et al. // *J. Virol.* 2007. V. 81. № 18. P. 9641–9652.
21. Graham F.L., Smiley J., Russell W.C., Nairn R. // *J. Gen. Virol.* 1977. V. 36. № 1. P. 59–74.
22. Mosmann T. // *J. Immunol. Methods.* 1983. V. 65. № 1–2. P. 55–63.
23. Heim A., Ebnet C., Harste G., Pring-Akerblom P. // *J. Med. Virol.* 2003. V. 70. № 2. P. 228–239.
24. Babkov D.A., Chizhov A.O., Khandazhinskaya A.L., Corona A., Esposito F., Tramontano E., Seley-Radtke K.L., Novikov M.S. // *Synthesis.* 2015. V. 47. № 10. P. 1413–1422.
25. Strober W. // *Curr. Protoc Immunol.* 2001. Appendix 3. Appendix 3B.
26. Nikitenko N.A., Speiseder T., Lam E., Rubtsov P.M., Tonaeva K.D., Borzenok S.A., Dobner T., Prassolov V.S. // *Acta Naturae.* 2015. V. 7. № 3. P. 100–107.
27. Nikitenko N.A., Speiseder T., Groitl P., Spirin P.V., Prokofjeva M.M., Lebedev T.D., Rubtsov P.M., Lam E., Riecken K., Fehse B., et al. // *Biochimie.* 2015. V. 113. P. 10–16.

УДК 577.152.3

Обратимая циклическая термоинактивация олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans*

М. В. Овчинникова^{1,2}, А. Г. Михайлова^{1*}, Д. М. Карлинский¹, В. А. Горленко², Л. Д. Румш¹¹Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Московский педагогический государственный университет, 119991, Москва, ул. М. Пироговская, 1, стр. 1

*E-mail: anna.mikhailova@ibch.ru

Поступила в редакцию 29.01.2018

Принята к печати 11.05.2018

РЕФЕРАТ Обнаружено уникальное свойство олигопептидазы В из *Serratia proteamaculans* (PSP) и ее мутантных вариантов – способность к обратимой термоинактивации при 37°C с возвращением и даже повышением активности выше первоначальной при последующем охлаждении. Процесс можно повторять с теми же результатами многократно (до пяти циклов). Данный эффект можно объяснить сдвигом равновесия между неактивной открытой формой фермента и активной закрытой при изменении температуры инкубации.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА олигопептидаза В, *Serratia proteamaculans*, термоинактивация.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ PSP – протеиназа из *Serratia proteamaculans*; OpdB – олигопептидаза В; BAPNA – *n*-нитроанилид N_α-бензоил-DL-аргинина; ДМСО – диметилсульфоксид.

ВВЕДЕНИЕ

Олигопептидаза В (OpdB) [КФ 3.4.21.83] – это трипсиноподобная сериновая пептидаза, принадлежащая к семейству пролилолигопептидаз. OpdB присутствует в одноклеточных эукариотах: трипаносомах *Trypanosoma cruzi* [1], *T. brucei* [2] и *T. evansi* [3], а также в лейшманиях *Leishmania major* и *L. amazonensis* [4]. OpdB или гены, кодирующие этот фермент, обнаружены в прокариотах: *Escherichia coli* [5], *Moraxella lacunata* [6], *Salmonella enterica* serovar *typhimurium* [7], *Yersinia pestis* [7], *Serratia marcescens*, *Stenotrophomonas maltophilia* и *Rhodococcus erythropolis* [8], микобактериях *Mycobacterium tuberculosis* и *M. leprae* [7], а также в спирохетах *Treponema denticola* [9]. Представители олигопептидаз В обнаружены также в некоторых высших растениях, например в амброзии *Ambrosia artemisiifolia* [10]. На настоящий момент наиболее изучены OpdB из простейших; определены трехмерные структуры OpdB *L. major* [11] и *T. brucei* [12]. Пространственная структура и энзимологические характеристики большинства бактериальных олигопептидаз В не определены, известны лишь нуклеотидные последовательности кодирующих их генов.

Объектом нашего исследования является олигопептидаза В *Serratia proteamaculans*, названная нами PSP. Ген *OpdB S. proteamaculans* 94 был клонирован,

секвенирован и экспрессирован в *E. coli*; изучена субстратная специфичность OpdB, ингибирование, а также влияние ионов кальция, pH и температуры на активность фермента [13–18].

Все ранее изученные олигопептидазы В как протозойные, так и бактериальные, отличает высокая термостабильность [5, 19]. PSP – это первая известная психрофильная олигопептидаза В. Этот фермент достаточно быстро инактивируется при 37°C; процесс термоинактивации не зависит от природы буфера, оставаясь одинаковым в фосфатном, имидазольном и Трис-буфере pH 7.5–8.0 [17]. Спектры собственной флуоресценции указывают на разворачивание молекулы PSP в результате нагревания при 37°C, сопровождающееся уменьшением ферментативной активности. Ионы кальция ускоряют и усиливают инактивацию PSP [17].

При изучении термоинактивации PSP в ходе экспериментов, описанных в [17], неожиданно обнаружили восстановление активности после инкубации некоторых проб при низких температурах. В этом исследовании мы детально изучили этот феномен при [Ca²⁺] = 0 и 50 мМ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали *n*-нитроанилид N_α-бензоил-D,L-аргинина (BAPNA) (Sigma, США); Трис и NaCl

(Merck, Германия), глицерин (ICN, США); диметилсульфоксид (ДМСО) и *n*-нитрофениловый эфир *n*'-гуанидинобензойной кислоты (Fluka, Германия).

Получение и очистка PSP дикого типа и точечных мутантов, экспрессированных в *E. coli* BL21(DE3) (Novagen), были выполнены как описано в [17, 20].

Оптическое поглощение измеряли на спектрофотометре Eppendorf BioSpectrometer@kinetic (Германия). Концентрацию белка определяли методом Брэдфорда с помощью реактива Bio-Rad Protein Assay, стандарт БСА. Молярность растворов фермента определяли титрованием активных центров *n*-нитрофениловым эфиром *n*'-гуанидинобензойной кислоты [21].

Изучение активности препаратов PSP проводили спектрофотометрически с использованием VAPNA (0.2 мМ) в качестве субстрата в 0.1 М Трис-НСl-буфере, рН 8.0; 50 мМ CaCl₂, содержащем 2% ДМСО при 25°C, регистрируя увеличение оптического поглощения при 405 нм, происходящее при образовании свободного *n*-нитроанилина ($\Delta\epsilon_{405}$ 10400 М⁻¹см⁻¹). Начальные скорости гидролиза субстрата (два-три повтора для каждого измерения; разница в величинах скоростей не более 5–10%) определяли по начальному линейному участку кинетической кривой (степень гидролиза не превышала 10%).

Изучение термостабильности препаратов PSP

Определяли начальную активность фермента дикого типа и его мутантных вариантов (0.05 мг/мл = 0.65 мкМ) после разведения запасного раствора фермента, нагретого до 25°C, в буфере инкубации при этой же температуре, отбирая аликвоты по 5–10 мкл и измеряя начальную скорость гидролиза субстрата VAPNA (0.2 мМ; общий объем 1.5 мл). Аликвоты растворов фермента (100 мкл; 0.65 мкМ) инкубировали в течение соответствующего промежутка времени при соответствующей температуре, отбирая по 5–10 мкл в кварцевую кювету с VAPNA и немедленно измеряя остаточную активность как описано выше. Контрольные пробы всех вариантов PSP с той же концентрацией (0.05 мг/мл = 0.65 мкМ) инкубировали в течение соответствующего промежутка времени при 25 и 4°C так же, как опытные образцы, за исключением нагревания, и определяли их активность.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характерной особенностью ферментов семейства пролилолигопептидаз, в том числе OpdB, является N-концевой β -пропеллерный домен, препятствующий проникновению в активный центр объемных глобулярных белков, и каталитический домен, распо-

ложенный в С-концевой части молекулы. Изучение трехмерных структур ферментов семейства пролилолигопептидаз показало, что эти белки существуют в открытой (неактивной) и закрытой (активной) форме, находящихся в равновесии. Определение трехмерных структур протозойных OpdB из *L. major* [11] и *T. brucei* [12] показало, что функционирование этих ферментов определяется не только аминокислотными остатками триады активного центра и первичного субстратсвязывающего центра, но и пятью междоменными солевыми мостиками SB1–SB5, в которых задействованы 9 заряженных аминокислотных остатков. Ключевая роль при этом принадлежит мосту SB1 – E 172/179–R650/664 (трипаносома/лейшмания), замыкание-размыкание которого при переходе от открытой неактивной формы фермента к закрытой активной и обратно приводит к образованию триады активного центра или соответственно к ее разрушению. Солевые мосты SB1–SB5 строго консервативны у всех протозойных OpdB.

Аминокислотная последовательность PSP обладает 35% идентичности по отношению к последовательностям OpdB *L. major* и *T. brucei*; в области С-концевого каталитического домена уровень идентичности выше – 50%. При этом участки активного центра и первичного субстратсвязывающего центра у всех этих ферментов практически одинаковы. Однако оказалось, что пять функционально важных междоменных солевых мостов, обнаруженных в протозойных ферментах, не являются консервативными. Только один из них (SB3) сохраняется в PSP, а также в других известных бактериальных OpdB. В положениях, соответствующих пяти из семи заряженных остатков OpdB *L. major* и *T. brucei*, образующих солевые мосты SB1, SB2, SB4 и SB5, в PSP и других исследованных бактериальных OpdB находятся незаряженные или противоположно заряженные аминокислотные остатки. Отсутствует и ключевой солевой мост, отвечающий за активность фермента.

Для выяснения механизма действия PSP мы провели моделирование трехмерной структуры этого белка в закрытой и открытой форме [20].

В результате были выявлены 12 заряженных остатков, образующих структуру из меж- и внутридоменных солевых мостов, определяющих структуру и активность PSP. Восемь из них (E75, E96, E125, D647, D649, K655, R658, K660) были заменены на незаряженные путем точечного мутагенеза. Получены и охарактеризованы соответствующие мутантные ферменты и показана важная роль вышеперечисленных остатков. Удаление заряженных остатков 75, 96, 655 и 658 приводило к инактивации фермента, 125 и 649 – к повышению его активности. В зависимости от использованных субстратов замена остатков 647

и 660 приводила либо к 2–3-кратному понижению активности, либо к 1.5–2-кратному повышению [20].

В данном исследовании сравнили термостабильность при $[Ca^{2+}] = 0$ и 50 мМ PSP дикого типа (wt) и четырех точечных мутантов с заменой заряженных остатков His652-петли PSP (D647A, D649A, K655A и K660A), а также двух точечных мутантов (E75A и E125A) с заменой кислотных остатков, локализованных в N-концевом β -пропеллерном домене, на незаряженные.

Как нами было неоднократно показано ранее, активность препаратов PSP дикого типа [15, 17, 18] и его мутантных вариантов [20] при температуре $\leq 25^\circ C$ в 0.1 М Трис-НСI-буфере, pH 8.0 практически не меняется в течение достаточно длительных интервалов времени (до 10–14 сут); при этом отсутствие или наличие (50 мМ) ионов Ca^{2+} не имеет значения. В данном исследовании активность исходных препаратов PSP, хранящихся как при $4^\circ C$, так и при $25^\circ C$ также оставалась постоянной в течение всего эксперимента.

Данные, представленные на рис. 1А,Б, показывают, что ионы кальция являются дестабилизирующим фактором для всех вариантов PSP. Термостабильность мутантов E75A и E125A при $[Ca^{2+}] = 0$ выше на 20–25% термостабильности фермента дикого типа, а мутантов D649A, K655A, K660A и, особенно D647A, в 1.5–2 раза ниже (рис. 1А). При $[Ca^{2+}] = 50$ мМ различие в термостабильности всех вариантов PSP было менее выражено, однако наиболее термолабильным оказался мутант E75A (рис. 1Б).

На основании данных о скорости инактивации PSP и соответствующих мутантных вариантов этого фермента, представленных на рис. 1, для изучения реактивации вариантов PSP выбрали инкубацию при $37^\circ C$ в течение 3 ч. После определения остаточной активности пробы ферментов инкубировали при $25^\circ C$ (0.5 и 1 ч), определяя активность, а затем оставляли при $4^\circ C$ на 18–20 ч. Обнаружено, что активность как фермента дикого типа, так и всех мутантных вариантов возрастала (рис. 2А,Б), причем в случае wt, E125A и E75A при охлаждении частично термоинактивированной пробы систематически наблюдали 1.2–1.8-кратное повышение начальной активности (рис. 2А–В). Активность D649A при охлаждении достигала 100–107% (рис. 2Г).

Еще более интересным представляется возможность повторения данного цикла нагревания-охлаждения аликвоты вариантов PSP (до 5-кратного), причем каждый цикл включает падение активности при нагревании ($37^\circ C$) с последующим возрастанием при охлаждении (25 и $4^\circ C$). При последующих циклах (2–5) восстановленная активность превышала исходную в меньшей степени (или практически не пре-

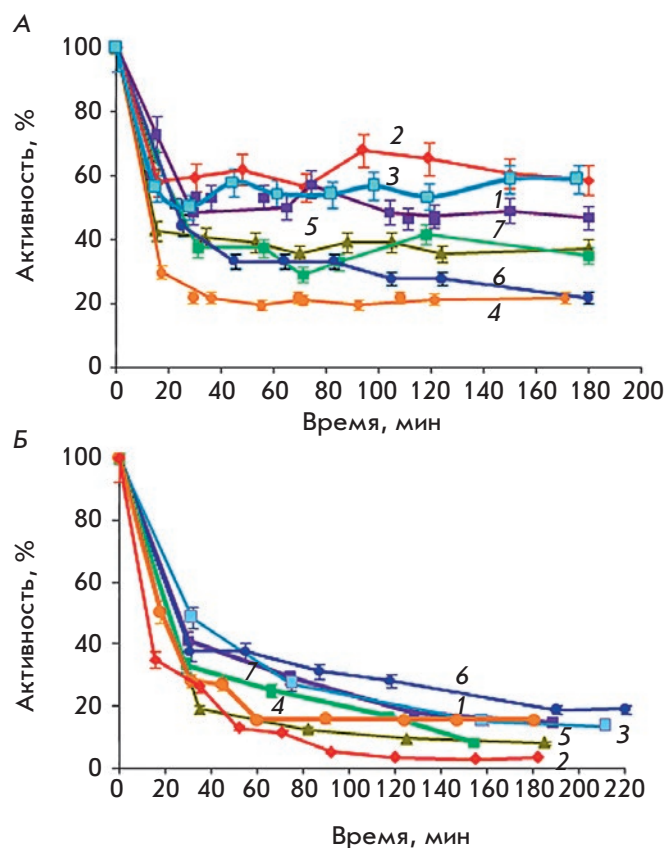


Рис. 1. Инактивация PSP (wt) и мутантных вариантов этого фермента (0.65 мкМ), субстрат ВАРНА, в ходе инкубации при $37^\circ C$ (0.1 М Трис-НСI pH 8.0). А – $[Ca^{2+}] = 0$; Б – $[Ca^{2+}] = 50$ мМ. 1 – wt; 2 – E75A; 3 – E125A; 4 – D647A; 5 – D649A; 6 – K655A; 7 – K660A. Начальная активность ($v_0/[E]$, мин $^{-1}$): wt – 739; E75A – 200; E125A – 1846; D647A – 346; D649A – 923; K655A – 300; K660A – 323

вышала), а активность вариантов D649A в циклах 4 и 5 после охлаждения была меньше исходной (около 80%) (рис. 2Г). Аналогичные опыты по реактивации D647A, K655A и K660A также выявили повышение активности при охлаждении частично денатурированного фермента, однако при этом реактивация в первых двух циклах не превышала 75–80%, а в следующих циклах – 45–50% исходной активности препаратов (данные не приведены).

Охлаждение частично инактивированных проб в присутствии ионов кальция также приводило к повышению активности, но оно не достигало 100%, оставаясь на уровне 64% (wt), 36% (D649A) и 28% (E125A), даже при длительной инкубации (несколько суток) при $4^\circ C$ (рис. 3).

Термостабильность молекулы PSP мы изучали ранее с помощью высокочувствительной дифферен-

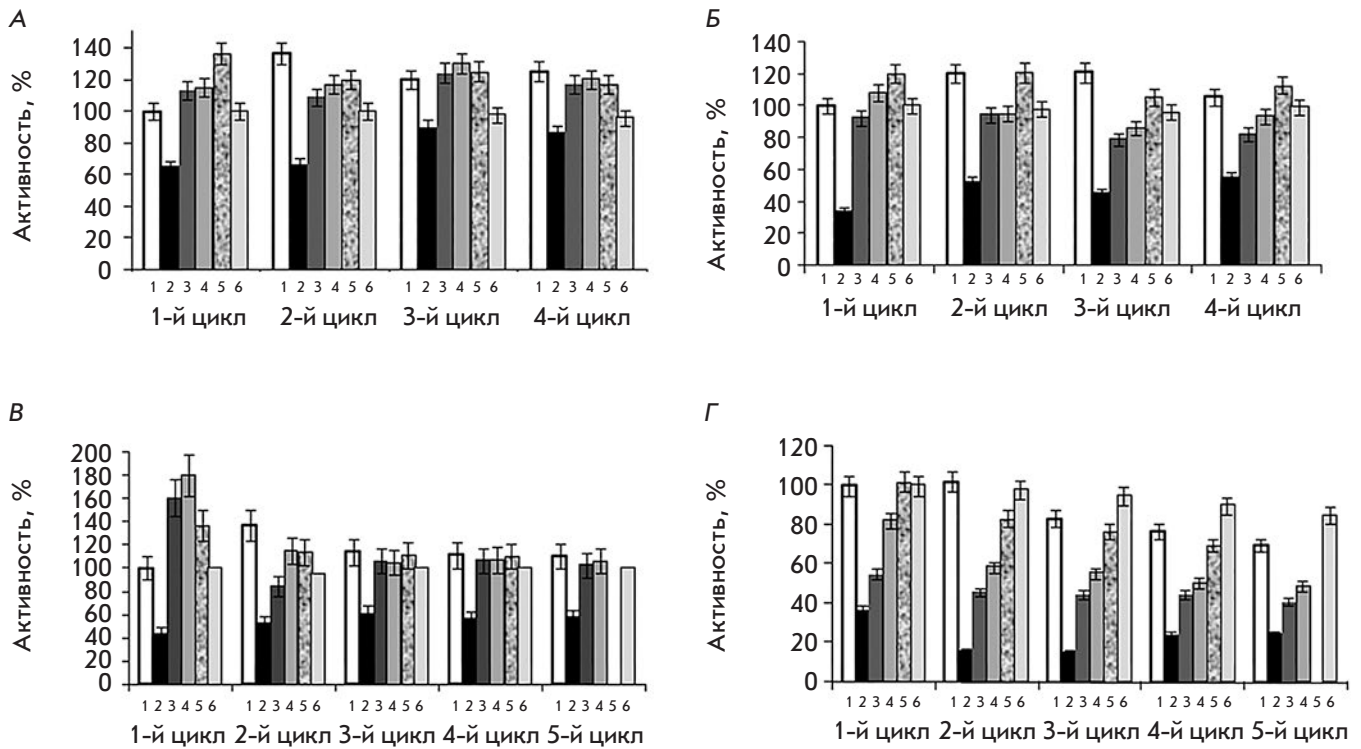


Рис. 2. Влияние на активность мутантных вариантов PSP (0.65 мкМ) циклического нагревания-охлаждения в 0.1 М Трис-НСI pH 8.0. А – wt; Б – E125A; В – E75A; Г – D649A. 1 – начальная активность; 2 – 37°C, 3 ч; 3, 4 – 25°C, 0.5 и 1 ч соответственно; 5 – 4°C; 18–20 ч; 6 – контроль: 25°C, 4 ч и 4°C, 18–20 ч. Начальная активность ($v_0/[E]$, мин⁻¹): wt – 739; E75A – 200; E125A – 1846; D649A – 923

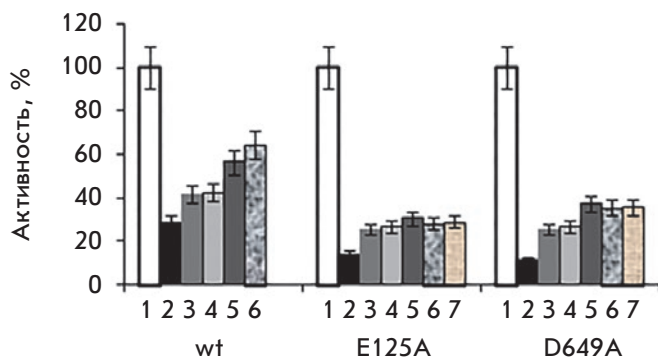


Рис. 3. Влияние на активность PSP (wt), E125A и D649A (0.65 мкМ) последовательного нагревания при 37°C и охлаждения в 0.1 М Трис-НСI pH 8.0, содержащем 50 мМ СаCl₂. 1 – начальная активность; 2 – 37°C, 3 ч; 3, 4 – 25°C, 0.5 и 1 ч соответственно; 5, 6, 7 – 4°C, 18–20, 36–48 и 54–72 ч соответственно

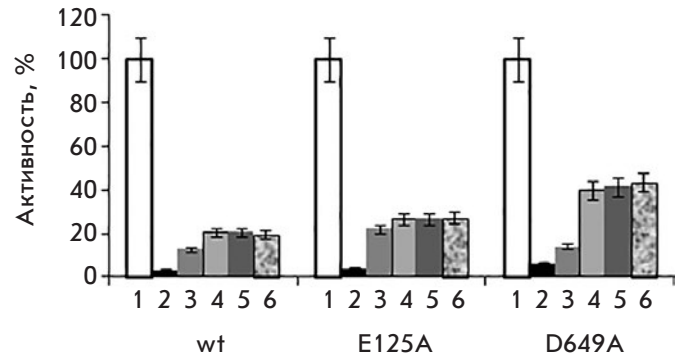


Рис. 4. Влияние на активность PSP (wt), E125A и D649A (0.65 мкМ) последовательного нагревания при 43°C и охлаждения в 0.1 М Трис-НСI pH 8.0. 1 – начальная активность; 2 – 43°C, 0.5 ч; 3, 4 – 25°C, 0.5 и 1 ч соответственно; 5, 6 – 4°C, 18–20 и 36–48 ч соответственно

циальной сканирующей калориметрии (ВЧ-ДСК). Полученные данные выявили низкую термостабильность PSP; кривая теплоемкости этого белка содержала два пика с соответствующими значениями $T_d = 43.1^\circ\text{C}$ (менее стабильный С-концевой каталити-

ческий домен) и 46.3°C (более стабильный N-концевой β -пропеллер) [17].

Мы исследовали влияние на активность PSP (wt, E125A и D649A) инкубации в течение 0.5 ч при температуре 43°C, соответствующей температуре дена-

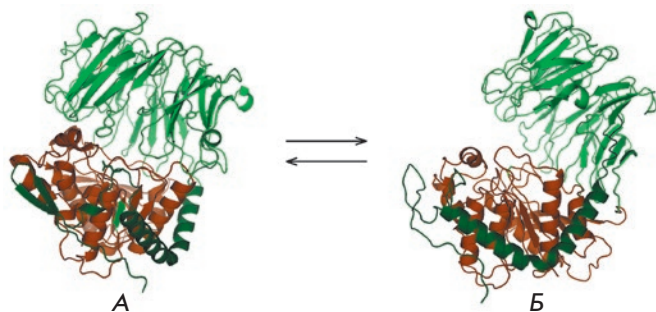


Рис. 5. Активная закрытая (А) и неактивная открытая (Б) формы PSP. Темно-зеленым цветом выделен N-концевой пептид 1–80; зеленым – N-концевой β -пропеллерный домен 81–408; коричневым – C-концевой протеолитический домен 409–677

турации C-концевого каталитического домена, с последующим охлаждением по схеме экспериментов при 37°C. Остаточная активность после нагревания составляла несколько процентов, тем не менее, последовательная инкубация при 25 и 4°C приводила к повышению активности вариантов PSP на порядок (до 20–40%) (рис. 4).

В результате инкубации wt, E125A и D649A в течение 0.5 ч при температуре 46°C, соответствовавшей плавлению N-концевого β -пропеллерного домена, наблюдалась полная инактивация фермента; последующая инкубация при 25 и 4°C к реактивации не приводила (данные не приведены).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаружено уникальное свойство олигопептидазы В из *S. proteamaculans* (PSP) – способность к обратимой термоинактивации при 37°C с восстановлением и даже с некоторым превышением исходной активности при последующем охлаждении. Процесс можно повторять с аналогичными результатами многократно (до пяти циклов). Данный эффект может быть объяснен сдвигом равновесия между неактивной открытой формой фермента и активной закрытой в сторону открытой формы при нагрева-

нии. Последующее охлаждение приводит к обратному сдвигу в сторону закрытой активной формы. Основанием для этой гипотезы служат результаты рентгеноструктурных и ЯМР-исследований характера обратимых переходов между разными формами ферментов семейства пролилолигопептидаз [12], а также полученные нами ранее экспериментальные данные о корреляции термоинактивации PSP при 37°C с разворачиванием (согласно спектрам собственной флуоресценции) его белковой молекулы [17]. На рис. 5 изображены закрытая и открытая формы PSP, соответствующие полученной нами модели этого фермента [20]. Очевидно, что неактивная открытая форма – развернутая молекула, т.е. денатурированный фермент.

Сложнее объяснить происходящее при этом повышение активности. Вероятно, в ходе перехода могут образовываться промежуточные более активные формы фермента. Действительно, ЯМР-исследования пролилолигопептидазы человека обнаружили существование многочисленных конформаций этого белка в растворе, что позволило сделать вывод [12], что молекулы ферментов этого семейства, в том числе и OpdB, находятся в постоянно подвижном состоянии, принимая последовательно ряд различных конформаций, включая полностью открытую и полностью закрытую формы.

Ионы кальция препятствуют обратному переходу к закрытой форме. Понижение термостабильности PSP в присутствии Ca^{2+} может быть вызвано разрушением солевых мостов SB2 и SB3 при связывании Ca^{2+} с остатками участвующих в них E494 и D460. Действительно, замена соответствующих остатков в OpdB *T. brucei* на незаряженные приводила к значительному понижению термостабильности мутантов. Сделан вывод [22] о том, что солевые мосты SB2 и SB3 играют структурную роль, определяя стабильность молекулы OpdB. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского научного фонда
(грант № 14-50-00131).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Burleigh B.A., Caler E.V., Webster P., Andrews N.W. // *J. Cell Biol.* 1997. V. 136. № 3. P. 609–620.
- Morty R.E., Shih A.Y., Fülöp V., Andrews N.W. // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. № 10. P. 2191–2196.
- Morty R.E., Pelle R., Vadasz I., Uzcanga G.L., Seeger W., Bubis J.J. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 12. P. 10925–10937.
- de Matos Guedes H.L., Duarte Carneiro M.P., de Oliveira Gomes D.C., Rossi-Bergmann B., Giovanni De-Simone S. // *Parasitol. Res.* 2007. V. 101. № 4. P. 865–875.
- Yan J.B., Wang G.Q., Du P., Zhu D.X., Wang M.W., Jiang X.Y. // *Prot. Expr. Purif.* 2006. V. 47. № 2. P. 645–650.
- Yoshimoto T., Tabira J., Kabashima T., Inoue S., Ito K. // *J. Biochem.* 1995. V. 117. № 3. P. 654–660.
- Morty R.E., Fülöp V., Andrews N.W. // *J. Bacteriol.* 2002. V. 184. № 12. P. 3329–3337.
- Mustafa M.S.M., Nakajima Y., Oyama H., Iwata N., Ito K. // *Biol. Pharm. Bull.* 2012. V. 35. № 11. P. 2010–2016.
- Fenno J.C., Lee S.Y., Bayer C.H., Ning Y. // *Infect. Immun.* 2001. V. 69. № 10. P. 6193–6200.
- Bagarozzi D.A. Jr., Potempa J., Travis J. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 1998. V. 18. № 3. P. 363–369.
- McLuskey K., Paterson N.G., Bland N.D., Isaacs N.W., Mottram J.C. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 50. P. 39249–39259.

12. Canning P., Rea D., Morty R.E., Fulop V. // *PloS One*. 2013. V. 8. № 11. e79349.
13. Михайлова А.Г., Лихарева В.В., Хайруллин Р.Ф., Лубенец Н.Л., Румш Л.Д., Демидюк И.В., Костров С.В. // *Биохимия*. 2006. Т. 71. № 5. С. 697–706.
14. Хайруллин Р.Ф., Михайлова А.Г., Себякина Т.Ю., Лубенец Н.Л., Зиганшин Р.Х., Демидюк И.В., Громова Т.Ю., Костров С.В., Румш Л.Д. // *Биохимия*. 2009. Т. 74. № 10. С. 1427–1437.
15. Михайлова А.Г., Хайруллин Р.Ф., Демидюк И.В., Громова Т.Ю., Костров С.В., Румш Л.Д. // *Биохимия*. 2011. Т. 76. № 4. С. 591–603.
16. Михайлова А.Г., Хайруллин Р.Ф., Коломийцева Г.Я., Румш Л.Д. // *Биохимия*. 2012. Т. 77. № 3. С. 384–391.
17. Mikhailova A.G., Khairullin R.F., Demidyuk I.V., Kostrov S.V., Grinberg N.V., Burova T.V., Grinberg V.Ya., Rumsh L.D. // *Protein Exp. Purif.* 2014. V. 93. P. 63–76.
18. Михайлова А.Г., Некрасов А.Н., Зинченко А.А., Ракитина Т.В., Корженевский Д.А., Липкин А.В., Разгуляева О.А., Овчинникова М.В., Горленко В.А., Румш Л.Д. // *Биохимия*. 2015. Т. 80. № 11. С. 1606–1620.
19. Ismail N.I.M., Yuasa T., Yuasa K., Nambu Y., Nisimoto M., Goto M., Matsuki H., Inoue M., Nagahama M., Tsuji A. // *J. Biochem.* 2010. V. 147. № 2. P. 201–211.
20. Mikhailova A.G., Rakitina T.V., Timofeev V.I., Karlinsky D.M., Korzhenevsky D.A., Agapova Yu.K., Vlaskina A.V., Ovchinnikova M.V., Gorlenko V.A., Rumsh L.D. // *Biochimie*. 2017. V. 139. P. 125–136.
21. Walsh K.F., Wilcox P.E. // *Meth. Enzymol.* 1970. V. 19. P. 31–41.
22. Fukumoto J., Ismaliza N., Ismail M., Kubo M., Kinoshita K., Inoue M., Yuasa K., Nishimoto M., Matsuki H., Tsuji A. // *J. Biochem.* 2013. V. 154. № 5. P. 465–473.

УДК 612.88+57.045

Растворимая гуанилатциклаза как ключевой фермент в модулирующем влиянии NO на metabotropic glutamate receptors

И. В. Рыжова*, А. Д. Ноздрачев, Т. В. Тобиас, Е. А. Вершинина

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, 199034, Санкт-Петербург, наб. Макарова, 6

*E-mail: irenerzhova@mail.ru

Поступила в редакцию 06.09.2017

Принята к печати 25.04.2018

РЕФЕРАТ Синаптическая пластичность афферентного синапса вестибулярного аппарата определяется динамичным взаимодействием ионотропных и metabotropic glutamate receptors и модуляторов синаптической передачи. Показано, что оксид азота модулирует ответы iGluR. В настоящей работе исследовано влияние NO на функцию mGluR афферентного синапса. Ингибитор синтазы оксида азота понижал уровень фоновой активности, но увеличивал амплитуду ответа агониста mGluR групп I и II – ACPD. Донор NO SNAP увеличивал уровень фоновой активности. Кратковременная перфузия синаптической области низкими концентрациями SNAP приводила к уменьшению амплитуды ответов агонистов mGluR ACPD и DHPG. Ингибирующее влияние донора NO устранялось в условиях блокады растворимой гуанилатциклазы специфическим ингибитором ODQ. Длительная аппликация NO не вызывала статистически значимого изменения амплитуды ответа ACPD. Однако SNAP в концентрациях 10 и 100 мкМ увеличивал амплитуду ответов агониста mGluR через 30 и 15 мин соответственно после окончания воздействия донора NO. Полученные данные показывают разнонаправленное влияние NO на функцию mGluR и свидетельствуют о существовании сложного механизма, регулирующего афферентный поток от вестибулярных органов в центральную нервную систему.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вестибулярный аппарат, гуанилатциклаза, metabotropic glutamate receptors, оксид азота, синаптическая пластичность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ iGluR – ионотропные glutamate receptors; mGluR – metabotropic glutamate receptors; NO – оксид азота; NOS – NO-синтаза; ACPD – (±)-1-аминоциклопентан-*trans*-1,3-дикарбоновая кислота; SNAP – S-нитрозо-N-ацетил-DL-пеницилламин; DHPG – (S)-3,5-дигидроксифенилглицин; sGC – растворимая гуанилатциклаза; ODQ – 1H[1,2,4]оксадиазоло[4,3-а]квиноксалин-1; cGMP – циклический гуанозинмонофосфат; L-NAME – N-нитро-L-аргинин метиловый эфир гидрохлорид; IP3R – рецепторы инозитолтрифосфата; RyR – рианодинные рецепторы; PKG – протеинкиназа G; AMPA – α-амино-3-гидрокси-5-метил-4-изоксазол-пропионовая кислота; NMDA – N-метил-D-аспарат; ЦНС – центральная нервная система; ВПСП – возбуждающий постсинаптический потенциал.

ВВЕДЕНИЕ

Волосковые клетки – вторичночувствующие рецепторы внутреннего уха, контактируют с афферентными волокнами посредством аминокислотного синапса. Пластичность глутаматергического синапса обеспечивается функциональным взаимодействием ионотропных и metabotropic glutamate receptors и модуляторов синаптической передачи, которые могут выделяться волосковыми клетками, нервными окончаниями или приноситься с током

крови. Особый интерес представляет оксид азота, газообразный нейромодулятор, который функционирует как внутриклеточный и внесинаптический сигнальный мессенджер. Источником NO у человека и животных является L-аргинин, который под действием NO-синтазы и ряда кофакторов превращается в NO и L-цитруллин. Во внутреннем ухе оксид азота может синтезироваться в нормальных условиях при активации нейрональной и эндотелиальной NO-синтазы, локализованной в волосковых клетках,

афферентных и эфферентных нервных волокнах [1–3]. Патологические процессы внутреннего уха (лабиринтэктомия, эксайтотоксичность, инфекции и воздействие ототоксических веществ) сопровождаются активацией индуцируемой NOS, что приводит к длительному синтезу высоких концентраций NO [4–9].

Важное значение NO в функционировании вестибулярного эпителия подтверждается данными клинической и экспериментальной физиологии. При помощи электрода, селективного к NO, в волосковых клетках выявлен базовый синтез оксида азота, который увеличивался при воздействии ацетилхолина, глутамата, антибиотиков, липосахаридов и цитокинов [10, 11]. В вестибулярном эпителии амфибий обнаружены эффекты доноров NO и ингибиторов NOS. Показано, что NO уменьшал входное сопротивление мембраны вестибулярных афферентных нейронов, повышал уровень фоновой активности афферентных волокон, увеличивал амплитуду ответов на адекватное раздражение и величину ответов агонистов iGluR. В противоположность эффектам доноров NO ингибиторы NOS понижали частоту суммарной фоновой активности афферентных волокон и ВПСП, но увеличивали амплитуду ответов глутамата и его агонистов AMPA и NMDA [12–14]. Предполагается, что ингибиторы NOS действуют на пресинаптическом уровне и снижают выделение нейромедиатора. Нами показано постсинаптическое влияние доноров NO и ингибиторов NOS в условиях блокады пресинаптической мембраны гипермагниевым-гипокальциевым раствором [13]. Опубликованы данные, свидетельствующие об участии NO в формировании афферентного разряда и в адаптивных изменениях вестибулярного анализатора [3, 8, 9, 11, 12, 14].

Механизм действия NO на синаптическую передачу, синаптическую пластичность и нейродегенеративные процессы, по мнению ряда исследователей, связан с модуляцией активности ионных каналов плазматической мембраны [15–18]. В вестибулярном эпителии при помощи метода патч-клампа целой и перфорированной клеток показано, что NO ингибирует Ca^{2+} -токи волосковых клеток крист полукружных каналов крыс посредством нитрозилирования Ca^{2+} -каналов и активации сигнального каскада sGC-sGMP [18]. Показано, что NO ослабляет уровень Ca^{2+} -осцилляций волосковых клеток саккулуса лягушки и увеличивает амплитуду тока, необходимого для их вызова. Этот эффект связывают не только с ингибированием Ca^{2+} -зависимых K^{+} - и Ca^{2+} -каналов, но и с уменьшением вероятности их открытия [12]. Ингибирование токов K^{+} -каналов донорами NO и мембранопроницаемым аналогом sGMP – 8-бром-sGMP – наблюдали на волосковых клетках типа I полукружных каналов крысы [19, 20].

Известно, что iGluR и mGluR колоколизированы на постсинаптической мембране. Принимая во внимание синтез NO при активации рецепторов NMDA и его быструю диффузию по градиенту концентрации, нами была выдвинута гипотеза о возможном влиянии NO и на функцию mGluR. Наши пилотные исследования показали, что донор NO SNAP уменьшал амплитуду ответов ACPD, агониста mGluR, а ингибитор NOS L-NAME оказывал противоположное действие [21]. Настоящая работа посвящена детальному изучению влияния NO на функцию mGluR.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Методика

Синаптические процессы в патологических и нормальных функциональных условиях характеризуются различными концентрациями NO и различным временем его действия. Нормально функционирующий синапс подвергается кратковременным воздействиям низких концентраций NO, тогда как при патологических состояниях происходит длительное влияние высоких концентраций NO. При выборе экспериментальной модели мы руководствовались данными, согласно которым содержание NO в ткани утрикулуса увеличивается через 5 мин после аппликации аминогликозидного антибиотика гентамицина [22]. Учитывая сказанное, мы исследовали: 1) кратковременное (1 мин) и длительное (9 мин) влияние донора NO SNAP (1–100 мкМ) на амплитуду ответов агонистов mGluR ACPD и DHPG; 2) специфичность влияния NO на функцию mGluR доказывали при помощи блокады рецептора NO растворимой гуанилатциклазы специфическим ингибитором ODQ.

Эксперименты выполняли на изолированном препарате вестибулярного эпителия лягушки при помощи отведения импульсной активности от целого нерва, иннервирующего ампулу заднего полукружного канала. Вестибулярный аппарат лягушки является уникальной моделью, позволяющей изучить закономерности синаптической передачи в бутонобразных синаптических окончаниях между волосковой клеткой и афферентным нервным волокном. Хрящевую капсулу с лабиринтом иссекали и помещали для последующего препарирования в камеру, непрерывно перфузируемую раствором следующего состава (в мМ): NaCl 117; KCl 2.5; $NaHCO_3$ 1.2; $NaH_2PO_4 \cdot 2H_2O$ 0.17; $CaCl_2$ 1.8; глюкоза 2.5. Исследуемые вещества растворяли в нормальном растворе в необходимых концентрациях (pH 7.4). Аппликацию исследуемых растворов осуществляли методом внешней перфузии. В опытах использовали следующие вещества фирмы Sigma-Aldrich: ингибитор NO-синтазы L-NAME; донор NO SNAP;

агонист I и II групп mGluR ACPD; селективный агонист I группы (mGlu1 и mGlu5) DHPG; селективный ингибитор sGC ODQ.

Множественную импульсную активность афферентных волокон, контактирующих с рецепторным эпителием полукружного канала, регистрировали при помощи засасывающего стеклянного электрода. Импульсную активность подавали на усилитель А-М Systems Inc 3000, преобразовывали в стандартные прямоугольные импульсы длительностью 2 мс, которые регистрировали на компьютере on-line в течение всего эксперимента при помощи оригинальной программы. Ответ агонистов mGluR ACPD и DHPG оценивался как отношение разности максимума и минимума ответа к частоте фоновой активности (Δ к фону). Сравнивали изменение амплитуды ответов агонистов mGluR ACPD и DHPG до и после аппликации ингибитора NOS и донора NO SNAP.

Данные представлены как средние значения со стандартными ошибками ($M \pm SE$). Анализ данных проводили с использованием однофакторного дисперсионного анализа для зависимых переменных ANOVA (Repeated measures) с последующими множественными парными сравнениями (Post hoc test), фактор – стадия процесса (фон/воздействие/восстановление). При отсутствии достаточного материала в стадии восстановления сравнивали только две стадии с применением *t*-теста. Все расчеты продублированы ранговым тестом Вилкоксона для зависимых переменных. Статистические решения принимали на 5% уровне значимости. Расчеты проводили с использованием программного комплекса SPSS Inc. Иллюстративный материал готовили с помощью пакета программ MS-Excel.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Влияние донора NO SNAP на фоновую активность афферентных волокон

Перфузия синаптической области раствором SNAP (0.01–100 мкМ) вызывала двухфазное позитивно-негативное изменение частоты фоновой активности. Воздействие донора NO SNAP характеризовалось отсутствием дозозависимости. Динамика ответа широко варьировала от опыта к опыту, что выражалось в различном соотношении амплитуды и длительности позитивной и негативной фаз ответа. Длительное воздействие высоких концентраций SNAP (100 мкМ) приводило к небольшому повышению импульсной активности, которое сменялось снижением частоты афферентных разрядов. Пониженный уровень импульсной активности не восстанавливался до первоначального уровня после 30-минутной экспозиции в нормальном растворе (рис. 1).

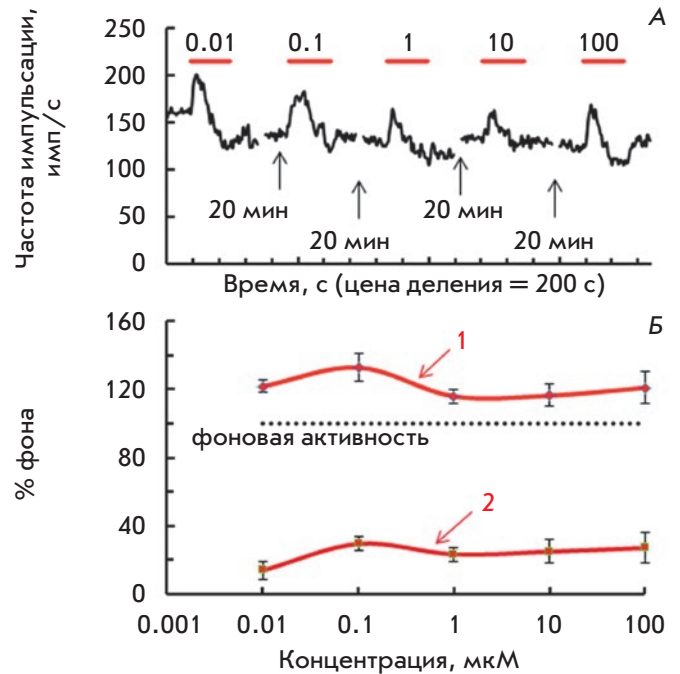


Рис. 1. Влияние различных концентраций донора NO SNAP на уровень фоновой активности нервных волокон, контактирующих с задним полукружным каналом вестибулярного аппарата лягушки. А – оригинальная запись эксперимента. По оси абсцисс – время, с; по оси ординат – средняя частота импульсной активности, имп/с. Б – кривая доза-ответ донора NO SNAP для первой максимальной (1) и второй минимальной (2) фаз ответа. $N = 5-6$

Кратковременное влияние донора NO на функцию метаботропных глутаматных рецепторов

Поскольку в вестибулярном эпителии выявлены только mGluR группы I и II [23, 24], в нашей работе мы исследовали влияние NO на амплитуду ответов агониста mGluR I и II групп ACPD и агониста mGluR I группы DHPG.

Агонист mGluR ACPD вызывал увеличение частоты импульсной активности. Для того чтобы отделить изменения возбуждающей фазы ответов агониста mGluR от возбуждающего эффекта донора NO SNAP, агонист mGluR апплицировали на фоне выраженного воздействия донора NO, при этом амплитуда ответа ACPD была меньше величины его тестового стимула. Наблюдаемые изменения были обратимы после 15-минутного отмывания в нормальном растворе (рис. 2).

Донор NO SNAP в низких концентрациях оказывал аналогичное влияние на ответы DHPG – агониста mGluR группы I. Аппликация DHPG (200 мкМ) сопровождалась увеличением частоты импульсной

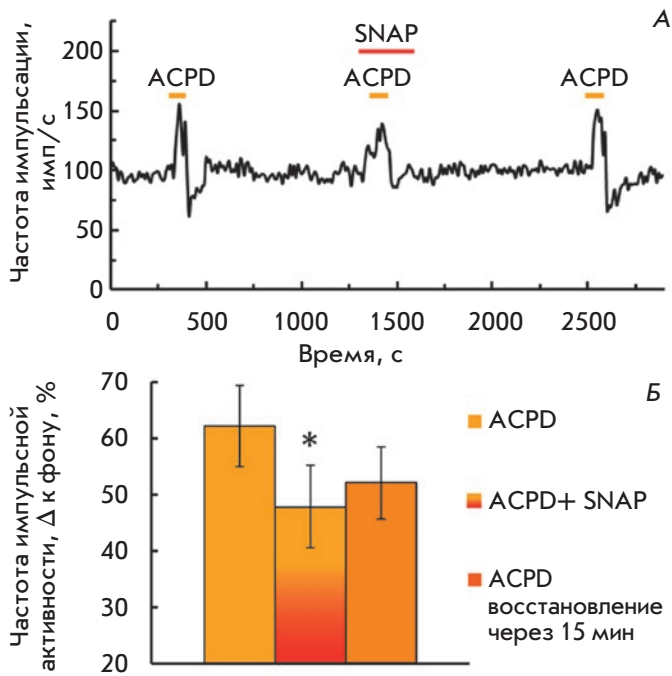


Рис. 2. Развитие возбуждающего ответа агониста mGluR ACPD (100 мкМ) на фоне увеличения частоты импульсной активности афферентных волокон после кратковременной аппликации донора NO SNAP (1 мкМ). А – оригинальная запись. По осям обозначения те же, что и на рис. 1А. Б – диаграмма ингибирования амплитуды ответа ACPD донором NO SNAP. (ANOVA $F(2,18) = 3.9, p = 0.039$; Post hoc test $p = 0.03$). Абсцисса: слева направо – ACPD-контроль, ACPD после кратковременной аппликации SNAP, ACPD-восстановление через 15 мин; ордината: величина ответа ACPD, среднее \pm ошибка среднего

активности афферентных волокон. Донор NO SNAP (1 мкМ) статистически значимо уменьшал амплитуду ответа агониста mGluR группы I DHPG (рис. 3). Таким образом, кратковременное воздействие оксида азота приводит к подавлению функции mGluR групп I и II. Ингибирующий эффект был полностью обратимым.

Длительное влияние NO на функцию mGluR

Изучение пролонгированного действия NO на функцию mGluR представляет особый интерес в связи с высокой концентрацией NO и длительным его воздействием при развитии патологических процессов внутреннего уха. В наших экспериментах первоначально апплицировали агонист mGluR ACPD (100 мкМ). После 15-минутного промывания препарата нормальным раствором проводили 5-минутную перфузию донора NO SNAP (0.1–100 мкМ), на фоне которой осуществляли повторную аппликацию агониста mGluR ACPD. Восстановление ответов ACPD в нормальном растворе контролировали через 15 и 30 мин после прекращения совместного воздействия SNAP и ACPD.

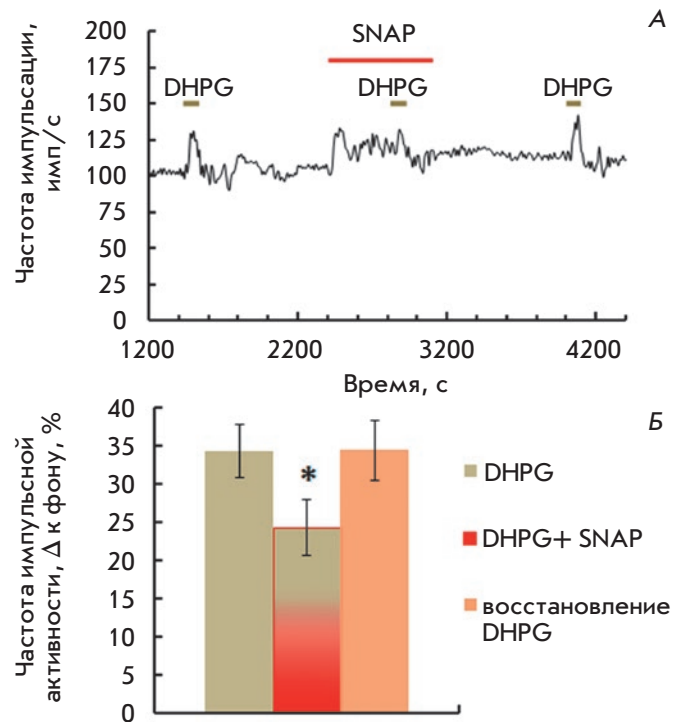


Рис. 3. Влияние донора NO SNAP (1 мкМ) на величину ответа агониста mGluR группы I DHPG (200 мкМ). А – оригинальная запись эксперимента. По осям обозначения те же, что и на рис. 1А. Б – диаграмма, отражающая уменьшение амплитуды ответа DHPG на фоне кратковременной аппликации SNAP (Wilcoxon $p = 0.025$)

Длительная перфузия синаптической области растворами низкой концентрации SNAP (0.1–1 мкМ) не влияла ни на величину ответа после 5-минутной перфузии, ни на восстановление ответа через 15 и 30 мин. SNAP в концентрации 10 мкМ не изменял ни величины ответа агониста mGluR после 5-минутной перфузии, ни амплитуды ответа агониста mGluR после 15-минутного пребывания препарата в нормальном растворе. Однако через 30 мин после прекращения воздействия SNAP (10 мкМ) наблюдали статистически значимое увеличение амплитуды ответа ACPD, которое составляло 169.9% по отношению к фону. Тенденцию к различиям наблюдали между воздействием и восстановлением через 15 мин (Post hoc test = 0.082) и через 30 мин (Post hoc test = 0.059).

SNAP (100 мкМ) также не изменял амплитуды ответа агониста mGluR ACPD по отношению к фону к концу 5-минутной аппликации, но вызывал ста-

статистически значимое увеличение амплитуды ответа агониста ACPD через 15 мин после окончания аппликации донора NO по отношению к контролю. Увеличение амплитуды ответа сохранялось на этом уровне и через 30 мин после окончания воздействия NO, хотя и было статистически незначимым (рис. 4).

Таким образом, влияние NO на функцию mGluR зависело от концентрации и длительности воздействия. Кратковременное воздействие низких концентраций NO сопровождалось ингибированием функции mGluR. Длительное воздействие высоких концентраций донора NO приводило к увеличению ответов mGluR.

Влияние специфического ингибитора sGC на депрессивный эффект донора NO SNAP

Участие ферментативного пути в модуляции функции mGluR изучали с использованием следующего протокола. Этап 1 (рис. 5А): аппликация агониста mGluR ACPD (норма 1), отмывка препарата в нормальном растворе, перфузия синаптической области раствором SNAP (1 мкМ) и ACPD (100 мкМ) (наблюдали ингибирующий эффект, воздействие 1), регистрация восстановления ответа агониста mGluR ACPD через 15 мин в нормальном растворе. Этап 2 (рис. 5Б): инкубация препарата в течение 20 мин в растворе специфического ингибитора sGC ODQ (15 мкМ), на фоне перфузии препарата раствором ODQ повтор этапа 1 [аппликация раствора ACPD 100 мкМ (контроль 2), SNAP (1 мкМ) и ACPD (100 мкМ) (воздействие 2), контроль амплитуды ответа ACPD после 15-минутной отмывки]. Этап 3: после перфузии в течение 1 ч вестибулярного аппарата в нормальном растворе тестировали сохранение эффекта ODQ (повторяли этап 1). Сравнивали статистическую значимость различий в величине ответов агониста ACPD и ACPD на фоне SNAP до и после блокады sGC между нормой 1 и воздействием 1, а также между нормой 2 и воздействием 2. Сохранение эффекта воздействия ODQ оценивали как разницу между нормой 3 и воздействием 3 третьего этапа. ANOVA с последующими парными множественными сравнениями выявил значимое уменьшение амплитуды ответов агониста mGluR ACPD под воздействием донора NO SNAP (ANOVA $F(2.18) = 3.9$, $p = 0.039$, Post hoc test – $p = 0.03$), которое исчезало после блокады sGC специфическим ингибитором ODQ (ANOVA $F(2.20) = 0.408$, $p = 0.67$). Влияние ODQ сохранялось через 1 ч (рис. 5).

ОБСУЖДЕНИЕ

Функциональная роль mGluR в различных структурах ЦНС изучена достаточно подробно. mGluR играют ключевую роль в процессах онтогенеза ЦНС

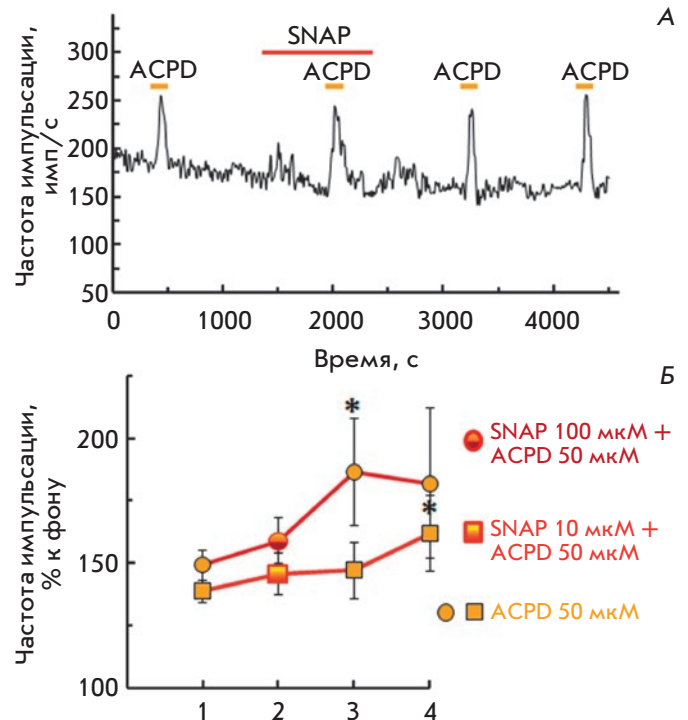


Рис. 4. Влияние длительной аппликации донора NO SNAP на амплитуду ответов агониста mGluR группы I и II ACPD (50 мкМ). А – оригинальная запись опыта (SNAP 10 мкМ). По осям обозначения те же, что и на рис. 1А. Б – суммарные кривые, отражающие изменение амплитуды ответов ACPD при длительном воздействии различных концентраций донора NO: SNAP 10 мкМ (ANOVA $F(3.18) = 4.4$, $p = 0.017$, Post hoc test $p = 0.047$) и SNAP 100 мкМ (ANOVA $F(2.16) = 4.58$, $p = 0.027$, Post hoc test $p = 0.027$). По оси абсцисс: 1 – контрольное значение ACPD, 2 – SNAP + ACPD после 5-минутной перфузии синаптической области раствором донора NO SNAP, 3 – ответ на аппликацию ACPD через 15 мин ($n = 10$) и 4 – через 30 мин ($n = 6$) после прекращения перфузии препарата раствором донора NO. По оси ординат: величина ответа ACPD, среднее \pm ошибка среднего

[25], участвуют в долговременной потенциации, депрессии, обучении и формировании долговременной памяти [26–28], выявлены на мембранах глиальных клеток, на пре- и постсинаптических мембранах в коре, стриатуме, гиппокампе и мозжечке [26, 29–31]. В настоящее время клонировано восемь подтипов mGluR, которые подразделяются на три группы в зависимости от структуры, фармакологических характеристик и связи с системами вторичных посредников [29, 32–34]. Во всех случаях активация mGluR связана с выходом Ca^{2+} из внутриклеточного

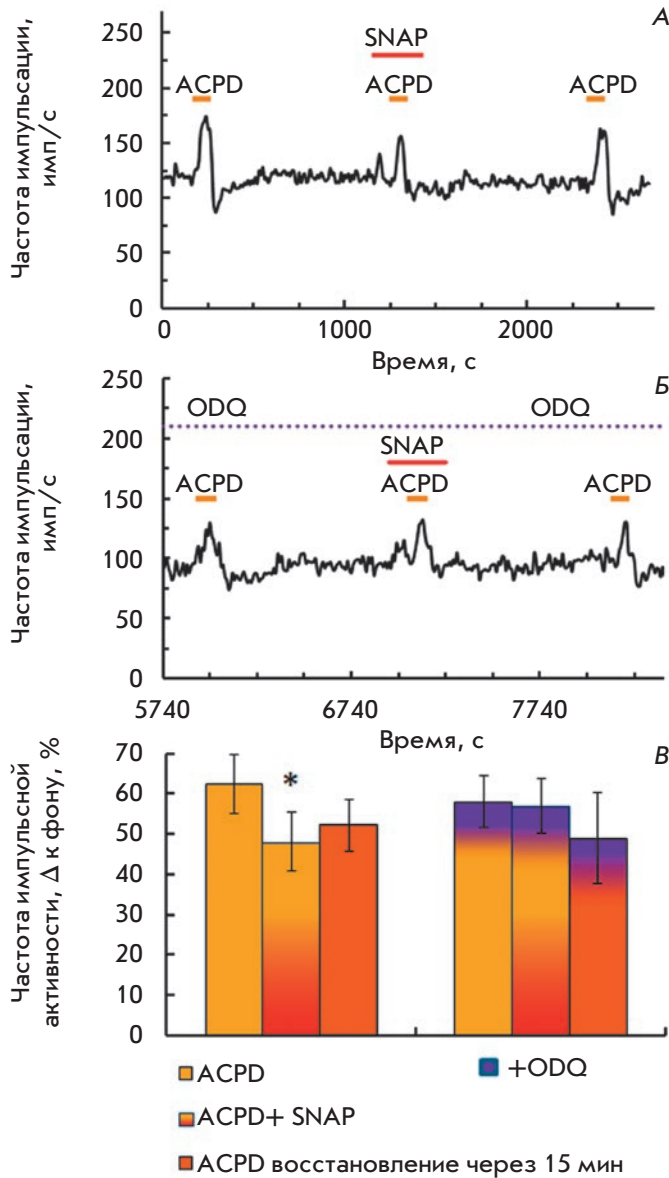


Рис. 5. Устранение модулирующего депрессивного влияния донора NO SNAP (1 мкМ) после 20-минутной блокады sGC раствором специфического ингибитора ODQ (15 мкМ). А, Б – оригинальная запись динамики ответов агониста mGluR ACPD до (А) и после (Б) аппликации ODQ. По осям обозначения те же, что и на рис. 1А. В – диаграмма, иллюстрирующая устранение ингибирующего влияния донора NO SNAP (1 мкМ) на величину ответов ACPD (100 мкМ) после 20-минутной инкубации препарата в растворе ингибитора sGC ODQ (15 мкМ). По оси абсцисс слева направо – ACPD-контроль, ACPD на фоне SNAP, ACPD-восстановление через 15 мин; далее то же на фоне воздействия ODQ. По оси ординат – величина ответа ACPD, среднее ± ошибка среднего

А депо и пролонгированием волны возбуждения, запускаемой iGluR.

На мембранах эндоплазматического ретикула локализованы два типа Ca^{2+} -каналов, которые различаются по своим функциональным и фармакологическим характеристикам. Рианодиновые рецепторы (RyR) функционально взаимодействуют с потенциал-зависимыми Ca^{2+} -каналами плазматической мембраны, активируются низкими концентрациями рианодина, АТФ, гепарином, микромолярными концентрациями катионов Ca^{2+} . Функция рианодиновых Ca^{2+} -каналов может ингибироваться миллимолярными концентрациями Ca^{2+} и рианодина, модулироваться NO, оксидантами, протеинкиназами и внутриклеточными белками [35, 36]. Рецепторы инозитолтрифосфата (IP3R) эндоплазматического ретикула активируются IP3, но ингибируются кальмодулином и киназой I, активируемой NO/cGMP [37].

Сведения о функциях mGluR и способах их модуляции в акустико-латеральной системе немногочисленны. В вестибулярном эпителии земноводных обнаружены только mGluR I и II групп, локализованные на пре- и постсинаптических мембранах. Функция mGluR 2, 3 подтипов до сих пор не изучена [23, 24]. Доказательства непосредственного участия mGluR I в афферентной синаптической передаче в вестибулярном аппарате [23] и в улитке [38, 39] получены с применением методов электрофизиологии, иммуногистохимии и молекулярной генетики.

Участие группы I mGluR в работе глутаматергического синапса показано на полукружных каналах лягушки [23, 40]. В этих исследованиях агонист mGluR I–II ACPD и специфический агонист mGluR I DHPG увеличивали частоту афферентных разрядов ампулярного нерва. Доказано, что активация пресинаптических mGluR облегчает глутаматергическую трансмиссию вследствие высвобождения внутриклеточного Ca^{2+} из IP3-чувствительных и рианодин/кофеин-чувствительных внутриклеточных Ca^{2+} -депо.

На вестибулярном аппарате лягушки с использованием иммуноцитохимических и электрофизиологических методов выявлена функциональная связь mGluR группы I с IP3R эндоплазматического ретикула, доказано участие IP3 в модуляции фоновой активности и механически вызванных ответов [41]. Совокупность опубликованных данных свидетельствует о том, что в вестибулярном аппарате земноводных присутствует гетерогенная популяция mGluR, активация которой связана с образованием IP3, запуском рецепторов рианодина и IP3 и выходом Ca^{2+} из цистерн эндоплазматического ретикула. Важно отметить, что увеличение частоты импульсной активности афферентных волокон, вызванное

аппликацией агониста mGluR ACPD, обусловлено только активностью mGluR и, следовательно, рецепторов RyR и IP3R, но не ионотропных, поскольку специфические антагонисты iGluR не изменяли амплитуду ответа агониста mGluR ACPD [23].

Афферентные волокна вестибулярного эпителия характеризуются фоновой активностью, которая отражает тоническое выделение глутамата волосковыми клетками [42]. Чувствительность вестибулярного аппарата к адекватным стимулам и информативность сигнала, поступающего в ЦНС, определяется соотношением фоновой и вызванной активности. Согласно современным представлениям, активация mGluR вестибулярного эпителия полукружных каналов формирует положительную обратную связь, увеличивая контраст между фоновой и вызванной активностью [23]. Эта гипотеза подтверждается и нашими данными, согласно которым аппликация агониста mGluR ACPD увеличивала амплитуду ответов агонистов iGluR [24].

Результаты наших пилотных экспериментов и представленные данные свидетельствуют о том, что NO может модулировать функцию mGluR. В наших экспериментах ингибитор NOS L-NAME в зависимости от концентрации уменьшал уровень фоновой активности афферентных волокон, но увеличивал амплитуду ответов агониста mGluR ACPD [21]. Эти результаты подтверждают гипотезу, согласно которой фоновая и вызванная активность афферентных волокон вестибулярного эпителия формируется за счет различных механизмов [42]. Полученные нами данные по влиянию ингибиторов NOS на фоновую активность афферентных волокон [13] соответствуют результатам, полученным на различных моделях акустико-латеральной системы: L-NAME ингибировал фоновую активность органов боковой линии [43]. Ингибиторы NOS L-NOARG и L-NAME понижали частоту фоновой активности вестибулярного нерва и ВПСР у аксолотля [1, 12]. На вестибулярном эпителии саккулюса лягушки при помощи специфического флуоресцентного зонда показано снижение синтеза NO в присутствии L-NAME [11]. Совокупность наших и опубликованных данных позволяет сделать вывод о том, что в вестибулярном эпителии в нормальных физиологических условиях выделяется незначительное количество NO, а наблюдаемый эффект понижения уровня фоновой активности и увеличения амплитуды ответов агониста mGluR ACPD на фоне блокады NOS ингибитором L-NAME является специфичным.

Ингибирующее влияние малых концентраций доноров NO на ответы агонистов mGluR изучали в двух сериях экспериментов при одновременной и последовательной аппликации NO и агонистов mGluR,

что позволило отделить возбуждающий эффект агонистов mGluR от возбуждающего эффекта донора NO на фоновую активность и сравнить влияние донора NO SNAP на iGluR и mGluR. Сопоставление данных показало, что при одновременной кратковременной аппликации донор NO увеличивал амплитуду ответов агонистов iGluR AMPA и NMDA [14], но уменьшал величину ответа агонистов mGluR ACPD и DHPG. Ингибирующий эффект SNAP на величину ответов агониста mGluR ACPD не зависел от концентрации.

Принято считать, что NO может модифицировать возбудимость нервных клеток при помощи двух основных механизмов: прямого взаимодействия непосредственно с белком ионного канала (реакция нитрозилирования) и путем активации сигнального каскада NO/sGC/cGMP/PKG [15, 44]. Оба пути выявлены в волосковых клетках внутреннего уха [18]. Для решения вопроса об участии растворимой гуанилатциклазы, а следовательно, и NO/sGC/cGMP сигнального каскада в ингибирующем влиянии NO на mGluR мы применяли специфический блокатор sGC ODQ, поскольку именно sGC является специфическим цитозольным рецептором NO [45].

В наших опытах специфический блокатор sGC ODQ подавлял запуск сигнального каскада NO-sGC-cGMP и устранял ингибирующее влияние донора NO SNAP, что предполагает участие этого пути в модуляции mGluR. На наш взгляд, ингибирование функции mGluR малыми концентрациями NO можно рассматривать как один из механизмов пластичности глутаматергического синапса, направленного на уменьшение положительной обратной связи [24]. Эта гипотеза требует дальнейших доказательств.

Прямых данных о влиянии NO на функцию mGluR нам обнаружить не удалось. Однако установлено, что NO может ингибировать сигнальный каскад, запускаемый G-белками. Принципиальная возможность фосфорилирования рецепторов IP3 и понижения концентрации внутриклеточного Ca²⁺ при активации PKG показана на клетках яичника китайского хомячка. В этих экспериментах увеличение концентрации внутриклеточного Ca²⁺, вызванное активацией сигнального каскада тромбин/G-белок/фосфолипаза C, полностью устранялось в присутствии 8-бром-cGMP, что свидетельствует о специфичности воздействия cGMP-стимулируемой киназы [46].

Аналогичные данные получены на культуре клеток, трансфицированных IP3R и инкубированных со специфическим аналогом cGKI, активируемым cGMP. Предынкубация клеток, экспрессирующих IP3R, комплекс IRAG и протеинкиназу cGKIβ, со специфическим аналогом 8-pCPT-cGMP уменьша-

ла вызванный брадикинином выход Ca^{2+} из внутриклеточного депо. Наблюдаемый эффект связывают с фосфорилированием белкового комплекса IRAG и уменьшением синтеза IP3 [37].

На разных экспериментальных моделях выявлены cGMP-зависимый и cGMP-независимый пути влияния NO на рецепторы саркоплазматического ретикулула. Предполагается, что NO может по-разному модифицировать функцию рецепторов рианодина и IP3. Эти два механизма различаются кинетикой активации и концентрацией NO, необходимой для запуска процесса модуляции. NO-активируемый ферментативный путь, ведущий к активации PKG и ингибированию синтеза IP3 (или фосфорилированию рецепторов IP3), запускается низкими концентрациями NO в течение секундного временного диапазона. Процесс нитрозилирования RyR инициируется более высокой концентрацией NO, развивается в течение нескольких минут и связан с увеличением активности Ca^{2+} -канала, ассоциированной с повышением вероятности его открытия [47, 48]. Таким образом, выход ионов Ca^{2+} из внутриклеточного депо может модулироваться во времени различными механизмами. Длительное воздействие высоких концентраций NO может вызывать нитрозилирующий стресс, приводящий к патологии [47, 49].

Наши данные подтверждают гипотезу, согласно которой NO может модифицировать функцию mGluR, причем модулирующий эффект зависит от концентрации и времени воздействия NO.

Кратковременное воздействие низких концентраций NO приводит к подавлению ответов агонистов mGluR и, следовательно, к уменьшению выхода Ca^{2+} из внутриклеточного депо. Этот механизм, на наш взгляд, может быть связан с механизмом пластичности глутаматергического синапса, с уменьшением положительной обратной связи и направлен против эксайтотоксичности [24]. Длительная активация сигнального каскада NO высокими концентрациями донора NO вызывает невысокое, но статистически значимое увеличение амплитуды ответов агонистов mGluR, что гипотетически может быть связано с активацией рецепторов рианодина. Эти предположения требуют дальнейшего экспериментального подтверждения.

Таким образом, в настоящей работе показано:

NO влияет на функцию агонистов различных групп mGluR (ACPD и DHPG).

Блокирование специфического рецептора NO устраняет ингибирующее влияние NO на функцию mGluR, что указывает на специфический эффект NO. (Доказательства участия различных звеньев пути NO в модуляции функции mGluR планируется получить в дальнейших экспериментах.)

Вектор влияния NO на функцию mGluR зависит от концентрации и времени воздействия, что указывает на динамический характер влияния NO. ●

*Работа выполнена при поддержке РФФИ
(грант № 14-04-00409).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Flores A., Leyn-Olea M., Vega R., Soto E. // *Neurosci. Lett.* 1996. V. 205. P. 131–134.
- Lysakowski A., Singer M. // *J. Comp. Neurol.* 2000. V. 427. P. 508–521.
- Takumida M., Anniko M. // *In vivo.* 2004. V. 18. P. 345–350.
- Takumida M., Anniko M. // *ORL J. Otorhinolaryngol. Relat. Spec.* 1998a. V. 60. P. 67–72.
- Popa R., Anniko M., Takumida M. // *Acta Otolaryngol.* 2000. V. 120. P. 350–358.
- Takumida M., Anniko M. // *Eur. Arch. Otorhinolaryngol.* 1998b. V. 255. № 4. P. 184–188.
- Park J.-S., Jeong H.-S. // *Jpn. J. Pharmacol.* 2000. V. 84. P. 425–430.
- Smith P.F., Zheng Y., Paterson S., Darlington C.L. // *Acta Otolaryngol. Suppl.* 2001. V. 545. P. 57–60.
- Hong S.H., Park S.K., Cho Y.-S., Lee H.-S., Kim K.R., Kim M.G., Chung W.-H. // *Hear. Res.* 2006. V. 211. P. 46–53.
- Takumida M., Anniko M., Moncada S., Bolaños J.P. // *J. Neurochem.* 2006. V. 97. P. 1676–1689.
- Lv P., Rodriguez-Contreras A., Kim H.J., Zhu J., Wei D., Choong-Ryoul S., Eastwood E., Mu K., Levic S., Song H., Petrov Y., et al. // *J. Neurophysiol.* 2010. V. 103. P. 2494–2505.
- Flores A., Vega R., Soto E. // *Neurosci.* 2001. V. 103. P. 457–464.
- Андрианов Ю.Н., Рыжова И.В., Тобиас Т.В. // *Сенс. сист.* 2011. Т. 25. № 4. С. 297–304.
- Андрианов Ю.Н., Рыжова И.В., Тобиас Т.В. // *Сенс. сист.* 2012. Т. 26. № 3. С. 204–213.
- Garthwaite J., Boulton C. // *Annu. Rev. Physiol.* 1995. V. 57. P. 683–706.
- Rand M., Li C. // *Annu. Rev. Physiol.* 1995. V. 57. P. 659–682.
- Schuman E.M., Madison D.V. // *Annu. Rev. Neurosci.* 1994. V. 17. P. 153–183.
- Almanza A., Navarrete F., Vega R., Soto E. // *J. Neurophysiol.* 2007. V. 97. P. 1188–1195.
- Behrend O., Schwark C., Kunihiro T., Strupp M. // *NeuroReport.* 1997. V. 8. P. 2687–2690.
- Chen J.W. Y., Eatock R.A. // *J. Neurophysiol.* 2000. V. 84. P. 139–151.
- Рыжова И.В., Ноздрачев А.Д., Тобиас Т.В., Орлов И.В., Чихман В.Н., Солнушкин С.Д. // *ДАН.* 2016. V. 469. P. 116–118.
- Takumida M., Anniko M. // *Acta Otolaryngol.* 2001. V. 121. P. 342–345.
- Guth P.S., Holt J.C., Perin P., Athas G., Garcia M., Puri A., Zucca G., Botta L., Valli P. // *Hear. Res.* 1998a. V. 125. P. 154–162.
- Andrianov G.N., Puyal J., Raymond J., Venteo S., Dememes D., Ryzhova I.V. // *Hear. Res.* 2005. V. 204. P. 200–209.
- Puyal J., Grassi S., Dieni C., Frondali A., Dememes D., Raymond J., Petorossi V.E. // *J. Physiol.* 2003. V. 553. P. 427–443.
- Anwyl R. // *Brain Res. Rev.* 1999. V. 29. P. 83–120.
- Bellone C., Lüscher C., Mameli M. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. V. 65. P. 2913–2923.

28. Pettorossi V.E., Dieni C.V., Scarduzio M., Grassi S. // *Neurosci.* 2011. V. 187. P. 1–14.
29. Nakanishi S. // *Neuron.* 1994. V. 13. P. 1031–1037.
30. Pin J.-P., Duvoisin R. // *Neuropharmacol.* 1995. V. 34. P. 1–26.
31. Conn P.J., Pin J.P. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 1997. V. 37. P. 205–237.
32. Roberts M. // *Neuropharm.* 1995. V. 34. P. 813–819.
33. Kew J.N., Kemp J.A. // *Psychopharmacol.* 2005. V. 179. P. 4–29.
34. Niswender C.M., Conn P.J. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2010. V. 50. P. 295–322.
35. Fill M., Copello J.A. // *Physiol. Rev.* 2002. V. 82. P. 893–922.
36. Kakizawa S. // *Front. Endocrinol.* 2013. V. 4. P. 1–6.
37. Schlossmann J., Ammendola A., Ashman K., Zong H., Huber A., Neubauer G., Wang G.-X., Allescher H.D., Korth M., Wilm M., et al. // *Nature.* 2000. V. 404. P. 197–201.
38. Kleinlogel S., Oestereich T.A., Ehrenberger K., Felix D. // *NeuroReport.* 1999. V. 10. P. 1879–1882.
39. Peng B.G., Li Q.X., Ren T.Y., Ahmad S., Chen S.P., Chen P., Lin X. // *Neurosci.* 2004. V. 123. P. 221–230.
40. Hendricson A.W., Guth P.S. // *Hear. Res.* 2002. V. 172. P. 99–109.
41. Rossi M.L., Prigioni I., Gioglio L., Rubbini G., Russo G., Martini M., Farinelli F., Rispoli G., Fesce R. // *Eur. J. Neurosci.* 2006. V. 23. P. 1775–1783.
42. Guth P.S., Perin P., Norris C.H., Valli P. // *Progr. Neurobiol.* 1998b. V. 54. P. 193–247.
43. Vega R., Ortega A., Almanza A., Soto E. // *Neurosci. Lett.* 2006. V. 393. P. 65–69.
44. Martines-Ruiz A., Cadenas S., Lamas S. // *Free Radical Biol. Med.* 2011. V. 51. P. 17–29.
45. Garthwaite J., Southam E., Boulton C., Nielsen E., Schmidt K., Mayer B. // *Mol. Pharmacology.* 1995. V. 48. P. 184–188.
46. Ruth P., Wang G.-X., Boekhoff I., May B., Pfeir A., Pennert R., Korth M., Breer H., Hofmann F. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. P. 2623–2627.
47. Ahern G., Klyachko V., Jackson M.B. // *Trends Neurosci.* 2002. V. 25. № 10. P. 510–517.
48. Stoyanovsky D., Murphy T., Anno P.R., Kim Y.-M., Salama G. // *Cell Calcium.* 1997. V. 21. № 1. P. 19–29.
49. Nakamura T., Lipton S.A. // *Neurochem. Res.* 2016. V. 41. № 3. P. 510–514.

УДК 57.065,582.282.192.3

Филогенетический анализ и молекулярное типирование трихотеценпродуцирующих грибов рода *Fusarium* из российских коллекций

А. А. Стахеев^{1*}, Л. В. Самохвалова¹, О. Д. Микитюк², С. К. Завриев¹¹Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10²Всероссийский научно-исследовательский институт фитопатологии, 143050, Московская обл., Одинцовский р-н, р.п. Большие Вяземы, ул. Институт, влад. 5

*E-mail: Stakheev.aa@gmail.com

Поступила в редакцию 26.04.2017

Принята к печати 27.03.2018

РЕФЕРАТ Проведен трехлокусный филогенетический анализ штаммов грибов рода *Fusarium*, депонированных во всероссийских коллекциях и предположительно способных к синтезу микотоксинов трихотеценовой группы. Исследован меж- и внутривидовой полиморфизм фрагментов гена фактора элонгации трансляции 1 альфа (*TEF1α*) и двух генов, входящих в трихотеценовый кластер – *TRI5* и *TRI14*. Анализ 60 штаммов различного происхождения позволил подтвердить и уточнить таксономическую характеристику некоторых штаммов с помощью ДНК-маркеров. Впервые на территории России идентифицирован штамм *F. commune* (F-900), а также выявлен штамм (F-846), филогенетически отличный от любого из охарактеризованных на данный момент видов *Fusarium*. Также показано, что штаммы *F. equiseti* из северо-западных регионов России относятся к североευропейской (I) группе, а северокавказский изолят – к южноевропейской (II). Частичные последовательности гена *TRI14* 9 из 12 исследованных видов охарактеризованы впервые. Сравнительный анализ выявил относительно высокий уровень внутривидового полиморфизма этих последовательностей, в частности у видов *F. graminearum* и *F. sporotrichioides*, однако не обнаружено какой-либо связи между различиями в структуре гена *TRI14* и географическим происхождением либо хемотипом штаммов. С помощью двух систем праймеров проведено молекулярное типирование штаммов-продуцентов трихотеценов типа В, позволившее охарактеризовать их специфические хемотипы. Принадлежность большинства исследованных штаммов к определенному хемотипу подтверждена методом ВЭЖХ.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ДНК-маркеры, идентификация, род *Fusarium*, трихотеценовые микотоксины, филогенетический анализ, хемотип.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПЦР – полимеразная цепная реакция; ТрМТ – трихотеценовые микотоксины; *TEF1α* – ген фактора элонгации трансляции 1 альфа; *TRI5* – ген триходииенсинтетазы.

ВВЕДЕНИЕ

Грибы рода *Fusarium*, относящегося к классу аскомицетов, занимают разнообразные экологические ниши и встречаются в различных климатических поясах. На территории России виды *Fusarium* распространены во всех регионах, в которых выращивают сельскохозяйственные культуры, в первую очередь злаки. Этот гриб причиняет существенный ущерб сельскохозяйственной и пищевой промышленности, исчисляемый сотнями миллионов долларов ежегодно. Кроме того, микотоксины, продуцируемые представителями рода *Fusarium*, представляют угрозу здоровью человека и животных, а также действуют

как факторы патогенности по отношению к растениям [1].

Наиболее обширной группой токсических метаболитов, продуцируемых грибами рода *Fusarium*, являются трихотеценовые микотоксины (ТрМТ). Трихотеценовые микотоксины продуцируются не только представителями рода *Fusarium*, но и родов *Myrothecium*, *Trichoderma*, *Cephalosporium*, *Verticimonosporium*, *Stachybotrys* [2]. На сегодняшний день выявлено около 200 трихотеценовых токсинов [3–6]. ТрМТ представляют собой сесквитерпеновые соединения, состоящие из трех колец, у которых при атомах С-12–С-13 находится эпоксидное кольцо,

а при С-9–С-10 – двойная связь, поэтому группа носит название 12,13-эпокситрихотец-9-ены. В зависимости от структуры боковых групп трихотеценовые токсины делятся на четыре типа (А–D), при этом лишь А и В продуцируются грибами рода *Fusarium*. К более токсичным представителям трихотеценов типа А относятся диацетоксисцирпенол (ДАС), а также токсины Т-2 и НТ-2, а основными продуцентами этих токсинов являются *F. sporotrichioides* и *F. langsethiae*. В 2015–2016 гг. была описана новая группа трихотеценовых токсинов типа А, получившая название NX [7, 8]. Интересно, что эти соединения идентифицированы в культурах *F. graminearum*, традиционного продуцента ТрМТ В-типа. Тип В представлен такими соединениями, как ниваленол (НИВ), дезоксиниваленол (ДОН), а также их ацетилированными производными (3- и 15-АДОН и 4,15-АНИВ), которые продуцируются *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, а также группой видов, известной под названием *F. graminearum* species complex (FGSC) [9, 10]. Кроме того, *F. poae*, *F. venenatum* и *F. equiseti* способны продуцировать токсины, относящиеся как к А-, так и к В-типам [11]. Тип токсинов, продуцируемых тем или иным штаммом, определяется структурой и функциями генов, входящих в состав трихотеценового кластера [12, 13]. У большинства трихотеценообразующих видов *Fusarium* в состав основного кластера входят 12 генов, кодирующих как ферменты, ответственные за различные этапы биосинтеза, так и регуляторные факторы, некоторые из которых контролируют экспрессию большого числа генов, связанных с различными аспектами метаболизма и жизнедеятельности грибов [14]. Трихотеценовые токсины ингибируют синтез белка у эукариот [15], а такие трихотецены, как ДОН, представляют собой важные факторы агрессивности, способствуя распространению гриба по тканям растения-хозяина. Показано, что искусственная инокуляция колоса злаков мутантными штаммами *F. graminearum*, у которых нарушен синтез ДОН, приводила к поражению меньшего количества зерновок, чем инокуляция штаммами дикого типа [16].

Опасность, которую представляют грибы рода *Fusarium* и продуцируемые ими микотоксины, делает необходимой разработку методов быстрого и надежного определения видовой принадлежности штаммов, что позволит определять спектр соединений, накапливающихся в культуре или партии зерна. На сегодняшний день важную роль в таксономических исследованиях рода *Fusarium* и идентификации его представителей играют методы, основанные на анализе полиморфизма ДНК. Применение молекулярно-генетического подхода позволило более

четко установить стандарты и границы видов, а также охарактеризовать целый ряд новых таксонов. В частности, мультилокусный филогенетический анализ с использованием ДНК-маркеров с охарактеризованной последовательностью нуклеотидов (SCAR-маркеры [17]) на основе 13 генов «домашнего хозяйства» позволил выявить 9 новых видов в составе FGSC [10], который ранее считался единым видом *F. graminearum*. Чуть позднее этот комплекс был дополнен также видами *F. vorosii* и *F. gerlachii* [18]. Всего в составе комплекса FGSC выделяют 16 филогенетических видов [19]. Применение филогенетического подхода дало возможность подтвердить статус *F. pseudograminearum* и *F. culmorum* как самостоятельных видов [20, 21]. На территории России с помощью анализа полиморфных ДНК-маркеров идентифицированы группы штаммов, впоследствии охарактеризованные как два новых вида – *F. ussuriatum*, морфологически и фенотипически сходный с *F. graminearum* [22], и *F. sibiricum*, близкородственный *F. sporotrichioides* [23]. Ряд недавних филогенетических исследований позволил установить сложную структуру комплекса видов *F. equiseti*–*F. incarnatum* (FIESC) и выделить в его составе несколько новых видов [24]. Кроме того, изучение меж- и внутривидового полиморфизма ДНК позволило разработать ряд высокоспецифичных систем диагностики и идентификации основных возбудителей фузариоза, прежде всего, основанных на ПЦР и ее модификациях [25–29]. Применение современных молекулярно-биологических и биоинформатических методов, в том числе полногеномного секвенирования [30, 31], существенно ускорило изучение генетического разнообразия рода *Fusarium* и функциональную характеристику элементов геномов, однако поиск эффективных методов молекулярного маркирования и информативных ДНК-баркодов остается по-прежнему актуальным [32, 33].

Род *Fusarium* отличается от большинства других таксонов царства Грибы (Fungi). «Золотым стандартом» молекулярной таксономии грибов считается область внутреннего транскрибируемого спейсера рибосомной ДНК (*ITS*) [34]. Однако в геноме представителей рода *Fusarium* эти маркеры представлены двумя неортологичными копиями и не обладают достаточным уровнем межвидового полиморфизма [35]. На сегодняшний день в филогенетических и таксономических исследованиях в качестве маркера наиболее часто используется ген *TEF1α* [36, 37]. Интересным представляется использование в качестве филогенетических маркеров генов, вовлеченных в биосинтез микотоксинов. Так, ген, кодирующий триходиенсинтетазу (*TRI5*), ранее использовали для разработки систем видоспеци-

фичных праймеров [38] и изучения внутривидового полиморфизма представителей комплекса видов *F. equiseti* [39, 40]. Однако филогенетические характеристики гена *TRI5* не сравнивали с характеристиками «классических» маркеров, таких, как *TEF1α*. Среди других генов, входящих в состав трихотецевого кластера и применяемых в филогенетических исследованиях, необходимо отметить *TRI1*, кодирующий цитохром-Р450-монооксигеназу, и *TRI12*, кодирующий белок, участвующий в транспорте токсинов из клетки [41]. Филогенетический анализ гена *TRI1* позволил идентифицировать группу штаммов *F. graminearum*, обладающих способностью к синтезу токсина NX-2 [7]. Полиморфизм гена *TRI12* использовали для дизайна праймеров, выявляющих штаммы-продуценты ТрМТ типа В в соответствии с их хемотипом (3/15-АДОН, НИВ) [42]. В состав трихотецевого кластера входит также ряд генов, практически не охарактеризованных ни структурно, ни функционально, таких, как *TRI9* и *TRI14* [43].

Содержащиеся во всероссийских коллекциях штаммы *Fusarium*, потенциально способные к синтезу ТрМТ и представляющие различные климатогеографические зоны России, практически не охарактеризованы молекулярно-генетическими методами. Поэтому основными целями нашей работы были: (1) анализ корректности таксономической идентификации трихотеценпродуцирующих штаммов *Fusarium*, депонированных во всероссийских коллекциях, с помощью SCAR-маркеров; (2) изучение молекулярно-генетического разнообразия штаммов различного географического происхождения, выделенных в разные годы и из разных источников; (3) определение меж- и внутривидового полиморфизма гена *TRI14*, одного из наименее изученных генов трихотецевого кластера; (4) определение хемотипов штаммов-продуцентов ТрМТ типа В с помощью известных систем праймеров, с подтверждением полученных результатов методом ВЭЖХ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Штаммы грибов

В работе анализировали 60 штаммов 12 видов грибов рода *Fusarium*, депонированных во всероссийских коллекциях и предположительно обладающих способностью к биосинтезу ТрМТ. При выборе штаммов исходили из максимального охвата различных природно-географических зон России. Кроме того, в исследование были включены штаммы из ряда сопредельных государств, а также из Молдовы и Германии. Кроме того, изучен штамм *F. graminearum* F-892 (ВКПМ), депонированный в базе данных StrainInfo (<http://www.straininfo.net>)

под номером АТСС 36015. Перечень штаммов с указанием их географического происхождения, видов растений-хозяев, годами сбора и принадлежности к той или иной коллекции приведен в табл. 1. Дополнительно с помощью лабораторного микроскопа МИКМЕД 6 («Ломо», Россия) определяли морфологические характеристики ряда штаммов, первоначальная идентификация которых не подтверждалась молекулярными методами. Для проведения микроскопического анализа штаммы грибов выращивали в течение 10–14 сут на гвоздично-листовом агаре (ГЛА) и синтетической среде Ниренберга (SNA).

Выделение ДНК

Перед выделением ДНК моноспоровые культуры грибов выращивали на картофельно-сахарозном агаре (КСА) в течение 10 сут при комнатной температуре до получения обильного мицелия. ДНК из моноспоровых культур грибов выделяли с помощью метода, основанного на использовании цетилтриметиламмоний бромида в качестве детергента, с учетом модификаций, описанных нами ранее [28]. Концентрацию образцов ДНК и их чистоту оценивали с помощью спектрофотометра NanoVue (GE HealthCare, США).

Дизайн универсальных праймеров, проведение ПЦР, секвенирование

Для амплификации частичных последовательностей генов *TEF1α*, *TRI5* и *TRI14* сконструированы пары праймеров TEF50F (5'-CGACTCTGGCAAGTCGACCAC-3') и TEF590R (5'-CTCGGCTTTGAGCTTGTCAAG-3'); TRI5F (5'-ACACTGGTTCTGGACGACAGCA-3') и TRI5R (5'-CCATCCAGTTCTCCATCTGAG-3'); TRI14F (5'-GAAGCTGCCTCGACATGGCTC-3') и TRI14R (5'-AATAATATTATGGGGAACAATCAT-3').

Праймеры подбирали с использованием алгоритма ClustalW [44]. Физико-химические свойства праймеров оценивали с помощью программы Oligo 6.71.

ПЦР проводили с использованием следующих программ амплификации.

Праймеры TEF50F-590R: 93°C, 90 с; 93°C, 20 с; 64°C, 5 с; 67°C, 5 с (5 циклов); 93°C, 1 с; 64°C, 5 с; 67°C, 5 с (40 циклов).

Праймеры TRI5F-R и TRI14F-R: 93°C, 90 с; 93°C, 10 с; 55°C, 15 с; 72°C, 10 с (40 циклов).

ПЦР и электрофоретический анализ проводили согласно [27, 28].

Продукты ПЦР клонировали с использованием системы InstA Clone PCR Cloning Kit (Fermentas, Литва) в соответствии с протоколом производителя. ДНК секвенировали в ЗАО «Евроген» с использованием набора реактивов ABI PRISM BigDye

Таблица 1. Штаммы грибов рода *Fusarium*, использованные в работе

№	№ коллекции	Вид	Происхождение	Источник	Год выделения
1	М-99-43*	<i>F. culmorum</i>	Московская обл.	Пшеница	1999
2	09-1/7*	<i>F. culmorum</i>	Московская обл.	Пшеница	2009
3	М-99-9*	<i>F. culmorum</i>	Московская обл.	Пшеница	1999
4	М-10-1*	<i>F. culmorum</i>	Московская обл.	Пшеница	2010
5	BR-03-19*	<i>F. culmorum</i>	Брянская обл.	Пшеница	2003
6	BR-0453*	<i>F. culmorum</i>	Брянская обл.	Пшеница	2004
7	OM-0233*	<i>F. culmorum</i>	Омская обл.	Пшеница	2002
8	OR-02-37*	<i>F. culmorum</i>	Орловская обл.	Пшеница	2002
9	CM-9864*	<i>F. culmorum</i>	Смоленская обл.	Пшеница	1998
10	KP-1136-66*	<i>F. culmorum</i>	Кировская обл.	Пшеница	1995
11	KP-1599-25/3*	<i>F. culmorum</i>	Кировская обл.	Пшеница	1996
12	KS-1384-1*	<i>F. culmorum</i>	Кировская обл.	Пшеница	2007
13	М-05-111*	<i>F. culmorum</i>	Московская обл.	Пшеница	2005
14	КС-1716-8*	<i>F. culmorum</i>	Кировская обл.	Пшеница	1997
15	58801**	<i>F. culmorum</i>	Московская обл.	Пшеница	2004
16	Kz-27*	<i>F. culmorum</i>	Костанайская обл., Казахстан	Неизвестно	2014
17	74007**	<i>F. culmorum</i>	Архангельская обл.	Картофель	Неизвестно
18	58030**	<i>F. culmorum</i>	Ростовская обл.	Бодяк	2004
19	70505**	<i>F. culmorum</i>	Беларусь	Пшеница	2003
20	50106**	<i>F. culmorum</i>	Ленинградская обл.	Бодяк	2006
21	64722**	<i>F. cerealis</i>	Хабаровский край	Пшеница	2006
22	39295**	<i>F. cerealis</i>	Провинция Хэйлунцзян, Китай	Пшеница	2003
23	37032**	<i>F. cerealis</i>	Провинция Хэйлунцзян, Китай	Пшеница	2003
24	39142**	<i>F. cerealis</i>	Провинция Хэйлунцзян, Китай	Пшеница	2003
25	37031**	<i>F. cerealis</i>	Провинция Хэйлунцзян, Китай	Пшеница	2003
26	41727**	<i>F. cerealis</i>	Северная Осетия	Бодяк	2004
27	G.8-8**	<i>F. graminearum</i>	Германия	Пшеница	1998
28	41806**	<i>F. graminearum</i>	Северная Осетия	Пшеница	2004
29	48702**	<i>F. graminearum</i>	Тульская обл.	Пшеница	Неизвестно
30	58033**	<i>F. graminearum</i>	Ленинградская обл.	Пшеница	2002
31	70725**	<i>F. graminearum</i>	Орловская обл.	Пшеница	2006
32	58212**	<i>F. ussurianum</i> ¹	Приморский край	Пшеница	Неизвестно
33	29813**	<i>F. ussurianum</i>	Еврейская АО	Пшеница	2002
34	MM-7*	<i>F. sporotrichioides</i>	Московская обл.	Пшеница	2010
35	KG-9744*	<i>F. sporotrichioides</i>	Кировская обл.	Пшеница	Неизвестно
36	78105**	<i>F. sporotrichioides</i>	Орловская обл.	Пшеница	2006
37	SK-1506*	<i>F. sporotrichioides</i>	Северная Осетия	Пшеница	2010
38	64706**	<i>F. sporotrichioides</i>	Приморский край	Ячмень	2006
39	33100**	<i>F. sporotrichioides</i>	Приморский край	Пшеница	2003
40	74006**	<i>F. sporotrichioides</i>	Ленинградская обл.	Ячмень	2006
41	11007**	<i>F. sibiricum</i>	Красноярский край	Ячмень	2000
42	11014**	<i>F. sibiricum</i>	Амурская обл.	Овёс	2001
43	55201**	<i>F. langsethiae</i>	Калининградская обл.	Овёс	2005
44	82901**	<i>F. langsethiae</i>	Орловская обл.	Овёс	2003
45	47401**	<i>F. poae</i>	Московская обл.	Пшеница	2004
46	61701**	<i>F. poae</i>	Саратовская обл.	Пшеница	2005
47	58242**	<i>F. venenatum</i>	Германия	Неизвестно	Неизвестно
48	58514**	<i>F. venenatum</i>	Ленинградская обл.	Овёс	2013
49	58455**	<i>F. venenatum</i>	Новгородская обл.	Пшеница	2001
50	F-842***	<i>F. sambucinum</i>	Киевская обл., Украина	Картофель	1965
51	F-3966***	<i>F. sambucinum</i> ²	Тульская обл.	Почва	2006
52	F-4360***	<i>F. sambucinum</i> ²	Бурятия	Древесина	2005
53	64414**	<i>F. equiseti</i>	Калининградская обл.	Ячмень	2006
54	65901**	<i>F. equiseti</i>	Ленинградская обл.	Ячмень	2006
55	97001**	<i>F. equiseti</i>	Северная Осетия	Пшеница	2007
56	F-3549***	<i>F. equiseti</i> ²	Пустыня Негев, Израиль	Почва	1995
57	F-2681***	<i>F. incarnatum</i>	Московская обл.	Неизвестно	1966
58	F-846***	<i>F. sp.</i> ³	Молдова	Дыня	1958
59	F-892 (ATCC36015)****	<i>F. graminearum</i>	США	Неизвестно	1977
60	F-900****	<i>F. sambucinum</i> ²	Красноярский край	Лиственница сиб.	Неизвестно

* Штаммы из коллекции ВНИИФ; ** штаммы из коллекции ВИЗР; *** штаммы из коллекции ИБФМ; **** штаммы из коллекции ГосНИИГенетика.

¹ Первоначально идентифицирован как *F. graminearum*.

² В ходе работы видовая принадлежность не подтвердилась.

³ Первоначально идентифицирован как *F. poae*.

Terminator v. 3.1. с последующим анализом продуктов реакции на автоматическом секвенаторе ABI PRISM 3730 Applied Biosystems.

Охарактеризованные в настоящей работе последовательности нуклеотидов депонированы в GenBank NCBI под номерами: MG989711-989751 (*TEF1α*), MN001611-001651 (*TRI5*), MN001652-001692 (*TRI14*).

Филогенетический анализ

ДНК-маркеры с охарактеризованной последовательностью нуклеотидов сравнивали с последовательностями, депонированными в базах данных GenBank NCBI и Fusarium MLST (<http://www.westerdijkinstituut.nl/fusarium/>) с помощью алгоритма BLAST. Построение филогенетических деревьев проводили с использованием метода максимального правдоподобия (maximum likelihood, ML) и модели нуклеотидных замен GTR+G (General Time Reversible, с гамма-распределением) [45] в программе MEGA5.1 [46]. Помимо исследуемых штаммов в филогенетическом анализе использовали ряд последовательностей соответствующих генов типовых штаммов из международных коллекций, депонированных в базах данных. Достоверность топологий филогенетических деревьев подтверждали с помощью бутстреп-анализа с 1000 повторностей. Инсерции и делеции при проведении анализа не учитывали. Количество вариабельных, филогенетически информативных нуклеотидов и гаплотипов для каждого маркера вычисляли, используя выборку из 41 штамма в программе DnaSP v6 [47].

Молекулярное типирование продуцентов ТрМТ типа В

С целью определения хемотипов продуцентов ТрМТ типа В анализировали штаммы *F. graminearum*, *F. culmorum*, *F. cerealis*, *F. ussuriarum*. Хемотип-специфичную ПЦР проводили с использованием трех наборов праймеров: два набора праймеров на полиморфные участки гена *TRI12* [42] (набор обозначен нами как 12-1), [48] (12-2), а также пара праймеров, амплифицирующая фрагменты последовательности гена *TRI13* разной длины в зависимости от хемотипа [49] (13-1). Структура праймеров и температура их плавления приведены в табл. 2. При этом в случае системы 12-2 анализ решено проводить с каждой парой праймеров отдельно, а не в формате мультиплексной ПЦР [48], что позволит повысить специфичность анализа, а также избежать образования неспецифических ампликонов.

Полученные результаты подтверждали с помощью количественной ПЦР (кПЦР) с парами праймеров из систем 12-1 и 12-2. В состав реакционной смеси, помимо стандартных компонентов, добавляли по 1.5 мкл 20× красителя EvaGreen (Biotium, США). Амплификацию и детекцию флуоресцентного сигнала проводили в детектирующем амплификаторе ДТ-96 («ДНК-Технология», Россия). Результаты ПЦР выражали в значении пороговых циклов (quantification cycle, C_q , [50]). Анализ каждого образца проводили в двух независимых повторностях.

Таблица 2. Праймеры, использованные для хемотипирования штаммов, продуцирующих ТрМТ типа В

Набор праймеров	Структура праймеров	Длина продукта, п.н.	$T_{пл}$, °C	Хемотип	Ссылка
12-1	12CON (унив.): 5'-CATGAGCATGGTGATGTC-3'				[48]
	12 NF: 5'-TCTCCTCGTTGTATCTGG-3'	840	60	НИВ	
	12-15F: 5'-TACAGCGGTCGCAACTTC-3'	670	60	15-АДОН	
	12-3F: 5'-CTTTGGCAAGCCCGTGCA-3'	410	60	3-АДОН	
12-2	3ADONf: 5'-AACATGATCGGTGAGGTATCGA-3' 3ADONr: 5'-CCATGGCGCTGGGAGTT-3'	60	60	3-АДОН	[42]
	15ADONf: 5'-GTTTCGATATTCATTGGAAAGCTAC-3' 15ADONr: 5'-CAAATAAGTATCGTCTGAAATTGGAAA-5'	57	60	15-АДОН	
	NIVf: 5'-GCCCATATTCGCGACAATGT-5' NIVr: 5'-GGCGAAGTATGAGTAACAAAACC-3'	77	60	НИВ	
	Tri13P1: 5'-CTCSACCGCATCGAAGASTCTC-3' Tri13P2: 5'-GAASGTCGCARGACCTTGTTTC-3'	859 644 583	62	15-АДОН 3-АДОН НИВ	
13-1				[49]	

Примечание: унив. – универсальный праймер.

Анализ токсинообразования штаммов-продуцентов ТрМТ типа В методом ВЭЖХ

Для определения типа ТрМТ, продуцируемых исследуемыми штаммами, культуры грибов выращивали на жидкой среде MYRO [51] при 25°C, 220 об/мин в течение 5 сут. Способность изолятов продуцировать ДОН и его моноацетилованные производные определяли, анализируя отделенный от мицелия центрифугированием супернатант культурального фильтрата, с помощью жидкостной хроматографии высокого давления с обращенной фазой [52, 53]. Аликвоту супернатанта культуральной жидкости объемом 8 мл разбавляли смесью ацетонитрил : вода (1 : 1) до 10 мл, пропускали через мембранный фильтр Millipore с диаметром пор 0.22 мкм и вводили 10 мкл образца в инжектор жидкостного хроматографа Waters 1525 Breeze, снабженного УФ-детектором Waters 2487 (Waters, США). Разделение проводили на колонке Symmetry C18 (150 × 4.6 мм), которую термостатировали при 27°C. Микотоксины элюировали смесью ацетонитрил : метанол : вода (1 : 1 : 8 об/об/об – подвижная фаза) со скоростью потока 0.5 мл/мин и детектировали при 254 нм. В качестве стандартов использовали коммерческие препараты ДОН, 3-АцДОН и 15-АцДОН (Sigma-Aldrich, США), а в качестве контроля – фильтрат неинокулированной среды MYRO, которую инкубировали одновременно с выращиванием погруженных культур грибов в указанных выше условиях.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Филогенетические свойства генов, анализ их частичных последовательностей с помощью алгоритма BLAST, микроскопический анализ морфологии штаммов со спорной идентификацией

Основные филогенетические свойства анализируемых генов приведены в табл. 3. ДНК всех штаммов при амплификации с парой праймеров 50F-590R образовывала единственный продукт амплификации размером от 452 до 483 п.о., содержащего два интрона

длиной от 80 до 100 и от 236 до 254 п.н. За вычетом инсерций и делеций, не учитываемых при оценке филогенетических свойств, длина анализируемых последовательностей составила 392 п.н., включая 129 (32.9%) варьируемых нуклеотидов. Число филогенетически информативных позиций – 115 (29.3%), число гаплотипов – 17. Анализ последовательностей гена *TEF1α* с применением алгоритма BLAST подтвердил первоначальную видовую идентификацию 54 штаммов. Из шести штаммов, идентификация которых не была подтверждена, три были изначально охарактеризованы как *F. sambucinum*. Показано, что последовательности *TEF1α* штаммов F-3966 (№ 51, см. табл. 1), NRRL 52726, относящегося к комплексу *F. tricinctum* species, и NRRL 52727 (*F. avenaceum*), сходны на 99.3%. Сходство штамма F-4360 (№ 52) со штаммом *F. acuminatum* NRRL 52789 составляет 99.545%. Последовательность гена *TEF1α* штамма F-900 (№ 60) на 100% сходна с последовательностью фрагмента этого гена штамма NRRL 52764 *F. commune*. Не подтверждена первоначальная видовая принадлежность штамма F-3549 (№ 56), морфологически идентифицированного как *F. equiseti*: BLAST-анализ выявил 99% сходство с последовательностью штамма NRRL 34033 относительно редкого вида *F. brachygibbosum*. Штамм 58212 (№ 32), первоначально идентифицированный как *F. graminearum*, показал 100% сходство последовательности *TEF1α* со штаммами CBS 123751-123745, типовыми для *F. ussurianum*. Наиболее интересный результат получен при анализе результатов секвенирования маркерной последовательности штамма F-846, первоначально идентифицированного как *F. roae*. Сравнение с последовательностями *TEF1α* типовых штаммов, депонированными в базах данных, не выявило 100% сходства ни с одной из них. Наиболее близкой была последовательность штамма F-0016 вида *F. polyphialidicum* (DQ295144, сходство 97%).

Пара праймеров TRI5F-R обеспечивала амплификацию ДНК всех исследуемых штаммов, за исклю-

Таблица 3. Филогенетические характеристики анализируемых последовательностей нуклеотидов

Локус	ДП, п.н.	GC, %	ВП, %	ФИП, %	Число ГТ	H _d	P _i
<i>TEF1α</i>	392	53.2	32.9	29.3	17	0.933	0.08872
<i>TRI5</i>	379	48.5	37.2	36.1	13	0.907	0.13586
<i>TRI14</i>	650	49.1	36.8	34.5	23	0.96	0.13510
<i>TEF1α + TRI5 + TRI14</i>	1421	50	35.9	33.5	28	0.976	0.1233

Примечание. ДП – длины анализируемых последовательностей, GC – GC-состав, ВП – варьируемые позиции (variable sites), ФИП – филогенетически информативные позиции (parsimony informative sites), ГТ – гаплотипы, H_d – гаплотипическое разнообразие, P_i – нуклеотидное разнообразие.

чением № 51, 52, 56 и 60. Продукт амплификации гена *TRI5* длиной 431–440 п.н. содержал один интрон длиной 52–61 п.н. Длина анализируемых последовательностей составила 379 п.н., в том числе 141 (37.2%) вариабельная позиция и 137 (36.1%) филогенетически информативных, число гаплотипов – 13. Анализ последовательностей с помощью BLAST подтвердил корректность видовой идентификации 54 штаммов. Продукт амплификации ДНК штамма 58212 показал 99% сходство с последовательностью фрагмента гена *TRI5 F. asiaticum* (штаммы NRRL 26156, 28720). Необходимо отметить, что ни одна из баз данных не содержала записей о полных или частичных структурах этого гена у штаммов *F. ussurianum*, однако, принимая во внимание близкое родство *F. asiaticum* и *F. ussurianum* [7], этот результат представляется достоверным. Продукт амплификации ДНК штамма F-846 был на 98% сходным с частичной последовательностью гена *TRI5* штамма *F. langsethiae* KF2640 (JF966259).

При проведении ПЦР с парой праймеров TRI14F-R не были выявлены продукты амплификации ДНК образцов № 51, 52, 56, 60 (как и в случае пары TRI5F-R), а также № 58 (F-846). ДНК остальных штаммов амплифицировалась с образованием продуктов размером от 698 до 705 п.н., содержащих один интрон длиной от 50 до 59 п.н. Длина анализируемой последовательности (без учета вставок и делеций) составила 650 п.н., из которых 239 (36.8%) вариабельные, а 224 (34.5%) – филогенетически информативные, число гаплотипов – 23. Поиск сходных последовательностей в базах данных GenBank и Fusarium MLST показал, что исследованные штаммы *F. graminearum* составляют две группы: первая, в которую входят № 30 и 58, показала 100% сходство с последовательностью *TRI14* штамма CBS 138562 (KU572434.1), в то время как вторая (№ 27–29, 31) полностью идентична последовательности штамма CBS 138561 (KU572429.1), при этом сходство последовательностей в этих двух группах составляло 97%.

Проведен микроскопический анализ основных морфологических структур штаммов, первоначальная идентификация которых не была подтверждена при анализе маркерных последовательностей. У штаммов F-3966 и F-4360, растущих на ГЛЖ, выявлены удлиненные изогнутые макроконидии с тремя-четырьмя перегородками, характерными для *F. avenaceum*, *F. tricinctum* и *F. acuminatum* [54]. Штамм F-900 также формировал изогнутые макроконидии с четырьмя перегородками и микроконидии овальной формы размером порядка 10 мкм – признаки, соответствующие характеристикам вида *F. commune* [55]. У штамма F-846 обнаружены толстостенные микроконидии с четырьмя-пятью перегородками, а также

овальные и булавовидные микроконидии. Этот результат подтверждает предположение об ошибочности первоначальной идентификации штамма как *F. roae*, поскольку для этого вида характерны шаровидные или остроконечные микроконидии, а также редко формирующиеся макроконидии, как правило, с тремя перегородками [54].

Анализ топологии филогенетических деревьев

Филогенетические деревья, построенные на основе структур трех изучаемых генов, имели как сходство, так и ряд существенных топологических различий. На дендрограмме гена *TEF1α* (рис. 1) присутствуют четыре крупных кластера, поддержанных высокими значениями бутстрепа (98–99%). Каждый кластер включал штаммы видов, характеризующихся сходными спектрами продуцируемых микотоксинов. Кластер I (бутстреп-поддержка 98%) представлен видами, продуцирующими ТрМТ типа В (в том числе *F. pseudograminearum* CBS109954, номер КМ434220), кластер II (99%) сформирован продуцентами ТрМТ типа А, кластер III (98%) представлен видами, образующими оба типа ТрМТ, а кластер IV (99%) – видами *F. equiseti* и *F. incarnatum*, также способными продуцировать токсины как типа А, так и В, однако, в отличие от *F. roae* и близкородственных видов, они обладают также способностью к синтезу зеараленона и некоторых других микотоксинов. Необходимо отметить, что кластеры I–III и IV формировали отдельные группы, поддержанные высокими значениями бутстрепа (99%), а «*F. sp.*» (штамм F-846 *Fusarium sp.*) занимал промежуточное положение между этими двумя группами. Кластеры I и II включали в себя по две подгруппы: первую подгруппу кластера I (поддержка 99%) составили штаммы видов *F. culmorum* и *F. cerealis*, а вторую (98%) – *F. graminearum* и *F. ussurianum*. В кластере II подгруппы были представлены видами *F. langsethiae* и *F. sporotrichioides/F. sibiricum* (бутстреп-поддержка по 99% каждая). Наиболее неоднородным был кластер IV, представленный видами *F. equiseti* и *F. incarnatum*. Два типовых штамма *F. incarnatum* (NRRL 22244 и NRRL 34059) формировали отдельную группу, поддержанную значением бутстрепа 59%, в которую, однако, не вошел штамм F-2681, исследованный в настоящей работе. Штамм *F. equiseti* 97001 сформировал подгруппу (90%) вместе со штаммами H2-2-5B (JF496575) и 10393 (LN901566), а штаммы 65901 и 64414 вошли в состав другой подгруппы (99%), куда также входили штаммы VI01095 (AJ543560), VI01070 (AJ543562) и 10675 (LN901573).

Бутстреп-поддержка основных кластеров, соответствующих токсигенным профилям исследуемых видов, на дендрограмме гена *TRI5* (рис. 2) состав-

Рис. 1. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнения частичных последовательностей нуклеотидов гена *TEF1α* видов-производителей ТрМТ с помощью метода максимального правдоподобия (74 последовательности). Показаны значения бутстрепа более 50% для 1000 повторностей. В анализ включена 21 последовательность типовых штаммов, депонированных в GenBank NCBI

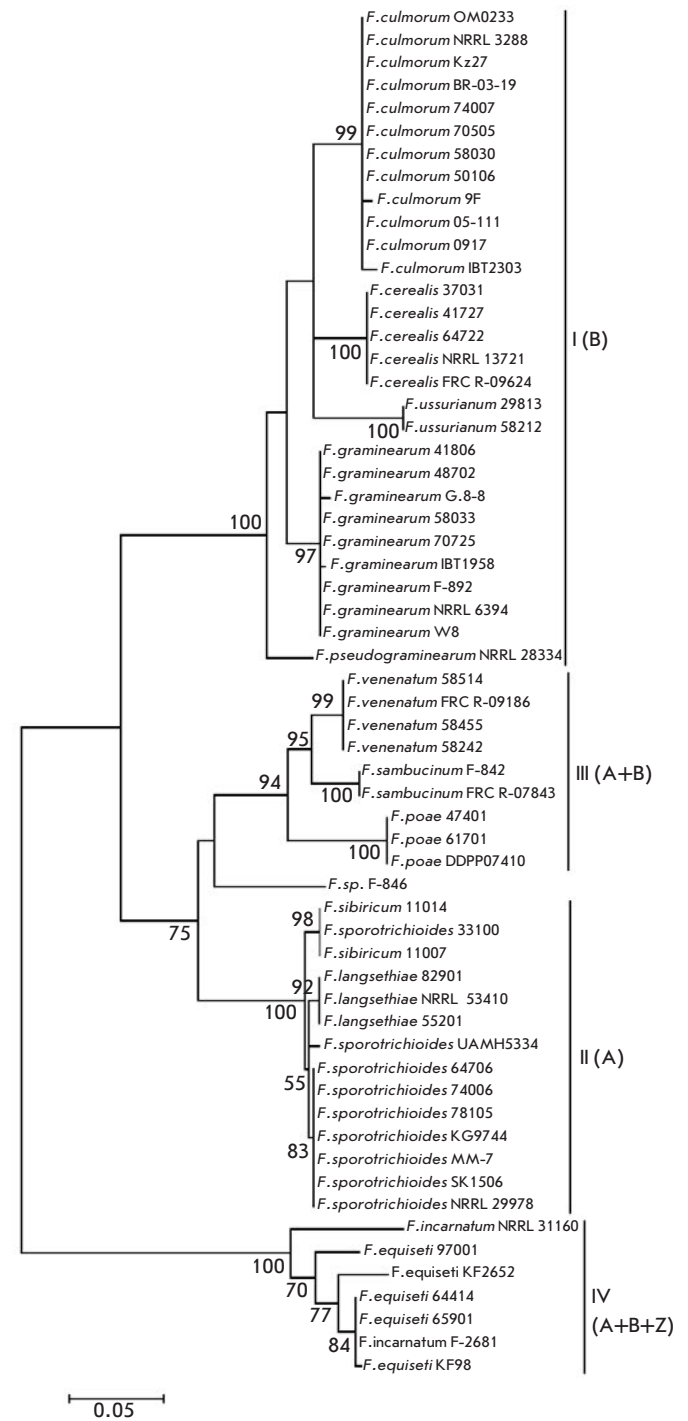
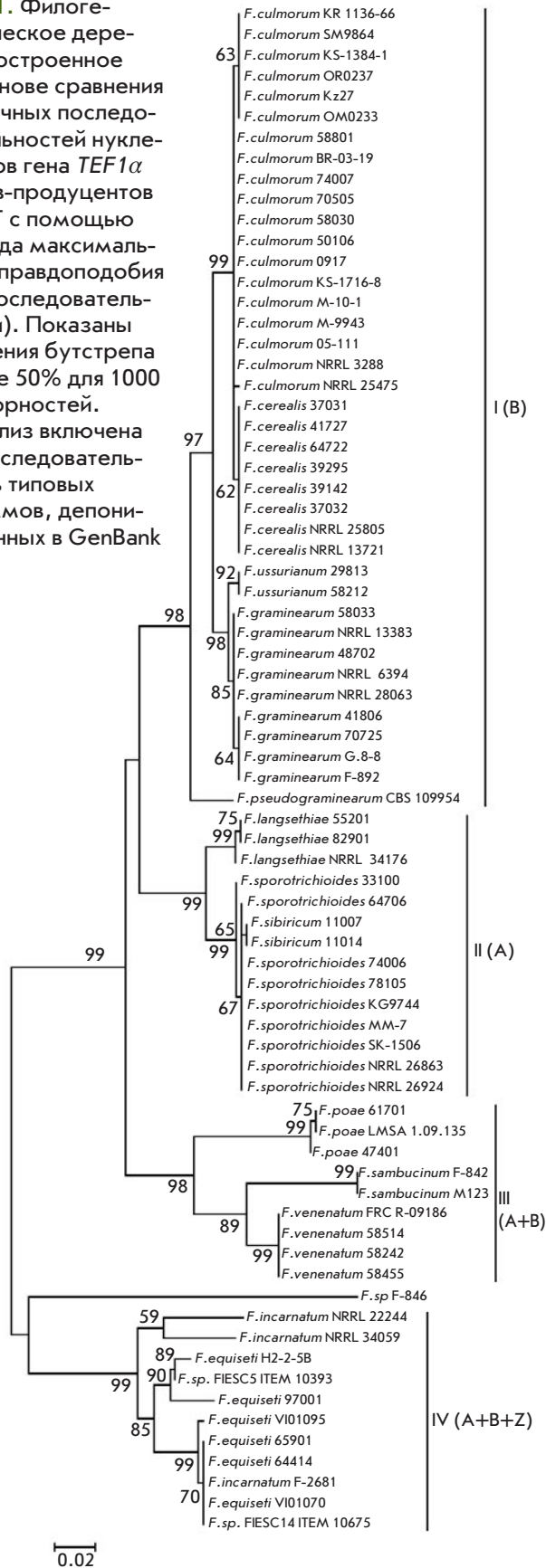


Рис. 2. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнения частичных последовательностей нуклеотидов гена *TR15* видов-производителей ТрМТ с помощью метода максимального правдоподобия (60 последовательностей). Показаны значения бутстрепа более 50% для 1000 повторностей. В анализ включены 18 последовательности типовых штаммов, депонированных в GenBank NCBI

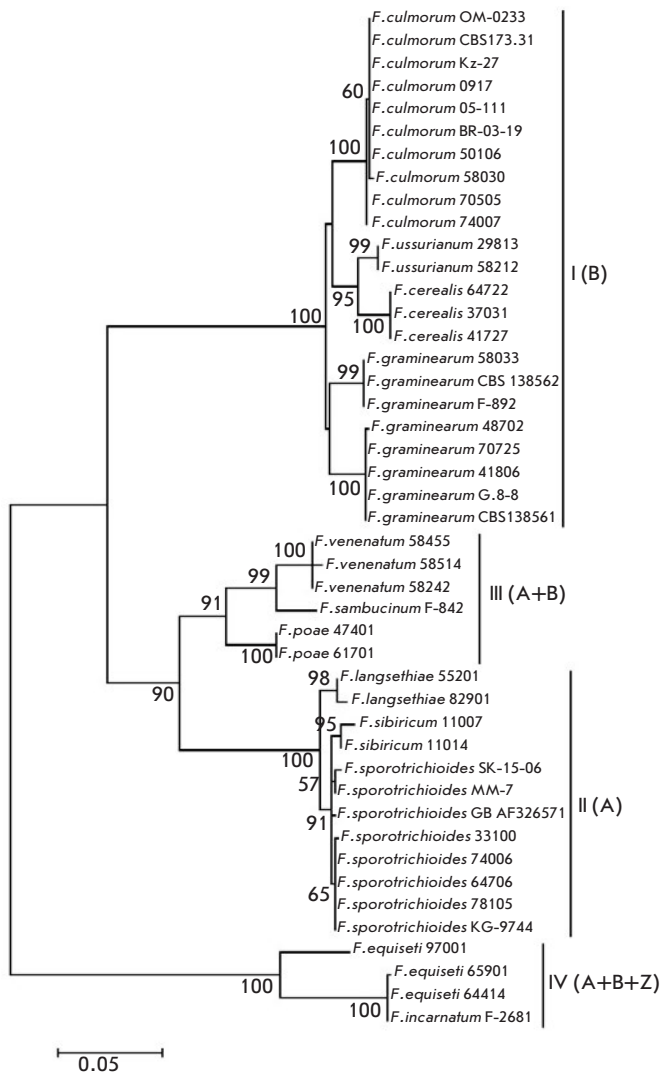


Рис. 3. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнения частичных последовательностей нуклеотидов гена *TR114* видов-продуцентов ТрМТ с помощью метода максимального правдоподобия (45 последовательностей). Показаны значения бутстрепа более 50% для 1000 повторностей. В анализ включены четыре последовательности типовых штаммов, депонированных в GenBank NCBI

ляла от 94 (кластер III) до 100% (кластеры I, II, IV). В отличие от дендрограммы гена *TEF1α*, «*F. sp.*» занимал промежуточное положение между кластерами II и III. Кроме того, штаммы *F. sporotrichioides* не формировали единой группы, а были распределены по кластеру II, в частности, штамм 33100 оказался в одной подгруппе со штаммами *F. sibiricum* (поддержка 98%). В составе кластера I отсутствовала подгруппа *F. graminearum-ussurianum*, характерная для дендрограммы *TEF1α*. На филогенетическом дереве гена *TRI14* (рис. 3) штаммы *F. ussuriense* сфор-

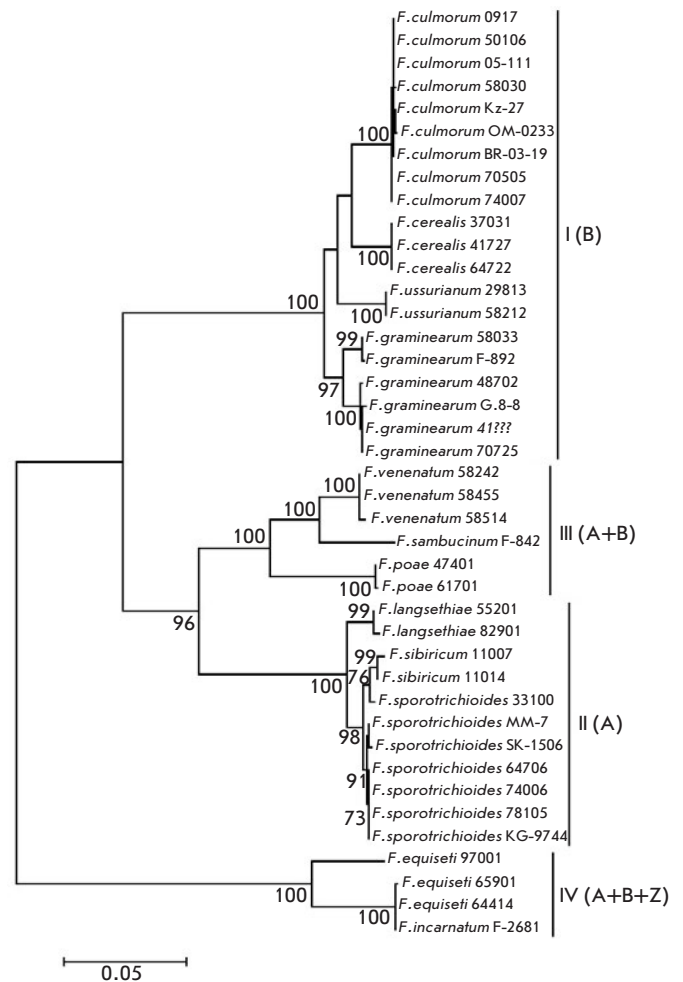


Рис. 4. Филогенетическое дерево, построенное на основе сравнения комбинированной последовательности нуклеотидов генов *TEF1α+TRI5+TRI14* видов-продуцентов ТрМТ с помощью метода максимального правдоподобия (41 последовательность). Показаны значения бутстрепа более 50% для 1000 повторностей

мировали подгруппу со штаммами *F. cerealis* (бутстреп-поддержка 95%), в то время как штаммы *F. graminearum* разделились на две подгруппы, поддержанные значениями бутстрепа 99 и 100%. В состав кластера II входят подгруппы *F. langsethiae* (98%) и *F. sporotrichioides/sibiricum* (91%); таким образом, топология этого кластера на дендрограмме *TRI14* соответствовала скорее топологии дендрограммы *TEF1α*, чем *TRI5*. Необходимо отметить, что в составе кластера IV штаммы *F. equiseti* 64414, 65901 и *F. incarnatum* F-2681, с одной стороны, и штамм *F. equiseti* 97001, с другой, формировали отдельные ветви на дендрограммах обоих *TRI*-генов.

В структуре филогенетического дерева, построенного на основе анализа комбинированной последовательности генов *TEF1α*, *TRI5* и *TRI14* (рис. 4), можно

выделить четыре крупных кластера, поддержанных значениями бутстрепа 100%. Обращает на себя внимание существование общей группы, включающей кластеры II и III (бутстреп-поддержка 96%).

Хемотипирование штаммов-продуцентов ТрМТ типа В, определение микотоксинов методом ВЭЖХ

В табл. 4 приведены результаты анализа 33 штаммов-продуцентов ТрМТ типа В методом кПЦР с наборами праймеров 12-1 и 12-2. От использования

набора 3-1 в ходе исследования было решено отказаться, поскольку при электрофоретическом анализе продуктов амплификации во всех образцах выявлены две специфические полосы (данные не приведены), т.е. не удавалось разделить хемотипы 3-АДОН и 15-АДОН *F. graminearum*. Согласно результатам хемотипирования, все проанализированные штаммы *F. culmorum* и *F. ussurianum* принадлежат к хемотипу 3-АДОН, к нему же относятся штаммы *F. graminearum* 58033 и 70725. ДНК штаммов *F.*

Таблица 4. Результаты кПЦР ДНК 33 штаммов рода *Fusarium*, относящихся к продуцентам ТрМТ типа В, с использованием наборов праймеров 12-1 и 12-2

Штамм	3-АДОН		15-АДОН		НИВ		ВЭЖХ
	12-1	12-2	12-1	12-2	12-1	12-2	
Набор праймеров							
<i>F. culmorum</i> М-99-43	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> 09-1/7	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> М-99-9	+	+	-	?	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> М-10-1	+	+	-	-	-	-	н/а
<i>F. culmorum</i> BR-03-19	+	+	-	-	-	-	н/а
<i>F. culmorum</i> BR-0453	+	+	-	-	-	-	н/а
<i>F. culmorum</i> ОМ-0233	+	+	-	-	-	-	н/а
<i>F. culmorum</i> ОР-02-37	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> СМ-9864	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> КР-1136-66	+	+	-	-	-	-	н/а
<i>F. culmorum</i> КР-1599-25/3	+	+	-	-	-	-	ДОН
<i>F. culmorum</i> КС-1384-1	+	+	-	-	-	-	ДОН
<i>F. culmorum</i> М-05-111	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> КС-1716-8	+	+	-	-	-	-	н/а
<i>F. culmorum</i> 58801	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> Кz-27	+	+	-	-	-	-	н/а
<i>F. culmorum</i> 74007	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> 58030	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> 70505	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. culmorum</i> 50106	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. cerealis</i> 64722	-	-	-	-	+	+	н/а
<i>F. cerealis</i> 39295	-	-	-	-	+	+	н/а
<i>F. cerealis</i> 37032	-	-	-	-	+	+	н/а
<i>F. cerealis</i> 39142	-	-	-	-	+	+	н/а
<i>F. cerealis</i> 37031	-	-	-	-	+	+	н/а
<i>F. cerealis</i> 41727	-	-	-	-	+	+	н/а
<i>F. graminearum</i> G.8-8	-	-	+	+	-	-	ДОН
<i>F. graminearum</i> 41806	?	?	+	+	-	-	15-АДОН
<i>F. graminearum</i> 48702	-	?	+	+	-	-	15-АДОН
<i>F. graminearum</i> 58033	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. graminearum</i> 70725	+	+	-	-	-	-	3-АДОН
<i>F. ussurianum</i> 58212	+	+	-	-	-	-	ДОН
<i>F. ussurianum</i> 29813	+	+	-	-	-	-	3-АДОН

Примечание. ВЭЖХ – результаты анализа методом ВЭЖХ. «?» – минорные полосы детектированы при электрофоретическом анализе либо амплификация на последних циклах кПЦР; «н/а» – не анализировали.

graminearum G.8-8, 41806, 48702 амплифицировалась с парой праймеров 12CON-12-15F, что свидетельствует об их принадлежности к 15-АДОН-хемотипу (однако в образцах *F. graminearum* 14-17 выявлены также минорные полосы, что, вероятно, связано с условиями проведения ПЦР).

Анализ токсинообразующей способности штаммов методом ВЭЖХ подтвердил данные молекулярного типирования большей части образцов (табл. 4). В большинстве культур ДОН количественно преобладал над ацетилированными производными, в культурах штаммов *F. graminearum* G.8-8, *F. culmorum* КР-1599-25/3, KS-1384-1, *F. ussurianum* 58212 производные обнаружены не были. На рис. 5 в качестве примера изображена хроматограмма культуральной жидкости штамма *F. ussurianum* 29813, содержащая пики, соответствующие ДОН (время удерживания 4.453) и 3-АДОН (время удерживания 5.483).

ОБСУЖДЕНИЕ

Основной задачей настоящей работы было изучение генетического разнообразия и токсигенных характеристик выделенных в разные годы в разных регионах России и депонированных во всероссийских коллекциях штаммов грибов рода *Fusarium*, потенциально способных к синтезу ТрМТ. Другой важный аспект исследования – расширение сведений о структурных особенностях генов, относящихся к основному трихотеценовому кластеру, связанных с синтезом токсинов и патогенными свойствами гриба.

Поскольку ген *TEF1α* на сегодняшний день считается наиболее изученным и наиболее филогенетически информативным SCAR-маркером представителей рода *Fusarium*, анализ его последовательностей стал основой для верификации таксономического статуса коллекционных штаммов. Первоначальная идентификация шести из 60 образцов не была подтверждена. Использование комбинации молекулярно-генетического и морфологического подходов позволило с высокой достоверностью определить видовую принадлежность «спорных» штаммов. Штамм 58212 (первоначально *F. graminearum*) был идентифицирован как *F. ussurianum*, что хорошо согласуется с его географическим происхождением (Приморский край) и с тем фактом, что виды *F. graminearum* и *F. ussurianum* практически невозможно отличить по морфологическим признакам. Штаммы F-3966 и F-4360, депонированные в коллекциях как *F. sambucinum*, идентифицированы как *F. avenaceum* и *F. acuminatum* соответственно. Виды *F. acuminatum* и *F. avenaceum* не продуцируют трихотеценовые микотоксины, однако по занимаемым экологическим нишам и характеру роста на картофельно-сахарозном агаре сходны с *F. sambucinum*.

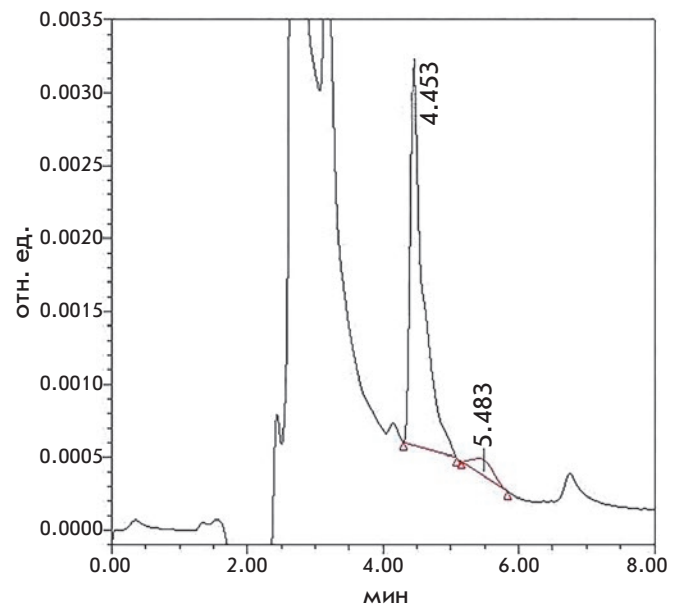


Рис. 5. Хроматограмма культуральной жидкости штамма *F. ussurianum* 29813. Пик, охарактеризованный временем удерживания 4.453 – ДОН; пик, охарактеризованный временем удерживания 5.483 (красный) – 3-АДОН

Данные о подобных ошибках отсутствуют, однако утверждается, что распространена неверная идентификация близкородственного к этим двум видам *F. torulosum* как *F. sambucinum* [54]. Штамм F-900, выделенный из почвы лесопитомника в Красноярском крае, по результатам комплексного исследования идентифицирован как *F. commune*. Вид *F. commune*, описанный в 2003 г. [55], до настоящего времени не выявлялся на территории России. Согласно имеющимся данным, *F. commune* может быть как почвенным сапрофитом, так и поражать различные растения, в том числе важные в хозяйственном отношении культуры. *F. commune* считается таксономически близким к комплексу видов *F. oxysporum*, он не способен к синтезу ТрМТ [56], что подтверждается отсутствием продуктов ПЦР-амплификации с парами праймеров к генам *TRI5* и *TRI14*. Штамм F-846, выделенный из дыни (Молдова, 1958), который по данным Всероссийской коллекции микроорганизмов представляет собой *F. roae*, при анализе последовательностей генов *TEF1α* и *TRI5* не показал 100% сходства ни с одной из последовательностей, депонированных в базах данных. По структуре маркерных генов наиболее близкими к нему оказались штаммы *F. polyphialidicum* F-0016 (*TEF1α*) и *F. langsethiae* F2640 (*TRI5*). Родство F-846 с *F. polyphialidicum* не подтверждено анализом морфологических структур. Что же касает-

ся штамма F2640, депонированного в GenBank, то существуют сомнения в правильности его отнесения к *F. langsethiae*, что подтверждается значительными различиями в структуре гена *TRI5* этого штамма и типовых штаммов *F. langsethiae*. На дендрограммах генов *TEF1α* и *TRI5* F-846 занимал промежуточное положение и не был отнесен ни к одному из крупных кластеров. Можно осторожно предположить, что штамм F-846 представляет собой отдельный филогенетический вид, однако для подтверждения этого предположения необходим дополнительный анализ с использованием большего спектра ДНК-маркеров, исследование токсинообразующей способности, а также дополнительных морфологических и физиологических данных.

В последние годы показано, что вид *F. equiseti* вместе с близкородственным *F. incarnatum* обладает сложной филогенетической структурой, формируя неоднородную группу, называемую «*F. incarnatum-equiseti* species complex» (FIESC). Штаммы *F. equiseti* из северной и южной Европы образуют две разные группы, названные типами I и II [57]. В настоящей работе маркерные последовательности гена *TEF1α* штаммов из различных регионов России сравнивали с последовательностями этого гена штаммов VI01070 и VI01095, относящихся к типу I, штамма H2-2-5B, относящегося к типу II, а также штаммов 10675 и 10393, проанализированных в [40]. Сравнение последовательностей и филогенетический анализ *TEF1α* показали, что штамм 97001, по всей видимости, принадлежит к типу II (южная Европа), что коррелирует с его географическим происхождением (Сев. Осетия), в то время как штаммы 64414 и 65901 (Калининградская и Ленинградская обл. соответственно) относятся к североевропейскому типу I. Исключением из этого правила стал штамм 10675 (LN901573), выделенный в 2009 г. из пшеницы в Испании, отнесенный, однако, согласно топологии сконструированного дерева, к типу I. К типу I также принадлежал штамм F-2681 *F. incarnatum*.

Использование в филогенетических исследованиях структур генов, ответственных за различные этапы биосинтеза микотоксинов, является дискуссионным, поскольку большая часть этих генов приобретена в результате горизонтального переноса. Сравнительный анализ таких маркеров, как правило, не вполне корректно отражает эволюционные отношения между таксонами, однако может быть полезен при выявлении особенностей токсинообразования либо патогенных свойств штаммов. В настоящей работе нами исследованы частичные структуры двух входящих в трихотеценовый кластер генов – *TRI5*, кодирующего триходиенсинтазу, ответственную за первый этап биосинтеза ТрМТ, и *TRI14*, точ-

ная функция которого неизвестна, однако предположительно связана с регуляцией биосинтеза ДОН или его транспортом за пределы клетки в процессе развития гриба в тканях зараженного растения [16]. Представленная в базах данных информация о последовательностях генов трихотеценового кластера достаточно ограничена. Так, депонировано по одной последовательности гена *TRI5* *F. venenatum* и *F. incarnatum* и две – *F. sambucinum*. Найдены лишь три аннотации гена *TRI14* *F. sporotrichioides*, одна – *F. pseudograminearum*, а также семь и четыре – в составе полных последовательностей трихотеценового кластера *F. graminearum* и *F. culmorum* соответственно. Таким образом, впервые определены и депонированы в базу данных GenBank частичные последовательности гена *TRI14* 9 из 12 исследованных видов. Характерной особенностью генов *TRI5* и *TRI14* стал тот факт, что значительная часть переменных позиций у них сосредоточена в кодирующей части, что отражается и на различиях в аминокислотных последовательностях соответствующих белков между и внутри видов. Обратная картина наблюдается в случае гена *TEF1α*, у которого все переменные позиции находятся в интронах, а кодирующая часть отличается высокой консервативностью. Как мы полагаем, такой характер различий может быть следствием разной эволюционной истории этих генов, а также того, что фактор элонгации трансляции не относится к белкам, специфичным для рода *Fusarium*, в то время как полиморфизм аминокислотных последовательностей белков, кодируемых генами *TRI*, имеет важное адаптивное значение. Этим же можно объяснить различия в топологии филогенетических деревьев, построенных на основе *TEF1α*, *TRI5* и *TRI14*. Одно из таких различий – формирование кластерами II (продуценты ТрМТ типа А) и III (ТрМТ А+В) общих ветвей, поддержанных высокими значениями бутстрепа (90 и 75%), на дендрограммах генов *TRI5* и *TRI14* соответственно. В свою очередь, на дендрограмме гена *TEF1α* кластер II формирует общую ветвь с кластером I (продуценты ТрМТ типа В), хотя бутстреп-поддержка этой ветви была низкой (менее 50%). Также на дендрограммах генов *TRI5* и *TRI14* штаммы *F. ussuriatum* формировали единые кластеры со штаммами видов *F. culmorum* и *F. cerealis*, что противоречит эволюционным данным, согласно которым *F. ussuriatum* наиболее близок к виду *F. graminearum* [22], что подтверждено при филогенетическом анализе *TEF1α*. На дендрограмме гена *TRI14* исследованные штаммы *F. graminearum* были разделены на два кластера с высокой бутстреп-поддержкой, однако нам не удалось связать эту группировку ни с хемотипом штаммов, ни с их географическим происхождением.

Можно предположить существование связи между полиморфизмом гена *TRI14* и различиями в агрессивности разных штаммов по отношению к растению-хозяину. Однако в рамках настоящей работы таких исследований не проводилось. Для гена *TRI5* также не выявлено корреляции между хемотипами *F. graminearum* (3/15-АДОН) и филогенетической структурой вида. Кроме того, ни один из проанализированных штаммов *F. graminearum* и *F. culmorum* не содержал 8-нуклеотидной делеции (TGGAACA), маркерной для слаботоксигенных штаммов этих видов [58].

Несмотря на приблизительно одинаковое содержание переменных и филогенетически информативных позиций, а также гаплотипическое разнообразие трех генов, анализ *TEF1α* более точно отражал филогенетическую структуру и предполагаемое эволюционное развитие группы видов рода *Fusarium* – продуцентов ТрМТ. Этот результат согласуется с данными, полученными ранее при исследовании полиморфизма других генов, вовлеченных в биосинтез микотоксинов, например *TRI1* [7], или гена энниатинсинтазы (*Esyn1*) – ключевого фермента биосинтеза энниатинов у *F. avenaceum* и близкородственных видов [28, 59].

Принадлежность к тому или иному хемотипу является специфической характеристикой штамма, продуцирующего В-трихотецены. В последние годы опубликованы работы, посвященные встречаемости хемотипов продуцентов В-трихотеценов (прежде всего, *F. graminearum*) в различных регионах мира, например в Южной Америке [60], Африке [61] и Европе [62, 63]. В 2016 г. были опубликованы результаты обширного исследования, проведенного специалистами из 17 стран Европы, в том числе из России [64], практическим результатом которого стало создание европейской базы данных (www.catalogueeu.luxmss.lu). В этой базе данных содержится информация о 187 штаммах, выделенных на территории России, при этом нет упоминания о штаммах из целого ряда регионов, таких, как Западная Сибирь и Волго-Вятский район, а также сведений о хемотипах коллекционных образцов, выделенных в прошлые годы. В настоящем исследовании для анализа типа ТрМТ мы применили комбинированный подход, включающий хемотипирование с использованием хемотип-специфических праймеров, описанных ранее (см. раздел «Молекулярное типирование продуцентов ТрМТ типа В»), а также анализ культуральных жидкостей некоторых штаммов методом ВЭЖХ. С помощью наборов праймеров, специфичных к полиморфным участкам гена *TRI12* (12-1 и 12-2), удалось установить хемотипы штаммов четырех видов, продуцирующих ТрМТ типа В. Показано,

что штаммы *F. culmorum* и *F. ussuriense* относятся к 3-АДОН-хемотипу, штаммы *F. cerealis* – к НИВ-хемотипу, а среди штаммов *F. graminearum* присутствуют продуценты как 3-АДОН, так и 15-АДОН. Необходимо иметь в виду, что в некоторых случаях данные ПЦР-анализа могут не совпадать с реальным токсигенным профилем штамма, что подчеркивает необходимость подтверждения генетических данных с помощью химических методов [65]. Методом ВЭЖХ были подтверждены результаты хемотипирования 16 из 20 штаммов, выбранных для хроматографического анализа. В культуральных жидкостях четырех штаммов содержался только ДОН, а его ацетилированные производные отсутствовали. Опубликованные в последние годы результаты показывают, что среди штаммов *F. graminearum* различного географического происхождения доминируют продуценты 3-АДОН, что в значительной степени обусловлено их более высокой агрессивностью по сравнению с продуцентами 15-АДОН и НИВ [66, 67]. Анализ европейских штаммов *F. graminearum* показал, что 3-АДОН-хемотип распространен на севере Европы, в то время как хемотип 15-АДОН чаще встречается в центральной части и на юге континента [62–64]. Из трех исследованных нами штаммов *F. graminearum* 15-АДОН-хемотипа два можно отнести к центрально-европейской группе (G.8-8 – Германия, 48702 – Тульская обл.) и один – к южно-европейской (41806 – Сев. Осетия). Штаммы 3-АДОН-хемотипа можно отнести к северо-европейской (58033 – Ленинградская обл.) и центрально-европейской (70725 – Орловская обл.) группам. Все изученные культуры вида *F. culmorum* были отнесены к 3-АДОН-хемотипу. Считается, что для *F. culmorum* характерны лишь два из трех известных В-хемотипов – 3-АДОН и НИВ, при этом 3-АДОН существенно более распространен [61, 64], что подтверждено в настоящей работе. Штамм *F. ussuriense* 29813, представляющий 3-АДОН-хемотип, продуцировал наибольшие количества ДОН из всех проанализированных культур. Принадлежность штаммов *F. cerealis* к НИВ-хемотипу также соответствует данным [68]. Мы считаем, что результаты, полученные в настоящей работе, позволяют частично восполнить отсутствие в Европейской базе данных сведений о хемотипах штаммов из некоторых регионов России. Так, впервые охарактеризованы штаммы из Волго-Вятского региона (№ 10–12) и Западной Сибири, а также граничащей с ней Костанайской области Казахстана (№ 7, 16).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты настоящей работы имеют как фундаментальное, так и прикладное значение.

Фундаментальное значение определяется существенным расширением сведений о молекулярно-генетическом разнообразии трихотеценпродуцирующих штаммов рода *Fusarium* различного происхождения, представляющих различные регионы России. Применение комплексного подхода, сочетающего классическое исследование морфологических структур с анализом высокоинформативных ДНК-маркеров, позволило подтвердить и уточнить видовую принадлежность ряда коллекционных образцов, в частности, впервые обнаружить на территории России штамм *F. commune*. Впервые для филогенетических исследований использован ген *TRI14*, анализ которого выявил, с одной стороны, высокий уровень меж- и внутривидового полиморфизма, а с другой, необходимость дальнейшего изучения его структуры и функций, которые позволили бы лучше понять его роль в процессах патогенеза и биосинтеза микотоксинов. Прикладная значимость работы обусловлена возможностью использования изученных маркеров для разработки систем мониторинга зара-

женности продуктов питания продуцентами ТрМТ. Комбинированное исследование принадлежности продуцентов ТрМТ типа В к основным хемотипам с помощью специфической ПЦР и ВЭЖХ позволило оценить их распространенность на территории России, в том числе в регионах, где ранее не находили продуцентов ТрМТ. ●

Коллектив авторов выражает благодарность Т.Ю. Гагкаевой (ФГБНУ ВИЗР) за ценные комментарии, касающиеся морфологической характеристики исследуемых штаммов.

*Работа выполнена при финансовой поддержке грантов РФФИ № 15-29-02527 (Л.С., С.З.; подбор коллекционных образцов, филогенетический анализ генов *TEF1α* и *TRI5*, микроскопия) и 16-34-01369 (А.С.; структурный и филогенетический анализ гена *TRI14*, исследование токсинообразующей способности штаммов методом ВЭЖХ).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Moretti A., Susca A., Mule G., Logrieco A.F., Proctor R.H. // *Int. J. Food Microbiol.* 2013. V. 167. P. 57–66.
- Ueno Y. // *Adv. Food Nutr. Res.* 1989. V. 3. P. 301–305.
- Desjardins A.E. *Fusarium* mycotoxins: chemistry, genetics and biology. APS Press, St. Paul, Minnesota, 2006.
- Grovey J.F. / The trichothecenes and their biosynthesis. // *Progress in the Chemistry of Organic Natural Products*. Eds Herz W., Falk H., Kirby G.W. Vienna: Springer-Verlag, 2007. P. 63–130.
- McCormick S.P., Stanley A.M., Stover N.A., Alexander N.J. // *Toxins*. 2011. V. 3. P. 802–814.
- Nesic K., Ivanovic S., Nesic V. // *Rev. Environ. Contam. Toxicol.* 2014. V. 228. P. 101–120.
- Kelly A., Proctor R.H., Belzile F., Chulze S.N., Clear R.M., Cowger C., Elmer W., Lee T., Obanor F., Waalwijk C., Ward T.J. // *Fungal Genet. Biol.* 2016. V. 95. P. 39–48.
- Varga E., Wiesenberger G., Hametner C., Ward T.J., Dong Y., Schöfbeck D., McCormick S., Broz K., Stückler R., Schumacher R., et al. // *Environ. Microbiol.* 2015. V. 17. № 8. P. 2588–2600.
- O'Donnell K., Kistler H.C., Tacke B.K., Casper H.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2000. V. 97. P. 7905–7910.
- O'Donnell K., Ward T.J., Geiser D.M., Kistler H.C., Aoki T. // *Fungal Genet. Biol.* 2004. V. 41. P. 600–623.
- Moss M.O., Thrane U. // *Toxicol. Lett.* 2004. V. 153. № 1. P. 23–28.
- Brown D.W., Dyer R.B., McCormick S.P., Kendra D.F., Plattner R.D. // *Fungal Genet. Biol.* 2004. V. 41. P. 454–462.
- Alexander N.J., McCormick S.P., Waalwijk C., van der Lee T., Proctor R.H. // *Fungal Genet. Biol.* 2011. V. 48. № 5. P. 485–495.
- Nasmith C.G., Walkowiak S., Wang L., Leung W.W.Y., Gong Y., Johnston A., Harris L.J., Guttman D.S., Subramaniam R. // *PLoS Pathog.* 2011. V. 7. № 9. e1002266.
- Cundliffe E., Cannon M., Davies J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1974. V. 71. № 1. P. 30–34.
- Dyer R.B., Plattner R.D., Kendra D.F., Brown D.R. // *J. Agric. Food Chem.* 2005. V. 53. P. 9281–9287.
- Paran I., Michelmore R.W. // *Theor. Appl. Genet.* 1993. V. 85. № 8. P. 985–993.
- Starkey D.E., Ward T.J., Aoki T., Gale L.R., Kistler H.C., Geiser D.M., Suga H., Toth B., Varga J., O'Donnell K. // *Fungal Genet. Biol.* 2007. V. 44. P. 1191–1204.
- Aoki T., Ward T.J., Kistler H.C., O'Donnell K. // *JSM Mycotoxins*. 2012. V. 62. P. 91–102.
- Obanor F., Erginbas-Orakci G., Tunali B., Nicol J.M., Chakraborty S. // *Fungal Biol.* 2010. V. 114. P. 753–765.
- Scott J.B., Chakraborty S. // *Mycol. Res.* 2006. V. 110. P. 1413–1425.
- Yli-Mattila T., Gagkaeva T., Ward T.J., Aoki T., Kistler H.C., O'Donnell K. // *Mycologia*. 2009. V. 101. № 6. P. 841–852.
- Yli-Mattila T., Ward T.J., O'Donnell K., Proctor R.H., Burkin A.A., Kononenko G.P., Gavrilova O.P., Aoki T., McCormick S.P., Gagkaeva T.Yu. // *Int. J. Food Microbiol.* 2011. V. 147. P. 58–68.
- O'Donnell K., Sutton D.A., Rinaldi M.G., Gueidan C., Crous P.W., Geiser D.M. // *J. Clin. Microbiol.* 2009. V. 47. P. 3851–3861.
- Fernandez-Ortuno D., Waalwijk C., van der Lee T., Fan J., Atkins S., West J.S., Fraaije B.A. // *Int. J. Food Microbiol.* 2013. V. 166. P. 148–154.
- Nicolaisen M., Surponiene S., Nielsen L.K., Lazzaro I., Spliid N.H., Justensen A.F. // *J. Microbiol. Meth.* 2009. V. 76. P. 234–240.
- Stakheev A.A., Ryazantsev D.Yu., Gagkaeva T.Yu., Zavriev S.K. // *Food Control*. 2011. V. 22. P. 462–468.
- Stakheev A.A., Khairulina D.R., Zavriev S.K. // *Int. J. Food Microbiol.* 2016. V. 225. P. 27–37.
- Yli-Mattila T., Nayaka S.C., Venkataramana M., Yörük E. // *Methods Mol. Biol.* 2017. V. 1542. P. 269–291.
- Walkowiak S., Rowland O., Rodrigue N., Subramaniam R. // *BMC Genomics*. 2016. V. 17. P. 1014.
- Lysoe E., Frandsen R.J.N., Divon H.H., Terzi V., Orru L., Lamontanara A., Kolseth A.-K., Nielsen K.F., Thrane U. // *Int. J. Food Microbiol.* 2016. V. 221. P. 29–36.

32. Al-Hatmi A.M.S., van den Ende A.H.G.G., Stielow J.B., van Diepeningen A.D., Seifert K.A., McCormick W., Assabgui R., Gräfenhan T., de Hoog G.S., Levesque C.A. // *Fungal Biol.* 2016. V. 120. P. 231–245.
33. Nirmaladevi D., Venkataramana M., Srivastava R.K., Up-palapati S.R., Gupta V.K., Yli-Mattila T., Clement Tsui K.M., Srinivas C., Niranjana S.R., Chandra N.S. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 21367.
34. Schoch C.L., Seifert K.A., Huhndorf S., Robert V., Spouge J.L., Levesque C.A., Chen W., Fungal Barcoding Consortium. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 6241–6246.
35. O'Donnell K., Cigelnik E. // *Mol. Phylogenet. Evol.* 1997. V. 7. № 1. P. 103–116.
36. Kristensen R., Torp M., Kosiak B., Holst-Jensen A. // *Mycol. Res.* 2005. V. 109. № 2. P. 173–186.
37. Geiser D.M., Jimenez-Case M., Kang S., Makalowska I., Ve-reraraghavan N., Ward T., Zhang N., Kuldau G.A., O'Donnell K. // *Eur. J. Plant Pathol.* 2004. V. 110. P. 473–479.
38. Niessen L., Schmidt H., Vogel R.F. // *Int. J. Food Microbiol.* 2004. V. 95. P. 305–319.
39. Stepień L., Gromadzka K., Chelkowski J. // *J. Appl. Genet.* 2012. V. 53. P. 227–236.
40. Villani A., Moretti A., De Saeger S., Han Z., Di Mavungu J.D., Soares C.M.G., Proctor R.H., Venancio A., Lima N., Stea G., et al. // *Int. J. Food Microbiol.* 2016. V. 234. P. 24–35.
41. Menke J., Dong Y., Kistler H.C. // *Mol. Plant Microbe In.* 2012. V. 25. № 11. P. 1408–1418.
42. Nielsen L.K., Jensen J.D., Rodriguez A., Jorgensen L.N., Jus-tensen A.F. // *Int. J. Food Microbiol.* 2012. V. 157. P. 384–392.
43. Wachowska U., Packa D., Wiwart M. // *Toxins.* 2017. V. 9. № 12. P. 408.
44. Thompson J.D., Higgins D.G., Gibson T.J. // *Nucl. Acids Res.* 1994. V. 22. P. 4673–4680.
45. Nei M., Kumar S. *Molecular Evolution and Phylogenetics.* New York: Oxford University Press, 2000.
46. Tamura K., Peterson D., Peterson N., Stecher G., Nei M., Ku-mar S. // *Mol. Biol. Evol.* 2011. V. 28. № 10. P. 2731–2739.
47. Rozas J., Ferrer-Mata A., Sánchez-DelBarrio J.C., Guirao-Rico S., Librado P., Ramos-Onsins S.E., Sánchez-Gracia A. // *Mol. Biol. Evol.* 2017. V. 34. № 12. P. 3299–3302.
48. Ward T.J., Bielawski J.P., Kistler H.C., Sullivan E., O'Donnell K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 9278–9283.
49. Wang J.H., Li H.-P., Qu B., Zhang J.-B., Huang T., Chen F.-F., Liao Y.-C. // *Int. J. Mol. Sci.* 2008. V. 9. P. 2495–2504.
50. Bustin S.A., Benes V., Garson J.A., Hellemans J., Huggett J., Kubista M., Mueller R., Nolan T., Pfaffl M.W., Shipley G.L., Vandesompele J., Wittwer C.T. // *Clin. Chem.* 2009. V. 55. P. 611–622.
51. Farber J.M., Sanders G.W. // *Appl. Environ. Microbiol.* 1986. V. 51. № 2. P. 381–384.
52. Gupta V.K., Chattopadhyay P., Kalita M.C., Chaurasia A.K., Gogoi H.K., Singh L. // *Pharm. Methods.* 2011. V. 2. № 1. P. 25–29.
53. Han Z., Tangni E.K., Huybrechts B., Munaut F., Scauf-laire J., Wu A., Callebaut A. // *Mycotoxin Res.* 2014. V. 30. P. 231–240.
54. Leslie J.F., Summerell B.A. *The Fusarium laboratory manual.* Blackwell Publ., 2006. P. 266–267.
55. Skovgaard K., Rosendahl S., O'Donnell K., Hirenberh H.I. // *Mycologia.* 2003. V. 95. P. 630–636.
56. Zhu Z., Zheng L., Pan L. // *Plant Disease.* 2014. V. 98. № 7. P. 977–987.
57. Marin P., Moretti A., Ritieni A., Jurado M., Vazquez C., Teresa Gonzalez-Jaen M. // *Food Microbiol.* 2012. V. 31. P. 229–237.
58. Bakan B., Giraud-Delville C., Pinson L., Richard-Molard D., Fournier E., Brygoo Y. // *Appl. Environ. Microbiol.* 2002. V. 68. № 11. P. 5472–5479.
59. Kulik T., Pszczolkowska A., Lojko M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2011. V. 12. P. 5626–5640.
60. Pan D., Mionetto A., Calero N., Reynoso M.M., Torres A., Bettucci L. // *Gen. Mol. Res.* 2016. V. 15. № 1. 15017270.
61. Laraba I., Boureghda H., Abdallah N., Bouaicha O., Obanor F., Moretti A., Geiser D.M., Kim H.-S., McCormick S.P., Proctor R.H., et al. // *Fungal Genet. Biol.* 2017. V. 103. P. 34–41.
62. Yli-Mattila T., Rämö S., Hietaniemi V., Hussien T., Carlobos-Lopez A.L., Cumagun C.J.R. // *Microorganisms.* 2013. V. 1. P. 162–174.
63. Surponiene S., Sakalauskas S., Mankeviciene A., Barcaus-kaite K., Jonaviciene A. // *Zemdirbyste-Agriculture.* 2016. V. 103. № 3. P. 281–287.
64. Pasquali M., Beyer M., Logrieco A., Audenaert K., Balmas V., Basler R., Boutigny A.L., Chrpova J., Czembor E., Gagkaeva T., et al. // *Front. Microbiol.* 2016. V. 7. P. 406.
65. Kulik T., Busko M., Bilska K., Ostrowska-Kolodziejczak A., van Diepeningen A.D., Perkowski J., Steinglein S. // *Toxins.* 2016. V. 8. № 11. 330.
66. Covarelli L., Beccari G., Prodi A., Generotti S., Etruschi F., Juan C., Ferrer E., Manes J. // *J. Sci. Food Agric.* 2014. V. 95. P. 540–551.
67. Pasquali M., Giraud F., Brochot C., Cocco E., Hoffmann L., Bohn T. // *Int. J. Food Microbiol.* 2010. V. 137. P. 246–253.
68. Amarasinghe C.C., Tittlemier S.A., Fernando W.G.D. // *Plant Pathol.* 2015. V. 64. № 4. P. 988–995.

УДК 612.816:612.822.2

АТР уменьшает вход ионов кальция в нервную терминаль, блокируя кальциевые каналы L-типа

Э. Ф. Хазиев^{1,2,3}, Д. В. Самигуллин^{1,2,3}, А. Н. Ценцевицкий^{1,2*}, Э. А. Бухараева^{1,2},
Е. Е. Никольский^{1,2}

¹Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального исследовательского центра «Казанский научный центр Российской академии наук», 420111, Казань, а/я 30

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

³Казанский национальный исследовательский технический университет им. А.Н. Туполева, 420111, Казань, ул. К. Маркса, 31/7

*E-mail: atsen@list.ru

Поступила в редакцию 16.10.2017

Принята к печати 09.04.2018

РЕФЕРАТ В нервно-мышечном соединении АТР, активируя пресинаптические P2Y-рецепторы, подавляет вызванную и спонтанную квантовую секрецию ацетилхолина, уменьшая входящий кальциевый ток. С использованием специфического кальций-чувствительного флуоресцентного красителя Oregon Green Bapta 1 на нервно-мышечном синапсе лягушки показано, что экзогенная АТР снижает амплитуду кальциевого транзиента, отражающую изменение входа кальция в ответ на нервный стимул. Этот эффект АТР на транзистент предотвращается блокадой P2-рецепторов сураминол. Специфический блокатор пресинаптических потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа нитрендипин, снижая *per se* амплитуду транзиента, значительно ослабляет эффект АТР на кальциевый сигнал. С другой стороны, предварительное воздействие АТР на нервно-мышечный препарат полностью устраняло угнетающее действие нитрендипина на кальциевый ответ. Полученные данные свидетельствуют о том, что в подавляющем действии АТР на амплитуду кальциевого транзиента в нервном окончании лягушки есть существенный компонент, обусловленный снижением входа кальция через потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА АТР, кальциевый транзистент, кальциевые каналы, нервно-мышечное соединение.

ВВЕДЕНИЕ

В нервно-мышечном соединении АТР уменьшает амплитуду многоквантовых токов концевой пластинки (ТКП), активируя пресинаптические P2Y-рецепторы [1]. Угнетающее действие АТР на амплитуду постсинаптических токов является пресинаптическим эффектом и может быть обусловлено изменением активности кальциевых каналов, вход кальция (Ca^{2+}) через которые запускает процесс экзоцитоза синаптических везикул. Действительно, АТР обратимо снижала Ca^{2+} ток в перисинаптическом отделе аксона [2] и уменьшала амплитуду Ca^{2+} -транзиента, зарегистрированного в различных отделах нервной терминали лягушки [3]. Изменение амплитуды транзиента отражает изменение концентрации свободных ионов Ca^{2+} внутри терминали [4, 5], и ее снижение при действии АТР может свидетельствовать о влиянии этого пурина на активность пресинаптических кальциевых

каналов. На нервной терминали лягушки функционируют несколько типов потенциал-зависимых кальциевых каналов [4]. Активность каналов какого типа изменяется при действии АТР неизвестно. Данные о влиянии АТР на потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа достаточно противоречивы. На различных объектах показано, что АТР способна как усиливать вход ионов кальция через каналы L-типа [6], так и ингибировать эти каналы [7]. В настоящей работе, используя флуоресцентный метод регистрации Ca^{2+} -транзиента в нервной терминали лягушки, мы выясняли, участвуют ли пресинаптические потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа в подавлении амплитуды Ca^{2+} -транзиента АТР. Установлено, что снижение амплитуды транзиента при активации пуринорецепторов частично обусловлено уменьшением входа ионов Ca^{2+} через кальциевые каналы L-типа.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Исследование выполнено на изолированном нервно-мышечном препарате *m. cutaneus pectoris* лягушек *Rana ridibunda*. Относительное изменение уровня Ca^{2+} в нервной терминали (Ca^{2+} -транзист) оценивали при помощи флуоресцентного красителя Oregon Green Bapta 1. Подробно методика загрузки красителя через культю нерва, протоколы регистрации и обработки флуоресцентных сигналов представлены в работе [8]. Использовали следующий протокол экспериментов. После загрузки флуоресцентного красителя в нервные терминали препарат помещали в ванночку объемом 3 мл, через которую со скоростью 3 мл/мин протекал перфузионный раствор. Для предотвращения сокращений мышечных волокон при стимуляции двигательного нерва использовали раствор Рингера с пониженным содержанием ионов Ca^{2+} и повышенным Mg^{2+} : NaCl – 113.0 мМ, KCl – 2.5 мМ, NaHCO_3 – 3.0 мМ, MgCl_2 – 6.0 мМ, CaCl_2 – 0.9 мМ (рН 7.2–7.3, температура $20.0 \pm 0.3^\circ\text{C}$). Эксперименты проводили в соответствии с этическими принципами и нормативными документами, рекомендованными Европейским научным фондом (ESF) и Декларацией о гуманном отношении к животным. В каждой серии экспериментов использовали 6–21 синапс от 3–5 животных.

Стимуляцию двигательного нерва прямоугольными импульсами длительностью 0.2 мс с частотой 0.5 имп/с осуществляли стимулятором (A-M Systems 2100) при помощи «всасывающего» suction электрода. Со всей длины выбранной нервной терминали в контрольных условиях регистрировали 60 последовательных флуоресцентных сигналов, после чего в перфузионный раствор добавляли исследуемое вещество. Регистрацию 60 сигналов с той же терминали, что и в контроле, начинали спустя 20–25 мин после аппликации вещества. При необходимости в перфузионный раствор в присутствии первого вещества подавали следующее исследуемое соединение, и сигналы все с той же нервной терминали вновь регистрировали через 20–25 мин. Предварительно были проведены эксперименты, результаты которых свидетельствуют о том, что амплитудно-временные параметры флуоресцентного сигнала в ответ на редкую стимуляцию двигательного нерва не претерпевают изменений в течение 3–4 ч.

Регистрацию флуоресцентных сигналов в ответ на нервный стимул осуществляли с помощью фотометрической установки на базе микроскопа Olympus BX-51 с водно-иммерсионным объективом $\times 60$ в программе Turbo-SM. В качестве источника освещения использовали монохроматор Polyhrom V (Till Photonics, Munich, Германия), настроенный на длину волны возбуждения красителя – 488 нм.

Флуоресцентный сигнал выделяли с использованием следующего набора фильтров: 505DCXT дихроическое зеркало, E520LP эмиссия (Chroma). Для уменьшения фонового свечения область освещения ограничивали при помощи диафрагмы. Данные анализировали с использованием программного обеспечения камеры Neuro CCD и ImageJ. В программе ImageJ выбирали области терминали и фона. Из всех значений свечения области терминали вычитали значение свечения фоновой области. Данные представляли как отношение: $(\Delta F / F_0 - 1) \times 100\%$, где ΔF – интенсивность флуоресценции в ответ на стимул, а F_0 – интенсивность флуоресценции в состоянии покоя. F_0 регистрировали перед каждой записью флуоресцентных сигналов в ответ на нервный стимул.

Статистическую значимость различий между выборками оценивали с использованием *t*-критерия Стьюдента и критерия Манна–Уитни. Различия между выборками считали статистически значимыми при $p < 0.05$ (n – количество исследованных синапсов).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экзогенная АТР в концентрации 10 мкМ вызывала снижение амплитуды Ca^{2+} -транзиста в ответ на нервный стимул в среднем на $13.2 \pm 1.9\%$ ($p = 0.0003$, $n = 8$; рис. 1А,В). Увеличение концентрации АТР до 100 мкМ не повлияло на выраженность эффекта – Ca^{2+} -транзист снижался на $13.6 \pm 1.4\%$ ($p = 0.000003$, $n = 21$) относительно контрольных значений (рис. 1В).

Сурамин – неселективный антагонист Р2-рецепторов – в дозе 300 мкМ увеличивал величину Ca^{2+} -транзиста в среднем на $20.5 \pm 9.0\%$ ($p = 0.037$, $n = 8$; рис. 1В) относительно значений в контрольных условиях. Добавление 100 мкМ АТР в среду, содержащую сурамин, не приводило к значимому изменению Ca^{2+} -транзиста, которое составило лишь $3.4 \pm 3.1\%$ ($p = 0.27$, $n = 5$; рис. 1Б,В). Таким образом, влияние АТР на амплитуду Ca^{2+} -транзиста связано с активацией Р2-рецепторов.

Специфический блокатор кальциевых каналов L-типа нитрендипин в концентрации 5 мкМ снижал амплитуду Ca^{2+} -транзиста на $12.4 \pm 3.6\%$ ($p = 0.0003$, $n = 12$; рис. 2), что свидетельствует о вкладе каналов L-типа в суммарный кальциевый ток, вызванный потенциалом действия (см. также [4]). Изменение амплитуды Ca^{2+} -транзиста под влиянием АТР в условиях блокады каналов L-типа составило всего $4.2 \pm 1.1\%$ ($p = 0.016$, $n = 7$; рис. 2), что значительно меньше собственного эффекта АТР (критерий Манна–Уитни, $p = 0.011$). Таким образом, блокада кальциевых каналов L-типа уменьшала сниже-

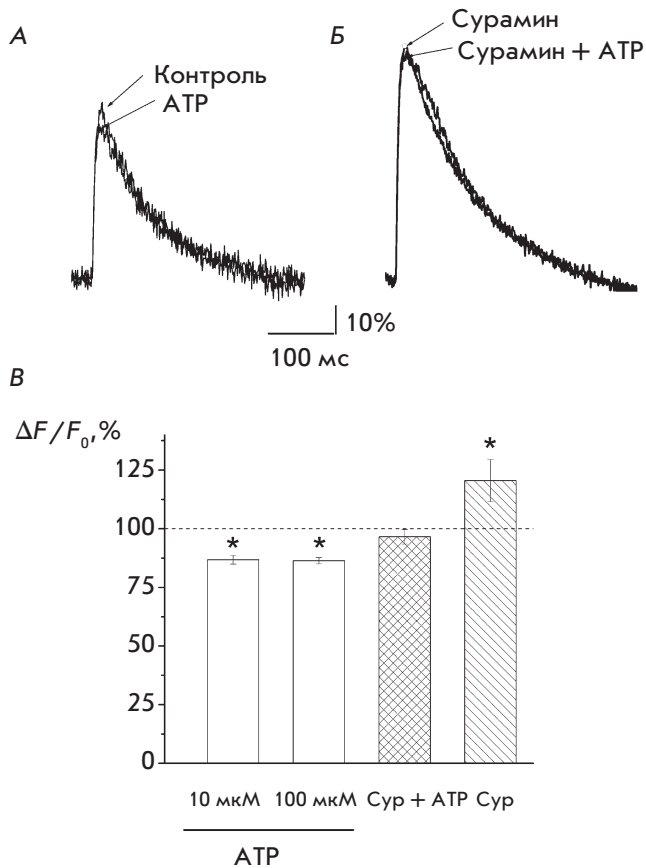


Рис. 1. АТР снижает амплитуду Ca²⁺-транзientа в результате активации P2-рецепторов. А – снижение амплитуды транзientа при действии 10 мкМ АТР. Б – отсутствие снижения амплитуды Ca²⁺-транзientа под влиянием АТР при наличии в среде сурамина. А, Б – усреднение 60 сигналов. В – влияние 10 и 100 мкМ АТР, сурамина (Сура) и АТР в присутствии сурамина на амплитуду Ca²⁺-транзientа. За 100% приняты значения амплитуды транзientа в контроле (для АТР и сурамина) и при блокировании P2-рецепторов сурамином (для Сура + АТР). * *p* < 0.05

ние амплитуды Ca²⁺-транзientа под действием АТР. Можно предположить, что активация пуринорецепторов АТР приводит к подавлению активности кальциевых каналов L-типа. Если это верно, то уменьшение амплитуды транзientа при действии нитрендипина должно быть менее выраженным в присутствии АТР. И действительно, нитрендипин не влиял на амплитуду Ca²⁺-транзientа после предварительной аппликации АТР – изменение амплитуды составило лишь 2.0 ± 1.9% (*n* = 6; рис. 2).

Ранее мы показали, что экзогенная АТР в концентрации 100 мкМ уменьшала амплитуду Ca²⁺-транзientа в равной степени в различных участ-

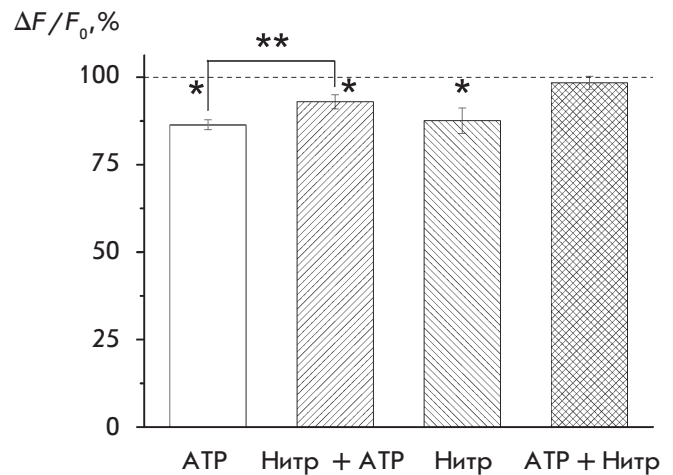


Рис. 2. АТР снижает амплитуду Ca²⁺-транзientа в результате блокирования каналов L-типа. АТР достоверно слабее уменьшает амплитуду транзientа после предварительной блокады каналов L-типа нитрендипином (Нитр + АТР). Нитрендипин *per se* снижает амплитуду транзientа (Нитр). **p* < 0.05. Нитрендипин не влияет на амплитуду Ca²⁺-транзientа в условиях активации P2-рецепторов АТР (АТР + Нитр). ***p* < 0.05 по критерию Манна–Уитни

ках протяженного нервного окончания лягушки [3]. Уменьшение транзientа при действии АТР соответствует снижению амплитуды вызванных ТКП при нормальном содержании кальция [1] и квантового состава ТКП в условиях сниженной концентрации ионов Ca²⁺ в растворе [9]. Данные об АТР-индуцированном уменьшении входа ионов Ca²⁺ внутрь терминали в ответ на нервный импульс согласуются с результатами работы [2], в которой показано обратимое снижение пресинаптического кальциевого тока под действием АТР.

Экзогенная АТР снижала амплитуду ТКП в результате активации пресинаптических P2Y-рецепторов, поскольку эффект предотвращался предварительной инкубацией препарата в сураминe [1]. В наших экспериментах снижение амплитуды Ca²⁺-транзientа при действии АТР также предотвращалось сурамином (рис. 1Б,В). При этом сам сурамин вызывал увеличение Ca²⁺-транзientа (рис. 1). Этот эффект может быть связан с возможностью увеличения концентрации ионов Ca²⁺ в цитоплазме в результате его выхода из саркоплазматического ретикулума [10]. Показано, что сурамин увеличивает не только вероятность открытого состояния, но и проводимость одиночных рианодин-чувствительных каналов [11]. Увеличение амплитуды Ca²⁺-транзientа под влиянием сурамина соответствует данным

об увеличении квантового состава ТКП при блокировании P2-рецепторов [12].

Данные о влиянии АТР на потенциал-зависимые кальциевые каналы L-типа достаточно противоречивы. АТР в микромолярных концентрациях способна обратимо дозо-зависимым образом подавлять ток через Ca²⁺-каналы L-типа в кардиомиоцитах [7]. В то же время активация пуринорецепторов способна усиливать вход ионов Ca²⁺ через каналы L-типа в перисинаптических глиальных клетках лягушки [6]. Полученные нами результаты показывают, что в снижение амплитуды Ca²⁺-транзientа при действии АТР вносит вклад подавление активности Ca²⁺-каналов L-типа. Об этом свидетельствует значительное снижение эффекта АТР на Ca²⁺-транзient в присутствии нитрендипина – специфического блокатора каналов L-типа (рис. 2). Дополнительным под-

тверждением того, что в эффекты АТР вносят вклад Ca²⁺-каналы L-типа, является отсутствие влияния их специфического блокатора нитрендипина на амплитуду транзientа после предварительного действия АТР (рис. 2). В этих условиях, когда активность Ca²⁺-каналов L-типа уже снижена под действием АТР, у нитрендипина не остается мишеней для воздействия.

Результаты нашей работы свидетельствуют, что в угнетающем действии АТР на вход Ca²⁺ в нервное окончание лягушки в ответ на нервный стимул существенную роль играет активность потенциал-зависимых кальциевых каналов L-типа. ●

*Работа частично поддержана грантом
РФФИ № 16-04-01051 А.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sokolova E., Grishin S., Shakirzyanova A., Talantova M., Giniatullin R. // Eur. J. Neurosci. 2003. V. 18. P. 1254–1264.
2. Grishin S., Shakirzyanova A., Giniatullin A., Afzalov R., Giniatullin R. // Eur. J. Neurosci. 2005. V. 21. P. 1271–1279.
3. Khaziev E., Golovyahina A., Bukharaeva E., Nikolsky E., Samigullin D. // BioNanoSci. 2017. V. 7. P. 254–257.
4. Tsentsevitsky A.N., Samigullin D.V., Nurullin L.F., Khaziev E.F., Nikolsky E.E., Bukharaeva E.A. // Frogs: genetic diversity, neural development and ecological implications / Ed. Lambert H. New York: NOVA Publ., 2014. P. 179–194.
5. Khaziev E., Samigullin D., Zhilyakov N., Fatikhov N., Bukharaeva E., Verkhatsky A., Nikolsky E. // Front. Physiol. 2016. V. 7. P. 621. doi: 10.3389/fphys.2016.00621. eCollection 2016.
6. Robitaille R. // J. Neurosci. 1995. V. 15. P. 7121–7131.
7. Yamamoto T., Habuchi Y., Nishio M., Morikawa J., Tanaka H. // Cardiovascular Res. 1999. V. 41. P. 166–174.
8. Samigullin D.V., Khaziev E.F., Zhilyakov N.V., Bukharaeva E.A., Nikolsky E.E. // J. Vis. Exp. 2017. V. 125. P. 55122.
9. Tsentsevitsky A., Nikolsky E., Giniatullin R., Bukharaeva E. // Neuroscience. 2011. V. 189. P. 93–99.
10. Emmick J.T., Kwon S., Bidasee K.R., Besch K.T., Besch H.R. Jr // J. Pharmacol. Exp. Ther. 1994. V. 269. P. 717–724.
11. Hill A.P., Kingston O., Sitsapesan R. // Mol. Pharmacol. 2004. V. 65. № 5. P. 1258–1268.
12. Sugiura Y., Ko C.P. // Neuroreport. 2000. V. 11. № 13. P. 3017–3021.

УДК 577.352.465; 576.32/.36

Роль адаптерного белка MIM в актин-зависимой регуляции эпителиальных натриевых каналов (ENaC)

Л. С. Шуйский^{1,2*}, В. В. Левченко², Ю. А. Негуляев^{1,3}, А. В. Старущенко², Д. В. Илатовская^{2,4}¹Институт цитологии РАН, 194064, Россия, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4²Department of Physiology, Medical College of Wisconsin, 8701 Watertown Plank Road, Milwaukee, WI 53226, USA³Санкт-Петербургский политехнический университет Петра Великого, кафедра медицинской физики, 195251, Россия, Санкт-Петербург, Политехническая ул., 2⁴Medical University of South Carolina, Department of Medicine, Division of Nephrology, 96 Jonathan Lucas St, MSC 629 CSB 822, Charleston, SC 29425, USA

*E-mail: leonid.shuyskiy@gmail.com

Поступила в редакцию 09.11.2017

Принята к печати 03.04.2018

РЕФЕРАТ Эпителиальные натриевые каналы (ENaC) располагаются на апикальной мембране клеток различных эпителиев, в частности, в собирательных трубочках почки, где обеспечивают тонкую регуляцию реабсорбции ионов натрия. Динамические перестройки актинового цитоскелета являются одним из основных механизмов регуляции активности ENaC. В этот процесс вовлечены актинсвязывающие белки кортактин и комплекс Arp2/3, которые уменьшают вероятность открытого состояния канала; однако до сих пор неизвестны конкретные звенья регуляции активности ENaC. Мы предположили, что одним из компонентов регуляции может быть адаптерный белок MIM (missing-in-metastasis), обладающий доменами связывания с PIP₂-богатыми участками плазматической мембраны, микрофиламентами, GTP-азами Rac (домен IMD), а также кортактином (домен PRD) и G-актином (домен WH2). Вовлечение белка MIM в актин-зависимую регуляцию ENaC изучали с использованием метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации whole-cell на модели временной трансфекции клеток линии CHO. Котрансфекция субъединиц ENaC с белком MIM или его мутантными формами привела к уменьшению плотности ENaC-опосредованного тока. Временная трансфекция клеток разными формами белка MIM выявила важную роль доменов PRD и WH2 в индукции перестроек актинового цитоскелета. Результаты электрофизиологических исследований и окрашивание актинового цитоскелета дают основание предполагать, что белок MIM, вероятно, входит в состав мультибелкового комплекса, отвечающего за актин-зависимую регуляцию активности ENaC.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ENaC, MIM, кортактин, комплекс Arp2/3, актиновый цитоскелет.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ENaC – эпителиальный натриевый канал; mENaC – эпителиальный натриевый канал мыши; MIM (missing-in-metastasis) – адаптерный белок; *mtss1* – ген, кодирующий белок MIM.

ВВЕДЕНИЕ

В эпителиальных клетках микрофиламенты (МФ, фибриллярный актин, или F-актин) вовлечены в регуляцию клеточных контактов, образование ламеллоподий и филоподий, модуляцию активности ионных каналов и другие процессы [1, 2]. Актиновый цитоскелет прямо или опосредованно (при участии актинсвязывающих белков) связан с цитоплазматическими участками ионных каналов и регулирует их воротные свойства, встраивание, интернализацию и др. [3–11]. Показано прямое взаимодействие актинового цитоскелета с эпителиальными натриевыми

каналами (ENaC) [11–14], водными каналами аквапорин 2 (AQP2) [15–17], каналами «муковисцидоза» (CFTR) [18–20] и др. Реорганизация актинового цитоскелета влияет на активность ионных каналов [7, 21–24]. Действие цитохалазина D приводит к увеличению вероятности открытого состояния (P_o) ENaC [10]. Предполагается, что именно короткие микрофиламенты, а не глобулярный G-актин или длинные фибриллы F-актина, регулируют активность различных ионных каналов [5, 10, 25, 26].

Ионные каналы ENaC, относящиеся к суперсемейству DEG/ENaC (дегенерины/эпителиальные натри-

евые каналы), экспрессируются в различных органах и тканях человека и животных (эпителии почки, легких, кишечника и др.) и обеспечивают направленный перенос ионов натрия от апикальной мембраны к базолатеральной. Отличительной чертой каналов суперсемейства DEG/ENaC является блокирование диуретиком амилоридом в наномолярной концентрации [27]. Согласно современным представлениям, функциональный канал ENaC образован тремя субъединицами – α , β , γ в соотношении 1 : 1 : 1 [28, 29]. В почке ENaC экспрессируется в эпителиальных клетках собирательных трубочек и опосредует регулирующую реабсорбцию ионов натрия, играя важную роль в поддержании водно-солевого гомеостаза и в регуляции давления крови [30, 31]. Обнаружена колокализация ENaC с актиновыми филаментами [14, 32] и актинсвязывающими белками (анкирин, спектрин и др. [33]). Показано взаимодействие канала с SH3-доменом α -спектрина за счет богатого пролином участка на С-конце α -субъединицы ENaC [25, 33, 34]. Существующая модель регуляции ENaC постоянно дополняется новыми данными – недавно было выявлено, что в доставке ENaC на апикальную мембрану клеток в собирательных трубочках почки участвует цитоскелетсвязывающий белок анкирин G [35]. Нами предложена модель, согласно которой кортактин (через комплекс Arp2/3) является связующим звеном между каналом и цитоскелетом клеток собирательных трубочек почки мыши [36]. Взаимодействие ENaC с цитоскелетом через адаптерные белки играет важную функциональную роль в регуляции реабсорбции натрия в дистальном отделе нефрона.

В 2002 году был открыт адаптерный белок MIM (missing-in-metastasis, отсутствующий при метастазировании), продукт гена *mtss1* (metastasis suppressor 1, супрессор метастазирования). Этот актинсвязывающий белок, как изначально предполагалось [37], значим при метастазировании некоторых видов злокачественных новообразований. MIM обнаружен как транскрипт, отсутствующий в клеточной линии метастатического рака молочной железы (клеточная линия SKBR3) и клеточных линиях метастатической аденокарциномы предстательной железы (LNCaP и PC3) [37–39]. Предполагалось, что MIM может функционировать как супрессор метастазирования [37], однако однозначного мнения на этот счет не сложилось [40, 41]. Обнаружено, что повышение экспрессии MIM коррелирует с некоторыми видами злокачественной трансформации, например при меланоме и плоскоклеточном раке головы и шеи [42, 43]. Повышение экспрессии MIM коррелирует с прогрессированием гепатокарциномы [44]. MIM включает в себя несколько важных доменов,

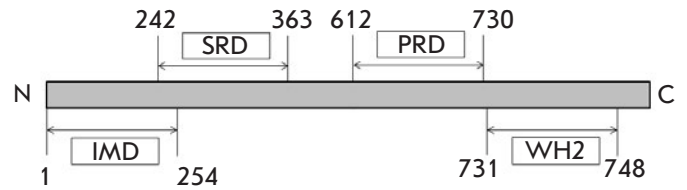


Рис. 1. Доменная структура белка MIM мыши (ген *mtss1*, UniProt Q8R1S4). Домен IMD связывает активные филаменты, PIP₂-богатые участки мембраны, малые GTP-азы Ras, участвует в димеризации белка. Домен SRD содержит сайты фосфорилирования по тирозину. Домен PRD связывается с кортактином и тирозинфосфатазой дельта. Домен WH2 связывает G-актин

которые, по всей видимости, играют ключевую роль во взаимодействии с другими белками (см. рис. 1). Так, N-концевой домен IMD (IRSp53-MIM homology domain) связывает актиновые филаменты, обогащенные PIP₂-участки мембраны, малые GTP-азы Ras и участвует в димеризации белка. Домен SRD (serine rich domain) содержит сайты фосфорилирования по тирозину; домен PRD (proline rich domain) связывается с кортактином и тирозинфосфатазой дельта; C-концевой домен WH2 (WASP homology domain 2) связывает G-актин. Предположительно, MIM вовлечен в регуляцию актинового цитоскелета посредством двух независимых актинсвязывающих доменов: IMD и WH2 [37, 39]. Показана колокализация MIM с кортактином, и вероятное их взаимодействие с помощью пролин-богатого домена белка (PRD) MIM [45]. MIM участвует в перестройках цитоскелета [38, 45, 46] – повышенная экспрессия MIM сопровождается формированием актин-богатых протрузий, наподобие раффлов и микрошипигов [47]. В клетках эпителия почки мыши MIM колокализуется с комплексом Arp2/3, где он может опосредовать сборку актиновых филаментов [48, 49]. Функционально активный белок собирается, по-видимому, в гомодимеры, и важную роль в этом процессе играет домен IMD [50]. MIM экспрессируется в почке эмбрионов мыши в области ветвящихся собирательных трубочек, тубул и гломерул [51]. Значительная экспрессия MIM обнаружена в кортикальном слое почек новорожденных мышей, слабая – в мозговой области. Мыши с нарушением гена *mtss1* (MIM^{-/-}) рождались здоровыми, но к 5 месяцу жизни почки примерно половины животных содержали большие и многочисленные кисты, проявляя признаки аутосомно-доминантной поликистозной болезни почек [51]. MIM модулирует взаимодействие между цитоскелетом и плазматической мембраной, способствуя поддержанию клеточных контактов в эпителии почки [52]. Учитывая

важную роль белка MIM в функционировании клеток эпителия почки, возникает вопрос об участии данного белка в регуляции активности ENaC. Задачей нашей работы было изучение вовлечения белка MIM в актин-зависимую регуляцию ENaC и расширение модели регуляции ENaC актинсвязывающими белками.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии

В работе использована клеточная линия СНО (Chinese Hamster Ovary cells) – иммортализованная клеточная линия, полученная на основе эпителиальных клеток яичников китайского хомяка (СНО-К1, Американская коллекция клеточных культур). Клетки культивировали в чашках Петри в среде DMEM, содержащей 10% сыворотки крови плодов коровы и 80 мкг/мл гентамицина.

Временная трансфекция

В работе использованы плазмиды, кодирующие: α -, β -, γ -субъединицы mENaC [36, 53] и различные формы белка MIM мыши (предоставлены доктором Lappalainen и доктором Zhao [45, 49, 54]). MIM full – полноценный белок; MIM PH – химерный белок, в котором инактивированный домен IMD конъюгирован с доменом PH (pleckstrin homology – домен, гомологичный плекстрину) фосфолипазы C дельта 1 (PLCD1), с нарушением способности димеризоваться; MIM Δ PRD – белок с делецией домена PRD (Δ 617–727), не взаимодействует с кортактином; MIM Δ WH2 – белок с делецией домена WH2 (Δ 746–759), не полимеризующий G-актин; MIM/IMD-L – плазида кодирует только длинный вариант сплайсинга отдельного домена IMD, который не способен взаимодействовать с GTP-азами Rac (остальная часть белка отсутствует). Все MIM-плазмиды кодируют белок мыши, они основаны на векторе pEGFP-N5. Вся информация по созданию плазмид приведена в ранее опубликованных статьях [49, 54]. Перестройки актинового цитоскелета анализировали с использованием временной трансфекции клеток различными плазмидами, кодирующими белок MIM и его мутантные формы, контролем служила трансфекция GFP. Для электрофизиологических экспериментов клетки высевали на покровные стекла 4×4 мм так, чтобы в день трансфекции плотность монослоя составляла 50–60%. За 24 ч до экспериментов проводили временную трансфекцию α -, β -, γ -субъединицами mENaC (соотношение 1 : 1 : 1) вместе с различными формами белка MIM. Весовое соотношение плазмидной ДНК: α -mENaC – 0.33 мкг, β -mENaC – 0.33 мкг, γ -mENaC – 0.33 мкг (суммарно 1 мкг плазмид, кодирующих mENaC), GFP в контроле – 1 мкг, MIM

(любой вариант имел GFP-метку) – 1 мкг. Суммарно на одну временную трансфекцию – 2 мкг плазмидной ДНК. Все эксперименты проводили на клетках линии СНО с использованием трансфицирующего реагента Polyfect (Qiagen). Маркером успешной трансфекции в контроле служила плазида, кодирующая GFP.

Визуализация актинового цитоскелета фиксированных клеток

Фиксацию и окрашивание трансфицированных клеток линии СНО проводили по стандартному протоколу [36]. Клетки высевали на покровные стекла (12×12 мм), на следующий день промывали PBS, фиксировали в течение 10 мин при комнатной температуре 3.7% формальдегидом. Далее клетки перфорировали 0.1% Triton X-100 (5 мин, комнатная температура), инкубировали в 2-мкМ растворе родамина-фаллоидина в течение 15 мин при 37°C (Sigma-Aldrich). Ядра окрашивали красителем Hoechst-33342 (5 мкг/мл, инкубация 5 мин, комнатная температура) и закрепляли на предметном стекле при помощи среды Vectashield (Vector Laboratories). После добавления каждого реагента (предварительно растворены в PBS) следовала промывка раствором PBS. Визуализацию осуществляли с помощью конфокального микроскопа Nikon A-1R, объектив $\times 100$, цифровое увеличение. Использовали лазеры с длинами волн возбуждения 405 нм (Hoechst-33342, максимум эмиссии 461 нм), 488 нм (GFP, максимум эмиссии 509 нм) и 561 нм (родамин-фаллоидин, максимум эмиссии 565 нм). Анализ и обработку изображений проводили в программном обеспечении ImageJ.

Электрофизиология

Интегральные токи регистрировали с помощью метода локальной фиксации потенциала (patch-clamp) в конфигурации whole-cell. Для определения максимального значения ENaC-опосредованного интегрального тока эксперименты проводили в условиях постоянного протока жидкости в камере (shear-stress); для определения минимального значения в конце эксперимента ENaC-опосредованный интегральный ток блокировали добавлением амилорида (10 мкМ). В работе использовали усилитель Axopatch 200B (Molecular Devices, Sunnyvale, CA, США), связанный посредством АЦП-ЦАП Digidata 1440A с компьютером с установленным программным обеспечением pClamp 10.2 (Molecular Devices). Во время проведения экспериментов использовали фильтр Бесселя 1 кГц. Записи токов получены в условиях фиксации напряжения с использованием ранее апробированного протокола [36] (схема подачи потенциала в эксперименте показана на рис. 3B): поддерживаемый потенциал +40 мВ, далее линей-

ное уменьшение с +60 мВ до -100 мВ (рампы, продолжительность 500 мс). Активность ENaC определяли как значение плотности тока (ток, нормализованный на электрическую емкость клетки) при потенциале -80 мВ. Для анализа использовали клетки со значением электрической емкости в интервале $6 \div 10$ пФ (электрическую емкость клетки компенсировали перед экспериментом). В качестве отрицательного контроля использовали котрансфекцию α -, β -, γ -ENaC и плазмиды, кодирующей GFP (основана на векторе pEGFP), по весовому соотношению плазмидной ДНК (1 мкг (α -, β -, γ -mENaC) и 1 мкг GFP). Внутриклеточный раствор (в мМ): 120 CsCl, 5 NaCl, 5 EGTA, 2 MgCl₂, 2 Mg-АТФ, 40 HEPES/Трис; рН 7.4. Внеклеточный раствор (в мМ): 140 LiCl, 2 MgCl₂, 10 HEPES/Трис, рН 7.4.

Статистическая обработка результатов

Все результаты представлены в виде среднее \pm стандартная ошибка среднего. Для анализа использовали непарный тест Стьюдента, рассчитанный в программном обеспечении Microcal Origin 6.1 (Microcal Software). Различия с $p < 0.05$ считали статистически значимыми.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние различных мутантных форм белка MIM на структуру актинового цитоскелета

Нами изучено влияние белка MIM (доменная структура представлена на рис. 1) на организацию актинового цитоскелета и активность ENaC. Действие белка MIM и его мутантов на актиновый цитоскелет анализировали на фиксированных клетках линии CHO, окрашенных родамином-фаллоидином. Структура актинового цитоскелета в клетках, трансфицированных полноценным белком MIM (рис. 2, MIM full), изменялась по сравнению с контрольной трансфекцией GFP (рис. 2, GFP) – наблюдалось утолщение пучков актиновых филаментов в примембранной области, индуцировалось образование выступов клеточной мембраны (микрошипики). Трансфекция химерным белком (рис. 2, MIM PH) привела к схожим изменениям структуры актинового цитоскелета, в то время как трансфекция белком с делецией пролин-богатого домена (не взаимодействующего с кортактином; рис. 2, MIM Δ PRD) или белком с делецией домена WH2 (не способен полимеризовать G-актин; рис. 2, MIM Δ WH2) не вызвала подобных изменений. Трансфекция длинного варианта сплайсинга отдельного домена IMD белка MIM (не способен взаимодействовать с GTP-азами Ras; рис. 2, MIM/IMD-L) приводила к неравномерному распределению актинового цитоскелета в сравнении с трансфекцией полноценным белком. Наши результаты согласу-

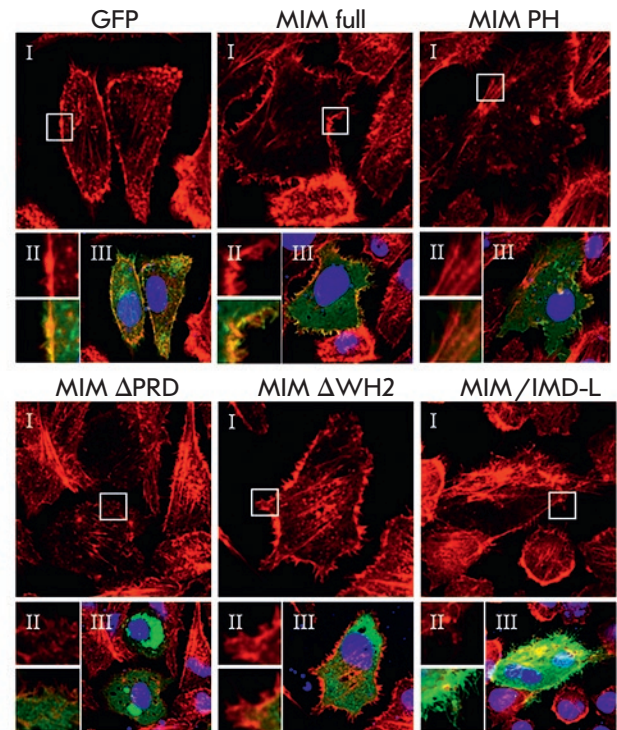
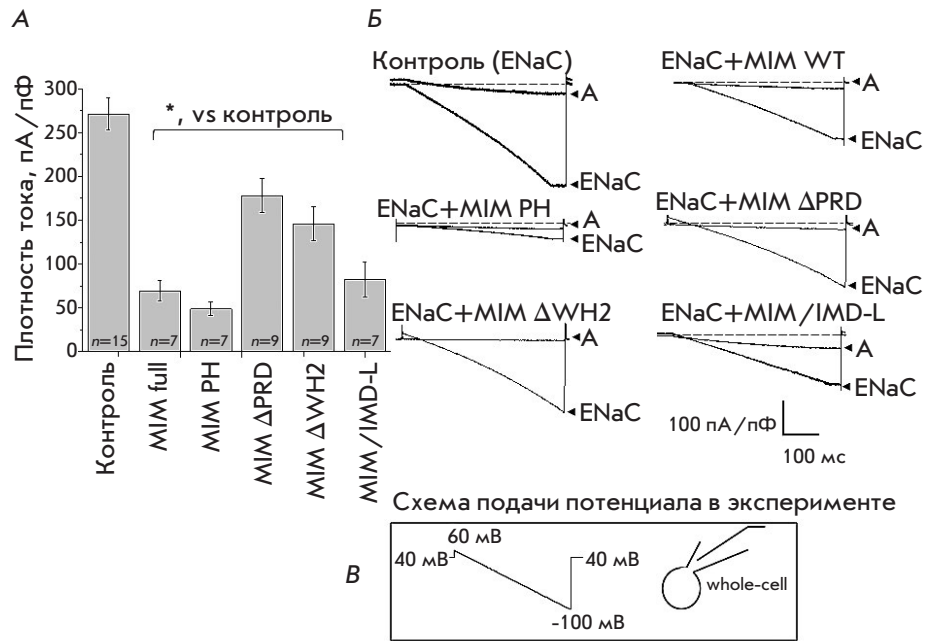


Рис. 2. Организация актинового цитоскелета после трансфекции различными мутантными формами белка MIM. Изображения актинового цитоскелета, полученные с помощью конфокального микроскопа (представлены типичные микрофотографии из трех независимых экспериментов): фиксированные клетки линии CHO после временной трансфекции плазмиды, кодирующими разные формы белка MIM (каждая плазида построена на векторе pEGFP). GFP – контрольная трансфекция; MIM full – полноценный белок; MIM PH – химерный белок, инактивированный домен IMD конъюгирован с доменом PH PLCD1, нарушена способность димеризоваться; MIM Δ PRD – белок с делецией домена PRD (Δ 617–727), не взаимодействует с кортактином; MIM Δ WH2 – белок с делецией домена WH2 (Δ 746–759), не полимеризует G-актин; MIM/IMD-L – длинный вариант сплайсинга отдельного домена IMD (остальная часть белка отсутствует), не способен взаимодействовать с GTP-азами Ras. I – Канал эмиссии родамина-фаллоидина (красный). II – увеличенные изображения выбранных участков: сверху – флуоресценция родамина-фаллоидина, снизу – совмещенное изображение. III – совмещенное изображение эмиссии GFP (зеленый), родамина-фаллоидина (красный) и Hoechst-33342 (краситель нуклеиновых кислот, синий)

ются с данными, полученными на клеточной линии фибробластов 3T3 [38], где трансфекция MIM-GFP приводила к появлению аномальных червеобразных (worm-like) актиновых структур и уменьше-

Рис. 3. Влияние различных мутантных форм белка MIM на плотность интегрального амилорид-чувствительного натриевого тока. Клетки линии CHO котрансфицированы тремя субъединицами mENaC вместе с GFP (контроль) либо mENaC вместе с различными формами белка MIM. А – суммирующая гистограмма плотностей тока, полученных в электрофизиологических экспериментах с использованием метода локальной фиксации потенциала в конфигурации whole-cell (*n* – число независимых экспериментов; * – *p* < 0.05). Б – записи типичных ENaC-опосредованных интегральных токов (ENaC – амплитуда тока, А – добавление амилорида в концентрации 10 мкМ). В – схема подачи потенциала в эксперименте



нию стресс-фибрилл. Сходные перестройки актинового цитоскелета наблюдали после трансфекции MIM/IMD-L (длинный вариант отдельного домена IMD) при изучении домена IMD в клетках линии U2OS [49]. Высказано предположение, что это происходит вследствие искривления плазматической мембраны. Таким образом, выявленные в нашем исследовании перестройки актинового цитоскелета связаны с доменами PRD и WH2 белка MIM. В связи с тем, что своим пролин-богатым доменом PRD MIM взаимодействует с кортактином, можно предположить, что белок MIM модулирует кортактин-зависимую и Arp2/3-опосредованную полимеризацию актина [52], важную для реализации различных клеточных функций, в том числе для образования клеточных выростов [49].

Влияние белка MIM на опосредованный ENaC интегральный ток

Динамические перестройки актинового цитоскелета являются одним из механизмов регуляции активности ENaC [14, 32]. Согласно данным, полученным нами на клеточной линии эпителия почки мыши, в регуляцию ENaC вовлечены актинсвязывающие белки кортактин и комплекс Arp2/3 [36]. Экспрессия белка MIM обнаружена в отделе почки, где экспрессируется ENaC, и установлена его колокализация с кортактином и белками, образующими комплекс Arp2/3 [45, 52]. В электрофизиологических экспериментах получены следующие значения плотности интегрального ENaC-опосредованного тока (пА/пФ):

в контроле – 271.2 ± 18.3 , после котрансфекции с MIM full – 69.6 ± 11.9 , с MIM PH – 48.9 ± 7.8 , с MIM ΔPRD – 178.0 ± 19.3 , с MIM ΔWH2 – 146.0 ± 19.4 , с MIM/IMD-L – 82.7 ± 19.8 . Суммарный график и примеры записей токов представлены на рис. 3А,Б. Как представлено на рис. 3А, ENaC-опосредованный ток был значительно ниже, когда субъединицы канала были трансфицированы совместно с MIM full. Кроме того, мы показали, что все протестированные нами мутанты значительно снижали активность канала по сравнению с контролем, в котором канал экспрессировался без белков MIM. Однако мутантные формы MIM (ΔPRD и ΔWH2) оказывали самое слабое влияние на плотность интегрального тока. Таким образом, мы можем предположить, что белок MIM (вместе с актинсвязывающими белками кортактином и комплексом Arp2/3) вовлечен в актин-опосредованную регуляцию ENaC. На основании полученных данных выдвинута гипотеза (рис. 4), согласно которой многофункциональный адаптерный белок MIM участвует в цитоскелет-опосредованной регуляции ENaC.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Давление крови в организме прямо зависит от гомеостаза ионов натрия (Na^+); контроль этого процесса осуществляют почки за счет реабсорбции Na^+ и воды при помощи различных ионных каналов и транспортеров, в том числе эпителиальных натриевых каналов (ENaC), в альдостерон-чувствительном дистальном отделе нефрона. Снижение вероятности от-

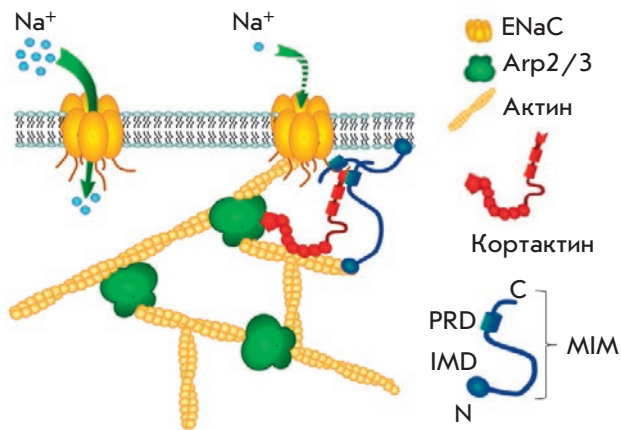


Рис. 4. Предложенная схема актин-зависимой регуляции ENaC с участием актинсвязывающих белков MIM, кортактина и белков, входящих в комплекс Arp2/3

крытого состояния ENaC, как показано ранее [36], может происходить вследствие кортактин-зависимой и Arp2/3-опосредованной реорганизации актинового цитоскелета, однако точный механизм регуляции активности ENaC актиновым цитоскелетом и адаптерными белками до конца не изучен. Новым участником многокомпонентной модели регуляции ENaC, возможно, является адаптерный белок MIM. С использованием метода локальной фиксации по-

тенциала удалось определить, что MIM участвует в цитоскелет-опосредованной регуляции активности ENaC, и показать важную роль доменов PRD и WH2. Полученные изображения актинового цитоскелета подтверждают участие белка MIM в процессах организации актинового цитоскелета. Таким образом, активность ENaC регулируется перестройками актинового цитоскелета при участии сложноорганизованного мультибелкового комплекса, который может включать в себя помимо кортактина и комплекса Arp2/3 также MIM (рис. 4). Изучение тонкой регуляции работы этого комплекса важно для понимания молекулярных механизмов, которые могут лежать в основе многих патофизиологических состояний. ●

Авторы благодарят Dr. Xi Zhan (University of Maryland School of Medicine) и Dr. Pekka Lappalainen (University of Helsinki) за предоставленные плазмиды для работы с белком MIM. Мы также благодарим И.О. Васильеву, В.И. Чубинского-Надеждина, Е.А. Морачевскую (Институт цитологии РАН) и Ю. Полину (Медицинский университет Южной Каролины) за критические комментарии, учтенные при написании данной статьи.

Работа поддержана грантами National Heart, Lung, and Blood Institute (R35 HL135749 and R01 HL108880) и National Institute of Diabetes and Digestive and Kidney Disease (R00 DK105160).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Janmey P.A. // *Physiol. Rev.* 1998. V. 78. № 3. P. 763–781.
- Le Clainche C., Carlier M.F. // *Physiol. Rev.* 2008. V. 88. № 2. P. 489–513.
- Wang Q., Zheng W., Wang Z., Yang J., Hussein S., Tang J., Chen X.Z. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 4. P. e0123018.
- Sudarikova A.V., Tsaplina O.A., Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Morachevskaya E.A., Negulyaev Y.A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2015. V. 461. № 1. P. 54–58.
- Karpushev A.V., Ilatovskaya D.V., Staruschenko A. // *BMC Res. Notes.* 2010. V. 3. P. 210.
- Alli A.A., Bao H.F., Liu B.C., Yu L., Aldrugh S., Montgomery D.S., Ma H.P., Eaton D.C. // *Am. J. Physiol. Renal Physiol.* 2015. V. 309. № 5. P. F456–463.
- Sasaki S., Yui N., Noda Y. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1838. № 2. P. 514–520.
- Rooj A.K., Liu Z., McNicholas C.M., Fuller C.M. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2015. V. 309. № 5. P. C308–319.
- Karpushev A.V., Levchenko V., Ilatovskaya D.V., Pavlov T.S., Staruschenko A. // *Hypertension.* 2011. V. 57. № 5. P. 996–1002.
- Karpushev A.V., Ilatovskaya D.V., Pavlov T.S., Negulyaev Y.A., Staruschenko A. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 1. P. e8827.
- Shin S.H., Lee E.J., Hyun S., Chun J., Kim Y., Kang S.S. // *Cell Signal.* 2012. V. 24. № 3. P. 641–651.
- Jovov B., Tousson A., Ji H.L., Keeton D., Shlyonsky V., Ripoll P.J., Fuller C.M., Benos D.J. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 53. P. 37845–37854.
- Copeland S.J., Berdiev B.K., Ji H.L., Lockhart J., Parker S., Fuller C.M., Benos D.J. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2001. V. 281. № 1. P. C231–240.
- Mazzochi C., Buben J.K., Smith P.R., Benos D.J. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 10. P. 6528–6538.
- Noda Y., Horikawa S., Katayama Y., Sasaki S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 322. № 3. P. 740–745.
- Noda Y., Sasaki S. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2006. V. 1758. № 8. P. 1117–1125.
- Moeller H.B., Praetorius J., Rutzler M.R., Fenton R.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 1. P. 424–429.
- Rogan M.P., Stoltz D.A., Hornick D.B. // *Chest.* 2011. V. 139. № 6. P. 1480–1490.
- Cantiello H.F. // *Exp. Physiol.* 1996. V. 81. № 3. P. 505–514.
- Chasan B., Geisse N.A., Pedatella K., Wooster D.G., Teintze M., Carattino M.D., Goldmann W.H., Cantiello H.F. // *Eur. Biophys. J.* 2002. V. 30. № 8. P. 617–624.
- Negulyaev Y.A., Vedernikova E.A., Maximov A.V. // *Mol. Biol. Cell.* 1996. V. 7. № 12. P. 1857–1864.
- Negulyaev Y.A., Khaitlina S.Y., Hinssen H., Shumilina E.V., Vedernikova E.A. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 52. P. 40933–40937.
- Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Sudarikova A.V., Nikolsky N.N.,

- Morachevskaya E.A. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2013. V. 450. P. 126–129.
24. Chubinskiy-Nadezhdin V.I., Negulyaev Y.A., Morachevskaya E.A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2011. V. 412. № 1. P. 80–85.
25. Cantiello H.F., Stow J.L., Prat A.G., Ausiello D.A. // *Am. J. Physiol.* 1991. V. 261. № 5 Pt 1. P. C882–888.
26. Staruschenko A., Negulyaev Y.A., Morachevskaya E.A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. V. 1669. № 1. P. 53–60.
27. Kleyman T.R., Cragoe E.J., Jr. // *Semin. Nephrol.* 1988. V. 8. № 3. P. 242–248.
28. Staruschenko A., Adams E., Booth R.E., Stockand J.D. // *Biophys. J.* 2005. V. 88. № 6. P. 3966–3975.
29. Canessa C.M., Schild L., Buell G., Thorens B., Gautschi I., Horisberger J.D., Rossier B.C. // *Nature.* 1994. V. 367. № 6462. P. 463–467.
30. Garty H., Palmer L.G. // *Physiol Rev.* 1997. V. 77. № 2. P. 359–396.
31. Alvarez de la Rosa D., Canessa C.M., Fyfe G.K., Zhang P. // *Annu. Rev. Physiol.* 2000. V. 62. P. 573–594.
32. Mazzochi C., Benos D.J., Smith P.R. // *Am. J. Physiol. Renal. Physiol.* 2006. V. 291. № 6. P. F1113–1122.
33. Rotin D., Bar-Sagi D., O’Brodivich H., Merilainen J., Lehto V.P., Canessa C.M., Rossier B.C., Downey G.P. // *EMBO J.* 1994. V. 13. № 19. P. 4440–4450.
34. Smith P.R., Saccomani G., Joe E.H., Angelides K.J., Benos D.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. № 16. P. 6971–6975.
35. Klemens C.A., Edinger R.S., Kightlinger L., Liu X., Butterworth M.B. // *J. Biol. Chem.* 2017. V. 292. № 1. P. 375–385.
36. Ilatovskaya D.V., Pavlov T.S., Levchenko V., Negulyaev Y.A., Staruschenko A. // *FASEB J.* 2011. V. 25. № 8. P. 2688–2699.
37. Lee Y.G., Macoska J.A., Korenchuk S., Pienta K.J. // *Neoplasia.* 2002. V. 4. № 4. P. 291–294.
38. Mattila P.K., Salminen M., Yamashiro T., Lappalainen P. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 10. P. 8452–8459.
39. Machesky L.M., Johnston S.A. // *J. Mol. Med. (Berl).* 2007. V. 85. № 6. P. 569–576.
40. Nixdorf S., Grimm M.O., Loberg R., Marreiros A., Russell P.J., Pienta K.J., Jackson P. // *Cancer Lett.* 2004. V. 215. № 2. P. 209–220.
41. Bompard G., Sharp S.J., Freiss G., Machesky L.M. // *J. Cell. Sci.* 2005. V. 118. Pt. 22. P. 5393–5403.
42. Dawson J.C., Bruche S., Spence H.J., Braga V.M., Machesky L.M. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 3. P. e31141.
43. Mertz K.D., Pathria G., Wagner C., Saarikangas J., Sboner A., Romanov J., Gschaider M., Lenz F., Neumann F., Schreiner W., et al. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 3465.
44. Ma S., Guan X.Y., Lee T.K., Chan K.W. // *Hum. Pathol.* 2007. V. 38. № 8. P. 1201–1206.
45. Lin J., Liu J., Wang Y., Zhu J., Zhou K., Smith N., Zhan X. // *Oncogene.* 2005. V. 24. № 12. P. 2059–2066.
46. Yamagishi A., Masuda M., Ohki T., Onishi H., Mochizuki N. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 15. P. 14929–14936.
47. Woodings J.A., Sharp S.J., Machesky L.M. // *Biochem. J.* 2003. V. 371. Pt 2. P. 463–471.
48. Lee S.H., Kerff F., Chereau D., Ferron F., Klug A., Dominguez R. // *Structure.* 2007. V. 15. № 2. P. 145–155.
49. Mattila P.K., Pykalainen A., Saarikangas J., Paavilainen V.O., Vihinen H., Jokitalo E., Lappalainen P. // *J. Cell. Biol.* 2007. V. 176. № 7. P. 953–964.
50. Cao M., Zhan T., Ji M., Zhan X. // *Biochem. J.* 2012. V. 446. № 3. P. 469–475.
51. Xia S., Li X., Johnson T., Seidel C., Wallace D.P., Li R. // *Development.* 2010. V. 137. № 7. P. 1075–1084.
52. Saarikangas J., Mattila P.K., Varjosalo M., Bovellan M., Hakanen J., Calzada-Wack J., Tost M., Jennen L., Rathkolb B., Hans W., et al. // *J. Cell. Sci.* 2011. V. 124. Pt 8. P. 1245–1255.
53. Staruschenko A., Pochynyuk O.M., Tong Q., Stockand J.D. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2005. V. 1669. № 2. P. 108–115.
54. Zhao H., Pykalainen A., Lappalainen P. // *Curr. Opin. Cell. Biol.* 2011. V. 23. № 1. P. 14–21.

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 комплексные 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.