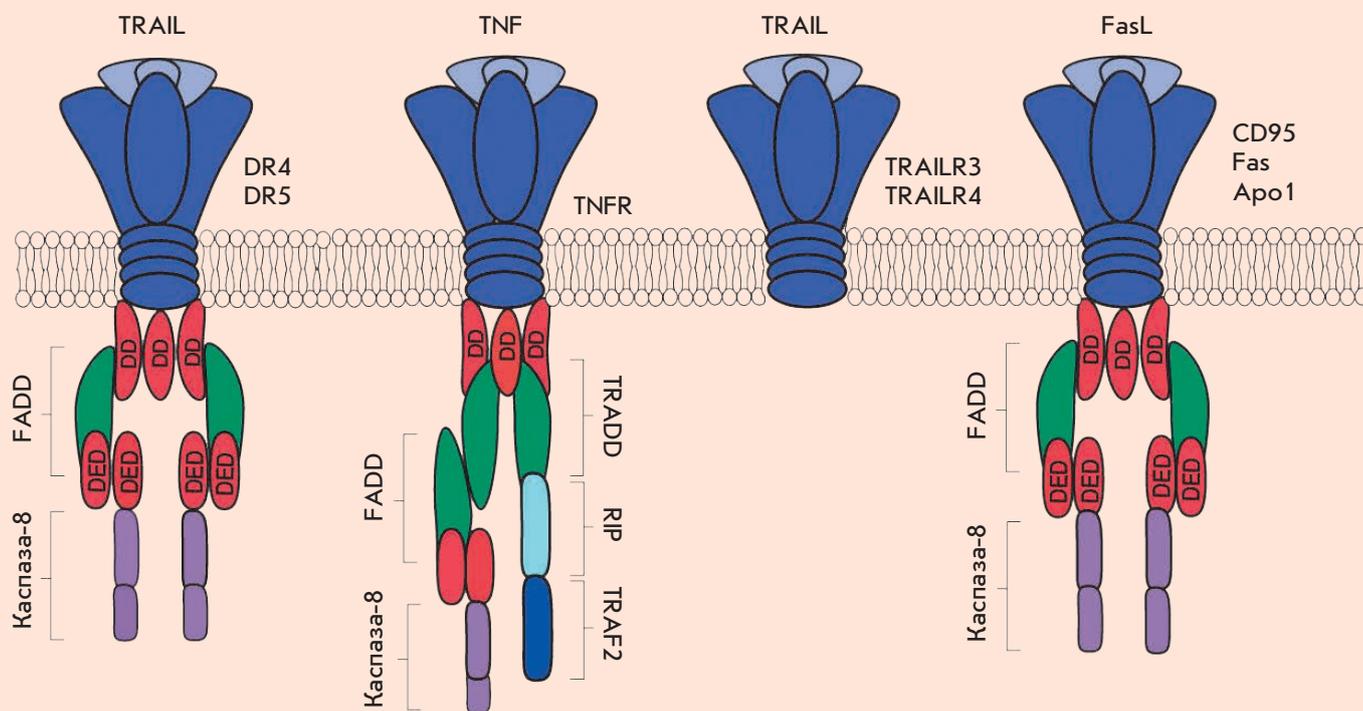


# Acta Naturae

## Рецепторы смерти: НОВЫЕ ВОЗМОЖНОСТИ В ТЕРАПИИ ОНКОЛОГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ



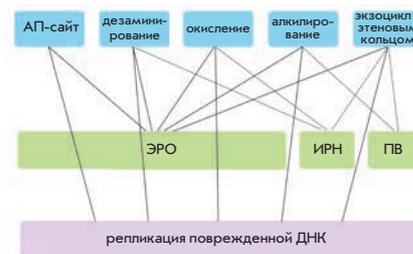
**ВЕКТОРНЫЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ  
БОЛЕЗНИ, ВЫЗВАННОЙ ВИРУСОМ  
ЭБОЛА  
СТР. 4**

**ПРОГНОЗИРОВАНИЕ  
ЭВОЛЮЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ  
ВИРУСА ГРИППА А  
СТР. 51**

## Необъемные повреждения ДНК у человека: пути образования, репарации и репликации

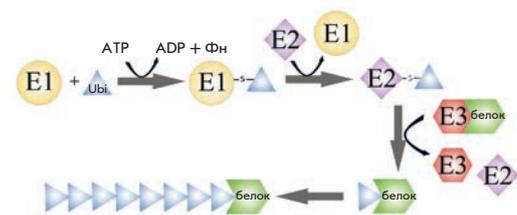
А. В. Игнатов, К. А. Бондаренко, А. В. Макарова

Повреждения ДНК являются одной из основных причин нарушений репликации, возникновения мутаций и клеточной гибели. В обзоре рассмотрены основные типы «необъемных» повреждений, встречающиеся в геномной ДНК человека, механизмы их образования, пути репарации, а также роль специализированных ДНК-полимераз в репликации поврежденной ДНК.



Основные пути репарации «необъемных» повреждений ДНК у человека

## Протеасомы в регуляции белкового гомеостаза плюрипотентных стволовых клеток



Убиквитин-протеасомная система

А. В. Селенина, А. С. Цимоха, А. Н. Томилин

Эмбриональные и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки представляют интерес не только для фундаментальных исследований, но и для медицины. Механизмы поддержания в них белкового гомеостаза с помощью убиквитин-протеасомной системы изучены мало. Данная система путем деградации белков контролирует важнейшие клеточные процессы. Поэтому изучение роли этой системы и механизмов ее работы в плюрипотентных клетках позволит лучше понять их биологию, открывая новые подходы в регенеративной медицине.

## Изменение содержания иммунопротеасом и макрофагов в печени крыс при индукции донорспецифической толерантности

Я. Д. Карпова, В. Д. Устиченко, Н. М. Алабедакарим, А. А. Степанова, Ю. В. Люпина, К. И. Богуславский, Г. А. Божок, Н. П. Шарова

Индукция донорспецифической толерантности (ДСТ) путем введения клеток донора в портальную вену реципиента является одним из методов решения проблемы приживления трансплантатов. Однако механизм развития ДСТ не выяснен. В представленной работе методами Вестерн-блоттинга и проточной цитофлуориметрии впервые изучено изменение содержания иммунопротеасом и макрофагов в печени крыс на ранних сроках развития аллоспецифической портальной толерантности.

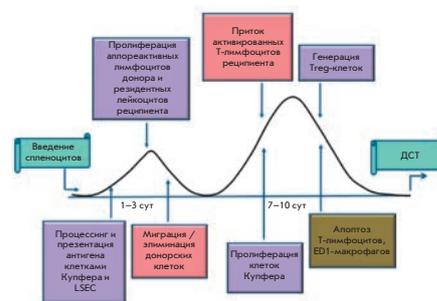


Схема индукции и развития ДСТ

## 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. Беспрозванный (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 (Компъень, Франция),  
В.К. Швядас (Москва, Россия),  
Н.К. Янковский (Москва, Россия)

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

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

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

© ACTA NATURAE, 2017

Номер подписан в печать 27 сентября 2017 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

И. В. Должикова, Е. А. Токарская, А. Ш. Джаруллаева,  
А. И. Тухватулин, Д. В. Щебляков, О. Л. Воронина,  
С. И. Сыромятникова, С. В. Борисевич, В. Б. Пантюхов,  
В. Ф. Бабира, Л. В. Колобухина, Б. С. Народицкий,  
Д. Ю. Логунов, А. Л. Гинцбург

**Векторные вакцины против болезни, вызванной  
вирусом Эбола ..... 4**

А. В. Игнатов, К. А. Бондаренко, А. В. Макарова  
**Необъемные повреждения ДНК у человека: пути  
образования, репарации и репликации ..... 13**

О. В. Марков, Н. Л. Миронова, В. В. Власов,  
М. А. Зенкова

**Противоопухолевые вакцины на основе ден-  
дритных клеток: от экспериментов на животных  
моделях до клинических испытаний ..... 29**

А. В. Селенина, А. С. Цимоха, А. Н. Томилин

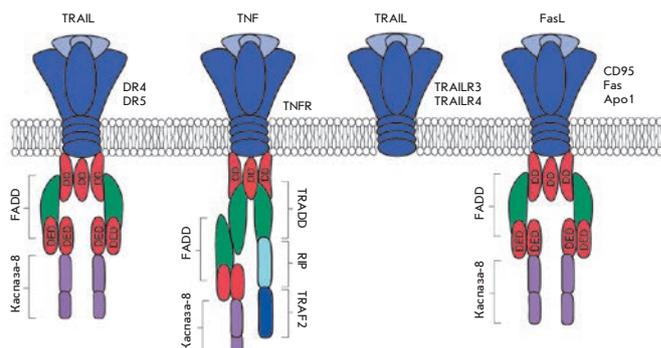
**Протеасомы в регуляции белкового гомеостаза  
плюрипотентных стволовых клеток ..... 42**

- Т. А. Тимофеева, М. Н. Асатрян, А. Д. Альтштейн,  
Б. С. Народицкий, А. Л. Гинцбург, **Н. В. Каверин**  
**Прогнозирование эволюционной изменчивости  
вируса гриппа А** ..... 51
- В. М. Украинская, А. В. Степанов, И. С. Глаголева,  
В. Д. Кнорре, А. А. Белогуров, А. Г. Габибов  
**Рецепторы смерти: новые возможности в терапии  
онкологических заболеваний** ..... 59

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- А. П. Богачук, З. И. Сторожева, Г. Б. Телегин,  
А. С. Чернов, А. Т. Прошин, В. В. Шерстнев,  
Ю. А. Золотарев, В. М. Липкин  
**Специфическая активность амидной формы  
пептида HLDF-6: изучение на трансгенной модели  
болезни Альцгеймера** ..... 68
- Я. Д. Карпова, В. Д. Устиченко,  
Н. М. Алабедаькарим, А. А. Степанова,  
Ю. В. Люпина, К. И. Богуславский, Г. А. Божок,  
Н. П. Шарова  
**Изменение содержания иммунопротеасом  
и макрофагов в печени крыс при индукции донор-  
специфической толерантности** ..... 75
- Д. Э. Коржевский, В. В. Гусельникова, О. В. Кирик,  
Е. Г. Сухорукова, И. П. Григорьев  
**Пространственная организация внутриядерных  
структур дофаминергических нейронов мозга  
человека** ..... 85
- М. А. Носенко, Н. В. Малюченко, М. С. Друцкая,  
А. Ю. Архипова, И. И. Агапов, С. А. Недоспасов,  
М. М. Мойсенович  
**Индукция экспрессии ICAM-1 в эмбриональных  
фибробластах мышцы при их культивировании  
на губчатых фиброин-желатиновых  
скаффолдах** ..... 93
- Л. В. Путляева, А. М. Шварц, А. В. Клепикова,  
И. Е. Воронцов, И. В. Кулаковский, Д. В. Купраш  
**Минорный вариант однонуклеотидного  
полиморфизма rs3753381 увеличивает  
активность энхансера гена *SLAMF1*** ..... 98

- Е. А. Соколова, Г. М. Прошкина, О. М. Кутова,  
И. В. Балалаева, С. М. Деев  
**Влияние рекомбинантного адресного  
токсина DARPIn-PE40 на динамику роста  
HER2-положительных опухолей** ..... 108
- A. Buivydiene, V. Liakina, J. Valantinas, J. Norkuniene,  
E. Mockiene, S. Jokubauskiene, R. Smaliukiene,  
L. Jancoriene, L. Kovalevska, E. Kashuba  
**Expression Levels of the Uridine-Cytidine Kinase  
Like-1 Protein as a Novel Prognostic Factor for  
the Hepatitis C Virus-associated Hepatocellular  
Carcinomas** ..... 114
- Правила для авторов** ..... 121



**РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ**  
(см. статью Украинской и др.)

УДК 615.371

# Векторные вакцины против болезни, вызванной вирусом Эбола

И. В. Должикова<sup>1\*</sup>, Е. А. Токарская<sup>1</sup>, А. Ш. Джаруллаева<sup>1</sup>, А. И. Тухватулин<sup>1</sup>,  
Д. В. Щербляков<sup>1</sup>, О. Л. Воронина<sup>1</sup>, С. И. Сыромятникова<sup>2</sup>, С. В. Борисевич<sup>2</sup>, В. Б. Пантюхов<sup>2</sup>,  
В. Ф. Бабира<sup>3</sup>, Л. В. Колобухина<sup>4</sup>, Б. С. Народицкий<sup>1</sup>, Д. Ю. Логунов<sup>1</sup>, А. Л. Гинцбург<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

<sup>2</sup>48 Центральный научно-исследовательский институт Министерства обороны Российской Федерации, 141306, Московская обл., Сергиев Посад-6, ул. Октябрьская, 11

<sup>3</sup>Филиал № 7 «Главный военный клинический госпиталь им. академика Н.Н. Бурденко» Министерства обороны Российской Федерации, 141306, Московская обл., Сергиев Посад-6, ул. Новая, 4

<sup>4</sup>Инфекционная клиническая больница № 1 Департамента здравоохранения города Москвы, 125367, Москва, Волоколамское ш., 63

\*E-mail: i.dolzhikova@gmail.com

Поступила в редакцию 02.03.2017

Принята к печати 05.06.2017

**РЕФЕРАТ** Болезнь, вызванная вирусом Эбола (БВВЭ), – одно из опаснейших инфекционных заболеваний человека и животных. Впервые вспышка этого заболевания произошла в 1976 году в Судане и Заире. С тех пор было зафиксировано более 20 вспышек, самая крупная из которых в 2014–2016 годах переросла в эпидемию на территории Западной Африки и унесла жизни более 11000 человек. Хотя наиболее эффективным средством борьбы с эпидемиями является вакцинопрофилактика, к началу эпидемии БВВЭ в мире не было ни одной зарегистрированной и разрешенной к применению вакцины. Разработка первых вакцин против БВВЭ началась еще в 1980 году и прошла огромный технологический путь от инактивированных до генно-инженерных вакцин на основе рекомбинантных вирусных векторов. Данный обзор посвящен векторным вакцинам против БВВЭ, которые показали наибольшую эффективность в доклинических исследованиях и в настоящее время находятся на разных этапах клинических исследований. Особое внимание уделено механизмам развития иммунного ответа, важным для защиты организма от БВВЭ, а также ключевым параметрам вакцин, необходимых для индукции длительного протективного иммунитета против БВВЭ.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** вакцины против болезни, вызванной вирусом Эбола, векторные вакцины, рекомбинантные вирусные векторы, вирус Эбола.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** Ad3, ChAd3 – рекомбинантный аденовирус шимпанзе серотипа 3; Ad5 – рекомбинантный аденовирус человека серотипа 5; Ad26 – рекомбинантный аденовирус человека серотипа 26; BDBV – вирус Эбола Бундибугио; GMT – геометрическое среднее титра; GMC – геометрическое среднее концентрации; GP – гликопротеин; MARV – вирус Марбург; MVA – рекомбинантный модифицированный вирус осповакцины Анкара; NP – нуклеопротеин; RESTV – вирус Эбола Рестон; SUDV – вирус Эбола Судан; TAFV – вирус Эбола леса Тай; VSV – рекомбинантный вирус везикулярного стоматита; ZEBOV – вирус Эбола Заир; БВВЭ – болезнь, вызванная вирусом Эбола; БОЕ – бляшкообразующие единицы; ВНА – вируснейтрализующие антитела; вч – вирусные частицы; ИФНгамма – интерферон гамма; НЯ – нежелательное явление.

## БОЛЕЗНЬ, ВЫЗВАННАЯ ВИРУСОМ ЭБОЛА

Вирус Эбола вызывает одно из самых опасных заболеваний, поражающих человека и приматов. Болезнь, вызываемая вирусом Эбола (БВВЭ), характеризуется тяжелым течением, общей интоксикацией и высоким уровнем летальности, достигающим 90% [1–3]. Вирус рода Эбола (*Ebolavirus*) входит

в семейство Filoviridae. Вирусные частицы всех вирусов семейства Filoviridae (отряд Mononegavirales) имеют характерную филаментоподобную форму, их геном представлен одноцепочечной РНК с отрицательной полярностью. Выделяют три рода филовирусов: *Ebolavirus*, *Marburgvirus* и *Cuevavirus*. Из них выраженной патогенностью для человека обладают

*Ebolaviruses* и *Marburgviruses*, а наиболее патогенным является вирус Эбола (ЕВОВ). В настоящее время обнаружено пять видов вируса Эбола: *Bundibugyo ebolavirus* (BDBV), *Zaire ebolavirus* (ZEBOV), *Reston ebolavirus* (RESTV), *Sudan ebolavirus* (SUDV), *Tai Forest ebolavirus* (ТАFV), из которых ZEBOV, SUDV и BDBV представляют наибольшую опасность для человека [4, 5].

Впервые БВВЭ была выявлена в 1976 году в Ямбуку (Демократическая Республика Конго, в то время северная часть Заира) и в Нзаре (Судан). В том же году от больного, который проживал вблизи реки Эбола, был впервые выделен возбудитель БВВЭ – вирус Эбола (*Ebolavirus*) [6, 7].

С момента выделения патогена и до настоящего времени зарегистрировано более 20 вспышек БВВЭ, самая крупная из которых в 2014–2016 годах переросла в эпидемию (28616 случаев) и унесла жизни более 11000 человек [8]. К моменту этой эпидемии в мире не было зарегистрировано ни профилактических, ни терапевтических средств против БВВЭ. В то же время в Вирусологическом центре научно-исследовательского института Минобороны России для экстренной профилактики и лечения групп высокого риска был разработан специфический гетерологичный (лошадиный) иммуноглобулин против лихорадки Эбола, который показал 100% протективную активность в опытах на обезьянах [9]. В связи с высоким уровнем смертности во время последней эпидемии БВВЭ и распространением вируса за пределы Африки в начале августа 2014 года был создан Комитет ВОЗ, который пришел к выводу, что начавшаяся вспышка БВВЭ представляет собой чрезвычайную ситуацию, имеющую международное значение, что значительно ускорило разработку профилактических и терапевтических средств против БВВЭ. Так, через 2 года было создано несколько вакцинных препаратов, которые в настоящее время находятся на различных стадиях клинических исследований, а две вакцины, разработанные в России, зарегистрированы для медицинского применения.

### **ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БВВЭ: ИСТОРИЯ И СТРАТЕГИИ РАЗРАБОТКИ**

Наиболее эффективным и экономичным способом защиты от инфекционных заболеваний является вакцинопрофилактика, однако к началу последней вспышки лихорадки Эбола (2014–2016) не было ни одной разрешенной к применению вакцины.

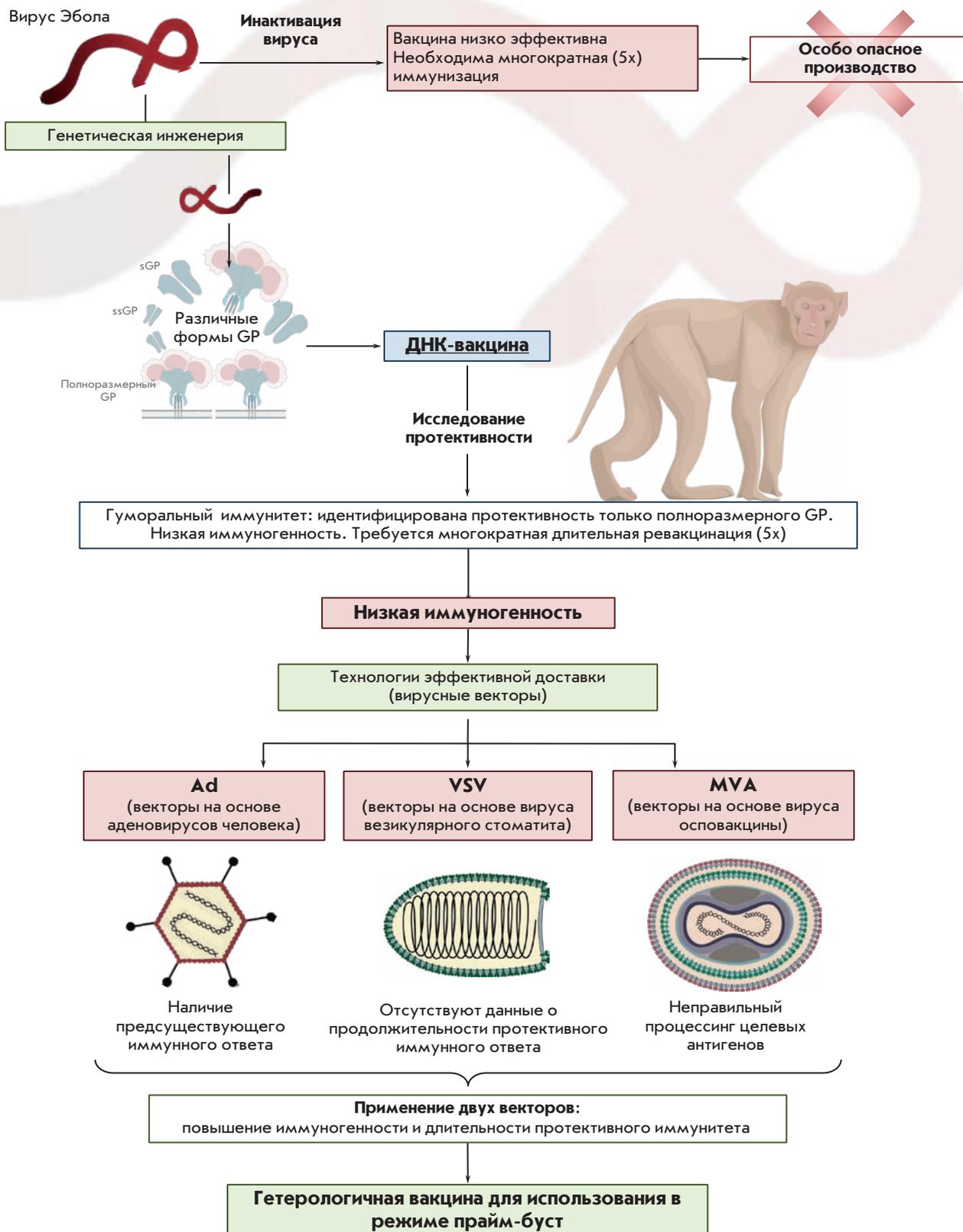
Разработка первых вакцин от лихорадки Эбола началась после идентификации вируса и фокусировалась в основном на попытках создать эффективную вакцину на основе инактивированного вируса Эбола

(*рисунок*). В 1980 году на морских свинках была апробирована первая кандидатная вакцина на основе инактивированного нагреванием или формалином вируса Эбола, которая показала 100% протективность [10]. Однако, несмотря на высокую эффективность у морских свинок, вакцина не обеспечивала должный уровень защиты приматов от летальной инфекции [11]. Еще одним минусом такой вакцины были крайне опасные условия производства. Все вместе делало внедрение такой вакцины в клиническую практику нецелесообразным (*рисунок*).

Для создания эффективной и безопасной вакцины потребовалось еще более 15 лет. Связано это с тем, что длительное время оставались непонятными особенности экспрессии основного протективного антигена GP вируса Эбола. Прорыв был совершен в 1995 году, когда была опубликована статья Волчкова В.Е. и соавт. [12]. Было показано, что в результате редактирования РНК вирусной полимеразой образуется несколько форм GP, из которых только 20% представляют собой полноразмерный оболочечный антиген GP [12] (*рисунок*). В той же работе обнаружили, что GP, экспрессируемый в эукариотических клетках, подвергается обширному гликозилированию, что, как оказалось впоследствии, критично для сохранения иммуногенности и протективности антигена [12, 13].

Понимание особенностей биосинтеза различных форм GP привело, в первую очередь, к созданию кандидатных ДНК-вакцин. Плазмидные векторы, на основе которых сконструированы такие вакцины, содержали ген полноразмерного гликопротеина GP или ген нуклеопротеина вируса Эбола. Эти вакцины показали достаточно высокий уровень протекции в исследованиях на животных, причем эффективность ДНК-вакцины, несущей ген гликопротеина GP вируса Эбола, была выше, чем у вакцины, несущей ген нуклеопротеина NP вируса Эбола [14]. Однако использование таких вакцин требовало многократного (5 раз) введения препарата для достижения высокого уровня протективности [15], что является критическим лимитирующим фактором для эффективного их применения в условиях разворачивающейся эпидемии.

Проблема многократной вакцинации разрешилась с распространением технологии получения рекомбинантных вирусных векторов (*рисунок*). Такие векторы, в отличие от ДНК-вакцин, обеспечивают высокий и длительный уровень экспрессии целевого трансгена, что позволяет индуцировать протективный иммунитет после одной-двух иммунизаций [16–18]. В экспериментах с прямым сравнением показано, что иммунный ответ значительно быстрее формируется при введении кандидатной вакцины на основе рекомбинантного вирусного вектора, нежели на ос-



Стратегии разработки вакцин против БВВЭ

нове плазмидной ДНК [16]. При этом необходимо отметить, что при иммунизации наряду с гуморальным иммунным ответом развивался более выраженный клеточный (CD8+ и CD4+) иммунный ответ, что, как оказалось впоследствии, является ключевым моментом для защиты от лихорадки Эбола. В различных исследованиях было показано, что ключевую роль в формировании протективного иммунитета к вирусу Эбола играет именно клеточный иммунитет [19, 20]. При направленном истощении CD3+ (CD8+ и CD4+) клеток у иммунизированных против БВВЭ обезьян происходило снижение протективного иммунитета, сформированного вакцинацией, что приводило к гибели всех животных от инфекции, вызванной вирусом Эбола. При истощении только CD8+ клеток у иммунизированных обезьян также снижался протективный ответ: погибли 80% животных. Тогда как пассивный перенос поликлональных антител к вирусу Эбола в высоких титрах от вакцинированных обезьян к наивным обеспечивал неполную их защиту от летальной инфекции: 75% особей погибли, несмотря на высокие титры общих антител IgG и ВНА в сыворотке периферической крови [20]. Косвенно важное значение клеточного иммунитета было подтверждено тем, что у людей, выживших после перенесенной БВВЭ, в периферической крови наблюдалось повышение количества специфических CD8+ клеток по сравнению со здоровыми людьми. При этом количество специфических CD4+ клеток практически не увеличивалось [21].

Обобщая более чем тридцатилетнюю историю исследований, направленных на разработку эффективной вакцины против БВВЭ, можно сделать вывод, что «идеальная» вакцина против лихорадки Эбола должна индуцировать формирование клеточного и гуморального иммунного ответа, должна вводиться минимальное количество раз, а также формировать длительный протективный иммунитет.

Использование рекомбинантных вирусных векторов позволяет обеспечить все указанные условия, в связи с чем именно вакцины, разработанные на их основе, поддержаны ВОЗ во время последней эпидемии БВВЭ в качестве перспективного направления разработки вакцин против лихорадки Эбола.

### **ВЕКТОРНЫЕ ВАКЦИНЫ ПРОТИВ БВВЭ, ВЫШЕДШИЕ В КЛИНИЧЕСКИЕ ИССЛЕДОВАНИЯ**

Основная часть разрабатываемых вакцин против лихорадки Эбола основана на использовании рекомбинантных вирусных векторов, экспрессирующих протективный антиген GP – полноразмерный поверхностный гликопротеин вируса Эбола.

В настоящее время завершены клинические исследования фазы 3 вакцины на основе рекомби-

нантного вируса везикулярного стоматита (VSV). Вакцины на основе VSV, кодирующие GP вируса Эбола Заир (1995 Киквит) и Судан, показали свою эффективность в серии доклинических исследований на приматах [22, 23]. В серии клинических исследований показана высокая иммуногенность вакцины на основе VSV [24, 25]. Вакцина индуцировала высокий уровень GP-специфичных антител (*таблица*), ассоциированных с протективностью в исследованиях на приматах. В клинических исследованиях, проведенных в Европе и Африке, было показано, что использование вакцины на основе VSV в различных дозах приводило к индукции гуморального иммунного ответа, при этом уровни GP-специфичных антител были сходны. В фазе 3 клинических исследований в Гвинее (с использованием кольцевой вакцинации) показана 100% эффективность вакцины [26, 27].

Вакцина на основе рекомбинантного аденовируса человека серотипа 5 (Ad5), кодирующая полноразмерный GP 2014 ZEBOV, прошла фазу 1 клинических исследований в Китае [28, 29]. Введение высокой дозы вакцины ( $1.6 \times 10^{11}$  вч) индуцировало выработку высокого уровня GP-специфичных антител в титре 1 : 1306 у 100% добровольцев через 1 мес. после вакцинации, Т-клеточный ответ имел максимум на 14 день, но снизился к 28 дню исследования. Через 6 мес. после вакцинации титр антител к GP значительно снизился и составил 1 : 198 (*таблица*). Ревакцинацию добровольцев проводили через 6 мес. после первичной вакцинации. Через 4 недели после ревакцинации вакцина индуцировала формирование высокого уровня GP-специфичных антител (титр 1 : 11825) в сыворотке крови добровольцев. Через 1 год после ревакцинации титр GP-специфичных антител в сыворотке крови добровольцев составил 1 : 857. Одну из главных проблем, ограничивающих использование векторов на основе Ad5, представляет широкая распространенность в популяции предсуществующего иммунитета к Ad5 (наличие Ad5-нейтрализующих антител). Показано [29, 30], что наличие антител к Ad5 до вакцинации приводит к индукции более низкого GP-специфичного гуморального и Т-клеточного ответа после вакцинации. Однако во время клинических исследований вакцины в Китае было показано, что применение высокой дозы вакцины на основе Ad5 способно снизить негативное влияние предсуществующего иммунитета на формирование GP-специфичного иммунного ответа [29].

Другой способ решения проблемы предсуществующего иммунитета к вакцинному вектору – использование таких серотипов рекомбинантных векторов, предсуществующий иммунитет к которым редко детектируется в человеческой популяции [31], напри-

Вакцины, которые находятся на разных стадиях клинических исследований

Вакцина	Доза	Происхождение антигена	Иммунный ответ (титр EBOV GP-специфичных IgG)	Наиболее частое НЯ	Ссылка
Ad5	Низкая ( $2 \times 10^9$ вч) Высокая ( $2 \times 10^{10}$ вч)	EBOV SUDV	GMT: Низкая: 85 (День 28) Высокая: 155 (День 28)	Головная боль	[30]
Ad5	Низкая ( $4 \times 10^{10}$ вч) Высокая ( $1.6 \times 10^{11}$ вч)	EBOV	GMT: Низкая: 682.7 (День 28) Высокая: 1305.7 (День 28)	Боль в месте введения	[28]
Ad5	Прайм-буст (6 мес.) Низкая ( $4 \times 10^{10}$ вч) Высокая ( $1.6 \times 10^{11}$ вч)	EBOV	GMT: Низкая: 682.7 (День 28) 575.5 (6 мес.) 6110 (День 28 после бустирования) 674.1 (12 мес. после бустирования) Высокая: 1305.7 (День 28) 197.9 (6 мес.) 11825 (День 28 после бустирования) 856.8 (12 мес. после бустирования)	Боль в месте введения	[29]
Ad26+ MVA	Группа 1 Праймирование: Ad26 ( $5 \times 10^{10}$ вч) Бустирование: MVA ( $10^8$ TCID <sub>50</sub> ) Группа 2: Праймирование: MVA ( $10^8$ TCID <sub>50</sub> ) Бустирование: Ad26 ( $5 \times 10^{10}$ вч)	EBOV; SUDV; MARV; TAFV	GMC: Группа 1: 7553 (День 21) Группа 2: 18474 (День 21)	Боль в месте введения	[41]
ChAd3	Низкая ( $2 \times 10^{10}$ вч) Высокая ( $2 \times 10^{11}$ вч)	EBOV; SUDV	GMT: Низкая: 331 (День 28) Высокая: 2037 (День 28)	Лихорадка	[32]
ChAd3+ MVA	Праймирование: ChAd3 Группа 1 ( $1 \times 10^{10}$ вч) Группа 2 ( $2.5 \times 10^{10}$ вч) Группа 3 ( $5 \times 10^{10}$ вч) Бустирование: MVA $1.5 \times 10^8$ БОЕ 3 $\times 10^8$ БОЕ	EBOV; SUDV; MARV; TAFV	GMT: Праймирование: 758 (6 мес.) Бустирование: 1750 (6 мес.)	Боль в месте введения	[33, 42]
ChAd3	Группа 1 ( $2.5 \times 10^{10}$ вч) Группа 2 ( $5 \times 10^{10}$ вч)	EBOV; SUDV	GMC: Группа 1: 51 мкг/мл (День 28) Группа 2: 44.9 мкг/мл (День 28)	Усталость	[43]
ChAd3+ MVA	Праймирование: ChAd3 Группа 1 ( $1 \times 10^{10}$ вч) Группа 2 ( $2.5 \times 10^{10}$ вч) Группа 3 ( $5 \times 10^{10}$ вч) Группа 4 ( $1 \times 10^{11}$ вч) Бустирование: MVA $2 \times 10^8$ вч	EBOV; SUDV; MARV; TAFV	GMT: Праймирование Группа 1: 295.0 (День 28) Группа 2: 204.6 (День 28) Группа 3: 555.8 (День 28) Группа 4: 1493.6 (День 28) Бустирование: 9279.6 (День 28)	Боль в месте введения	[39]
rVSV	Места 1&2: Группа 1 ( $3 \times 10^6$ БОЕ) Группа 2 ( $2 \times 10^7$ БОЕ) Место 3: Группа 1 ( $3 \times 10^5$ БОЕ) Группа 2 ( $3 \times 10^6$ БОЕ) Место 4: Группа 1 ( $1 \times 10^7$ БОЕ) Группа 2 ( $5 \times 10^7$ БОЕ)	EBOV	GMT: Место 1: Группа 1: 1392.9 (День 28) Группа 2: 1969.8 (День 28) Место 2: Группа 1: 1492.9 (День 28) Группа 2: (-) (День 28) Место 3: Группа 1: 1055.6 (День 28) Группа 2: 2570.9 (День 28) Место 4: Группа 1: 1064.2 (День 28) Группа 2: 1780.1 (День 28)	Боль в месте введения	[24]

rVSV	Группа 1 ( $3 \times 10^5$ БОЕ)	EBOV	GMT: Группа 1: 344.5 (День 28)	Боль в месте введения	[44]
rVSV	Группа 1 ( $3 \times 10^6$ БОЕ) Группа 2 ( $2 \times 10^7$ БОЕ)	EBOV	GMT: Группа 1: 1300 (День 28) Группа 2: 4079 (День 28)	Боль в месте введения	[25]
rVSV	Группа ( $2 \times 10^7$ БОЕ)	EBOV	-	Боль в месте введения	[26]
DNA	Группа 1 (2.0 мг) Группа 2 (4.0 мг) Группа 3 (8.0 мг)	EBOV; SUDV	-	Местные реакции	[15]
DNA	Праймирование: Группа (4.0 мг) Бустирование: Группа (4.0 мг)	EBOV; SUDV; MARV	GMT: Группа: 31.8 (День 28)	Боль в месте введения	[45]
DNA	Группа (4.0 мг)	EBOV; SUDV; MARV	GMT: Группа: 31.0 (День 28)	Боль в месте введения	[46]
VSV+ Ad5	Группа 1: Праймирование $VSV 1.25 \times 10^7$ БОЕ Бустирование $Ad 1.25 \times 10^{11}$ вч Группа 2: Праймирование $VSV 2.5 \times 10^7$ БОЕ Бустирование $Ad 2.5 \times 10^{11}$ вч	EBOV	Группа 1: 33.51 (День 21) 343.1 (День 28) 2540 (День 42) Группа 2: 55.49 (День 21) 1230 (День 28) 3277 (День 42)	Боль в месте введения	[40]

мер, аденовирусов человека серотипа 26 или аденовирусов шимпанзе серотипа 3 (Ad3).

Вакцина на основе Ad3 прошла фазу 1 клинических исследований и перешла к фазам 2–3. Вакцинные векторы на основе Ad3 несут в своем составе ген GP вируса Эбола 1976 Майинга-Заир или ген GP вируса Эбола Гулу-Судан. По результатам клинических испытаний фазы 1, проведенных в США [32], показано, что вакцина индуцировала формирование высокого уровня GP-специфичных антител (титр 1 : 2037) и Т-клеточного ответа, которые ассоциированы с протективностью на модели ННР. Однако в клинических исследованиях, проведенных в Англии [33], отмечен низкий титр GP-специфичных антител – 1 : 469 (средние значения не достигали уровней, протективных для приматов), Т-клеточный ответ имел максимум на 14 день исследования и снизился к 28 дню.

Одной из проблем разработанных вакцин против БВВЭ является снижение протективного иммунного ответа через несколько месяцев после иммунизации. Эту проблему можно решить при использовании гетерологичных вакцин, которые вводятся в режиме прайм-буст (рисунки). Именно такая стратегия вакцинации против лихорадки Эбола была рекомендована ВОЗ в качестве наиболее перспективной [34]. Также следует обратить внимание, что рекомбинантные вирусные векторы имеют свои недостатки

(наличие предсуществующего иммунитета к вакцинному вектору на основе Ad5 [35], неправильный процессинг целевых антигенов при использовании вакцинного вектора на основе MVA [36], отсутствие данных о продолжительности протективного иммунного ответа для вакцинного вектора на основе VSV [37]), которые можно элиминировать при использовании гетерологичной вакцинации (рисунки).

В серии доклинических исследований на приматах [38] показано, что гомологичная вакцинация вектором на основе Ad3 (Ad3 + Ad3) вызывает кратковременную 100% протективность (5 недель), однако при таком режиме вакцинации к 8 мес. протективность снижалась до 33%. При использовании гетерологичного режима вакцинации (Ad3 + MVA) протективность через 8 мес. после бустирования составила 100%.

Гетерологичная вакцина на основе Ad3 и рекомбинантного модифицированного вируса осповакцины Анкара (MVA) прошла фазу 1 клинических исследований. Вакцинные векторы на основе Ad3 несут ген GP вируса Эбола 1976 Майинга-Заир или вируса Эбола Гулу-Судан, векторы MVA (мультивалентный MVA-BN-filo) – гены GP EBOV, SUDV, MARV, ген NP Тайфорест. Показано, что использование режима гетерологичной вакцинации позволило многократно усилить как гуморальный, так и клеточный иммунный ответ [39]. Более того, использование вакцины на основе комбинации Ad3 и MVA позволило со-

хранить высокие титры GP-специфичных антител (1 : 1750) через 6 мес. после бустирования.

В РФ в соответствии с рекомендациями ВОЗ разработана гетерологичная комбинированная векторная вакцина против БВВЭ, основанная на двух рекомбинантных вирусных векторах, экспрессирующих гликопротеин вируса Эбола, – рекомбинантном вирусе везикулярного стоматита (VSV-GP) и рекомбинантном аденовирусе человека 5 серотипа (Ad-GP) – для введения в режиме прайм-буст [40].

В серии доклинических исследований на приматах показано, что иммунизация этой вакциной позволила добиться 100% уровня протективности как при заражении животных через 3 недели после иммунизации, так и через 5 мес. после иммунизации.

Клинические исследования безопасности и иммуногенности показали, что вакцина обладает высоким уровнем безопасности и иммуногенности при применении у здоровых добровольцев.

В процессе исследования безопасности вакцины не выявлено ни одного серьезного нежелательного явления (НЯ). Все НЯ носили слабый или умеренный характер, появлялись в течение первых 2 дней после вакцинации и проходили в течение последующих 3 дней. Самыми распространенными НЯ были боль в месте введения, головная боль и слабость/усталость, что характерно для большинства вакцин, основанных на рекомбинантных вирусных векторных системах.

Эффективность вакцины оценивали по различным параметрам гуморального и клеточного иммунного ответа. Уровень сероконверсии составил 100%. Уровень ZEBOV-GP-специфичных IgG на 42 день исследования составил в среднем 1 : 3277 в группе, которой вводили полную дозу вакцины. Важно обратить внимание на то, что иммунизация только VSV-GP в той же дозе индуцировала формирование антител в титре 1 : 538 к 42 дню, что значительно ниже титров, полученных при гетерологичной вакцинации. С помощью анализа нейтрализации вируса на 28 день у 93.1% добровольцев в группе, получавшей полную дозу вакцины, обнаружены вируснейтрализующие антитела со средним титром 1 : 20. Клеточный иммунный ответ оценивали по выработке ИФНгамма мононуклеарными клетками периферической крови после стимуляции антигенами – ответ обнаружен у 100% добровольцев на 42 день исследования.

Несмотря на то что опубликованы данные о негативном влиянии предсуществующего иммунитета к аденовирусам, не обнаружено значимой корреляции между уровнем Ad5-нейтрализующих антител и уровнем GP-специфичного гуморального и клеточного ответа при иммунизации здоровых добровольцев вакциной на основе VSV и Ad. Это свидетельствует о том, что использование гетерологичной

вакцинации позволило нивелировать негативное влияние предсуществующего иммунитета к вакцинным векторам на основе аденовируса человека серотипа 5.

По результатам доклинических и клинических исследований, в которых показана высокая эффективность и безопасность вакцины, в 2015 году в РФ была зарегистрирована вакцина против БВВЭ, разработанная и произведенная в ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

БВВЭ представляет серьезную угрозу для глобальной безопасности. Начиная с 1976 года, когда вирус Эбола был впервые обнаружен, зарегистрировано более 20 вспышек, которые в основном ограничивались сельской местностью в Восточной и Центральной Африке. Но в 2014 году вспышка, которая началась в трех странах Западной Африки, изменила ситуацию. Это были первые случаи, когда вирус детектировали в городских центрах, и ему удалось распространиться за пределы Африки на территорию Европы и Северной Америки.

Распространение вируса Эбола во время эпидемии БВВЭ 2014–2016 годов за пределы Африки и высокий уровень смертности стали веской причиной активной разработки эффективных средств профилактики и терапии. К настоящему времени в различных клинических исследованиях, проведенных в Африке, Европе, США и России, показаны хорошие профили безопасности и иммуногенности нескольких вакцинных препаратов против БВВЭ. Восемь вакцинных препаратов находятся сейчас на разных стадиях клинических исследований. Две вакцины, разработанные и производимые в ФГБУ «ФНИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России («ГамЭвак» и «ГамЭвак-Комби»), в настоящее время являются единственными зарегистрированными вакцинами против лихорадки Эбола. Вакцина «ГамЭвак-Комби» – это гетерологичная вакцина, основанная на двух рекомбинантных векторах – VSV и Ad5, вакцина «ГамЭвак» является гомологичной вакциной на основе рекомбинантного вектора Ad5.

В заключение необходимо отметить, что, несмотря на высокую цену, которую пришлось заплатить, человечество извлекло важный урок. Стало очевидным, что своевременная борьба с глобальными угрозами общественному здоровью возможна только при условии консолидации усилий политических лидеров, экспертов ВОЗ и ключевых разработчиков медицинских препаратов. Совместная работа специалистов из разных областей позволила в короткие сроки внедрить в практическую медицину передовые разработки в области создания новых вакцинных препаратов.

Очевидно, что полученный опыт будет использован в дальнейшем для своевременной разработки вакцин против других опасных вирусных инфекций, для которых отсутствуют профилактические

средства (тяжелый острый респираторный синдром и ближневосточный респираторный синдром, вызываемый коронавирусами; болезнь, вызванная вирусом Зика и др.). ●

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fields virology. 5th ed. / Eds Knipe D.M., Howley P.M. Philadelphia: Lippincott Williams & Wilkins, 2006. P. 1409–1448.
- Taylor D., Leach R., Bruenn J. // BMC Evolutionary Biology. 2010. V. 10. P. 193.
- Bennett J.E., Dolin R., Blaser M.J. Mandell, Douglas, and Bennett's Principles and Practice of Infectious Diseases. 8th ed. Philadelphia: Elsevier, 2015. P. 1995–1999.
- Hartman A.L., Towner J.S., Nichol S.T. // Clin. Lab. Med. 2010. V. 30. P. 161–177.
- Kuhn J.H., Becker S., Ebihara H., Geisbert T.W., Johnson K.M., Kawaoka Y., Lipkin W.I., Negredo A.I., Netesov S.V., Nichol S.T., et al. // Arch. Virol. 2010. V. 155. № 12. P. 2083–2103.
- Ebola haemorrhagic fever in Zaire, 1976. Report of an International Commission. // Bull. WHO. 1978. V. 56. № 2. P. 271–293.
- Ebola haemorrhagic fever in Sudan, 1976. Report of an International Commission. // Bull. WHO. 1978. V. 56. № 2. P. 247–270.
- World Health Organization. 2015. Ebola Situation Report–21.
- Борисевич И.В., Краснянский В.П., Лебединская Е.В., Михайлов В.В., Тиманькова Г.Д., Черникова Н.К. Препарат, содержащий иммуноглобулин против лихорадки Эбола из сыворотки крови лошадей, жидкий (иммуноглобулин Эбола). Патент РФ № 2130318 от 20.05.1999 г.
- Lupton H.W., Lambert R.D., Bumgardner D.L., Moe J.B., Eddy G.A. // Lancet. 1980. V. 2. P. 1294–1295.
- Geisbert T.W., Pushko P., Anderson K., Smith J., Davis K.J., Jahrling P.B. // Emerging Infectious Diseases. 2002. V. 8. P. 503–507.
- Volchkov V.E., Becker S., Volchkova V.A., Ternovoj V.A., Kotov A.N., Netesov S.V., Klenk H.D. // Virology. 1995. V. 214. № 2. P. 421–430.
- Dowling W., Thompson E., Badger C., Mellquist J.L., Garrison A.R., Smith J.M., Paragas J., Hogan R.J., Schmaljohn C. // J. Virol. 2007. V. 81. № 4. P. 1821–1837.
- Vanderzanden L., Bray M., Fuller D., Roberts T., Custer D., Spik K., Jahrling P., Huggins J., Schmaljohn A., Schmaljohn C. // Virology. 1998. V. 246. P. 134–144.
- Martin J.E., Sullivan N.J., Enama M.E., Gordon I.J., Roederer M., Koup R.A., Bailer R.T., Chakrabarti B.K., Bailey M.A., Gomez P.L., et al. // Clin. Vaccine Immunol. 2006. V. 13. № 11. P. 1267–1277.
- Sullivan N.J., Geisbert T.W., Geisbert J.B., Xu L., Yang Z.Y., Roederer M., Koup R.A., Jahrling P.B., Nabel G.J. // Nature. 2003. V. 424. № 6949. P. 681–684.
- Jones S.M., Feldmann H., Ströher U., Geisbert J.B., Fernando L., Grolla A., Klenk H.D., Sullivan N.J., Volchkov V.E., Fritz E.A., et al. // Nat. Med. 2005. V. 11. № 7. P. 786–790.
- Sridhar S. // Ther. Adv. Vaccines. 2015. V. 3. № 5–6. P. 125–138.
- Wilson J.A., Hart M.K. // J. Virol. 2001. V. 75. № 6. P. 2660–2664.
- Sullivan N.J., Hensley L., Asiedu C., Geisbert T.W., Stanley D., Johnson J., Honko A., Olinger G., Bailey M., Geisbert J.B., et al. // Nat. Med. 2011. V. 17. № 9. P. 1128–1131.
- Dahlke C., Lunemann S., Kasonta R., Kreuels B., Schmiedel S., Ly M.L., Fehling S.K., Strecker T., Becker S., Altfeld M., et al. // J. Infect. Dis. 2017. V. 215. № 2. P. 287–292.
- Geisbert T.W., Daddario-Dicaprio K.M., Lewis M.G., Geisbert J.B., Grolla A., Leung A., Paragas J., Matthias L., Smith M.A., Jones S.M., et al. // PLoS Pathog. 2008. V. 4. № 11. e1000225.
- Geisbert T.W., Geisbert J.B., Leung A., Daddario-DiCaprio K.M., Hensley L.E., Grolla A., Feldmann H. // J. Virol. 2009. V. 83. № 14. P. 7296–7304.
- Agnandji S.T., Huttner A., Zinser M.E., Njuguna P., Dahlke C., Fernandes J.F., Yerly S., Dayer J.A., Kraehling V., Kasonta R., et al. // N. Eng. J. Med. 2015. PMID: 25830326. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1502924>.
- Regules J.A., Beigel J.H., Paolino K.M., Voell J., Castellano A.R., Munoz P., Moon J.E., Ruck R.C., Bennett J.W., Twomey P.S., et al. // N. Eng. J. Med. 2015. PMID: 25830322. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1414216>.
- Henao-Restrepo A.M., Longini I.M., Egger M., Dean N.E., Edmunds W.J., Camacho A., Carroll M.W., Doumbia M., Draguez B., Duraffour S., et al. // Lancet. 2015. V. 386. P. 857–866.
- Henao-Restrepo A.M., Camacho A., Longini I.M., Watson C.H., Edmunds W.J., Egger M., Carroll M.W., Dean N.E., Diatta I., Doumbia M., et al. // Lancet. 2017. V. 389. № 10068. P. 505–518.
- Zhu F., Hou L., Li J., Wu S., Liu P., Zhang G., Hu Y., Meng F., Xu J., Tang R., et al. // Lancet. 2015. V. 385. № 9984. P. 2272–2279.
- Li J.X., Hou L.H., Meng F.Y., Wu S.P., Hu Y.M., Liang Q., Chu K., Zhang Z., Xu J.J., Tang R., et al. // Lancet Glob Health. 2016. V. 5. № 3. P. e324–e334.
- Ledgerwood J.E., Costner P., Desai N., Holman L., Enama M.E., Yamshchikov G., Mulangu S., Hu Z., Andrews C.A., Sheets R.A., et al. // Vaccine. 2010. V. 29. № 2. P. 304–313.
- Ersching J., Hernandez M.I., Cezarotto F.S., Ferreira J.D., Martins A.B., Switzer W.M., Xiang Z., Ertl H.C., Zanetti C.R., Pinto A.R. // Virology. 2010. V. 407. № 1. P. 1–6.
- Ledgerwood J.E., DeZure A.D., Stanley D.A., Novik L., Enama M.E., Berkowitz N.M., Hu Z., Joshi G., Ploquin A., Sitar S., et al. // N. Eng. J. Med. 2014. PMID: 25426834. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1410863>.
- Rampling T., Ewer K., Bowyer G., Wright D., Imoukhuede E.B., Payne R., Hartnell F., Gibani M., Bliss C., Minhinnick A., et al. // N. Eng. J. Med. 2015. PMID: 25629663. <http://dx.doi.org/10.1056/NEJMoa1411627>.
- Moorthy V., Fast P., Greenwood B. Heterologous Prime-Boost immunisation in Ebola vaccine development, testing and licensure. Report of a WHO Consultation held on 21 November 2014, Geneva, Switzerland.
- Fausther-Bovendo H., Kobinger G. // Hum. Vaccin. Immunother. 2014. V. 10:10. P. 2875–2884.
- VanSlyke J.K., Hraby D.E. // Curr. Top. Microbiol. Immunol. 1990. V. 163. P. 185–206.
- National Academies of Sciences, Engineering, and Medicine. The Ebola Epidemic in West Africa: Proc. Workshop. Washington, DC: Nat. Acad. Press, 2016. P. 56–58.
- Stanley D.A., Honko A.N., Asiedu C., Trefry J.C., Lau-Kilby A.W., Johnson J.C., Hensley L., Ammendola V., Abbate A., Grazioli F., et al. // Nat. Med. 2014. V. 20. № 10. P. 1126–1129.
- Tapia M.D., Sow S.O., Lyke K.E., Haidara F.C., Diallo F.,

- Doumbia M., Traore A., Coulibaly F., Kodio M., Onwuchekwa U., et al. // *Lancet Infect. Diseases*. 2016. V. 16. P. 31–42.
40. Dolzhikova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., Dzharullaeva A.S., Tukhvatulina N.M., Shcheblyakov D.V., Shmarov M.M., Tokarskaya E.A., Simakova Y.V., Egorova D.A., et al. // *Hum.Vaccin. Immunother*. 2017. P. 1–8. doi: 10.1080/21645515.2016.1238535. [Epub ahead of print]
41. Milligan I.D., Gibani M.M., Sewell R., Clutterbuck E.A., Campbell D., Plested E., Nuthall E., Voysey M., Silva-Reyes L., McElrath M.J., et al. // *JAMA*. 2016. V. 315. P. 1610–1623.
42. Ewer K., Rampling T., Venkatraman N., Bowyer G., Wright D., Lambe T., Imoukhuede E.B., Payne R., Fehling S.K., Strecker T., et al. // *N. Eng. J. Med*. 2016. V. 374. P. 1635–1646.
43. De Santis O., Audran R., Pothin E., Warpelin-Decrausaz L., Vallotton L., Wuerzner G., Cochet C., Estoppey D., Steiner-Monard V., Lonchamp S., et al. // *Lancet Infect. Dis*. 2016. V. 16. P. 311–320.
44. Huttner A., Dayer J.A., Yerly S., Combescure C., Auderset F., Desmeules J., Eickmann M., Finckh A., Goncalves A.R., Hooper J.W., et al. // *Lancet Infect. Dis*. 2015. V. 15. P. 1156–1166.
45. Sarwar U.N., Costner P., Enama M.E., Berkowitz N., Hu Z., Hendel C.S., Sitar S., Plummer S., Mulangu S., Bailer R.T., et al. // *J. Infect. Dis*. 2015. V. 211. P. 549–557.
46. Kibuuka H., Berkowitz N.M., Millard M., Enama M.E., Tindikahwa A., Sekiziyivu A.B., Costner P., Sitar S., Glover D., Hu Z., et al. // *Lancet*. 2015. V. 385. P. 1545–1554.

УДК 577.123.8:577.113.4

# Необъемные повреждения ДНК у человека: пути образования, репарации и репликации

А. В. Игнатов<sup>1,2</sup>, К. А. Бондаренко<sup>1</sup>, А. В. Макарова<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Курчатова, 2<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра молекулярной биологии, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

\*E-mail: amakarova-img@yandex.ru

Поступила в редакцию 10.09.2016

Принята к печати 29.05.2017

**РЕФЕРАТ** Повреждения ДНК являются одной из основных причин нарушений репликации, возникновения мутаций и клеточной гибели. Из ДНК повреждения удаляются с помощью нескольких типов репарационных процессов. Важным механизмом преодоления репликативного блока нерепарированных повреждений служит вовлечение в репликацию поврежденной ДНК специализированных ДНК-полимераз, которые эффективно включают нуклеотиды напротив поврежденных оснований, но характеризуются низкой точностью синтеза. В обзоре рассмотрены основные типы «необъемных» повреждений, встречающиеся в геномной ДНК человека, механизмы их образования, пути репарации, а также роль специализированных ДНК-полимераз в репликации поврежденной ДНК.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** повреждения ДНК, репарация, репликация поврежденной ДНК.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АП-сайты – апуриновые/апиримидиновые сайты; АФК – активные формы кислорода; ДНКП – ДНК-полимеразы; ИРН – инцизионная репарация нуклеотидов; ПВ – прямое восстановление; спецДНКП – специализированные ДНК-полимеразы; ЭРН – эксцизионная репарация нуклеотидов; ЭРО – эксцизионная репарация оснований; 5'-дРФ – 5'-2-дезоксирибозо-5-фосфат; ГаруА – 4,6-диамино-5-формамидопиримидин; ГаруГ – 2,6-диамино-4-гидрокси-5-формамидопиримидин; 5,6-DHU – 5,6-дигидроурацил; 5-oh-U – 5-гидроксиурацил; 8-охо-G – 7,8-дигидро-8-оксогуанин; 5-oh-C – 5-гидроксицитозин; N1-me-A – N1-метиладенин; N3-me-A – N3-метиладенин; N5-me-C – 5-метилцитозин; N7-me-G – N7-метилгуанин; O<sup>6</sup>-me-G – O<sup>6</sup>-метилгуанин; SAM – S-аденозилметионин; N<sup>2</sup>-et-G – N<sup>2</sup>-этилгуанин; TG – тимидин гликоль; εA – N<sup>6</sup>-этенoadенин; 1,2-εG – 1,N<sup>2</sup>-этенoгуанин; 2,3-εG – N<sup>2</sup>,3-этенoгуанин; εC – 3,N<sup>4</sup>-этенoцитозин.

## ВВЕДЕНИЕ

В ДНК живых организмов ежедневно появляется множество повреждений, которые образуются спонтанно и в результате воздействия разнообразных химических и физических факторов: свободных радикалов, ультрафиолетового и ионизирующего излучения, клеточных метаболитов и химических канцерогенов. Кроме того, повреждения могут образовываться в ходе физиологических клеточных реакций (интермедиаты при репарации ДНК, гипермутации генов иммуноглобулинов и др.).

В результате воздействия химических канцерогенов (таких, как акролеин, цисплатин, бензо[α]пирен, ароматические амины и нитрозамины) и ультрафиолетового излучения в ДНК образуются преимущественно объемные аддукты, внутринитевые и межнитевые сшивки, которые существенно нарушают

геометрию сахарофосфатного остова ДНК [1]. Эти повреждения удаляются из геномной ДНК главным образом путем эксцизионной репарации нуклеотидов (ЭРН, Nucleotide Excision Repair, NER) [2, 3]. Нерепарированные объемные повреждения в значительной степени ингибируют работу высокоточных ДНК-полимераз (ДНКП), которые специализируются на копировании геномной ДНК и руководствуются строгим геометрическим соответствием при включении нуклеотидов [4–6]. Накопление подобных повреждений в делящихся клетках ведет к остановке репликации, абберациям хромосом и гибели клеток.

Спонтанные повреждения и повреждения, образованные в ходе обменных клеточных процессов или в результате атаки свободных радикалов, представляют собой, главным образом, «необъемные» повреждения. К основным группам «необъемных»

повреждений ДНК относятся: апуриновые-апири-мидиновые сайты (АП-сайты), окисленные и некоторые алкилированные производные нуклеотидов, а также повреждения, вызванные дезаминированием азотистых оснований. Главным механизмом удаления таких повреждений является эксцизионная репарация оснований (ЭРО, Base Excision Repair, BER). Подробно механизмы ЭРО рассмотрены в нескольких последних обзорах [7–9]. «Необъемные» повреждения в меньшей степени влияют на структуру ДНК, но они тоже нарушают работу ферментов синтеза ДНК, вызывая ошибки копирования генетической информации и блоки репликации.

В настоящем обзоре мы систематизируем основные пути образования, репарации и репликации «необъемных» повреждений ДНК и рассматриваем роль специализированных ДНКП человека (спецДНКП), обеспечивающих эффективный, но часто высокоошибочный синтез поврежденной ДНК.

## ПУТИ ОБРАЗОВАНИЯ И ТИПЫ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК

### Апуриновые и апири-мидиновые сайты

Важнейшую роль в механизмах мутагенеза, вызванных повреждениями геномной ДНК, играют апуриновые и апири-мидиновые сайты (АП-сайты), которые являются самыми частыми повреждениями ДНК. За день в клетке млекопитающих в среднем появляется 9000–14000 АП-сайтов [10, 11]. Большинство АП-сайтов образуется в результате спонтанного гидролиза N-гликозидной связи дезоксирибонуклеотидов, который идет с достаточно высокой скоростью при физиологических условиях [12]. При этом скорость отщепления пуриновых азотистых оснований (апуринизация) превышает темпы гидролиза пиримидиновых более чем в 10 раз [11]. Разрыв гликозидной связи происходит и в процессе ЭРО в результате работы ДНК-гликозилаз [13]. Наконец, образование АП-сайтов является важным этапом гипермутагенеза генов иммуноглобулинов у млекопитающих [14, 15].

АП-сайты обладают одновременно высокими мутагенными и цитотоксическими свойствами. Из-за невозможности образования канонических водородных связей с АП-сайтами многие ДНКП останавливаются или включают dAMP напротив повреждения (таблица) [16–19]. Включение dAMP напротив АП-сайта энергетически наиболее выгодно [20]. В отстающей цепи АП-сайты подавляют активность ДНКП Pol  $\delta$  по замещению цепи (strand displacement synthesis) в репликативном синтезе, нарушая созревание фрагментов Оказаки [21]. Нерепарированные АП-сайты приводят к остановке транскрипции, являясь причиной высокой частоты мутагенеза

у *Saccharomyces cerevisiae* [22]. У человека АП-сайты в ДНК преимущественно распознаются и расщепляются ферментом АП-эндонуклеазой АРЕ1 с образованием одноцепочечных разрывов [23, 24]. Важно отметить, что недавно выявили роль многих других белков в альтернативных путях АРЕ1-независимой репарации АП-сайтов: субъединиц белка Ku, входящего в состав ДНК-зависимой протеинкиназы (DNA-PK) [25–27], тирозил-ДНК-фосфодиэстеразы I (TDP1) [28, 29] и поли(ADP-рибозо)полимеразы PARP1 [30]. Альтернативные пути удаления АП-сайтов могут служить резервными механизмами репарации повреждения. Подробно функции белков Ku и TDP1 в репарации АП-сайтов рассмотрены в обзорах [31, 32].

### Окисленные производные азотистых оснований

В результате воздействия активных форм кислорода (АФК), которые образуются под влиянием ионизирующего излучения или в результате физиологических обменных процессов, в клетках происходит окисление азотистых оснований. Митохондриальная ДНК подвергается атаке АФК в гораздо большей степени, чем ядерная [33]. Разные АФК отличаются реакционной способностью. Супероксидный радикал ( $O_2^{\cdot -}$ ) и пероксид водорода ( $H_2O_2$ ) обладают слабой реакционной способностью, тогда как гидроксильный радикал ( $OH^{\cdot}$ ) очень активен и повреждает все четыре основания ДНК; синглетный кислород ( $^1O_2$ ) атакует преимущественно остатки гуанина [34–36]. Под влиянием окислительного стресса образуется не менее ста разных типов повреждений [34]. К наиболее распространенным и биологически значимым окисленным производным азотистых оснований относятся: 7,8-дигидро-8-оксогуанин (8-охо-G), тимидингликоль (TG), 5-гидроксицитозин (5-oh-C), 2,6-диамино-4-гидрокси-5-формаидопиримидин (ФаруG) и 4,6-диамино-5-формаидопиримидин (ФаруА) (рис. 1). К появлению формаидопиримидиновых повреждений приводит раскрытие имидазольного кольца в результате атаки АФК [35, 37–39].

8-охо-G и TG относятся к одним из самых частых повреждений ДНК, вызываемых АФК. За сутки в клетке человека образуется в среднем 1000–2000 8-охо-G и до 2000 TG [35]. 8-охо-G относится к высокому мутагенным повреждениям. Большинство ДНКП напротив 8-охо-G включают dAMP за счет образования хугстиновских водородных связей, что приводит к образованию трансверсий GC–TA (таблица) [40–42]. TG является не мутагенным, но высокотоксичным повреждением, блокирующим работу ферментов репликации (таблица) [43, 44]. Механизмы снижения мутагенного потенциала окисленных производных нуклеотидов в клетке сложны и включают

альтернативные варианты удаления и коррекции поврежденных нуклеотидов.

### Повреждения, вызванные дезаминированием азотистых оснований

Потеря аминогруппы азотистыми основаниями происходит в клетке спонтанно [45, 46] и при окислительном дезаминировании под действием активных форм азота (например, образующихся при воспалении) [47–49], а также ферментативным путем. Дезаминирование остатков цитозина цитидиндезаминазами и последующее удаление урацила с образованием АП-сайтов играют ключевую роль в мутагенезе при созревании вариабельных областей генов иммуноглобулинов в В-лимфоцитах млекопитающих [14, 15].

Одноцепочечная ДНК (например, реплицируемая или активно транскрибируемая) подвергается дезаминированию значительно чаще (более чем в 100 раз) по сравнению с двухцепочечной ДНК [50, 51]. Пиримидиновые основания более подвержены спонтанному дезаминированию, чем пуриновые [51, 52], однако пуриновые основания чаще подвергаются окислительному дезаминированию [53]. Наиболее часто в клетке происходит дезаминирование цитозина с образованием урацила (рис. 1). В среднем в клетке млекопитающих в день происходит дезаминирование 100–500 остатков цитозина с образованием урацила [45, 51, 54]. При дезаминировании цитозина и одновременном воздействии свободных радикалов или ионизирующей радиации могут образовываться производные урацила – 5-гидроксиурацил (5-oh-U) и 5,6-дигидроурацил (5,6-DHU) (рис. 1) [55, 56].

В геномной ДНК встречаются также продукты дезаминирования аденина (гипоксантин) и гуанина (ксантин и оксанин) (рис. 1). Частота появления гипоксантина и ксантина составляет 1–7 на каждые  $10^6$  нуклеотидов [57–59]. Дезаминированные азотистые основания в составе ДНК не приводят к остановке работы эукариотических ДНКП, но обладают высоким мутагенным потенциалом, генерируя точковые мутации. ДНКП эукариот включают напротив урацила dAMP, что приводит к транзициям GC–AT при последующих раундах репликации (таблица) [60]. Напротив гипоксантина ДНКП преимущественно включают dCMP, что приводит к транзиции AT–GC [61–63]. Ксантин и оксанин могут образовывать связи с тиминем, вызывая транзиции GC–AT при репликации [64].

Большой вклад в мутагенез ДНК вносит и дезаминирование 5-метилцитозина (5-me-C), в результате которого образуется тимин, что вызывает прямые транзиции GC–AT [45]. Несмотря на то, что только 3% цитозинов геномной ДНК человека метилирова-

ны, «CpG-островки», которые выполняют функцию подавления экспрессии генов, в 70–80% случаев содержат 5-me-C и являются горячими точками мутагенеза в делящихся клетках млекопитающих [65, 66].

Повреждения, вызванные дезаминированием азотистых оснований, преимущественно репарируются по пути ЭРО.

### Алкилированные производные азотистых оснований

В индукции образования «необъемных» алкилированных азотистых оснований большую роль играют экзогенные химические алкилирующие агенты, которые представляют собой электрофильные соединения со сродством к нуклеофильным центрам органических молекул и включают широкий спектр веществ. Например, экзогенные алкилирующие агенты присутствуют в пищевых продуктах в виде нитрозаминов (N-нитрозодиметиламин и N-нитрозодиэтиламин, которые образуются при взаимодействии аминов и нитритов во время копчения и интенсивной термической обработки) [67, 68] и в окружающей среде в виде галогеналканов (винилхлорид, используемый в качестве сырья в производстве пластмасс, сельскохозяйственный фумигант бромметан, хладагент хлорметан) [69–71]. Некоторые алкилирующие соединения широко используются в химиотерапии (циклофосфамид, мелфалан, бусульфан, темозоломид) [72, 73]. По механизму нуклеофильного замещения алкилирующие агенты можно разделить на соединения  $S_N1$ -типа (мономолекулярное замещение с образованием интермедиата: азотистый иприт, N-нитрозо-N-метилмочевина) и  $S_N2$ -типа (одностадийное бимолекулярное замещение: метилметансульфонат, диметилсульфат, бусульфан) [74, 75].

Во всех четырех азотистых основаниях обнаружено множество потенциальных сайтов для реакций алкилирования (N1, N3, N<sup>6</sup>, N7 в аденине, N1, N<sup>2</sup>, N3, N7, O<sup>6</sup> в гуанине, N3, N<sup>4</sup>, O<sup>2</sup> в цитозине, N3, O<sup>2</sup> и O<sup>4</sup> в тимине), но все они имеют разную реакционную способность. Распространенными и биологически значимыми являются такие алкилированные производные азотистых оснований, как: N3-метиладенин (N3-me-A), O<sup>6</sup>-метилгуанин (O<sup>6</sup>-me-G), 1-метиладенин (N1-me-A), N7-метилгуанин (N7-me-G), N<sup>2</sup>-этилгуанин (N<sup>2</sup>-et-G) (рис. 1) [74–77]. Наиболее распространены такие продукты N-метилирования, как N7-me-G и N3-me-A. N7-me-G может составлять до 70–80% метилированных повреждений в ДНК.

Алкилирование азотистых оснований происходит также под влиянием эндогенных генотоксических агентов. S-аденозилметгенион (SAM) является слабым алкилирующим агентом и выступает в ка-

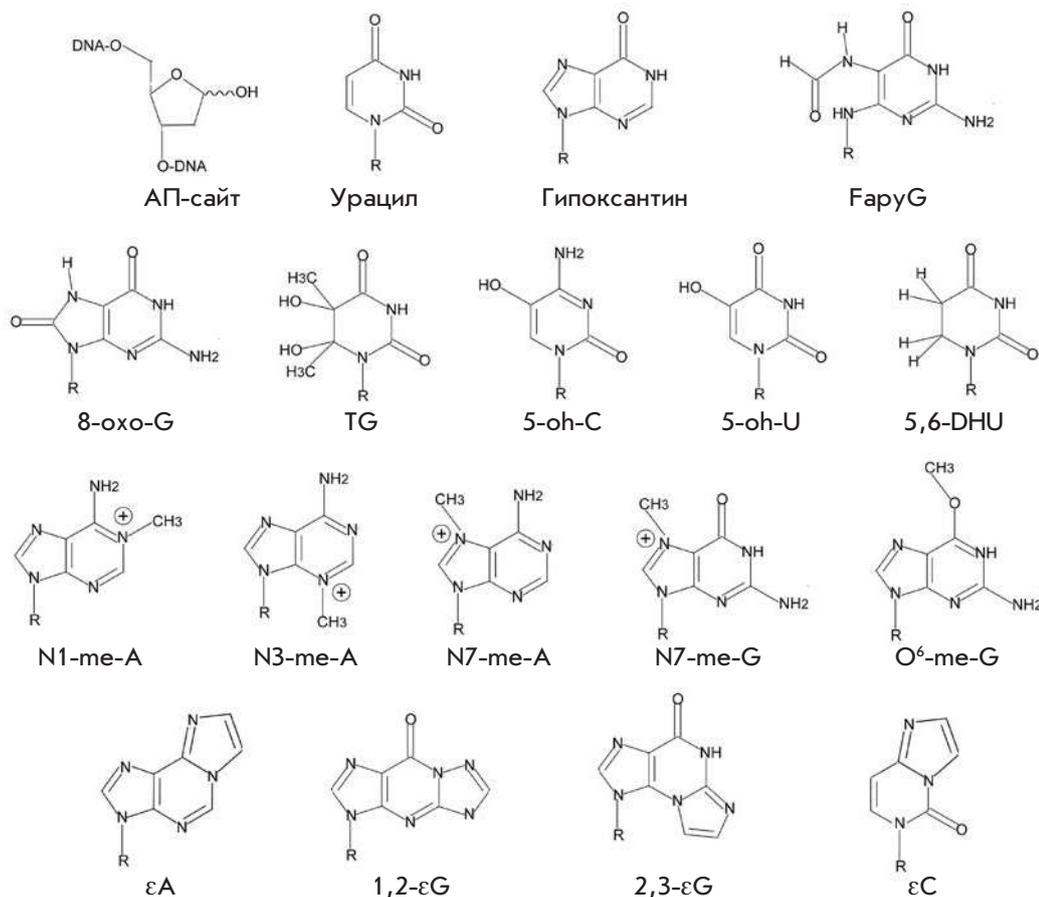
честве донора метильной группы в реакциях трансметилирования в клетках. За сутки под влиянием SAM в клетке млекопитающих образуется, предположительно, около 4000 7-me-G, 600 3-me-A и 10–30 остатков O<sup>6</sup>-me-G [78, 79].

Накопление N3-me-A является цитотоксичным, поскольку N3-me-A блокирует работу ДНКП, нарушая контакты между активным центром ДНКП и атомом N3 аденина в малой бороздке ДНК (таблица) [80–82]. Изучение влияния N7-me-G на работу ДНКП затруднено из-за высокой нестабильности поврежденного основания. Метилированные остатки гуанина не ингибируют работу ДНКП I *Escherichia coli* (Pol I) [83]. Однако с использованием химически стабильного аналога N7-me-G недавно показали, что Pol β человека включает нуклеотиды напротив повреждения с низкой эффективностью и точностью (таблица) [84]. N7-me-G подвергается спонтанной депуринизации с образованием цитотоксичных АП-сайтов [75]. Кроме того, N7-me-G с открытым имидазольным кольцом (me-Fару-G) ингибирует репликацию [85, 86]. O<sup>6</sup>-me-G образуется преимущественно в результате воздействия на ДНК химических агентов S<sub>N</sub>1-типа [78]. Это повреждение обладает мутагенными и канцерогенными свойствами, образуя связи с тиминном и вы-

зывая транзиции GC–AT при репликации [87–89]. O<sup>6</sup>-me-G может также блокировать работу некоторых ДНКП (таблица) [90, 91]. Важную роль в репарации «необъемных» алкилированных производных азотистых оснований играет не только ЭРО, но и прямое восстановление структуры оснований с помощью алкилтрансфераз и диоксигеназ [92].

К относительно «необъемным» повреждениям, репарация которых также обеспечивается ферментами, участвующими в репарации алкилированных азотистых оснований, можно отнести и экзоциклические повреждения азотистых оснований с этеновым кольцом: 1,N<sup>6</sup>-этенаденин (εА), 1,N<sup>2</sup>-этенугуанин (1,2-εG), N<sup>2</sup>,3-этенугуанин (2,3-εG) и 3,N<sup>4</sup>-этенцитозин (εС) (рис. 1). Их появление вызывают альдегиды, образующиеся при перекисном окислении липидов под действием свободных радикалов кислорода и азота [93, 94], а также некоторые промышленные генотоксические соединения (например, винилхлорид и уретан) [95]. Экзоциклические повреждения ДНК обладают высокими мутагенными и генотоксическими свойствами *in vitro* и *in vivo* [96–99]. 1,N<sup>6</sup>-этенo-группа нарушает уотсон-криковские взаимодействия и блокирует работу большинства ДНКП, включая некоторые спецДНКП (таблица) [17, 100, 101].

Рис. 1. Распространенные «необъемные» повреждения ДНК



## РЕПАРАЦИЯ НЕОБЪЕМНЫХ ПОВРЕЖДЕНИЙ ДНК

### Экцизионная репарация оснований (ЭРО)

Основным механизмом удаления необъемных повреждений ДНК является ЭРО (рис. 2 и 3). Существует два основных пути ЭРО: «короткозаплаточный» (short-path) и «длиннозаплаточный» (long-path). В ходе «короткозаплаточного» пути происходит замещение только одного поврежденного нуклеотида, тогда как при «длиннозаплаточном» удаляются 2–8 нуклеотидов [102].

Классический путь ЭРО состоит из следующих основных этапов: 1) удаление поврежденного азотистого основания: узнавание повреждения и расщепление N-гликозидной связи с помощью специфической монофункциональной ДНК-гликозилазы с образованием АП-сайта; 2) гидролиз фосфодиэфирной связи у 5'-конца АП-сайта с образованием 3'-ОН и 5'-2-дезоксирибозо-5-фосфата (5'-дРФ) с помощью АП-эндонуклеазы; 3) удаление 5'-дРФ и заполнение бреши с помощью спецДНКП; 4) лигирование с помощью ДНК-лигазы (рис. 3) [7–9, 102].

ЭРО инициируется ДНК-гликозилазой. ДНК-гликозилазы, обладающие только гликозилазной активностью, называются монофункциональными (например, урацил-ДНК-гликозилаза UNG, N-метилпури-ДНК-гликозилаза MPG, NEIL3) [103–105]. В этом случае АП-сайт расщепляет АП-эндонуклеаза APE1 [23, 106]. Однако ряд ДНК-гликозилаз обладают одновременно ДНК-гликозилазной и АП-лиазной активностями: OGG1 (слабая АП-лиазная активность), NEIL1, NEIL2 и NTH1. Такие ДНК-гликозилазы называются бифункциональными, они не только удаляют поврежденное основание, но и гидролизуют цепи ДНК с 3'-конца АП-сайта с образованием 3'- $\alpha,\beta$ -ненасыщенной альдегидной группы (3'- $\alpha,\beta$ -4-гидроксипентен-2-аль) (NTH1 и OGG1) или 3'-фосфата (NEIL1 и NEIL2) [103–105]. В удалении 3'-альдегидной группы и 3'-P участвуют APE1 (3'-фосфодиэстеразная активность) и полинуклеотидкиназа/фосфатаза PNKP (3'-фосфатазная активность) соответственно [107–109].

В большинстве случаев повреждения удаляются в ходе «короткозаплаточного» пути ЭРО. Важную роль в регуляции работы ферментов при этом играет белок XRCC1 (белок, входящий в группу комплементации, которая обуславливает чувствительность клеток к рентгеновскому излучению), выполняющий структурную и координирующую функции [110, 111]. Однако в ряде случаев ЭРО идет по «длиннозаплаточному» пути, в котором функцию координации работы ферментов играют белок скользящего зажима PCNA (ядерный антиген пролиферирующих клеток)

и белок-«погрузчик» RFC (фактор репликации C) [112]. Механизмы выбора пути ЭРО до конца не ясны. Предположительно, «длиннозаплаточный» путь может быть выбран в S-фазе в активно делящихся клетках [113] или когда удаление 5'-дРФ затруднено (например, в случае аналогов АП-сайта).

Основной ДНКП, которая осуществляет репаративный синтез ДНК при ЭРО у млекопитающих, является Pol  $\beta$  X-семейства. Pol  $\beta$  обладает одновременно 5'-дРФ-лиазной активностью и способна не только эффективно застраивать брешь, но и удалять 5'-дРФ, образованный после расщепления АП-сайта APE1 [114]. Три другие ДНКП, Pol  $\lambda$  X-семейства, Pol  $\iota$  Y-семейства и Pol  $\theta$  A-семейства, также обладают 5'-дРФ-лиазной активностью и, предположительно, могут участвовать в ЭРО некоторых повреждений ДНК или при снижении активности Pol  $\beta$  [115–118]. В «длиннозаплаточном» пути ЭРО могут принимать участие также высокоточные репликативные Pol  $\delta$  и Pol  $\epsilon$  [119]. Pol  $\beta$ , Pol  $\delta$  или Pol  $\epsilon$  ведут синтез с замещением цепи ДНК (strand displacement synthesis), содержащей повреждение. В результате образуется флэп-структура из трех цепей ДНК, одна из которых имеет «свисающий» одноцепочечный 5'-участок, который отщепляет «флэп»-эндонуклеаза FEN1 [120]. Сшивание цепей ДНК при «короткозаплаточном» пути осуществляет ДНК-лигаза III (LIG3 $\alpha$ ), [121], а при «длиннозаплаточном» – ДНК-лигаза I (LIG1) [122].

Существует более 10 разных ДНК-гликозилаз человека, которые специализируются на узнавании разных типов повреждений ДНК [103, 104]. Во многих случаях одно повреждение могут распознавать несколько ДНК-гликозилаз.

Удаление остатков урацила происходит преимущественно в результате ЭРО с помощью монофункциональных урацил-ДНК-гликозилаз с образованием АП-сайтов. У млекопитающих обнаружено пять урацил-ДНК-гликозилаз, что подчеркивает особую роль дезаминирования цитозина в мутагенезе и цитотоксичности. У человека известны два варианта урацил-ДНК-гликозилазы, кодируемых геном UNG: UNG1 и UNG2. Изоформы образуются в результате альтернативного сплайсинга и считывания транскриптов с альтернативных промоторов. В репарации повреждений U:A ядерной ДНК участвует UNG2, тогда как UNG1 осуществляет репарацию остатков урацила в митохондриальной ДНК [123–125].

SMUG1 (одноцепочечная селективная монофункциональная урацил-ДНК-гликозилаза), предположительно, является резервной урацил-ДНК-гликозилазой, участвующей также в удалении 5-гидроксиметилурацила и окисленных пиримидинов [126, 127]. UNG1 и UNG2 удаляют остатки урацила из одноцепочечной и двухцепочечной ДНК, тогда

как SMUG1 обладает высокой активностью на одноцепочечной ДНК [128]. «Мисматч»-специфичные тимин-ДНК-гликозилаза (TDG) и метил-СрG-связывающий белок 4 (MBD4) участвуют в репарации U и T, спаренных с G, в том числе при репарации дезаминированных N5-me-C СрG-островков, участвуя в деметилировании ДНК и эпигенетической регуляции работы генов [129–132].

Репарацию окисленных производных азотистых оснований осуществляют преимущественно бифункциональные ДНК-гликозилазы. Основной ДНК-гликозилазой, обеспечивающей репарацию 8-охо-G в ходе ЭРО, является OGG1 [133, 134]. Существует несколько изоформ OGG1, образующихся в результате альтернативного сплайсинга. Изоформа 1a обнаруживается преимущественно в ядре, тогда как изоформа 2a – в митохондриях [135, 136]. Другая ДНК-гликозилаза, NEIL1, также участвует в репарации 8-охо-G, хотя и обладает менее выраженной активностью [137, 138].

В репарации различных окисленных производных пиримидиновых нуклеотидов участвуют ДНК-гликозилазы NTH1 и NEIL1 [138–143]. NEIL2 участвует в репарации окисленных продуктов цитозина (5,6-DHU, 5-oh-U, 5-oh-C) [144]. NEIL3 может распознавать и удалять разные окисленные производные азотистых оснований, включая TG и Фарупуриновые повреждения, но функции фермента еще мало изучены [145, 146]. OGG1 и NTH1 удаляют повреждения в двухцепочечной ДНК, тогда как NEIL1, NEIL2 и NEIL3 эффективно работают на одноцепочечных ДНК-матрицах, предположительно, участвуя в репарации окисленных азотистых оснований в ходе репликации и транскрипции [147–150].

В репарации алкилированных пуриновых азотистых оснований в ходе ЭРО участвует N-метилпурин-ДНК-гликозилаза MPG (также известная как N-алкиладенин-ДНК-гликозилаза и 3-метиладенин-ДНК-гликозилаза AAG, MAG). MPG обладает очень широкой субстратной специфичностью, участвуя в распознавании и удалении N3-me-A, N7-me-G, N1-me-T, εA, 1,2-εG [151–155]. Кроме алкилированных азотистых оснований, MPG участвует в репарации повреждений, вызванных дезаминированием пуриновых азотистых оснований (гипоксантина, ксантина, оксанина) [152, 153, 156, 157]. Особенности структуры активных центров ДНК-гликозилаз, влияющие на распознавание разных типов повреждений, рассмотрены в обзоре [104].

### **ЭРО в коррекции нуклеотидов, спаренных с поврежденными основаниями ДНК**

Интересны механизмы предотвращения возникновения мутаций и коррекции повреждений с помощью

«мисматч»-специфичных ДНК-гликозилаз, участвующих в удалении неповрежденных азотистых оснований, спаренных с поврежденными нуклеотидами. Например, MUTYH аденингликозилаза узнает аденин в паре с 8-охо-G [158, 159]. Удаление dAMP и его замена на комплементарный dCMP предотвращает трансверсии при последующих раундах репликации. Процесс коррекции пары A:8-охо-G реконструирован *in vitro* с помощью MUTYH, APE1, Pol λ и ДНК-лигазы I в присутствии PCNA, RPA и FEN1 [159]. В сходном механизме удаления тимина, некомплементарно спаренного с цитозиновыми и гуаниновыми основаниями, содержащими экзоциклические повреждения с этеновым кольцом, участвует ДНК-гликозилаза TDG [160].

### **Инцизионная репарация нуклеотидов (ИРН)**

Альтернативным путем удаления повреждений с участием АП-эндонуклеаз является инцизионная репарация нуклеотидов (ИРН, Nucleotide Incision Repair, NIR) (рис. 2) [161, 162]. В этом процессе удаление поврежденного нуклеотида происходит без участия ДНК-гликозилаз и без образования потенциально мутагенных промежуточных продуктов – АП-сайтов. APE1 разрезает ДНК с 5'-конца поврежденного нуклеотида, оставляя неповрежденный 3'-конец свободным для ДНКП. Оставшийся поврежденный нуклеотид может затем удаляться «флэп»-эндонуклеазой FEN1. *In vitro* Pol β и LIG1 застраивают брешь и зашивают цепь ДНК [163]. Первоначально, роль ИРН была продемонстрирована для окисленных нуклеотидов ДНК. APE1 может распознавать и участвовать в удалении TG, 5,6-дигидропиримидинов и 5-гидроксипиримидинов [161, 164]. Недавно было показано, что ИРН может быть альтернативным путем репарации и других «необъемных» повреждений: урацила [165], εA и εC [164].

### **Прямое восстановление структуры ДНК (ПВ)**

В удалении ряда «необъемных» повреждений также участвуют ферменты, способные непосредственно восстанавливать структуру азотистых оснований (рис. 2). К таким ферментам относятся диоксигеназы (окислительные деметилазы) семейства AlkB и алкилтрансферазы, участвующие в репарации алкилированных азотистых оснований ДНК [166]. Диоксигеназы осуществляют окислительное деметилирование поврежденных азотистых оснований, используя катализируемый Fe(II) механизм окисления алкильных групп молекулярным кислородом [167]. У человека обнаружено восемь гомологов AlkB *E. coli* (ALKBH1–8). Диоксигеназы ALKBH2 и ALKBH3 играют ключевую роль в деметилировании N1-me-A, N3-me-C, εA, алкилированных оснований тимина [168–170].

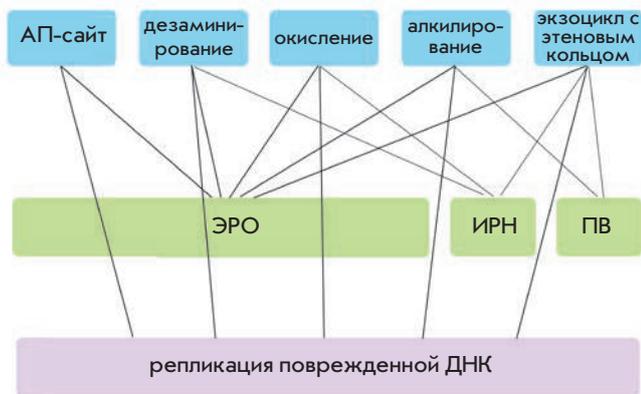


Рис. 2. Основные пути репарации «необъемных» повреждений ДНК у человека

O<sup>6</sup>-алкилгуанин-ДНК-трансфераза человека (AGT или MGMT) участвует в репарации O<sup>6</sup>-me-G и O<sup>4</sup>-me-T, а также распознает и удаляет целый ряд относительно объемных алкильных групп O<sup>6</sup>-модифицированных азотистых оснований [171–173]. AGT необратимо связывает метильные группы, используя тиольную группу цистеина в качестве акцептора (S<sub>N</sub>2-механизм реакции) [174, 175].

**РЕПЛИКАЦИЯ ПОВРЕЖДЕННЫХ УЧАСТКОВ ДНК СПЕЦИАЛИЗИРОВАННЫМИ ДНК-ПОЛИМЕРАЗАМИ**

Далеко не все повреждения могут быть быстро удалены из генома ферментами репарации. Большое количество нерепарированных повреждений нарушают работу высокоточных репликативных ДНКП Pol α, Pol δ и Pol ε (таблица), блокируют репликацию, что приводит к остановке клеточного цикла, хромосомной нестабильности или гибели клеток. Важнейшим механизмом преодоления репликатив-

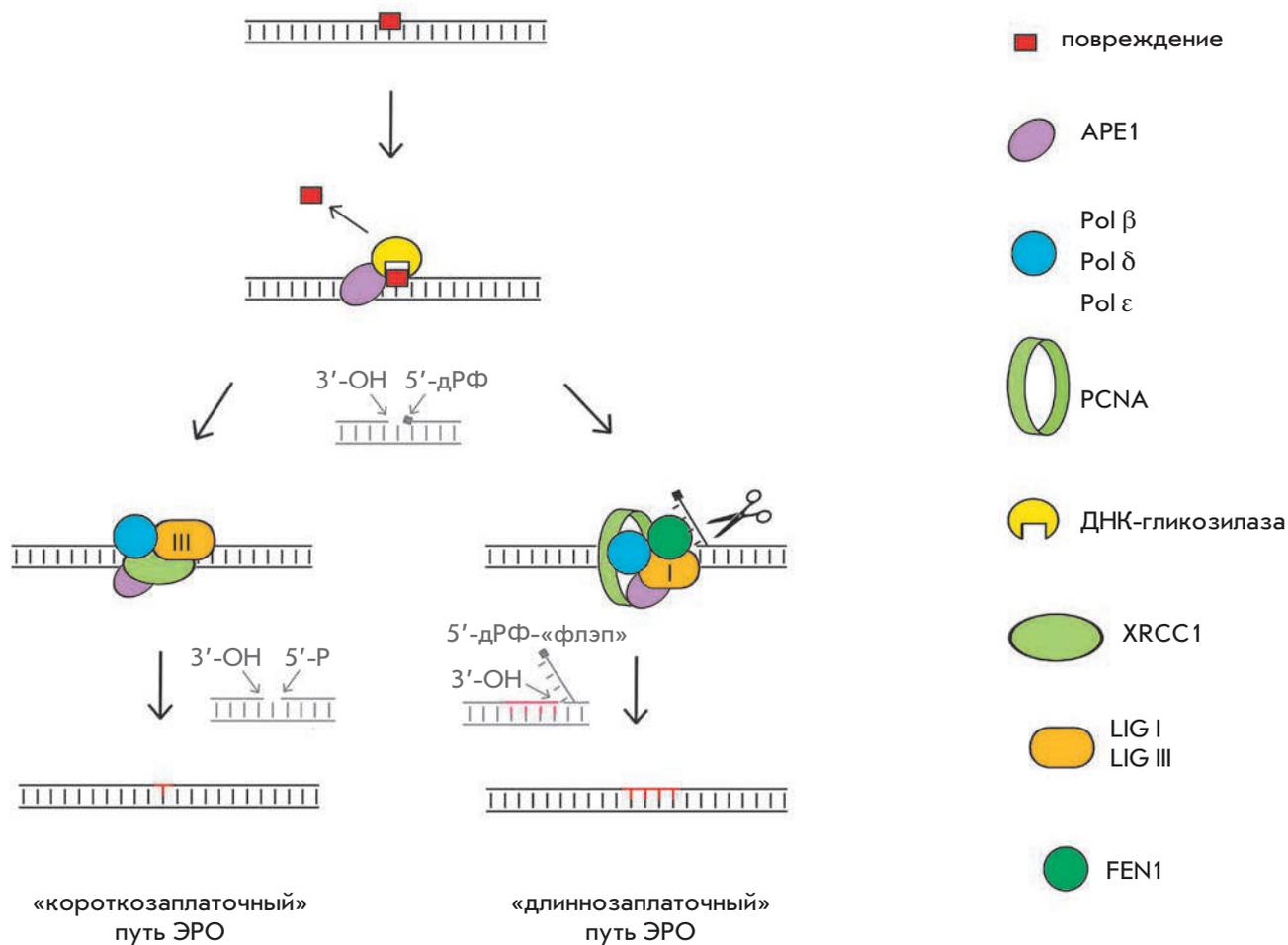


Рис. 3. «Короткозаплаточный» и «длиннозаплаточный» пути ЭРО у человека

ного блока служит вовлечение в репликацию поврежденной ДНК спецДНКП, которые относятся к разным семействам и специализируются на репликации разных повреждений (*рис. 2 и 4, таблица*). В клетках человека ключевую роль в репликации через «необъемные» повреждения ДНК играют Pol  $\iota$ , Pol  $\eta$ , Pol  $\kappa$ , Rev1 Y-семейства и Pol  $\zeta$  В-семейства [176–179]. Для эффективной работы спецДНКП объединяются в мультисубъединичные комплексы (мутасомы, или транслесомы), состоящие из ДНКП и белков, выполняющих структурные и регуляторные функции и участвующих в координации работы комплекса (*рис. 4*). СпецДНКП обладают активным центром, нетребовательным к структуре матрицы, и эффективно включают нуклеотиды напротив повреждений. В то же время вследствие «толерантности» активного центра, использования неканонических водородных связей при включении нуклеотидов и отсутствия 3'-5'-корректирующей активности эти ферменты характеризуются низкой точностью синтеза ДНК и сами служат источником мутаций в организме [180].

### Роль Pol $\iota$ , Pol $\eta$ и Pol $\kappa$ в репликации поврежденной ДНК

ДНКП Y-семейства Pol  $\iota$ , Pol  $\eta$  и Pol  $\kappa$  – это односубъединичные ферменты, обладающие очень низкой точностью синтеза ( $10^{-1}$ – $10^{-4}$ ) и низкой процессивностью [181–186]. Pol  $\eta$  и Pol  $\iota$  являются ДНКП-«инserterами» (ДНКП-«инserter» – ДНКП, которая ограничивается включением только одного или нескольких нуклеотидов напротив поврежденного участка). Основная функция Pol  $\eta$  в клетке состоит в эффективной и точной репликации через фотопродукты (тимин-тиминовые циклобутановые димеры) и защите клеток от ультрафиолетового излучения [187, 188]. Тем не менее, Pol  $\eta$  эффективно включает нуклеотиды напротив некоторых других «необъемных» повреждений (*таблица*) [82, 89, 187, 189–196]. Например, Pol  $\eta$  с высокой эффективностью осуществляет синтез напротив АП-сайтов, включая dAMP и dTMP [189, 196], а также окисленных азотистых оснований, преимущественно включая корректные нуклеотиды напротив 8-охо-G и TG, [192, 193, 195], играя важную роль в защите клеток от наиболее распространенных цитотоксичных и мутагенных повреждений.

Pol  $\iota$  эффективно включает нуклеотиды с разной точностью напротив целого ряда «необъемных» повреждений ДНК: АП-сайтов [189, 196–199], урацила и его производных [200], 8-охо-G [201], N3-me-A [190, 202], O<sup>6</sup>-me-G [203], 1,2-εG [204], εA [205, 206] (*таблица*). Во многих случаях важную роль в эффективном синтезе через повреждения играет способность Pol  $\iota$

к образованию неканонических водородных связей при спаривании нуклеотидов. Например, Pol  $\iota$  использует хугстиновские взаимодействия при включении нуклеотидов напротив εA, этеновое кольцо которого делает невозможным образование уотсон-криковских водородных связей [206]. Использование хугстиновских взаимодействий Pol  $\iota$  показано и при включении dNMP напротив O<sup>6</sup>-me-G, метильная группа которого экспонирована в большую бороздку ДНК [203].

Необычной особенностью Pol  $\iota$  является преимущественное включение dGMP напротив тимина, урацила и производных урацила в матричной ДНК [184, 185, 200, 207]. Это свойство может играть важную роль в снижении мутагенного потенциала дезаминированных остатков цитозина и 5-me-C [200]. Включение dGMP напротив T матричной ДНК стабилизируется уникальной водородной связью, которая образуется непосредственно между N<sup>2</sup>-атомом dGTP и Gln59 в активном центре Pol  $\iota$  [208]. С достаточной высокой эффективностью Pol  $\iota$  включает нуклеотиды напротив АП-сайтов, являясь также одной из немногих ДНКП, которая включает напротив этого повреждения преимущественно не dAMP, а dGMP или dTMP [189, 196, 198, 199].

Основной функцией Pol  $\kappa$  в клетке считается синтез через гуаниновые дезоксирибонуклеотиды, содержащие химические группы в положении N<sup>2</sup>, образующиеся под действием канцерогенов. К ним относятся как крупные повреждения [209–211], так и относительно «необъемные»: 1,2-εG и 2,3-εG (*таблица*) [96, 212]. Pol  $\kappa$  также с высокой эффективностью и точностью осуществляет репликацию матричной ДНК с TG [213].

Поскольку Pol  $\eta$  и Pol  $\iota$  не всегда могут осуществить удлинение праймера после включения нуклеотида напротив поврежденного основания, дальнейший синтез после поврежденных участков, в том числе от некомplementарных концов праймеров, обеспечивает ДНКП-«экстендер» (ДНКП-«экстендер» – ДНКП, которая продолжает синтез после повреждения). В отличие от Pol  $\eta$  и Pol  $\iota$ , Pol  $\kappa$  с достаточно высокой эффективностью продолжает синтез от некомplementарных концов праймеров [214, 215] и, предположительно, в ряде случаев может выполнять функцию ДНКП-«экстендера», в том числе способствуя закреплению мутаций. Однако ключевая роль в продолжении репликации после поврежденных участков принадлежит ДНКП В-семейства Pol  $\zeta$  [197, 216].

### Роль Pol $\zeta$ и Rev1 в репликации поврежденной ДНК

Pol  $\zeta$  состоит из четырех субъединиц: каталитической Rev3 и регуляторных Rev7, р50 и р66 [217–219].

Эффективность и точность репликации «необъемных» повреждений ДНКП человека

Повреждение	ДНКП	Эффективность репликации	Преимущественное включение нуклеотидов	
АП-сайт	Репликативные ДНКП			
	Pol α	+ [18, 189]	dAMP [18] dAMP ≈ dTMP [189]	
	Pol δ	+ [17]; +++ [189] (Pol δ/PCNA); подавляет активность по замещению цепи [21]	dAMP [189]	
	Pol ε	- [16]		
	спецДНКП			
	Pol η	+++ [189, 191] ++++ [194, 196]	dAMP [191, 192, 196] dAMP ≈ dTMP [189] dAMP ≈ dGMP [194]	
	Pol ι	++ [189, 197, 199] ++++ [196] и в кооперации с ScPol ζ [197]	dTMP [189, 196] dGMP [197, 198, 199]	
	Pol κ	+ [189, 196]	dCMP ≥ dAMP [189] dAMP [196]	
	PrimPol	- [233, 237, 242]; + [238]; +++++ [234]	dAMP ≈ делеции [238] делеции [234]	
Дезаминирование	U	Репликативные ДНКП		
		Pol δ	++++ [60] (ScPol δ)	dAMP [60] (ScPol δ)
		Pol ε	++++ [60] (ScPol δ)	dAMP [60] (ScPol δ)
		спецДНКП		
		Pol ι	++++ [200] (U, 5-oh-U и 5,6-DHU)	dGMP напротив U, 5-oh-U и 5,6-DHU [200]
		PrimPol	++++ [237]	dAMP [237]
	гипоксантин	Репликативные ДНКП		
		Pol α	+++ [62]	dCMP [62]
		спецДНКП		
Pol η	++++ [62]	dCMP [62]		
Pol κ	++++ [62]	dCMP [62]		
Окисление	8-охо-G	Репликативные ДНКП		
		Pol α	+ [40]	dAMP [40]
		Pol δ	+ [17, 40]	dAMP [40]
		спецДНКП		
		Pol η	++++ [195, 201] и [193] <i>in vivo</i> +++ [42]	dCMP [195] dAMP ≈ dCMP [42] dAMP [201]
		Pol ι	+ [198]; ++ [201]; +++++ [200]	dCMP [199–201]
		Pol κ	+++ [201]	dAMP [201]
	PrimPol	++++	dCMP [236, 240]	
	TG	Репликативные ДНКП		
		Pol α	- [44, 192]	dAMP [192]
		спецДНКП		
		Pol η	+++ [192]	dAMP [192]
Pol ι				
Pol κ	++++ [213] ++++ в кооперации с Pol ζ <i>in vivo</i> [222]	dAMP [213, 222]		
PrimPol	- [233]			

Алкилирование	N3-me-A	Репликативные ДНКП		
		Pol α	- [82]	dAMP [82]
		Pol δ	- [82]	
		спецДНКП		
		Pol η	++++ [82]	dTMP ≈ dAMP [82]
		Pol ι	+ [82, 202]	dTMP ≈ dAMP [82]
	Pol κ	+++ [82, 202]	dTMP [82]	
	O <sup>6</sup> -me-G	Репликативные ДНКП		
		Pol α	+++ [90, 91]	
		Pol δ	+++ [17]; ++++ [87]	dCMP ≈ dTMP [87]
		спецДНКП		
		Pol η	+ [90]; ++++ [87, 89]	dCMP ≈ dTMP [87, 89]
		Pol ι	++ [87, 203]	dTMP [87, 203]
	Pol κ	+++ [87]	dCMP ≈ dTMP [87]	
	εA	Репликативные ДНКП		
		Pol δ	- [17, 100]	
		спецДНКП		
		Pol η	+++ [100]	dTMP [100]
Pol ι		++ [205, 206]; ++++ в кооперации с дрожжевой Pol ζ [206]	dTMP с Mg <sup>2+</sup> и dCMP с Mn <sup>2+</sup> [205] dCMP ≈ dTMP [206]	
Pol κ		+ [100]	dTMP и делеции [100]	

Эффективность репликации:

-- ингибирование;

+ - низкая;

++ - включает нуклеотиды напротив повреждения, но продолжение репликации затруднено;

+++ - умеренная;

++++ - высокая.

Четырехсубъединичный комплекс Pol ζ человека впервые был выделен в 2014 году [218], и исследования репликации через «необъемные» повреждения ДНК с участием Pol ζ еще не проведены. Препараты Pol ζ из *S. cerevisiae* с высокой эффективностью продолжают синтез ДНК от некомплементарных концов праймеров и праймеров, спаренных с повреждениями [215, 220].

С участием дрожжевого фермента показано также, что Pol ζ кооперируется с Pol ι человека или Pol η дрожжей для эффективной репликации через АП-сайты [215, 221], с Pol κ для высокоточной репликации напротив TG [222] и Pol ι для эффективной репликации напротив εA [206]. В отличие от ДНКП Υ-семейства, функции которых взаимозаменяемы, потеря каталитической активности Pol ζ в клетках млекопитающих является летальной, что указывает на роль Pol ζ в репликации большого числа эндогенных повреждений ДНК [223, 224].

Предполагается, что другой белок Υ-семейства, Rev1, обладает слабой ДНК-полимеразной активностью (преимущественно включает dCMP при синтезе

ДНК напротив G в матричной ДНК), но играет важную структурную и регуляторную роли при сборке мутасомы [177]. Rev1 одновременно содержит сайты связывания с ДНКП Υ-семейства Pol ι, Pol η, Pol κ (через RIR-мотив в Pol ι, Pol η, Pol κ) [225–227] и несколькими субъединицами Pol ζ [228–230]. Rev1 также взаимодействует с неубиквитинилированным и моноубиквитинилированным фактором процессивности PCNA [231, 232]. Наличие множества сайтов связывания с ДНКП и факторами репликации позволяет координировать работу ферментов репликации и своевременно обеспечивать переключение синтеза с высокоточных ДНКП на спецДНКП и с ДНКП-«инserterа» Υ-семейства на процессивную Pol ζ (рис. 4). Однако детальный механизм работы мутасомы в рамках двухполимеразной модели репликации понятен не до конца.

#### Роль PrimPol в репликации поврежденной ДНК

В 2013 году была открыта спецДНКП нового типа – праймаза-полимераза PrimPol, которая обладает одновременно ДНК-полимеразной и праймазной

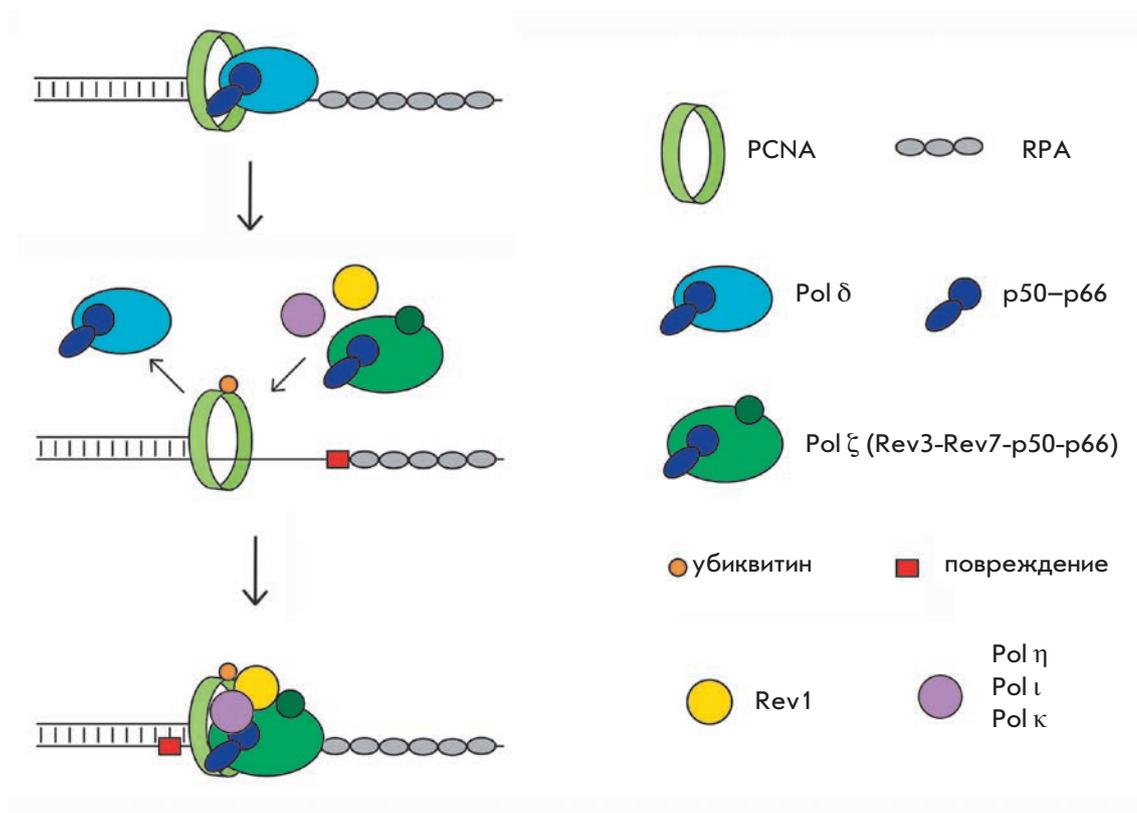


Рис. 4. Репликация поврежденной ДНК с участием спецДНКП у человека

активностями, но отличается от Pol α-праймазы способностью к инициации синтеза ДНК с использованием dNMP [233–235]. PrimPol не относится ни к одному из семейств известных ДНКП эукариот, а принадлежит АЕР-семейству праймаз [236]. Нокаут гена *PRIMPOL* не только вызывает чувствительность клеток к повреждениям ДНК [233], но и замедляет скорость движения репликативной вилки в отсутствие экзогенных повреждающих факторов [237]. PrimPol эффективно включает нуклеотиды напротив некоторых «необъемных» повреждений ДНК (например, точный синтез напротив 8-охо-G) (таблица) [234, 238], но предполагается, что основной функцией PrimPol может быть реинициация репликации после поврежденных участков ДНК [239]. Активность PrimPol, в отличие от большинства ДНКП человека, не стимулируется PCNA [240], но активируется белком PolDIP2 [241]. PrimPol обнаруживается не только в ядре, но и в митохондриях [234] и активируется митохондриальной хеликазой Twinkle [242].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе эволюции у живых организмов выработались механизмы, обеспечивающие эффективную защиту от генотоксичности повреждений ДНК.

К ним относятся как механизмы удаления поврежденных оснований и восстановления первоначальной структуры ДНК (репарация), так и механизмы, обеспечивающие толерантность клеток к повреждениям ДНК без их удаления (синтез через поврежденные участки). Ключевую роль в репарации «необъемных» повреждений ДНК играют ЭРО и целый ряд ДНК-гликозилаз, обладающих субстратной специфичностью по отношению к разным типам повреждений. В последние годы были открыты альтернативные механизмы репарации «необъемных» повреждений ДНК (ИРН, прямое восстановление структуры ДНК с помощью диоксигеназ, АРЕ1-независимая репарация АП-сайтов и др.). Показано, что пути репарации в клетке перекрываются и дублируют функции друг друга. Небольшое число повреждений, которое может оставаться в геномной ДНК, часто приводит к остановке работы высокоточных репликативных ДНКП и переключению на репликацию с участием спецДНКП. Недавно был открыт новый механизм преодоления блоков репликации, вызванных повреждениями ДНК – реинициация репликации после повреждений ДНК с участием ДНК-полимеразы и праймазы PrimPol. Множественность механизмов репарации и репликации поврежденной ДНК обеспечивает высокую за-

щиту клеток от цитотоксического и мутагенного воздействия повреждений.

Накопление «необъемных» повреждений в результате нарушения работы ферментов репарации и репликации приводит к развитию многих заболеваний человека, прежде всего, онкологических. Связь нарушений функции ферментов репарации и репликации с болезнями человека рассмотрена в обзорах [243–246]. Поиск эффективных способов регуляции активности ферментов репарации и репликации является

перспективным направлением, которое может привести к созданию новых терапевтических подходов. ●

*Авторы выражают благодарность А.В. Кульбачинскому за ценные дискуссии и помощь в подготовке рукописи. Обзор подготовлен при поддержке Президиума РАН (МКБ, Новые группы), РФФИ и Правительства Москвы (15-34-70002-мол\_a\_мос и 15-04-08-398-а), фонда «Династия» и стипендии Президента РФ.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Geacintov N.E., Cosman M., Hingerty B.E., Amin S., Broyde S., Patel D.J. // *Chem. Res. Toxicol.* 1997. V. 10. № 2. P. 111–146.
- Скосарева Л.В., Лебедева Н.А., Лаврик О.И., Речкунова Н.И. // *Молекуляр. биология.* 2013. Т. 47. № 5. С. 731–742.
- Kamileri I., Karakasilioti I., Garinis G.A. // *Trends. Genet.* 2012. V. 28. № 11. P. 566–573.
- Hsu G.W., Huang X., Luneva N.P., Geacintov N.E., Beese L.S. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 5. P. 3764–3770.
- O'Day C., Burgers P.M., Taylor J.S. // *Nucleic Acids Res.* 1992. V. 20. № 20. P. 5403–5406.
- Wang Y. // *Chem. Res. Toxicol.* 2008. V. 21. № 2. P. 276–281.
- Bauer N.C., Corbett A.H., Doetsch P.W. // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. № 21. P. 10083–10101.
- Dianov G.L., Hubscher U. // *Nucleic Acids Res.* 2013. V. 41. № 6. P. 3483–3490.
- Krokan H.E., Bjoras M. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013. V. 5. № 4. a012583.
- Nakamura J., Walker V.E., Upton P.B., Chiang S.Y., Kow Y.W., Swenberg J.A. // *Cancer Res.* 1998. V. 58. № 2. P. 222–225.
- Tice R.R., Setlow R.B. *Handbook of the Biology of Aging.* New York: Van Nostrand Reinhold, 1985. 173 p.
- Lindahl T., Nyberg B. // *Biochemistry.* 1972. V. 11. № 19. P. 3610–3618.
- Guillet M., Boiteux S. // *Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 23. № 22. P. 8386–8394.
- Chen Z., Wang J.H. // *Front. Med.* 2014. V. 8. № 2. P. 201–216.
- Petersen-Mahrt S.K., Harris R.S., Neuberger M.S. // *Nature.* 2002. V. 418. № 6893. P. 99–103.
- Locatelli G.A., Pospiech H., Tanguy Le Gac N., van Loon B., Hubscher U., Parkkinen S., Syväoja J.E., Villani G. // *Biochem. J.* 2010. V. 429. № 3. P. 573–582.
- Schmitt M.W., Matsumoto Y., Loeb L.A. // *Biochimie.* 2009. V. 91. № 9. P. 1163–1172.
- Shibutani S., Takeshita M., Grollman A.P. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 21. P. 13916–13922.
- Weerasooriya S., Jasti V.P., Basu A.K. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 9. e107915.
- Cuniasse P., Fazakerley G.V., Guschlbauer W., Kaplan B.E., Sowers L.C. // *J. Mol. Biol.* 1990. V. 213. № 2. P. 303–314.
- Maga G., van Loon B., Crespan E., Villani G., Hubscher U. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 21. P. 14267–14275.
- Yu S.L., Lee S.K., Johnson R.E., Prakash L., Prakash S. // *Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 23. № 1. P. 382–388.
- Dempfle B., Herman T., Chen D.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. № 24. P. 11450–11454.
- Li M., Wilson 3<sup>rd</sup> D.M. // *Antioxid. Redox Signal.* 2014. V. 20. № 4. P. 678–707.
- Choi Y.J., Li H., Son M.Y., Wang X.H., Fornsgaglio J.L., Sobol R.W., Lee M., Vijg J., Imholz S., Dollé M.E., et al. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 1. e86358.
- Ilina E.S., Lavrik O.I., Khodyreva S.N. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2008. V. 1784. № 11. P. 1777–1785.
- Roberts S.A., Strande N., Burkhalter M.D., Strom C., Haverener J.M., Hasty P., Ramsden D.A. // *Nature.* 2010. V. 464. № 7292. P. 1214–1217.
- Lebedeva N.A., Rechkunova N.I., Lavrik O.I. // *FEBS Lett.* 2011. V. 585. № 4. P. 683–686.
- Lebedeva N.A., Rechkunova N.I., El-Khamisy S.F., Lavrik O.I. // *Biochimie.* 2012. V. 94. № 8. P. 1749–1753.
- Khodyreva S.N., Prasad R., Ilina E.S., Sukhanova M.V., Kutuzov M.M., Liu Y., Hou E.W., Wilson S.H., Lavrik O.I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2010. V. 107. № 51. P. 22090–22095.
- Косова А.А., Лаврик О.И., Ходырева С.Н. // *Молекуляр. биология.* 2015. Т. 49. № 1. С. 67–74.
- Речкунова Н.И., Лебедева Н.А., Лаврик О.И. // *Биоорганическая химия.* 2015. Т. 41. № 5. С. 531–538.
- Yakes F.M., van Houten B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. № 2. P. 514–519.
- Cadet J., Wagner J.R. // *Cold. Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013. V. 5. № 2. a012559.
- van Loon B., Markkanen E., Hubscher U. // *DNA Repair.* 2010. V. 9. № 6. P. 604–616.
- Storr R.J., Woolston C.M., Zhang Y., Martin S.G. // *Antioxid. Redox Signal.* 2013. V. 18. № 18. P. 2399–2408.
- Boiteux S., Gajewski E., Laval J., Dizdaroglu M. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. № 1. P. 106–110.
- Burgdorf L.T., Carell T. // *Chemistry.* 2002. V. 8. № 1. P. 293–301.
- Dolinnaya N.G., Kubareva E.A., Romanova E.A., Trikin R.M., Oretskaya T.S. // *Biochimie.* 2013. V. 95. № 2. P. 134–147.
- Shibutani S., Takeshita M., Grollman A.P. // *Nature.* 1991. V. 349. № 6308. P. 431–434.
- Hsu G.W., Ober M., Carell T., Beese L.S. // *Nature.* 2004. V. 431. № 7005. P. 217–221.
- McCulloch S.D., Kokoska R.J., Garg P., Burgers P.M., Kunkel T.A. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. № 9. P. 2830–2840.
- Aller P., Rould M.A., Hogg M., Wallace S.S., Doublie S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 3. P. 814–818.
- Clark J., Beardsley G.P. // *Biochemistry.* 1987. V. 26. № 17. P. 5398–5403.
- Shen J.C., Rideout W.M., Jones P.A. // *Nucleic Acids Res.* 1994. V. 22. № 6. P. 972–976.
- Singer B., Grunberger D. *Molecular Biology of Mutagens and Carcinogens.* New York: Plenum Press, 1983. 19 p.
- Caulfield J.L., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 21. P. 12689–12695.

48. Nguyen T., Brunson D., Crespi C.L., Penman B.W., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89. № 7. P. 3030–3034.
49. Ohshima H., Tatemichi M., Sawa T. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2003. V. 417. № 1. P. 3–11.
50. Frederico L.A., Kunkel T.A., Shaw B. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. № 26. P. 6523–6530.
51. Lindahl T., Nyberg B. // *Biochemistry*. 1974. V. 13. № 16. P. 3405–3410.
52. Karran P., Lindahl T. // *Biochemistry*. 1980. V. 19. № 26. P. 6005–6011.
53. Shapiro R., Yamaguchi H. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1972. V. 281. № 4. P. 501–506.
54. Frederico L.A., Kunkel T.A., Shaw B.R. // *Biochemistry*. 1990. V. 29. № 10. P. 2532–2537.
55. Wagner J.R., Hu C.C., Ames B.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1992. V. 89. № 8. P. 3380–3384.
56. Dizdaroglu M., Laval J., Boiteux S. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. № 45. P. 12105–12111.
57. Dong M., Dedon P.C. // *Chem. Res. Toxicol.* 2006. V. 19. № 1. P. 50–57.
58. Lim K.S., Huang S.H., Jenner A., Wang H., Tang S.Y., Halliwell B. // *Free Radic. Biol. Med.* 2006. V. 40. № 11. P. 1939–1948.
59. Pang B., Zhou X., Yu H., Dong M., Taghizadeh K., Wishnok J.S., Tannenbaum S.R., Dedon P.C. // *Carcinogenesis*. 2007. V. 28. № 8. P. 1807–1813.
60. Wardle J., Burgers P.M., Cann I.K., Darley K., Heslop P., Johansson E., Lin L.J., McGlynn P., Sanvoisin J., Stith C.M., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2008. V. 36. № 3. P. 705–711.
61. Hill-Perkins M., Jones M.D., Karran P. // *Mutat. Res.* 1986. V. 162. № 2. P. 153–163.
62. Yasui M., Suenaga E., Koyama N., Masutani C., Hanaoka F., Gruz P., Shibutani S., Nohmi T., Hayashi M., Honma M. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 377. № 4. P. 1015–1023.
63. Hajnic M., Ruiter Ad., Polyansky A.A., Zagrovic B. // *J. Am. Chem. Soc.* 2016. V. 138. № 17. P. 5519–5522.
64. Nakano T., Asagoshi K., Terato H., Suzuki T., Ide H. // *Mutagenesis*. 2005. V. 20. № 3. P. 209–216.
65. Cooper D.N., Youssoufian H. // *Hum. Genet.* 1988. V. 78. № 2. P. 151–155.
66. Temiz N.A., Donohue D.E., Bacolla A., Vasquez K.M., Cooper D.N., Mudunuri U., Ivanic J., Cer R.Z., Yi M., Stephens R.M., et al. // *Hum. Genet.* 2015. V. 134. № 8. P. 851–864.
67. Chikan N.A., Shabir N., Shaff S., Mir M.R., Patel T.N. // *Asian. Pac. J. Cancer Prev.* 2012. V. 13. № 3. P. 1077–1079.
68. Sutandyo N. // *Acta. Med. Indones.* 2010. V. 42. № 1. P. 36–42.
69. Bolt H.M., Gansewendt B. // *Crit. Rev. Toxicol.* 1993. V. 23. № 3. P. 237–253.
70. Bulathsinghala A.T., Shaw I.C. // *Hum. Exp. Toxicol.* 2014. V. 33. № 1. P. 81–91.
71. Guengerich F.P., Min K.S., Persmark M., Kim M.S., Humphreys W.G., Cmarik J.M., Thier R. *IARC Sci. Publ.* 1994. № 125. P. 57–72.
72. Cheung-Ong K., Giaever G., Nislow C. // *Chem. Biol.* 2013. V. 20. № 5. P. 648–659.
73. Colvin M. *Holland-Frei Cancer Medicine*. 6th edition. Hamilton: BC Decker, 2003. 51 chapter.
74. Beranek D.T. // *Mutat. Res.* 1990. V. 231. № 1. P. 11–30.
75. Fu D., Calvo J.A., Samson L.D. // *Nat. Rev. Cancer*. 2012. V. 12. № 2. P. 104–120.
76. Beranek D.T., Weis C.C., Swenson D.H. // *Carcinogenesis*. 1980. V. 1. № 7. P. 595–606.
77. Reiner B., Zamenhof S. // *J. Biol. Chem.* 1957. V. 228. № 1. P. 475–486.
78. Rydberg B., Lindahl T. // *EMBO J.* 1982. V. 1. № 2. P. 211–216.
79. Barrows L.R., Magee P.N. // *Carcinogenesis*. 1982. V. 3. № 3. P. 349–351.
80. Boiteux S., Huisman O., Laval J. // *EMBO J.* 1984. V. 3. № 11. P. 2569–2573.
81. Fronza G., Gold B. // *J. Cell. Biochem.* 2004. V. 91. № 2. P. 250–257.
82. Plosky B.S., Frank E.G., Berry D.A., Vennall G.P., McDonald J.P., Woodgate R. // *Nucleic Acids Res.* 2008. V. 36. № 7. P. 2152–2162.
83. Larson K., Sahm J., Shenkar R., Strauss B. // *Mutat. Res.* 1985. V. 150. № 1–2. P. 77–84.
84. Koag M.C., Kou Y., Ouzon-Shubeita H., Lee S. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. № 13. P. 8755–8766.
85. Boiteux S., Laval J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1983. V. 110. № 2. P. 552–558.
86. O'Connor T.R., Boiteux S., Laval J. // *Nucleic Acids Res.* 1982. V. 16. № 13. P. 5879–5894.
87. Choi J.Y., Chowdhury G., Zang H., Angel K.C., Vu C.C., Peterson L.A., Guengerich F.P. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 50. P. 38244–38256.
88. Ellison K.S., Dogliotti E., Connors T.D., Basu A.K., Essigmann J.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1989. V. 86. № 22. P. 8620–8624.
89. Haracska L., Prakash S., Prakash L. // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. № 21. P. 8001–8007.
90. Perrino F.W., Blans P., Harvey S., Gelhaus S.L., McGrath C., Akman S.A., Jenkins G.S., LaCourse W.R., Fishbein J.C. // *Chem. Res. Toxicol.* 2003. V. 16. № 12. P. 1616–1623.
91. Voigt J.M., Topal M.D. // *Carcinogenesis*. 1995. V. 16. № 8. P. 1775–1782.
92. Nay S.L., O'Connor T.R. *New Research Directions in DNA Repair*. InTech, 2013. 5 chapter.
93. Chung F.L., Chen H.J., Nath R.G. // *Carcinogenesis*. 1996. V. 17. № 10. P. 2105–2111.
94. Nair J., Barbin A., Velic I., Bartsch H. // *Mutat. Res.* 1999. V. 424. № 1–2. P. 59–69.
95. Barbin A. // *Mutat. Res.* 2000. V. 462. № 2–3. P. 55–69.
96. Chang S.C., Fedeles B.I., Wu J., Delaney J.C., Li D., Zhao L., Christov P.P., Yau E., Singh V., Jost M., et al. // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. № 11. P. 5489–5500.
97. Choi J.Y., Zang H., Angel K.C., Kozekov I.D., Goodenough A.K., Rizzo C.J., Guengerich F.P. // *Chem. Res. Toxicol.* 2006. V. 19. № 6. P. 879–886.
98. Pandya G.A., Moriya M. // *Biochemistry*. 1996. V. 35. № 35. P. 11487–11492.
99. Shibutani S., Suzuki N., Matsumoto Y., Grollman A.P. // *Biochemistry*. 1996. V. 35. № 47. P. 14992–14998.
100. Levine R.L., Miller H., Grollman A., Ohashi E., Ohmori H., Masutani C., Hanaoka F., Moriya M. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 22. P. 18717–18721.
101. Yamanaka K., Minko I.G., Takata K., Kolbanovskiy A., Kozekov I.D., Wood R.D., Rizzo C.J., Lloyd R.S. // *Chem. Res. Toxicol.* 2010. V. 23. № 3. P. 689–695.
102. Fortini P., Dogliotti E. // *DNA Repair*. 2007. V. 6. № 4. P. 398–409.
103. Жарков Д.О. // *Вест. Росс. АН*. 2013. Т. 83. № 2. С. 112–119.
104. Жарков Д.О. // *Молекуляр. биология*. 2007. Т. 41. № 5. С. 772–786.
105. Brooks S.C., Adhikary S., Rubinson E.H., Eichman B.F. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1834. № 1. P. 247–271.
106. Demple B., Sung J.S. // *DNA Repair (Amst.)*. 2005. V. 4. № 12. P. 1442–1449.

107. Das A., Wiederhold L., Leppard J.B., Kedar P., Prasad R., Wang H., Boldogh I., Karimi-Busheri F., Weinfeld M., Tomkinson A.E., et al. // *DNA Repair*. 2006. V. 5. № 12. P. 1439–1448.
108. Pascucci B., Maga G., Hübscher U., BJORAS M., Seeberg E., Hickson I.D., Villani G., Giordano C., Cellai L., Dogliotti E. // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. № 10. P. 2124–2130.
109. Wiederhold L., Leppard J.B., Kedar P., Karimi-Busheri F., Rasouli-Nia A., Weinfeld M., Tomkinson A.E., Izumi T., Prasad R., Wilson S.H., et al. // *Mol. Cell*. 2004. V. 15. № 2. P. 209–220.
110. Caldecott K.W., Tucker J.D., Stanker L.H., Thompson L.H. // *Nucleic Acids Res.* 1995. V. 23. № 23. P. 4836–4843.
111. Kubota Y., Nash R.A., Klungland A., Schär P., Barnes D.E., Lindahl T. // *EMBO J.* 1996. V. 15. № 23. P. 6662–6670.
112. Gary R., Kim K., Cornelius H.L., Park M.S., Matsumoto Y. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 7. P. 4354–4363.
113. Mjelle R., Hegre S.A., Aas P.A., Slupphaug G., Drablos F., Saetrom P., Krokan H.E. // *DNA Repair*. 2015. V. 30. P. 53–67.
114. Sobol R.W., Prasad R., Evenski A., Baker A., Yang X.P., Horton J.K., Wilson S.H. // *Nature*. 2000. V. 405. № 6788. P. 807–810.
115. Prasad R., Bebenek K., Hou E., Shock D.D., Beard W.A., Woodgate R., Kunkel T.A., Wilson S.H. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 32. P. 29649–29654.
116. Garcia-Diaz M., Bebenek K., Kunkel T.A., Blanco L. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 37. P. 34659–34663.
117. Petta T.B., Nakajima S., Zlatanou A., Despras E., Couve-Privat S., Ishchenko A., Sarasin A., Yasui A., Kannouche P. // *EMBO J.* 2008. V. 27. № 21. P. 2883–2895.
118. Prasad R., Longley M.J., Sharief F.S., Hou E.W., Copeland W.C., Wilson S.H. // *Nucleic Acids Res.* 2009. V. 37. № 6. P. 1868–1877.
119. Stucki M., Pascucci B., Parlanti E., Fortini P., Wilson S.H., Hübscher U., Dogliotti E. // *Oncogene*. 1998. V. 17. № 7. P. 835–843.
120. Levin D.S., Vijayakumar S., Liu X., Bermudez V.P., Hurwitz J., Tomkinson A.E. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 53. P. 55196–55201.
121. Cappelli E., Taylor R., Cevasco M., Abbondandolo A., Caldecott K., Frosina G. // *J. Biol. Chem.* 1997. V. 272. № 38. P. 23970–23975.
122. Levin D.S., McKenna A.E., Motycka T.A., Matsumoto Y., Tomkinson A.E. // *Curr. Biol.* 2000. V. 10. № 15. P. 919–922.
123. Nilsen H., Otterlei M., Haug T., Solum K., Nagelhus T.A., Skorpen F., Krokan H.E. // *Nucleic Acids Res.* 1997. V. 25. № 4. P. 750–755.
124. Haug T., Skorpen F., Aas P.A., Malm V., Skjelbred C., Krokan H.E. // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. № 6. P. 1449–1457.
125. Slupphaug G., Markussen F.H., Olsen L.C., Aasland R., Aarsaether N., Bakke O., Krokan H.E., Helland D.E. // *Nucleic Acids Res.* 1993. V. 21. № 11. P. 2579–2584.
126. Masaoka A., Matsubara M., Hasegawa R., Tanaka T., Kurisu S., Terato H., Ohyama Y., Karino N., Matsuda A., Ide H. // *Biochemistry*. 2003. V. 42. № 17. P. 5003–5012.
127. Wibley J.E., Waters T.R., Haushalter K., Verdine G.L., Pearl L.H. // *Mol. Cell*. 2003. V. 11. № 6. P. 1647–1659.
128. Haushalter K.A., Todd Stukenberg M.W., Kirschner M.W., Verdine G.L. // *Curr. Biol.* 1999. V. 9. № 4. P. 174–185.
129. Hendrich B., Hardeland U., Ng H.H., Jiricny J., Bird A. // *Nature*. 1999. V. 401. № 6750. P. 301–304.
130. Neddermann P., Gallinari P., Lettieri T., Schmid D., Truong O., Hsuan J.J., Wiebauer K., Jiricny J. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 22. P. 12767–12774.
131. Sjolund A., Senejani A.G., Sweasy J.B. // *Mutat. Res.* 2013. V. 743–744. P. 12–25.
132. Bellacosa A., Drohat A.C. // *DNA Repair*. 2015. V. 32. P. 33–42.
133. Boiteux S., Radicella J.P. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2000. V. 377. № 1. P. 1–8.
134. Radicella J.P., Dherin C., Desmaze C., Fox M.S., Boiteux S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. № 15. P. 8010–8015.
135. Ohtsubo T., Oda H., Fujiwara T., Kang D., Sugimachi K., Nakabeppu Y., Nishioka K. // *Mol. Biol. Cell*. 1999. V. 10. № 5. P. 1637–1652.
136. Takao M., Aburatani H., Kobayashi K., Yasui A. // *Nucleic Acids Res.* 1998. V. 26. № 12. P. 2917–2922.
137. Hazra T.K., Izumi T., Boldogh I., Imhoff B., Kow Y.W., Jaruga P., Dizdaroglu M., Mitra S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. № 6. P. 3523–3538.
138. Parsons J.L., Zharkov D.O., Dianov G.L. // *Nucleic Acids Res.* 2005. V. 33. № 15. P. 4849–4856.
139. Aspinwall R., Rothwell D.G., Roldan-Arjona T., Anselmino C., Ward C.J., Cheadle J.P., Sampson J.R., Lindahl T., Harris P.C., Hickson I.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. № 1. P. 109–114.
140. Bandar V., Sunkara S., Wallace S.S., Bond J.P. // *DNA Repair*. 2002. V. 1. № 7. P. 517–529.
141. Dizdaroglu M., Karahail B., Sentürker S., Buckley T.T., Roldán-Arjona T. // *Biochemistry*. 1999. V. 38. № 1. P. 243–246.
142. Miyabe I., Zhang Q.M., Kino K., Sugiyama H., Takao M., Yasui A., Yonei S. // *Nucleic Acids Res.* 2002. V. 30. № 14. P. 3443–3448.
143. Parsons J.L., Kavli B., Slupphaug G., Dianov G.L. // *Biochemistry*. 2007. V. 46. № 13. P. 4158–4163.
144. Hazra T.K., Kow Y.W., Hatahet Z., Imhoff B., Boldogh I., Mokkaapati S.K., Mitra S., Izumi T. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 34. P. 30417–30420.
145. Liu M., Doublé S., Wallace S.S. // *Mutat. Res.* 2013. V. 743–744. P. 4–11.
146. Rolseth V., Krokeide S.Z., Kunke D., Neurauter C.G., Suganthan R., Sejersted Y., Hildrestrand G.A., Bjørås M., Luna L. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1833. № 5. P. 1157–1164.
147. Dou H., Mitra S., Hazra T.K. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 50. P. 49679–49684.
148. Banerjee D., Mandal S.M., Das A., Hegde M.L., Das S., Bhakat K.K., Boldogh L., Sarkar P.S., Mitra S., Hazra T.K. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 8. P. 6006–6016.
149. Hegde M.L., Hegde P.M., Bellot L.J., Mandal S.M., Hazra T.K., Li G.M., Boldogh L., Tomkinson A.E., Mitra S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 33. E3090–E3099.
150. Liu M., Imamura K., Averill A.M., Wallace S.S., Doublé S. // *Structure*. 2013. V. 21. № 2. P. 247–256.
151. Chakravarti D., Ibeanu G.C., Tano K., Mitra S. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 24. P. 15710–15715.
152. Engelward B.P., Weeda G., Wyatt M.D., Broekhof J.L., de Wit J., Donker I., Allan J.M., Gold B., Hoeijmakers J.H., Samson L.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. № 24. P. 13087–13092.
153. Hang B., Singer B., Margison G.P., Elder R.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. № 24. P. 12869–12874.
154. Saparbaev M., Langouët S., Privezentzev C.V., Guengerich F.P., Cai H., Elder R.H., Laval J. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 30. P. 26987–26993.
155. Wolfe A.E., O'Brien P.J. // *Biochemistry*. 2009. V. 48. № 48. P. 11357–11369.
156. Saparbaev M., Laval J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1994. V. 91. № 13. P. 5873–5877.
157. Hitchcock T.M., Dong L., Connor E.E., Meira L.B., Samson L.D., Wyatt M.D., Cao W. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 37. P. 38177–38183.
158. McGoldrick J.P., Yeh Y.C., Solomon M., Essigmann J.M., Lu A.L. // *Mol. Cell. Biol.* 1995. V. 15. № 2. P. 989–996.

159. van Loon B., Hubscher U. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 43. P. 18201–18206.
160. Goto M., Shinmura K., Matsushima Y., Ishino K., Yamada H., Totsuka Y., Matsuda T., Nakagama H., Sugimura H. // *Free Radic. Biol. Med.* 2014. V. 76. P. 136–146.
161. Gros L., Ishchenko A.A., Ide H., Elder R.H., Saparbaev M.K. // *Nucleic Acids Res.* 2004. V. 32. № 1. P. 73–81.
162. Ishchenko A.A., Deprez E., Maksimenko A., Brochon J.C., Tauc P., Saparbaev M.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 8. P. 2564–2569.
163. Gelin A., Redrejo-Rodríguez M., Laval J., Fedorova O.S., Saparbaev M., Ishchenko A.A. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 8. e12241.
164. Prorok P., Saint-Pierre C., Gasparutto D., Fedorova O.S., Ishchenko A.A., Leh H., Buckle M., Tudek B., Saparbaev M. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 12. e51776.
165. Prorok P., Alili D., Saint-Pierre C., Gasparutto D., Zharkov D.O., Ishchenko A.A., Tudek B., Saparbaev M.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 39. E3695–E3703.
166. Yi C., He C. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2013. V. 5. № 1. a012575.
167. Yi C., Jia G., Hou G., Dai Q., Zhang W., Zheng G., Jian X., Yang C.G., Cui Q., He C. // *Nature*. 2010. V. 468. № 7321. P. 330–333.
168. Aas P.A., Otterlei M., Falnes P.O., Vågbo C.B., Skorpen F., Akbari M., Sundheim O., Bjørås M., Slupphaug G., Seeberg E., et al. // *Nature*. 2003. V. 421. № 6925. P. 859–863.
169. Duncan T., Trewick S.C., Koivisto P., Bates P.A., Lindahl T., Sedgwick B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2002. V. 99. № 26. P. 16660–16665.
170. You C., Wang P., Nay S.L., Wang J., Dai X., O'Connor T.R., Wang Y. // *ACS Chem. Biol.* 2016. V. 11. № 5. P. 1332–1338.
171. Lamb K.L., Liu Y., Ishiguro K., Kwon Y., Paquet N., Sartorelli A.C., Sung P., Rockwell S., Sweasy J.B. // *Mol. Carcinog.* 2014. V. 53. № 3. P. 201–210.
172. Pegg A.E., Boosalis M., Samson L., Moschel R.C., Byers T.L., Swenn K., Dolan M.E. // *Biochemistry*. 1993. V. 32. № 45. P. 11998–12006.
173. Zak P., Kleibl K., Laval F. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 1. P. 730–733.
174. Demple B., Sedgwick B., Robins P., Totty N., Waterfield M.D., Lindahl T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1985. V. 82. № 9. P. 2688–2692.
175. Campbell C.R., Spratt T.E. // *Biochemistry*. 1994. V. 33. № 37. P. 11364–11371.
176. Макарова А.В., Кульбачинский А.В. // *Биохимия*. 2012. Т. 77. № 6. С. 669–685.
177. Makarova A.V., Burgers P.M. // *DNA Repair*. 2015. V. 29. P. 47–55.
178. Yang W. // *Biochemistry*. 2014. V. 53. № 17. P. 2793–2803.
179. Sharma S., Helchowski C.M., Canman C.E. // *Mutat. Res.* 2013. V. 743–744. P. 97–110.
180. McCulloch S.D., Kunkel T.A. // *Cell Res.* 2008. V. 18. № 1. P. 148–161.
181. Johnson R.E., Washington M.T., Prakash S., Prakash L. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 11. P. 7447–7450.
182. Matsuda T., Bebenek K., Masutani C., Hanaoka F., Kunkel T.A. // *Nature*. 2000. V. 404. № 6781. P. 1011–1013.
183. Ohashi E., Bebenek K., Matsuda T., Feaver W.J., Gerlach V.L., Friedberg E.C., Ohmori H., Kunkel T.A. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 50. P. 39678–39684.
184. Tissier A., McDonald J.P., Frank E.G., Woodgate R. // *Genes Dev.* 2000. V. 14. № 13. P. 1642–1650.
185. Zhang Y., Yuan F., Wu X., Wang X. // *Mol. Cell. Biol.* 2000. V. 20. № 19. P. 7099–7108.
186. Zhang Y., Yuan F., Xin H., Wu X., Rajpal D.K., Yang D., Wang Z. // *Nucleic Acids Res.* 2000. V. 28. № 21. P. 4147–4156.
187. Masutani C., Kusumoto R., Iwai S., Hanaoka F. // *EMBO J.* 2000. V. 19. № 12. P. 3100–3109.
188. McCulloch S.D., Kokoska R.J., Masutani C., Iwai S., Hanaoka F., Kunkel T.A. // *Nature*. 2004. V. 428. № 6978. P. 97–100.
189. Choi J.Y., Lim S., Kim E.J., Jo A., Guengerich F.P. // *J. Mol. Biol.* 2010. V. 404. № 1. P. 34–44.
190. Furrer A., van Loon B. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. № 1. P. 553–566.
191. Kokoska R.J., McCulloch S.D., Kunkel T.A. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. № 50. P. 50537–50545.
192. Kusumoto R., Masutani C., Iwai S., Hanaoka F. // *Biochemistry*. 2002. V. 41. № 19. P. 6090–6099.
193. Lee D.H., Pfeifer G.P. // *Mutat. Res.* 2008. V. 641. № 1–2. P. 19–26.
194. Patra A., Zhang Q., Lei L., Su Y., Egli M., Guengerich F.P. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 13. P. 8028–8038.
195. Patra A., Nagy L.D., Zhang Q., Su Y., Müller L., Guengerich F.P., Egli M.A. // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. № 24. P. 16867–16882.
196. Sherrer S.M., Fiala K.A., Fowler J.D., Newmister S.A., Pryor J.M., Suo Z. // *Nucleic Acids Res.* 2011. V. 39. № 2. P. 609–622.
197. Johnson R.E., Washington M.T., Haracska L., Prakash S., Prakash L. // *Nature*. 2000. V. 406. № 6799. P. 1015–1019.
198. Nair D.T., Johnson R.E., Prakash L., Prakash S., Aggarwal A.K. // *Structure*. 2009. V. 17. № 4. P. 530–537.
199. Zhang Y., Yuan F., Wu X., Taylor J.S., Wang Z. // *Nucleic Acids Res.* 2001. V. 29. № 4. P. 928–935.
200. Vaisman A., Woodgate R. // *EMBO J.* 2001. V. 20. № 22. P. 6520–6529.
201. Kirouac K.N., Ling H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 8. P. 3210–3215.
202. Johnson R.E., Yu S.L., Prakash S., Prakash L. // *Mol. Cell. Biol.* 2007. V. 27. № 20. P. 7198–7205.
203. Pence M.G., Choi J.Y., Egli M., Guengerich F.P. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 52. P. 40666–40672.
204. Pence M.G., Blans P., Zink C.N., Hollis T., Fishbein J.C., Perrino F.W. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 3. P. 1732–1740.
205. Makarova A.V., Ignatov A., Miropolskaya N., Kulbachinskiy A. // *DNA Repair*. 2014. V. 22. C. 67–76.
206. Nair D.T., Johnson R.E., Prakash L., Prakash S., Aggarwal A.K. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2006. V. 13. № 7. P. 619–625.
207. Makarova A.V., Grabow C., Gening L.V., Tarantul V.Z., Tahirov T.H., Bessho T., Pavlov Y.I. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 1. e16612.
208. Kirouac K.N., Ling H. // *EMBO J.* 2009. V. 28. № 11. P. 1644–1654.
209. Jha V., Bian C., Xing G., Ling H. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. № 10. P. 4957–4967.
210. Minko I.G., Harbut M.B., Kozekov I.D., Kozekova A., Jakobs P.M., Olson S.B., Moses R.E., Harris T.M., Rizzo C.J., Lloyd R.S. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 25. P. 17075–17082.
211. Yasui M., Dong H., Bonala R.R., Suzuki N., Ohmori H., Hanaoka F., Johnson F., Grollman A.P., Shibutani S. // *Biochemistry*. 2004. V. 43. № 47. P. 15005–15013.
212. Zhao L., Pence M.G., Christov P.P., Wawrzak Z., Choi J.Y., Rizzo C.J., Egli M., Guengerich F.P. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 42. P. 35516–35526.
213. Fischhaber P.L., Gerlach V.L., Feaver W.J., Hatahet Z., Wallace S.S., Friedberg E.C. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 40. P. 37604–37611.
214. Lone S., Townson S.A., Uljon S.N., Johnson R.E., Brahma A., Nair D.T., Prakash S., Prakash L., Aggarwal A.K. // *Mol. Cell.*

2007. V. 25. № 4. P. 601–614.
215. Carlson K.D., Johnson R.E., Prakash L., Prakash S., Washington M.T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 43. P. 15776–15781.
216. Livneh Z., Ziv O., Shachar S. // *Cell Cycle*. 2010. V. 9. № 4. P. 729–735.
217. Baranovskiy A.G., Lada A.G., Siebler H.M., Zhang Y., Pavlov Y.I., Tahirov T.H. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 21. P. 17281–17287.
218. Lee Y.S., Gregory M.T., Yang W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 8. P. 2954–2959.
219. Makarova A.V., Stodola J.L., Burgers P.M. // *Nucleic Acids Res.* 2012. V. 40. № 22. P. 11618–11626.
220. Haracska L., Prakash S., Prakash L. // *Mol. Cell. Biol.* 2003. V. 23. № 4. P. 1453–1459.
221. Yuan F., Zhang Y., Rajpal D.K., Wu X., Guo D., Wang M., Taylor J.S., Wang Z. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 11. P. 8233–8239.
222. Yoon J.H., Bhatia G., Prakash S., Prakash L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 107. № 32. P. 14116–14121.
223. Esposito G., Godindagger I., Klein U., Yaspo M.L., Cumano A., Rajewsky K. // *Curr. Biol.* 2000. V. 10. № 19. P. 1221–1224.
224. Wittschieben J., Shivji M.K., Lalani E., Jacobs M.A., Marini F., Gearhart P.J., Rosewell I., Stamp G., Wood R.D. // *Curr. Biol.* 2000. V. 10. № 19. P. 1217–1220.
225. Guo C., Fischhaber P.L., Luk-Paszyc M.J., Masuda Y., Zhou J., Kamiya K., Kisker C., Friedberg E.C. // *EMBO J.* 2003. V. 22. № 24. P. 6621–6630.
226. Ohashi E., Hanafusa T., Kamei K., Song I., Tomida J., Hashimoto H., Vaziri C., Ohmori H. // *Genes Cells*. 2009. V. 14. № 2. P. 101–111.
227. Pozhidaiva A., Pustovalova Y., D'Souza S., Bezsonova I., Walker G.C., Korzhnev D.M. // *Biochemistry*. 2012. V. 51. № 27. P. 5506–5520.
228. Pustopalova Y., Bezsonova I., Korzhnev D.M. // *FEBS Lett.* 2012. V. 586. № 19. P. 3051–3056.
229. Pustovalova Y., Magalhães M.T., D'Souza S., Rizzo A.A., Korza G., Walker G.C., Korzhnev D.M. // *Biochemistry*. 2016. V. 55. № 13. P. 2043–2053.
230. Wojtaszek J., Lee C.J., D'Souza S., Minesinger B., Kim H., D'Andrea A.D., Walker G.C., Zhou P. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 40. P. 33836–33846.
231. Guo C., Sonoda E., Tang T.S., Parker J.L., Bielen A.B., Takeda S., Ulrich H.D., Friedberg E.C. // *Mol. Cell*. 2006. V. 23. № 2. P. 265–271.
232. Pustopalova Y., Maciejewski M.W., Korzhnev D.M. // *J. Mol. Biol.* 2013. V. 425. № 17. P. 3091–3105.
233. Bianchi J., Rudd S.G., Jozwiakowski S.K., Bailey L.J., Soura V., Taylor E., Stevanovic I., Green A.J., Stracker T.H., Lindsay H.D., et al. // *Mol. Cell*. 2013. V. 52. № 4. P. 566–573.
234. García-Gómez S., Reyes A., Martínez-Jiménez M.I., Chocrón E.S., Mourón S., Terrados G., Powell C., Salido E., Méndez J., Holt I.J., et al. // *Mol. Cell*. 2013. V. 52. № 4. P. 541–553.
235. Wan L., Lou J., Xia Y., Su B., Liu T., Cui J., Sun Y., Lou H., Huang J. // *EMBO Rep.* 2013. V. 14. № 12. P. 1104–1112.
236. Iyer L.M., Koonin E.V., Leipe D.D., Aravind L. // *Nucleic Acids Res.* 2005. V. 33. № 12. P. 3875–3896.
237. Keen B.A., Jozwiakowski S.K., Bailey L.J., Bianchi J., Doherty A.J. // *Nucleic Acids Res.* 2014. V. 42. № 9. P. 5830–5845.
238. Zafar M.K., Ketkar A., Lodeiro M.F., Cameron C.E., Eoff R.L. // *Biochemistry*. 2014. V. 53. № 41. P. 6584–6594.
239. Kobayashi K., Guillian T.A., Tsuda M., Yamamoto J., Bailey L.J., Iwai S., Takeda S., Doherty A.J., Hirota K. // *Cell Cycle*. 2016. V. 15. № 15. P. 1997–2008.
240. Guillian T.A., Jozwiakowski S.K., Ehlinger A., Barnes R.P., Rudd S.G., Bailey L.J., Skehel J.M., Eckert K.A., Chazin W.J., Doherty A.J. // *Nucleic Acids Res.* 2015. V. 43. № 2. P. 1056–1068.
241. Guillian T.A., Bailey L.J., Brissett N.C., Doherty A.J. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. № 7. P. 3317–3329.
242. Stojković G., Makarova A.V., Wanrooij P.H., Forslund J., Burgers P.M., Wanrooij S. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. 28942.
243. Köberle B., Koch B., Fischer B.M., Hartwig A. // *Arch. Toxicol.* 2016. V. 90. № 10. P. 2369–2388.
244. Markkanen E., Meyer U., Dianov G.L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2016. V. 17. № 6. E856.
245. Lange S.S., Takata K., Wodd R.D. // *Nat. Rev. Cancer*. 2011. V. 11. № 2. P. 96–110.
246. Korzhnev D.M., Hadden M.K. // *J. Med. Chem.* 2016. Epub ahead of print.

УДК 577.27

# Противоопухолевые вакцины на основе дендритных клеток: от экспериментов на животных моделях до клинических испытаний

О. В. Марков\*, Н. Л. Миронова†, В. В. Власов, М. А. Зенкова

Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

E-mail: \*markov\_oleg@list.ru; †mironova@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 01.12.2016

Принята к печати 07.06.2017

**РЕФЕРАТ** Стандартные методы терапии опухолевых заболеваний обладают рядом недостатков, главные из которых неспецифичность и тяжелые побочные эффекты. Кроме того, опухолевые заболевания сопряжены с подавлением иммунной системы, что может быть причиной неэффективности стандартных методов лечения. Поэтому актуальной представляется разработка иммунотерапевтических подходов, обладающих специфическим противоопухолевым действием и приводящих к активации иммунной системы. Среди множества методов выделяются вакцины на основе дендритных клеток (ДК), нагруженных опухолевыми антигенами *ex vivo*, способные индуцировать противоопухолевый ответ цитотоксических Т-клеток. В настоящем обзоре рассмотрены подходы к приготовлению ДК-вакцин, а также результаты изучения противоопухолевой активности ДК-вакцин на мышинных моделях *in vivo* и в клинических испытаниях.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** дендритные клетки, доставка опухолевых антигенов, клинические испытания, мышинные модели опухолевых заболеваний, противоопухолевые вакцины.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АГ – антиген; АПК – антигенпредставляющие клетки; ГМ-КСФ – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; ДК – дендритные клетки; ИЛ – интерлейкин; ИФН – интерферон; НК – нуклеиновая кислота; ОАГ – опухолеассоциированные/опухолеспецифические антигены; ПКФ – простатическая кислая фосфатаза; Трег – регуляторные Т-клетки; УФ – ультрафиолет; ФНО – фактор некроза опухоли; ЦИК – цитокин-индуцированные киллерные клетки; ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты; ЦФ – циклофосфамид; ДГН – реакция гиперчувствительности (IV) типа; HLA – человеческий лейкоцитарный антиген; KLH – гемоцианин моллюска *Fissurella apertura*; OVA – овальбумин; SVV – сурвивин; TLR – толл-подобный рецептор; ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты.

## ВВЕДЕНИЕ

Дендритные клетки (ДК) – профессиональные антигенпредставляющие клетки, главной функцией которых являются захват антигенов, процессинг и представление их наивным Т-лимфоцитам для активации иммунного ответа против захваченного антигена. Уникальная способность ДК активировать CD4<sup>+</sup> Т-хелперные клетки и CD8<sup>+</sup> цитотоксические Т-лимфоциты (ЦТЛ) и определять таким образом направленность иммунных реакций привлекает все большее внимание при создании противоопухолевых вакцин, способных специфически действовать на определенные типы опухолей. Обнаружение опухолевых антигенов (ОАГ), т.е. белков, сверхэкспрессия которых специфична для определенных типов опухолей, стало толчком к их использованию для на-

грузки ДК. Сейчас известны ОАГ таких типов опухолей, как меланома (gp100, Melan-A/Mart-1, тирозиназа, MAGE-1 [1, 2]), рак предстательной железы (PSA [3], PSCA [4]) и др.

В настоящее время противоопухолевые ДК-вакцины активно изучают на мышинных моделях *in vivo* и в клинических испытаниях. В 2010 году Управлением по контролю качества пищевых продуктов и медикаментов США (FDA) была одобрена первая и пока единственная в мире терапевтическая клеточная вакцина Sipuleucel-T против устойчивого к кастрации метастатического рака предстательной железы на основе ДК, нагруженных рекомбинантным гибридным белком, состоящим из простатической кислой фосфатазы (ПКФ) и гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора

(ГМ-КСФ) [5]. Таким образом, существуют все основания для появления в ближайшем будущем высокоэффективных противоопухолевых иммунотерапевтических подходов, основанных на применении модифицированных дендритных клеток.

В настоящем обзоре стратегии применения ДК, активированных под действием разных ОАГ, рассмотрены на мышинных моделях опухолевых заболеваний *in vivo* и в клинических исследованиях.

### ПРИГОТОВЛЕНИЕ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ДК-ВАКЦИН

Можно выделить четыре главные группы подходов к терапии опухолей с использованием ДК: (1) инъекции ДК, нагруженных опухолевыми антигенами *ex vivo*; (2) системное введение опухолевых антигенов для нагрузки ДК *in vivo*; (3) инъекции немодифицированных зрелых ДК; (4) инъекции экзосом ДК. В настоящем обзоре мы остановимся на классических ДК-вакцинах, приготовленных путем нагрузки ДК опухолевыми антигенами *ex vivo*.

В качестве источников предшественников ДК (преДК) при приготовлении ДК-вакцин обычно используют клетки костного мозга (в работах с мышинными моделями) и моноциты периферической крови (в клинических исследованиях). Стандартный способ приготовления ДК-вакцин представляет собой инкубацию преДК в присутствии цитокинов ГМ-КСФ и ИЛ-4 в течение 6–8 дней, нагрузку незрелых ДК опухолевыми антигенами с последующей активацией созревания ДК с помощью воспалительных цитокинов (ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИФН- $\gamma$  и др.) или ксеногенных факторов – ЛПС (бактериального липополисахарида), ОК432 (*Streptococcus pyogenes* низкой вирулентности), КЛН (гемоцианина моллюска *Fissurella apertura*) и др.

На эффективность противоопухолевого иммунного ответа, активируемого модифицированными ДК, большое влияние оказывают ОАГ, которыми нагружают незрелые ДК. В качестве источников ОАГ используют: лизаты опухолей [6–9], синтетические опухолеспецифические пептиды [10–13], опухолевые белки [14], апоптотические опухолевые клетки [15], нуклеиновые кислоты (ДНК [16], мРНК [17], суммарную опухолевую РНК [18, 19]) и вирусные векторы [15, 20], кодирующие ОАГ, а также иммуностимулирующие молекулы (ИЛ-12 [21, 22]), факторы пролиферации (ГМ-КСФ [23]) и хемотаксические сигналы (лимфотактин [24]).

Незрелые ДК способны захватывать опухолевые антигены с помощью множества механизмов, таких, как фагоцитоз, макропиноцитоз, рецепторопосредованный эндоцитоз и др., поэтому доставку опухолевых антигенов белковой природы (белки, пептиды

и лизаты) или апоптотических опухолевых клеток в ДК осуществляют путем пассивного добавления ОАГ к незрелым ДК.

В случае доставки в ДК нуклеиновых кислот (НК), кодирующих ОАГ, приходится использовать более сложные подходы. НК представляют собой гидрофильные полианионные молекулы, которые, во-первых, со слабой эффективностью электростатически взаимодействуют с отрицательно заряженной плазматической мембраной клетки, во-вторых, не способны проникать внутрь клетки через гидрофобный липидный бислой клеточной мембраны. Более того, в биологических жидкостях незащищенные НК быстро разрушаются нуклеазами. Также известно, что свободные мРНК способны взаимодействовать с толл-подобными рецепторами (TLR3, TLR7, TLR8), что приводит зачастую к нежелательной активации иммунной системы [25]. Поэтому для доставки НК в ДК используют физические методы (электропорация [16, 26–28], сонопорация [29, 30]); вирусные системы (аденовирусы, аденоассоциированные вирусы, ретровирусы, лентивирусы, вирус осповакцины и др.) [31–38]; невирусные системы (поликатионные полимеры [31, 39–41], катионные липосомы [28, 42–45]).

### ПРИМЕНЕНИЕ ДК, НАГРУЖЕННЫХ ОАГ, В ТЕРАПИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ НОВООБРАЗОВАНИЙ

В табл. 1 и 2 представлены результаты изучения противоопухолевых ДК-вакцин на мышинных моделях (работы 2010–2015 гг.) и в клинических испытаниях (работы 2005–2015 гг.). При отборе исследований учитывали разнообразие заболеваний, подвергавшихся лечению ДК-вакцинами, а также источники ОАГ для нагрузки ДК. Следует отметить высокое разнообразие источников ОАГ, используемых для нагрузки ДК, в работах с мышинными моделями опухолевых заболеваний, начиная от классических опухолевых пептидов и лизатов и заканчивая производными нейраминовой кислоты и живыми опухолевыми клетками. В клинических испытаниях в качестве основных источников ОАГ для нагрузки ДК использовали, прежде всего, АГ белковой природы – лизаты опухолевых клеток, белки и пептиды. Использовали также разные способы введения вакцины (внутрикожные, внутривенные, в лимфатические узлы и т.д.) [46].

### ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДК-ВАКЦИН НА МЫШИНЫХ МОДЕЛЯХ *in vivo*

Нами рассмотрены результаты 15 исследований ДК-вакцин, выполненных с 2010 по 2015 год на мышинных моделях. Среди них восемь посвящены терапевтическим ДК-вакцинам, в которых ДК вводили

Таблица 1. Эффективность ДК-вакцин на мышинных моделях опухолей *in vivo*

Тип опухоли	Тип АГ	Схема лечения*	Результат	Ссылка
Рак толстого кишечника	Пептид АН1 (фрагмент gp70); желперный белок овальбумин (OVA)	п/к, $5 \times 10^5$ клеток/мышь; 2 раза с интервалом 7 сут	↓ размеров опухоли СТ26; ↑ пролиферации ЦТЛ; ↑ продолжительности жизни животных	[47]
	Аденовирусные векторы, кодирующие СЕА и SVV; гибридный белок CAR-TAT	п/к, $1 \times 10^6$ клеток/мышь; 2–3 раза с интервалом 7 сут	Для ДК, экспрессировавших одновременно СЕА и SVV: ↑ реактивности спленоцитов против МС38/СЕА2 <i>in vitro</i> ; ↓ роста опухоли, более эффективное в присутствии CAR-TAT	[48]
Гепатоцеллюлярная карцинома	Аденовирусный вектор, кодирующий FAT10; ФНО-α	Профилактическая: п/к, $1 \times 10^6$ кл/мышь; 3 раза спустя 3 сут после п/к введения Нер3G клеток	↑ цитотоксичности ЦТЛ против Нер3G; ↓ размеров опухоли Нер3G; ↑ продолжительности жизни животных	[49]
	Гибридный белок Ca9-AbOmpA, или лизат клеток RENCA-Ca9	п/к, $1 \times 10^6$ клеток/мышь; 3 раза с интервалом 7 сут	↓ роста опухоли в 1.5–3 раза ↑ секреции ИЛ-2, ИФН-γ и ФНО-α Т-клетками <i>in vitro</i> ; ↑ реактивности спленоцитов против RENCA-Ca9	[50]
Лимфома Дальтона	Лизат клеток лимфомы Дальтона; ИЛ-15; комбинация с кукурбитаценом I, ИЛ-15	в/б, $1 \times 10^6$ клеток/мышь; 6 раз с интервалом 4 сут в/б, 10 инъекций (1 мг/кг) кукурбитаценом I с интервалом 1 сут в течение 19 сут в/в, 5 инъекций ИЛ-15 (8 мкг/кг) с 25 по 33 сут	Группа ДК/лизат/ИЛ-15 + кукурбитаценом I: ↑ выживаемости животных (51 сут), контроль – 22 сут; нет полного выздоровления. Группа ДК/лизат/ИЛ-15 + кукурбитаценом I + ИЛ-15: ↑ выживаемости животных, 70% живых животных к 60-му дню, полное излечение от опухоли. Аккумуляция CD4 <sup>+</sup> и CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоцитов в метастазах	[51]
Лимфома EL4	Лизат клеток EL4; полисахарид G1-4A <i>Tinospora cordifolia</i>	Профилактическая: п/к, $5 \times 10^5$ клеток/мышь; 3 раза с интервалом 7 сут; терапевтическая: п/к, $5 \times 10^5$ клеток/мышь; на 3, 7 и 10 дни развития опухоли	↓ размера опухоли в 2.2–3.8 раза в профилактической схеме; ↓ размера опухоли в 2.1–2.6 раза в терапевтической схеме	[52]
Лейкоз FBL3, меланома B16F10 (модифицированные, экспрессируют N-фенилацетил-D-нейраминную кислоту)	GM3NPhAc-KLH; комбинация с ManNPhAc	Профилактическая: п/к, $1 \times 10^6$ клеток/мышь; 3 раза с интервалом 7 сут; в/б ManNPhAc (50 мг/кг веса) 7 раз каждый день после трансплантации опухоли	↑ цитотоксичности ЦТЛ против модифицированных клеток FBL3; ↓ размера опухоли FBL3 в 2.5 раза; ↑ продолжительности жизни животных; ↓ количества легочных метастазов B16F10 в 2 раза	[53]
Опухоль молочной железы 4T1	Лизат клеток 4T1, siRNK против IDO	в/в, $2 \times 10^6$ клеток/мышь; 3 раза с интервалом 7 сут	↓ размера опухоли в 2 раза; ↓ апоптоз CD4 <sup>+</sup> и CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоцитов; ↑ пролиферации ЦТЛ; ↓ количество Трег-клеток	[54]

Меланома B16	мРНК $\beta_2m$ -опухолевый пептид-TLR4 (электропора-ция)	Профилактическая: в/б, $2.5 \times 10^6$ клеток/мышь, 3 раза с интервалом 7 сут; терапевтическая: в/б, $2.5 \times 10^6$ клеток/мышь, 3 раза с интервалом 7 сут	Созревание ДК. Активация ЦТЛ. Полная защита от развития опухоли в профилактической схеме. $\uparrow$ продолжительности жизни животных в терапевтической схеме	[55]
	Суммарный белок клеток меланомы (сонопорация)	Профилактическая: п/к, $1 \times 10^6$ клеток/мышь; 2 раза с интервалом 7 сут	$\downarrow$ количества легочных метастазов в 4 раза	[30]
	Живые клетки B16; ЛПС	Профилактическая: в/в, $5 \times 10^6$ клеток/мышь; 2 раза с интервалом 14 сут	Полное отсутствие опухоли B16; $\uparrow$ количества ЦТЛ	[56]
	Живые или апопто-тические клетки B16, пептиды gp100 <sup>25-33</sup> и TRP <sup>181-188</sup> , ЛПС и ИФН- $\gamma$	в/в, $5 \times 10^6$ клеток/мышь; 2 раза с интервалом 7 сут	$\downarrow$ количества легочных метастазов в 14.3 раза (ДК-живые клетки B16); $\downarrow$ количества легочных метастазов в 2–2.7 раза (ДК-пептиды и апопто-тические клетки B16)	[57]
Карцинома легких Льюис (LLC)	Аденовирусный вектор, кодирующий ливин $\alpha$ человека	Профилактическая: п/к, $5 \times 10^5$ клеток/мышь; 3 раза с интервалом 7 сут; терапевтическая: п/к, $5 \times 10^5$ клеток/мышь; 3 раза с интервалом 4 сут	$\uparrow$ цитотоксичности ЦТЛ; полная выживаемость животных в профилактической схеме; $\downarrow$ роста опухоли в 2 раза и $\uparrow$ выживаемости мышей в терапевтической схеме	[58]
	Лизат клеток LLC	в/б, $1 \times 10^5$ клеток/мышь; 2 раза с интервалом 7 сут	$\downarrow$ количества легочных метастазов в 2–7.5 раза	[59]
Плоскоклеточ-ный рак легких SCCVII	Апоптотические клетки SCCVII	п/к, $1 \times 10^6$ клеток/мышь; 2 раза с интервалом 7 сут	$\downarrow$ количества легочных метастазов в 3.9 раза; $\uparrow$ выживаемости мышей в 2.4 раза; $\uparrow$ цитотоксичности ЦТЛ	[60]

\* – Лечение по терапевтической схеме, если не указано другое.

мышам, носителям опухолей; четыре – профилактическим ДК-вакцинам, в которых ДК вводили животным до трансплантации опухоли, и три исследования – обоим типам ДК-вакцин. Противоопухолевый потенциал ДК изучали на мышинных моделях таких опухолей, как опухоли толстого кишечника [47, 48], гепатоцеллюлярная карцинома [49, 50], лимфомы Дальтона [51] и EL4 [52], лейкоз FBL3 [53], опухоли молочной железы 4T1 [54], меланома B16 [30, 55–57], карцинома легких Льюис [58, 59] и плоскоклеточный рак легкого SCCVII [60] (табл. 1). Практически во всех рассмотренных работах ДК получали инкубацией костномозговых предшественников ДК в присутствии цитокинов ГМ-КСФ и ИЛ-4. Как терапевтические, так и профилактические ДК-вакцины животным обычно вводили 2–3 раза с интервалом в 7 дней преимущественно с помощью подкожных инъ-

екций, реже применяли внутривенные или внутривенные инъекции.

В качестве источника ОАГ для нагрузки ДК чаще всего использовали антигены белковой природы, прежде всего лизат и суммарный белок опухолевых клеток. Используемые вакцины можно разделить на: (1) ДК-вакцины без дополнительных стимулов (меланома B16 [30], карцинома легких Льюис [59]); (2) ДК-вакцины, дополнительно обработанные siРНК против иммуносупрессорного фермента индоламин-2,3-диоксигеназы (опухоль молочной железы 4T1 [54]) или полисахаридным иммуностимулятором растительного происхождения (лимфома EL4 [52]); (3) ДК-вакцины, комбинированные с инъекциями кукурбитацина I, селективного ингибитора STAT3 опухолевых клеток (лимфома Дальтона [51]). Кроме того, на модели рака толстого кишечника в качестве

источника ОАГ использовали опухолевый пептид АН1 (фрагмент gp70) в сочетании с хелперным белком неопухолевой природы (овальбумин), основная функция которого заключалась в увеличении стабильности и эффективности презентации антигенов ДК Т-лимфоцитам [47]. В случае модели гепатоцеллюлярной карциномы для нагрузки ДК использовали гибридный белок, представляющий собой карбоангидразу 9, соединенную с мембранным белком бактерии *Acinetobacter baumannii* [50].

Еще один достаточно распространенный источник ОАГ для нагрузки ДК – апоптотические опухолевые клетки, использовали в модели плоскоклеточного рака легкого SCCVII [60].

ДК модифицировали также генетическими конструкциями, а именно аденовирусными векторами, кодирующими ОАГ (рак толстого кишечника [48], гепатоцеллюлярная карцинома [49], карцинома легких Льюис [58]), или мРНК, кодирующей гибридный полипептид  $\beta_2m$ -опухолевый пептид-TLR4, содержащий ОАГ, соединенный с компонентами как МНС I, так и толл-подобного рецептора TLR4 (меланомы B16 [55]).

Новыми источниками ОАГ, применявшимися для активации ДК, стали N-фенилацетил-D-нейрамина кислота – искусственно синтезированное производное нейрамина кислоты (модели лейкоза FBL3 и меланомы B16 [53]), а также живые опухолевые клетки (модель меланомы B16 [56, 57]).

Все рассмотренные ДК-вакцины обладали значительной эффективностью и приводили к снижению размеров опухоли в 1.5–3 раза относительно контроля [47–50, 52–54, 58], причем введение ДК-вакцин, нагруженных опухолевым лизатом, в комбинации с инъекциями кукурбитацина I приводило к полному исчезновению лимфомы Дальтона [51]. Кроме того, наблюдалась полная защита животных от развития меланомы B16 после введения профилактических ДК-вакцин, трансфицированных мРНК, кодирующей полипептид  $\beta_2m$ -опухолевый пептид-TLR4 [55], или приготовленных с использованием живых клеток меланомы B16 в качестве источника ОАГ [56]. Противоопухолевые ДК-вакцины значительно снижали количество метастазов у мышей [30, 53, 57, 59, 60], существенно увеличивали продолжительность жизни животных-опухоленосителей [47, 49, 51, 53, 55, 58, 60], а также индуцировали развитие сильного противоопухолевого ответа цитотоксических Т-клеток [47–50, 53–56, 58, 60].

Таким образом, полученные на мышинных моделях опухолевых заболеваний многообещающие результаты как терапевтического, так и профилактического применения ДК-вакцин указывают на их высокую перспективность и позволяют надеяться

на появление эффективных противоопухолевых ДК-вакцин.

### ЭФФЕКТИВНОСТЬ ДК-ВАКЦИН В КЛИНИЧЕСКИХ ИСПЫТАНИЯХ

Многообещающие результаты, полученные на мышинных моделях *in vivo*, побудили исследователей еще в конце 90-х годов прошлого века перейти к клиническим испытаниям противоопухолевых ДК-вакцин. В клинических испытаниях, проводимых в течение почти 20 лет, задокументирована безопасность противоопухолевой иммунотерапии с помощью ДК. Вакцинация ДК хорошо переносится организмом [61], вызывает слабые побочные эффекты, такие, как локальные воспалительные реакции в местах инъекций и лимфатических узлах [62, 63], иногда наблюдаются проявления, сходные с симптомами гриппа [63, 64]. Тем не менее, несмотря на свою безопасность и перспективность, иммуновакцинация онкологических больных ДК-вакцинами в большинстве случаев оказалась менее эффективной, чем в экспериментах на мышинных моделях. Это может быть связано с различными причинами, в том числе с тем, что в большинстве исследований ДК-вакцинацию применяют у пациентов с последними стадиями заболеваний, имеющими крайне агрессивные опухоли, не отвечающие на стандартную терапию, а также с более сильной иммуносупрессорной активностью опухолей человека. Несмотря на отсутствие большого количества впечатляющих клинических результатов, дальнейшая разработка противоопухолевых ДК-вакцин не прекращается: углубляется понимание функционирования ДК, испытываются новые источники опухолевых антигенов и иммуностимулирующие агенты для нагрузки и активации ДК, оцениваются возможности комбинации ДК-вакцин с другими подходами.

Мы попытались оценить разнообразие и клиническую эффективность ДК-вакцин в случае опухолей различного происхождения. С этой целью проанализированы результаты 20 работ, выполненных за период с 2005 по 2015 год, в большинстве из которых ДК-вакцины проходили фазы I и II клинических исследований (табл. 2). Эти исследования проводили на заболеваниях различных нозологических форм, в них использовали различные опухолевые антигены, нагружаемые в ДК, а также схемы лечения и комбинации ДК-вакцин с другими терапевтическими подходами.

Три ДК-вакцины прошли фазу III исследований, причем одна из них, Sipuleucel-T, применявшаяся при кастрационно-резистентном раке предстательной железы, была впоследствии одобрена FDA под коммерческим названием Provenge® [5].

Противоопухолевый потенциал ДК-вакцин оценивали на пациентах с опухолями органов пищеварения (печень, поджелудочная железа и толстая кишка), головного мозга (глиобластома), крови (миелолейкоз, лимфоцитарный лейкоз, лимфома), костной ткани (остеосаркома), репродуктивных органов (яичники, предстательная железа), кожи (меланома) и легких (немелкоклеточный рак) как после хирургического удаления опухолей и прохождения стандартных курсов химио- или радиотерапии, так и не получавших предварительного лечения (табл. 2). Результативность ДК-вакцин оценивали по двум критериям – иммунологическому и клиническому. Основными иммунологическими характеристиками, измеряемыми в клинических исследованиях ДК-вакцин, были реакция иммунной системы на ОАГ (реакция гиперчувствительности типа IV на опухолевые антигены (ДТН-реакция)), присутствие комплексов HLA с опухолевыми антигенами на поверхности ДК, экспрессия перфорина/гранзима CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитами, активность цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов против опухолевых клеток, уровень синтеза ИФН- $\gamma$  Т-лимфоцитами, количество регуляторных Т-клеток в крови и опухолевых клеток в костном мозге, концентрация опухолевых маркеров (PSA, CEA) в сыворотке крови и т.д. (табл. 2). Клинический ответ на иммунотерапию ДК-вакцинами оценивали по выживаемости пациентов, наличию ремиссии/рецидивов заболевания, причем признаком прогрессии заболевания считали увеличение размеров опухоли на 20%, стабильного состояния – отсутствие видимых изменений размера опухоли, частичного ответа, или частичной ремиссии – снижение размеров опухоли на 30%, полного ответа, или полной ремиссии – исчезновение опухоли (табл. 2).

В большинстве рассмотренных нами работ ДК получали из мононуклеарных клеток периферической крови, которые культивировали в присутствии цитокинов ГМ-КСФ и ИЛ-4. В одном случае для приготовления ДК-вакцины использовали ГМ-КСФ и ИЛ-13 [79]. В качестве противоопухолевых вакцин, прошедших фазу III испытаний, использовали неклассические ДК-вакцины: ДК, выделенные из легочных лимфоузлов, применяли при немелкоклеточном раке легкого [81]; вакцину Sipuleucel-T, представляющую собой клеточный препарат, выделенный из лейкоцитарного материала, в состав которого входили, в том числе ДК, применяли при раке предстательной железы [5, 83].

В качестве источников ОАГ для нагрузки ДК чаще всего использовали антигены белковой природы – пептиды, синтетические белки, а также лизаты опухолевых клеток (в 15 работах из 20). Пептидные

ОАГ применяли как в виде одиночного антигена (WT-1 или MUC1 при опухолях поджелудочной железы [65, 66]), так и смеси антигенов (MAGE1, TRP-2, gp100, HER-2, ИЛ-13R $\alpha$ 2 при глиобластомах [67]; gp100, тирозиназу, MAGE-A1,-A2,-A3, MART-1 при меланоме [79]; Тах-пептиды вируса HTLV-1 при Т-клеточном лейкозе и лимфоме [72]; а также фрагменты hTERT, Her2/neu и PADRE при раке яичников [75]). Также для нагрузки ДК использовали мРНК, которые кодировали один антиген (CEA при раке толстого кишечника [68]) или набор антигенов (MAGE-A1,-A3,-C2, тирозиназа, MelanA/MART-1 и gp100 при меланоме [77]). При гепатоцеллюлярной карциноме ДК нагружали химерными белками, содержащими такие ОАГ, как  $\alpha$ -фетопротеин, глипикан-3 и MAGE-3, каждый из которых был соединен с пептидом цитоплазматической трансдукции [69]. Другой гибридный белок, содержащий PSA, соединенный с ГМ-КСФ, использовали для нагрузки вакцины Sipuleucel-T [5, 83]. Лизаты опухолевых клеток использовали для приготовления ДК-вакцин против остеосаркомы [74] и меланомы [76, 78, 80], причем чаще всего лизат готовили из аутологичных опухолевых клеток. ДК часто нагружали также апоптотическими опухолевыми клетками, например, в ДК-вакцинах против миелоидного [71] и лимфоцитарного лейкоза [73] и рака предстательной железы [82]. В ДК-вакцине против немелкоклеточного рака легкого ДК вообще не нагружали ОАГ, а использовали вместе с лимфоцитами после совместной инкубации в присутствии ИЛ-2 [81].

Как известно, введение в организм-опухолениватель незрелых ДК может вызвать развитие толерантности иммунной системы к опухолевым антигенам, что, в конечном итоге, приведет к еще большей опухолевой прогрессии [84]. Поэтому практически во всех клинических испытаниях ДК-вакцин большое внимание уделяется агентам, стимулирующим созревание ДК. С этой целью использовали как одиночные провоспалительные цитокины (ФНО- $\alpha$  или ИФН- $\gamma$ ), так и коктейли, содержащие набор провоспалительных цитокинов, простагландин E2, а также в некоторых случаях поли (I : C)-олигонуклеотиды, бактерии *S. pyogenes* низкой вирулентности (OK432), бактерии *Klebsiella pneumoniae* или гемоцианин *F. apertura* (KLH) (табл. 2).

Несмотря на разнообразие протоколов иммунотерапии опухолей с помощью ДК-вакцин, в них можно выявить и общие черты. ДК вводят в основном внутривенно или подкожно 3–4 раза с интервалом 7–14 сут. Объем дозы составляет в среднем 10<sup>6</sup>–10<sup>7</sup> ДК. В некоторых случаях ДК-вакцинация может сочетаться с химиотерапией (гемцитабин при опу-

Таблица 2. Иммуноterapia опухолей с помощью ДК в клинических испытаниях

Тип опухоли	Фаза	Кол-во пациентов	Тип АГ; стимул созревания	Схема лечения	Результат	Ссылка
Опухоль поджелудочной железы	I	10	Пептид WT-1. Комбинация с гемцитабином	День 1, 8, 15 – в/в, гемцитабин (1 г/м <sup>2</sup> ). День 8-й, 22-й – в/к, 1×10 <sup>7</sup> ДК. Три цикла	ДТН+ реакция (3/10). Положительный HLA/WT-1 тетрамерный тест (6/10). Положительный ИФН-γ ELISPOT (7/10). Отсутствие клинического ответа	[65]
Опухоль поджелудочной железы и желчных протоков	I/II	12	Пептид MUC-1; ФНО-α*, ИЛ-1β*, ИЛ-16*	в/к – п/к, 1×10 <sup>6</sup> кл, 3 раза с интервалом 21 сут и 1 раз через 6 мес. после последней вакцинации	↑ экспрессии перфорина и гранзима CD8 <sup>+</sup> Т-лимфоцитами; ↑ средней выживаемости до 26 мес. (8/12) и более 7 лет (4/12)	[66]
Глиобластома	I	21	Пептиды Mage1, TRP-2, gp-100, HER-2, ИЛ-13Rα2; ФНО-α*	в/к, 1×10 <sup>7</sup> кл, 3 раза с интервалом 14 сут	Медиана выживаемости 40.1 мес.; средняя выживаемость без прогрессии 16.9 мес.; средняя общая выживаемость 38.4 мес.; 24-месячная выживаемость без прогрессии 43.8%; 36-месячная общая выживаемость 55.6%	[67]
Рак толстого кишечника	I	16	мРНК СЕА (электропорация) (5/16) или САР-1, пептид (11/16); цитокиновый коктейль 1*	в/к – в/в, 5×10 <sup>6</sup> кл, 3 раза с интервалом 7 сут	СЕА-специфические Т-клетки (8/11, пептидная группа; 0/5, РНК-группа); ↑ уровня СЕА в крови (7/11, пептидная группа; 2/5, РНК-группа); средняя выживаемость без прогрессии 18 мес. (пептидная группа) и 26 мес. (РНК-группа)	[68]
Гепатоцеллюлярная карцинома	I/II	5	Гибридный белок (α-фетопротеин, глипикан-3, Mage-3, пептид цитоплазматической трансдукции); цитокиновый коктейль 2*	п/к, 4×10 <sup>7</sup> кл, 4 раза с интервалом 14 сут и 2 раза на 12 и 14 нед. с начала вакцинации	Опухольспецифический Т-клеточный ответ (5/5); стабильное заболевание (1/5)	[69]
Опухоль печени (III и IV стадии)	I	67	Опухолевый лизат аутологичных и аллогенных опухолевых клеток; ФНО-α. Комбинация с цитокин-индуцированными клетками (ЦИК)	ДК: внутрь лимфоузлов, >10 <sup>6</sup> кл на 10 и 12 дни. ЦИК: в/в, >1×10 <sup>10</sup> кл на 12 и 14 дни	Полное выздоровление (0/67); частичная ремиссия (5/67); стабильное заболевание (29/67). ДК-ЦИК подавляют пролиферацию клеток HerG2	[70]
Миелоидный лейкоз	I	4	Апоптотические лейкозные клетки; KLN, OK432*	в/к, 5 раз с интервалом 14 сут	Антилейкозный CD8 <sup>+</sup> Т-клеточный ответ (2/4); ↓ количества лейкозных клеток в костном мозге в 2.1 раза (1/4)	[71]
Т-клеточный лейкоз, лимфома	I	3	Тах-пептиды LLFGYPVYV или SFHSLHLLY; ФНО-α, KLN, OK432	п/к, 5×10 <sup>6</sup> кл, 3 раза с интервалом 14 сут	Тах-специфический ЦТЛ-ответ на 16–20 нед. (3/3); полная ремиссия (1/3); частичная ремиссия (1/3); стабильное заболевание (1/3)	[72]
Лимфоцитарный лейкоз	I	15	Аутологичные апоптотические В-клетки; ФНО-α*	ДК: в/к (1×10 <sup>7</sup> кл), 4 раза с интервалом 14 сут, 1 раз спустя 14 нед. после первой ДК-вакцины; ГМ-КСФ: 4 раза; после ДК-вакцины; ЦФ: за 2 сут до введения ДК. когорта 1: ДК когорта 2: ДК+ГМ-КСФ когорта 3: ДК+ГМ-КСФ +ЦФ	Антилейкозный CD8 <sup>+</sup> Т-клеточный ответ 1) 2/5; 2) 3/5; 3) 5/5	[73]
Остеосаркома	I	12	Лизат аутологичной опухоли; KLN; ПГЕ <sub>2</sub> *	в/к, 10 <sup>5</sup> –10 <sup>6</sup> кл, 3 раза с интервалом 7 сут. После ДК-терапии п/к инъекции ИЛ-2 6 раз с интервалом 1 сут	Противоопухолевый CD8 <sup>+</sup> Т-клеточный ответ (2/12). Отсутствие клинического ответа	[74]
Рак яичников	I/II	11	Пептиды hTERT 988Y, Her2/neu 369VV2V9, Her2/neu 689 и PADRE; <i>Klebsiella pneumoniae</i> *; ИФН-γ*	в/к, 3.5×10 <sup>7</sup> кл, 4 раза с интервалом 21 сут; ЦФ в/в	Рецидив заболевания в течение вакцинации (2/11); рецидив заболевания после вакцинации (3/11); отсутствие признаков заболевания в течение >36 мес. (6/11); 36-месячная общая выживаемость 90%	[75]

Меланома	I	8	Лизат аутологичной меланомы; ФНО- $\alpha$ . Комбинация с опухоль-инфильтрирующими лимфоцитами. Предварительная химиотерапия	ДК: в/к, 3 раза с интервалом 14 сут. Лимфоциты: в/в, 1–3 раза с интервалом 7 сут спустя 14 сут после последней ДК-вакцинации	Полная ремиссия (1/8). Стабильное заболевание в течение 2 и 10 мес. (2/8). Прогрессирующее заболевание (7/8)	[76]
	I	30	mPNC, кодирующая химерный белок, содержащий ОАГ (MAGE-A1, -A3, -C2, тирозиназу, MelanA/MART-1 и gp100) и HLA II-направляющие последовательности (электропорация); <i>Поли (I : C) или TriMix</i> . Комбинация с инъекциями ИФН- $\alpha$ -2b	в/к, $2.4 \times 10^7$ кл., 4–6 раз с интервалом 14 сут ИФН- $\alpha$ -2b п/к 3 раза в нед.	Иммунный ответ против меланома-ассоциированных антигенов (4/10). Полная ремиссия (10/30). Рецидив меланомы (20/30). Средняя выживаемость без рецидива 22 мес. Двухлетняя выживаемость 93%. Четырехлетняя выживаемость 70%	[77]
	I	20: 5 – III 15 – IV	Лизат аутологичной меланомы; ФНО- $\alpha^*$	в/к, $1-5 \times 10^6$ кл., 4 раза с интервалом 10 сут	$\uparrow$ продукции ИФН- $\gamma$ (10/20); $\uparrow$ цитотоксичности ЦТЛ (4/20); DTH <sup>+</sup> -реакция (11/20); $\uparrow$ времени опухолевой прогрессии в 4.1 раза (группа DTH <sup>+</sup> -реакция по сравнению с группой DTH <sup>-</sup> -реакцией); $\uparrow$ выживаемости в 2.9 раза (группа DTH <sup>+</sup> -реакция по сравнению с DTH <sup>-</sup> -реакцией)	[78]
	II	24	Пептиды gp100, тирозиназа, MAGE-A2, MAGE-A3, MART-1, MAGE-A1; <i>KLH</i>	п/к, $1-5 \times 10^7$ кл., 4 раза с интервалом 7 сут, далее 1 раз через 14 сут и 5 раз с интервалом 1 мес.	$\uparrow$ опухолеспецифических CD8 <sup>+</sup> Т-клеток (18/24); активация Th1-ответа (12/24); DTH <sup>+</sup> -реакция на ОАГ – 41% пациентов; DTH <sup>+</sup> -реакция на KLH – 64% пациентов; $\uparrow$ выживаемости пациентов в 1.9 раза; частичный ответ (1/24); стабильное заболевание (7/24); прогрессирующее заболевание (16/24)	[79]
		33	Лизаты клеток аллогенных линий меланомы M44, COLO829, SK-MEL28; ИФН- $\gamma^*$	Около лимфатических узлов, $2.5 \times 10^7$ кл., 6 раз с интервалом 14 сут, далее 2 раза с интервалом 42 сут	$\uparrow$ опухолеспецифических CD8 <sup>+</sup> Т-клеток в крови (26/33). Полная ремиссия (1/33), частичный ответ (2/33), стабильное заболевание (6/33)	[80]
Немелкоклеточный рак легкого	III	103	ДК ОАГ не нагружали. Вакцина – ДК и лимфоциты, из легочных лимфоузлов, инкубированные в присутствии ИЛ-2, с добавлением лимфоцитов периферической крови	Группа А: химиотерапия 4 мес. курса, ДК-вакцина через 1 нед. после каждого курса химиотерапии + 1 раз в мес. (в течение 6 мес.) + 1 раз в 2 мес. (в течение 14 мес.). Группа Б: химиотерапия 4 мес. курса	Двухлетняя общая выживаемость в группах А и Б – 93.4 и 66.0%; пятилетняя общая выживаемость в группах А и Б – 81.4 и 48.3%; 2- и 5-летняя выживаемость без рецидивов – 68.5 и 41.4% (группа А); 56.8 и 26.2% (группа Б).	[81]
Рак предстательной железы	I/II	25	Клетки LNCaP, обработанные УФ-излучением; <i>поли (I : C)</i> . Комбинация с химиотерапией	1. Циклофосфамид 7 сут. 2. ДК п/к, $10^7$ кл., 12 раз в течение 1-го года (2 раза с интервалом 2 нед.) 3. Доцетаксел через каждые 3 нед. до достижения токсичности. 4. ДК п/к, $10^7$ кл., 10 раз с интервалом 6 нед.	$\downarrow$ PSA на $\geq 50\%$ (8/23) $\downarrow$ PSA на 20–50% (5/23) $\downarrow$ Т-регуляторных клеток в крови. Индукция PSA-специфических ЦТЛ. Средняя выживаемость 19 мес.	[82]
	III	127	ПКФ-ГМ-КСФ, гибридный белок	в/в, $3.7 \times 10^9$ кл., 3 раза с интервалом 14 сут	Прогрессирующее заболевание (115/127); $\uparrow$ времени прогрессии заболевания в 1.2 раза; $\uparrow$ средней выживаемости в 1.2 раза	[83]
	III	512	ПКФ-ГМ-КСФ, гибридный белок	в/в, $3.7 \times 10^9$ кл., 3 раза с интервалом 14 сут	$\downarrow$ риска смерти на 22%; $\uparrow$ средней выживаемости в 1.2 раза; $\uparrow$ 36-месячной выживаемости в 1.4 раза; активация Th1-ответа	[5]

Примечания: \* – факторы созревания ДК; п/к – подкожно; в/б – внутривенно; в/в – внутривенно; в/к – внутрикожно; DTH-реакция – реакция гиперчувствительности замедленного (IV) типа; KLH – keyhole limpet hemocyanin, гемоцианин *Fissurella apertura*; ОК432 – смесь группы *A Streptococcus pyogenes* низкой вирулентности; цитокиновый коктейль 1 – ПГЕ<sub>2</sub>, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6; цитокиновый коктейль 2 – ПГЕ<sub>2</sub>, ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-6, ИФН- $\gamma$ , ОК432, поли (I : C); TriMix – mPNC, кодирующая CD40L, CD70 и конститутивно активный TLR4; ЦФ – циклофосфамид; стабильное заболевание – нет видимых изменений в размере опухоли; прогрессирующее заболевание – увеличение размеров опухоли на 20%; частичный ответ – снижение размеров опухоли на 30%; полный ответ – исчезновение опухоли.

холи поджелудочной железы [65]; циклофосфамид при лимфоцитарном лейкозе [73] и раке яичников [75], доцетаксел при раке предстательной железы [82]), с применением других иммунных клеток (цитокин-индуцированных киллерных клеток, т.е. Т-лимфоцитов и натуральных киллеров, активированных ИЛ-1, ИЛ-2, ИФН- $\gamma$  и анти-CD3-антителами при опухолях печени [70]; опухольинфильтрирующих лимфоцитов при меланоме [76]), а также с инъекциями цитокинов (ГМ-КСФ при лимфоцитарном лейкозе [73], ИЛ-2 при остеосаркоме [74], ИФН- $\alpha$ -2b при меланоме [77]).

Практически во всех рассмотренных нами работах показано, что введение ДК-вакцин приводит к активации противоопухолевого иммунного ответа: нарабатываются опухолеспецифические цитотоксические CD8<sup>+</sup> Т-лимфоциты, усиливается экспрессия перфорина и гранзима, а также продукция ИФН- $\gamma$ , у части пациентов развивается реакция гиперчувствительности на опухолевые антигены (ДТН-реакция), снижается количество регуляторных Т-клеток и т.д. Однако, несмотря на довольно значительный иммунологический ответ, клиническая результативность противоопухолевой терапии с помощью ДК является менее впечатляющей. Клинический ответ либо довольно слабый, либо отсутствует, что выражается в большом количестве рецидивов и прогрессии опухолей. Низкой эффективностью обладает даже Sipuleucel-T – единственная противоопухолевая ДК-вакцина, получившая одобрение FDA. Иммуноterapia с использованием этой вакцины не привела к ремиссии ни у одного пациента, в подавляющем большинстве случаев заболевание прогрессировало, хотя выживаемость пациентов увеличилась в 1.2 раза по сравнению с группой, получавшей плацебо [83]. Таким образом, можно сделать вывод, что активация опухолеспецифического иммунного ответа после ДК-вакцинации не всегда приводит к значимым клиническим результатам. Это можно объяснить, прежде всего, негативным действием опухоли на иммунную систему. Даже при условии, что противоопухолевые Т-лимфоциты будут надлежащим образом активированы ДК-вакцинами, иммуноterapia может потерпеть неудачу, поскольку опухоль способна уходить от иммунного надзора путем подавления функциональной активности иммунокомпетентных клеток, в том числе Т-лимфоцитов и ДК, используя различные механизмы [85].

На клиническую значимость ДК-вакцинации указывает ремиссия опухолей у ряда пациентов. Так, например, более чем у половины больных раком яичников (6/11) иммуноterapia ДК, нагруженными смесью опухолеспецифических пептидов (hTERT

988Y, Her2/neu 369VV2V9, Her2/neu 689 и PADRE), в комбинации с инъекциями циклофосфамида, привела к отсутствию признаков заболевания в течение 36 мес., 36-месячная выживаемость составила 90% [75]. Это один из самых высоких показателей клинической результативности ДК-вакцин в работах, рассмотренных в настоящем обзоре.

Большое количество ремиссий отмечено у пациентов с меланомой, получавших ДК-вакцины, нагруженные смесью мРНК, кодирующих ОАГ MAGE-A1, -A3, -C2, тирозиназу, MelanA/MART-1 и gp100, связанные с HLA II-направляющими последовательностями, в комбинации с инъекциями ИФН- $\alpha$ -2b [77]. За средний период наблюдения (6.4 года) полная ремиссия наблюдалась у 10 из 30 пациентов. Средняя безрецидивная выживаемость составила 22 мес. Средняя двух- и четырехлетняя выживаемость – 93 и 70% соответственно. Иммунный ответ против ассоциированных с меланомой антигенов наблюдался у четырех из 10 пациентов [77].

К полной или частичной ремиссии меланомы приводило также применение ДК-вакцин, в которых в качестве источника ОАГ для нагрузки ДК использовали лизаты как аутологичных клеток меланомы (1/8 пациентов) [76], так и аллогенных клеточных линий M44, COLO829, SK-MEL28 (полный ответ у 1 из 33, частичный – у 2 из 33 пациентов) [80]. Следует отметить, что меланомы довольно часто используются для клинического исследования противоопухолевой активности ДК и относительно лучше поддается иммунотерапии, чем другие типы опухолей.

Высокая эффективность ДК-вакцин отмечена также в пилотном клиническом исследовании ДК против Т-клеточного лейкоза и лимфомы, в котором принимали участие три пациента [72]. В качестве ДК-вакцин использовали ДК, нагруженные Тах-пептидами Т-лимфотропного вируса человека типа 1 (LLFGYPVYV и SFHSLHLLY), которые созревали под действием стандартного стимула – ФНО- $\alpha$  в комбинации с ксеногенными факторами KLN и OK432. После ДК-вакцинации у всех трех пациентов наблюдали значимые клинические ответы: полную ремиссию (1/3), частичную ремиссию (1/3) и стабилизацию заболевания (1/3). Эффективный клинический ответ был связан с развитием Тах-специфического ответа ЦТЛ у всех пациентов [72].

Выживаемость пациентов также является важным показателем эффективности противоопухолевой ДК-вакцинации. Следует отметить, что практически все клинические исследования показывают, что введение ДК-вакцин больным с опухолями различного типа приводит к увеличению их выживаемости и продолжительности жизни по сравнению с пациентами, не получавшими ДК-вакцины. Так, в рассмо-

тренных нами работах одно из самых значительных увеличений выживаемости достигнуто у пациентов с опухолями поджелудочной железы и желчных протоков, которым вводили ДК, нагруженные пептидом MUC-1 и стимулированными для созревания цитокинами ФНО- $\alpha$ , ИЛ-1 $\beta$ , ИЛ-16 – у четырех из 12 пациентов средняя выживаемость составила более 7 лет [66].

Более подробно остановимся на трех клинических исследованиях противоопухолевых ДК-вакцин, находившихся в фазе III испытаний. В первом исследовании вакцину на основе ДК и активированных киллерных Т-лимфоцитов в комбинации с химиотерапией применяли у пациентов с немелкоклеточным раком легкого [81] после хирургического удаления опухоли. В исследовании приняли участие 103 пациента, которых разделили на две группы: группа А получала иммунохимиотерапию, группа Б – только химиотерапию. Использовали вакцину на основе ДК и активированных киллерных Т-клеток, которые выделяли из содержимого лимфатических узлов, расположенных в местах локализации опухолей, и культивировали в присутствии ИЛ-2 с последующим добавлением лимфоцитов периферической крови. Двухлетняя общая выживаемость в группах А и Б составила 93.4 и 66.0% соответственно; пятилетняя – 81.4 и 48.3% соответственно. Двух- и пятилетняя выживаемость без рецидивов составила 68.5, 41.4 и 56.8, 26.2% в группах А и Б соответственно [81].

В двух других исследованиях оценивали ДК-вакцину Sipuleucel-T, которую применяли при кастрационно-резистентном раке предстательной железы. Однако результаты клинических испытаний Sipuleucel-T оказались менее впечатляющими по сравнению с другими противоопухолевыми ДК-вакцинами [83]. Sipuleucel-T представляет собой клеточный препарат из продуктов лейкофереза, в состав которого входят и ДК. Клетки нагружали гибридным белком, состоящим из полноразмерного ПКФ и полноразмерного человеческого ГМ-КСФ (ПКФ-ГМ-КСФ). В исследовании принимали участие пациенты с бессимптомным метастатическим гормонорефрактерным раком предстательной железы. На фоне применения такой вакцины у большинства пациентов наблюдали прогрессию заболевания. Тем не менее, Sipuleucel-T приводил к 1.2-кратному увеличению средней выживаемости (25.8 мес. против 21.7 мес. в группе плацебо), а также к развитию иммунологического ответа на ПКФ и Т-клеточного ответа типа Th1 [5, 83]. Вскоре после публикации этих результатов Sipuleucel-T был одобрен Управлением по контролю качества продуктов и лекарств США (FDA USA) для лечения пациентов

и коммерциализирован под названием Provenge® [86].

### **ЭФФЕКТИВНОСТЬ ПРОТИВООПУХОЛЕВЫХ ДЕНДРИТНО-КЛЕТОЧНЫХ ВАКЦИН: ВОПРОСЫ И ОТВЕТЫ**

Из рассмотренных нами работ видно, что большинство противоопухолевых ДК-вакцин, прошедших к настоящему времени клинические исследования, обладают ограниченной эффективностью. Некоторые исследователи полагают, что низкая эффективность ДК-вакцин может быть связана с тем, что их влияние на выживаемость пациентов становится заметным лишь спустя некоторое время после проведения лечения [5]. Однако главной причиной низкой эффективности ДК-вакцин, на наш взгляд, является сильное иммуносупрессорное действие опухоли, которое реализуется с помощью множества механизмов. Например, опухоль и ее окружение способны ослаблять проникновение Т-лимфоцитов в места локализации опухоли, снижать активность гранзимы В и подавлять экспрессию рецептора смерти CD95 Т-лимфоцитами, а также индуцировать анергию активированных Т-лимфоцитов путем усиления экспрессии ингибиторных рецепторов CTLA-4 и PD-1, так называемых иммунологических чекпойнтов, на поверхности Т-лимфоцитов [87]. Иммуносупрессорное действие CTLA-4 заключается в конкуренции со стандартным участником иммунологического синапса CD28 за связывание с костимуляторными молекулами ДК CD80 (B7.1) и CD86 (B7.2) и передаче ингибиторного сигнала Т-лимфоцитам, что приводит к ослаблению ТКР/CD28 сигнального пути Т-лимфоцитов, снижению продукции ИЛ-2 Т-клетками и, в конечном итоге, к задержке клеточного цикла [87, 88]. Рецептор PD-1 взаимодействует с молекулами B7-H1, которые экспрессируются на поверхности опухолевых клеток, что также приводит к нарушению ТКР/CD28 сигнального пути Т-лимфоцитов, индукции синтеза противовоспалительного цитокина ИЛ-10 и, в конце концов, к активации иммуносупрессорных Трег и апоптозу опухолеспецифических Т-лимфоцитов [87, 89].

Для усиления эффективности ДК-вакцин разумно использовать дополнительные методы, направленные на снижение ингибирующего действия опухоли. Так, например, блокаторы CTLA-4, PD-1 и B7-H1 в комбинации с противоопухолевыми ДК-вакцинами позволяют снизить иммуносупрессорное действие опухоли, что может привести к значительному увеличению противоопухолевой активности ДК-вакцин. На сегодняшний день известны такие блокаторы иммунологических чекпойнтов, как Ipilimumab [90] для CTLA-4, Nivolumab [91] и Pembrolizumab

[92] для PD-1. Эти моноклональные антитела были не так давно одобрены FDA для иммунотерапии метастатической меланомы [93, 94]. Блокаторы B7-H1 в настоящее время проходят клинические испытания, но еще не получили разрешения на клиническое использование [95]. На сегодняшний день опубликована только одна работа, в которой противоопухолевые ДК-вакцины применяли в сочетании с блокаторами иммунологических чекпойнтов. В этом клиническом исследовании фазы II пациенты с меланомой получали комбинацию Ipilimumab с ДК-вакцинами, нагруженными TriMix РНК и мРНК, кодирующими антигены, ассоциированные с меланомой. Были получены многообещающие результаты – после прохождения курса терапии полную ремиссию наблюдали у восьми из 39 пациентов и частичный ответ – у семи [96]. Несомненно, что клинические исследования противоопухолевых ДК-вакцин в сочетании с блокаторами иммунологических чекпойнтов не заставят себя долго ждать.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Несмотря на разнообразные механизмы, которые опухоль использует для уклонения от иммунного ответа, удалось получить многообещающие результаты иммунотерапии рака с помощью модифицированных ДК. На мышинных моделях наблюдали уменьшение скорости роста опухоли, сокращение количества метастазов, увеличение выживаемости животных-опухоленосителей, запуск опухолеспецифического от-

вета ЦТЛ [50, 54, 57, 97, 98]. Результаты клинических испытаний противоопухолевых ДК-вакцин также были достаточно неплохими, однако менее впечатляющими по сравнению с полученными на мышинных моделях *in vivo*. Возможно, это связано с тем, что в большинстве случаев клинические испытания проводятся на больных, находящихся на терминальных стадиях заболевания, когда любое лечение малоэффективно. Кроме того, низкая эффективность ДК-вакцин может быть связана с более выраженным подавлением иммунной системы человека опухолью.

Остались нерешенными проблемы поиска наиболее иммуногенного источника ОАГ, недостаточной специфичности и эффективности доставки ОАГ в ДК, что может сказываться на презентации процессированных ОАГ в комплексах с молекулами МНС I/II на поверхности ДК и слабой поляризации противоопухолевых иммунных ответов. Поэтому дальнейшая разработка противоопухолевых вакцин на основе ДК, способных преодолевать негативное действие опухоли и ее окружения и инициировать эффективный противоопухолевый иммунный ответ, остается важной задачей. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке  
ФЦНТП «Исследования и разработки  
по приоритетным направлениям развития  
научно-технологического комплекса России  
на 2014–2020 годы» (соглашение № 14.607.21.0043,  
уникальный идентификатор RFMEFI60714X0043).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Slingluff C.L.Jr., Petroni G.R., Yamshchikov G.V., Hibbitts S., Grosh W.W., Chianese-Bullock K.A., Bissonette E.A., Barnd D.L., Deacon D.H., Patterson J.W., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2004. V. 22. P. 4474–4485.
2. Terheyden P., Schrama D., Pedersen L.O., Andersen M.H., Kampgen E., Straten P., Becker J.C. // *Scand. J. Immunol.* 2003. V. 58. P. 566–571.
3. Rožková D., Tišerová H., Fučíková J., Lašt'ovička J., Podrazil M., Ulčová H., Budínský V., Prausová J., Linke Z., Minárik I., et al. // *Clin. Immunol.* 2009. V. 131. P. 1–10.
4. Koh Y.T., Gray A., Higgins S.A., Hubby B., Kast W.M. // *Prostate.* 2009. V. 69. P. 571–584.
5. Kantoff P.W., Higano C.S., Shore N.D., Berger E.R., Small E.J., Penson D.F., Redfern C.H., Ferrari A.C., Dreicer R., Sims R.B., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2010. V. 363. P. 411–422.
6. Nestle F.O., Aligagic S., Gilliet M., Sun Y., Grabbe S., Dummer R., Burg G., Schadendorf D. // *Nat. Med.* 1998. V. 4. P. 328–332.
7. Fields R.C., Shimizu K., Mule J. // *J. Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1998. V. 95. P. 9482–9487.
8. Geiger J., Hutchinson R., Hohenkirk L., McKenna E., Chang A., Mule J. // *Lancet.* 2000. V. 356. P. 1163–1165.
9. Geiger J.D., Hutchinson R.J., Hohenkirk L.F., McKenna E.A., Yanik G.A., Levine J.E., Chang A.E., Braun T.M., Mule J.J. // *Cancer Res.* 2001. V. 61. P. 8513–8519.
10. Celluzzi C.M., Mayordomo J.I., Storkus W.J., Lotze M.T., Falo L.D. // *J. Exp. Med.* 1996. V. 183. P. 283–287.
11. Miconnet I., Coste I., Beermann F., Haeuw J.F., Cerottini J.C., Bonnefoy J.Y., Romero P., Renno T. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. P. 4612–4619.
12. Wang H.Y., Fu T., Wang G., Zeng G., Perry-Laller D.M., Yang J.C., Restifo N.P., Hwu P., Wang R.F. // *J. Clin. Invest.* 2002. V. 109. P. 1463–1470.
13. van Gisbergen K., Aarnoudse C., Meijer G., Geijtenbeek T., van Kooyk Y. // *Cancer Res.* 2005. V. 65. P. 5935–5944.
14. Curti A., Tosi P., Comoli P., Terragna C., Ferri E., Cellini C., Massaia M., D'Addio A., Giudice V., Di Bello C., et al. // *Br. J. Haematol.* 2007. V. 139. P. 415–424.
15. Jarnjak-Jankovic S., Pettersen R.D., Saeboe-Larssen S., Weisenberg F., Olafsen M.R., Gaudernack G. // *Cancer Gene Ther.* 2005. V. 12. P. 699–707.
16. van Tandeloo V., Ponsaerts P., Lardon F., Nijis G., Lenjou M., van Broeckhoven C., van Bockstaele D.R., Berneman Z.N. // *Blood.* 2001. V. 98. P. 49–56.
17. Suso E.M., Dueland S., Rasmussen A.M., Vetrhus T., Aamdal S., Kvalheim G., Gaudernack G. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2011. V. 60. P. 809–818.
18. Boczkowski D., Nair S.K., Nam J.H., Lysterly H.K., Gilboa E. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. P. 1028–1034.
19. Heiser A., Maurice M.A., Yancey D.R., Wu N.Z., Dahm P.,

- Pruitt S.K., Boczkowski D., Nair S.K., Ballo M.S., Gilboa E., et al. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. P. 2953–2960.
20. Nair S.K., Boczkowski D., Morse M., Cumming R.I., Lyerly H.K., Gilboa E. // *Nat. Biotechnol.* 1998. V. 16. P. 364–369.
21. Nishioka Y., Hiraio M., Robbins P.D., Lotze M.T., Tahara H. // *Cancer Res.* 1999. V. 59. P. 4035–4041.
22. Rodriguez-Calvillo M., Duarte M., Tirapu I., Berraondo P., Mazzolini G., Qian C., Prieto J., Melero I. // *Exp. Hematol.* 2002. V. 30. P. 195–204.
23. Nakamura M., Iwahashi M., Nakamori M., Ueda K., Matsuura I., Noguchi K., Yamaue H. // *Clin. Cancer Res.* 2002. V. 8. P. 2742–2749.
24. Zhang W., He L., Yuan Z., Xie Z., Wang J., Hamada H., Cao X. // *Hum. Gene Ther.* 1999. V. 10. P. 1151–1161.
25. van Lint S., Renmans D., Broos K., Dewitte H., Lentacker I., Heirman C., Breckpot K., Thielemans K. // *Expert Rev. Vaccines.* 2015. V. 14. P. 235–251.
26. Vari F., Hart D.N. // *Cytotherapy.* 2004. V. 6. P. 111–121.
27. Aarntzen E.H., Schreiber G., Bol K., Lesterhuis W.J., Croockewit A.J., de Wilt J.H., van Rossum M.M., Blokx W.A., Jacobs J.F., Duiveman-de Boer T., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2012. V. 18. P. 5460–5470.
28. Ibraheem D., Elaissari A., Fessi H. // *Int. J. Pharm.* 2014. V. 459. P. 70–83.
29. De Temmerman M.L., Dewitte H., Vandenbroucke R.E., Lucas B., Libert C., Demeester J., De Smedt S.C., Lentacker I., Rejman J. // *Biomaterials.* 2011. V. 32. P. 9128–9135.
30. Oda Y., Suzuki R., Otake S., Nishiie N., Hirata K., Koshima R., Nomura T., Utoguchi N., Kudo N., Tachibana K., et al. // *J. Control. Release.* 2012. V. 160. P. 362–366.
31. Chen Y.Z., Yao X.L., Tabata Y., Nakagawa S., Gao J.Q. // *Clin. Dev. Immunol.* 2010. V. 2010. P. 565643.
32. Yang J., Liu H., Zhang X. // *Biotechnol. Adv.* 2014. V. 32. P. 804–817.
33. Reeves M.E., Royal R.E., Lam J.S., Rosenberg S.A., Hwu P. // *Cancer Res.* 1996. V. 56. P. 5672–5677.
34. Nikitina E.Y., Clark J.I., van Beynen J., Chada S., Virmani A.K., Carbone D.P., Gabrilovich D.I. // *Clin. Cancer Res.* 2011. V. 7. P. 127–135.
35. Streitz J., Tormo D., Schweichel D., Tuting T. // *Cancer Gene Ther.* 2006. V. 13. P. 318–325.
36. Murakami T., Tokunaga N., Waku T., Gomi S., Kagawa S., Tanaka N., Fujiwara T. // *Clin. Cancer Res.* 2004. V. 10. P. 3771–3880.
37. Antonia S.J., Mirza N., Fricke I., Chiappori A., Thompson P., Williams N., Bepler G., Simon G., Janssen W., Lee J.H., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2006. V. 12. P. 878–887.
38. Morse M.A., Clay T.M., Hobeika A.C., Osada T., Khan S., Chui S., Niedzwiecki D., Panicali D., Schlom J., Lyerly H.K. // *Clin. Cancer Res.* 2005. V. 11. P. 3017–3024.
39. Perche F., Benvegna T., Berchel M., Lebegue L., Pichon C., Jaffrès P.A., Midoux P. // *Nanomedicine.* 2011. V. 7. P. 445–453.
40. Moffatt S., Cristiano R.J. // *Int. J. Pharm.* 2006. V. 321. P. 143–154.
41. Tang R., Palumbo R.N., Nagarajan L., Krogstad E., Wang C. // *J. Control. Release.* 2010. V. 142. P. 229–237.
42. Maslov M.A., Kabilova T.O., Petukhov I.A., Morozova N.G., Serebrennikova G.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A. // *J. Control. Release.* 2012. V. 160. P. 182–193.
43. Markov O.V., Mironova N.L., Maslov M.A., Petukhov I.A., Morozova N.G., Vlassov V.V., Zenkova M.A. // *J. Control. Release.* 2012. V. 160. P. 200–210.
44. Markov O.V., Mironova N.L., Sennikov S.V., Vlassov V.V., Zenkova M.A. // *PLoS One.* 2015. V. 10. P. e0136911.
45. Markov O.V., Mironova N.L., Shmendel E.V., Serikov R.N., Morozova N.G., Maslov M.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A. // *J. Control. Release.* 2015. V. 213. P. 45–56.
46. Morrison B.J., Steel J.C., Gregory M., Morris J.C., Malyguine A.M. // *Dendritic Cells in Cancer / Eds Shurin M.R., Satler R.D.* New York: Springer Science & Business Media, 2009. P. 347–363.
47. Zarnani A.H., Torabi-Rahvar M., Bozorgmehr M., Zareie M., Mojtabavi N. // *Cancer Res. Treat.* 2015. V. 47. P. 518–526.
48. Kim H.S., Kim C.H., Park M.Y., Park J.S., Park H.M., Sohn H.J., Kim H.J., Kim S.G., Oh S.T., Kim T.G. // *Immunol. Lett.* 2010. V. 131. P. 73–80.
49. Yang Z., Wu D., Zhou D., Jiao F., Yang W., Huan Y. // *Cell. Immunol.* 2015. V. 293. P. 17–21.
50. Kim B.R., Yang E.K., Kim D.Y., Kim S.H., Moon D.C., Lee J.H., Kim H.J., Lee J.C. // *Clin. Exp. Immunol.* 2012. V. 167. P. 73–83.
51. Hira S.K., Mondal I., Manna P.P. // *Cytotherapy.* 2015. V. 17. P. 647–664.
52. Pandey V.K., Shankar B.S., Sanis K.B. // *Int. Immunopharmacol.* 2012. V. 14. P. 641–649.
53. Qiu L., Li J., Yu S., Wang Q., Li Y., Hu Z., Wu Q., Guo Z., Zhang J. // *Oncotarget.* 2015. V. 6. P. 5195–5203.
54. Zheng X., Koropatnick J., Chen D., Velenosi T., Ling H., Zhang X., Jiang N., Navarro B., Ichim T.E., Urquhart B., et al. // *Int. J. Cancer.* 2013. V. 132. P. 967–977.
55. Cafri G., Sharbi-Yunger A., Tzehoval E., Alteber Z., Gross T., Vadai E., Margalit A., Gross G., Eisenbach L. // *Mol. Ther.* 2015. V. 23. P. 1391–1400.
56. Matheoud D., Perié L., Hoeffel G., Vimeux L., Parent I., Marañón C., Bourdoncle P., Renia L., Prevost-Blondel A., Lucas B., et al. // *Blood.* 2010. V. 115. P. 4412–4420.
57. Matheoud D., Baey C., Vimeux L., Tempez A., Valente M., Louche P., Le Bon A., Hosmalin A., Feuillet V. // *PLoS One.* 2011. V. 6. P. e19104.
58. Xie J., Xiong L., Tao X., Li X., Su Y., Hou X., Shi H. // *Lung Cancer.* 2010. V. 68. P. 338–345.
59. Baek S., Lee S.J., Kim M.J., Lee H. // *Immune Network.* 2012. V. 12. P. 269–276.
60. Moon J.H., Chung M.K., Son Y.I. // *Laryngoscope.* 2012. V. 122. P. 2442–2446.
61. Van Tandeloo V.F., Ponsaerts P., Berneman Z.N. // *Curr. Opin. Mol. Ther.* 2007. V. 9. P. 423–431.
62. Su Z., Dannull J., Yang B.K., Dahm P., Coleman D., Yancey D., Sichi S., Niedzwiecki D., Boczkowski D., Gilboa E., et al. // *J. Immunol.* 2005. V. 174. P. 3798–3807.
63. Heiser A., Coleman D., Dannull J., Yancey D., Maurice M.A., Dahm P., Niedzwiecki D., Gilboa E., Vieweg J. // *J. Clin. Invest.* 2002. V. 109. P. 409–417.
64. Mazzolini G., Alfaro C., Sangro B., Feijoo E., Ruitz J., Benito A., Tirapu I., Arina A., Sola J., Herraiz M., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2005. V. 23. P. 999–1010.
65. Mayanagi S., Kitago M., Sakurai T., Matsuda T., Fujita T., Higuchi H., Taguchi J., Takeuchi H., Itano O., Aiura K., et al. // *Cancer Sci.* 2015. V. 106. P. 397–406.
66. Lepisto A.J., Moser A.J., Zeh H., Lee K., Bartlett D., McKolanis J.R., Geller B.A., Schmotzer A., Potter D.P., Whiteside T., et al. // *Cancer Ther.* 2008. V. 6. P. 955–964.
67. Phuphanich S., Wheeler C.J., Rudnick J.D., Mazer M., Wang H., Nuño M.A., Richardson J.E., Fan X., Ji J., Chu R.M., et al. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2012. V. 62. P. 125–135.
68. Lesterhuis W.J., De Vries I.J., Schreiber G., Schuurhuis D.H., Aarntzen E.H., De Boer A., Scharenborg N.M., Van De Rakt M., Hesselink E.J., Figdor C.G., et al. // *Anticancer Res.* 2010. V. 30. P. 5091–5098.
69. Tada F., Abe M., Hirooka M., Ikeda Y., Hiasa Y., Lee Y., Jung N.C., Lee W.B., Lee H.S., Bae Y.S., et al. // *Int. J. Oncol.* 2012. V. 41. P. 1601–1609.

70. Li Q.Y., Shi Y., Huang D.H., Yang T., Wang J.H., Yan G.H., Wang H.Y., Tang X.J., Xiao C.Y., Zhang W.J., et al. // *Int. J. Clin. Exp. Med.* 2015. V. 8. P. 5601–5610.
71. Kitawaki T., Kadowaki N., Fukunaga K., Kasai Y., Maekawa T., Ohmori K., Itoh T., Shimizu A., Kuzushima K., Kondo T., et al. // *Exp. Hematol.* 2011. V. 39. P. 424–433.
72. Suehiro Y., Hasegawa A., Iino T., Sasada A., Watanabe N., Matsuoka M., Takamori A., Tanosaki R., Utsunomiya A., Choi I., et al. // *Br. J. Haematol.* 2015. V. 169. P. 356–367.
73. Palma M., Hansson L., Choudhury A., Näsman-Glaser B., Eriksson I., Adamson L., Rossmann E., Widén K., Horváth R., Kokhaei P., et al. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2012. V. 61. P. 865–879.
74. Himoudi N., Wallace R., Parsley K.L., Gilmour K., Barrie A.U., Howe K., Dong R., Sebire N.J., Michalski A., Thrasher A.J., et al. // *Clin. Transl. Oncol.* 2012. V. 14. P. 271–279.
75. Chu C.S., Boyer J., Schullery D.S., Gimotty P.A., Gamerman V., Bender J., Levine B.L., Coukos G., Rubin S.C., Morgan M.A., et al. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2012. V. 61. P. 629–641.
76. Poschke I., Lövgren T., Adamson L., Nyström M., Andersson E., Hansson J., Tell R., Masucci G.V., Kiessling R. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2014. V. 63. P. 1061–1071.
77. Wilgenhof S., Corthals J., Van Nuffel A.M., Benteyn D., Heirman C., Bonehill A., Thielemans K., Neyns B. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2015. V. 64. P. 381–388.
78. Escobar A., López M., Serrano A., Ramirez M., Pérez C., Aguirre A., González R., Alfaro J., Larrondo M., Fodor M., et al. // *Clin. Exp. Immunol.* 2005. V. 142. P. 555–568.
79. Oshita C., Takikawa M., Kume A., Miyata H., Ashizawa T., Iizuka A., Kiyohara Y., Yoshikawa S., Tanosaki R., Yamazaki N., et al. // *Oncol. Reports.* 2012. V. 28. P. 1131–1138.
80. Ribas A., Camacho L.H., Lee S.M., Hersh E.M., Brown C.K., Richards J.M., Rodriguez M.J., Prieto V.G., Glaspy J.A., Osseguera D.K., et al. // *J. Transl. Med.* 2010. V. 8. P. 89.
81. Kimura H., Matsui Y., Ishikawa A., Nakajima T., Yoshino M., Sakairi Y. // *Cancer Immunol. Immunother.* 2015. V. 64. P. 51–59.
82. Podrazil M., Horvath R., Becht E., Rozkova D., Bilkova P., Sochorova K., Hromadkova H., Kayserova J., Vavrova K., Las-tovicka J., et al. // *Oncotarget.* 2015. V. 6. P. 18192–18205.
83. Small E., Schellhammer P.F., Higano C.S., Redfern C.H., Nemunaitis J.J., Valone F.H., Verjee S.S., Jones L.A., Hershberg R.M. // *J. Clin. Oncol.* 2006. V. 24. P. 3089–3094.
84. Mahnke K., Schmitt E., Bonifaz L., Enk A.H., Jonuleit H. // *Immunol. Cell Biol.* 2002. V. 80. P. 477–483.
85. Vinay D.S., Ryan E.P., Pawelec G., Talib W.H., Stagg J., Elkord E., Lichter T., Decker W.K., Whelan R.L., Kumara H.M., et al. // *Semin. Cancer Biol.* 2015. (35. Suppl.). P. S185–S198.
86. Galluzzi L., Senovilla L., Vacchelli E., Eggermont A., Fridman W.H., Galon J., Sautès-Fridman C., Tartour E., Zitvogel L., Kroemer G. // *Oncoimmunology.* 2012. V. 1. P. 1111–1134.
87. Töpfer K., Kempe S., Müller N., Schmitz M., Bachmann M., Cartellieri M., Schackert G., Temme A. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2011. V. 2011. P. 918471.
88. Walunas T.L., Lenschow D.J., Bakker C.Y., Linsley P.S., Freeman G.J., Green J.M., Thompson C.B., Bluestone J.A. // *Immunity.* 1994. V. 1. P. 405–413.
89. Fife B.T., Pauken K.E. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2011. V. 1217. P. 45–59.
90. Starz H. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2012. V. 12. P. 981–982.
91. Sundar R., Cho B.C., Brahmer J.R., Soo R.A. // *Ther. Adv. Med. Oncol.* 2015. V. 7. P. 85–96.
92. Dang T.O., Ogunniyi A., Barbee M.S., Drilon A. // *Expert Rev. Anticancer. Ther.* 2015. V. 10. P. 1–8.
93. Chmielowski B. // *J. Skin Cancer.* 2013. V. 2013. P. 423829.
94. Ivashko I.N., Kolesar J.M. // *Am. J. Hlth. Syst. Pharm.* 2016. V. 73. P. 193–201.
95. Boyerinas B., Jochems C., Fantini M., Heery C.R., Gulley J.L., Tsang K.Y., Schlom J. // *Cancer Immunol. Res.* 2015. V. 3. P. 1148–1157.
96. Wilgenhof S., Corthals J., Heirman C., van Baren N., Lucas S., Kvistborg P., Thielemans K., Neyns B. // *J. Clin. Oncol.* 2016. V. 34. P. 1330–1338.
97. Koido S., Kashiwaba M., Chen D., Gendler S., Kufe D., Gong J. // *J. Immunol.* 2000. V. 165. P. 5713–5719.
98. Yang B.B., Jiang H., Chen J., Zhang X., Ye J.J., Cao J. // *Head Neck.* 2010. V. 32. P. 626–635.

УДК 57.017.642, 577.112.7, 577.218

# Протеасомы в регуляции белкового гомеостаза плюрипотентных стволовых клеток

А. В. Селенина<sup>1,2</sup>, А. С. Цимоха<sup>1#</sup>, А. Н. Томилин<sup>1,2\*</sup><sup>1</sup>Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4<sup>2</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9

E-mail: #atsimokha@incras.ru; \*a.tomilin@incras.ru

Поступила в редакцию 09.12.2016

Принята к печати 04.09.2017

**РЕФЕРАТ** Эмбриональные стволовые клетки и индуцированные плюрипотентные стволовые клетки представляют интерес не только для фундаментальных исследований, но и для медицины, в первую очередь, регенеративной медицины. Несмотря на большой интерес к плюрипотентным клеткам, механизмы поддержания в них белкового гомеостаза с помощью убиквитин-протеасомной системы изучены крайне слабо. Считается, что посредством посттрансляционных модификаций белков и их деградации в протеасомах убиквитин-протеасомная система контролирует практически все основные клеточные процессы: клеточный цикл, самообновление, передачу сигнала, транскрипцию, трансляцию, окислительный стресс, иммунный ответ, апоптоз и др. Поэтому изучение роли убиквитин-протеасомной системы и механизмов ее работы в плюрипотентных клетках позволит не только лучше понять их биологию, но также ляжет в основу новых подходов в регенеративной медицине.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** иммунопротеасома, индуцированные плюрипотентные стволовые клетки, протеасома, убиквитин-протеасомная система, эмбриональные стволовые клетки.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ИП – иммунопротеасома; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; МЭФ – мышинные эмбриональные фибробласты; СЕ – субъединица; УПС – убиквитин-протеасомная система; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки.

## ВВЕДЕНИЕ

Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) – это культивируемые клетки, получаемые из клеток раннего эпибласта (первичной эктодермы) преимплантационных эмбрионов млекопитающих. ЭСК могут делиться в культуре бесконечно долго, не подвергаясь процессам старения и сохраняя свое недифференцированное состояние и способность дифференцироваться во все клеточные типы, за исключением двух внезародышевых (трофобласта и первичной эндодермы) [1, 2]. Исследование молекулярных механизмов контроля плюрипотентности в настоящий момент является одной из наиболее актуальных тем биологии. Изучение генно-регуляторных (транскрипционных) сетей занимает важное место в изучении плюрипотентности и выхода из этого клеточного состояния посредством дифференцировки. Уровень экспрессии транскрипционных факторов, таких, как Oct4, c-Myc, Nanog, Klf4 и Sox2, – важное регулирующее событие в судьбе плюрипотентных стволовых клеток [3–6]. Даже самые небольшие изменения в уровне экспрес-

сии этих транскрипционных факторов посредством взаимодействия с другими регуляторными белками могут приводить к дифференцировке или онкогенезу [4, 7–13]. Модификаторы хроматина и системы, обеспечивающие стабильность генома, также играют ключевую роль в функционировании ЭСК [14, 15]. Способность ЭСК избегать репликативного старения и в то же время поддерживать плюрипотентное состояние обеспечивается определенными клеточными системами контроля, которые работают в высокоинтенсивном режиме в данных клетках [3]. Так как именно плюрипотентные клетки раннего эпибласта (природные аналоги ЭСК) дают начало всему организму, включая зародышевую линию, они должны иметь жестко отлаженные процессы защиты генома от мутаций. Согласно некоторым исследованиям, ЭСК показывают повышенную устойчивость к повреждениям ДНК и низкую частоту геномных мутаций по сравнению с дифференцированными клетками [16–18]. Кроме того, ЭСК не только производят меньше активных форм кислорода [14, 19],

но также имеют механизмы, позволяющие избавляться от накопления гено- и протеотоксичных факторов [20]. Несмотря на большой интерес к исследованиям в области регуляции повреждений ДНК и ответа на окислительный стресс, новые данные показывают, что поддержание белкового гомеостаза играет одну из центральных ролей в функционировании ЭСК [21, 22]. Белковый гомеостаз представляет собой сложную сеть интегрированных и конкурирующих путей, которые поддерживают стабильность протеома клетки [23]. Данная сеть регулирует все клеточные процессы, вовлеченные в жизненный цикл белков, включая их синтез, фолдинг, перемещение, взаимодействие и деградацию. Нарушения в белковом гомеостазе приводят к накоплению поврежденных белков, которые, в свою очередь, негативно влияют на бессмертие и самообновление ЭСК [20]. Поэтому очевидно, что ЭСК должны иметь точно отрегулированный механизм поддержания белкового гомеостаза. Известно, например, что ЭСК чрезвычайно чувствительны к изменениям в транскрипции и деградации/фолдингу белков [24, 25]. Некоторые исследователи утверждают, что утрата регуляции белкового гомеостаза – отличительная черта старения, поэтому изучение ЭСК способствует пониманию такого явления, как возрастное понижение целостности протеома [26, 27]. Из-за некоторого сходства ЭСК и трансформированных клеток четкое понимание белкового гомеостаза ЭСК также может внести вклад в изучение онкологических заболеваний [27].

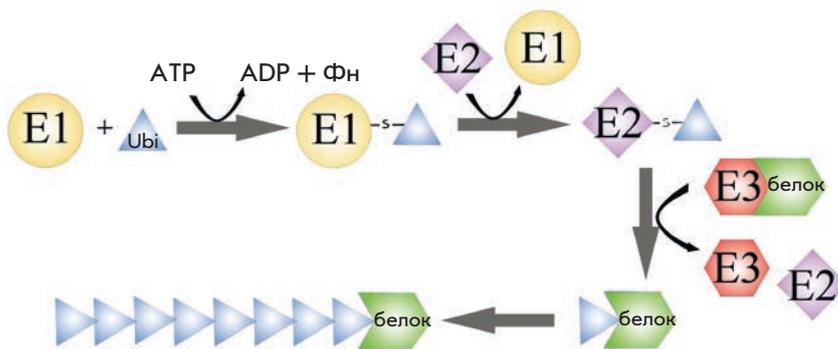
Одним из важных и открытых вопросов является получение индуцированных плюрипотентных стволовых клеток (иПСК) в процессе соматического репрограммирования [28, 29]. Обнаружение возможности получения иПСК из мышечных фибробластов с помощью форсированной экспрессии ключевых транскрипционных факторов – Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc – внесло неопределимый вклад в понимание молекулярных механизмов клеточного репрограммирования и открыло новые подходы к альтернативным исследованиям, неосуществимым по ряду причин на модельных животных [28, 29]. иПСК обладают сходной с ЭСК морфологией, пролиферативной способностью, набором эндогенных маркеров плюрипотентности и способны дифференцироваться *in vivo* и *in vitro* [30–32]. В настоящее время наибольшей эффективности репрограммирования достигают с помощью вирусной доставки факторов репрограммирования [28, 33–37]. Дальнейший прогресс в применении данной технологии в научных исследованиях и/или в медицине будет зависеть от возможности получать иПСК в отсутствие геномных модификаций. Некоторые исследования уже достигли определенных успехов в решении этой проблемы, например,

показана возможность репрограммирования с помощью эписомных векторов, таких, как аденовирусы, транспозоны, очищенные белки, модифицированные РНК, микроРНК и т.д. [34]. Несмотря на несомненный прогресс в получении иПСК, все еще необходимы знания и технологии, которые могли бы повысить эту эффективность и сделать процесс репрограммирования более безопасным и предсказуемым.

### УБИКВИТИН-ПРОТЕАСОМНАЯ СИСТЕМА

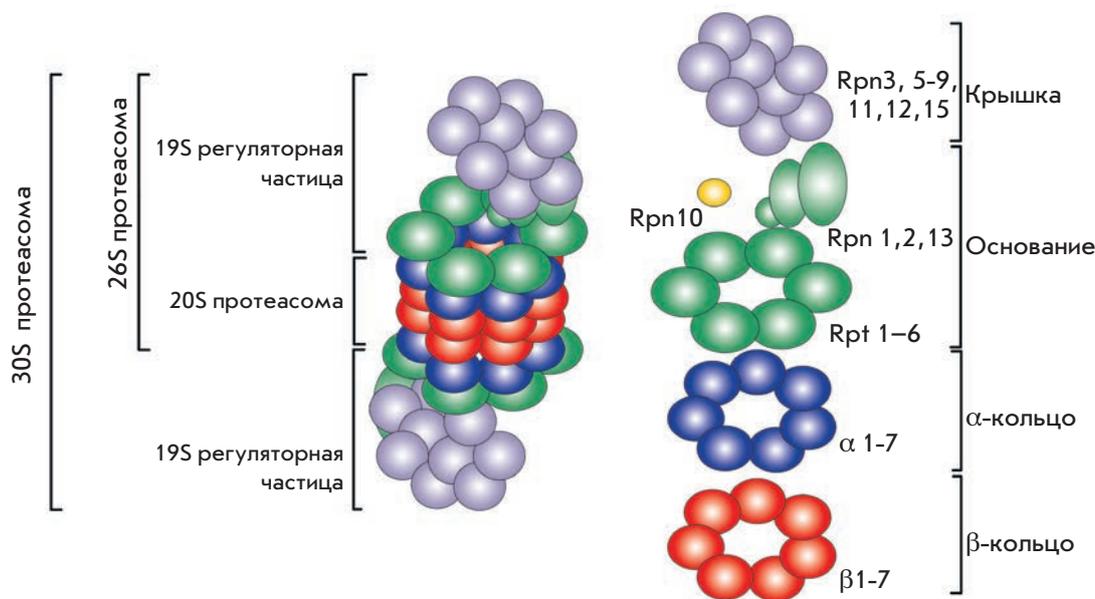
Убиквитин-протеасомная система (УПС) – ключевой участник поддержания белкового гомеостаза. УПС представляет собой протеолитический аппарат эукариотической клетки, регулирующий основные клеточные процессы, такие, как клеточный цикл, передача сигнала, транскрипция, трансляция, окислительный стресс, иммунный ответ и апоптоз [38, 39]. Функционирование УПС осуществляется через посттрансляционные модификации, которые образуются путем ковалентного присоединения убиквитина, организованного АТР-зависимым каскадом убиквитин-активирующих ферментов (E1), убиквитин-конъюгирующих ферментов (E2) и убиквитин-лигаз (E3) (рис. 1А) [40, 41]. Одиночный E1-фермент может взаимодействовать со всем многообразием E2-ферментов, а дальнейшие комбинации между E2 и E3 обеспечивают субстратную специфичность и регуляцию нижестоящих процессов. Моноубиквитинирование представляет собой метку для передачи сигнала и эндоцитоза, в то время как полиубиквитинирование приводит к АТР-зависимой деградации белка в протеасоме [42, 43]. УПС участвует в поддержании белкового гомеостаза как в течение жизни клетки, так и во время ее смерти; играет важную роль и в здоровых, и в больных клетках, например, при нейродегенеративных заболеваниях (болезнь Альцгеймера), при сердечных дисфункциях (транзиторная ишемическая атака) или при аутоиммунных заболеваниях (синдром Шегрена) [44]. Важным компонентом УПС является мультисубъединичный протеолитический комплекс – протеасома (рис. 1Б). Центральная коровая часть протеасомы – 20S частица – представляет собой полый бочонок, состоящий из четырех колец, каждое из которых включает семь субъединиц (SE)  $\alpha$ - или  $\beta$ -типов (7 $\alpha$ , 7 $\beta$ , 7 $\beta$ , 7 $\alpha$ ). В клетках эукариот только три SE  $\beta$ -типа несут активный треониновый сайт (Thr1) на N-конце [45]: SE  $\beta$ 1/PSMB6 обладает активностью по типу каспазы,  $\beta$ 2/PSMB7 – трипсина и  $\beta$ 5/PSMB5 – химотрипсина [39, 41, 46]. Коровая 20S частица может взаимодействовать с одной или двумя регуляторными 19S частицами, таким образом формируется 26S или 30S протеасома (рис. 2) [39]. Регуляторный комплекс 19S сформирован из «ос-

А



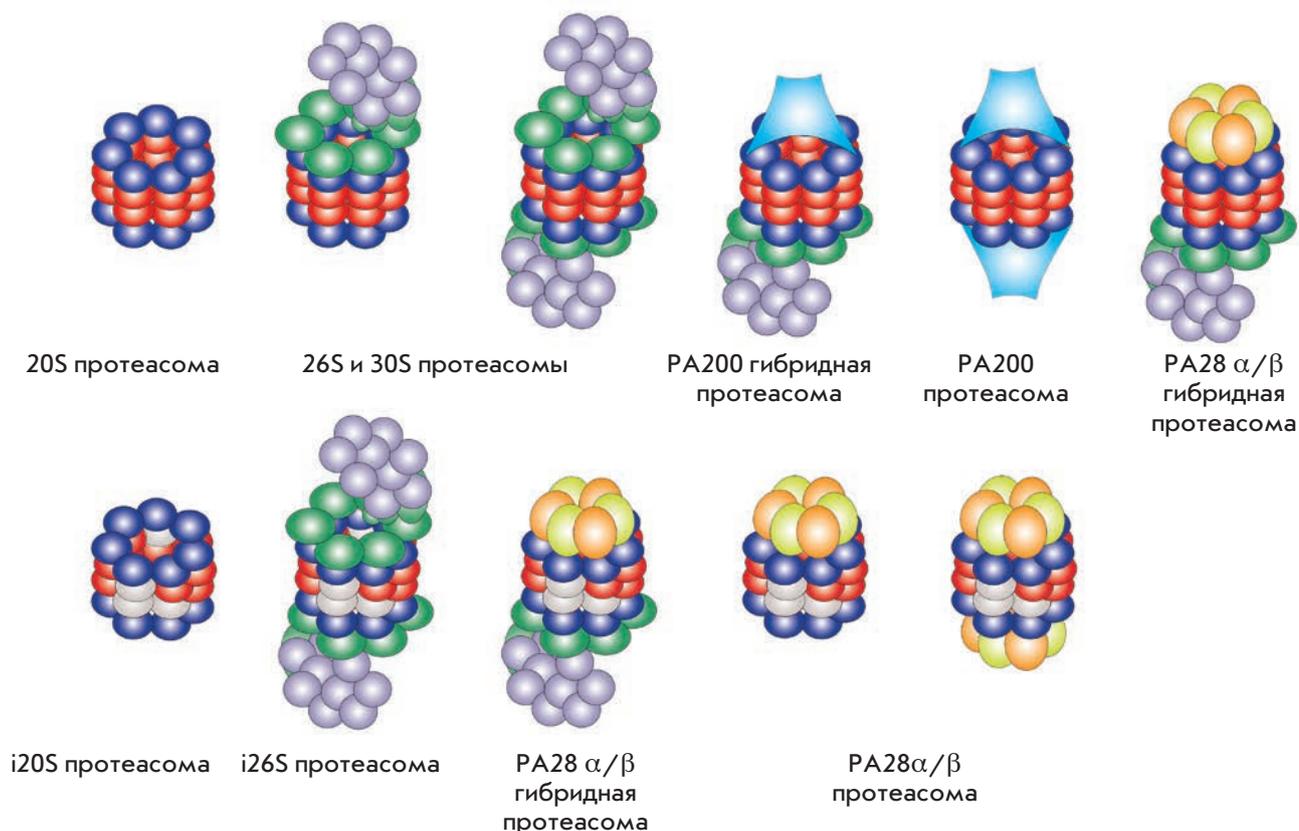
**Рис. 1.** Убиквитин-протеасомная система. А – ковалентное присоединение убиквитина АТФ-зависимым каскадом убиквитин-активирующих ферментов (E1), убиквитин-конъюгирующих ферментов (E2) и убиквитин-лигаз (E3). Б – структура протеасомы (пояснения в тексте)

Б



нования» и «крышки», содержащих 18 СЕ, 13 из которых АТФ-независимые (Rpn), а остальные шесть представляют собой ААА-АТФ-азные (Rpt) [47]. Функции «крышки» регуляторной частицы 19S заключаются в захвате полиубиквитинированных белков с помощью СЕ Rpn10/PSMD4 и Rpn13/ADRM1 и последующем деубиквитинировании захваченного белка. «Основание» обеспечивает разворачивание белка, открытие ворот, сформированных α-кольцом, и пропускание белка в каталитическую полость 20S протеасомы [39, 47, 48]. 20S протеасома функционирует независимо от АТФ, однако, она может взаимодействовать с полиубиквитинированными белками, как и 26S протеасома, но механизмы этого процесса еще не изучены [49]. 20S частица может активироваться не только за счет 19S частиц, но и с помощью другого регулятора – РА200 (рис. 2) [50]. Этот белок также связывается с 20S протеасомой, однако функции РА200 и механизмы регуляции мало изучены.

Известно, что этот белок преимущественно находится в ядре, способен увеличивать продукцию более коротких пептидов протеасомой, обеспечивать деградацию окисленных белков в процессе адаптации клетки к окислительному стрессу. Кроме того, экспрессия РА200 увеличивается в ответ на ионизирующее излучение [50]. Существует еще один регулятор активности протеасомы – РА28 (рис. 2), представляющей собой гетерогексамерный или гетерогептамерный комплекс, состоящий из трех СЕ РА28α и трех СЕ РА28β – РА28α3β3, или РА28α3β4, или РА28α4β3 [51]. С-Концы СЕ РА28 могут встраиваться в межсубъединичный карман между α-СЕ и таким образом контролировать и стабилизировать открытие ворот α-кольца, особенно во время иммунного ответа [39, 52]. Взаимодействие клеток с медиаторами воспаления провоцирует замену конститутивных СЕ β1/PSMB6, β2/PSMB7 и β5/PSMB5 индуцибельными каталитическими СЕ β1i/PSMB9, β2i/PSMB10 и β5i/



**Рис. 2.** Разнообразие протеасом в клетке млекопитающих. Каталитически активная 20S протеасома состоит из 4 колец, каждое из которых включает 7 субъединиц  $\alpha$ - (синий цвет) или  $\beta$ -типов ( $7\alpha$ ,  $7\beta$ ,  $7\beta$ ,  $7\alpha$ , красный цвет). В особых условиях конститутивные каталитические субъединицы  $\beta 1$ ,  $\beta 2$  и  $\beta 5$  замещаются на индуцибельные  $\beta 1i$ ,  $\beta 2i$  и  $\beta 5i$  (светло-серый цвет), формируя иммунопротеасому (i20S). 20S протеасома может взаимодействовать с одной или двумя регуляторными частицами 19S (фиолетовый и зеленый цвета), образуя соответственно 26S или 30S протеасомы, а также с другими регуляторными комплексами PA200 (голубой цвет) и PA28 (желтый и оранжевый цвета), формируя гибридные протеасомы. Иммунопротеасома также может взаимодействовать с регуляторами 19S и PA28, формируя гибридные формы, различающиеся по своей активности и специфичности (пояснения в тексте)

PSMB8. В таком случае протеасому называют иммунопротеасомой (ИП) (рис. 2). Замена каталитически активных СЕ меняет пептидазные активности протеасомы, увеличивая эффективность формирования эпитопов для главного комплекса гистосовместимости I (МНС I) [53–56]. Вариации эпитопов, производимых ИП, обусловлены расщеплением белков после основных и гидрофобных аминокислотных остатков (трипсин- и химотрипсин-подобные активности), тогда как расщепление после кислых аминокислотных остатков (каспаза-подобная активность), согласно некоторым источникам, отсутствует [49]. Первый скрининг транскрипционно-активных генов в ЭСК человека (чЭСК) выявил около 900 наиболее активных генов, в том числе ген индуцибельной протеа-

сомной СЕ  $\beta 5i$ /PSMB8 [57]. В дальнейшем в транскриптомном профиле чЭСК обнаружили и другие гены УПС, что подтверждает гипотезу о роли этой системы и белкового гомеостаза в поддержании плюрипотентности ЭСК [58, 59].

### ПРОТЕАСОМЫ В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ СТВОЛОВЫХ КЛЕТКАХ МЫШИ

Плюрипотентные клетки, как уже упоминалось, способны давать начало клеткам всех типов, присутствующих в организме, и это предполагает существование жесткого контроля над самообновлением и плюрипотентностью. Эта программа включает транскрипционные факторы, сигнальные пути и микроРНК, тесно взаимодействующие с системой ре-

гуляторных белков и других специфических белков, участвующих в формировании структуры хроматина. Такое взаимодействие формирует уникальное состояние хроматина в плюрипотентных клетках [60]. Примечательно, что ингибирование протеолитической активности протеасом или нокдаун отдельных СЕ протеасом в ЭСК мышцы (мЭСК) приводит к активации обычно неактивных криптических («скрытых») промоторов [61]. Показано также, что 19S комплекс регулирует экспрессию генов независимо от протеолитической активности протеасомы. Так, в мЭСК СЕ «крышки» Rpn12/PSMD8 контролирует сборку преинициаторного комплекса транскрипции, но только в присутствии СЕ «основания» Rpt3/PSMC4 [61]. Таким образом, протеасома действует в мЭСК как транскрипционный репрессор, предотвращая aberrantную инициацию транскрипции, которая, в свою очередь, могла бы привести к несанкционированному выходу из состояния плюрипотентности.

УПС активно участвует в регуляции уровня и (или) функционирования различных регуляторных белков в стволовых и половых клетках млекопитающих, особенно тех белков, которые участвуют не только в регуляции транскрипции, но и в работе сигнальных каскадов [22]. Быстрая модуляция времени жизни этих факторов позволяет стволовым клеткам реагировать на поступающие из окружающей среды сигналы, в ответ на которые они или сохраняют свойства плюрипотентности, или приступают к реализации программы дифференцировки. При участии УПС функционируют различные сигнальные пути: LIF/JAK/STAT3, Nodal/TGF $\beta$ /активин, Wnt/ $\beta$ -катенин, Notch и BMP. УПС вовлечена также в регуляцию активности транскрипционных факторов, таких, как Rel, и белков семейства GATA в различных стволовых и прогениторных клетках [62–66]. Примечательно, что все эти сигнальные каскады участвуют в регуляции клеточной плюрипотентности.

Замечено, что накапливающиеся в мЭСК белки, поврежденные активными формами кислорода, убиквитинированы, а значит, в дальнейшем должны подвергаться протеасомной деградации [67, 68]. Тем не менее, оказалось, что 20S протеасома уменьшает количество окисленных белков по АТР- и убиквитин-независимому пути [67]. Обнаружено также, что в деградации окисленных белков участвуют не только 20S протеасомы, но и ИП [69], что предполагает повышенную экспрессию индуцибельных СЕ и белков комплекса PA28 в мЭСК. Однако повышение уровней белков  $\beta$ 5i/PSMB8 и PA28 $\alpha/\beta$  было замечено лишь в процессе дифференцировки мЭСК [52]. Интересно, что в соматических клетках мышцы, таких, как фибробласты кожи, эмбриональные фибробласты (МЭФ), клетки печени и мозговой ткани, уровень окислен-

ных белков зависит от активности ИП и гибридных PA28 протеасом [69–71]. Все это доказывает, что ИП и регулятор PA28 играют важную роль в деградации окисленных белков в соматических клетках и в процессе дифференцировки мЭСК, но не в самих плюрипотентных клетках.

Возможность получения ИПСК поставила еще один важный вопрос о роли УПС в процессе репрограммирования и в индукции плюрипотентности. Показано, что факторы плюрипотентности Oct4, Sox2, Nanog и c-Myc, а также Dax1, Rex1, Dnmt3l и Msh6 убиквитинируются [21, 72]. Более того, ингибирование протеасомной активности с помощью обратимого ингибитора MG132 вызывает сильное снижение эффективности репрограммирования МЭФ (наши неопубликованные данные) вплоть до полного ингибирования [21]. Важно иметь в виду, что не только убиквитинирование, но и фосфорилирование играет важную роль в поддержании самообновления и плюрипотентности мЭСК. Так, в числе идентифицированных фосфорилированных и убиквитинированных белков (всего более 280), немало так или иначе связанных с плюрипотентностью [21]. Известно, что УПС вовлечена в регуляцию клеточного цикла [73]. Убиквитин-лигаза Fbw7/Fbxw7, например, может направлять на деградацию важные регуляторы жизненного цикла клетки, такие, как c-Myc, c-Jun, циклин-Е и Notch [74]. Интересно, что, несмотря на одинаковый уровень этого белка в мЭСК и фибробластах, экспрессия Fbw7 увеличивается, а c-Myc снижается в процессе дифференцировки мЭСК. Кроме того, нокдаун Fbw7 в мЭСК вызывает повышение экспрессии c-Myc, Oct4, Nanog и Sox2 на ранних стадиях дифференцировки, а подавление экспрессии Fbxw7 в процессе репрограммирования приводит к повышению эффективности получения ИПСК [21]. В регуляцию плюрипотентности вовлечены не только убиквитин-лигазы E3, но также и СЕ регулятора 19S. Деубиквитинирующий белок Rpn11/PSMD14 этого регулятора является решающим фактором в поддержании плюрипотентности. Так, экспрессия Rpn11/PSMD14 падает при дифференцировке мЭСК, а нокдаун этой СЕ в МЭФ ингибирует их репрограммирование и ИПСК [21]. Интересно, что сверхэкспрессия Rpn11/PSMD14 в мЭСК предотвращала дифференцировку, удерживая клетки в состоянии плюрипотентности. Согласно нашим данным, в процессе репрограммирования наблюдается усиление экспрессии индуцибельных СЕ протеасом  $\beta$ 5i/PSMB8 и  $\beta$ 1i/PSMB9, причем ингибирование активности СЕ  $\beta$ 5i/PSMB8 снижало эффективность получения ИПСК (наши неопубликованные данные), что свидетельствует об участии ИП в репрограммировании.

## ПРОТЕАСОМЫ В ЭМБРИОНАЛЬНЫХ КЛЕТКАХ ЧЕЛОВЕКА

Анализ транскриптома с использованием микрочипов при нокдауне *Oct4* в чЭСК линии H1 выявил достоверное изменение уровней экспрессии 18 генов, связанных с УПС [75]. Причем известно, что ингибирование активности протеасом в чЭСК приводит к различным последствиям. Так, например, обратимый ингибитор протеасом MG132 влияет только на плюрипотентные стволовые, но не соматические клетки [24, 58, 76]. Различные временные интервалы воздействия (от 20 мин до 10 ч) даже высоких концентраций протеасомных ингибиторов (20 мкМ MG132 и 10 мкМ лактацитина) не изменяли ни жизнеспособность клеток, ни их морфологию [24, 61]. Интересно, что присутствие ингибитора протеасом MG132 даже в низких дозах полностью ингибировало репрограммирование МЭФ в иПСК [21] и снижало клонообразование в процессе репрограммирования фибробластов человека на фоне повышения экспрессии генов *Oct4* и *Nanog* [77]. Ингибирование активности протеасом в плюрипотентных клетках приводило к подавлению экспрессии генов плюрипотентности, таких, как *Oct4*, *Nanog*, *c-Myc*, *Sox2*, *SSEA-3*, *Tra-1-81* и *Tra-1-60*, в результате чего происходила потеря возможности самообновления при одновременной активации экспрессии генов дифференцировки, таких, как *FGF5* и *GATA4* [24, 58, 76].

Подобно СЕ «крышки» Rpn11/PSMD14 мыши, в чЭСК играет важную роль другая СЕ «крышки» – Rpn6/PSMD11. Данная СЕ стабилизирует весь 26S протеасомный комплекс, повышая сродство регулятора 19S к 20S частице через взаимодействие с СЕ  $\alpha 2$ /PSMA2 [24]. Уровень экспрессии белка Rpn6/PSMD11 находится на высоком уровне в чЭСК и иПСК, однако, понижается при дифференцировке чЭСК в предшественники нервных клеток и в зрелые нейроны [24]. Наблюдаемое снижение экспрессии Rpn6/PSMD11 сопровождается спадом активности всей протеасомы, приводит к уменьшению числа собранных протеасомных комплексов и, следовательно, к накоплению убиквитинированных белков в клетке. Это наблюдение опять же доказывает роль протеасомы в поддержании белкового гомеостаза в плюрипотентных клетках. Анализ синтезируемых и функционально активных протеасом в чЭСК и в сравнении с предшественниками нейронов, зрелыми нейронами, фибробластами и астроцитами гиппокампа показал присутствие большего количества 26S протеасом с двумя 19S частицами (30S протеасом), в то время как свободных 20S частиц наблюдалось меньше [24]. Такие структурные перестройки протеасом вызывают понижение протеасомной активности как в полученных из чЭСК клетках (например, трофобластах),

так и в соматических клетках (например, фибробластах и клетках линии НЕК293Т). Известно, однако, что УПС играет важную роль в нейронах, особенно в передаче нервного импульса [78], поэтому до сих пор нет правдоподобного объяснения, почему в нейронах активность протеасом значительно ниже, чем в чЭСК.

В отличие от мЭСК [52, 67], плюрипотентные стволовые клетки человека содержат меньше окислительно-модифицированных белков, что выявляется при сравнении с неонатальными фибробластами человека, а также производными чЭСК и иПСК [79]. Увеличение числа свободных 20S частиц во время нейрональной дифференцировки чЭСК поднимает вопрос о том, может ли регуляторная частица PA28 принимать участие в этом процессе, как это происходит у мыши [52]. Вероятно, PA28 может взаимодействовать с 20S протеасомой, тем самым регулируя его протеолитическую активность. Однако появление комплекса PA28 должно сопровождаться и появлением индуцибельных СЕ, а следовательно, формированием ИП [69, 70]. Первоначально функционирование ИП связывают с процессингом антигенов, белковым гомеостазом и ответом на окислительный стресс [49, 70, 71]. Исследование роли ИП в поддержании плюрипотентности чЭСК показало, что во время дифференцировки этих клеток наблюдается подавление химотрипсин-подобной активности протеасом [76]. Интересно, что при дифференцировке мЭСК этот тип пептидазной активности протеасом напротив возрастает [52]. Данная активность осуществляется тремя СЕ:  $\beta 5$ /PSMB5,  $\beta 1i$ /PSMB9 и  $\beta 5i$ /PSMB8 [56, 80, 81]. Во время дифференцировки уровень экспрессии генов конститутивных СЕ протеасомы  $\beta 1$ /PSMB6,  $\beta 2$ /PSMB7 снижается, однако, уровень белка  $\beta 5$ /PSMB5 остается неизменным. Несмотря на выявленные изменения в экспрессии этих генов, на уровне белка изменений не происходит; в то же время наблюдается снижение экспрессии индуцибельных СЕ  $\beta 1i$ /PSMB9 и  $\beta 5i$ /PSMB8 как на уровне мРНК, так и на уровне белка [76]. Эти данные объясняют наблюдаемое снижение химотрипсин-подобной активности протеасом во время дифференцировки, однако, ответа на вопрос, опосредовано ли это участием ИП в поддержании плюрипотентности, до сих пор нет. С другой стороны, использование специфических для ИП ингибиторов UK101 ( $\beta 1i$ /PSMB9) и PK957 ( $\beta 5i$ /PSMB8) активировало экспрессию маркеров дифференцированных клеток и потерю плюрипотентности чЭСК [76], что свидетельствует о роли ИП в поддержании плюрипотентности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

УПС влияет на получение и поддержание плюрипотентности, на выход из этого состояния как челове-

мЭСК

УПС участвует в сигнальной трансдукции [22, 62–66]

УПС убиквитинирует факторы плюрипотентности *Oct4*, *Sox2*, *Nanog* и *c-Myc*, а также *Dax1*, *Rex1*, *Dnmt3l* и *Msh6* [21, 72]

Протеасома действует как транскрипционный глушитель, предотвращая aberrantную инициацию транскрипции [61]

Деградация окисленных белков с помощью конститутивной протеасомы и повышение активности иммунопротеасомы при дифференцировке [67–69]

Экспрессия СЕ *Rpn11/PSMD14* падает при дифференцировке [21]. Сверхэкспрессия *Rpn11/PSMD14* предотвращает дифференцировку, сохраняя состояние плюрипотентности

Нокдаун СЕ *Rpn11/PSMD14* в МЭФ ингибирует репрограммирование [21]

Ингибирование протеасомной активности с помощью *MG132* вызывает сильное снижение эффективности репрограммирования МЭФ (неопубликованные данные) вплоть до полного ингибирования [21]

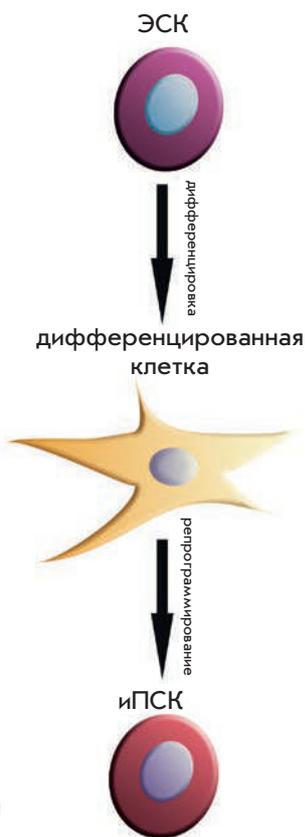
чЭСК

*Rpn6/PSMD11* СЕ имеет повышенную активность в ЭСК: стабилизирует 26S протеасомный комплекс, повышая сродство регулятора 19S к 20S частице [24]

Ингибирование протеасом подавляет экспрессию *Oct4*, *Nanog*, *c-Myc*, *Sox2*, *SSEA-3*, *Tra-1-81* и *Tra-1-60* и активирует экспрессию генов дифференцировки *FGF5* и *GATA4* [24, 58, 76]

Повышенный уровень экспрессии индукцибельных СЕ  $\beta 1i/PSMB9$  и  $\beta 5i/PSMB8$  в ЭСК, а также подавление активности иммунопротеасом во время дифференцировки [76]

Ингибитор протеасом *MG132* снижает клонирование в процессе репрограммирования фибробластов человека на фоне повышения экспрессии генов *Oct3/4* и *Nanog* [77]



**Рис. 3.** Участие убиквитин-протеасомной системы (УПС) в плюрипотентных стволовых клетках мыши и человека, а также в ходе выхода и вхождения в состояние плюрипотентности. Суммируются наиболее важные сведения о роли УПС в указанных клеточных типах и процессах. В квадратных скобках приведены ссылки на литературу

ческих, так и мышечных клеток (рис. 3). Протеасомы и регулятор PA28 участвуют в деградации большей части окисленных белков при дифференцировке [52, 67], регулируют клеточный цикл ЭСК через E3-лигазы и деубиквитиномы [21], модулируют состояние плюрипотентности через убиквитинирование основных транскрипционных факторов плюрипотентности, например, *Oct4*, *Nanog* и *c-Myc* [21, 52]. Ингибирование протеасомной активности ведет к негативной регуляции факторов плюрипотентности и активации факторов, связанных с клеточной дифференцировкой [24, 58, 76]. Кроме того, ИП также принимают активное участие в поддержании белкового гомеостаза, клеточной пролиферации и дифференцировке, что говорит о том, что данные протеолитические комплексы играют немаловажную роль за пределами иммунного ответа [52, 58, 76]. На сегодняшний день функциональное значение ИП в поддержании плюрипотентности и самообновления

в ЭСК и ИПСК остается по большей части неисследованным. Дальнейшие эксперименты должны внести ясность в роль данных протеолитических комплексов в индукции, поддержании и утери плюрипотентности. Также остается немало вопросов о роли УПС в таких процессах, как репрограммирование и транс-дифференцировка, ответы на которые позволят достичь больших успехов в прикладных областях медицины, включая регенеративную медицину, заместительную клеточную терапию и скрининг лекарственных препаратов [29].

Актуальной на сегодня темой является получение так называемых наивных плюрипотентных стволовых клеток человека, и в этом вопросе достигнуты определенные успехи [82, 83], однако как изменяется работа УПС, меняется ли работа протеасом и ИП в этом процессе, пока остается неизвестным. Значение УПС определяется в быстрой модификации белков клеточного цикла, регуляции транскрип-

ции и трансляции, в контроле деградации поврежденных модифицированных белков для поддержания пролиферативного потенциала и белкового гомеостаза плюрипотентных клеток, тем не менее большая часть работы УПС в данных клетках остается неизученной.

ЭСК и иПСК имеют уникальную способность самообновления и являются плюрипотентными, т.е. они способны дифференцироваться во все типы клеток трех зародышевых листков: мезодермы, энтодермы и эктодермы [2]. ЭСК и иПСК мыши поддерживают плюрипотентность благодаря генной регуляторной сети, основанной на LIF и Wnt сигнальных путях [62], в то время как чЭСК зависят от FGF, TGF $\beta$ /Nodal/

Activin сигнальных путей [63]. На сегодняшний день хорошо известно, что УПС имеет отношение к данным сигнальным путям [64–66, 84], и, таким образом, открытие новых узлов пересечения и механизмов регуляции данных путей в контексте УПС и плюрипотентных стволовых клеток является невероятно важным и требующим изучения аспектом в биологии и медицине. ●

*Исследование выполнено за счет гранта  
Российского научного фонда (№ 14-14-00718)  
и гранта Российского фонда фундаментальных  
исследований (№ 15-04-08128).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Evans M.J., Kaufman M.H. // Nature. 1981. V. 292. № 5819. P. 154–156.
- Thomson J.A., Itskovitz-Eldor J., Shapiro S.S., Waknitz M.A., Swiergiel J.J., Marshall V.S., Jones J.M. // Science. 1998. V. 282. № 5391. P. 1145–1147.
- Young R.A. // Cell. 2011. V. 144. № 6. P. 940–954.
- Fang L., Zhang L., Wei W., Jin X., Wang P., Tong Y., Li J., Du J.X., Wong J. // Mol. Cell. 2014. V. 55. № 4. P. 537–551.
- Sears R.C. // Cell Cycle. 2004. V. 3. № 9. P. 1131–1135.
- Xu H., Wang W., Li C., Yu H., Yang A., Wang B., Jin Y. // Cell Research. 2009. V. 19. № 5. P. 561–573.
- Tolkunova E., Malashicheva A., Parfenov V.N., Sustmann C., Grosschedl R., Tomilin A. // J. Molecular Biology. 2007. V. 374. № 5. P. 1200–1212.
- Li Y., McClintick J., Zhong L., Edenberg H.J., Yoder M.C., Chan R.J. // Blood. 2005. V. 105. № 2. P. 635–637.
- Gidekel S., Pizov G., Bergman Y., Pikarsky E. // Cancer Cell. 2003. V. 4. № 5. P. 361–370.
- Kehler J., Tolkunova E., Koschorz B., Pesce M., Gentile L., Boiani M., Lomeli H., Nagy A., McLaughlin K.J., Schöler H.R. // EMBO Reports. 2004. V. 5. № 11. P. 1078–1083.
- DeVeale B., Brokman I., Mohseni P., Babak T., Yoon C., Lin A., Onishi K., Tomilin A., Pevny L., Zandstra P.W. // PLoS Genetics. 2013. V. 9. № 11. P. e1003957.
- Wu G., Han D., Gong Y., Sebastiano V., Gentile L., Singhal N., Adachi K., Fishedick G., Ortmeier C., Sinn M. // Nature Cell Biology. 2013. V. 15. № 9. P. 1089.
- Lengner C.J., Camargo F.D., Hochedlinger K., Welstead G.G., Zaidi S., Gokhale S., Scholer H.R., Tomilin A., Jaenisch R. // Cell Stem Cell. 2007. V. 1. № 4. P. 403–415.
- Saretzki G., Walter T., Atkinson S., Passos J.F., Bareth B., Keith W.N., Stewart R., Hoare S., Stojkovic M., Armstrong L. // Stem Cells. 2008. V. 26. № 2. P. 455–464.
- Watanabe A., Yamada Y., Yamanaka S. // Phil. Trans. R. Soc. B. 2013. V. 368. № 1609. P. 20120292.
- Hong Y., Cervantes R., Tichy E., Tischfield J., Stambrook P. // Mutation Research/Fundamental and Molecular Mechanisms of Mutagenesis. 2007. V. 614. № 1. P. 48–55.
- Nagaria P., Robert C., Rassool F.V. // Biochimica et Biophysica Acta (BBA)–General Subjects. 2013. V. 1830. № 2. P. 2345–2353.
- Tichy E.D., Stambrook P.J. // Exp. Cell Res. 2008. V. 314. № 9. P. 1929–1936.
- Saretzki G., Armstrong L., Leake A., Lako M., von Zglinicki T. // Stem Cells. 2004. V. 22. № 6. P. 962–971.
- Vilchez D., Simic M.S., Dillin A. // Trends Cell Biol. 2014. V. 24. № 3. P. 161–170.
- Buckley S.M., Aranda-Orgilles B., Strikoudis A., Apostolou E., Loizou E., Moran-Crusio K., Farnsworth C.L., Koller A.A., Dasgupta R., Silva J.C. // Cell Stem Cell. 2012. V. 11. № 6. P. 783–798.
- Naujokat C., Šarić T. // Stem Cells. 2007. V. 25. № 10. P. 2408–2418.
- Powers E.T., Morimoto R.I., Dillin A., Kelly J.W., Balch W.E. // Annu Rev Biochem. 2009. V. 78. P. 959–991.
- Vilchez D., Boyer L., Morante I., Lutz M., Merkwirth C., Joyce D., Spencer B., Page L., Masliah E., Berggren W.T. // Nature. 2012. V. 489. № 7415. P. 304–308.
- You K.T., Park J., Kim V.N. // Genes Dev. 2015. V. 29. № 19. P. 2004–2009.
- López-Otín C., Blasco M.A., Partridge L., Serrano M., Kroemer G. // Cell. 2013. V. 153. № 6. P. 1194–1217.
- Finkel T., Serrano M., Blasco M.A. // Nature. 2007. V. 448. № 7155. P. 767–774.
- Takahashi K., Yamanaka S. // Cell. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
- Шнайдер Т., Фишман В., Лисковых М., Понамарцев С., Серов О., Томилин А., Аленина Н. // Цитология. 2014. Т. 56. № 12. С. 869–880.
- Maherali N., Sridharan R., Xie W., Utikal J., Eminli S., Arnold K., Stadtfeld M., Yachechko R., Tchieu J., Jaenisch R. // Cell Stem Cell. 2007. V. 1. № 1. P. 55–70.
- Wernig M., Meissner A., Foreman R., Brambrink T., Ku M., Hochedlinger K., Bernstein B.E., Jaenisch R. // Nature. 2007. V. 448. № 7151. P. 318–324.
- Yu J., Vodyanik M.A., Smuga-Otto K., Antosiewicz-Bourget J., Frane J.L., Tian S., Nie J., Jonsdottir G.A., Ruotti V., Stewart R. // Science. 2007. V. 318. № 5858. P. 1917–1920.
- Carey B.W., Markoulaki S., Hanna J., Saha K., Gao Q., Mitalipova M., Jaenisch R. // Proceedings of the National Academy of Sciences. 2009. V. 106. № 1. P. 157–162.
- González F., Boué S., Belmonte J.C.I. // Nature Reviews Genetics. 2011. V. 12. № 4. P. 231–242.
- Theunissen T.W., Jaenisch R. // Cell Stem Cell. 2014. V. 14. № 6. P. 720–734.
- Liskovkykh M., Chuykin I., Ranjan A., Safina D., Popova E., Tolkunova E., Mosienko V., Minina J.M., Zhdanova N.S., Mullins J.J. // PLoS One. 2011. V. 6. № 11. P. e27345.

37. Kostina A.S., Uspensky V.E., Irtyuga O.B., Ignatieva E.V., Freylikhman O., Gavriiliuk N.D., Moiseeva O.M., Zhuk S., Tomilin A., Kostareva A.A. // *Biochimica et Biophysica Acta (BBA)-Molecular Basis of Disease*. 2016. V. 1862. № 4. P. 733–740.
38. Kloetzel P.-M., Soza A., Stohwasser R. // *Biol. Chem.* 1999. V. 380. № 3. P. 293–297.
39. Tanaka K. // *Proceedings of the Japan Academy, Series B*. 2009. V. 85. № 1. P. 12–36.
40. Glickman M.H., Ciechanover A. // *Physiol. Rev.* 2002. V. 82. № 2. P. 373–428.
41. Цимоха А.С. // *Цитология*. 2010. Т. 52. № 4. С. 277–300.
42. Mukhopadhyay D., Riezman H. // *Science*. 2007. V. 315. № 5809. P. 201–205.
43. Seifert U., Krüger E. // *Biochem. Soc. Trans.* 2008. V. 36. № 5. P. 879–884.
44. Dahlmann B. // *BMC Biochemistry*. 2007. V. 8. № 1. P. 1.
45. Fenteany G., Standaert R.F., Lane W.S., Choi S. // *Science*. 1995. V. 268. № 5211. P. 726.
46. Orlowski M., Wilk S. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2000. V. 383. № 1. P. 1–16.
47. da Fonseca P.C., He J., Morris E.P. // *Mol. Cell*. 2012. V. 46. № 1. P. 54–66.
48. Smith D.M., Chang S.-C., Park S., Finley D., Cheng Y., Goldberg A.L. // *Mol. Cell*. 2007. V. 27. № 5. P. 731–744.
49. Ebstein F., Kloetzel P.M., Kruger E., Seifert U. // *Cell Mol. Life Sci.* 2012. V. 69. № 15. P. 2543–2558.
50. Pickering A.M., Davies K.J. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2012. V. 523. № 2. P. 181–190.
51. Zhang Z., Krutchinsky A., Endicott S., Realini C., Rechsteiner M., Standing K.G. // *Biochemistry*. 1999. V. 38. № 17. P. 5651–5658.
52. Hernebring M., Fredriksson A., Liljevald M., Cvijovic M., Norrman K., Wiseman J., Semb H., Nyström T. // *Sci. Rep.* 2013. V. 3. P. 1381.
53. Strehl B., Seifert U., Krüger E., Heink S., Kuckelkorn U., Kloetzel P.M. // *Immunol. Rev.* 2005. V. 207. № 1. P. 19–30.
54. Krüger E., Kuckelkorn U., Sijts A., Kloetzel P.-M., The components of the proteasome system and their role in MHC class I antigen processing, *Reviews of physiology, biochemistry and pharmacology*. Springer, 2003. P. 81–104.
55. Sijts A.J., Ruppert T., Rehmann B., Schmidt M., Koszinowski U., Kloetzel P.-M. // *J. Exp. Med.* 2000. V. 191. № 3. P. 503–514.
56. Boes B., Hengel H., Ruppert T., Multhaup G., Koszinowski U.H., Kloetzel P.-M. // *J. Exp. Med.* 1994. V. 179. № 3. P. 901–909.
57. Sato N., Sanjuan I.M., Heke M., Uchida M., Naef F., Brivanlou A.H. // *Dev. Biol.* 2003. V. 260. № 2. P. 404–413.
58. Assou S., Cerecedo D., Tondeur S., Pantesco V., Hovatta O., Klein B., Hamamah S., De Vos J. // *BMC Genomics*. 2009. V. 10. № 1. P. 1.
59. Baharvand H., Hajheidari M., Ashtiani S.K., Salekdeh G.H. // *Proteomics*. 2006. V. 6. № 12. P. 3544–3549.
60. Meshorer E., Misteli T. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2006. V. 7. № 7. P. 540–546.
61. Szutorisz H., Georgiou A., Tora L., Dillon N. // *Cell*. 2006. V. 127. № 7. P. 1375–1388.
62. Ogawa K., Nishinakamura R., Iwamatsu Y., Shimosato D., Niwa H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 343. № 1. P. 159–166.
63. James D., Levine A.J., Besser D., Hemmati-Brivanlou A. // *Development*. 2005. V. 132. № 6. P. 1273–1282.
64. Greber B., Lehrach H., Adjaye J. // *Stem Cells and Development*. 2008. V. 17. № 6. P. 1065–1078.
65. Hatakeyama S. // *JAKSTAT*. 2012. V. 1. № 3. P. 168–175.
66. Miyazono K., Ten Dijke P., Heldin C.-H. // *Advances in Immunology*. 2000. V. 75. P. 115–157.
67. Hernebring M., Brolén G., Aguilaniu H., Semb H., Nyström T. // *Proceedings of the National Academy of Sciences*. 2006. V. 103. № 20. P. 7700–7705.
68. Dudek E., Shang F., Valverde P., Liu Q., Hobbs M., Taylor A. // *The FASEB J*. 2005. V. 19. № 12. P. 1707–1709.
69. Pickering A.M., Koop A.L., Teoh C.Y., Ermak G., Grune T., Davies K.J. // *Biochemical J*. 2010. V. 432. № 3. P. 585–595.
70. Seifert U., Bialy L.P., Ebstein F., Bech-Otschir D., Voigt A., Schröter F., Prozorovski T., Lange N., Steffen J., Rieger M. // *Cell*. 2010. V. 142. № 4. P. 613–624.
71. Ebstein F., Voigt A., Lange N., Warnatsch A., Schröter F., Prozorovski T., Kuckelkorn U., Aktas O., Seifert U., Kloetzel P.-M. // *Cell*. 2013. V. 152. № 5. P. 935–937.
72. Park J.-A., Kim Y.-E., Ha Y.-H., Kwon H.-J., Lee Y.-H. // *BMB Rep.* 2012. V. 45. № 5. P. 299–304.
73. Konstantinova I.M., Tsimokha A.S., Mittenberg A.G. // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2008. V. 267. P. 59–124.
74. Tu Y., Chen C., Pan J., Xu J., Zhou Z.-G., Wang C.-Y. // *Int. J. Clin. Exp. Pathol.* 2012. V. 5. № 8. P. 726–738.
75. Babaie Y., Herwig R., Greber B., Brink T.C., Wruck W., Groth D., Lehrach H., Burdon T., Adjaye J. // *Stem Cells*. 2007. V. 25. № 2. P. 500–510.
76. Atkinson S.P., Collin J., Irina N., Anyfantis G., Kyung B.K., Lako M., Armstrong L. // *Stem Cells*. 2012. V. 30. № 7. P. 1373–1384.
77. Floyd Z.E., Staszkiwicz J., Power R.A., Kilroy G., Kirk-Ballard H., Barnes C.W., Strickler K.L., Rim J.S., Harkins L.L., Gao R., Kim J., Eilertsen K.J. // *Cell Reprogram.* 2015. V. 17. № 2. P. 95–105.
78. Cajigas I.J., Will T., Schuman E.M. // *EMBO J*. 2010. V. 29. № 16. P. 2746–2752.
79. Prigione A., Fauler B., Lurz R., Lehrach H., Adjaye J. // *Stem Cells*. 2010. V. 28. № 4. P. 721–733.
80. Kloetzel P.M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2004. V. 1695. № 1–3. P. 225–233.
81. Gaczynska M., Goldberg A.L., Tanaka K., Hendil K.B., Rock K.L. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 29. P. 17275–17280.
82. Ware C.B., Nelson A.M., Mecham B., Hesson J., Zhou W., Jonlin E.C., Jimenez-Caliani A.J., Deng X., Cavanaugh C., Cook S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 12. P. 4484–4489.
83. Nichols J., Smith A. // *Cell Stem Cell*. 2009. V. 4. № 6. P. 487–492.
84. Wang T. // *Frontiers in Biosci: J. Virtual Library*. 2003. V. 8. P. d1109–1127.

УДК 578.74

# Прогнозирование эволюционной изменчивости вируса гриппа А

Т. А. Тимофеева<sup>1\*</sup>, М. Н. Асатрян<sup>1</sup>, А. Д. Альштейн<sup>1,2,3</sup>, Б. С. Народицкий<sup>1,2</sup>,  
А. Л. Гинцбург<sup>1,2</sup>, Н. В. Каверин<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии им. Н.Ф.Гамалеи МЗ РФ, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М.Сеченова МЗ РФ, 119991, Москва, Б. Пироговская ул., 2

<sup>3</sup>Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул.Вавилова, 34/5

\*E-mail: timofeeva.fatjana@inbox.ru

Поступила в редакцию 16.01.2017

Принята к печати 14.08.2017

**РЕФЕРАТ** Из-за своей быстрой эволюционной изменчивости вирус гриппа А остается одним из наиболее распространенных и опасных возбудителей инфекционных заболеваний человека. Изучение эволюции вирусов гриппа А, которую можно наблюдать буквально в реальном времени, за последние годы испытало подъем благодаря накоплению экспериментальных данных (селекция эскейп-мутантов с последующим изучением их фенотипических характеристик, конструирование вирусов с заданными мутациями при помощи методов обратной генетики), появлению новых теоретических подходов, в основе которых лежит построение и анализ филогенетических деревьев штаммов вирусов гриппа, а также системному сочетанию известных математических методов (системы интегро-дифференциальных уравнений, статистические методы, методы теории вероятности) и имитационного моделирования. Длительная циркуляция высокопатогенных вирусов гриппа А вызывает серьезные опасения в отношении появления пандемически опасных вариантов, поэтому возникает необходимость в применении теоретических и экспериментальных методов для прогнозирования эволюционной изменчивости и вирусов подтипа Н5.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** вирус гриппа А, филогенетические деревья, эскейп-мутанты, математические методы, математическое моделирование, фенотипические характеристики, обратная генетика.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** HA – гемагглютинин вируса гриппа; NA – нейраминидаза вируса гриппа; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; МНС – главный комплекс гистосовместимости; Н1–Н18 – подтипы гемагглютинина вируса гриппа А; N1–N11 – подтипы нейраминидазы вируса гриппа А.

## ДОЛГАЯ ПРОБЛЕМА С КОРОТКИМ НАЗВАНИЕМ «ГРИПП»

Первый вирус гриппа человека был выделен В. Смитом, К. Эндрюсом и П. Лэйдлоу (W. Smith, C.H. Andrewes, P.P. Laidlaw) в Англии в 1933 году в Национальном институте медицинских исследований [1, 2]. За два года до этого, в 1931 году, Р. Шоуп (R.E. Shope) в США выделил вирус гриппа свиней [3, 4]. За прошедшие 85 лет накоплена обширная информация о структурно-функциональных свойствах вирусов гриппа, патогенезе гриппозной инфекции, реакциях адаптивного и естественного иммунитета. Вирус гриппа до сих пор остается одним из наиболее распространенных и опасных возбудителей инфекционных заболеваний человека. Он способен вызывать эпидемии и пандемии, сопровождающиеся высокой смертностью населения и огромными экономическими потерями. Причиной этого является быстрая эволюция вируса гриппа А, его приспособляемость к человеческой популяции с меняющимся состоянием ее специфического иммунитета и неизменными меха-

низмами естественного иммунитета. Особое значение во взаимоотношении вируса с популяцией человека имеют его фенотипические характеристики: 1) способность заражать клетки верхних дыхательных путей (рецепторсвязывающая активность); 2) способность «ускользнуть» от специфических иммунных реакций организма; 3) способность образовывать инфекционное потомство. Первая и вторая характеристики зависят преимущественно от поверхностных белков вириона, вклад в третью могут вносить все вирусные белки. В основе изменения этих характеристик лежат разные механизмы изменчивости вирусного генома.

На вирус гриппа, попавший в организм, воздействуют две формы иммунного ответа. Гуморальному иммунному ответу, представленному, в основном, нейтрализующими антителами к поверхностным белкам – гемагглютинином (HA) и нейраминидазе (NA), принадлежит ведущая роль в защите от инфекции. Антитела против гемагглютинина наиболее важны для нейтрализации вируса и предотвраще-

ния заболевания [5]. Антитела против нейраминидазы менее эффективно предотвращают инфекцию, но сдерживают ее развитие, препятствуя высвобождению вируса из зараженных клеток [6]. Основную роль в защите от инфекции играют антитела к поверхностным гликопротеинам, однако антитела образуются и к консервативным внутренним антигенам М и NP, но они не являются вируснейтрализующими антителами [7]. Клеточный иммунный ответ действует на этапе уничтожения зараженных вирусом клеток, он представлен вирусспецифическими цитотоксическими Т-лимфоцитами, которые распознают иммунодоминантные сайты внутренних белков вируса гриппа (матриксного белка М1 и нуклеопротеина NP), представленные через молекулы главного комплекса гистосовместимости (МНС) [8].

От гуморального иммунного ответа организма вирус благополучно «уходит» при помощи механизма антигенного дрейфа [9] – накопления точечных мутаций, приводящих к изменению структуры поверхностных гликопротеинов вириона, вследствие чего специфические антитела перестают узнавать вирус. От клеточного иммунного ответа вирус также «защищается» путем антигенного дрейфа, суть которого состоит в накоплении точечных мутаций уже в иммунодоминантных сайтах внутренних белков [8]. Еще один из основных механизмов изменчивости вируса гриппа – это антигенный сдвиг – механизм реассортации фрагментов генома, который приводит к появлению новых пандемических вариантов [10]. Генетический материал вируса гриппа сегментирован – представлен отдельными блоками нуклеиновой кислоты, которые реплицируются в клетке независимо один от другого. Это позволяет разным вирусам гриппа А легко скрещиваться, образуя гибриды, которые называются реассортантами. Если два вируса гриппа А (птичий и человеческий) заразят одну и ту же клетку, то в вирусном потомстве многие вирусные частицы окажутся гибридными, получившими некоторые гены от птичьего вируса-родителя, а некоторые от человеческого.

Менее ясна роль других механизмов, обеспечивающих изменчивость вируса гриппа, таких, как образование дефектных частиц [11] и межмолекулярная рекомбинация. Хотя у вирусов с негативным РНК-геномом, к которым относится вирус гриппа, рекомбинация происходит достаточно редко, показано включение в ген *НА* клеточной мРНК. Это придает вирусу способность к многоцикловогой инфекции в клеточной культуре без трипсина, что обычно коррелирует с высокой вирулентностью [12]. Не исключено, что подобные события могут быть фактором быстрых эволюционных изменений вируса гриппа А.

## **МНОГООБРАЗИЕ ВИРУСОВ ГРИППА А В ПРИРОДЕ И ИХ ЭВОЛЮЦИЯ**

Вирусы гриппа А, циркулирующие в природе и выделенные от человека, а также от разных видов млекопитающих и птиц, характеризуются значительным структурным разнообразием гликопротеинов оболочки – гемагглютинаина и нейраминидазы. В настоящее время у вирусов гриппа А описано 18 (Н1–Н18) подтипов гемагглютинаина и 11 (N1–N11) подтипов нейраминидазы [13]. Потенциальными возбудителями будущих пандемий могут стать вирусы с гемагглютинаинами подтипов Н1, Н2, Н3, Н5, Н6, Н7, Н9 и Н10 и нейраминидазами подтипов N1, N2, N3 и N8, которые вызывают заболевания у людей, в том числе спорадические. Из известных нам пандемий гриппа самой страшной была знаменитая «испанка» 1918 года, унесшая по разным оценкам от 50 до 100 миллионов жизней, поэтому хотелось бы иметь способы предсказания таких событий заранее.

Сезонным же эпидемиям гриппа достаточно эффективно противостоят вакцины, рекомендованные ВОЗ. Однако в результате быстрой эволюции вируса состав таких вакцин приходится обновлять практически каждый год. Изучение эволюции вирусов гриппа необходимо для того, чтобы научиться предсказывать, какой именно вариант вызовет эпидемию (или, возможно, пандемию) и своевременно создавать эффективные средства защиты.

Поскольку эволюцию вируса гриппа можно наблюдать буквально в реальном времени, в последние годы изучение эволюции вирусов гриппа А испытало подъем благодаря как накоплению экспериментальных данных, так и появлению новых теоретических подходов.

## **ТЕОРЕТИЧЕСКИЕ ПОДХОДЫ К ПРОГНОЗИРОВАНИЮ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВИРУСОВ ГРИППА А**

Мы остановимся на теоретических подходах, которые, на наш взгляд, наиболее перспективны для прогнозирования эволюционной изменчивости вирусов гриппа А. В основе этих подходов лежит построение и анализ филогенетических деревьев штаммов вирусов гриппа, а также специальный математический аппарат (системы интегро-дифференциальных уравнений, статистические методы, методы теории вероятности, имитационное моделирование) [14, 15].

Филогенетические деревья отражают эволюционные взаимосвязи между различными видами или другими биологическими сущностями, имеющими общего предка. Такие деревья строятся в несколько этапов: 1) сначала составляется выборка нуклеотидных и аминокислотных последовательностей; 2) затем производится множественное выравнивание;

3) далее осуществляется непосредственно построение дерева с использованием различных математических методов (например, метода максимального правдоподобия, метода ближайших соседей, матричных методов, метода максимальной бережливости); 4) и, наконец, производится визуализация и редактирование дерева. В настоящее время широко используется обширное программное обеспечение и интернет-ресурсы, предназначенные для визуализации филогенетических деревьев вируса гриппа А [16].

В одном из рассматриваемых подходов анализируют влияние положительного эпистаза на эволюцию вируса гриппа [17, 18]. К эпистатическим мутациям относятся парные мутации, появление одной из которых влияет на появление другой. При использовании филогенетических деревьев белков NA и HA (подтипов H3N2 и H1N1) на основе данных NCBI's Influenza Virus Resource [19] разработан статистический метод, позволяющий своевременно выявить признаки будущих эпистатических (парных) мутаций. Для построения филогенетических деревьев в этом подходе используется метод ближайших соседей. Суть метода заключается в обнаружении пар частей белка, интервалы на филогенетическом дереве между последовательными мутациями которых значительно ниже средних показателей, т.е. за основу взято предположение, что мутация в одной части белка ускоряет появление мутации в другой. Эти взгляды практически не учитываются при прогнозировании состава вакцин, но, тем не менее, могут быть очень важными.

Другой подход к прогнозированию предлагает способ определения клад (единицы популяции, более крупные, чем штамм) филогенетического дерева, которые будут «развиваться» (увеличивать свою частотность) в следующем сезоне или, наоборот, «затухать». Для этого разрабатывается «модель приспособляемости» [20] гемагглютинаина вируса гриппа А подтипа H3, которая предсказывает эволюцию популяции вируса от года к году и предлагает принципиальный способ выбора вакцины. Частотностью (концентрацией) штамма называется доля популяции носителей вируса, инфицированных данным штаммом. Частотностью клады в некотором сезоне считается сумма всех частотностей штаммов этого сезона, находящихся в данной кладе. Приспособляемостью (скоростью развития) штамма называется параметр, влияющий на увеличение или уменьшение частотности его дочерних штаммов в следующем сезоне [14]. При построении филогенетических деревьев в этом подходе используют метод максимального правдоподобия.

Для прогнозирования эволюционной изменчивости вирусов гриппа А с использованием этих подходов необходима максимально полная база данных нукле-

отидных последовательностей генов вируса гриппа, определенных к настоящему времени.

Чтобы построенные филогенетические деревья можно было считать максимально приближенными к реальности, исходные данные должны пройти тщательный отбор по критериям (наличие полноразмерных нуклеотидных последовательностей штаммов вируса гриппа А, их территориальное распределение и т.д.), которые могут улучшить их положение с точки зрения репрезентативности.

Хороший способ проверки построенного дерева и, как следствие, правильности критериев отбора заключается в сравнении эскейп-мутантов (от англ. escape – убегающий, ускользающий), полученных от некоторого штамма вируса, и ветвей филогенетического дерева, где «родительским» узлом является вышеназванный штамм. Эскейп-мутанты – это варианты вируса, устойчивые к нейтрализующему действию того или иного моноклонального антитела. Если последовательности эскейп-мутантов нашли свое отражение на филогенетическом дереве, то они должны находиться в ветвях, происходящих от исходного вируса. Если картина иная, то возможны различные объяснения, но наиболее вероятны либо ошибка при отборе данных для дерева, либо ошибка в его построении.

### **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ К ПРОГНОЗИРОВАНИЮ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВИРУСОВ ГРИППА А**

Как и в случае теоретических подходов, для реализации экспериментальных подходов к прогнозированию эволюционной изменчивости вирусов гриппа А необходим анализ нуклеотидных последовательностей циркулирующих штаммов с использованием базы данных. При этом в результате экспериментальной работы база данных пополняется новыми штаммами – нуклеотидными последовательностями эскейп-мутантов. Классическая методика получения эскейп-мутантов по гемагглютинуину в лабораторных условиях описана еще в 1980 году [21]. После селекции эскейп-мутантов дальнейшее использование трехмерной структуры молекулы в сочетании с техникой секвенирования вирусных генов позволяет локализовать сайты (или отдельные аминокислотные остатки), распознаваемые нейтрализующими антителами. В трехмерной структуре молекулы эскейп-мутантов эти сайты (выступы, петли, «карманы») распределяются неслучайным образом.

Впервые сайты связывания с антителами были выявлены в трехмерной структуре молекулы гемагглютинаина H3, поскольку в течение 20 лет (с 1981 по 2001 год) это был единственный подтип, трехмерная структура которого была определена с помощью

рентгеноструктурного анализа [22, 23]. В настоящее время хорошо изучены сайты взаимодействия с антителами эскейп-мутантов потенциально пандемических подтипов НА, таких, как Н1 [24–26], Н2 [26, 27], Н3 [26, 28], Н5 [26, 29–31] и Н9 [26, 32], очень слабо – Н7 [33], для подтипов Н6 и Н10 данные отсутствуют.

Из-за быстрой изменчивости вирусов гриппа А область сайтов взаимодействия гемагглютинаина с антителами у эскейп-мутантов изменяется и постоянно расширяется. Поэтому возникает необходимость не только в изучении гемагглютининов тех подтипов, которые мало изучены или не изучены ранее (Н6, Н7 и Н10), но также в выявлении сайтов взаимодействия с антителами гемагглютинаина новых вариантов вируса, появляющихся в ходе эволюции уже изученных подтипов (Н1, Н2, Н3, Н5, Н9). Такая задача становится особенно актуальной, если появляется новый вариант вируса гриппа человека, вызывающий мощную эпидемическую вспышку.

Для прогнозирования эволюционной изменчивости вируса гриппа А важно учитывать вариации не только гемагглютинаина, но и другого поверхностного белка – нейраминидазы, поскольку именно в результате слаженного функционирования генов этих белков возможно появление новых эволюционно наиболее успешных вариантов вируса. Поэтому изучение в лабораторных условиях эскейп-мутантов нейраминидазы и гемагглютинаина началось практически одновременно.

### **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ПОДХОДЫ, СПОСОБСТВУЮЩИЕ ПРОГНОЗИРОВАНИЮ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ ВИРУСА ГРИППА**

Для предсказания распространения того или иного варианта вируса в природных условиях недостаточно просто определить сайты поверхностных белков (как гемагглютинаина, так и нейраминидазы), отвечающие за взаимодействие с антителами.

Необходимо проводить **скрининг природных изолятов** вируса гриппа А, циркулировавших в предшествующие годы, с целью обнаружения вариантов вируса, полученных в лаборатории. Оказалось, что не все мутации, зарегистрированные у лабораторных эскейп-мутантов, встречаются в природных изолятах вируса гриппа А. Причинами такого несоответствия могут быть дополнительные **фенотипические эффекты**, вызванные мутациями. Поэтому очень важно изучение фенотипических свойств эскейп-мутантов, в первую очередь, вирулентности и сродства к аналогам клеточных рецепторов («птичьего» и «человеческого» типов), уровня репликации и репродуктивной активности при различных температурах

и, наконец, устойчивости по отношению к факторам окружающей среды (температуре, рН).

Например, при изучении влияния аминокислотных замен в молекуле гемагглютинаина вирусов гриппа на фенотипические свойства таких потенциально пандемических подтипов, как Н5 и Н9, было замечено, что эскейп-мутанты подтипа Н9 [34] более консервативны в фенотипических вариациях, в то время как у эскейп-мутантов подтипа Н5 [35, 36] все фенотипические характеристики изменялись в зависимости от аминокислотных замен в молекуле гемагглютинаина. Геном вирусов гриппа подтипа Н9 более стабилен и не обнаруживает такой вариабельности при циркуляции в природных условиях, как геном вирусов Н5. Этот факт хорошо согласуется с экспериментальными результатами [34].

Таким образом, изучение влияния аминокислотных замен на фенотипические свойства эскейп-мутантов позволяет ограничить множество отобранных в лаборатории предполагаемых эволюционно удачных вариантов вируса и попытаться прогнозировать активность таких вариантов при циркуляции в природе.

**Но вариации фенотипических свойств вирусов** гриппа могут быть обусловлены мутациями не только в поверхностных, но и в других белках. Следовательно, для строгого доказательства зависимости фенотипических свойств вируса от мутаций в той или иной позиции молекулы гемагглютинаина (или другого вирусного белка) необходимо с помощью **методов обратной генетики** сконструировать вирусы с точно заданными мутациями и изучить их фенотипические свойства, тем самым подтвердить и ограничить множество прогнозируемых штаммов.

При прогнозировании эволюционной изменчивости вирусов подтипа Н5 в направлении пандемически опасных вариантов необходимо обращать внимание на важные регионы молекулы НА, мутации в которых могут приводить к усилению патогенных свойств вируса гриппа А. Такими участками могут быть:

- рецепторсвязывающий сайт, отвечающий за взаимодействие с клеточными рецепторами;
- сайты, отвечающие за связывание с антителами (антигенные сайты);
- сайт гликозилирования, играющий важную роль в созревании молекулы НА;
- сайт нарезания, имеющий большое значение для инфекционности вируса.

В связи с этим возникает необходимость в применении теоретических и экспериментальных методов для прогнозирования эволюционной изменчивости вирусов и подтипа Н5.

Внимание к вирусам гриппа А подтипа Н5 не ослабевает с 1997 года, когда впервые у людей за-

регистрировали респираторную инфекцию, вызванную этими вирусами [37]. В настоящее время смертность от заболевания, вызванного подтипом H5, составляет около 53%, что почти в 5 раз выше, чем при знаменитой «испанке». На данный момент вирус не способен передаваться от человека к человеку, в частности, из-за специфичности связывания с рецепторами «птичьего», а не «человеческого» типа [38], но при приобретении такой способности последствия могут оказаться катастрофическими для всего человечества.

В случае вирусов подтипа H5 построению филогенетических деревьев особенно затрудняет неполная представленность данных в базе нуклеотидных последовательностей. Расширить базу данных мы можем путем ее пополнения нуклеотидными последовательностями эскейп-мутантов подтипа H5, отдавая при этом себе отчет, что такие данные, полученные в экспериментальных условиях, могут быть использованы как промежуточные узлы к реально зарегистрированным (природным) штаммам.

#### ЧТО ОТДЕЛЯЕТ НАС ОТ ПАНДЕМИИ, ВЫЗВАННОЙ «ПТИЧЬИМ» ГРИППОМ?

Для того чтобы вирус гриппа птиц подтипа H5 приобрел не только способность к распространению в человеческой популяции, но и эволюционно удачные фенотипические характеристики, необходимы изменения, на которые может потребоваться не очень много времени.

В лабораторных условиях показано [39, 40], что всего нескольких мутаций в молекуле HA циркулирующего штамма H5N1 достаточно, чтобы вирус приобрел способность к передаче воздушно-капельным путем и стал пандемически опасным. Эти мутации (рис. 1) располагаются в районе рецепторсвязывающего сайта (N224K, Q226L – обозначены красным цветом), в стержневом регионе (T318I – зеленый) и зоне поверхностного контакта тримеров (H107Y – синий), а также в области сайта гликозилирования (N158D, T160A – показаны желтым). На основе филогенетического анализа гена HA были предсказаны позиции аминокислотных остатков, отвечающих за распространение вируса H5N1 среди млекопитающих [41]. Это позиции 186, 226 и 228, расположенные в рецепторсвязывающем сайте, и 160 в сайте гликозилирования. Локализация двух теоретически предсказанных и экспериментально выявленных позиций полностью совпадает. Следует отметить, что предсказанные позиции располагаются в важных регионах молекулы HA – рецепторсвязывающем сайте и сайте гликозилирования. При этом, что важно, в их число входит и позиция 186, которая встречается у экспериментально отобранных эскейп-мутантов

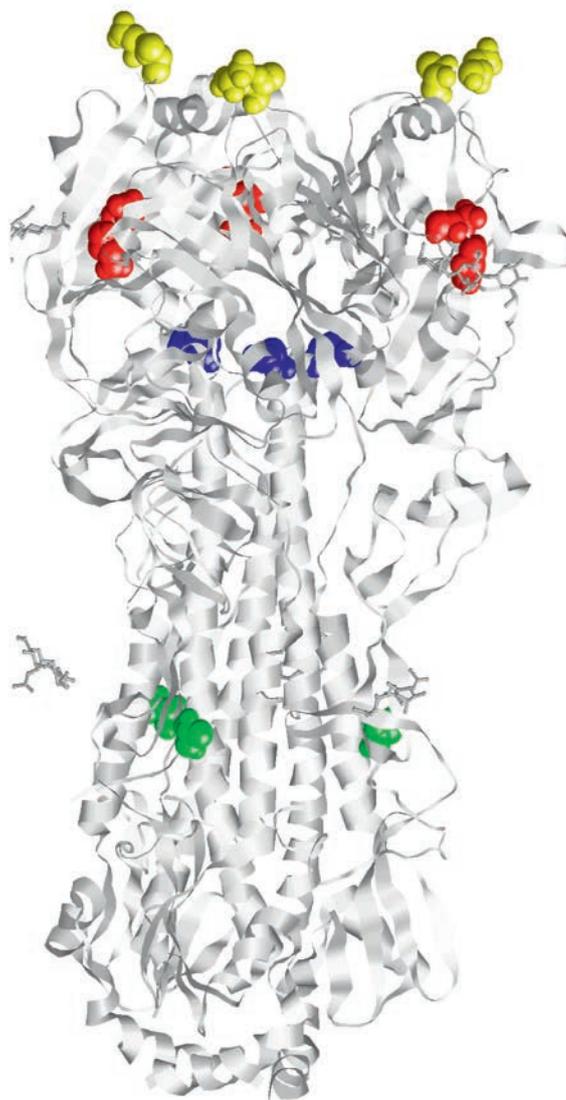
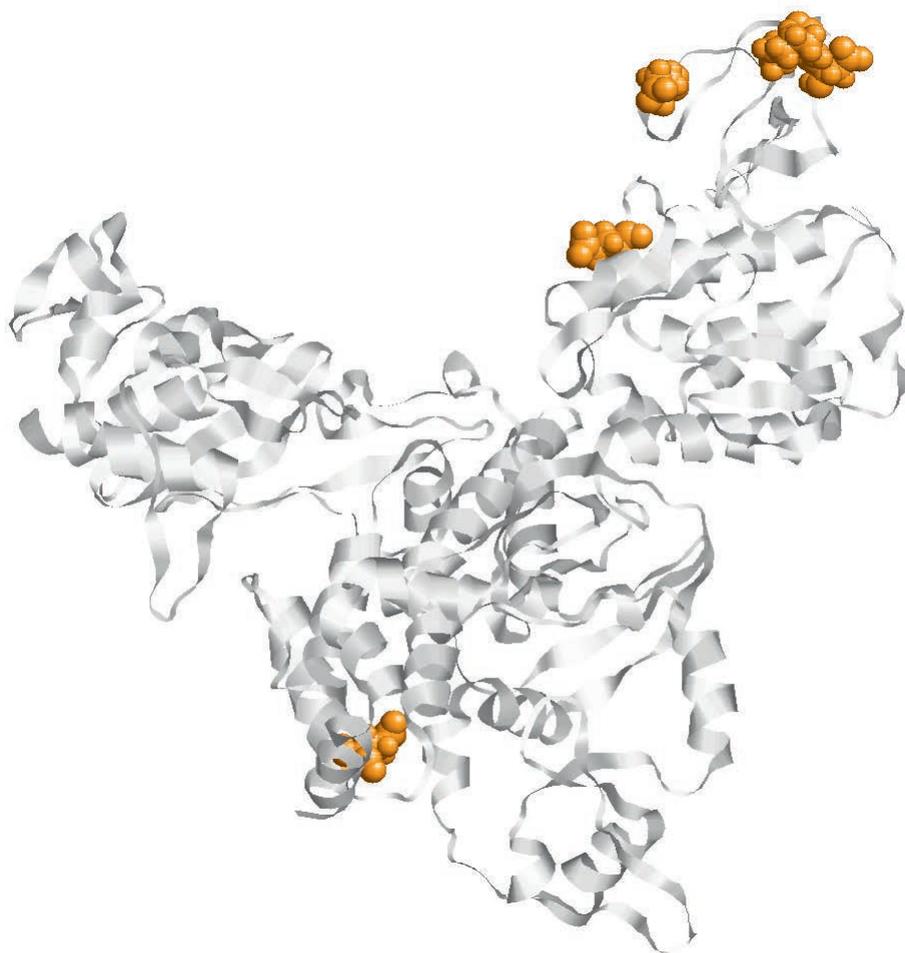


Рис. 1. Локализация в тримере молекулы гемагглютинаина H5 аминокислотных остатков, мутации в которых способствуют распространению высокопатогенных вирусов H5N1 среди млекопитающих [39, 40]

[36]. В настоящее время в молекуле HA выявлены дополнительные новые стабилизирующие (эволюционно-удачные) мутации, сопряженные с мутациями, изменяющими рецепторную специфичность высокопатогенных вирусов H5N1 в сторону «человеческого» типа [42].

Таким образом, **детальный структурно-функциональный анализ** рецепторсвязывающего сайта, антигенных сайтов, сайта нарезания, сайта гликозилирования гемагглютининов различных подтипов вируса гриппа А создает основу для анализа эволюционных



**Рис. 2.** Локализация в мономере молекулы белка PB2 аминокислотных остатков, мутации в которых способствуют распространению высокопатогенных вирусов H5N1 среди млекопитающих [44]

изменений этих подтипов и открывает новые возможности для прогнозирования появления в природе вариантов, которые отбираются в лабораторных условиях.

#### **ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ ФАКТОРЫ, НЕОБХОДИМЫЕ ДЛЯ ПРОГНОЗИРОВАНИЯ ЭВОЛЮЦИОННОЙ ИЗМЕНЧИВОСТИ «ПТИЧЬЕГО» ГРИППА**

Способность высокопатогенных вирусов H5N1 передаваться среди млекопитающих связана с мутациями не только в гемагглютинине, но и в белке полимеразного комплекса PB2 – кеп-распознающей эндонуклеазе, вовлеченной в инициацию транскрипции вирусной мРНК и играющей важную роль в процессе репликации вируса [43]. В генах полимеразного комплекса, который отвечает за передачу вируса среди млекопитающих, недавно был выявлен целый набор мутаций – это, помимо известной мутации E627K в белке PB2, аминокислотные замены E192K, E627V, D701V, K702R в PB2 (рис. 2) и N105S в белке PB1 [44]. Теоретическое предсказание аминокислотных остатков, отвечающих за передачу вируса

подтипа H5N1 среди млекопитающих, основанное на филогенетическом анализе гена PB2 [45], включает позиции 590, 627 и 701. В двух случаях теоретически предсказанные позиции полностью совпадают с определенными экспериментально – 627 и 701 [41].

До недавнего времени считалось, что эскейп-мутации сосредоточены только в высоковариабельных поверхностных белках вируса гриппа. В последние годы появились работы, доказывающие существование таких мутаций в сайтах внутренних – консервативных – белков, в частности, в белке нуклеопротеина (NP). Исходно белок NP был охарактеризован как высококонсервативный. Но дальнейшие серологические исследования с помощью поликлональных или моноклональных антител показали, что белок NP подвержен изменчивости. Однако селекция эскейп-мутантов не применима к сайтам белка NP вируса гриппа А, отвечающим за взаимодействие с антителами, поскольку анти-NP-антитела не обладают нейтрализующей активностью. Поэтому в этом случае можно использовать сайт-специфический мутагенез с последующим тестированием получен-

ного в прокариотической системе белка в иммуноферментном анализе. Все обнаруженные антигенно значимые аминокислотные остатки являются вариabельными, и в 3D-структуре они «разбросаны» по поверхности молекулы белка NP [45]. Определено также расположение и структура компактного антигенного сайта в домене тела молекулы NP вируса гриппа А [46].

Для прогнозирования эволюционной изменчивости вирусов гриппа А необходимо учитывать также влияние мутаций не только в поверхностных, но и во внутренних белках.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, вирус гриппа остается одним из наиболее распространенных и опасных возбудителей инфекционных заболеваний человека. Он способен вызывать эпидемии и пандемии, сопровождающиеся высокой смертностью среди населения и огромными экономическими потерями. Причина этого заключается в быстрой эволюции и приспособляемости вируса гриппа А к человеческой популяции с ее меняющимся состоянием специфического иммунитета и неизменными механизмами естественного иммунитета.

Поскольку эволюцию вируса гриппа можно наблюдать буквально в реальном времени, то в последние годы изучение эволюции вирусов гриппа А испытало подъем благодаря как накоплению значительного количества экспериментальных данных (селекция эскейп-мутантов с последующим изучением их фенотипических характеристик, конструирование вирусов со строго заданными мутациями при помощи методов обратной генетики), так и появлению новых подходов, в основе которых лежит построение и анализ филогенетических деревьев штаммов вирусов гриппа, а также системное сочетание математических методов (системы интегро-дифференциальных уравнений, статистические методы, методы теории вероятности) и имитационного моделирования.

Чтобы построенные филогенетические деревья можно было считать максимально приближенными к реальности, исходные данные должны пройти

тщательный отбор по критериям (наличие полных нуклеотидных последовательностей штаммов вируса гриппа А, их территориальное распределение и т.д.), которые могут улучшить положение с точки зрения их репрезентативности. Хороший способ проверки построенного дерева и, как следствие, правильности критериев отбора заключается в сравнении эскейп-мутантов, полученных от некоторого штамма вируса, и ветвей филогенетического дерева, где «родительским» узлом является вышеназванный штамм.

В результате изучения влияния аминокислотных замен на фенотипические свойства эскейп-мутантов можно ограничить множество отобранных в лаборатории предполагаемых эволюционно удачных вариантов вируса и попытаться прогнозировать их активность при циркуляции в природе. Однако вариации фенотипических свойств вирусов гриппа могут быть обусловлены мутациями не только в гене *HA*, но и в других генах. Следовательно, для строгого доказательства зависимости фенотипических свойств вируса от мутаций в той или иной позиции молекулы гемагглютинина (или другого белка) необходимо с помощью методов обратной генетики сконструировать вирусы с заданными мутациями путем использования и выявления фенотипических свойств таких вирусов.

Постройка филогенетических деревьев вирусов подтипа Н5 затрудняется неполной представленностью данных в базе нуклеотидных последовательностей. Расширить базу данных можно путем ее пополнения нуклеотидными последовательностями эскейп-мутантов Н5, учитывая при этом, что полученные в экспериментальных условиях данные, могут использоваться как промежуточные узлы к реально зарегистрированным (природным) штаммам.

Для прогнозирования эволюционной изменчивости вирусов гриппа А необходимо учитывать влияние мутаций не только в поверхностных (*HA* и *NA*), но и во внутренних белках (*NP*, *M1*, *M2*, *P*).

Используя системное сочетание современных подходов и накопленный экспериментальный опыт, можно проводить исследования с целью прогнозирования эволюционной изменчивости вирусов гриппа А. ●

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smith W., Andrewes C.H., Laidlaw P.P. // *Lancet*. 1933. P. 66–68.
2. Smith W., Andrewes C.H., Laidlaw P.P. // *Br. J. Exp. Pathol*. 1935. V. 16. P. 291–302.
3. Shope R.E. // *J. Exp. Med*. 1931. V. 54. P. 373–385.
4. Shope R.E. // *J. Exp. Med*. 1934. V. 62. P. 49–61.
5. Донина С.А., Найхин А.Н., Руденко Л.Г. // *Аллергология и иммунология*. 2000. № 1. С. 114.
6. Cox R.J., Brokstad K.A., Ogra P. // *Scand. J. Immunol*. 2004. V. 59. № 1. P. 1–15.
7. Askonas B.A., McMichael A.J., Webster R.G. // *Basic and Applied Influenza Research*. / Ed. Beare A.S. Boca Raton, FL: CRC Press, 1982. P. 159–188.
8. Найхин А.Н., Лосев И.В. // *Вопросы вирусологии*. 2015. Т. 60. С. 11–16.
9. Both G.W., Sleight M.J., Cox N.J., Kendal A.P. // *J. Virol*. 1978. V. 75. P. 4886–4890.
10. Lamb R.A., Krug R.M. // *Orthomyxoviridae. Fields virology. Section 2, Specific Virus Families* / Eds B.N. Fields and D.M. Knipe. Lippincott, Williams, Wilkins, 2001. P. 1091–1137.

11. Steinhauer D.A., Holland J.J. // *Annu. Rev. Microbiol.* 1987. V. 41. P. 409–433.
12. Khatchikian D., Orlich M., Rott R. // *Virology.* 1982. V. 122. P. 38–47.
13. Webster R.G., Govorkova E.A. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2014. V. 1323. P. 115–139.
14. Strelkova N., Lassig M. // *Genetics.* 2012. V. 192. P. 671–682.
15. Shih A.C.-C., Hsiao T.-C., Ho M.-S., Li W.-H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. P. 6283–6288.
16. Neher R.A., Bedford T. // *Bioinformatics.* 2015. V. 31(21). P. 3546–3548.
17. Kryazhimskiy S., Dushoff J., Bazykin G.A., Plotkin J.B. // *PLoS Genet.* 2011. V. 7. e101301.
18. Neverov A.D., Kryazhimskiy S., Plotkin J.B., Bazykin G.A. // *PLoS Genet.* 2015. V. 11(8). e1005404.
19. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/genome/FLU>.
20. Luksza M., Lassig M. // *Nature.* 2014. V. 507. P. 57–74.
21. Webster R.G., Laver W.G. // *Virology.* 1981. V. 104. P. 139–148.
22. Wilson I.A., Skehel J.J., Wiley D.C. // *Nature.* 1981. V. 289. P. 366–373.
23. Skehel J.J., Stevens D.J., Daniels R.S., Douglas A.R., Knosow M., Wilson I.A., Wiley C.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1984. V. 81. P. 1779–1783.
24. Caton A.J., Browlee G.G., Yewdell J.W., Gerhard W. // *Cell.* 1982. V. 31. P. 417–427.
25. Rudneva I., Ignatieva A., Timofeeva T., Shilov A., Kushch A., Masalova O., Klimova R., Bovin N., Mochalova L., Kaverin N. // *Virus Res.* 2012. V. 166. P. 61–67.
26. Каверин Н.В., Руднева И.А., Тимофеева Т.А., Игнатьева А.В. // *Вопросы вирусологии, Приложение 1.* 2012. С. 148–158.
27. Tsuchiya E., Sugawara K., Hongo S., Matsuzaki Y., Muraki Y., Li Z.N., Nakamura K. // *J. Gen. Virol.* 2001. V. 82. P. 2475–2484.
28. Wiley D.C., Wilson I.A., Skehel J.J. // *Nature.* 1981. V. 289. P. 373–378.
29. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Ilyushina N.A., Varich N.L., Lipatov A.S., Smirnov Y.A., Govorkova E.A., Gitelman A.K., Lvov D.K., Webster R.G. // *J. Gen. Virol.* 2002. V. 83. P. 2497–2505.
30. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Govorkova E.A., Timofeeva T.A., Shilov A.A., Kochergin-Nikitsky K.S., Krylov P.S., Webster R.G. // *J. Virol.* 2007. V. 81. P. 12911–12917.
31. Rudneva I.A., Kushch A.A., Masalova O.V., Timofeeva T.A., Klimova R.R., Shilov A.A., Ignatieva A.V., Krylov P.S., Kaverin N.V. // *Viral Immunol.* 2010. V. 23. № 2. P. 181–187.
32. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Ilyushina N.A., Lipatov A.S., Krauss S., Webster R.G. // *J. Virol.* 2004. V. 78. № 1. P. 240–249.
33. Schmeiser F., Vasudevan A., Verma S., Wang W., Alvarado E., Weiss C., Autokorale V., Maseda G., Weir J.P. // *PLoS One.* 2015. V. 10(1). e0117108.
34. Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Ignatieva A.V., Shilov A.A., Ilyushina N.A. // *Arch. Virol.* 2016. V. 161. P. 3515–3520.
35. Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Ignatieva A.V., Shilov A.A., Krylov P.S., Ilyushina N.A., Kaverin N.V. // *Virology.* 2013. V. 447. P. 233–239.
36. Kaverin N.V., Rudneva I.A., Timofeeva T.A., Ignatieva A.V., Shilov A.A., Bovin N.V., Ilyushina N.A. // *Virus Res.* 2015. V. 210. P. 81–89.
37. Centers for Disease Control and Prevention (CDC) // *MMWR Morb. Mortal Wkly Rep.* 1997. V. 46(50). P. 1204–1207.
38. Matrosovich M., Zhou N., Kawaoka Y., Webster R. // *J. Virol.* 1999. V. 73. P. 1146–1155.
39. Imai M., Watanabe T., Hatta M., Das S.C., Ozawa M., Shinya K., Zhong G., Hanson A., Katsura H., Watanabe S., et al. // *Nature.* 2012. V. 486. № 7403. P. 420–428.
40. Russell C.A., Fonville J.M., Brown A.E., Burke D.E., Smith D.L., James S.L., Herfst S., van Boheemen S., Linster M., Schrauwen E.J., et al. // *Science.* 2012. V. 336. P. 1541–1547.
41. Zhang Z.-W., Liu T., Zeng J., Chen Y.-E., Yuan M., Zhang D.-W., Zhu F., Yuan S. // *Infectious of Poverty.* 2015. V. 4. № 50. P. 2–9.
42. Hanson A., Imai M., Hatta M., McBride R., Imai H., Taft A., Zhong G., Watanabe T., Suzuki Y., Neumann G., et al. // *J. Virol.* 2016. V. 90. № 6. P. 2981–2992.
43. Plotch S.J., Bouloy M., Krug R.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. P. 1618–1622.
44. Taft A.S., Ozawa M., Fitch A., Depasse J.V., Halfmann P.J., Hill-Batorski L., Hatta M., Fridrich T.C., Lopes T.J.S., Maher E.A., et al. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. № 7491. P. 1–12.
45. Varich N.L., Sadykova G.K., Prilipov A.G., Kochergin-Nikitsky K.S., Kushch A.A., Masalova O.V., Klimova R.R., Gitelman A.K., Kaverin N.V. // *Viral Immunol.* 2011. V. 24. № 2. P. 1–7.
46. Varich N.L., Sadykova G.K., Prilipov A.G., Kochergin-Nikitsky K.S., Webster R.G., Kaverin N.V. // *Arch. Virology.* 2014. V. 159. P. 1493–1497.

УДК 571.27

# Рецепторы смерти: новые возможности в терапии онкологических заболеваний

В. М. Украинская<sup>1</sup>, А. В. Степанов<sup>1,2\*</sup>, И. С. Глаголева<sup>2</sup>, В. Д. Кнорре<sup>1</sup>, А. А. Белогуров<sup>1,2</sup>, А. Г. Габибов<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, 420008, Казань, ул. Кремлевская, 18

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

Поступила в редакцию 12.01.2017

Принята к печати 02.06.2017

**РЕФЕРАТ** В представленном обзоре рассмотрены подходы к терапии опухолей с использованием клеточных рецепторов смерти. Описано строение и функционирование рецепторов смерти и их лигандов. Охарактеризованы направления разработки агонистов рецепторов смерти и проведен их сравнительный анализ. Также рассмотрены антитела – агонисты рецепторов DR4 и DR5, находящиеся на различных этапах клинических исследований. Сделан вывод, что усовершенствование агонистов рецепторов смерти предполагает повышение их стабильности, растворимости и периода полувыведения, а также преодоление резистентности опухолевых клеток. Для эффективного применения антител требуется более подробное изучение их комбинаций с другими противоопухолевыми агентами.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** апоптоз, рецепторы смерти, DR4, DR5, ФНО, опухолевые клетки.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ФНО – фактор некроза опухоли; DR4 – рецептор смерти 4; DR5 – рецептор смерти 5.

## ВВЕДЕНИЕ

Основными методами терапии онкологических заболеваний являются химиотерапия в комбинации с хирургическим вмешательством. В силу отсутствия селективности по отношению к злокачественным клеткам эта стратегия приводит к разнообразным побочным эффектам и возможным осложнениям. Поэтому привлекательной выглядит идея создания специфичных препаратов, направленно подавляющих развитие раковых клеток, таких, как антитела и их производные [1]. Важным этапом в разработке противоопухолевых препаратов стало создание инициирующих апоптоз агентов. Известно, что при злокачественной трансформации часто нарушаются пути активации апоптоза – физиологического процесса, регулирующего количество клеток и играющего ключевую роль в элиминации поврежденных, ненужных или зараженных клеток [2]. Все более глубокое понимание механизмов регуляции программируемой гибели клеток привело к появлению новых агентов, способных перезапустить апоптоз в злокачественных клетках. Основную долю современных терапевтических агентов, инициирующих апоптоз,

составляют низкомолекулярные вещества, которые часто вызывают развитие системных осложнений [3].

Принципиально другой мишенью противоопухолевой терапии является поиск агонистов суперсемейства рецепторов фактора некроза опухоли (tumor necrosis factor receptor superfamily, TNFRSF). Отдельную группу в данном суперсемействе составляют так называемые рецепторы смерти, содержащие домен смерти (death domain). К рецепторам смерти относятся рецептор фактора некроза опухоли 1 (TNFR1), рецептор фактора некроза опухоли 6 (CD95, FasR, Apo1), рецептор смерти 4 (DR4), рецептор смерти 5 (DR5) и др. Наиболее перспективными мишенями для таргетной терапии опухолевых заболеваний считаются DR4 и DR5, так как их экспрессия в раковых клетках повышена по сравнению с нормальными клетками [4, 5]. В здоровых клетках механизмы апоптоза регулируются группой антиапоптотических белков, к примеру, FLICE-подобным ингибирующим белком (с-FLIP), подавляющим активацию каспазы-8. Также в клетке присутствуют белки семейства Bcl-2, которые, образуя гетерокомплекс с каспазами, подавляют активность апоптотического сигнала [6, 7].

### СТРУКТУРА РЕЦЕПТОРОВ СМЕРТИ 4 И 5

DR4 и DR5 – трансмембранные белки типа I – состоят из трех доменов: внеклеточного, трансмембранного и внутриклеточного. Внутриклеточный домен содержит гомологичную цитоплазматическую последовательность – домен смерти. DR5 может существовать в виде двух изоформ DR5(L) и DR5(S): в короткой форме между цистеиновыми последовательностями и трансмембранным участком отсутствуют 29 аминокислотных остатков, что, однако, никак не сказывается на его функциональной активности [8].

Рецепторы DR4 и DR5 присутствуют во многих клетках человека, включая тимус, печень, лейкоциты крови, активированные Т-лимфоциты, тонкий кишечник. Эти рецепторы обнаружены в некоторых линиях опухолевых клеток, таких, как Jurkat [9], Ramos [10], HeLa [11], Colo205 [12] и др. Домены смерти DR4 и DR5 идентичны на 64%, а обогащенные цистеином домены – на 66% [13].

Взаимодействие рецептора с лигандом TRAIL (Tumor necrosis factor ligand superfamily number 10) сначала происходит в N-концевой части внеклеточного домена, когда лиганд соединяется с первым цистеиновым доменом, так называемым участком предварительного взаимодействия (preligand assembly domain, PLAD) [14]. Эта последовательность не принимает непосредственного участия в олигомеризации рецептора, но позволяет стабилизировать положение лиганда относительно рецептора [15]. Ранее обнаружили, что тримеризация лиганда происходит в присутствии иона  $Zn^{+2}$  [16], который нековалентно связывается с цистеин-богатыми доменами TRAIL. При стабилизации TRAIL в мономере рецептора происходят конформационное изменение, затем передвижение в липидных рафтах мембраны и образование активной формы тримера [17]. В инициации апоптоза ключевую роль играет домен смерти, к которому за счет гомотипического взаимодействия домена смерти адаптерного белка с доменом смерти рецептора (DD-DD) присоединяется адаптерный белок. Такими адаптерными молекулами являются белок FADD (Fas-associated DD-protein), взаимодействующий с доменом смерти Fas-рецептора, и белок TRADD (TNFR1-associated DD-protein), взаимодействующий с доменом смерти TNFR1-рецептора [18]. TRADD и FADD также включают дополнительные модули белок-белкового взаимодействия, называемые эффекторными доменами (DED) [19]. Эти модули принимают участие в присоединении прокаспазы 8/10 и регуляторного белка c-FLIP. Мультибелковый комплекс, образующийся между доменом смерти рецептора, FADD и каспазами 8/10, называется сигнальным комплексом, индуцирующим смерть (death

inducing signaling complex, DISC) [20] (рис. 1). После формирования DISC апоптотический сигнал передается на инициаторные каспазы.

### АКТИВАЦИЯ АПОПТОЗА

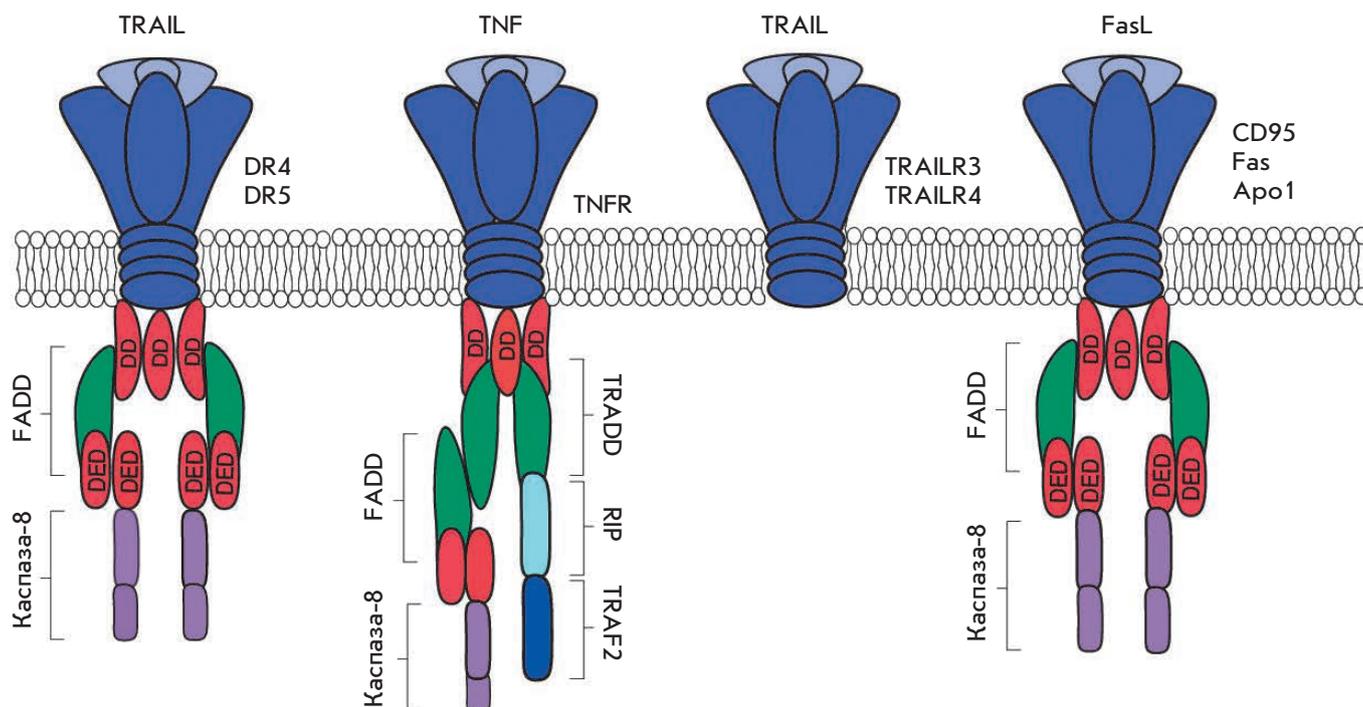
Апоптоз является сложным энергозависимым процессом, основанным на каскаде молекулярных превращений. На данный момент известны два пути развития апоптоза: рецепторный и митохондриальный.

После формирования DISC апоптотический сигнал передается на инициаторные каспазы. Каспазы существуют в клетке в форме неактивных прокаспаз (32–56 кДа), представляющих собой мономеры, состоящие из N-концевого домена, большой (17–21 кДа) и малой (10–13 кДа) субъединиц и коротких связующих областей [21]. Существует несколько теорий, описывающих процесс активации каспаз. Согласно одной – кластеризация каспаз на комплексе DISC приводит к их самоактивации за счет аутокаталитического процессинга. Согласно другой – сборка инициаторных каспаз благоприятствует их димеризации, в результате чего N-концевой продомен и связующие области в составе каждого из мономеров расщепляются, при этом большая и малая субъединица формируют гетеродимеры [22].

Субстратная специфичность инициаторных каспаз ограничивается эффекторными каспазами и проапоптотическим белком Bid [23]. При активации инициаторных каспаз 8/10 в составе комплекса DISC происходит дальнейшая активация эффекторных каспаз-3 и -7, обладающих ферментативной активностью. Сайтом гидролиза эффекторных каспаз является остаток Asp в тетрапептидном мотиве [24, 25]. Активация эффекторных каспаз приводит к запуску множества сигнальных путей, контролирующей жизнедеятельность клетки.

Митохондриальный путь апоптоза чаще всего активируется внутриклеточными факторами в ответ на различные сигналы: разрушение ДНК, появление активных форм кислорода, накопление белка с нарушенным фолдингом и др. Данный процесс регулируется белками семейства Bcl-2, в которое входит фактор Bid, активируемый путем протеолиза под действием каспазы-8 [26]. В активированной форме tBid вызывает пермеабиллизацию митохондриальной мембраны, выход цитохрома c и формирование апоптосомы, вызывающей активацию инициаторной каспазы-9 [27]. Это ключевой момент в развитии митохондриального пути апоптоза, далее происходит активация эффекторных каспаз (рис. 2).

Оба пути, и рецепторный, и митохондриальный, приводят к активации цитоплазматических эндонуклеаз, деградирующих ДНК, и протеаз, разрушающих внутриклеточные белки. Сами каспазы-3, -7 и -6



**Рис. 1.** Строение рецепторов смерти. К рецепторам смерти и их лигандам относятся: рецепторы DR4 (TNFRSF10A, TRAIL-R1) и DR5 (TNFRSF10B, TRAIL-R2, Apo2), DcR1 (TRAILR3) и DcR2 (TRAILR4) – их лиганд TRAIL; TNFR – рецептор фактора некроза опухолей с лигандом TNF; рецептор Fas (CD95, Apo1) – и лиганд FasL. TRADD – TNFR – белок, ассоциированный с доменом смерти, FADD – Fas-белок, ассоциированный с доменом смерти; DD – домен смерти; DED – эффекторные домены; RIP – протеинкиназа, связанная с рецептором смерти

расщепляют цитокератин и плазматическую мембрану, что обуславливает морфологические изменения, которые происходят в любой апоптотической клетке [28].

### TRAIL

TRAIL, как и фактор некроза опухоли (TNF), входит в суперсемейство фактора некроза опухоли (TNFSF) и участвует в регуляции жизненно важных биологических функций у позвоночных [29]. TRAIL содержит в своей структуре два антипараллельных бета-складчатых листа, которые формируют структуру бета-сендвича [30]. Обладающий единственным цистеиновым остатком, TRAIL способен образовывать хелатные комплексы с цинком. Субъединицы взаимодействуют друг с другом по схеме голова-к-хвосту с образованием пирамиды, усеченной к хвосту гомо-тримера [31]. Также TRAIL содержит значительное количество ароматических остатков, восемь из которых находятся на поверхности внутреннего листа и создают гидрофобную платформу для взаимодействия с соседними субъединицами.

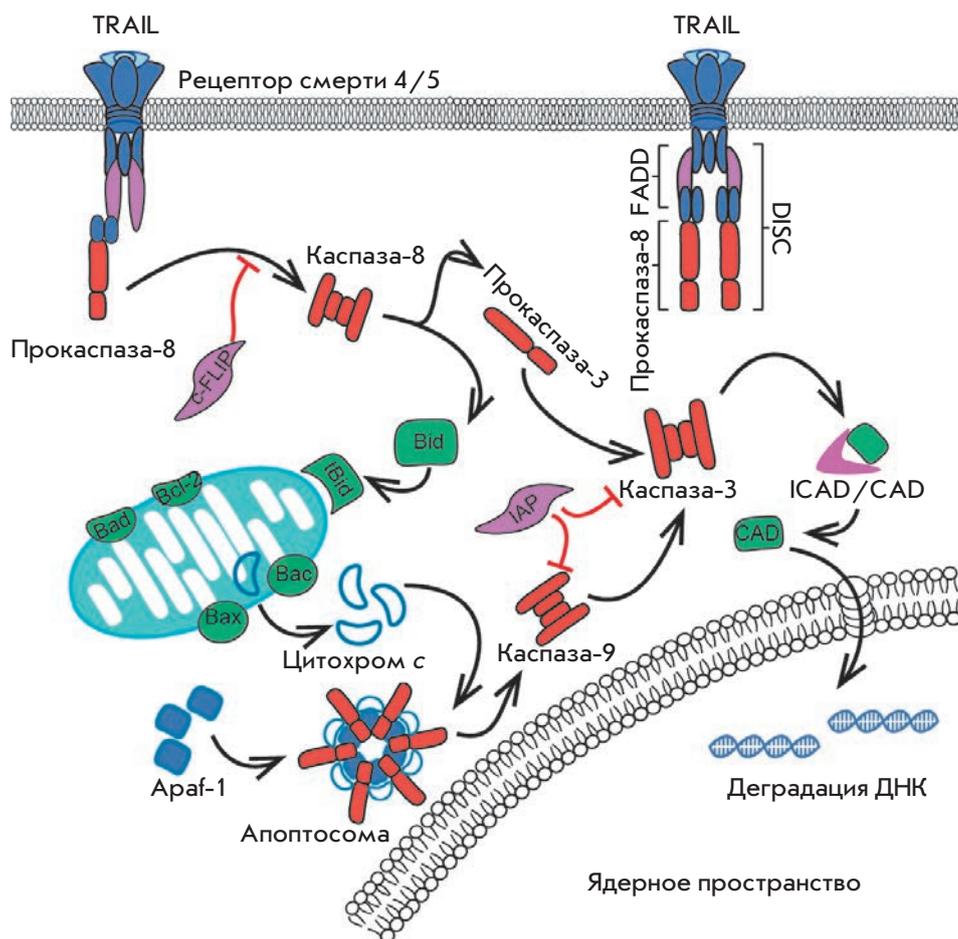
При создании терапевтических конструкций TRAIL имеет ряд преимуществ перед другими лигандами, вызывающими апоптоз. Основной его осо-

бенностью является отсутствие цитотоксичности в отношении нормальных клеток, в отличие от Fas-лиганда и TNF. Предполагается, что это обусловлено специфичностью TRAIL к расположенным на поверхности здоровых клеток рецепторам-«ловушкам» DcR1 (Decoy receptor 1) и DcR2 (Decoy receptor 2), у которых отсутствует внутриклеточный домен смерти [32]. Рецепторы-«ловушки» ингибируют развитие апоптоза, конкурируя с DR4 и DR5 за связывание с TRAIL. Также сам рецептор DcR2 может связываться с DR4, образуя лиганднезависимый комплекс [33]. Тем не менее, не до конца ясно, что еще обеспечивает выживаемость здоровых клеток, так как рецепторы-«ловушки» обнаруживают также на опухолевых клетках, чувствительных к TRAIL.

### РЕЗИСТЕНТНОСТЬ ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТОК К TRAIL

Существуют различные причины возникновения резистентности к TRAIL. Не последнюю роль в этом играют репрессоры сигнала апоптоза: к которым относятся белок c-FLIP, белки ингибиторы (IAP), транскрипционный фактор NF-κB и др. [34].

Чрезмерная экспрессия антиапоптотических белков, относящихся к семейству Bcl-2, может вносить свой вклад в развитие резистентности к TRAIL



**Рис. 2.** Схема передачи сигнала при апоптозе (рецепторный и митохондриальный пути). Взаимодействие рецептора с лигандом вызывает формирование комплекса DISC, что приводит к появлению факторов, активирующих апоптоз (каспазы-8, каспазы-3 и др.). Высвобождение цитохрома с приводит к образованию апоптосомы и активации каспазы-9. DISC – сигнальный комплекс, активирующий апоптоз; Bid, Bad, Bcl-2, Bax – белки семейства Bcl-2; ICAD/CAD – апоптотическая ДНКаза, Араф-1 – фактор активации апоптотических протеаз; IAP, с-FLIP – ингибиторы апоптоза

в различных видах опухолевых клеток [35]. Доказано, что присутствие «разрезанной» формы с-FLIP в составе комплекса DISC препятствует активации каспазы-8 [36]. Причиной резистентности к TRAIL могут быть различные мутации в белках, участвующих в сигнальном пути апоптоза. Так, мутация проапоптотического белка Bax приводит к устойчивости эпителиальных клеток рака толстой кишки [37].

К примеру, TRAIL-чувствительные линии нейроэндокринных опухолевых клеток (PNET) экспрессируют в необходимом количестве мРНК и белок каспазы-8, в отличие от TRAIL-резистентных клеток PNET, что вызвано метилированием гена, кодирующего каспазу. Показано, что в клетках PNET резистентность к TRAIL сохраняется даже при сверхэкспрессии рецепторов к TRAIL [38, 39].

Высокий уровень транскрипционного фактора NF-κB в опухолевых клетках может вызывать не только повышенную экспрессию рецепторов DR4 и DR5 [40], но и развитие резистентности к TRAIL, что вызвано повышенным синтезом антиапоптотических белков, которые регулируются данным фактором [41].

Описанные выше варианты покрывают далеко не все пути развития резистентности в опухолевых

клетках. Ее преодоление является основным направлением в разработке новых агентов, активирующих рецепторы DR4 и DR5.

### АГОНИСТЫ TRAIL-R В ТЕРАПИИ РАКА

На данный момент разработано множество стратегий направленного воздействия на TRAIL-R – это различные формы рекомбинантного растворимого TRAIL человека (Apo2L или Dulanermin), антитела-агонисты DR4, DR5 и др. [42]. Эти агенты безопасны и хорошо переносятся пациентами [43, 44].

Активность идеального терапевтического агента, действующего на TRAIL-зависимый апоптоз, должна соответствовать природному лиганду, подобно антителу с высокой аффинностью связываться с рецептором, и его период полувыведения должен обеспечивать продолжительную персистенцию в кровотоке. Рекомбинантный TRAIL человека активирует оба рецептора смерти, но его применение лимитируется быстрым расщеплением в крови и малым временем полувыведения. Также TRAIL может связываться с рецепторами-«ловушками», способными подавлять активацию апоптоза [45]. В качестве альтернативы TRAIL созданы антитела, взаимодей-

ствующие только с рецепторами смерти и не влияющими на рецепторы-«ловушки». Они относительно безопасны, обладают улучшенными фармакокинетическими свойствами по сравнению с рекомбинантным TRAIL, но специфичны только к одному виду рецептора. Несмотря на существующие ограничения, на этапе клинических испытаний находится много различных агентов, воздействующих на рецепторы смерти как в виде монотерапии, так и в комплексном подходе.

На данный момент разработаны инновационные стратегии, направленные на усовершенствование структуры TRAIL-лиганда. Первая рекомбинантная версия TRAIL содержала TNF-гомологичный домен, на N-концевой участок которого добавлен полигистидиновый кластер [46] или FLAG-эпитоп [47]. Эти фрагменты позволяют улучшить процесс очистки белка. Несмотря на то что два модифицированных белка показали эффективность *in vitro* и *in vivo*, их использование затрудняет появление гепатотоксичности.

Для увеличения стабильности комплекса TRAIL создано несколько его модификаций. Один из подходов состоит в присоединении к TRAIL мотива лейциновой (LZ-TRAIL) или изолейциновой застёжки (iz-TRAIL). Аналогичным решением является объединение TRAIL с тенаксином-С для стабилизации и олигомеризации молекулы. Эти агенты показали большую, чем у Dulanermin, активность *in vivo* и *in vitro* и безопасность в отношении гепатоцитов [48].

Совсем недавно несколько исследовательских групп разработали новый принцип стабилизации TRAIL, основанный на одноцепочечном TRAIL (scTRAIL) [49]. При данном подходе молекула экспрессируется в виде тримера, в котором три домена объединены линкером по типу голова-к-хвосту. Правильно собранная конструкция исключает возможность ошибки при ее экспрессии и предупреждает неспецифические взаимодействия с другими молекулами. Это дает scTRAIL преимущества перед его аналогами и обеспечивает эффективность в отношении некоторых резистентных опухолевых линий.

Для увеличения периода полувыведения TRAIL к нему присоединяют молекулы с лучшей фармакокинетикой, такие, как сывороточный альбумин человека или полиэтиленгликоль (ПЭГ). По результатам *in vivo* исследований пэгилирование iz-TRAIL увеличило период полувыведения, стабильность и растворимость молекулы [50].

## АНТИТЕЛА

Антитела к TRAIL-R1 (Maratumumab [51]) и TRAIL-R2 (Conatumumab [52], Lexatumumab [53], Tigatuzumab [54] и Drozitumab [55]) показали опре-

деленную эффективность в доклинических исследованиях. При проведении клинических исследований все антитела были безопасными и более стабильными по сравнению с TRAIL. Антитела, эффективные на I стадии клинических исследований, на II стадии использовали как в качестве монотерапии, так и в комбинации с цисплатином, паклитакселом [56] и другими противоопухолевыми средствами.

В качестве монотерапии эффективными оказались антитела Maratumumab и Conatumumab. При применении Maratumumab клинические улучшения наблюдались у 14 из 17 пациентов с неходжкинской лимфомой. У 29% пациентов с немелкоклеточным раком легких и у 32% с колоректальным раком наблюдалась продолжительная ремиссия [57, 58].

Комбинация Conatumumab с паклитакселом и карбоплатином в качестве впервые назначенной терапии при немелкоклеточном раке легкого оказалась более эффективной, чем при применении только паклитаксела и карбоплатина [59], в отличие от Maratumumab, эффективность которого в аналогичной комбинации не подтвердилась [60].

Также Conatumumab был эффективен в комбинации со стандартной химиотерапией FOLFIRI и ганитумабом в качестве вторичной терапии колоректального рака – выявлено повышение выживаемости пациентов, находящихся в состоянии ремиссии [61].

Tigatuzumab (CS-1008) в комбинации с гентамицином показал хорошую переносимость при метастазирующем раке печени. Доля пациентов с объективным ответом составила 13.1% [62].

Dulanermin – рекомбинантный аналог лиганда рецепторов смерти, был проверен на пациентах с опухолями различного происхождения. На стадии доклинических исследований этот препарат проявил активность против хондробластомы, колоректального рака и других опухолей. Но, к сожалению, клинические исследования не подтвердили данные доклинических испытаний [63].

Таким образом, для эффективного применения агонистов рецепторов смерти требуется индивидуальный подход к каждому пациенту, так как существует вероятность резистентности опухолевых клеток к данной терапии. Одним из принципов ее преодоления может быть поиск определенных биомаркеров резистентности, которые помогли бы охарактеризовать клетки с высоким уровнем экспрессии рецепторов смерти, потенциально чувствительных к воздействию антител [64].

Одним из подходов преодоления резистентности является применение генетически модифицированных Т-лимфоцитов. На основе одноцепочечного антитела к DR4, слитого с химерным антигенным рецептором Т-клеток (chimeric antigen receptor,

CAR), получены Т-клетки, специфически элиминирующие опухолевые клетки с DR4. Было показано, что при взаимодействии с опухолевыми клетками модифицированные химерным рецептором Т-клетки запускают не только индуцированный DR4 путь апоптоза, но и механизмы заложенного цитотоксического действия Т-клеток [65, 66].

### ПЕПТИДНЫЕ АГОНИСТЫ РЕЦЕПТОРОВ СМЕРТИ

Перспективным представляется поиск подходящих пептидов, агонистов DR4 и DR5. К преимуществам пептидов относится их способность селективно связываться только с определенным рецептором смерти [67]. Для отбора пептидных лигандов используется технология фагового дисплея, которая, связывая генотип с фенотипом, выбирает пептиды с агонистическими свойствами. Эти пептиды могут связываться с рецепторами DR4 и DR5 и активировать их.

Методом фагового дисплея был отобран пептид YSKVILTHRCY, который специфично связывается с DR5. Для увеличения растворимости на концы пептида добавили остатки Тур. Изучены свойства этого пептида в мономерной и димерной (два ковалентно соединенных мономера) форме. Установлено, что обе формы взаимодействуют с DR5 и вызывают развитие апоптоза в клеточной линии рака кишечника Colo205. Эффективность мономера может быть связана с тем, что в высоких концентрациях пептид может агрегировать в водной среде, так как содержит много ги-

дрофобных групп [68]. Аналогичным способом был отобран пептид GRVCLTLC SRLT, проявляющий высокую аффинность к DR5 ( $IC_{50} = 30$  нМ). Показано, что ключевую роль во взаимодействии с рецептором играет аминокислотная последовательность LTL [69].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработаны различные подходы к воздействию на опухолевые клетки, в том числе и через пути апоптоза. К сожалению, многие из них оказываются неработоспособными из-за резистентности клеток, неэффективности и неустойчивости самих терапевтических агентов. Другие же открывают новые возможности терапии опухолевых заболеваний. Более подробное изучение сигнальных путей рецепторов смерти позволит создавать новые агенты, которые смогут направленно воздействовать на раковые клетки. В свою очередь, для эффективного применения существующих антител к рецепторам смерти требуется более подробное изучение возможности их применения в формате сочетанной терапии. ●

*Работа выполнена при поддержке гранта РНФ № 14-24-00106. А.В. Степанов получил персональную финансовую поддержку РФФИ и Правительства Москвы в рамках научного проекта № 15-34-70037 мол\_а\_мос.*

### ПРИЛОЖЕНИЕ Классификация DR-агонистов, участвующих в клинических исследованиях

Заболевание	Фаза/Сопроводительная терапия	Пациенты, размер группы	Клиническая эффективность	Ссылка
<b>Lexatumumab</b>				
полное IgG и человеческое моноклональное антитело, агонист DR5				
Солидные раковые опухоли	I	24	Есть /небольшая	[53]
	I	32	Есть/низкая	[70]
	Ib / гемцитабин пеметрексед, доксорубицин или FOLFIRI	41	Нет данных	
<b>Maratumumab</b>				
полное IgG и человеческое моноклональное антитело, агонист DR4				
Солидные раковые опухоли	I	49	Есть	
	I	41	Нет	[71]
	I/паклитаксел, карбоплатин	27	Нет	[72]
НХЛ	Ib/II	40	Есть/низкая	[57]
КРР	II	38	Есть/низкая	[58]
Рак шейки матки	Ib/II / цисплатин, гемцитабин	49	Есть	
НМРЛ	II	32	Есть/низкая	
	II / паклитаксел, карбоплатин	100	Нет	[60]
ГЦК	II / сорафениб	101	В процессе	[73]
ММ	II / бортезомиб (Velcade)	105	Нет данных	

ОБЗОРЫ

<b>Conatumumab (AMG 655)</b> полное IgG и человеческое моноклональное антитело, агонист DR5				
Солидные раковые опухоли	I	37	Есть	[74]
	I с увеличением дозы	18		[47]
	Ib/AMG 479 (IGF-1R антагонист)	108		
НМРЛ	II/паклитаксел, карбоплатин	150	Нет	[59]
Лимфома	II/бортезомиб, вориностат	20	Нет	
Саркома мягких тканей	I/доксорубин	6		[75]
	II/доксорубин	120	Есть/низкая	
	II/FOLFOX6 бевацизумаб, ганитумаб		В процессе	
КРР	II/FOLFIRI, ганитумаб	155	Есть	[61]
	II/mFOLFOX бевацизумаб	180	Нет	[76]
	I, II/Panitumumab	53	Нет	
Рак поджелудочной железы	II/гемицитабин	125	Есть/низкая	[77]
<b>Tigatuzumab (CS-1008)</b> полное IgG1 и человеческое моноклональное антитело, агонист DR5				
Карцинома	I	17	Нет	[78]
НМРЛ	II/паклитаксел, карбоплатин	97	Нет	[54]
Рак поджелудочной железы	II/гемицитабин	62	Есть	[62]
Рак молочной железы	II/паклитаксел	64	Есть /небольшая	[79]
ГЦК	II/сорафениб	163	Нет	[80]
КРР	I	19	Есть /небольшая	[81]
Метастазирующий рак молочной железы	II/Абраксан		В процессе	
<b>Droxitumab</b> полное IgG1 и человеческое моноклональное антитело, агонист DR5				
Метастазирующий КРР	I/mFOLFOX, бевацизумаб		Есть/низкая	[82]
<b>Dulanermin</b> (rhApo2L/TRAIL) агонист проапоптотического рецептора				
Солидные раковые опухоли	I	58	Есть/низкая	[63]
НМРЛ	Ib/паклитаксел, карбоплатин+ бевацизумаб	24		[83]
	II/паклитаксел, карбоплатин+ бевацизумаб	213	Нет	[84]
КРР	Ib/FOLFOX6+ бевацизумаб	23	Есть	[85]
	II/FOLFOX6+ бевацизумаб		В процессе	
НХЛ	Ib/ритуксимаб	7	Есть	[86]
	II/ритуксимаб	132	В процессе	
<b>PRO95780</b> полное IgG1 и человеческое моноклональное антитело, агонист DR5				
Солидные раковые опухоли	I	50	Нет	[87]
КРР	I/FOLFOX, бевацизумаб	6		
НХЛ	I/ритуксимаб	49	Нет данных	
КРР	I/бевацизумаб, цетуксимаб, FOLFIRI, иринотекан	23	Нет данных	
Хондросаркома	II		В процессе	
НМРЛ	II/паклитаксел, карбоплатин, бевацизумаб	128	Нет данных	

НМРЛ – немелкоклеточный рак легкого; НХЛ – неходжкинская лимфома; КРР – колоректальный рак; ГЦК – гепатоцеллюлярная карцинома; ММ – множественная миелома.

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. // *Russian Chemical Reviews*. 2015. V. 84. № 1. P. 1–26.
2. Wong R.S. // *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2011. V. 30. P. 87.
3. Parameswaran N., Patial S. // *Crit. Rev. Eukaryot. Gene Expr*. 2010. V. 20. № 2. P. 87–103.
4. Strater J., Hinz U., Walczak H., Mechttersheimer G., Koretz K., Herfarth C., Moller P., Lehnert T. // *Clin. Cancer Res*. 2002. V. 8. № 12. P. 3734–3740.
5. Pan G., O'Rourke K., Chinnaiyan A.M., Gentz R., Ebner R., Ni J., Dixit V.M. // *Science*. 1997. V. 276. № 5309. P. 111–113.
6. Chinnaiyan A.M., Dixit V.M. // *Semin. Immunol*. 1997. V. 9. № 1. P. 69–76.
7. Reed J.C. // *Semin. Hematol*. 1997. V. 34. № 4. P. 9–19.
8. Wang T.T., Jeng J. // *Breast Cancer Res. Treat*. 2000. V. 61. № 1. P. 87–96.
9. Natori A., MacFarlane M., Inoue S., Walewska R., Majid A., Kneé D., Stover D.R., Dyer M.J., Cohen G.M. // *Br. J. Haematol*. 2007. V. 139. № 4. P. 568–577.
10. MacFarlane M., Kohlhaas S.L., Sutcliffe M.J., Dyer M.J., Cohen G.M. // *Cancer Res*. 2005. V. 65. № 24. P. 11265–11270.
11. Ren Y.G., Wagner K.W., Kneé D.A., Aza-Blanc P., Nasoff M., Deveraux Q.L. // *Mol. Biol. Cell*. 2004. V. 15. № 11. P. 5064–5074.
12. Chiron D., Pellat-Deceunynck C., Maillaçon M., Bataille R., Jégou G. // *J. Immunol*. 2009. V. 183. № 7. P. 4371–4377.
13. Pan G., Ni J., Wei Y.F., Yu G., Gentz R., Dixit V.M. // *Science*. 1997. V. 277. № 5327. P. 815–818.
14. Clancy L., Mruk K., Archer K., Woelfel M., Mongkolsapaya J., Screaton G., Lenardo M.J., Chan F.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. № 50. P. 18099–18104.
15. Sfrikakis P.P., Tsokos G.C. // *Clin. Immunol*. 2011. V. 141. № 3. P. 231–235.
16. Ozoren N., El-Deiry W.S. // *Semin. Cancer Biol*. 2003. V. 13. № 2. P. 135–147.
17. Marconi M., Ascione B., Ciarlo L., Vona R., Garofalo T., Sorice M., Gianni A.M., Locatelli S.L., Carlo-Stella C., Malorni W., et al. // *Cell Death Dis*. 2013. V. 4. P. e863.
18. Kuang A.A., Diehl G.E., Zhang J., Winoto A. // *J. Biol. Chem*. 2000. V. 275. № 33. P. 25065–25068.
19. Riley J.S., Malik A., Holohan C., Longley D.B. // *Cell Death Dis*. 2015. V. 6. P. e1866.
20. Kischkel F.C., Lawrence D.A., Chuntharapai A., Schow P., Kim K.J., Ashkenazi A. // *Immunity*. 2000. V. 12. № 6. P. 611–620.
21. Earnshaw W.C. // *Nature*. 1999. V. 397. № 6718. P. 387, 389.
22. Riedel S.J., Shi Y. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol*. 2004. V. 5. № 11. P. 897–907.
23. Huang K., Zhang J., O'Neill K.L., Gurumurthy C.B., Quadros R.M., Tu Y., Luo X. // *J. Biol. Chem*. 2016. V. 291. № 22. P. 11843–11851.
24. MacKenzie S.H., Clark A.C. // *Adv. Exp. Med. Biol*. 2012. V. 747. P. 55–73.
25. Thornberry N.A. // *Br. Med. Bull*. 1997. V. 53. № 3. P. 478–490.
26. Mukae N., Enari M., Sakahira H., Fukuda Y., Inazawa J., Toh H., Nagata S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. № 16. P. 9123–9128.
27. Finucane D.M., Bossy-Wetzel E., Waterhouse N.J., Cotter T.G., Green D.R. // *J. Biol. Chem*. 1999. V. 274. № 4. P. 2225–2233.
28. Slee E.A., Adrain C., Martin S.J. // *J. Biol. Chem*. 2001. V. 276. № 10. P. 7320–7326.
29. Banks T.A., Rickert S., Benedict C.A., Ma L., Ko M., Meier J., Ha W., Schneider K., Granger S.W., Turovskaya O., et al. // *J. Immunol*. 2005. V. 174. № 11. P. 7217–7225.
30. Cha S.S., Kim M.S., Choi Y.H., Sung B.J., Shin N.K., Shin H.C., Sung Y.C., Oh B.H. // *Immunity*. 1999. V. 11. № 2. P. 253–261.
31. Zakaria A., Picaud F., Guillaume Y.C., Gharbi T., Micheau O., Herlem G. // *J. Mol. Recognit*. 2016. V. 29. № 9. P. 406–414.
32. Baritaki S., Huerta-Yepez S., Sakai T., Spandidos D.A., Bonavida B. // *Mol. Cancer Ther*. 2007. V. 6. № 4. P. 1387–1399.
33. Marsters S.A., Sheridan J.P., Pitti R.M., Huang A., Skubatch M., Baldwin D., Yuan J., Gurney A., Goddard A.D., Godowski P., et al. // *Curr. Biol*. 1997. V. 7. № 12. P. 1003–1006.
34. Prasad S., Kim J.H., Gupta S.C., Aggarwal B.B. // *Trends Pharmacol. Sci*. 2014. V. 35. № 10. P. 520–536.
35. Sivaprasad U., Shankar E., Basu A. // *Cell Death Differ*. 2007. V. 14. № 4. P. 851–860.
36. Guseva N.V., Rokhlin O.W., Taghiyev A.F., Cohen M.B. // *Breast Cancer Res. Treat*. 2008. V. 107. № 3. P. 349–357.
37. LeBlanc H., Lawrence D., Varfolomeev E., Totpal K., Morlan J., Schow P., Fong S., Schwall R., Sinicropi D., Ashkenazi A. // *Nat. Med*. 2002. V. 8. № 3. P. 274–281.
38. Kim H.S., Lee J.W., Soung Y.H., Park W.S., Kim S.Y., Lee J.H., Park J.Y., Cho Y.G., Kim C.J., Jeong S.W., et al. // *Gastroenterology*. 2003. V. 125. № 3. P. 708–715.
39. Agolini S.F., Shah K., Jaffe J., Newcomb J., Rhodes M., Reed J.F., 3<sup>rd</sup>. // *J. Trauma*. 1997. V. 43. № 3. P. 395–399.
40. Ravi R., Bedi G.C., Engstrom L.W., Zeng Q., Mookerjee B., Gelinas C., Fuchs E.J., Bedi A. // *Nat. Cell. Biol*. 2001. V. 3. № 4. P. 409–416.
41. Kwon H.R., Lee K.W., Dong Z., Lee K.B., Oh S.M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2010. V. 391. № 1. P. 830–834.
42. Lemke J., von Karstedt S., Zinngrebe J., Walczak H. // *Cell Death Differ*. 2014. V. 21. № 9. P. 1350–1364.
43. Joy A.M., Beaudry C.E., Tran N.L., Ponce F.A., Holz D.R., Demuth T., Berens M.E. // *J. Cell Sci*. 2003. V. 116. P. 4409–4417.
44. Dimberg L.Y., Anderson C.K., Camidge R., Behbakht K., Thorburn A., Ford H.L. // *Oncogene*. 2013. V. 32. № 11. P. 1341–1350.
45. Milutinovic S., Kashyap A.K., Yanagi T., Wimer C., Zhou S., O'Neil R., Kurtzman A.L., Faynboym A., Xu L., Hannum C.H., et al. // *Mol. Cancer Ther*. 2016. V. 15. № 1. P. 114–124.
46. Pitti R.M., Marsters S.A., Ruppert S., Donahue C.J., Moore A., Ashkenazi A. // *J. Biol. Chem*. 1996. V. 271. № 22. P. 12687–12690.
47. Wiley S.R., Schooley K., Smolak P.J., Din W.S., Huang C.P., Nicholl J.K., Sutherland G.R., Smith T.D., Rauch C., Smith C.A., et al. // *Immunity*. 1995. V. 3. № 6. P. 673–682.
48. Rozanov D.V., Savinov A.Y., Golubkov V.S., Rozanova O.L., Postnova T.I., Sergienko E.A., Vasile S., Aleshin A.E., Rega M.F., Pellicchia M., et al. // *Mol. Cancer Ther*. 2009. V. 8. № 6. P. 1515–1525.
49. Siegemund M., Pollak N., Seifert O., Wahl K., Hanak K., Vogel A., Nussler A.K., Gottsch D., Munkel S., Bantel H., et al. // *Cell Death Dis*. 2012. V. 3. P. e295.
50. Harris J.M., Chess R.B. // *Nat. Rev. Drug Discov*. 2003. V. 2. № 3. P. 214–221.
51. Greco F.A., Bonomi P., Crawford J., Kelly K., Oh Y., Halpern W., Lo L., Gallant G., Klein J. // *Lung Cancer*. 2008. V. 61. № 1. P. 82–90.
52. Doi T., Murakami H., Ohtsu A., Fuse N., Yoshino T., Yamamoto N., Boku N., Onozawa Y., Hsu C.P., Gorski K.S., et al. // *Cancer Chemother. Pharmacol*. 2011. V. 68. № 3. P. 733–741.
53. Merchant M.S., Geller J.I., Baird K., Chou A.J., Galli S., Charles A., Amaoko M., Rhee E.H., Price A., Wexler L.H., et al. // *J. Clin. Oncol*. 2012. V. 30. № 33. P. 4141–4147.
54. Reck M., Krzakowski M., Chmielowska E., Sebastian M., Hadler D., Fox T., Wang Q., Greenberg J., Beckman R.A., von

- Pawel J. // *Lung Cancer*. 2013. V. 82. № 3. P. 441–448.
55. Kang Z., Chen J.J., Yu Y., Li B., Sun S.Y., Zhang B., Cao L. // *Clin. Cancer Res.* 2011. V. 17. № 10. P. 3181–3192.
56. Sasaki Y., Nishina T., Yasui H., Goto M., Muro K., Tsuji A., Koizumi W., Toh Y., Hara T., Miyata Y. // *Cancer Sci.* 2014. V. 105. № 7. P. 812–817.
57. Younes A., Vose J.M., Zelenetz A.D., Smith M.R., Burris H.A., Ansell S.M., Klein J., Halpern W., Miceli R., Kumm E., et al. // *Br. J. Cancer.* 2010. V. 103. № 12. P. 1783–1787.
58. Trarbach T., Moehler M., Heinemann V., Kohne C.H., Przyborek M., Schulz C., Sneller V., Gallant G., Kanzler S. // *Br. J. Cancer.* 2010. V. 102. № 3. P. 506–512.
59. Paz-Ares L., Balint B., de Boer R.H., van Meerbeeck J.P., Wierzbicki R., De Souza P., Galimi F., Haddad V., Sabin T., Hei Y.J., et al. // *J. Thorac. Oncol.* 2013. V. 8. № 3. P. 329–337.
60. von Pawel J., Harvey J.H., Spigel D.R., Dediu M., Reck M., Cebotaru C.L., Humphreys R.C., Gribbin M.J., Fox N.L., Camidge D.R. // *Clin. Lung Cancer.* 2014. V. 15. № 3. P. 188–196.e2.
61. Cohn A.L., Taberero J., Maurel J., Nowara E., Sastre J., Chuah B.Y., Kopp M.V., Sakaeva D.D., Mitchell E.P., Dubey S., et al. // *Ann. Oncol.* 2013. V. 24. № 7. P. 1777–1785.
62. Forero-Torres A., Infante J.R., Waterhouse D., Wong L., Vickers S., Arrowsmith E., He A.R., Hart L., Trent D., Wade J., et al. // *Cancer Med.* 2013. V. 2(6). P. 925–932.
63. Pan Y., Xu R., Peach M., Huang C.P., Branstetter D., Novotny W., Herbst R.S., Eckhardt S.G., Holland P.M. // *Br. J. Cancer.* 2011. V. 105. № 12. P. 1830–1838.
64. Dine J.L., O'Sullivan C.C., Voeller D., Greer Y.E., Chavez K.J., Conway C.M., Sinclair S., Stone B., Amiri-Kordestani L., Merchant A.S., et al. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2016. V. 155. № 2. P. 235–251.
65. Kobayashi E., Kishi H., Ozawa T., Hamana H., Nakagawa H., Jin A., Lin Z., Muraguchi A. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. V. 453. № 4. P. 798–803.
66. Jin A., Ozawa T., Tajiri K., Lin Z., Obata T., Ishida I., Kishi H., Muraguchi A. // *Eur. J. Immunol.* 2010. V. 40. № 12. P. 3591–3593.
67. Ladner R.C., Sato A.K., Gorzelany J., de Souza M. // *Drug Discov. Today.* 2004. V. 9. № 12. P. 525–529.
68. Vrieling J., Heins M.S., Setroikromo R., Szegezdi E., Mullally M.M., Samali A., Quax W.J. // *FEBS J.* 2010. V. 277. № 7. P. 1653–1665.
69. Li B., Russell S.J., Compaan D.M., Totpal K., Marsters S.A., Ashkenazi A., Cochran A.G., Hymowitz S.G., Sidhu S.S. // *J. Mol. Biol.* 2006. V. 361. № 3. P. 522–536.
70. Wakelee H.A., Patnaik A., Sikic B.I., Mita M., Fox N.L., Miceli R., Ullrich S.J., Fisher G.A., Tolcher A.W. // *Ann. Oncol.* 2010. V. 21. № 2. P. 376–381.
71. Hotte S.J., Hirte H.W., Chen E.X., Siu L.L., Le L.H., Corey A., Iacobucci A., MacLean M., Lo L., Fox N.L., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2008. V. 14. № 11. P. 3450–3455.
72. Mom C.H., Verweij J., Oldenhuis C.N., Gietema J.A., Fox N.L., Miceli R., Eskens F.A., Loos W.J., de Vries E.G., Sleijfer S. // *Clin. Cancer Res.* 2009. V. 15. № 17. P. 5584–5590.
73. Ciuleanu T., Bazin I., Lungulescu D., Miron L., Bondarenko I., Deptala A., Rodriguez-Torres M., Giantonio B., Fox N.L., Wissel P., et al. // *Ann. Oncol.* 2016. V. 27. № 4. P. 680–687.
74. Herbst R.S., Kurzrock R., Hong D.S., Valdivieso M., Hsu C.P., Goyal L., Juan G., Hwang Y.C., Wong S., Hill J.S., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2010. V. 16. № 23. P. 5883–5891.
75. Demetri G.D., Le Cesne A., Chawla S.P., Brodowicz T., Maki R.G., Bach B.A., Smethurst D.P., Bray S., Hei Y.J., Blay J.Y. // *Eur. J. Cancer.* 2012. V. 48. № 4. P. 547–563.
76. Fuchs C.S., Fakih M., Schwartzberg L., Cohn A.L., Yee L., Dreisbach L., Kozloff M.F., Hei Y.J., Galimi F., Pan Y., et al. // *Cancer.* 2013. V. 119. № 24. P. 4290–4298.
77. Kindler H.L., Richards D.A., Garbo L.E., Garon E.B., Stephenson J.J., Jr., Rocha-Lima C.M., Safran H., Chan D., Kocs D.M., Galimi F., et al. // *Ann. Oncol.* 2012. V. 23. № 11. P. 2834–2842.
78. Forero-Torres A., Shah J., Wood T., Posey J., Carlisle R., Copigneaux C., Luo F.R., Wojtowicz-Praga S., Percent I., Saleh M. // *Cancer Biother. Radiopharm.* 2010. V. 25. № 1. P. 13–19.
79. Forero-Torres A., Varley K.E., Abramson V.G., Li Y., Vaklavas C., Lin N.U., Liu M.C., Rugo H.S., Nanda R., Storniolo A.M., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2015. V. 21. № 12. P. 2722–2729.
80. Cheng A.L., Kang Y.K., He A.R., Lim H.Y., Ryoo B.Y., Hung C.H., Sheen I.S., Izumi N., Austin T., Wang Q., et al. // *J. Hepatol.* 2015. V. 63. № 4. P. 896–904.
81. Ciprotti M., Tebbutt N.C., Lee F.T., Lee S.T., Gan H.K., McKee D.C., O'Keefe G.J., Gong S.J., Chong G., Hopkins W., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2015. V. 33. № 24. P. 2609–2616.
82. Rocha Lima C.M., Bayraktar S., Flores A.M., MacIntyre J., Montero A., Baranda J.C., Wallmark J., Portera C., Raja R., Stern H., et al. // *Cancer Invest.* 2012. V. 30. № 10. P. 727–731.
83. Soria J.C., Smit E., Khayat D., Besse B., Yang X., Hsu C.P., Reese D., Wizezorek J., Blackhall F. // *J. Clin. Oncol.* 2010. V. 28. № 9. P. 1527–1533.
84. Soria J.C., Mark Z., Zatloukal P., Szima B., Albert I., Juhasz E., Pujol J.L., Kozielski J., Baker N., Smethurst D., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2011. V. 29. № 33. P. 4442–4451.
85. Wainberg Z.A., Messersmith W.A., Peddi P.F., Kapp A.V., Ashkenazi A., Royer-Joo S., Portera C.C., Kozloff M.F. // *Clin. Colorectal Cancer.* 2013. V. 12. № 4. P. 248–254.
86. Cheah C.Y., Belada D., Fanale M.A., Janikova A., Czucman M.S., Flinn I.W., Kapp A.V., Ashkenazi A., Kelley S., Bray G.L., et al. // *Lancet Haematol.* 2015. V. 2. № 4. P. e166–174.
87. Camidge D.R., Herbst R.S., Gordon M.S., Eckhardt S.G., Kurzrock R., Durbin B., Ing J., Tohnya T.M., Sager J., Ashkenazi A., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2010. V. 16. № 4. P. 1256–1263.

УДК 577.084.1

# Специфическая активность амидной формы пептида HLDF-6: изучение на трансгенной модели болезни Альцгеймера

А. П. Богачук<sup>1\*</sup>, З. И. Сторожева<sup>2</sup>, Г. Б. Телегин<sup>3</sup>, А. С. Чернов<sup>3</sup>, А. Т. Прошин<sup>4</sup>,  
В. В. Шерстнев<sup>4</sup>, Ю. А. Золотарев<sup>5</sup>, В. М. Липкин<sup>1</sup>

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

<sup>2</sup>Федеральный медицинский исследовательский центр наркологии и психиатрии им. В.П. Сербского Минздрава России, 119034, Москва, Кропоткинский пер., 23

<sup>3</sup>Филиал Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Московская обл., г. Пущино, просп. Науки, 6

<sup>4</sup>Научно-исследовательский институт нормальной физиологии им. П.К. Анохина РАН, 123315, Москва, ул. Балтийская, 8

<sup>5</sup>Институт молекулярной генетики РАН, 123182, Москва, пл. Курчатова, 2

\*E-mail: apbog@mx.ibch.ru

Поступила в редакцию 04.07.2016

Принята к печати 24.05.2017

**РЕФЕРАТ** Нейропротекторная и ноотропная активности амидной формы (АФ) пептида HLDF-6 (TGENHR-NH<sub>2</sub>) изучены на трансгенных мышях линии B6C3-Tg(APP<sup>swe</sup>,PSEN1<sup>de9</sup>)85Dbo (Tg+) – животной модели наследственной болезни Альцгеймера (БА). Исследования проведены на четырех группах мышей: группа 1 (экспериментальная) – мыши Tg+, которым интраназально вводили пептид в дозе 250 мкг/кг; группа 2 (активный контроль) – мыши Tg+, которым интраназально вводили физиологический раствор; группа 3 (контроль-1) – мыши Tg-; группа 4 (контроль-2) – мыши линии C57Bl/6. Когнитивные функции оценивали с использованием теста распознавания объекта, теста пассивного избегания и лабиринта Морриса. Показано, что фармацевтическая субстанция (ФС) на основе АФ пептида HLDF-6 в условиях интраназальной доставки в дозе 250 мкг/кг эффективно восстанавливает нарушенные когнитивные функции у трансгенных мышей Tg+. Эти результаты полностью согласуются с данными, полученными на животных моделях болезни Альцгеймера, которым фрагмент (25–35) бета-амилоида (βA) вводили в базальное гигантоклеточное ядро Мейнерта, в гиппокамп вводили одновременно фрагмент βA и иботеновую кислоту, а также при ишемическом инсульте (хроническая окклюзия сонных артерий – 2VO). Исходя из полученных результатов, для проведения доклинических исследований выбрали ФС на основе АФ пептида HLDF-6, и в качестве эффективной терапевтической дозы – 250 мкг/кг ФС. Способ доставки – интраназальное введение.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** амидная форма пептида HLDF-6, болезнь Альцгеймера, нейропротекторная и ноотропная активности, трансгенные мыши, фактор дифференцировки HLDF.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** HLDF – фактор дифференцировки лейкозных клеток человека (Human Leukemia Differentiation Factor); АФ – амидная форма; НФ – нативная форма; БА – болезнь Альцгеймера; ИИ – ишемический инсульт; ФС – фармацевтическая субстанция; βA – бета-амилоид.

## ВВЕДЕНИЕ

К числу важнейших медико-социальных проблем современности относятся цереброваскулярные и нейродегенеративные заболевания, являющиеся основной причиной смертности и инвалидизации населения России и зарубежных стран. К нейроде-

генеративным заболеваниям относится наиболее распространенная болезнь Альцгеймера (БА), диагностированная почти у 44 млн человек [1]. БА прогрессирует медленно, но неотвратимо и ведет к «отключению» важнейшего органа – головного мозга и расстройству ряда функций организма человека.

В последнее десятилетие болезнь Альцгеймера признана одной из четырех главных медико-социальных проблем современного общества.

Одним из серьезнейших цереброваскулярных заболеваний является ишемический инсульт (ИИ). Ежегодно в мире регистрируется более 15 млн случаев инсульта [2], в том числе более 450000 в России. К существенным недостаткам лекарственных средств, используемых при БА и ИИ и резко ограничивающих область их применения, относятся нежелательные побочные эффекты, а также привыкание либо недостаточная эффективность. Все это требует принятия неотложных мер для создания и внедрения в медицинскую практику новых эффективных препаратов для профилактики и лечения этих заболеваний.

Фактор дифференцировки HLDF (Human Leukemia Differentiation Factor) был обнаружен и выделен нами в 1994 году из среды культивирования клеток линии HL-60, обработанных ретиноевой кислотой [3]. При изучении фактора HLDF был идентифицирован его шестичленный фрагмент TGENHR (пептид HLDF-6), полностью воспроизводящий дифференцирующую активность полноразмерного фактора и обладающий широким спектром ноотропной и нейропротекторной активностей. На первичной культуре нейрональных клеток гиппокампа, мозжечка, а также иммунокомпетентных клеток получены прямые доказательства нейропротекторного эффекта пептида HLDF-6. Этот пептид проявляет антиапоптотическую активность, защищая клетки от действия пептида бета-амилоида ( $\beta$ A), азида натрия, церамида, этанола, а также от холодового стресса и гипоксии. Пептид HLDF-6 повышает жизнеспособность ранних зародышей мышей в условиях *in vitro* [4–7].

Изучение действия пептида HLDF-6 на разных видах животных, проведенное с использованием различных экспериментальных моделей (водный лабиринт Морриса, модели пассивного избегания, отсроченного выбора положения, зоосоциального узнавания), показало, что центральное и системное введение пептида здоровым животным приводит к улучшению формирования и сохранения долговременной памяти. На экспериментальных моделях клинической патологии (БА и ИИ) показано, что пептид снижает выраженный когнитивный дефицит и способствует восстановлению нарушенной памяти [8, 9]. Введение HLDF-6 животным с хронической ишемией головного мозга обеспечивает достоверный нейропротекторный эффект, защищая нейроны мозга от гибели в условиях ишемии [10].

Изучение фармакокинетики пептида HLDF-6 показало, что пептид обладает чрезвычайно низкой

устойчивостью в организме животных – период полудеградации пептида в плазме крови крысы равен 2 мин. Гидролиз HLDF-6 происходит с С-конца, и основной вклад в него вносят дикарбоксипептидазы [11]. Для защиты пептида от дикарбоксипептидаз использовали амидирование его С-концевой карбоксильной группы. Показано, что период полудеградации амидной формы (АФ) пептида HLDF-6 (TGENHR-NH<sub>2</sub>) в плазме крови крысы составляет 8 мин, что значительно выше, чем у нативной формы (НФ) пептида (TGENHR-OH) [12].

С целью выбора наиболее эффективной формы пептида HLDF-6 для исследования ее в качестве фармацевтической субстанции (ФС) мы провели расширенное сравнительное изучение нейропротекторной и ноотропной активности образцов ФС на основе АФ и НФ пептида HLDF-6 на животных моделях БА и ИИ. На первом этапе мы выявили нейропротекторную и ноотропную активность ФС на основе пептида HLDF-6 в моделях спорадической болезни Альцгеймера. Были использованы следующие модели: а) нарушение когнитивных функций при введении фрагмента (25–35) бета-амилоида в базальное гигантоклеточное ядро крыс Вистар; б) нарушение когнитивных функций при совместном введении фрагмента (25–35) бета-амилоида и иботеновой кислоты в гиппокамп крыс Вистар. Сравнительный анализ данных, полученных в обеих моделях БА, показал, что нейропротекторная эффективность АФ пептида HLDF-6, оцениваемая по степени восстановления нарушенных когнитивных функций, значительно превышает эффективность НФ пептида. При использовании АФ пептида HLDF-6 в дозе 250 мкг/кг (гораздо меньшей, чем доза препаратов сравнения) всегда наблюдалось практически полное восстановление функций [12].

В нашей работе представлены результаты изучения специфической активности ФС на основе АФ пептида HLDF-6 на трансгенной модели БА. Трансгенную модель использовали в соответствии с Методическими рекомендациями по доклиническому изучению лекарственных средств с ноотропным типом действия [13].

Болезнь Альцгеймера – нейродегенеративное заболевание, характеризующееся нарушением когнитивной функции и деменцией. Существуют наследственная и спорадическая формы БА. Наследственная форма передается по аутодоминантному типу. В 1991 году был идентифицирован первый ген, обуславливающий семейную манифестацию БА, – локализованный на хромосоме 21 мутантный ген белка APP – предшественника  $\beta$ A [14]. Позднее были выявлены мутации других генов, повышающие риск развития БА. Наибольшим эф-

фектом из продуктов этих генов обладал пресенилин-1 (ген которого расположен на хромосоме 14), ответственный за 70–80% случаев наследственной БА с ранним началом [15]. Создание трансгенных животных позволяет моделировать молекулярные процессы развития БА в течение всей жизни организма. Основное преимущество трансгенной модели состоит в том, что введение животным генов человека, отвечающих за развитие наследственной формы БА (генов *APP* и пресенилина), приводит к развитию у них патогенетических процессов, сходных с проявлениями БА у человека (образование амилоидных бляшек, окислительный стресс, нарушение холинергической передачи, гибель нейронов). Это позволяет предположить, что процессы, проходящие в ЦНС модельных животных, сходны с процессами при развитии БА у человека. Для изучения потенциальных лекарственных препаратов наиболее подходят так называемые дабл-трансгенные мыши линии *B6C3-Tg(APP<sup>swe</sup>,PSEN1<sup>de91</sup>)85Dbo* [16]. Животные этой линии экспрессируют мутантный пресенилин человека и химерный амилоидный белок мышь/человек. Характерной особенностью этой линии является раннее (в возрасте 6–7 месяцев) развитие патологии альцгеймеровского типа, обусловленное ускоренным отложением в мозге бета-амилоидных образований, и нарушение когнитивных функций, оцениваемое в моделях пространственного обучения [17, 18].

Цель нашей работы состояла в изучении нейротропной и ноотропной активности АФ пептида *HLDF-6* на трансгенных мышах *B6C3-Tg(APP<sup>swe</sup>,PSEN1<sup>de91</sup>)85Dbo* – животной модели наследственной БА.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Синтез АФ пептида *HLDF-6*

АФ пептида синтезировали по схеме, описанной в [12].

### Экспериментальные животные

В работе использовали здоровых мышей-самцов линии *B6C3-Tg(APP<sup>swe</sup>,PSEN1<sup>de91</sup>)85Dbo* (*Tg+*), мышей дикого типа *B6C3* (*Tg-*) и мышей *C57Bl/6*. Мышей весом 28–35 г в возрасте 8 месяцев получали из питомника лабораторных животных Филиала Института биоорганической химии РАН, Пущино. Питомник имеет международную аккредитацию *AAALACi*. Система управления качеством производства лабораторных животных в Питомнике сертифицирована на соответствие международным требованиям *ISO 9001:2008*. Все исследования на животных выполняли согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации (Приказ Министерства

здравоохранения и социального развития Российской Федерации от 23 августа 2010 г. № 708н г. Москва «Об утверждении Правил лабораторной практики»), а также рекомендациям, изложенным в «Руководстве по проведению доклинических исследований лекарственных средств» [13]. Были сформированы четыре группы мышей (по 10 особей в каждой): группа 1 (экспериментальная) – мыши *Tg+*, которым интраназально вводили ФС в дозе 250 мкг/кг; группа 2 (активный контроль) – мыши *Tg+*, которым интраназально вводили физиологический раствор; группа 3 (контроль-1) – мыши *Tg-*, которым интраназально вводили физиологический раствор; группа 4 (контроль-2) – мыши линии *C57Bl/6*, которым интраназально вводили физиологический раствор. Введение дополнительной контрольной группы обусловлено тем, что использовали несколько моделей когнитивных функций. Анализ опубликованных данных показывает, что особенности обучения и памяти у мышей *B6C3-Tg(APP<sup>swe</sup>,PSEN1<sup>de91</sup>)85Dbo* изучали преимущественно в моделях пространственного обучения, тогда как другие когнитивные модели были исследованы недостаточно [18, 19]. Данные, полученные с использованием пространственного обучения, свидетельствуют, что различия между линиями *B6C3-Tg+* и *B6C3-Tg-* наиболее выражены в моделях с высоким уровнем стресса (например, в лабиринте Морриса, но не в лабиринте Барнс) [20]. В то же время различия между *B6C3-Tg+* и *B6C3-Tg-* выявлены преимущественно в моделях с положительным, а не с отрицательным подкреплением [21]. Когнитивные способности мышей *B6C3-Tg-* также не охарактеризованы в достаточной мере. В связи с этим для оценки обоснованности экспериментальных протоколов мы сочли целесообразным ввести группу дополнительного контроля – мышей линии *C57Bl/6* с достаточно высоким уровнем ориентировочно-исследовательской активности и стрессоустойчивости [22], и с уровнем когнитивных способностей, близким к среднестатистическому [23].

Мы не использовали препарат сравнения, поскольку действие клинически эффективных препаратов (мемантина, донепезила и др.) в этой модели находится на стадии пилотных исследований и не охарактеризовано в достаточной степени [24, 25].

### Протокол введения ФС и тестирования когнитивных функций

Животным группы 1 в течение 30 дней через день (всего 15 инъекций) вводили АФ пептида в дозе 250 мкг/кг интраназально в объеме 10 мкл/кг поровну в обе ноздри, а животным групп 2–4 вводили физиологический раствор по такой же схеме. Когнитивные функции оценивали после окончания инъекций

по следующей схеме: 3–5 дни – тест распознавания объекта; 8–10 дни – тест пассивного избегания; 13–17 дни – тестирование в лабиринте Морриса.

**Тест распознавания нового объекта**

Тест распознавания нового объекта проводили при комнатном освещении в камере из серого пластика размером 35 × 35 × 40 см. Тест включал три пятиминутные сессии, разделенные интервалом 24 ч: 1 – без объектов, для адаптации к установке; 2 – с двумя одинаковыми объектами – металлическими цилиндрами диаметром 3 см и высотой 3 см; 3 – с заменой одного из цилиндров на пластиковый куб с длиной ребра 3 см. Поведение животных регистрировали с помощью цифровой видеокамеры и анализировали, используя компьютерную программу EthoVision XT (Noldus). Оценивали уровень ориентировочно-исследовательской активности при ознакомлении с предметами (сессия 2), а также время исследования «знакомого» и «нового» предметов в сессии 3. Индекс распознавания вычисляли по формуле:  $(T_n - T_z / T_n + T_z) \times 100\%$ , где  $T_n$  – время исследования «нового» объекта, а  $T_z$  – время исследования «знакомого» объекта во время третьей сессии [26–28].

**Тест пассивного избегания**

Тест пассивного избегания проводили в установке Columbus Instruments (США). Экспериментальная камера состояла из двух одинаковых отсеков размером 25 × 40 × 25 см с полом из металлических прутьев. Отсеки соединялись между собой отверстием в общей стенке (8 × 8 см), снабженным гильотинной дверью. Один из отсеков был освещен, другой затемнен. В ходе выработки пассивного избегания животное помещали в освещенный отсек и регистрировали время перехода в темную часть камеры (проявление норкового рефлекса). Сразу после того, как все четыре лапы животного оказывались в темной половине камеры, гильотинная дверь опускалась и мышь подвергали электрокожному раздражению через прутья пола (0.6 мА, 3 с), после чего ее сразу вынимали из камеры и помещали в домашнюю клетку. Через 48 ч после выработки тестировали выработанный навык. Мышь вновь помещали в светлый отсек, и фиксировали время перехода в темную половину [29–31].

**Лабиринт Морриса**

Лабиринт Морриса представлял собой круглый бассейн серого цвета диаметром 165 см с высотой стенок 60 см, наполненный водой на высоту 40 см. В центре одного из секторов на 2 см ниже уровня воды располагалась круглая платформа из плексигласа диаметром 9 см. Бассейн находился в комнате с большим количеством обстановочных стимулов (постеры,

шкафы и т.д.), ключевые стимулы над платформой отсутствовали. В ходе обучения животных опускали в воду с четырех разных точек и фиксировали время достижения платформы. После достижения платформы животное оставляли на ней на 15 с, а затем на 2 мин возвращали в домашнюю клетку. Обучение проводили в течение 5 дней [18].

**Статистическая обработка данных**

Статистическую обработку результатов проводили с использованием непараметрического критерия Манна–Уитни. Обработку проводили при помощи программного пакета STATISTICA 6.0.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ИХ ОБСУЖДЕНИЕ**

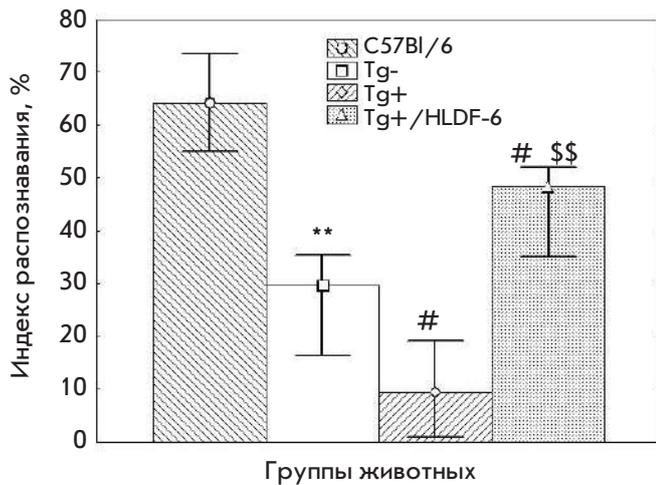
**Модель распознавания нового объекта**

Исследование объектов в сеансе экспозиции (*таблица*) не выявило значимых отличий в уровне ориентировочно-исследовательской активности между контрольными группами Tg- и C57Bl/6. В то же время у животных группы активного контроля (Tg+

Показатели ориентировочно-исследовательской активности мышей различных групп в модели распознавания объекта

Группа животных	Суммарное время исследования объектов в сеансе экспозиции (2-й день теста), с			Значения Z (стандартизованный критерий U Манна–Уитни) и значимость различий между группами
	Нижний квартиль	Медиана	Верхний квартиль	
1. Tg+ с введением ФС	10.2	13.4	17.4	#Z = 0.22, p = 0.83 *Z = 1.55, p = 0.12
2. Tg+ с введением физ. раствора	7.7	12.3	14.1	*Z = 2.41, p = 0.0156
3. Tg- с введением физ. раствора	15.4	16.0	17.3	&Z = 1.06, p = 0.29
4. C57Bl с введением физ. раствора	10.1	16.6	20.2	

# – Статистическая значимость отличий от группы 2.  
\* – Статистическая значимость отличий от группы 3.  
& – Статистическая значимость отличий от группы 4.



**Рис. 1.** Показатели долговременной памяти в модели распознавания объекта у мышей различных групп. Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей. \*\* –  $p < 0.01$  по сравнению с группой C57Bl/6, # –  $p < 0.05$  по сравнению с группой Tg-, \$\$ –  $p < 0.01$  по сравнению с группой Tg+

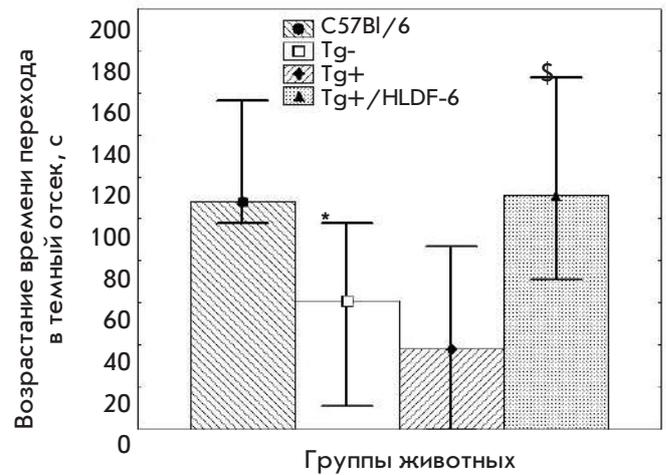
с введением физиологического раствора) исследовательская активность была статистически значимо ниже, чем у мышей группы Tg-. Животные экспериментальной группы не отличались существенно ни от группы активного контроля, ни от мышей Tg-.

Выявлены достаточно высокие значения индекса распознавания объекта, характеризующего декларативную долговременную память, связанную с функциями периринальной коры (участка средней височной извилины), у мышей группы C57Bl/6, сравнимые с опубликованными данными [32]. Обнаружено снижение индекса распознавания у животных контрольной группы Tg- по сравнению с мышами группы C57Bl/6, а также у мышей из группы активного контроля по сравнению с контрольными мышами Tg-. Введение ФС пептида восстанавливало индекс распознавания до уровня, превышающего значения не только в активном контроле, но и в группе Tg- (рис. 1).

### Модель пассивного избегания

Не выявлено статистически значимых межгрупповых различий в длительности латентного периода перехода в темный отсек в день обучения до подачи электрокожного раздражения.

В то же время обнаружены существенные межгрупповые различия по увеличению времени перехода в темный отсек в день тестирования, который характеризует долговременную память (рис. 2).



**Рис. 2.** Показатели обучения в модели пассивного избегания у мышей различных групп. По оси ординат – возрастание времени перехода в темный отсек в сеансе обучения по сравнению с сеансом тестирования (с). Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой C57Bl/6, # –  $p < 0.05$  по сравнению с группой Tg+

Сравнение показателей возрастания времени перехода в темный отсек в день тестирования (характеризующего долговременную память) не выявило статистически значимых различий между контрольными группами C57Bl/6 и Tg-, а также между активным контролем и группой Tg-. Животные, получавшие ФС, существенно превосходили группу активного контроля и на уровне тенденции ( $p = 0.062$ ) превосходили группу Tg-.

### Пространственная память в лабиринте Морриса

Показателем долговременной памяти в данной модели служит среднее время достижения платформы на 2–5 дни обучения. Результаты представлены на рис. 3.

Тест Манна–Уитни не выявил статистически значимых различий между контрольными группами (C57Bl/6 и Tg-) ни в один из дней обучения. Животные Tg+, получавшие физиологический раствор, имели существенный дефицит пространственной памяти в 4-й и 5-й дни обучения по сравнению с группой Tg-. Введение ФС приводило к частичному восстановлению пространственной памяти у мышей Tg+. На 4-й день обучения уровень выполнения навыка у животных этой группы занимал промежуточное положение между животными группы Tg+, получавшими физиологический раствор, и животными Tg-. В 5-й день обучения мыши Tg+, получавшие ФС, выполняли задачу существенно лучше, чем

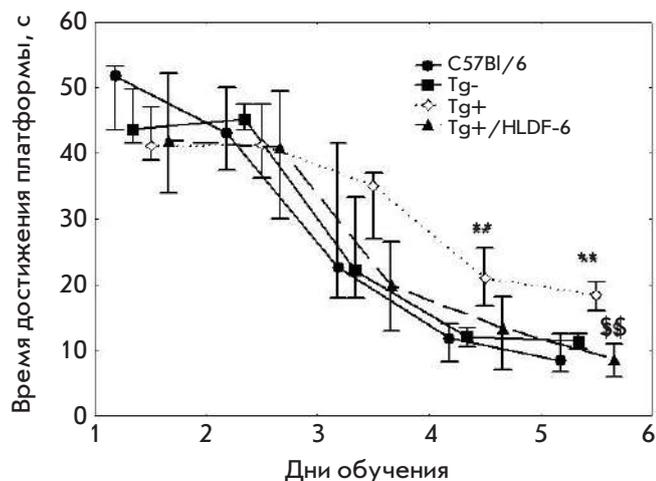


Рис. 3. Динамика обучения мышей в водном лабиринте Морриса. Данные представлены в виде медианы, верхнего и нижнего квартилей. \*\* –  $p < 0.01$  по сравнению с группой Tg-, \$\$ –  $p < 0.01$  по сравнению с группой Tg+

группа Tg+ с введением физиологического раствора и не отличались значимо от контрольной группы Tg-.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты свидетельствуют, что в условиях интраназальной доставки ФС на основе АФ пептида HLDF-6 в дозе 250 мкг/кг эффективно стимулирует выполнение когнитивных задач трансгенными мышами B6C3-Tg(APPSwe,PSEN1de9)85Dbo во всех использованных моделях. Следует отметить, что результаты, полученные в дополнительной контрольной группе мышей C57Bl/6, подтверждают валидность использованных моделей когнитивных функций. При этом в модели обстановочного пространственного обучения (лабиринт Морриса) динамика обучения контрольной группы Tg- не отличалась от динамики у мышей C57Bl/6. В группе активного контроля выявлено снижение динамики обучения по сравнению с Tg-, а введение ФС оказывало выраженный нейропротекторный эффект с восстановлением показателей обучения до контрольного уровня.

В модели распознавания объекта отмечено существенное снижение показателей обучения в группе Tg- относительно C57Bl/6 и (несколько менее выраженное) в группе активного контроля относительно Tg-; при этом введение ФС приводило к повышению показателя обучения до уровня, превосходящего Tg-.

В модели пассивного избегания также наблюдалось снижение показателей обучения в группе Tg- относительно C57Bl/6. Однако, в отличие от других

тестов, не обнаружено ухудшения обучения животных группы активного контроля в сравнении с Tg-. Введение ФС так же, как и в других моделях, стимулировало долговременную память у трансгенных мышей до уровня, даже несколько превышающего контрольный.

Совокупность полученных данных свидетельствует, что ФС на основе АФ пептида HLDF-6 обладает не только нейропротекторными свойствами, но и ноотропным эффектом, т.е. стимулирует когнитивные функции вне зависимости от наличия нейродегенеративного процесса.

Результаты нашей работы полностью согласуются с данными, полученными на животных моделях БА – фрагмент  $\beta A$  (25–35) вводили в базальное ганглиоцелочное ядро Мейнерта, фрагмент  $\beta A$  и иботеновую кислоту совместно вводили в гиппокамп [12]. По совокупности полученных результатов в качестве объекта дальнейших доклинических исследований мы выбрали ФС на основе АФ пептида HLDF-6, за эффективную терапевтическую дозу приняли 250 мкг/кг и интраназальное введение в качестве способа доставки.

Ранее методом радиорецепторного анализа мы провели изучение участия серотониновых, ГАМК и NMDA-глутаматных рецепторов мозга в ноотропном действии АФ пептида HLDF-6. Эти рецепторы участвуют в патогенезе различных неврологических расстройств и хронических нейродегенеративных заболеваний [33, 34]. Было изучено влияние АФ пептида HLDF-6 на характеристики связывания радиоактивно меченных лигандов с NMDA-рецепторами на мембранах гиппокампа, ГАМК-А и серотониновыми  $5HT_{2A}$ -рецепторами на мембранах префронтальной коры мышей BALB/c. Показано, что только в случае NMDA-глутаматных рецепторов субхроническое введение пептида в гиппокамп мышей приводит к возрастанию количества связавшегося лиганда (G-3H МК-801) [11], что отражает плотность соответствующих рецепторов. Таким образом, под воздействием АФ пептида HLDF-6 происходит восстановление до нормы количества NMDA-рецепторов, что вызывает улучшение когнитивного поведения. Субхроническое 5-разовое введение АФ пептида HLDF-6 не влияло на плотность ГАМК-рецепторов и никотиновых холинорецепторов, но сопровождалось снижением плотности  $5-HT_2$ -серотониновых рецепторов [35]. Сделан вывод, что механизм формирования нейропротекторной активности пептида Thr-Gly-Glu-Asn-His-Arg-NH<sub>2</sub> может включать воздействие на глутамат- и серотонинергическую системы.

Пептид HLDF-6 является фрагментом природного фактора дифференцировки HLDF-6, присут-

ствующего в крови и ЦНС млекопитающих и человека. Проведенные нами доклинические испытания лекарственного средства на основе АФ пептида HLDF-6 показали, что оно хорошо растворимо, легко метаболизируется, не обладает иммуногенностью и токсичностью, характеризуется высокой эффективностью специфической активности, безопасно в дозе, в 10 раз превышающей терапевтическую. Результаты доклинических исследований позволяют надеяться на успешное проведение клинических исследований препарата. Можно рассчитывать,

что в этом случае препарат найдет широкое применение в терапии БА. ●

*Работа поддержана Министерством образования и науки Российской Федерации (государственный контракт № 14N08.11.0002) и программой Президиума РАН «Молекулярная и клеточная биология».*

*Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБХ, поддержанного Минобрнауки России, идентификатор соглашения RFMEFI62117X0018.*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Prince M., Albanese E., Guerchet M., Prina M. // World Alzheimer Report. 2014. Website www.alz.co.uk/worldreport.
- Feigin V.L., Forouzanfar M.H., Krishnamurthi R., Mensah G.A., Connor M., Bennett D.A., Moran A.E., Sacco R.L., Anderson L., Truelsen T., et al. // Lancet. 2010. V. 383. № 9913. P. 245–255.
- Kostanyan I.A., Astapova M.V., Starovoytova E.V., Dranitsyna S.M., Lipkin V.M. // FEBS Lett. 1994. V. 356. № 2–3. P. 327–329.
- Костанян И.А., Астапова М.В., Наволоцкая Е.В., Лепихова Т.Н., Драницина С.М., Телегин Г.Б., Родионов И.Л., Байдакова Л.К., Золотарев Ю.А., Молотковская И.М., Липкин В.М. // Биоорганическая химия. 2000. Т. 26. № 7. С. 505–511.
- Сахарова Н.Ю., Костанян И.А., Лепихова Т.Н., Лепихов К.А., Наволоцкая Е.В., Малашенко А.М., Томбран-Тинк Дж., Липкин В.М., Чайлахян Л.М. // Докл. АН. 2000. Т. 372. № 2. С. 260–263.
- Rzhevsky D.I., Zhokhov S.S., Babichenko I.I., Goleva A.V., Goncharenko E.N., Baizhumanov A.A., Murashev A.N., Lipkin V.M., Kostanyan I.A. // Regul. Peptides. 2005. V. 127. № 1. P. 111–121.
- Костанян И.А., Жохов С.С., Сторожева З.И., Прошин А.Т., Сурина Е.А., Бабиченко И.И., Шерстнев В.В., Липкин В.М. // Биоорганическая химия. 2006. Т. 32. № 4. С. 399–407.
- Sewell R.D., Gruden M.A., Pache D.M., Storozheva Z.I., Kostanyan I.A., Proshin A.T., Yurashev V.V., Sherstnev V.V. // J. Psychopharmacol. 2005. V. 19. № 6. P. 602–608.
- Сторожева З.И., Прошин А.Т., Жохов С.С., Шерстнев В.В., Родионов И.Л., Липкин В.М., Костанян И.А. // Бюл. эксп. биол. мед. 2006. Т. 141. № 3. С. 292–296.
- Костанян И.А., Сторожева З.И., Семенова Н.А., Липкин В.М. // Докл. АН. 2009. Т. 428. № 4. С. 565–569.
- Золотарев Ю.А., Ковалёв Г.И., Дадаян А.К., Козик В.С., Кондрахин Е.А., Васильева Е.В., Липкин В.М. // Нейродегенеративные заболевания: от генома до целостного организма / Под ред. Угрюмова М.В. М.: Научный мир, 2014. Т. 2. С. 763–777.
- Bogachouk A.P., Storozheva Z.I., Solovjeva O.A., Sherstnev V.V., Zolotarev Yu.A., Azev V.N., Rodionov I.L., Surina E.A., Lipkin V.M. // J. Psychopharmacol. 2016. V. 30. № 1. P. 78–92.
- Бунятян Н.Д., Миронов А.Н., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журавлева М.М., Лепяхин В.К., Коробов Н.В., Меркулов В.А., Орехов С.Н., Сакаева И.В. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012. 942 с.
- Goate A., Chartier-Harlin M.C., Mullan M., Brown J., Crawford F., Fidani L., Giuffra L., Haynes A., Irving N., James L., et al. // Nature. 1991. V. 349. № 6311. P. 704–706.
- Selkoe D.J. // Nature. 1999. V. 399. (6738 suppl.). P. A23–A31.
- Jankowsky J.L., Slunt H.H., Ratovitski T., Jenkins N.A., Copeland N.G., Borchelt D.R. // Biomol. Eng. 2001. V. 17. № 6. P. 157–165.
- Su D., Zhao Y., Xu H., Wang B., Chen X., Chen J., Wang X. // PLoS One. 2012. V. 7. № 11. e50172.
- McKenna J.T., Christie M.A., Jeffrey B.A., McCo J.G., Lee E., Connolly N.P., Ward C.P., Strecker R.E. // Arch. Ital. Biol. 2012. V. 150. № 1. P. 5–14.
- Zhong Z., Yang L., Wu X., Huang W., Yan J., Liu S., Sun X., Liu K., Lin H., Kuang S., Tang X. // J. Mol. Neurosci. 2014. V. 53. № 3. P. 370–376.
- Bennett L., Kersaitis C., Macaulay S.L., Münch G., Niedermayer G., Nigro J., Payne M., Sheean P., Vallotton P., Zabaraz D., Bird M. // PLoS One. 2013. V. 8. № 10. e76362.
- Semina I.I., Baichurina A.Z., Makarova E.A., Leushina A.V., Kazakevich Zh.V., Gabdrakhmanova M.R., Mukhamed'yarov M.A., Zefirov A.L. // Bull. Exp. Biol. Med. 2015. V. 158. № 5. P. 621–623.
- Ковалёв Г.И., Кондрахин Е.А., Салимов П.М. // Нейрохимия. 2013. Т. 30. № 2. С. 128–134.
- Brooks S.P., Pask T., Jones L., Dunnett S.B. // Genes Brain Behav. 2005. V. 4. № 5. P. 307–317.
- Neumeister K.L., Riepe M.W. // J. Alzheimers Dis. 2012. V. 30. № 2. P. 245–251.
- Nagaku A., Shitaka Y., Yarimizu J., Matsuoka N. // Eur. J. Pharmacol. 2013. V. 703. № 1–3. P. 53–61.
- Rutten K., Reneerkens O.A., Hamers H., Sik A., McGregor I.S., Prickaerts J., Blokland A. // J. Neurosci. Meth. 2008. V. 171. № 1. P. 72–77.
- Nimmrich V., Szabo R., Nyakas C., Granic I., Reymann K.G., Schröder U.H., Gross G., Schoemaker H., Wicke K., Möller A., Luiten P. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2008. V. 327. № 2. P. 343–352.
- Zhang R., Xue G., Wang S., Zhang L., Shi C., Xie X. // J. Alzheimers Dis. 2012. V. 31. № 2. P. 801–812.
- Harkany T., O'Mahony S., Kelly J.P., Soós K., Törő I., Penke B., Luiten P.G., Nyakas C., Gulya K., Leonard B.E. // Behav. Brain Res. 1998. V. 90. № 2. P. 133–145.
- Xu Z., Zheng H., Law S.L., Dong So D., Han Y., Xue H. // J. Pept. Sci. 2006. V. 12. № 1. P. 72–78.
- Feng Z., Chang Y., Cheng Y., Zhang B.L., Qu Z.W., Qin C., Zhang J.T. // J. Pineal. Res. 2004. V. 37. № 2. P. 129–136.
- Tucker K.R., Godbey S.J., Thiebaud N., Fadool D.A. // Physiol. Behav. 2012. V. 107. № 3. P. 3424–3432.
- Walker D.L., Davis M. // Pharmacol. Biochem. Behav. 2002. V. 71. № 3. P. 379–392.
- Zhong Z., Yang L., Wu X., Yuang W., Yan J., Liu S., Sun X., Liu K., Lin H., Kuang S., Tang X. // J. Mol. Neurosci. 2014. V. 53. № 3. P. 370–376.
- Zolotarev Yu.A., Kovalev G.I., Kost N.V., Voevodina M.E., Sokolov O.Y., Dadayan A.K., Kondrakhin E.A., Vasilev E.V., Bogachuk A.P., Azev V.N., et al. // J. Psychopharmacol. 2016. V. 30. № 9. P. 922–935.

УДК 577.152.34

# Изменение содержания иммунопротеасом и макрофагов в печени крыс при индукции донорспецифической толерантности

Я. Д. Карпова<sup>1\*</sup>, В. Д. Устиченко<sup>2</sup>, Н. М. Алабедаькарим<sup>2</sup>, А. А. Степанова<sup>1</sup>, Ю. В. Люпина<sup>1</sup>, К. И. Богуславский<sup>2</sup>, Г. А. Божок<sup>2</sup>, Н. П. Шарова<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 26

<sup>2</sup>Институт проблем криобиологии и криомедицины НАН Украины, 61016, Харьков, ул. Переяславская, 23

\*E-mail: yasiik@gmail.com

Поступила в редакцию 27.08.2016

Принята к печати 02.06.2017

**РЕФЕРАТ** Индукция донорспецифической толерантности (ДСТ) путем введения клеток донора в порталную вену реципиента является одним из методов решения проблемы приживления трансплантатов. Однако механизм развития ДСТ не выяснен. В представленной работе методами Вестерн-блоттинга и проточной цитофлуориметрии впервые изучено изменение содержания иммунопротеасом и макрофагов в печени крыс на ранних сроках развития аллоспецифической порталной толерантности. На основании полученных данных можно заключить, что индукция ДСТ – активный процесс, состоящий из двух фаз, в ходе которых изменяется уровень иммунных субъединиц LMP2 и LMP7 протеасом в мононуклеарных клетках печени, включая клетки Купфера, а также количество клеток Купфера. Первая фаза длится до 5 сут после начала индукции ДСТ, вторая – с 5 по 14 сут. В обеих фазах уровень субъединиц LMP2 и LMP7 возрастает как в общем пуле мононуклеарных клеток, так и в клетках Купфера, с максимумами на 1-е и 7-е сут. Кроме того, со сдвигом в несколько суток в обеих фазах увеличивается общее количество клеток Купфера. При этом изменения наиболее выражены во второй фазе. На 3-и сут содержание мононуклеарных клеток, экспрессирующих иммунопротеасомы, становится ниже, чем у контрольных нативных животных. Предполагается, что в этой временной точке образуется своеобразное «окно возможностей» для последующего заполнения пустующей ниши клетками разных субпопуляций. В зависимости от этого возможно развитие либо толерантности, либо отторжения. Полученные результаты ставят новые задачи поиска способов воздействия на клеточный состав печени и экспрессию иммунопротеасом на 3-и сут после начала индукции ДСТ для блокирования развития отторжения.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** иммунопротеасомы, донорспецифическая толерантность, печень, клетки Купфера, крысы, проточная цитофлуориметрия.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ГКГ – главный комплекс гистосовместимости; ДСТ – донорспецифическая толерантность; АПК – антигенпредставляющие клетки; LSEC – клетки эндотелия синусоидов; Ab – антитела; pAb – поликлональные антитела; mAb – моноклональные антитела.

## ВВЕДЕНИЕ

Проблема приживления органов до сих пор остается одной из самых актуальных в трансплантологии. Трансплантация применяется на терминальных стадиях заболевания органа, когда иные методы лечения оказываются неэффективными. При аллогенной трансплантации активизируется иммунный ответ, который приводит к отторжению. Современные протоколы иммуносупрессии не всегда способны предотвратить отторжение, поэтому необходим поиск

способов индукции толерантности к трансплантату в организме реципиента.

Критическая роль печени в развитии трансплантационной толерантности известна давно. Спонтанное приживление печеночного аллотрансплантата у реципиентов, отличающихся от доноров по главному комплексу гистосовместимости (ГКГ), выявлено у аутбредных свиней [1], инбредных линий мышей [2] и крыс [3]. Сочетанная трансплантация печени и других органов приводила к лучшей

приживляемости, чем использование одиночных аллогraftов [4–6].

Еще один ключевой фактор, участвующий в индукции толерантности к трансплантату, – наличие в печени иммунокомпетентных клеток донорского происхождения. Это подтверждается исследованиями, в которых показано, что при элиминации из донорской печени «пассажирных» лейкоцитов не развивается толерантность к аллогraftу [7–9].

Метод индукции донорспецифической толерантности (ДСТ) основан на соблюдении этих двух условий. Он реализуется путем трансфузии донорских клеток (спленоцитов, лимфоцитов, клеток костного мозга) в печень через портальную вену. Использование этого метода приводит к значительному увеличению срока жизни аллотрансплантатов сердца [10], почек [11], кишечника [12], кожи [13], островков поджелудочной железы [14], трахеи [15] у экспериментальных моделей. Однако молекулярно-клеточные механизмы индукции и поддержания ДСТ остаются невыясненными, хотя многие исследователи подчеркивают значительный вклад макрофагов печени (клеток Купфера) [16, 17].

Возможными кандидатами на роль «менеджеров» иммунного ответа, способных направить его по пути принятия или отторжения аллогraftа, считаются множественные формы иммунопротеасом, содержащие протеолитически активные иммунные субъединицы LMP2, LMP10 и/или LMP7. Иммунопротеасомы участвуют в образовании антигенных эпитопов для молекул ГКГ, регуляции экспрессии костимуляторных молекул на антигенпредставляющих клетках (АПК) и дифференцировке субпопуляций Т-лимфоцитов [18–21].

Ранее мы обнаружили изменение соотношения субъединиц иммунопротеасом LMP2 и LMP7 в печени и аллогraftах яичника и щитовидной железы при индукции ДСТ [22, 23]. Приживление аллогraftов сопровождалось значительным увеличением количества мононуклеарных клеток в печени, экспрессирующих иммунопротеасомы с субъединицей LMP2, на 30-е сут после индукции ДСТ.

Преыдушие экспериментальные и клинические исследования показали, что индукция ДСТ наступает не во всех случаях [24, 25]. Более того, у 7–15% реципиентов развивается сенсбилизация к донорским антигенам [26, 27]. Поскольку пока не известен конкретный механизм индукции ДСТ, заранее определить вектор иммунного ответа в сторону принятия трансплантата либо его отторжения не представляется возможным. Это снижает ценность данного метода и ограничивает его использование в клинической трансплантологии.

Очевидно, что иммунологические события, происходящие в печени реципиента сразу после введения донорских клеток и связанные с распознаванием и презентацией антигена, могут определять развитие толерантности. В связи с этим исследование каскада клеточно-опосредованных реакций и изменения пула протеасом на ранних сроках после введения донорского антигена представляется актуальным для понимания механизма индукции ДСТ.

Цель нашей работы состояла в определении уровня иммунопротеасом и количества резидентных макрофагов в печени крыс в первые 2 недели после начала индукции ДСТ.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реактивы

В работе использованы среда ДМЕМ, коллагеназа и ДНКазы I (все Sigma, США), перколл (Pharmacia, Швеция), сапонин (Calbiochem, США), pAb кролика к субъединице LMP7, mAb мыши к субъединице LMP2 (все Biomol International, Великобритания), mAb мыши к макрофагам, конъюгированные с фикоэритрином (Anti-Rat Macrophage Marker, eBioscience, США), mAb мыши к  $\beta$ -актину (Santa Cruz Biotechnology, США), антитела к IgG кролика, меченные Alexa 488 (Invitrogen, США), антитела к IgG мыши, конъюгированные с фикоэритрином (eBioscience, США).

### Животные

Эксперименты были проведены на 5–6-месячных самках крыс линий Вистар и Август. Донорами были крысы линии Вистар, реципиентами – крысы линии Август. Все манипуляции с животными проводили в соответствии с положениями «Европейской конвенции защиты позвоночных животных, используемых с экспериментальной и иной научной целью» (Страсбург, 1985). В экспериментах использовали следующие группы животных: группа 1 ( $n = 12$ ) – интактный контроль; группа 2 ( $n = 48$ ) – ложноперированные животные (интрапортальное введение физиологического раствора); группа 3 ( $n = 48$ ) – животные с индукцией ДСТ (интрапортальное введение спленоцитов); группа 4 ( $n = 30$ ) – животные со «срывом» ДСТ (внутрибрюшинная инъекция хлорида гадолиния  $GdCl_3$  (1 мг/100 г массы тела) и интрапортальное введение спленоцитов через 1 сут).

### Получение спленоцитов и индукция ДСТ

Все процедуры проводили в стерильных условиях. Спленоциты получали из селезенки крыс линии Вистар по стандартному протоколу [28]. От эритроцитов избавлялись путем трехкратной обработ-

ки клеточной суспензии раствором, содержащим 154 мМ хлорида аммония, 10 мМ бикарбоната натрия, 0.082 мМ этилендиаминтетрауксусной кислоты (EDTA). Полученные клетки отмывали 2 раза средой ДМЕМ. Жизнеспособность спленоцитов, которую проверяли методом окрашивания трипановым синим, составляла в среднем 90%. ДСТ индуцировали путем введения в портальную вену печени 1 мл стерильного физиологического раствора, содержащего  $1 \times 10^7$  спленоцитов. Исследование печени проводили на 1, 3, 5, 7, 10, 14-е сут после индукции.

#### Получение мононуклеарных клеток печени

Печень крыс перфузировали через воротную вену бескальциевым буфером (5 мМ EDTA на 0.1 М фосфатно-солевом буфере, pH 7.4) в течение 5 мин. Затем печень выделяли и перфузировали 0.1 М фосфатно-солевым буфером, содержащим 0.4 мг/мл коллагеназы, 3.7 М CaCl<sub>2</sub>, 25 нг/мл ДНКазы I, 5 мМ MgCl<sub>2</sub> (pH 7.4), при 37°C в течение 10 мин. После этого ткань измельчали ножницами и дополнительно инкубировали в буфере с коллагеназой при 37°C в течение 30 мин, дезинтегрировали путем пипетирования, фильтровали через нейлоновое сито и центрифугировали при 20 g и 4°C в течение 2 мин. Отбирали супернатант и центрифугировали его при 400 g в течение 3 мин. Осадок клеток ресуспендировали в 30% перколле и центрифугировали при 400 g в течение 30 мин при 4°C. Отбирали клетки с границы раздела и отмывали 2 раза в 0.1 М фосфатно-солевом буфере при 4°C.

#### Фенотипический анализ клеток методом проточной цитофлуориметрии

Для идентификации субъединиц иммунопротеасом выделенные мононуклеарные клетки печени фиксировали в 4% параформальдегиде в течение 15 мин, пермеабилizировали в течение 15 мин в 1% растворе сапонины, приготовленном на 0.1 М фосфатно-солевом буфере. Обработку rAb кролика к субъединице LMP7 и mAb мыши к субъединице LMP2 проводили в течение ночи при 4°C в пробе, содержащей  $1 \times 10^6$  клеток и соответствующие антитела (разведение 1 : 600 на 0.1 М фосфатно-солевом буфере с 1% бычьего сывороточного альбумина). После отмывки клетки инкубировали с вторичными антителами: к IgG кролика, мечеными Alexa 488, или антителами к IgG мыши, мечеными фикоэритрином, в разведении 1 : 500 в течение 30 мин при комнатной температуре.

Для идентификации клеток Купфера  $1 \times 10^6$  клеток ресуспендировали в 0.25 мл фосфатно-солевого буфера, содержащего 10% фетальной телячьей сыворотки, и инкубировали в течение 30 мин с mAb мыши

Anti-Rat Macrophage Marker (разведение 1 : 50), конъюгированными с фикоэритрином.

Клетки анализировали на проточном цитофлуориметре BD FACSCalibur (BD Bioscience, США) с использованием программного обеспечения CellQuestPro.

#### Вестерн-блоттинг

Относительное содержание субъединиц протеасом и β-актина определяли в осветленных гомогенатах печени с использованием mAb мыши к субъединице LMP7, субъединице LMP2 и β-актину как описано ранее [23].

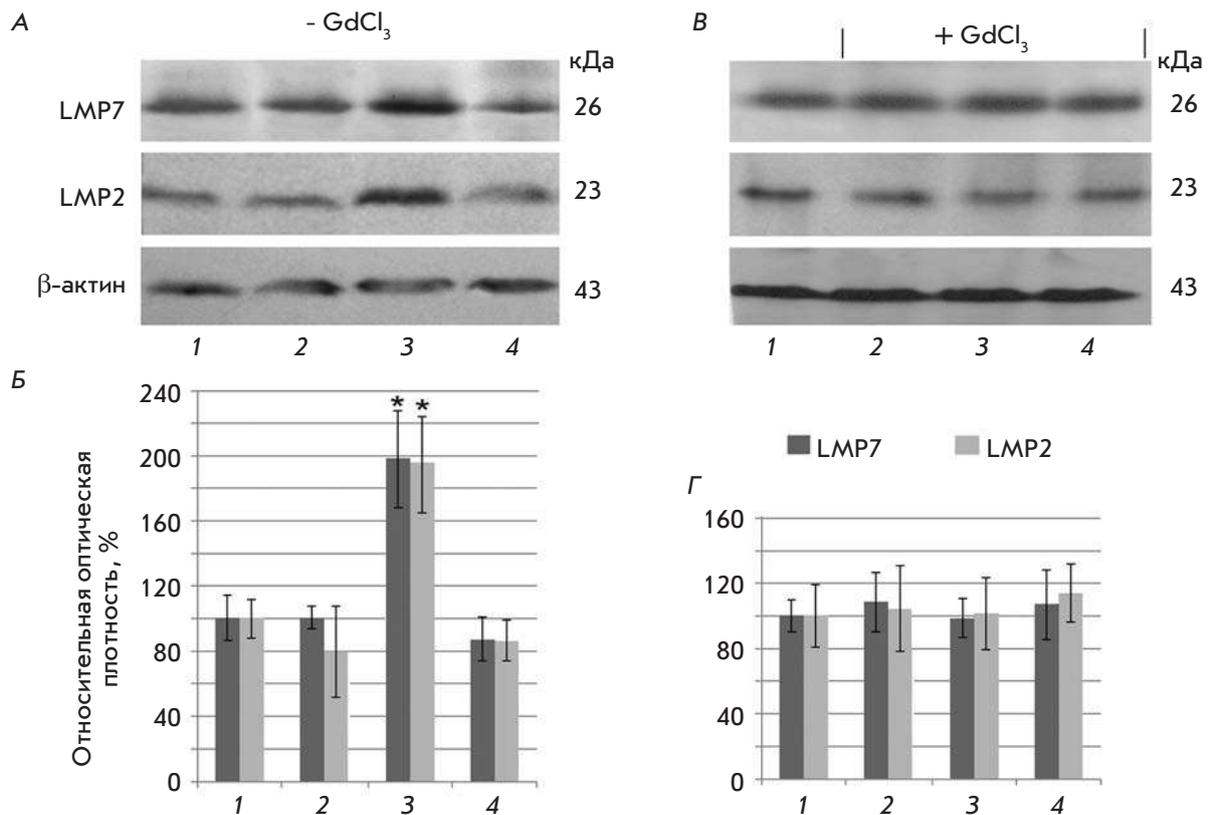
**Статистический анализ** проводили с помощью программного приложения Excel и Statistica 7.0. Данные представлены в виде медианы, значимость различий между выборками оценивали с помощью непараметрического критерия Манна–Уитни с уровнем значимости 0.05. При множественных сравнениях использовали поправку Бонферрони.

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

##### Содержание иммунных субъединиц LMP2 и LMP7 протеасом в клетках печени крыс после интрапортального введения спленоцитов

С помощью Вестерн-блоттинга в осветленных гомогенатах печени крыс с индукцией ДСТ (группа 3) был выявлен повышенный уровень иммунных субъединиц протеасом на 7-е сут после начала индукции ДСТ у пяти животных из шести в сравнении с ложнооперированным контролем (рис. 1). Очевидно, у одного животного механизмы развития ДСТ были нарушены. У ложнооперированных животных не выявлено различий в содержании иммунных субъединиц на всех исследованных сроках после введения физиологического раствора. Не обнаружено также различий в содержании иммунных субъединиц в печени у животных 4-й группы, которым вводили хлорид гадолиния. Чтобы понять, связаны ли обнаруженные изменения в пуле иммунопротеасом с мононуклеарными клетками печени, эти клетки изучали методом проточной цитофлуориметрии.

На рис. 2А представлены гистограммы, полученные при анализе окрашенных антителами к иммунным субъединицам LMP2 и LMP7 мононуклеарных клеток печени крыс. Выявлено изменение количества клеток, экспрессирующих субъединицы LMP2 и LMP7 после начала индукции ДСТ (рис. 2Б). Установлено, что уже на 1-е сут в печени животных обеих групп с интрапортальным введением спленоцитов (группы 3 и 4) количество LMP7-позитивных клеток увеличивается в 1.8 раза,



**Рис. 1.** Содержание субъединиц LMP7 и LMP2 протеасом в осветленных гомогенатах печени ложнооперированных крыс на 7-е сут после введения физиологического раствора (1) и печени крыс на 1 (2), 7 (3) и 14-е сут после начала индукции ДСТ (4) с предварительной инъекцией  $GdCl_3$  и без нее. А, В – Вестерн-блоты субъединиц LMP7, LMP2 и  $\beta$ -актина. Б, Г – относительное количество (оптическая плотность блотов) субъединиц LMP7 и LMP2, нормализованное на содержание  $\beta$ -актина. За 100% принимали количество субъединиц в образцах ложнооперированных животных; приведены средние значения  $\pm$  стандартная ошибка среднего, обозначены значимые отличия при  $p < 0.05$  и  $n = 5-6$  по сравнению с ложнооперированным контролем (\*)

а LMP2-позитивных – в 3 раза по сравнению с ложнооперированным контролем (группа 2).

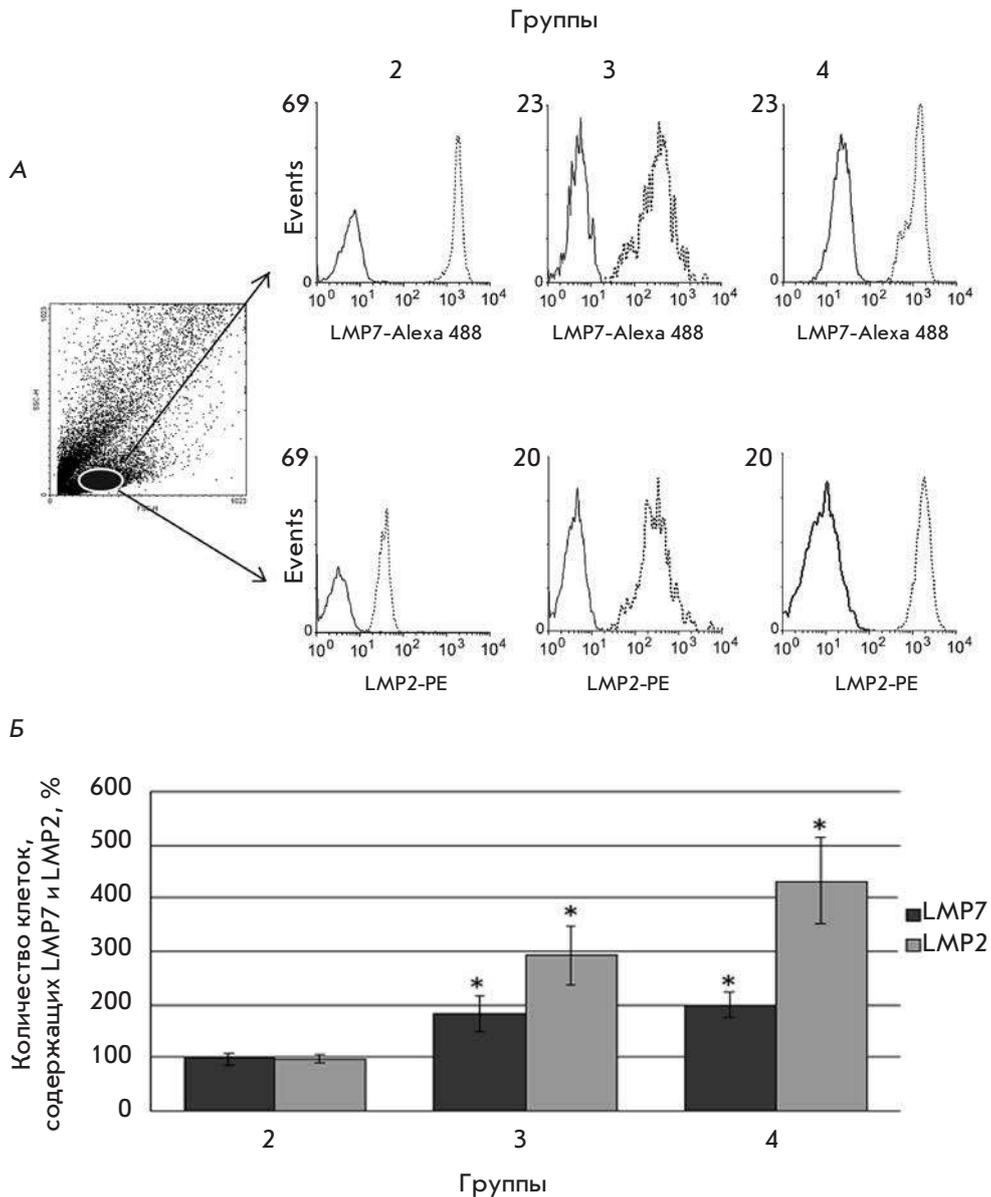
Хлорид гадолиния широко применяется в качестве специфического ингибитора антигенпредставляющей функции клеток Купфера [29]. Как показано ранее, введение этого соединения экспериментальным животным за сутки до интрапортальной инфузии спленоцитов отменяет феномен индукции ДСТ [13, 16].

Нами установлено, что у обработанных  $GdCl_3$  животных (группа 4) количество клеток, содержащих субъединицы LMP2 и LMP7, не отличалось значимо на 1-е сут от количества клеток у животных группы 3 (без обработки), но повышено по сравнению с ложнооперированными (группа 2) (рис. 2Б).

Учитывая богатый состав АПК печени, к которым помимо клеток Купфера и клеток эндотелия синусоидов (LSEC) относятся дендритные и звездчатые клетки [30], логично было бы заключить, что увеличение числа клеток, экспрессирующих иммунные субъединицы LMP2 и LMP7, может происходить

и на фоне ингибирования функции макрофагов. Однако в этом случае количество клеток, содержащих LMP2 и LMP7, должно различаться в группах 3 и 4: в группе 4 таких клеток должно быть меньше, чем в группе 3. Отсутствие значимых различий свидетельствует о том, что увеличение количества клеток, экспрессирующих LMP2 и LMP7, на 1-е сут обусловлено главным образом притоком в печень донорских спленоцитов, содержащих иммунные протеасомы. Макрофаги, если они и вносят вклад в общее число обогащенных иммунопротеасомами мононуклеарных клеток печени в этот период, то он минимален и не влияет на полученный результат.

На 3-и сут количество мононуклеарных клеток, содержащих иммунопротеасомы, в печени животных группы 3 снижалось по сравнению с первыми сутками (рис. 3). Это могло быть следствием того, что спленоциты донора покинули печень реципиента, мигрируя к регионарным лимфоузлам [31]. Возможно также, что они были элиминированы в результате



**Рис. 2.** Цитофлуориметрический анализ экспрессии субъединиц LMP7 и LMP2 в мононуклеарных клетках печени крыс. **А** – на точечном графике прямого (FSC) и бокового (SSC) светорассеяния овалом выделена субпопуляция анализируемых клеток. В правой части представлены гистограммы экспрессии LMP7 и LMP2 в анализируемой субпопуляции клеток печени крыс групп 2–4 на первые сутки после начала индукции ДСТ. **Б** – содержание (%) мононуклеарных клеток, экспрессирующих субъединицы LMP2 и LMP7, в печени животных групп 2–4 на 1-е сут. На гистограммах: сплошная линия – изотипический контроль, пунктирная линия – опыт. За 100% принимали количество клеток, содержащих субъединицы LMP2 и LMP7, в образцах группы 1. Данные значимо отличаются от группы 2 при  $p < 0.05$  и  $n = 5$  (\*)

активации цитотоксических CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов реципиента [32].

Интересен факт уменьшения количества мононуклеарных клеток, содержащих иммунные протеасомы, на 3-и сут не только в сравнении с первыми сутками после начала индукции ДСТ, но и относительно их базального уровня у контрольных животных группы 1. Если учесть, что иммунопротеасомы экспрессируются в основном в АПК и иммунокомпетентных клетках, то это косвенно указывает на уменьшение их количества в печени на 3-и сут после начала индукции. Это может быть связано с апоптозом активированных Т-лимфоцитов, наблюдаемым в печени при инициации и поддержании толерогенного статуса [31]. Однако независимо от того, какие механизмы

были задействованы, количество мононуклеарных клеток, обогащенных иммунопротеасомами, в печени в это время минимально, что может быть своеобразным «окном возможностей» для последующего заполнения пустующей ниши клетками разных субпопуляций, и в зависимости от этого развития аллоспецифической толерантности либо отторжения.

На 7-е сут после введения спленцитов наблюдался максимальный подъем содержания мононуклеарных клеток, экспрессирующих иммунопротеасомы, в печени животных группы 3, который превышал показатели контрольной группы почти в 100 раз для LMP2 и в 200 – для LMP7 (рис. 3). Такой массивный ответ мог быть вызван, с одной стороны, притоком в печень иммунокомпетентных клеток в от-

вет на введение донорских спленоцитов, а с другой, активацией резидентного пула АПК в самой печени, которая сопровождается повышением содержания иммунных субъединиц [33, 34]. В последующие сутки количество клеток, экспрессирующих иммунные субъединицы, постепенно снижалось.

В целом, результаты, полученные методом проточной цитофлуориметрии, совпадают с данными Вестерн-блоттинга, указывающими на всплеск экспрессии иммунопротеасом в печени на 7-е сут после индукции ДСТ. Кроме того, обнаружение этого эффекта не у всех животных подтверждает предположение о разных возможностях заполнения ниши после 3 сут, что критично для развития толерантности или отторжения.

У обработанных  $GdCl_3$  животных не наблюдали такого выраженного увеличения уровня клеток, обогащенных иммунопротеасомами. Количество LMP7-позитивных клеток не отличалось от их количества у ложнооперированных животных, а число LMP2-позитивных клеток на 7-е сут превышало значения в контроле всего в 4 раза. Разница между группами 3 и 4 косвенно свидетельствует о том, что ингибирование клеток Купфера влияет на зависимые от иммунопротеасом процессы, происходящие на ранних этапах индукции ДСТ.

### Взаимосвязь между содержанием клеток Купфера и изменением экспрессии иммунопротеасом при индукции ДСТ

Полученные результаты продиктовали необходимость прямого определения содержания клеток Купфера в разные сроки после введения спленоцитов. Использовали моноклональные антитела, распознающие ED2-подобные антигены на мембранах резидентных макрофагов крыс, в том числе клеток Купфера [35].

Профиль динамики ED2-позитивных клеток тоже имел два максимума (рис. 4), причем первый пик выявлялся на двое, а второй – на трое суток позже по сравнению с пиками содержания суммарного пула мононуклеарных клеток, экспрессирующих иммунопротеасомы (рис. 3 и 4). Такой сдвиг можно объяснить тем, что сначала АПК презентируют с участием иммунопротеасом чужеродный аллоантиген. Этот процесс сопровождается выбросом медиаторов иммунного ответа, которые служат сигналом для пролиферации клеток Купфера [36, 37].

У животных группы 4 всплесков количества макрофагов в печени не наблюдалось, вероятно, в связи с тем, что этап презентации антигена на фоне введения  $GdCl_3$  отсутствовал или был дефектным.

Полученные результаты дают основание утверждать, что индукция портальной толерантности – это

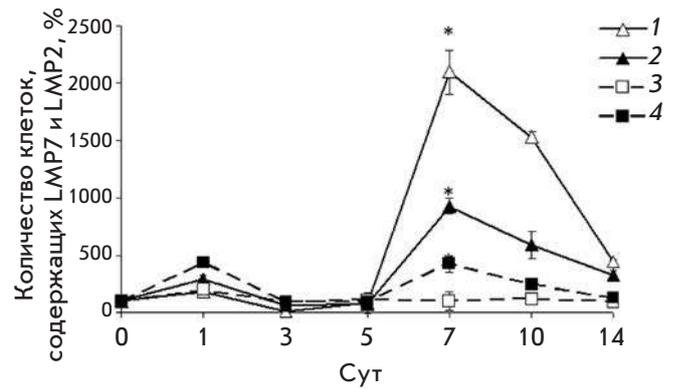


Рис. 3. Изменение количества мононуклеарных клеток, содержащих субъединицу LMP2 (закрашенные символы) и субъединицу LMP7 протеасом (открытые символы), через разные промежутки времени после начала индукции ДСТ в печени у животных групп 3 (кривые 1 и 2) и 4 (кривые 3 и 4). По оси абсцисс – сутки после начала индукции ДСТ. За 100% принимали количество клеток, содержащих субъединицы LMP2 и LMP7, в образцах группы 1. Данные статистически значимо отличаются от базального уровня (группа 1),  $p < 0.05$ ,  $n = 5$  (\*)

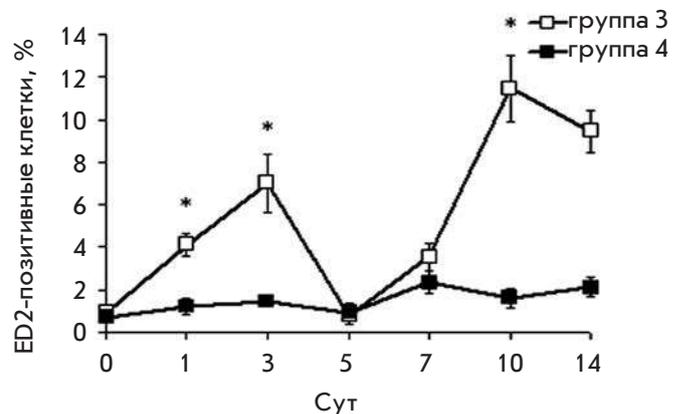
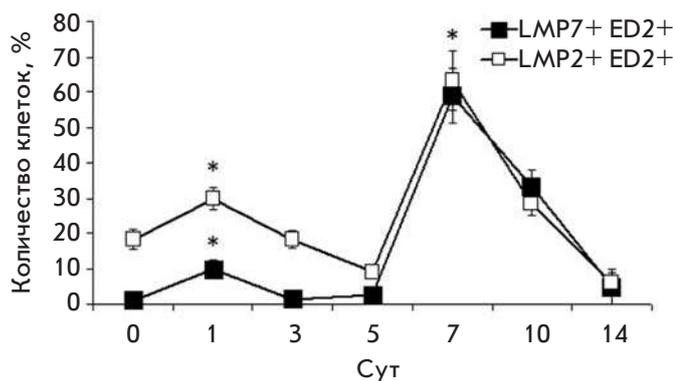


Рис. 4. Цитофлуориметрический анализ клеток, экспрессирующих маркер макрофагов ED, у животных групп 3 и 4 через разные промежутки времени после введения донорских спленоцитов. По оси абсцисс – сутки после начала индукции ДСТ. За 100% принимали количество клеток в образцах группы 1. Данные статистически значимо отличаются от базального уровня (группа 1),  $p < 0.05$ ,  $n = 5$  (\*)

активный процесс, затрагивающий несколько субпопуляций АПК печени и вовлекающий перестройки внутриклеточного протеасомного пула в механизмы процессинга и презентации антигенов. При этом на ранних стадиях развития ДСТ наблюдаются две «волны»: первая (1–3 сут) связана с притоком донорских клеток иммунной системы в печень, вторая



**Рис. 5.** Цитофлуориметрический анализ экспрессии субъединиц LMP7 и LMP2 в ED2-позитивных клетках печени животных группы 3 после начала индукции ДСТ. По оси абсцисс – сутки после начала индукции ДСТ; за 100% принимали общее количество ED2-позитивных клеток. Данные значимо отличаются от базального уровня (группа 1),  $p < 0.05$ ,  $n=5$  (\*)

(7–10 сут) – с активацией ответа в печени реципиента, в котором задействованы и клетки Купфера.

Изменяется ли профиль экспрессии индуцибельных субъединиц LMP2 и LMP7 в клетках Купфера после интрапортального введения аллоантигена?

Для ответа на этот вопрос были изучены изменения, происходящие в протеасомном пуле ED2-позитивных клеток в печени животных с индукцией ДСТ (группа 3) в разные сроки после введения донорских спленоцитов (рис. 5). Во-первых, выявлены два пика повышения количества субъединиц LMP2 и LMP7 – на 1-е и 7-е сут. Во-вторых, обнаружено, что соотношение экспрессии субъединиц LMP2 и LMP7 в ED2-позитивных клетках меняется в зависимости от времени после индукции ДСТ. В первые 5 сут количество LMP2 возрастает более заметно, чем LMP7, на 7-е сут – уровень обеих иммунных субъединиц одинаково высок.

Во временных изменениях количества ED2-позитивных клеток и иммунопротеасом можно выделить две фазы. В первой фазе количество LMP2 и LMP7 увеличивается на 1-е сут так же, как и в общем пуле мононуклеарных клеток, а количество ED2-позитивных клеток возрастает на 3-и сут (рис. 3–5). Во второй фазе все происходит в той же последовательности: на 7-е сут приходится пик экспрессии иммунных субъединиц протеасом в ED2-позитивных клетках так же, как и в общем пуле мононуклеарных клеток, после этого на 10-е сут увеличивается количество ED2-позитивных клеток.

По-видимому, существуют различия в механизмах увеличения экспрессии иммунных субъединиц протеасом в общем пуле мононуклеарных клеток

в первой и второй фазах. Первый пик экспрессии субъединиц LMP2 и LMP7 отражает, в основном, приток спленоцитов донора, обогащенных иммунопротеасомами. В то же время второй пик в большей или меньшей мере может быть связан с синтезом *de novo* субъединиц LMP2 и LMP7 в мононуклеарных клетках печени реципиента, в том числе в клетках Купфера. Этот синтез индуцируется в первой фазе в результате встречи спленоцитов с АПК печени. Как известно, LSEC способны к кросс-презентации чужеродного антигена непосредственно CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитам [38], причем для этого требуется незначительное количество стимулирующего биоматериала (< 1 нМ). Этот процесс осуществляется в течение нескольких часов [39] и сопровождается высвобождением цитокинов [40, 41], которые являются сигналом для повышения уровня индуцибельных субъединиц LMP7 и LMP2 [21, 42]. В пользу предположения о синтезе *de novo* иммунных субъединиц протеасом во второй фазе свидетельствует и тот факт, что их экспрессия под действием цитокинов достигает максимума только через 5–7 дней [43, 44]. Первый пик повышения уровня иммунных субъединиц в клетках Купфера может отражать начальный этап их синтеза *de novo*.

Соотношение иммунных субъединиц протеасом влияет на активацию макрофагов и поляризацию их в ED1- или ED2-фенотип [45]. Следовательно, изменение уровня субъединиц LMP2 и LMP7 в субпопуляции клеток может быть связано с активацией макрофагов типа 2. Это, в свою очередь, объясняет преобладание в печени процессов, препятствующих развитию отторжения, так как ED2-макрофаги относятся к противовоспалительному функциональному фенотипу, для которого характерна секреция цитокинов IL-10, IL-4, TGF- $\beta$  [46].

Установленная нами динамика экспрессии иммунопротеасом мононуклеаров печени отражает изменения в реактивности их субпопуляций в ответ на введение чужеродных антигенов. Ранее были получены данные о появлении максимумов активированных клеток в печени после введения пептидного антигена или адоптивного переноса лимфоцитов. Например, после адоптивного переноса CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов в печени реципиента наблюдали пролиферацию донорских клеток на 2.5 и 6-е сут [47]. Обнаружено также 8-кратное увеличение субпопуляции CD8<sup>+</sup> Т-лимфоцитов на 2-е сут после их интрапортального введения и постепенное уменьшение к 4 сут [48]. Стимуляция антигенным пептидом SEFLLEKRI приводила к 100-кратному приросту количества мононуклеарных клеток в печени, начиная с 2 сут, тогда как к 6 сут реакция угасала [49]. Интересно, что пик пролиферации лимфоцитов на-

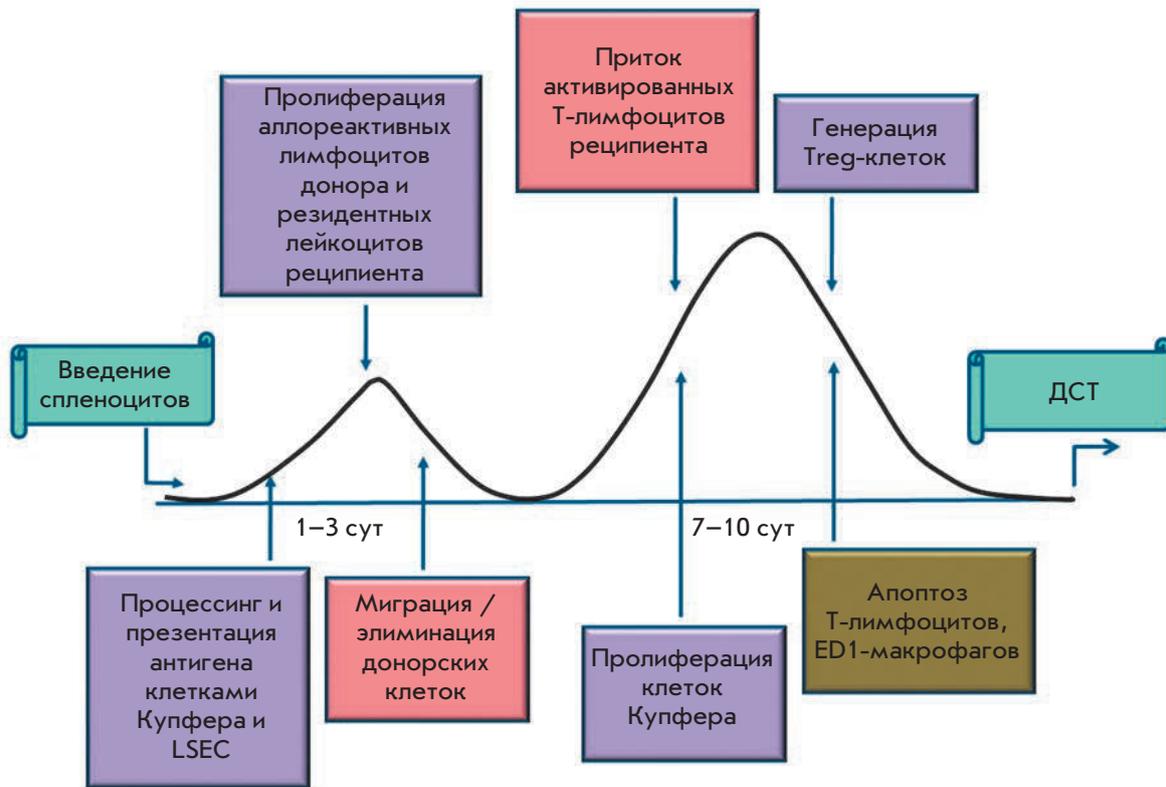


Рис. 6. Схема индукции и развития ДСТ

блюдался на 4-е сут, а динамика остальных субпопуляций носила двухфазный характер с максимумами на 1-е и 4-е сут.

Таким образом, двухфазный характер реактивности иммунитета печени в ответ на интрапортальное введение донорского антигена имеет под собой строгую иммунологическую основу (рис. 6). В первой фазе LSEC и клетки Купфера встречаются с донорскими клетками, которые, благодаря специфической способности печени к удерживанию активированных CD8+ Т-лимфоцитов [48], пребывают там достаточное время, необходимое для презентации антигена. После процессинга и презентации антигена, в которых участвуют иммунопротеасомы, запускается пролиферация донорских лейкоцитов и резидентных иммунокомпетентных клеток печени. Презентация антигена и активация лимфоцитов сопровождается выбросом цитокинов, которые играют ведущую роль в привлечении макрофагов и лимфоцитов реципиента в печень [50, 51]. Вследствие этого при индукции ДСТ появляется второй пик в динамике пула иммунопротеасом печени.

Взаимодействие активированных CD8+ Т-лимфоцитов с клетками Купфера приводит к их апоптозу за счет отсутствия адекватной провоспалительной

стимуляции [48]. Кроме прямого взаимодействия, клетки Купфера вырабатывают ряд проапоптотических веществ, таких, как TNF- $\alpha$ , CD95-лиганд, галектин-1, индоламин-диоксигеназа [52, 53]. В результате сокращения количества лимфоцитов в конце первой фазы индукции ДСТ уменьшается пул иммунопротеасом в печени. Дополнительное уменьшение количества иммунопротеасом в этот период может происходить за счет миграции донорских клеток в кровотоки реципиента.

Способность иммунокомпетентных субпопуляций клеток печени к первичной презентации антигена [51], в результате которой аллореактивные CD8+ Т-лимфоциты элиминируются посредством апоптоза, не получив положенную костимуляцию [48], дает возможность избежать развития иммунного ответа в первые сутки (1-3) после введения донорских клеток.

Вторая фаза связана с клональной экспансией и притоком в печень активированных Т-лимфоцитов и макрофагов реципиента. Фенотипический профиль клеток, заполняющих иммунологическую нишу печени в этой фазе, вероятно, определяет развитие либо толерантности, либо отторжения. Активация защитных механизмов иммунитета пе-

чени, направленных на устранение/уменьшение воспаления, может сместить баланс в сторону толерантности. Эти механизмы включают апоптоз активированных Т-лимфоцитов реципиента [31], ED1-поляризованных макрофагов и активированных Т-клеток в присутствии макрофагов ED2-фенотипа в печени [54, 55] и экспансию Treg-клеток [56] в ответ на презентацию антигена в печени.

Репертуар иммунных субъединиц влияет на иерархию презентируемых антигенных эпитопов АПК. Описаны, по крайней мере, четыре формы иммунных протеасом. Одна форма содержит все три протеолитические иммунные субъединицы – LMP7, LMP2 и LMP10. Две формы содержат по две иммунные субъединицы и одну протеолитическую конститутивную субъединицу:  $\beta 5$ -LMP2-LMP10 и LMP7-LMP2- $\beta 2$ . Одна форма содержит иммунную субъединицу LMP7 и две конститутивные субъединицы  $\beta 1$  и  $\beta 2$  [57–60]. В зависимости от сочетания протеолитически активных субъединиц меняются конформация субстратсвязывающих карманов [61], предпочтительные сайты гидролиза белков и, следовательно, набор продуцируемых антигенных эпитопов. Поэтому изменение баланса иммунных субъединиц в резидентных и транзиторных субпопуляциях клеток иммунной системы играет важную роль в том, каким образом будет представлен чужеродный антиген, вызовет он отторжение или будет «принят за своего».

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе впервые изучены изменения, происходящие в пуле иммунопротеасом мононуклеарных клеток печени при индукции аллоспецифической портальной толерантности. На основании полученных данных можно заключить, что индукция ДСТ – это активный процесс, имеющий две фазы, в ходе которых изменяется соотношение иммунных субъединиц LMP2 и LMP7 протеасом и количество АПК печени, в том числе клеток Купфера. Очевидно, баланс этих показателей важен для развития толерантности к трансплантируемым тканям. Третьи сутки после начала индукции ДСТ являются ключевой точкой, в которой образуется своеобразное «окно возможностей» для последующего заполнения пустующей ниши клетками разных субпопуляций, и в зависимости от этого развития толерантности либо отторжения. Полученные результаты ставят новые задачи поиска способов воздействия на клеточный состав печени и экспрессию иммунных протеасом на 3-и сут после начала индукции ДСТ для блокирования развития отторжения. ●

*Работа частично выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований, грант для молодых ученых 16-34-60083-мол\_а\_дк.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Calne R.Y., Sells R.A., Pena J.R., Davis D. R., Millard P.R., Herbertson B.M., Binns R.M., Davies D.A. // Nature. 1969. V. 2. № 223 (5205). P. 472–476.
- Qian S., Demetris A., Murase N., Rao A.S., Fung J.J., Starzi T.E. // Hepatology. 1994. V. 19. P. 916–924.
- Zimmermann F.A., Davies H.S., Knoll P.P. // Transplantation. 1984. V. 37. P. 406–410.
- Kamada N., Wight D.G.D. // Transplantation. 1984. V. 38. № 3. P. 217–221.
- Cunningham E.C., Sharland A.F., Bishop G.A. // Clin. Dev. Immunol. 2013. 2013:419692. Epub 2013 Nov 6.
- Topilsky Y., Raichlin E., Hasin T., Boilson B.A., Schriger J.A., Pereira N.L., Edwards B.C., Schriger J.A., Pereira N.L., Edwards B.S., Topilsky Y., Raichlin E., Hasin T. // Transplantation. 2013. V. 95. P. 859–865.
- Sun J., McCaughan G.W., Gallagher N.D., Scheil A.G., Bishop G.A. // Transplantation. 1995. V. 60. P. 233–236.
- Shimizu Y., Goto S., Lord R., Vari F., Edwards-Smith C., Chiba S., Schlect D., Buckley M., Kusano M., Kamada N. // Transpl. Int. 1996. V. 9. P. 593–595.
- Ko S., Deiwick A., Jager M.D., Dinkel A., Rohde F., Fisher R.T., Tsui T.Y., Rittmann K.L., Wonigeit K., Schlitt H.J. // Nat. Med. 1999. V. 5. P. 1292–1297.
- Kenick S., Lowry R.P., Forbes R.D.S., Lisbona R. // Transplant. Proc. 1987. V. 19. P. 478–479.
- Oko A., Idasiak-Piechocka I., Pawlaczek K., Wruk M., Pawlaczek E., Czekański S. // Ann. Transplant. 2002. V. 7. № 2. P. 51–53.
- Sheng Sun D., Iwagaki H., Ozaki M., Ogino T., Kusaka S., Fujimoto Y., Murata H., Sadamori H., Matsukawa H., Tanaka N., Yagi T. // Transpl. Immunol. 2005. V. 14. № 1. P. 17–20.
- Diaz-Peromingo J.A., Gonzalez-Quintela A. // Eur. Surg. Res. 2005. V. 37. P. 45–49.
- Ikebukuro K., Adachi Y., Yamada Y., Fujimoto S., Seino Y., Oyaizu H., Hioki K., Ikehara S. // Transplantation. 2002. V. 73. P. 512–518.
- Chalermkulrat W., McKinnon K.P., Brickey J. W., Neuringer I.P., Park R.C., Sterka D.C., Long B.R., McNeillie P., Noelle R.J., Ting J.P., Aris R.M. // Thorax. 2006. V. 61. № 1. P. 61–67.
- Nakagawa K., Matsuno T., Iwagaki H., Morimoto Y., Fujiwara T., Sadamori H., Inagaki M., Urushihara N., Yagi T., Tanaka N. // J. Int. Med. Res. 2001. V. 29. P. 119–130.
- Watanabe T., Kudo M., Chiba T., Wakatsuki Y. // Hepatol. Res. 2008. V. 38. P. 441–449.
- Gaczynska M., Rock K.L., Goldberg A.L. // Enzyme Protein. 1993. V. 47. № 4–6. P. 354–369.
- Cong Y., Konrad A., Iqbal N., Hatton R.D., Weaver C.T., Elson C.O. // J. Immunol. 2005. V. 174. № 5. P. 2787–2795.
- Trombetta E.S., Mellman I. // Annu. Rev. Immunol. 2005. V. 23. P. 975–1028.
- Basler M., Kirk C.J., Groettrup M. // Curr. Opin. Immunol. 2013. V. 25. № 1. P. 74–80.
- Карпова Я.Д., Божок Г.А., Люпина Ю.В., Легач Е.И., Астахова Т.М., Степанова А.А., Бондаренко Т.П., Шарова Н.П. // Изв. АН. Сер. биол. 2012. № 3. С. 296–302.

23. Степанова А.А., Карпова Я.Д., Божок Г.А., Устиченко В.Д., Люпина Ю.В., Легач Е.И., Вагида М.С., Казанский Д.Б., Бондаренко Т.П., Шарова Н.П. // *Биоорганическая химия*. 2014. Т. 40. № 1. С. 42–54.
24. Yunusov M.Y., Kuhr C.S., Georges G.E., Hogan W.J., Taranova A.G., Lesnikova M., Kim Y.S., Nash R.A. // *Transplantation*. 2006. V. 82. № 5. P. 629–637.
25. Божок Г.А. // *Проблемы эндокринной патологии*. 2011. № 1. С. 60–66.
26. Marti H.P., Henschkowski J., Laux G., Vogt D., Seiler C., Opelz G., Frey F.J. // *Transpl. Int.* 2006. V. 19. P. 19–26.
27. Mackie F. // *Nephrology (Carlton)*. 2010. Suppl 1. S101–S105.
28. Лимфоциты. Методы Пер. с англ. / Под ред. Дж. Клауса. М.: Мир, 1990. 395 с.
29. Ahmad N., Gardner C.R., Yurkow E.I., Laskin D.L. // *Hepatology*. 1999. V. 29. № 3. P. 728–736.
30. Crispe I. N., Giannandrea M., Klein I., John B., Sampson B., Wuensch S. // *Immunol. Reviews*. 2006. V. 213. P. 101–118.
31. Bishop G.A., Wang C., Sharland A.F., McCaughan G. // *Immunol. Cell Biol.* 2002. V. 80. № 1. P. 93–100.
32. Fast L.D. // *J. Immunol.* 1996. V. 157. № 11. P. 4805–4810.
33. Stevanović S. // *Transpl. Immunol.* 2002. V. 10. № 2–3. P. 133–136.
34. Jin Y., Fuller L., Ciancio G., Burke G.W. 3<sup>rd</sup>, Tzakis A.G., Ricordi C., Miller J., Esquenazal V. // *Hum. Immunol.* 2004. V. 65. № 2. P. 93–103.
35. Polfliet M.M., Fabriek B.O., Daniëls W.P., Dijkstra C.D., van den Berg T.K. // *Immunobiology*. 2006. V. 211. № 6–8. P. 419–425.
36. Milner J.D., Orekov T., Ward J.M., Torres-Velez F., Junttila I., Sun G., Buller M., Morris S.C., Finkelmann F.D., Paul W.E., et al. // *Blood*. 2010. V. 116. № 14. P. 2476–2483.
37. Jenkins S.J., Ruckerl D., Cook P.C., Jones L.H., Finkelman F.D., van Rooijen N., MacDonald A.S., Allen J.E. // *Science*. 2011. V. 332. № 6035. P. 1284–1288.
38. Knolle P.A., Limmer A // *Swiss Med. Wkly*. 2003. V. 133. № 37–38. P. 501–506.
39. Limmer A., Ohl J., Wingender G., Berg M., Jungerkes F., Schumak B., Djandji D., Scholz K., Klevenz A., Hegenbarth S., et al. // *Eur. J. Immunol.* 2005. V. 35. № 10. P. 2970–2981.
40. Limmer A., Ohl J., Kurts C., Ljunggren H.G., Reiss Y., Groettrup M., Momburg F., Arnold B., Knolle P.A. // *Nat. Med.* 2000. V. 6. № 12. P. 1348–1354.
41. Schurich A., Berg M., Stabenow D., Bottcher J., Kern M., Schild H.J., Kurts C., Schuette V., Burgdorf S., Diehl L., Limmer A., Knolle P.A. // *J. Immunol.* 2010. V. 184. № 8. P. 4107–4114.
42. Niewerth D., Kaspers G.J., Assaraf Y.G., van Meerloo J., Kirk C.J., Anderl J., Blank J.L., van de Ven P.M., Zweegman S., Jansen G., et al. // *J. Hematol. Oncol.* 2014. 7:7. doi: 10.1186/1756-8722-7-7.
43. Khan S., van den Broek M., Schwarz K., de Giuli R., Diener P.A., Groettrup M. // *J. Immunol.* 2001. V. 167. P. 6859–6868.
44. Heink S., Ludwig D., Kloetzel P.M., Kruger E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. P. 9241–9246.
45. Chen S., Kammerl I.E., Vosyka O., Baumann T., Yu Y., Wu Y., Irmeler M., Overkleeft H.S., Beckers J., Eickelberg O., Meiners S., Stoeger T. // *Cell Death Differ.* 2016. Mar 18. doi: 10.1038/cdd.2016.3. [Epub ahead of print]
46. Tcke F., Zimmermann H.W. // *J. Hepatol.* 2014. V. 60. № 5. P. 1090–1096.
47. Bowen D.G., Zen M., Holz L., Davis T., McCaughan G.W., Bertolino P. // *J. Clin. Invest.* 2004. V. 114. № 5. P. 701–712.
48. Kuniyasu Y., Marfani S.M., Inayat I.B., Sheikh S.Z., Mehal W.Z. // *Hepatology*. 2004. V. 39. № 4. P. 1017–1027.
49. Huang L., Soldevila G., Leeker M., Flavell R., Crispe I.N. // *Immunity*. 1994. V. 1. № 9. P. 741–749.
50. Lalor P.F., Shields P., Grant A., Adams D.H. // *Immunol. Cell Biol.* 2002. V. 80. № 1. P. 52–64.
51. Robinson M.W., Harmon C., O’Farrelly C. // *Cell Mol. Immunol.* 2016. V. 13. № 3. P. 267–276.
52. Perillo N.L., Pace K.E., Seilhamer J.J., Baum L.G. // *Nature*. 1995. V. 14. № 378 (6558). P. 736–739.
53. Müschen M., Warskulat U., Peters-Regehr T., Bode J.G., Kubitz R., Häussinger D. // *Gastroenterology*. 1999. V. 116. № 3. P. 666–677.
54. You Q., Cheng L., Kedl R.M., Ju C. // *Hepatology*. 2008. V. 48. № 3. P. 978–990.
55. Wan J., Benkdane M., Teixeira-Clerc F., Bonnafous S., Louvet A., Lafdil F., Pecker F., Tran A., Gual P., Mallat A., et al. // *Hepatology*. 2014. V. 59. № 1. P. 130–142.
56. Dangi A., Sumpster T.L., Kimura S., Stolz D.B., Murase N., Raimondi G., Vodovotz Y., Huang C., Thomson A.W., Gandhi C.R. // *J. Immunol.* 2012. V. 188. № 8. P. 3667–3677.
57. Groettrup M., Standera S., Stohwasser R., Kloetzel P.-M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 8970–8975.
58. Griffin T.A., Nandi D., Cruz M., Fehling H.J., van Kaer L., Monaco J.J., Colbert A. // *J. Exp. Med.* 1998. V. 187. P. 97–104.
59. Guillaume B., Chapiro J., Stroobant V., Colau D., van Holle B., Parvizi G., Bousquet-Dubouch M.P., Théate I., Parmentier N., van den Eynde B.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 43. P. 18599–18604.
60. Dahlmann B. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2016. V. 591. P. 132–140.
61. Unno M., Mizushima T., Morimoto Yu., Tomisugi Y., Tanaka K., Yasuoka N., Tsukihara T. // *Structure*. 2002. V. 10. P. 609–618.

УДК 612.398:611.018.82

# Пространственная организация внутриядерных структур дофаминергических нейронов мозга человека

Д. Э. Коржевский, В. В. Гусельникова\*, О. В. Кирик, Е. Г. Сухорукова, И. П. Григорьев  
Институт экспериментальной медицины, 197376, Санкт-Петербург, ул. Академика  
Павлова, 12

\*E-mail: guselnicova.valeriia@yandex.ru

Поступила в редакцию 15.09.2016

Принята к печати 24.08.2017

**РЕФЕРАТ** Изучена внутриядерная локализация белков нуклеофосмина (B23) и убиквитина в дофаминергических нейронах черной субстанции мозга человека ( $n = 6$ , возраст 25–87 лет) с помощью иммуногистохимических методов и конфокальной лазерной микроскопии. Установлено, что внутриядерные убиквитин-иммунопозитивные тельца, соответствующие по морфологическим признакам тельцам Маринеско, присутствуют в дофаминергических (тирозингидроксилаза-иммунопозитивных) нейронах черного вещества, но не выявлены в недофаминергических нейронах. Количество телец варьировало от 0 до 6 в одном клеточном ядре. Нуклеофосмин (B23) выявлялся в ядрышке нейронов, причем размеры ядрышка были постоянными для нигральных нейронов мозга отдельного индивида. Все наблюдаемые нейроны имели только по одному крупному ядрышку с интенсивной иммунореактивностью на нуклеофосмин и слабоокрашенной областью (до 1–2 мкм в диаметре), которая, по-видимому, представляет собой гигантский фибриллярный центр. На периферии его часто присутствует интенсивно окрашенная нуклеофосминсодержащая гранула. Использование двойной метки показало, что нуклеофосмин-иммунореактивное ядрышко и убиквитин-иммунореактивные тельца Маринеско могут располагаться как рядом, так и на удалении друг от друга. Трехмерная реконструкция свидетельствует, что округлые тельца Маринеско полиморфны и нередко имеют сложную форму с уплощениями и вогнутостью, что может быть связано с контактом не только с ядрышком, но и, предположительно, с другими внутриядерными структурами, не содержащими убиквитин или нуклеофосмин. Вблизи телец Маринеско часто расположены убиквитин-иммунореактивные структуры сравнительно небольшого размера (до 1 мкм в длину) и разнообразной формы, подобные кластосомам [Lafarga et al., 2002]. Ни в одном случае убиквитин не был обнаружен в ядрышках дофаминергических нейронов, а нуклеофосмин/B23 – в типичных тельцах Маринеско. Полученная информация может способствовать раскрытию молекулярных механизмов избирательной чувствительности дофаминергических нейронов черной субстанции к повреждающим факторам.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** головной мозг, дофаминергические нейроны, нуклеофосмин, тельца Маринеско, убиквитин, человек, черная субстанция, ядрышко.

## ВВЕДЕНИЕ

Для ядра эукариотической клетки характерна сложная внутренняя структурно-функциональная компартментализация, которая позволяет повысить эффективность внутриклеточных процессов за счет концентрирования специализированных факторов в определенных участках ядерного пространства. Среди важнейших ядерных компартментов принято выделять ядрышки, ядерные спеклы, тельца Кахаля, РМЛ-тельца и др. [1]. При этом одни внутри-

ядерные структуры (например, ядрышки) присутствуют в большинстве клеток эукариот, в то время как другие характерны для конкретного типа клеток. Примером таких специфических внутриядерных структур могут служить тельца Маринеско, которые в норме выявляются исключительно в нейронах черного вещества (*substantia nigra*) и голубого пятна (*locus coeruleus*) мозга человека и приматов [2, 3]. Важно отметить, что, хотя по отдельности

и ядрышки, и тельца Маринеско являются сравнительно хорошо охарактеризованными структурами, детального изучения их формы и пространственного взаиморасположения в ядрах нервных клеток проведено не было. Решить подобную задачу позволяет метод конфокальной микроскопии, предполагающий использование первичных антител к известным маркерным белкам различных внутриядерных структур. Для ядрышка таким маркером является нуклеофосмин (nucleophosmin, NPM, B23) – полифункциональный белок, участвующий в биогенезе рибосом, дубликации centrosom, регуляции пролиферации и апоптоза [4–6]. Интересно, что B23 экспрессируется на высоком уровне не только в активно пролиферирующих клетках, но также в постмитотических нейронах, однако данные о его роли в этих нейронах практически отсутствуют [6]. Предполагают, что в ядрышке нервных клеток B23 действует как датчик клеточного стресса, инициируя механизмы, способствующие поддержанию жизнеспособности нейронов (например, стабилизируя транскрипционный фактор p53) [7]. Кроме того, нормальный уровень B23 в нейронах является, возможно, условием поддержания блокады клеточного цикла, в то время как чрезмерная экспрессия данного белка может побудить клетку к возврату в клеточный цикл и инициировать гибель нейронов, что наблюдается в ходе развития нейродегенеративных заболеваний, таких, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, боковой амиотрофический склероз [8–10]. В связи с этим особенно существенным представляется иммуноцитохимическое исследование распределения белка B23 в дофаминергических нейронах черного вещества головного мозга человека, так как массовая гибель дофаминергических нейронов является характерным признаком болезни Паркинсона и обязательным показателем адекватности экспериментальных моделей этого заболевания [11, 12].

Отличие от B23, особенности распределения которого в дофаминергических нейронах не изучены, убиквитин как компонент протеасомной системы деградации поврежденных белков неоднократно изучали при анализе функционального состояния нейронов черного вещества в норме и при патологии [13, 14]. В настоящее время убиквитин считается специфическим маркером телец Маринеско, функциональное значение которых все еще остается непонятным [3]. При изучении внутриядерных убиквитин-иммунопозитивных телец нейронов *substantia nigra* головного мозга человека с использованием методов световой микроскопии и иммуноцитохимии было показано, что в черном веществе до 20% нейронов могут содержать убиквитин-иммунореактивные тельца, морфологическая характеристика которых соответ-

ствует тельцам Маринеско [15]. Следует отметить, что в рамках того же исследования в ядрах нейронов черного вещества обнаружены структуры, которые по ряду признаков не могли быть отнесены к тельцам Маринеско, однако содержали убиквитин в детектируемом количестве [15]. В последние годы появились данные о том, что убиквитин (вместе с убиквитин-подобными белками) играет важную роль не только в процессах внутриклеточной деградации белков, но и в биогенезе рибосом [16]. Это предполагает присутствие данного белка в составе ядрышек, однако результаты иммуноцитохимических исследований, которые подтверждали бы данное предположение, отсутствуют.

Таким образом, изучение формы и пространственного расположения B23- и убиквитин-иммунопозитивных структур в дофаминергических нейронах головного мозга человека является актуальной задачей современной нейробиологии и представляет интерес для фундаментальной неврологии. Поэтому поиск подходов к решению именно этих вопросов и составил цель нашей работы.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы фрагменты среднего мозга человека ( $n = 6$ , мужчин и женщин в возрасте от 25 до 87 лет, причина смерти которых не была связана с заболеваниями и повреждениями головного мозга). Материал получен из архива отдела общей и частной морфологии Института экспериментальной медицины. Программа исследований имеет положительное заключение Локального этического комитета ФГБНУ «ИЭМ».

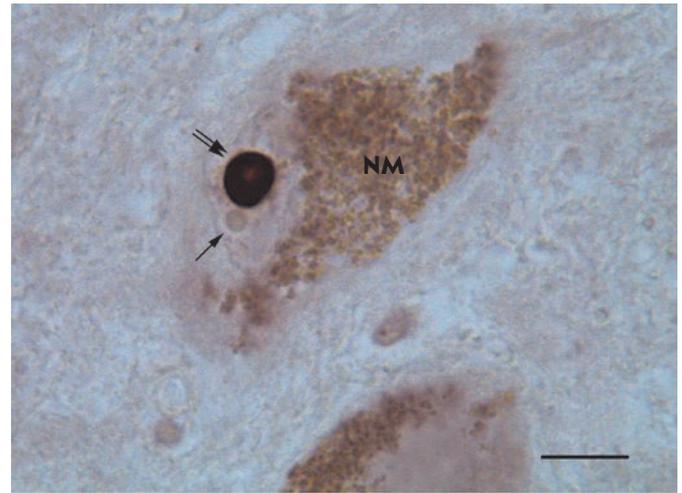
Материал был фиксирован в цинк-этанол-формальдегиде [17] и залит в парафин. Из парафиновых блоков готовили срезы толщиной 5, 7 и 10 мкм, которые наклеивали на предметные стекла с адгезивным покрытием (Histobond, Polysine, SuperFrost Gold, Германия). Часть препаратов окрашивали классическим нейростологическим методом – толудиновым синим по Нисслю. Перед постановкой иммуноцитохимических реакций верифицировали пригодность материала для исследования (исключали нейродегенеративный процесс и посмертный аутолиз). Для улучшения иммунореактивности выявляемых антигенов проводили их тепловое демаскирование в модифицированном цитратном буфере pH 6.1 (S1700, Dako, Дания). Контрольные иммуногистохимические реакции проводили с учетом рекомендаций производителей реагентов.

При постановке иммуногистохимических реакций для микроскопии в проходящем свете использовали следующие первичные антитела: поликлональные кроличьи антитела к убиквитину (Dako) в разведе-

дени 1 : 400; моноклональные мышинные антитела к белку B23 (нуклеофосмину) клон FC82291 (Sigma-Aldrich, США) в разведении 1 : 200 и мышинные моноклональные антитела к тирозингидроксилазе (клон 1B5) в разведении 1 : 50 (Leica-Novocastra, Великобритания). Для выявления связанных с изучаемыми маркерами кроличьих и мышинных первичных антител использовали реагент MACH2-Universal HRP-Polymer (Biocare Medical, США). Пероксидазную метку выявляли с использованием диаминобензидинового хромогена (DAB+; Dako). После постановки иммуноцитохимических реакций часть срезов подкрашивали 0.5% водным раствором крезилового фиолетового (Dr. Grubler, Германия) и 0.1% водным раствором астрового синего (Merck, Германия).

При постановке отдельных и комбинированных иммуногистохимических реакций для конфокальной лазерной микроскопии использовали те же самые первичные антитела, что и для иммунопероксидазной реакции. В двойной реакции использовали две комбинации антител – к тирозингидроксилазе/убиквитину и B23/убиквитину. После теплового демаскирования антигенов проводили инкубацию с первичными антителами в течение 65 ч при 27°C. В качестве вторичных антител для выявления первичных мышинных антител использовали моновалентный Fab-фрагмент иммуноглобулина ослы, меченный биотином (Jackson ImmunoResearch, США). После обработки вторичными антителами препараты инкубировали в растворе стрептавидина, конъюгированного с флуорохромом Cy2 (Jackson ImmunoResearch). Для выявления первичных кроличьих антител использовали антитела свиньи против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с тетраметилродаминизотиоцианатом (TRITC), произведенные Dako. Часть препаратов после постановки одиночной реакции на белок B23 подкрашивали ядерным красителем 7-AAD (Invitrogen, США). Конфокальную микроскопию проводили с использованием микроскопа LSM 710 (Carl Zeiss, Германия).

После проведения иммуноцитохимической реакции на белок B23 определяли размер ядрышек нейронов черного вещества. Диаметр ядрышка измеряли с использованием средств компьютерной программы LAS EZ (Leica, Германия). Анализировали ядрышки только тех нейронов, в цитоплазме которых четко просматривались гранулы нейромеланина. Измерения были выполнены независимо двумя исследователями (О.В. Кирик и В.В. Гусельниковой) на двух разных микроскопах Leica DM750 (Leica), укомплектованных камерами ICC50 и ICC50HD (Leica), после проведения дополнительной калибровки системы с помощью объект-микрометра.



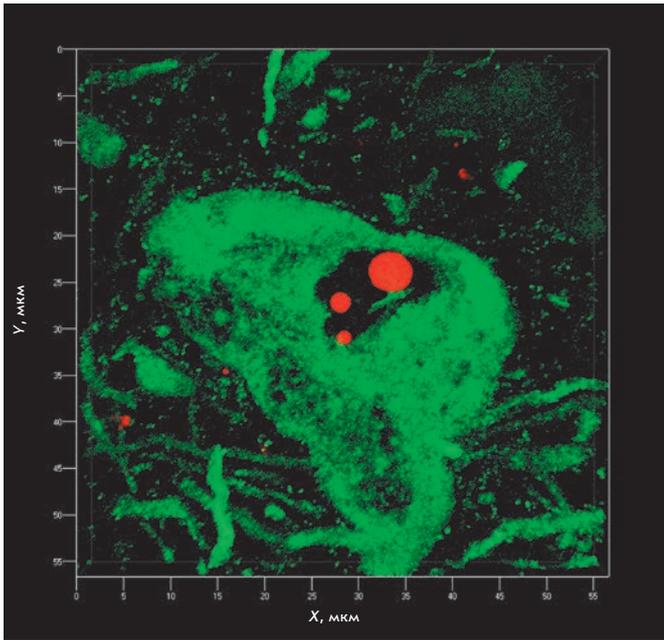
**Рис. 1.** Дофаминергический нейрон черного вещества головного мозга человека с B23-иммунопозитивным ядрышком. NM – гранулы нейромеланина в цитоплазме нейрона; одиночная стрелка указывает на неокрашенное тельце Маринеско, двойная – на иммунопозитивное ядрышко. Иммуноцитохимическая реакция на белок B23 без подкраски. Объектив Plan 100 × /1.25 (масляная иммерсия). Окуляр HC Plan 10 × /18. Масштабный отрезок равен 10 мкм

Количественные данные обрабатывали в программе Excel (Microsoft, США) и представляли в виде среднего значения ( $\bar{X}$ ) и стандартного отклонения ( $\sigma$ ). Для оценки однородности совокупности рассчитывали коэффициент вариации ( $V$ ).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Во всех случаях в препаратах были обнаружены ядрышки нейронов (как при окраске толуидиновым синим по Нисслю, так и при реакции на белок B23) и убиквитин-иммунопозитивные тельца (рис. 1). Двойная иммунофлуоресцентная реакция на тирозингидроксилазу и убиквитин (рис. 2) показала, что внутриядерные убиквитин-иммунопозитивные тельца действительно присутствуют в дофаминергических нейронах черного вещества и отсутствуют в нейронах, не проявляющих реакцию на маркерный фермент синтеза катехоламинов – тирозингидроксилазу.

Наблюдение ядрышек с использованием реакции на нуклеофосмин (B23) позволило выявить неоднородность их структуры при постоянстве ровных контуров и округлой формы. Установлено, что для нейронов черного вещества не характерно присутствие добавочных ядрышек. Все наблюдаемые нейроны содержали только по одному крупному ядрышку, ярко окрашенному при реакции на нуклеофосмин,



**Рис. 2.** Убиквитин-иммунопозитивные структуры в черном веществе головного мозга человека. Иммунопозитивную реакцию на убиквитин (красный цвет) дают три округлых тельца Маринеско в ядре нейрона и гранулы в нейропиле черного вещества. Двойная иммуноцитохимическая реакция на тирозингидроксилазу, визуализация с помощью флуорохрома Cy2 (зеленый цвет) и убиквитин; визуализация с помощью флуорохрома TRITC (красный цвет). Конфокальная лазерная микроскопия. Трехмерная реконструкция в режиме Shadow осуществлена в программном модуле ZEN 2011 (Carl Zeiss). Величина Z-серии – 5.6 мкм, количество оптических срезов – 29. Объектив 100 × /1.40 (масляная иммерсия)

в котором нередко просматривалась слабоокрашенная область. Подобную структуру, нередко выявляемую в ядрышках крупных нейронов, ранее называли ядрышковой вакуолью [18]. Позже было установлено, что она представляет собой гигантский фибриллярный центр (GFC), содержащий преимущественно фактор UBF [19]. Интересно, что ядрышки нейронов разных лиц из изученной выборки характеризовались определенной индивидуальностью в размерах и достаточно низкой вариабельностью размеров (таблица).

Изучение ядрышка с использованием конфокальной микроскопии подтвердило точность измерений, проведенных на иммунопероксидазных препаратах. При этом была исключена возможность ложного увеличения размеров изучаемой структуры за счет диффузии хромогена. Установлено, что ги-

гантский фибриллярный центр, который обычно располагается на периферии ядрышка, достигает 1–2 мкм в диаметре. Зона GFC характеризуется слабой флуоресценцией при реакции на белок B23, что свидетельствует о пониженной концентрации (но не об отсутствии) данного белка в этом ядрышковом компартменте. В периферической части GFC нередко обнаруживается ярко флуоресцирующая гранула, концентрирующая белок B23 (рис. 3).

Случай	Среднее значение диаметра (X), мкм	Стандартное отклонение, $\sigma$	Коэффициент вариации (V), %
Мужчина 25 лет	5.1	0.6	11.3
Мужчина 51 год	4.2	0.4	8.6
Мужчина 61 год	5.9	0.5	8.9
Женщина 62 года	6.1	0.3	4.9
Женщина 78 лет	5.6	0.3	5.6
Мужчина 87 лет	5.6	0.4	6.8

Проведение двойной реакции на белок B23 и убиквитин позволило четко визуализировать ядрышко и тельца Маринеско. Высокая интенсивность флуоресценции при выявлении обоих маркеров обеспечила возможность адекватной трехмерной реконструкции изучаемых структур как в режиме полупрозрачных объектов, так и в режиме контурирования их поверхностей (рис. 4). При пространственной реконструкции ядрышек и телец Маринеско обнаружено, что не все наблюдаемые объекты имеют правильную шаровидную форму. Так, для ядрышек типичной была форма шара или эллипсоида, однако единичные ядрышки имели грушевидную и гантелеобразную формы.

Тельца Маринеско характеризовались большим полиморфизмом, но при этом всегда имели четкие контуры (рис. 5). Эти тельца присутствовали в ядрах нейронов в разном количестве (до шести в пределах ядра одной клетки) и занимали различное положение относительно ядрышка. Так, тельце могло быть тесно ассоциировано с ядрышком и непосредственно примыкать к его поверхности, однако в большинстве случаев оно располагалось на небольшом расстоянии от ядрышка или было удалено от него. Если одно ядро содержало несколько телец Маринеско, то эти тельца могли быть как удалены друг от друга, так и сгруппированы, иногда с непосредственным соприкосновением границ. Локализация нескольких телец относительно ядрышка также была различной. Выявлены случаи, когда часть телец непосредственно при-

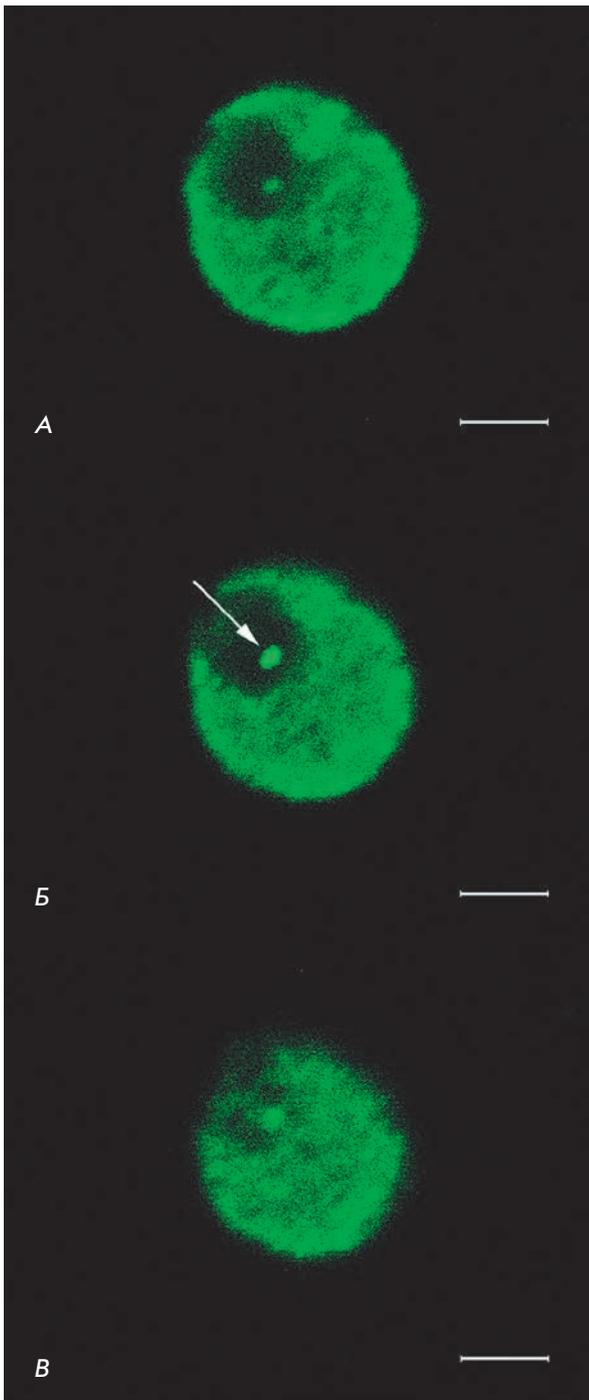


Рис. 3. Ядрышко дофаминергического нейрона черного вещества головного мозга человека. Последовательные одиночные оптические срезы, выполненные с интервалом 0.4 мкм. Стрелка указывает на иммуно-позитивную гранулу в области гигантского фибриллярного центра. Иммуноцитохимическая реакция на белок B23, визуализация с помощью флуорохрома Cy2 (зеленый цвет). Конфокальная лазерная микроскопия. Объектив Plan-Apochromat 100 × /1.40 (масляная иммерсия). Масштабный отрезок равен 2 мкм

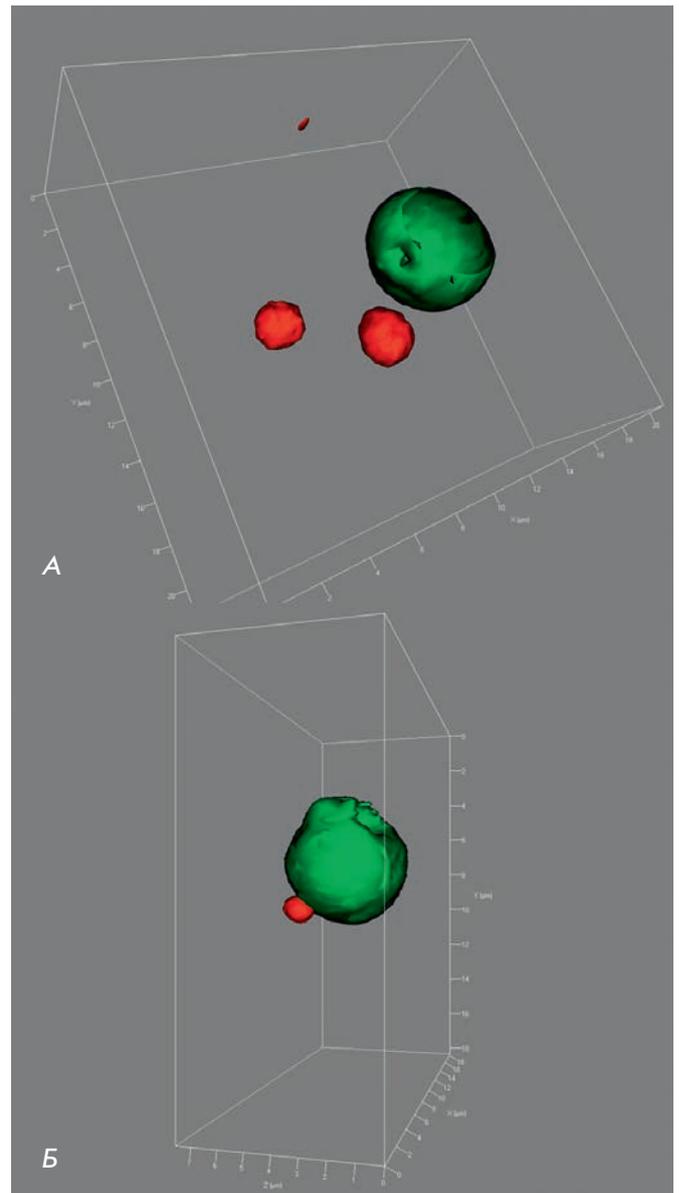
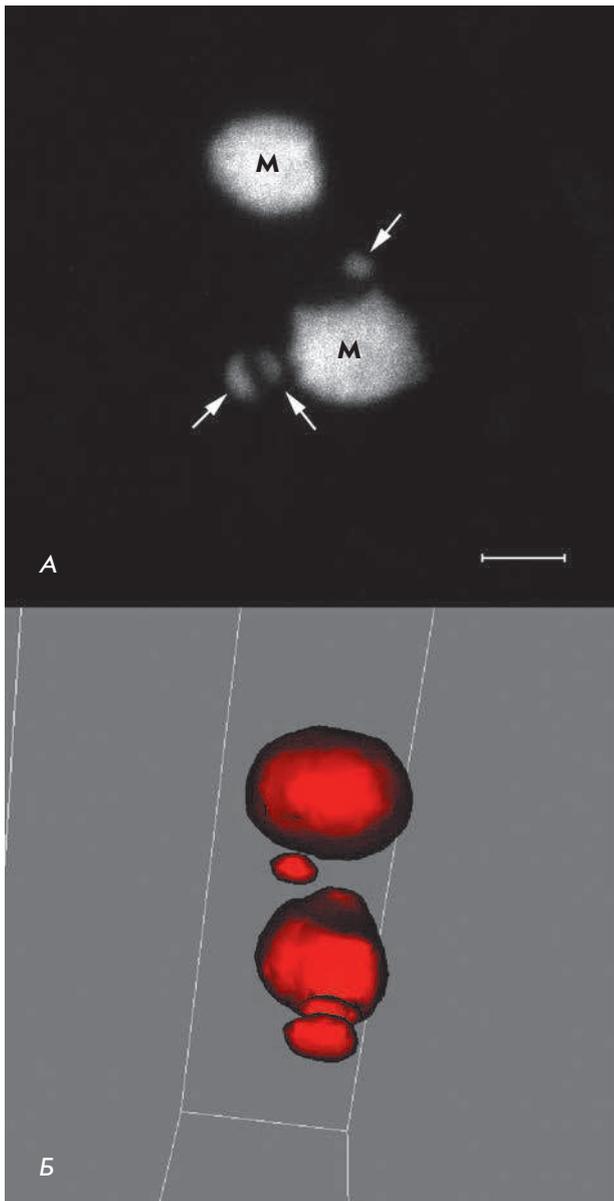


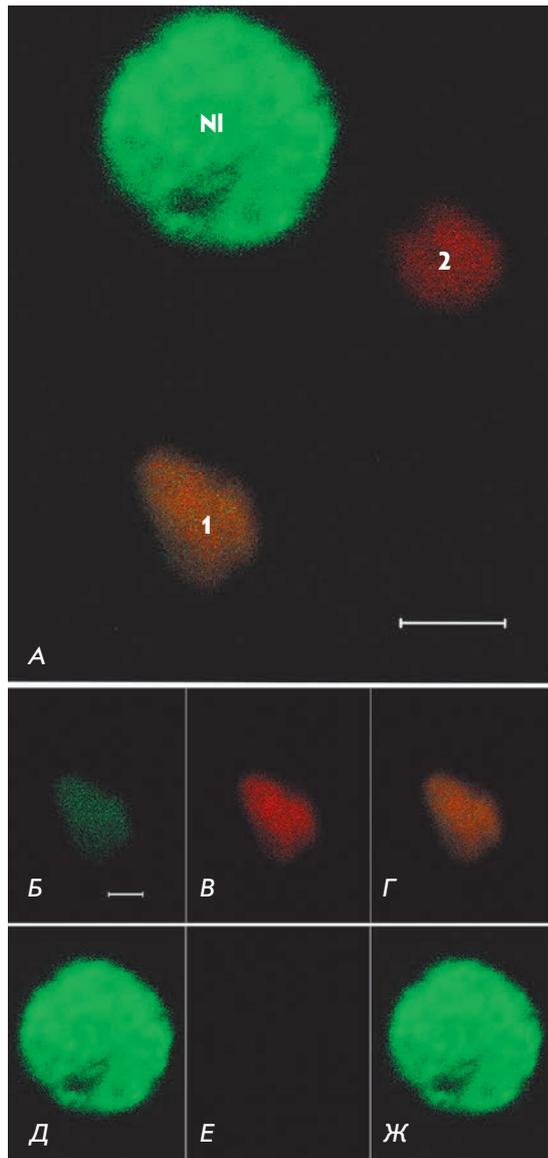
Рис. 4. Трехмерная реконструкция внутриядерных структур дофаминергического нейрона черного вещества головного мозга человека. Двойная иммуноцитохимическая реакция на белок B23, визуализация с помощью флуорохрома Cy2 (зеленый цвет – окрашено ядрышко), и убиквитин, визуализация с помощью флуорохрома TRITC (красный цвет). Конфокальная лазерная микроскопия. Реконструкция в режиме Surface осуществлена в программном модуле ZEN 2011 (Carl Zeiss). Величина Z-серии – 9.8 мкм (А) и 7.6 мкм (Б); количество оптических срезов – 50 (А) и 39 (Б). Объектив Plan-Apochromat 100 × /1.40 (масляная иммерсия)



**Рис. 5.** Тельца Маринеско в ядре дофаминергического нейрона черного вещества головного мозга человека. **М** – тельца Маринеско; **стрелка** – убиквитин-иммуно-позитивные структуры, которые не являются типичными тельцами Маринеско. Конфокальная лазерная микроскопия. **А** – изображение является суперпозицией 30 оптических срезов, выполненных с интервалом 0.2 мкм. **Б** – трехмерная реконструкция в режиме Surface с поворотом на 90° осуществлена в программном модуле ZEN 2011 (Carl Zeiss). Величина Z-серии – 5.8 мкм, количество оптических срезов – 30. Объектив Plan-Apochromat 100 ×/1.40 (масляная иммерсия). Масштабный отрезок равен 2 мкм

мыкала к границе ядрышка, в то время как другие были удалены от него. Иногда тельца окружали ядрышко с разных сторон. В ряде случаев все тельца обнаруживались на значительном расстоянии от ядрышка. Применение метода 3D-реконструкции позволило наблюдать все детали формы выявленных телец Маринеско (рис. 5). Полученные результаты свидетельствуют о том, что большинство идентифицируемых телец имеют правильную округлую, реже – овальную форму. Тем не менее, в ряде случаев отмечено присутствие на поверхности выявляемых телец уплощенных или вогнутых участков. Формирование такой сложной структуры поверхности тельца Маринеско может быть следствием присутствия некой другой структуры, непосредственно примыкающей к поверхности данного тельца. Косвенно это подтверждается полученными нами ранее данными, свидетельствующими о том, что уплощенные или вогнутые участки убиквитин-иммунопозитивных телец могут формироваться на их поверхности в местах контакта данных телец с ядрышком [15]. Более того, в нескольких случаях отмечено присутствие убиквитин-иммунопозитивных телец, примыкающих к поверхности структуры, определенной нами как добавочное ядрышко, на поверхности таких телец в месте примыкания также формировалось уплощение или вогнутость [15]. Тем не менее, при постановке двойной реакции на убиквитин и V23 было показано, что в ряде случаев тельца Маринеско удалены от V23-позитивного ядрышка и при этом все равно имеют сложную форму поверхности. Это может быть свидетельством присутствия в ядрах нейронов черного вещества других структур, с которыми взаимодействуют тельца Маринеско. С другой стороны, неровный контур данных телец в отсутствие ограничивающей мембраны может отражать динамику макромолекул и быть следствием ухода молекул с периферических участков телец Маринеско.

Другим важным результатом, полученным при использовании конфокальной микроскопии с послойным сканированием и 3D-реконструкции, стало подробное описание морфологии особых убиквитин-позитивных структур, которые по ряду признаков не могут быть отнесены к тельцам Маринеско, но четко выявляются при постановке соответствующей реакции на убиквитин (см. рис. 5). Эти структуры имеют сравнительно небольшие размеры (до 1 мкм в длину) и разнообразную форму – округлую, овальную, палочковидную и т.п. Как и тельца Маринеско, данные структуры характеризуются вариабельностью распределения в пределах ядра, при этом часто располагаясь вблизи типичных телец Маринеско и иногда примыкая к ним. Интересно отметить, что при не-



**Рис. 6.** Колокализация белка V23 и убиквитина в структурах ядра дофаминергического нейрона черного вещества головного мозга человека. А – общий план, показывающий иммунопозитивную реакцию структур в ядре. Б – колокализация белка V23 и убиквитина в атипичном тельце Маринеско (структура 1). NI – V23-иммунопозитивное ядрышко нейрона (колокализация выявляемых белков отсутствует); структура 2 – типичное тельце Маринеско (колокализация выявляемых белков отсутствует). Б, Д – зеленый канал (белок V23). В, Е – красный канал (убиквитин). Г, Ж – совмещенное изображение. Двойная иммуноцитохимическая реакция на белок V23, визуализация с помощью флуорохрома Cy2 (зеленый цвет), и убиквитин, визуализация с помощью флуорохрома TRITC (красный цвет). Конфокальная лазерная микроскопия. Объектив Plan-Apochromat 100 × / 1.40 (масляная иммерсия). Масштабный отрезок равен 2 мкм (А) и 1 мкм (Б–Ж)

посредственном примыкании таких убиквитин-позитивных структур к типичным тельцам Маринеско на поверхности последних присутствуют уплощенные или вогнутые участки, обращенные к данной структуре, что косвенно подтверждает предположение о неслучайном характере формирования сложной поверхности телец Маринеско. Вопрос о природе выявленных убиквитин-иммунопозитивных структур, не являющихся тельцами Маринеско, остается открытым. С этой точки зрения интересны данные, представленные Lafarga M. и соавт., которые выявили (с применением конфокальной и электронной микроскопии) в ядрах нескольких типов клеток особые структуры, названные кластосомами [20]. Согласно [20], эти внутриядерные структуры содержат убиквитин в высокой концентрации и являются местом разрушения различных белков. При этом присутствие в ядрах клеток кластосом определяется интенсивностью процессов протеасомной деградации в клетке – чем более они интенсивны, тем более выражены кластосомы [20]. Данное обстоятельство могло бы объяснить обнаруженное нами присутствие убиквитин-позитивных структур лишь в отдельных нейронах черного вещества на фоне их отсутствия в большинстве клеток различным функциональным состоянием анализируемых нейронов.

Изучение колокализации двух белков (убиквитина и V23) в ядрышках дофаминергических нейронов и тельцах Маринеско показало, что в ядрышках присутствует белок V23, а убиквитин отсутствует. Белок V23 никогда не колокализуется в ядрышке с убиквитином. Даже когда убиквитин-иммунопозитивные тельца непосредственно контактируют с ядрышком (см. рис. 4Б), зона кажущейся колокализации не превышает величины разрешения использованного оборудования (0.2 мкм). В противоположность ядрышку, в тельцах Маринеско колокализация убиквитина и белка V23 хотя и не типична, но возможна (рис. 6). При этом флуоресценция V23 существенно слабее, чем в области интенсивно окрашенных зон ядрышка, и сопоставима с флуоресценцией области GFC. Идентификация в ядрах нейронов телец, в которых белок V23 присутствует и колокализован с убиквитином, ставит вопрос о природе данных структур. Опубликованы данные о том, что убиквитин (вместе с убиквитин-подобными белками) играет важную роль не только в процессах внутриклеточной деградации белков, но и в биогенезе рибосом [16], что предполагает присутствие этого белка в составе ядрышек. Однако, как видно из рис. 6, идентифицированная V23/убиквитин-иммунопозитивная структура характеризуется неправильной формой, отсутствием внутренней структурированности и области GFC, в связи с чем она не может быть определена

как ядрышко, особенно учитывая представленные выше данные об отсутствии добавочных ядрышек в дофаминергических нейронах черного вещества. Особенности формы и размеров выявленных телец, а также присутствие в них убиквитина в высокой концентрации скорее свидетельствуют в пользу того, что данные внутриядерные структуры представляют собой специфическую разновидность телец Маринеско, содержащих белок B23. Однако нельзя исключать и возможность того, что обнаруженные B23/убиквитин-иммунопозитивные структуры являются самостоятельными внутриядерными включениями, не имеющими отношения ни к тельцам Маринеско, ни к кластосомам.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные результаты свидетельствуют о том, что в ядрах дофаминергических нейронов черного вещества человека присутствует несколько видов структур, содержащих исследованные белки и имеющих разнообразную форму. Относительно малыми размерами (до 2 мкм в диаметре), правильной формой и расположением вблизи ядрышка характеризуются структуры, подобные кластосомам. На различном расстоянии от ядрышка располагаются более крупные (чаще 2–4 мкм в диаметре) полиморфные тельца Маринеско, среди которых определяются атипичные структуры, содержащие как убиквитин, так и белок B23. Наиболее крупной и постоянной структурой ядра является ядрышко. Нами показана мономорфность и стабильность размеров ядрышек нейронов черного вещества человека. Установлено,

что для ядрышка дофаминергических нейронов характерно присутствие гигантского фибриллярного центра (GFC), ранее детально изученного только в нейронах лабораторных животных. Показано, что в составе GFC человека, в отличие от GFC крысы, обнаруживается непостоянная микроструктура, содержащая белок B23.

Все перечисленные факты содержат новую информацию о дофаминергических нейронах мозга человека. Дальнейшие исследования в этой области, направленные на изучение пространственной взаимосвязи ядрышка и телец Маринеско с другими внутриядерными структурами (тельцами Кахаля, PML-тельцами, ядерными спеклами), а также изучение динамики данных структур при развитии нейродегенерации позволят сделать вывод о вовлеченности внутриядерных структур в регуляцию функционального состояния катехоламинергических нейронов. Изучение особенностей распределения белков, входящих в состав данных структур, в норме и при патологии может способствовать обнаружению новых молекулярных маркеров процесса нейродегенерации. Анализ внутриядерных структур нейронов, устойчивых к повреждающим факторам, позволит сделать вывод о наличии (или отсутствии) взаимосвязи между особенностями внутриядерных включений и избирательной чувствительностью дофаминергических нейронов черной субстанции к повреждению. ●

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (проект № 14-15-00014).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Гаврилов А.А., Разин С.В. // Молекуляр. биология. 2015. Т. 49. № 1. С. 26–45.
2. Kettner M., Willwohl D., Hubbard G.B., Rüb U., Dick E.J. Jr., Cox A.B., Trottier Y., Auburger G., Braak H., Schultz C. // Exp. Neurol. 2002. V. 176. P. 117–121.
3. Григорьев И.П., Коржевский Д.Э. // Мед. акад. журн. 2015. Т. 15. № 2. С. 28–34.
4. Okuwaki M. // J. Biochem. 2008. V. 143. № 4. P. 441–448.
5. Colombo E., Alcalay M., Pelicci P.G. // Oncogene. 2011. V. 30. № 23. P. 2595–2609.
6. Pfister J.A., D'Mello S.R. // Exp. Biol. Med. (Maywood). 2015. V. 240. № 6. P. 774–786.
7. Marquez-Lona E.M., Tan Z., Schreiber S.S. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 2012. V. 417. № 1. P. 514–520.
8. Lim A.C.B., Qi R.Z. // J. Alzheimers Dis. 2003. V. 5. P. 329–335.
9. Ranganathan S., Bowser R. // Am. J. Pathol. 2003. V. 162. P. 823–835.
10. Neve R.L., McPhie D.L. // Pharmacol. Ther. 2006. V. 111. P. 99–113.
11. Hornykiewicz O. // Pharmacol. Rev. 1966. V. 18. № 2. P. 925–964.
12. Kozina E.A., Khakimova G.R., Khaindrava V.G., Kucheryanu V.G., Vorobyeva N.E., Krasnov A.N., Georgieva S.G., Kerkerian-Le Goff L., Ugrumov M.V. // J. Neurol. Sci. 2014. V. 340. № 1–2. P. 198–207.
13. Филатова Е.В., Шадрина М.И., Алиева А.Х., Колачева А.А., Сломинский П.А., Угрюмов М.В. // Докл. Акад. наук. 2014. Т. 456. № 6. С. 728–730.
14. Alexopoulou Z., Lang J., Perrett R.M., Elschami M., Hurry M.E., Kim H.T., Mazaraki D., Szabo A., Kessler B.M., Goldberg A.L., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2016. V. 113. № 32. P. E4688–4697.
15. Grigor'ev I.P., Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Gusel'nikova V.V., Kirik O.V. // Cell Tiss. Biol. 2016. V. 10. № 1. P. 29–36.
16. Stavreva D.A., Kawasaki M., Dunder M., Koberna K., Müller W.G., Tsujimura-Takahashi T., Komatsu W., Hayano T., Isobe T., Raska I., et al. // Mol. Cell. Biol. 2006. V. 26. № 13. P. 5131–5145.
17. Korzhevskii D.E., Sukhorukova E.G., Kirik O.V., Grigorev I.P. // Eur. J. Histochem. 2015. V. 59. № 3. P. 25–30.
18. Оксова Е.Е. // Арх. анат. 1972. Т. 63. № 10. С. 33–36.
19. Casafont I., Bengoechea R., Navascués J., Pena E., Berciano M.T., Lafarga M. // J. Struct. Biol. 2007. V. 159. № 3. P. 451–461.
20. Lafarga M., Berciano M.T., Pena E., Mayo I., Castaño J.G., Bohmann D., Rodrigues J.P., Tavanez J.P., Carmo-Fonseca M. // Mol. Biol. Cell. 2002. V. 13. № 8. P. 2771–2782.

УДК 571.27

# Индукция экспрессии ICAM-1 в эмбриональных фибробластах мышцы при их культивировании на губчатых фиброин-желатиновых скаффолдах

М. А. Носенко<sup>1,2,4</sup>, Н. В. Малюченко<sup>1</sup>, М. С. Друцкая<sup>1,2</sup>, А. Ю. Архипова<sup>1</sup>, И. И. Агапов<sup>3</sup>, С. А. Недоспасов<sup>1,2,4</sup>, М. М. Мойсенович<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

<sup>2</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, лаборатория молекулярных механизмов иммунитета, 119991, Москва, ул. Вавилова, 32

<sup>3</sup>Федеральный научный центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова Минздрава России, лаборатория бионанотехнологий, 123182, Москва, Щукинская ул., 1

<sup>4</sup>Немецкий ревматологический исследовательский центр, 10117, Берлин, Шаритеплатц, 1, Германия

\*E-mail: mmoisenovich@mail.ru

Поступила в редакцию 01.12.2016

Принята к печати 26.05.2017

**РЕФЕРАТ** Культивирование клеток в трехмерных условиях на биорезорбируемых каркасах (скаффолдах) – важнейший этап создания тканеинженерных конструкций, предназначенных для использования в регенеративной медицине, а также в качестве модельных систем для исследования механизмов клеточной дифференцировки и межклеточных взаимодействий. Искусственные субстраты могут модулировать фенотип и функциональную активность иммобилизованных на них клеток. Изучение таких изменений важно как для понимания фундаментальных процессов, лежащих в основе взаимодействия клеток в трехмерном микроокружении, так и для совершенствования тканеинженерных конструкций. В представленной работе исследована экспрессия молекулы адгезии ICAM-1 в эмбриональных фибробластах мышцы (МЭФ), культивируемых в фиброин-желатиновых скаффолдах. Повышенный уровень экспрессии ICAM-1 в МЭФ детектировали исключительно в условиях трехмерного культивирования на уровне как мРНК, так и белка. При этом культивирование МЭФ на различных субстратах не влияло на экспрессию MAdCAM-1, что свидетельствует об избирательности воздействия созданных трехмерных условий на экспрессию ICAM-1. Один из возможных механизмов индукции ICAM-1 в МЭФ связан с активацией AP-1, поскольку экспрессия *Fos* и *Junb* (но не *Jun* и *Jund*) в 3D повышалась. При культивировании фибробластов в 2D условиях уровень экспрессии компонентов AP-1 не изменялся.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** МЭФ, биоинженерия, полимерный матрикс, стромальные клетки, ICAM-1, 3D.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** 2D – двумерные условия; 3D – трехмерные условия; МЭФ – эмбриональные фибробласты мышцы; ФЖ – фиброиновый скаффолд, содержащий 30% желатина.

## ВВЕДЕНИЕ

Ранее нами был создан фиброин-желатиновый губчатый скаффолд, формирующий субстрат для адгезии и пролиферации клеток различных типов [1]. Фрагменты этого скаффолда размером 200–400 мкм при подкожном введении в область, прилегающую к ране, способствовали регенерации полнослойной раны кожи мышцы, по-видимому, из-за их иммуномодулирующей активности [2]. Одним из возможных ме-

ханизмов, лежащих в основе регенеративной активности фиброин-желатиновых скаффолдов, может быть усиление экспрессии фибробластами после их контакта с поверхностью скаффолдов молекул адгезии, вовлеченных в иммунные реакции. Одной из таких молекул является ICAM-1. В норме ICAM-1 представлена на фибробластах в небольшом количестве, а ее экспрессия может быть индуцирована в результате изменения микроокружения. Например, при воспа-

лении экспрессия ICAM-1 в тканеспецифичных фибробластах значительно возрастает и способствует миграции иммунных клеток к очагу воспаления [3, 4]. ICAM-1 важна для функционирования лимфоидных органов, где молекула обеспечивает контактные взаимодействия между клетками иммунной системы, стромальными и эндотелиальными клетками [5]. Воспроизведение этих и других взаимодействий, опосредованных трехмерным окружением, как *in vitro*, так и *in vivo* представляет важный этап в конструировании искусственной лимфоидной ткани [6].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Первичную культуру МЭФ и губчатые фиброиновые скаффолды, содержащие 30% желатина (3D ФЖ), получали как описано ранее [1]. Для 2D культивирования использовали скаффолды, выполненные в виде пленок из водного раствора того же состава, или культуральный пластик Nunc (Thermo Fisher Scientific, США).

РНК из МЭФ выделяли по стандартному протоколу с использованием TRI Reagent (Sigma Aldrich, США), наборов для обратной транскрипции (Thermo

Scientific, EN0521 и K1621) и ПЦР в реальном времени («Синтол», М-440), руководствуясь при этом рекомендациями производителей. Качество реакций оценивали по кривой плавления и электрофорезу в 1.8% агарозном геле продуктов амплификации. Снимки гелей проводили с помощью GelDoc™XR+System (BioRad, США). В качестве положительного контроля при анализе экспрессии гена *Madcam1* использовали суммарную РНК, выделенную из лимфатических узлов мыши. Работу проводили на приборе 7500 RT-PCR System (Applied Biosystems, США).

Иммунофлуоресцентный анализ проводили с применением антител  $\alpha$ ICAM1-Cy5 (КАТ1), ядерного красителя SYTOX orange, конъюгата фаллоидин-ФИТЦ для визуализации полимеризованного актина. Образцы заключали в Aqua-Poly/Mount (Polysciences, Inc., США). Полученные препараты исследовали с использованием электронного микроскопа Camscan Series II (Cambridge Instruments) в режиме SEI и на микроскопе Nikon Eclipse Ti-E с конфокальным модулем A1 (Nikon Corp., Япония) и объективом Apo TIRF 60 $\times$ /1.49 Oil или CFI Plan Apo VC 20 $\times$ /0.75.

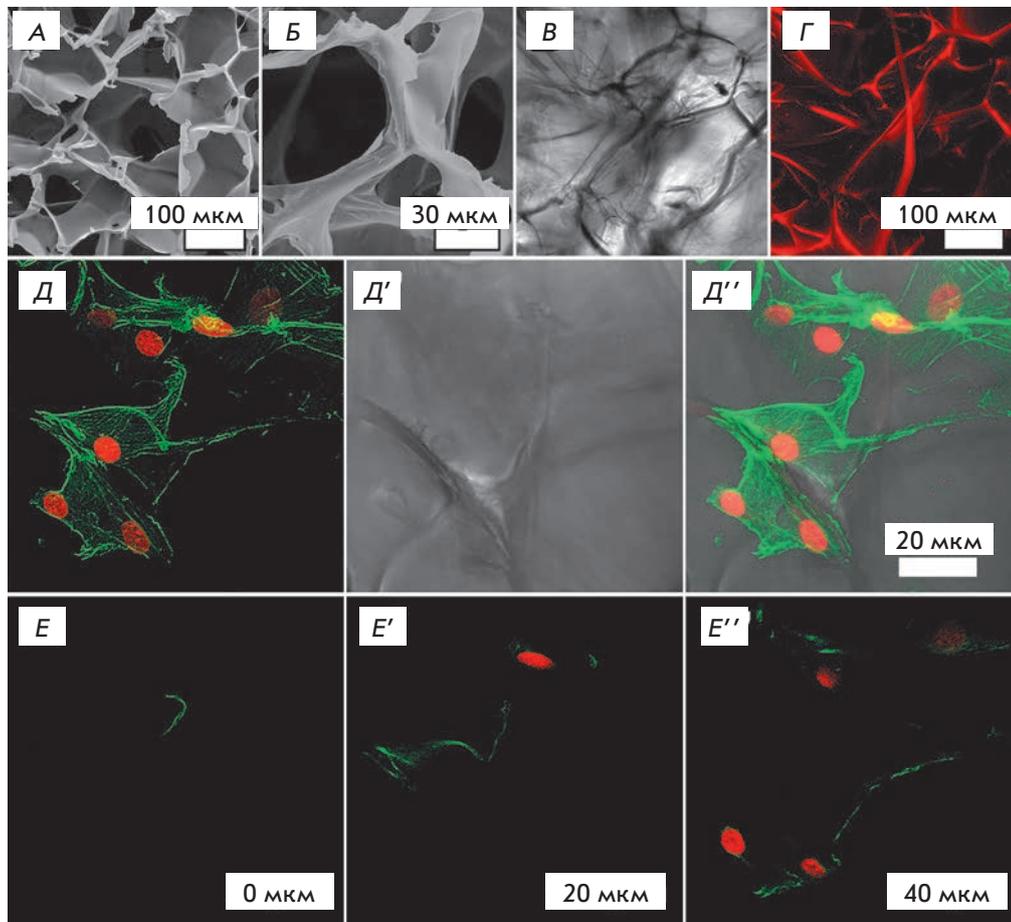
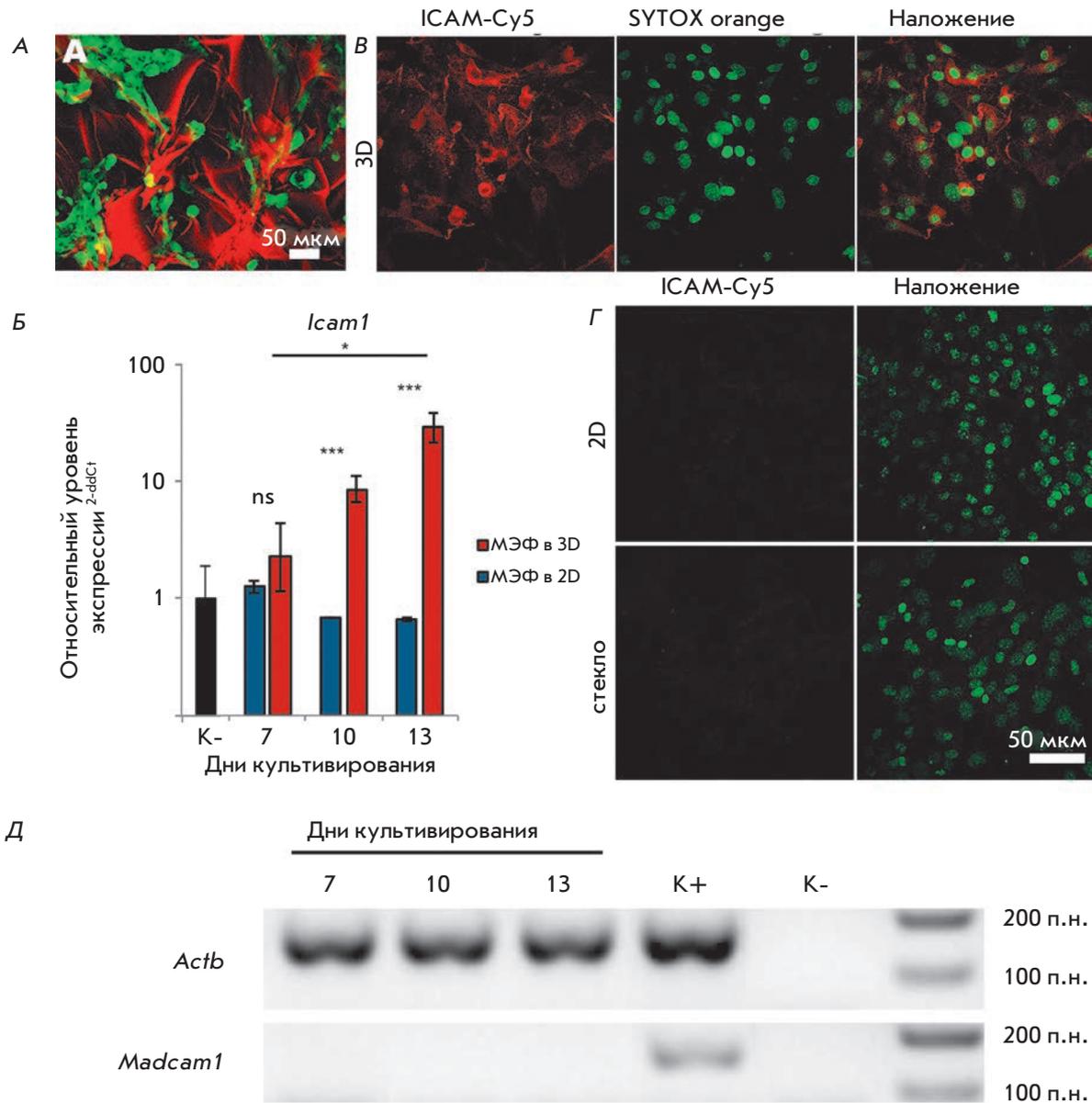


Рис. 1. Микроструктура скаффолдов и анализ цитоскелета МЭФ в условиях 3D культивирования. Изображения скаффолда получены на сканирующем электронном микроскопе (А, Б); в водной среде с использованием конфокальной системы в проходящем свете (DIC, В); проекция 150 оптических срезов с интервалом 1.2 мкм (Г). Материал скаффолда выявлен ТРИТЦ. Объектив CFI Plan Apo VC 20 $\times$ /0.75. Д–Д'' – трехмерная реконструкция в виде горизонтальной проекции 242 оптических срезов с интервалом 281 нм (68.002 мкм). Е–Е'' – оптические срезы на расстоянии 0, 20 и 40 мкм от первого оптического среза. Зеленым показан цитоскелет клеток (фаллоидин-ФИТЦ), красным – ядра (SYTOX orange). Объектив Apo TIRF 60 $\times$ /1.49 Oil



**Рис. 2.** Экспрессия ICAM-1 в МЭФ. **А** – распределение GFP<sup>+</sup> МЭФ при культивировании на 3D скаффолдах. Материал скаффолда выявлен ТРИТЦ. **Б** – экспрессия *Icam1* в культуре МЭФ в 2D (на пластике) и в 3D ФЖ. Значения рассчитаны относительно уровня экспрессии генов в МЭФ до начала эксперимента (обозначен К-). Данные репрезентативны для трех независимых экспериментов. \* –  $p < 0.05$ ; \*\*\* –  $p < 0.001$ ; ns – незначимая разница. **В, Г** – иммунофлуоресцентное окрашивание ICAM-1 в культуре МЭФ в 3D условиях (**В**), а также на 2D подложке из фиброина (**Г**, верхний ряд) и поверхности культурального пластика (**Г**, нижний ряд). Объектив – CFI Plan Apo VC 20×/0.75. **Д** – экспрессия гена *Madcam1* в культуре МЭФ в 3D ФЖ. Представлены результаты электрофореза в агарозном геле продуктов ПЦР со специфическими праймерами к указанным генам. Положительный контроль (К+) – материал лимфатических узлов мыши, в отрицательном контроле (К-) отсутствовала матрица для ПЦР

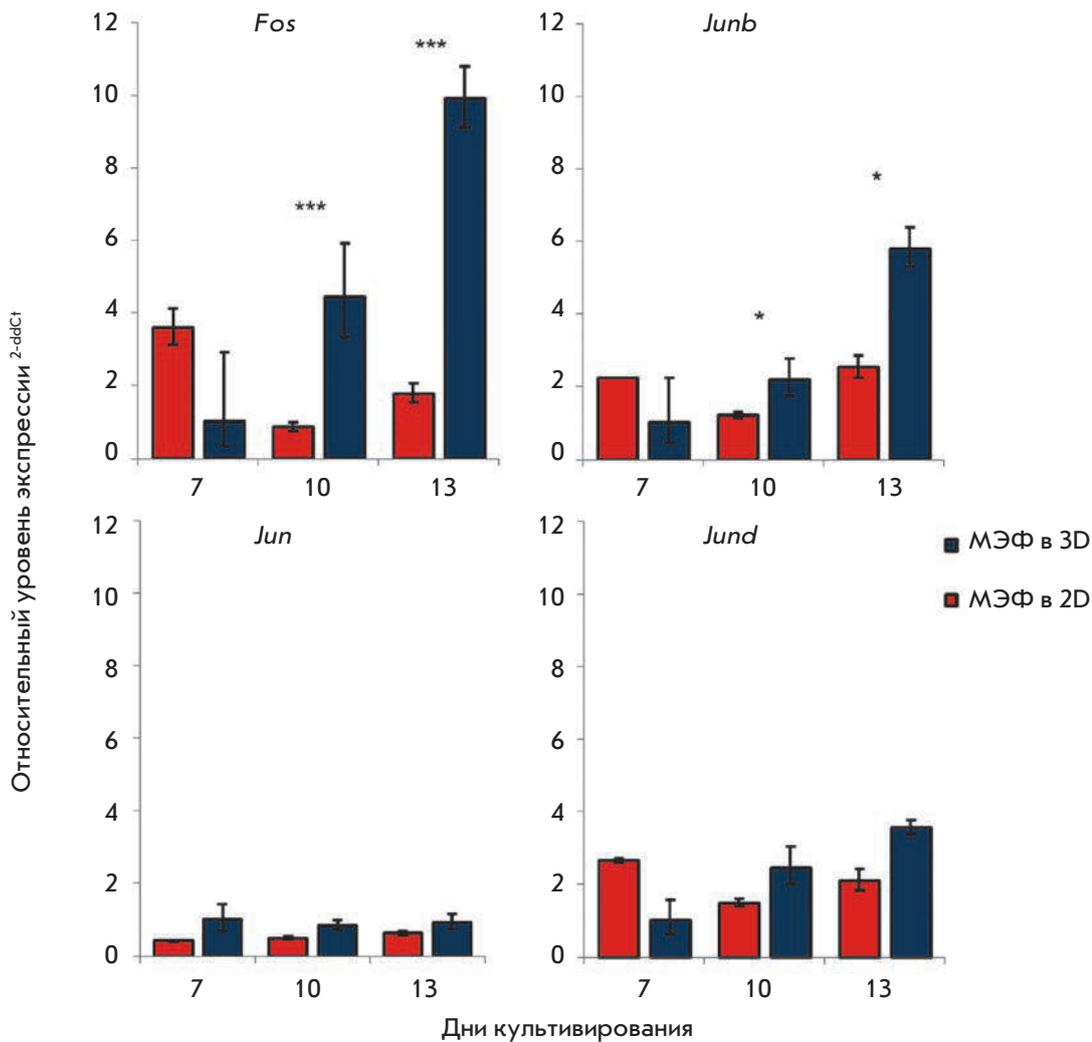


Рис. 3. Экспрессия генов AP-1. Экспрессия генов транскрипционного фактора AP-1 в культуре МЭФ при культивировании на пластике (2D) и на фиброиновых скаффолдах (3D). Значения рассчитаны относительно уровня экспрессии генов на седьмой день в МЭФ в 3D условиях. \* –  $p < 0.01$ ; \*\*\* –  $p < 0.001$

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

3D ФЖ скаффолд имеет трехмерную пористую структуру со сложной внутренней и внешней топографией (рис. 1А–Г). Важно, что при культивировании МЭФ на скаффолдах взаимодействие клеточных структур с субстратом осуществляется в различных плоскостях (рис. 1Д,Е'). Распределение клеток на поверхности трехмерного скаффолда также представлено на рис. 2А.

Поскольку молекулы адгезии играют важнейшую роль во взаимодействии клеток друг с другом и с внеклеточным матриксом, для изучения влияния условий культивирования на свойства МЭФ была проанализирована экспрессия гена молекулы адгезии ICAM-1 в 3D и 2D культурах. Известно, что цитоплазматический домен молекулы ICAM-1 взаимодействует с актиновым цитоскелетом [7], а кластеризация ICAM-1 индуцирует ассоциацию ICAM-1

с актинсвязывающими адаптерными белками и связывает ICAM-1 с F-актиновым цитоскелетом [8]. Мы предположили, что перестройки цитоскелета, вызванные культивированием МЭФ в трехмерных фиброиновых скаффолдах, могут приводить к изменению экспрессии ICAM-1. Действительно, при длительном культивировании МЭФ на фиброиновых скаффолдах, но не на культуральном пластике, наблюдается значительное увеличение экспрессии гена *Icam1* (рис. 2В). В соответствии с данными по экспрессии гена интенсивное окрашивание МЭФ антителами к ICAM-1 наблюдали только в условиях 3D культивирования (рис. 2В). При этом при 2D культивировании фибробластов на ФЖ-пленках или на стекле сигнал практически отсутствовал (рис. 2Г). Наличие очень слабого сигнала, по-видимому, обусловлено базовым уровнем экспрессии мРНК *Icam1* в 2D культуре (рис. 2В).

Чтобы убедиться в специфичности наблюдаемого эффекта и отсутствии его связи с общим повышением уровней экспрессии различных генов в процессе культивирования на 3D субстратах, была проанализирована экспрессия гена другой молекулы адгезии – MAdCAM-1. MAdCAM-1, как и ICAM-1, экспрессируется на стромальных и эндотелиальных клетках и является одним из ключевых участников в миграции иммунных клеток в лимфоидные органы, а также в барьерные ткани, однако для нее характерна специфическая индукция при активации некоторых цитокиновых рецепторов [9].

Продукты экспрессии гена *Madcam1* в культуре МЭФ на скаффолдах не были выявлены, что свидетельствует об избирательности влияния трехмерных условий культивирования на экспрессию генов молекул адгезии (рис. 2Д).

Известно, что промоторная область гена *Icam-1* содержит три сайта связывания транскрипционного фактора AP-1, который участвует в его регуляции [10]. Один из возможных механизмов индукции ICAM-1 в МЭФ может быть связан с изменением активности фактора AP-1. Анализ экспрессии генов, кодирующих субъединицы AP-1 (*Fos*, *Jun*, *Jund*, *Junb*) (рис. 3) показал значимое увеличение уровня экспрессии *Fos* и *Junb* в условиях 3D культивирования по сравнению с 2D. Экспрессия генов *Jun* и *Jund* не зависела от условий культивирования и не изменялась статистически значимо.

В дальнейшем предстоит понять, какие сигнальные пути, начиная с механорецепции трехмерного скаффолда или межклеточных взаимодействий, приводят к экспрессии AP-1 и затем, по-видимому, к появлению ICAM-1. Также нельзя исключать участия других транскрипционных факторов в индукции экспрессии ICAM-1. Так, например, известно, что в этот процесс вовлечено семейство транскрипционных факторов NF-κB [11].

## ВЫВОДЫ

Культивирование МЭФ в трехмерных фиброин-желатиновых скаффолдах приводит к существенному повышению экспрессии ICAM-1.

Усиление экспрессии ICAM-1 связано с трехмерной организацией скаффолда, а не с влиянием продуктов деградации фиброина, так как культивирование на двумерном фиброиновом матриксе не влияло на экспрессию молекулы.

Увеличение экспрессии ICAM-1 сопряжено с усилением экспрессии генов AP-1 – *Fos* и *Junb*, но не *Jun* и *Jund*. ●

Работа осуществлена при поддержке РФФИ  
(грант № 15-29-04903)  
и гранта Президента РФ для ведущих научных  
школ (НШ-10014.2016.4).

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Moisenovich M.M., Arkhipova A.Y., Orlova A.A., Drutskaya M.S., Volkova S.V., Zacharov S.E., Agapov I.I., Kirpichnikov M.P. // Acta Naturae. 2014. V. 6. № 1. P. 96–101.
- Архипова А.Ю., Носенко М.А., Малюченко Н.В., Зварцев Р.В., Мойсенович А.М., Жданова А.С., Васильева Т.В., Горшкова Е.А., Агапов И.И., Друцкая М.С., Недоспасов С.А., Мойсенович М.М. // Биохимия. 2016. Т. 81. № 11. С. 1494–1504.
- Couture P., Paradis-Massie J., Oualha-Morin N., Thibault G. // Exp. Cell Res. 2009. V. 315. № 13. P. 2192–2206.
- Zandvoort A., van der Geld Y.M., Jonker M.R., Noordhoek J.A., Vos J.T., Wesseling J., Kauffman H.F., Timens W., Postma D.S. // Eur. Respir. J. 2006. V. 28. № 1. P. 113–122.
- Randall T.D., Carragher D.M., Rangel-Moreno J. // Annu. Rev. Immunol. 2008. V. 26. P. 627–650.
- Nosenko M.A., Drutskaya M.S., Moisenovich M.M., Nedospasov S.A. // Acta Naturae. 2016. V. 8. № 2. P. 10–23.
- Carpen O., Pallai P., Staunton D.E., Springer T.A. // J. Cell. Biol. 1992. V. 118. P. 1223–1234.
- Schaefer A., Te Riet J., Ritz K., Hoogenboezem M., Anthony E.C., Mul F.P., de Vries C.J., Daemen M.J., Figdor C.G., van Buul J.D., Hordijk P.L. // J. Cell. Sci. 2014. V. 127. № 22. P. 4470–4482.
- Ando T., Langley R.R., Wang Y., Jordan P.A., Minagar A., Alexander J.S., Jennings M.H. // BMC Physiol. 2007. V. 14. № 7. P. 10.
- Voraberger G., Schafer R., Stratowa C. // J. Immunol. 1991. V. 147. № 8. P. 2777–2786.
- Roebuck K.A., Finnegan A. // J. Leukoc. Biol. 1999. V. 66. № 6. P. 876–888.

УДК 577.218

# Минорный вариант однонуклеотидного полиморфизма rs3753381 увеличивает активность энхансера гена *SLAMF1*

Л. В. Путляева<sup>1\*</sup>, А. М. Шварц<sup>1</sup>, А. В. Клепикова<sup>2,3</sup>, И. Е. Воронцов<sup>4</sup>, И. В. Кулаковский<sup>1,4</sup>,  
Д. В. Купраш<sup>1,5</sup>

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

<sup>2</sup>Институт проблем передачи информации им. А.А. Харкевича РАН, 127051, Москва, Большой Каретный пер., 19, стр. 1

<sup>3</sup>НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40

<sup>4</sup>Институт общей генетики им. Н.И. Вавилова РАН, 119991, Москва, ул. Губкина, 3

<sup>5</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, кафедра иммунологии, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

\*E-mail: lidia.mikhailova@mail.ru

Поступила в редакцию 08.02.2017

Принята к печати 31.05.2017

**РЕФЕРАТ** Ген *SLAMF1* кодирует трансмембранный гликопротеин CD150, экспрессируемый на поверхности Т- и В-лимфоцитов, НК-клеток, дендритных клеток, субпопуляций базофилов и макрофагов. При помощи биоинформатического и мутационного анализа регуляторных элементов, перекрывающихся с полиморфными позициями, мы провели поиск функциональных регуляторных полиморфизмов локуса *SLAMF1*, ассоциированных с аутоиммунными процессами. Анализ активности гена-репортера в В-клеточных линиях MP-1 и Raji показал, что введение минорного варианта полиморфизма rs3753381 (G > A), ассоциированного с миастенией гравис, более чем вдвое увеличивает энхансерную активность регуляторного участка локуса, содержащего rs3753381. При анализе нуклеотидного контекста в окрестности rs3753381 установлено, что минорный вариант этого полиморфизма улучшает сайты связывания факторов транскрипции семейств FOX и NFAT и ядерных рецепторов семейства RXR. Внесение мутаций, нарушающих какие-либо из этих сайтов, приводит к снижению энхансерной активности как в клетках MP-1, так и в Raji, причем каждая из двух использованных В-клеточных линий экспрессирует специфический набор таких факторов. Таким образом, минорный вариант полиморфизма rs3753381 может быть ассоциирован с миастенией гравис за счет модуляции экспрессии *SLAMF1*, предположительно, в В-лимфоцитах, участвующих в патологических аутоиммунных реакциях.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** аутоиммунитет, некодирующий полиморфизм, регуляция транскрипции, В-клетки.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** SLAM – сигнальная молекула активации лимфоцитов; CD – кластер дифференцировки; IFN- $\gamma$  – интерферон гамма; TCR – Т-клеточный рецептор; IL – интерлейкин.

## ВВЕДЕНИЕ

Рецептор *SLAMF1/CD150*, кодируемый геном *SLAMF1*, является трансмембранным гликопротеином массой 70 кДа, который экспрессируется на поверхности различных клеток гемопоэтического ряда человека и мыши: В- и Т-лимфоцитов (на разных стадиях дифференцировки), дендритных клеток, субпопуляций базофилов и макрофагов [1, 2]. Экспрессия *SLAMF1* повышается при активации упомянутых клеток, а также при активации моноцитов и тучных клеток [1, 3–5]. В Т-лимфоцитах

*SLAMF1* оказывает ко-стимулирующее действие на антигенспецифичную, CD28-независимую пролиферацию и индуцирует синтез IFN- $\gamma$  [6], тогда как в В-лимфоцитах он индуцирует и усиливает пролиферацию и синтез иммуноглобулинов [7]. *SLAMF1* также важен для двунаправленной Т-В-клеточной стимуляции. Белок *SLAMF1* может служить рецептором вируса кори [2], участвовать в процессе распознавания грамотрицательных бактерий и последующей активации макрофагов для уничтожения бактерий [8]. На мышинных моделях показано, что на-

рушение сигнального пути данного белка может приводить к развитию аутоиммунных заболеваний и иммунодефицитных состояний [9–11].

На данный момент хорошо известна роль четырех представителей семейства SLAM/CD2 в развитии аутоиммунных состояний. Изменения в нуклеотидных последовательностях генов *Ly108*, *Ly9*, *CD84* и *CD244* ассоциированы с запуском аутоиммунных процессов не только в мышиных моделях, но и на ограниченной когорте пациентов. Наличие альтернативных аллелей гена *Ly108* у мышей сильно влияет на центральную толерантность при развитии В- и Т-клеток, ввиду участия гена *Ly108* в TCR-опосредованной стимуляции ключевых проапоптотических молекул BIM и FasL [12], регуляции иммунологической толерантности и прогрессии клеточного цикла [13]. Кроме того, *Ly108* и *CD84* вместе с их адаптером SAP (SLAM-ассоциированный белок) участвуют в двунаправленной Т-В-клеточной стимуляции, что необходимо для формирования герминальных центров [14]. Имеются данные о связи однонуклеотидных полиморфизмов генов некоторых представителей семейства SLAM/CD2 с риском развития ряда аутоиммунных заболеваний. Известно, что минорный вариант rs509749 гена *CD229* (*Ly9*, *SLAMF3*) вызывает изменение аминокислотной последовательности ITSM-мотива *CD229* и последующее изменение аффинности рецептора к адаптеру SAP, что, в свою очередь, может приводить к увеличению риска развития системной красной волчанки [15, 16]. Имеются также данные об ассоциации гетерозиготного варианта (GA) однонуклеотидного полиморфизма rs6427528 гена *CD84* с положительным ответом на терапию этанерцептом при псориазе и ревматоидном артрите [17] и двух полиморфизмов гена *CD244* (2B4) – rs3766379 и rs6682654 – с прогрессией ревматоидного артрита и системной красной волчанки в когорте японских

пациентов [18]. Также известно о корреляции между полиморфизмом rs2049995 в гене *SAP*, кодирующим основной белок-адаптер представителей семейства SLAM, с развитием системной красной волчанки [19]. Все это свидетельствует о связи изменений в нуклеотидных последовательностях генов представителей семейства SLAM с развитием различных аутоиммунных заболеваний.

Известны два полиморфизма *SLAMF1*, ассоциированные с аутоиммунными процессами (табл. 1) [20, 21]. Результаты генотипирования, приведенные в упомянутых статьях, позволяют считать, что минорный вариант полиморфизма rs11265455 связан с риском развития сахарного диабета типа 2, а минорный вариант полиморфизма rs3753381 (G>A) ассоциирован с повышенным риском развития миастении гравис.

Согласно данным, полученным на мышах с индуцированным ожирением, сахарный диабет типа 2, считавшийся ранее только метаболическим заболеванием, связанным с нарушением взаимодействия инсулина и клеток тканей организма, также имеет аутоиммунную природу [22, 23] и может развиваться на фоне других аутоиммунных заболеваний [24, 25]. Важную роль в развитии диабета типа 2 играют В-клетки, вовлеченные в метаболизм глюкозы, участвующие в активации провоспалительных макрофагов и Т-клеток и продукции уникального профиля IgG-аутоантител у людей, страдающих ожирением. Показано, что в мышинной модели диабета типа 2 анти-CD20-антитела вызывают уменьшение активации Т-клеток и улучшают метаболизм глюкозы [22], а использование салицилатов и антагонистов IL-1, снижающих уровень глюкозы, прошло клинические испытания [26].

Приобретенная миастения гравис – редкое аутоиммунное заболевание, которое клинически про-

Таблица 1. Полиморфизмы локуса гена *SLAMF1*, ассоциированные с аутоиммунными процессами

SNP	rs11265455	rs3753381
Энхансер гена <i>SLAMF1</i>	D	E
Ассоциация с заболеваниями	Сахарный диабет типа 2	Миастения гравис
Риск-аллель	G (минорный)	A (минорный)
Альтернативный аллель	A (мажорный)	G (мажорный)
Частота встречаемости риск-аллеля	0.199	0.25
P-значения	$3.9 \times 10^{-5}$	$9.63 \times 10^{-6}$
OR	1.32 (1.16–1.47)	1.04 (0.87–1.25)
TFBS, предположительно разрушаемые минорным вариантом SNP	NFAT	RXR, FOX

Примечание: OR – отношение рисков развития заболевания; риск-аллель/ аллель, ассоциированный с риском возникновения заболевания; TFBS – сайт связывания транскрипционного фактора.

является утомляемостью и слабостью поперечно-полосатых мышц [21], [27]. Пусковой механизм для активации системы аутоиммунного ответа при миастении гравис до сих пор не выяснен: аутоантитела начинают вырабатываться против никотиновых ацетилхолиновых рецепторов, расположенных в окончании двигательного нерва, что приводит к ухудшению передачи нервного импульса к мышце [28]. Инъекция фракции иммуноглобулинов из сыворотки больного миастенией гравис, содержащей антитела анти-AChR (обнаруживаются у 85% пациентов) и анти-MuSK (у 15% пациентов), индуцировала симптомы миастении у животных [9, 29, 30]. При миастении гравис эффективна терапия, направленная на уменьшение количества В-клеток моноклональными антителами против CD20 (ретуксимаб) [31]. Известным фактором риска для развития аутоиммунных заболеваний является также изменение сигналинга Т-клеточного рецептора (TCR), что, в свою очередь, может влиять на систему селекции в тимусе, активность Т-хелперов и регуляторных Т-клеток [32]. Развитие многих аутоиммунных заболеваний, таких, как системная красная волчанка, полимиозит, дерматомиозит, ревматоидный артрит, синдром Шегрена, рассеянный склероз, приобретенный буллезный эпидермолиз, болезнь Крона, язвенный колит и аутоиммунный гепатит, связано с нарушением производства NKT-клеток (Natural Killer T-cell) [33]. Существуют данные о том, что увеличение в 2 раза экспрессии *SLAMF1* у мышей NOD.Nkrlb.Tg(Slamf1) удваивает продукцию NKT-клеток в тимусе посредством гомотипических взаимодействий (SLAM-SLAM) на поверхности незрелых NKT-клеток и CD4+CD8+-timoцитов, необходимых для развития NKT-клеток [9, 34]. Также небольшое повышение экспрессии CD150-SLAMF1 увеличивает продукцию IL-4 и IL-17 в ответ на стимуляцию через TCR [34]. Имеются данные, что *SLAMF1* участвует в регуляции продукции IFN- $\gamma$  CD4+ Т-клетками, что также может быть опосредованно связано с патогенезом и иммунорегуляцией миастении гравис [3]. Это позволяет предположить, что увеличение продукции *SLAMF1* под действием аллельного варианта однонуклеотидного полиморфизма может быть одним из звеньев в цепи развития аутоиммунных процессов.

Недавно мы охарактеризовали ряд регуляторных областей гена *SLAMF1*, в том числе промотор (297–0 относительно старта трансляции) и три энхансерных элемента примерно по 2.5 т.п.н., два из которых находятся в третьем интроне и один – на расстоянии 3 т.п.н. после кодирующей последовательности [35]. Активность регуляторных элементов изучена на клеточных линиях Raji и MP-1 (модели лимфомы

Беркитта и острого лимфобластного лейкоза соответственно). Было показано, что экспрессия мРНК *SLAMF1* находится под контролем факторов транскрипции EBF1, SP1, STAT6, IRF4, NF- $\kappa$ B, ELF1, TCF3 и SPI1/PU.1, связывающихся с промоторной и энхансерными областями.

В настоящей работе представлены данные еще по двум энхансерным элементам локуса гена *SLAMF1* (далее энхансеры E и D), в которых локализованы два полиморфизма, rs3753381 и rs11265455, ассоциированные с аутоиммунными процессами. Мы изучили влияние каждого из этих полиморфизмов на экспрессию гена *SLAMF1* в В-клетках. Энхансер E, в составе которого присутствует полиморфизм rs3753381, находится в третьем интроне гена *SLAMF1*, а энхансер D – на расстоянии 1.5 т.п.н. перед кодирующей областью гена.

В результате исследования полиморфизмов локуса гена *SLAMF1* мы показали, что ни минорный, ни мажорный варианты полиморфизма rs11265455 практически не влияют на активность промотора *SLAMF1*, в то время как минорный вариант полиморфизма rs3753381 (энхансер E) повышает активность промотора *SLAMF1* более чем в 2 раза. Мы идентифицировали FOX, RXR и NFAT как семейства ядерных белков, связывание которых зависит от аллельного варианта rs3753381, и выдвинули предположение о конкретных членах этих семейств, специфичных для исследованных клеточных линий (HNF4G, RXRB и FOXO2 в MP-1, и NFATC2/3 и NR2C1 в Raji).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Клеточная культура и процедура трансфекции

Клетки MP-1 и Raji культивировали в питательной среде RPMI («ПанЭко») с добавлением 10% фетальной сыворотки телят, L-глутамина, антибиотиков, незаменимых аминокислот, HEPES и пирувата натрия. Трансфекцию проводили с использованием Neon Transfection System (Life Technologies, США) из расчета  $2 \times 10^6$  клеток MP-1 и  $7 \times 10^6$  клеток Raji на одну трансфекцию. Активность люциферазы анализировали через 24 ч с помощью Dual Luciferase Assay kit (Promega, США).

### Плазмидные конструкции

Генно-инженерные манипуляции проводили по стандартным методикам, использовали ферменты производства Fermentas/ThermoScientific (Литва). Для создания конструкций pGL3-rs3753381(G) и pGL3-rs11265455(A) последовательности энхансеров E и D соответственно были амплифицированы с праймерами, содержащими сайты рестрикции

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры, использованные в работе

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'-3'	Применение
E150-5Sal (for)	TTTTGTCGACCCCTGTACCTTATTCT	Аmplификация энхансера E и введение сайтов рестрикции SalI и BglII
E150-5BglII (rev)	TTTAGATCTATCCTTGCCTTAAGGC	
rs3753381-F	ATTTTTACAGAGTTTCACAGCTTCCAGA	Конструирование «rs3753381(A)»
rs3753381-R	CTGTGAACTCTGTA AAAAATGTTTACTTGGGA	
S1enh7F	AGAAGAATTTGGGGGCAGAGAGGACT	Аmplификация энхансера D и введение сайта рестрикции SalI
S1enh7SalR (rev)	AAAAGTCGACCCGCCCTTTTTCATGAGTTAAAC	
for G RXRA	TACGGATTTATCAGCTTCCAGAAAA	Конструирование «mut RXR G»
rev G RXRA	AAGCTGATAAATCCGTA AAAAATGT TTAC	
for A RXRA	TACAGATTTATCAGCTTCCAGAAAA	Конструирование «mut RXR A»
rev A RXRA	AGCTGATAAATCTGTA AAAAATGT TTAC	
for G FOXO3	CATTACAACGGAGTTTCACAGCTT	Конструирование «mut FOX G»
rev G FOXO3	CTCCGTTGTAATGTTTACTTGGATG	
for A FOXO3	CATTACAACAGAGTTTCACAGCTT	Конструирование «mut FOX A»
rev A FOXO3	CTCTGTTGTAATGTTTACTTGGATG	

SalI и BglII (только SalI в случае энхансера D), и затем клонированы в вектор WT SLAMF1 [35], расщепленный по сайтам BamHI–NcoI вместе с фрагментом вектора pGL3-basic, расщепленным по сайтам SalI–NcoI. На базе конструкций pGL3-rs3753381(G) и pGL3-rs11265455(A) были созданы конструкции с альтернативными вариантами соответствующих полиморфизмов – rs3753381(A) и rs11265455(G). Мутации в сайты связывания белков семейств RXR и FOX вносили с помощью направленного мутагеназа коровых последовательностей сайтов с использованием соответствующих праймеров. Мутагенез проводили при помощи двухступенчатой ПЦР, полученные конструкции очищали с помощью набора NucleoBond Xtra Midi Kit (Macherey-Nagel, Германия) и проверяли секвенированием по методу Сэнгера. Нуклеотидные последовательности праймеров представлены в табл. 2.

**Биоинформатический анализ сайтов связывания**

Геномные сегменты в окрестности полиморфизмов rs3753381 и rs11265455 локуса гена SLAMF1 анализировали с использованием общедоступных данных ChIP-Seq, полученных для В-лимфобластоидной клеточной линии GM12878 и представленных в сервисе UCSC Genome Browser [36]. В качестве признаков регуляторных элементов мы рассматривали наличие области ацетилирования Lys27 в гистоне 3 (H3K27Ac) [37]; высокую чувствительность к ДНКазе I [38] по данным DNase-Seq проекта ENCODE для клеточной линии GM12878, схожей по этиологии с клеточными линиями MP-1 и Raji; и наличие экспериментально определенных участков связы-

вания факторов транскрипции [39]. Предсказание сайтов связывания транскрипционных факторов, перекрывающихся с позициями полиморфизмов, осуществлено с использованием коллекции мотивов HOCOMO3 [40]. Влияние аллельных вариантов на предсказанную аффинность связывания оценивали с помощью программы PERFECTOS-APE [41] с настройками по умолчанию.

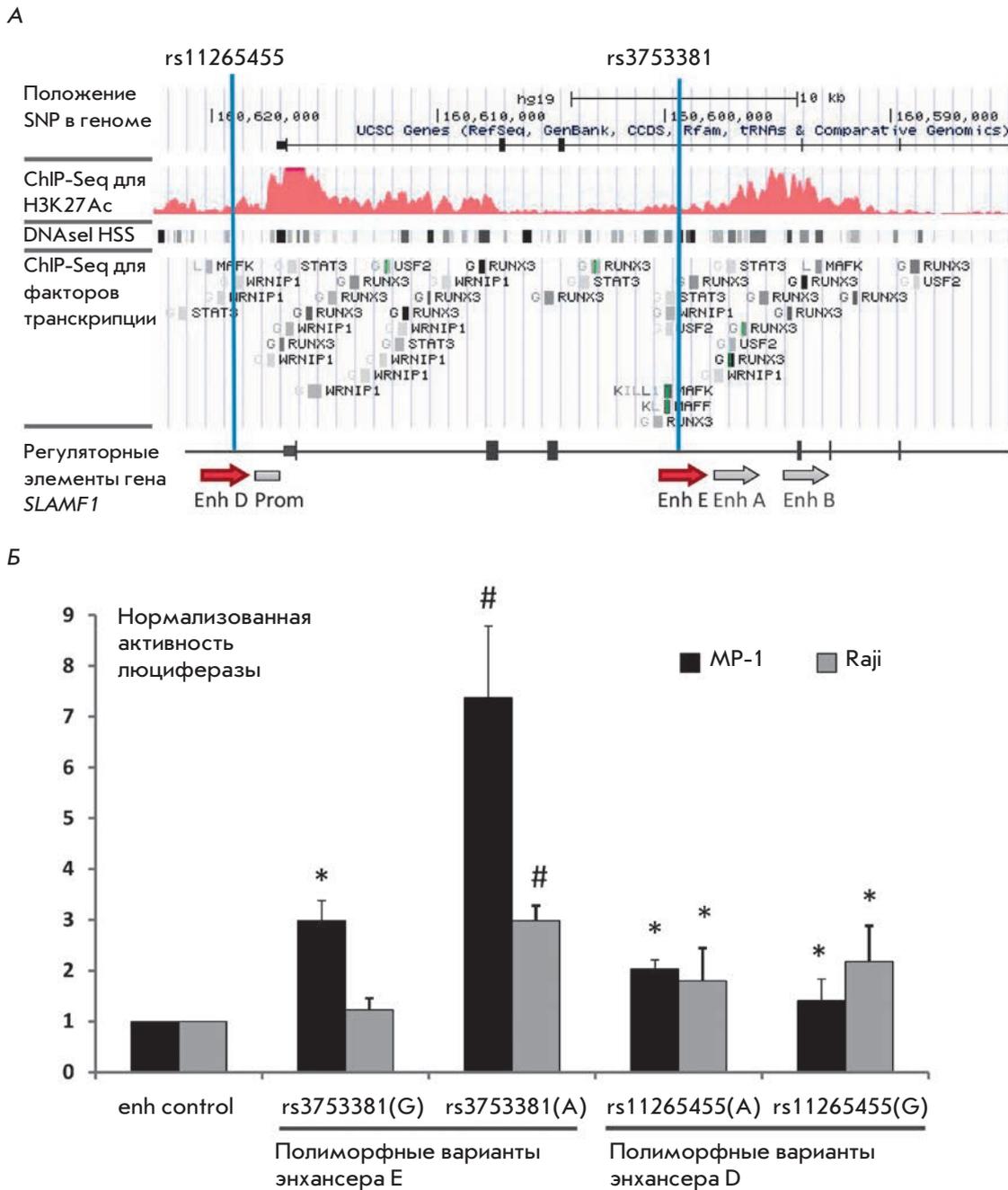
**Анализ дифференциальной экспрессии генов**

Образцы MP-1 и Raji, проанализированные в нашей работе, получены в [35]. Прочтения, полученные в результате секвенирования, доступны в Архиве коротких прочтений NCBI (NCBI Sequence Read Archive), идентификационный номер проекта PRJNA313457.

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

**Минорный вариант полиморфизма rs3753381 увеличивает активность энхансера SLAMF1**

Ранее мы описали промотор и три энхансера гена SLAMF1 – A, B и C, признаки регуляторных элементов в которых были ярко выражены [35] (рис. 1А, показаны энхансеры A и B, обозначены серыми стрелками). В нашей работе мы выбрали еще две предполагаемые регуляторные области для анализа возможного влияния изучаемых полиморфизмов на регуляцию экспрессии SLAMF1: полиморфизм rs3753381 входит в состав предполагаемого энхансера E (третий интрон SLAMF1), а полиморфизм rs11265455 находится в предполагаемом энхансере D – на расстоянии 1500 п.н. перед кодирующей областью гена (рис. 1А, показаны красными стрелка-



**Рис. 1.** Анализ предполагаемых энхансеров в локусе гена *SLAMF1*. **A** – схематическая карта расположения регуляторных элементов локуса *SLAMF1*. Серыми стрелками показаны энхансеры А и В, описанные нами ранее [35], толстыми черными линиями – экзоны гена *SLAMF1*, тонкими – интроны. Красная гистограмма – уровень ацетилирования H3K27, прямоугольниками отмечены области гиперчувствительности к ДНКазе I и области связывания транскрипционных факторов по данным анализа ChIP-Seq проекта ENCODE. Вертикальными синими линиями схематично обозначено расположение полиморфизмов rs3753381 и rs11265455. **Б** – влияние аллельных вариантов полиморфизмов rs3753381 и rs11265455 на активность энхансеров Е и D. Столбики соответствуют экспрессии гена-репортера в клеточных линиях MP-1 и Raji, нормализованной относительно конструкции, содержащей контрольный фрагмент без энхансерной активности [35]. Представленные данные получены из трех или более независимых экспериментов со средними значениями с учетом стандартной ошибки. «\*» обозначает статистически достоверное отличие от контрольной конструкции; «#» – статистически значимое отличие конструкции, содержащей минорный вариант полиморфизма rs3753381, от конструкции, содержащей последовательность с мажорным вариантом ( $P < 0.05$ , согласно *t*-критерию Стьюдента). Enh – энхансер; Prom – промотор

ми). Эти регуляторные элементы были клонированы в два этапа (см. «Экспериментальную часть») в вектор WT *SLAMF1* [35]. Все конструкции стимулировали активность промотора *SLAMF1*, что подтверждает функцию D и E как возможных энхансеров транскрипции.

Далее в последовательности энхансерных элементов D и E были введены единичные замены таким образом, чтобы заменить последовательности полиморфизмов rs11265455 и rs3753381 альтернативными вариантами, ассоциированными с развитием сахарного диабета типа 2 и миастении гравис соответственно (см. табл. 1).

Оба предполагаемых энхансерных элемента увеличивают активность промотора *SLAMF1* (см. рис. 1Б) по сравнению с ранее описанной [35] контрольной последовательностью, длина которой соответствует тестируемому энхансерным элементам, но не обогащена сайтами связывания транскрипционных факторов и меткой ацетилирования H3K27. Примечательно, что активность энхансера E в клеточной линии MP-1 была существенно выше, чем в линии Raji, а активность энхансера D оказалась невысокой и была примерно одинакова в обеих клеточных линиях. Поскольку данные клеточные линии имеют схожую степень зрелости и этиологию, различия в активности предполагаемых энхансерных элементов, по-видимому, можно объяснить различием в профилях экспрессии транскрипционных факторов в MP-1 и Raji.

На рис. 1Б показано, что присутствие минорного варианта полиморфизма rs3753381 увеличивает активность энхансера E в обеих клеточных линиях, а минорный вариант полиморфизма rs11265455 не оказывает значимого влияния на активность промотора *SLAMF1* ни в одной из изученных линий. Поэтому мы продолжили изучать только влияние полиморфизма rs3753381 на экспрессию гена *SLAMF1*.

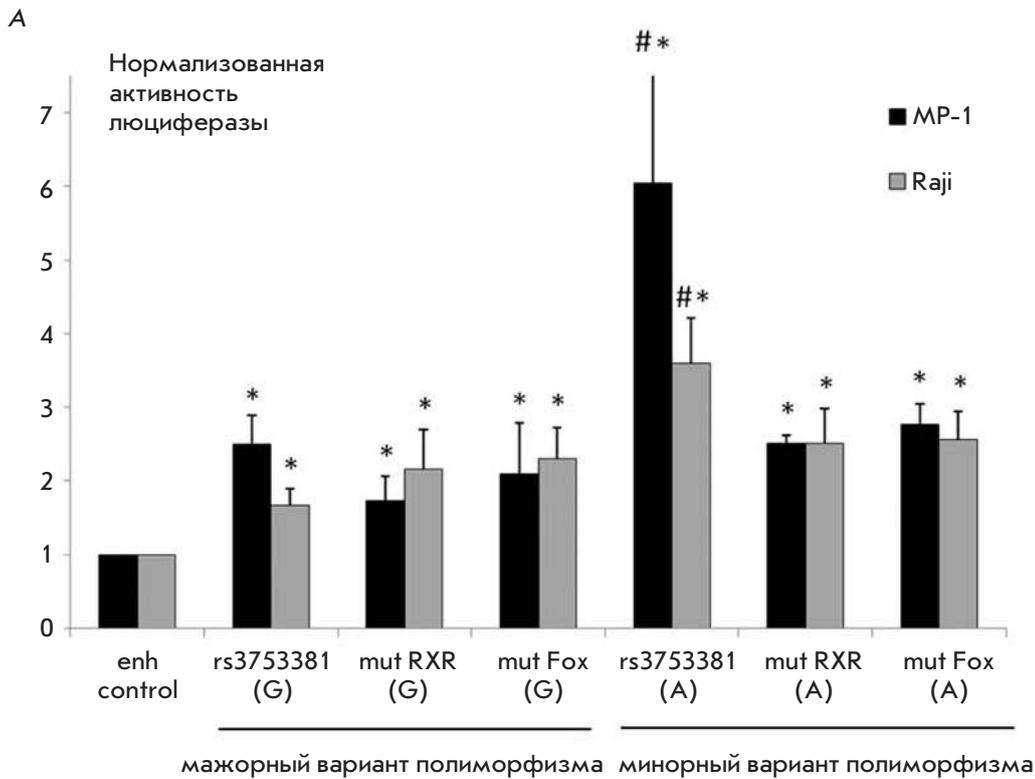
### Мутации сайтов связывания факторов транскрипции RXR и FOX угнетают активность энхансера E в случае минорного варианта полиморфизма rs3753381

Для объяснения значительного увеличения активности энхансера E при введении минорного варианта (A) полиморфизма rs3753381 был проведен биоинформатический анализ сайтов связывания факторов транскрипции, на которые мог повлиять изучаемый полиморфизм. С помощью программы PERFECTOS-APE мы провели анализ сайтов, перекрывающихся с rs3753381 и зависимых от изменения аллельного варианта. Было установлено, что с областью полиморфизма rs3753381 могут связываться различные ядерные белки семейств NFAT, RXR и FOX, и их

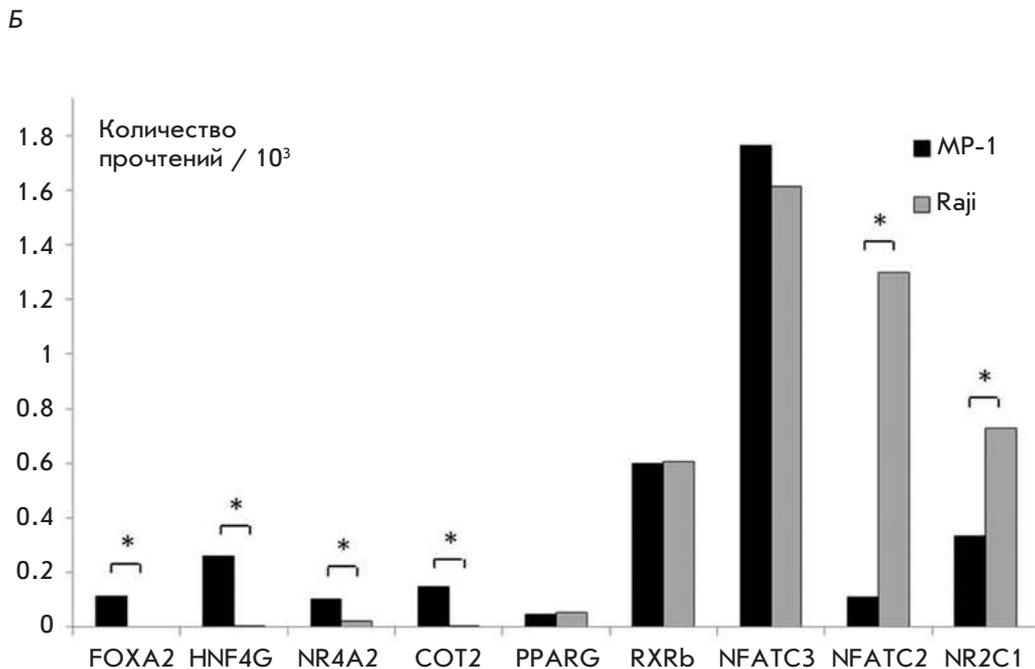
сайты связывания сильнее в случае минорного варианта (A). Предсказанные сайты были мутированы, а эффекты мутаций проверены в системе с геном-репортером (рис. 2А).

Мутации сайтов связывания ядерных белков семейств RXR и FOX значительно снижают активность энхансера относительно минорного варианта rs3753381. Для уточнения результатов мутагенеза mut FOX и mut RXR был проведен детальный биоинформатический анализ последовательности rs3753381 и области 20 п.н. до и после изучаемого полиморфизма. Были выбраны наиболее достоверные модели сайтов связывания из базы данных HOCOMOCS и с помощью PERFECTOS-APE проведен совместный анализ всех шести вариантов последовательности. Были отфильтрованы только предсказанные сайты с P-значением не хуже 0.001 для дикого типа последовательности с аллелем 'A'. Затем были рассмотрены только предсказания, в которых аффинность уменьшалась либо не изменялась у всех альтернативных вариантов последовательности (т.е. для аллеля 'G' либо внесенных мутаций). Для дальнейшего анализа были выбраны только белки, экспрессирующиеся в клеточных линиях MP-1 и Raji по данным экспрессионного профилирования (рис. 2Б, рис. 3).

В клеточной линии MP-1 активно экспрессируются HNF4G, NR4A2, COT2 и PPARG, что может объяснять значительное уменьшение активности энхансера E при повреждении сайтов связывания вышеописанных факторов вследствие мутации mut RXR (рис. 2А, конструкции mut RXR (A) и mut RXR (G)). В клеточной линии Raji высоко экспрессируются белки RXRB и NR2C1, чьи сайты связывания могут быть затронуты мутацией mut RXR, следовательно, нарушение связывания каждого из них может вносить свой вклад в уменьшение активности энхансера E. Из факторов семейства FOX, сайты которых могут быть разрушены соответствующей мутацией, в клеточной линии MP-1 активно экспрессируется FOXA2. В клеточной линии Raji экспрессируются белки семейства NFAT (NFATC2 и NFATC3), потенциально связывающие этот же участок. Также имеются основания предполагать, что каждая из мутаций: mut FOX(A), mut FOX(G), mut RXR(A) и mut RXR(G) затрагивает сайт связывания HNF4G, и именно это обуславливает падение активности энхансера E в перечисленных конструкциях в линии MP-1. Суммируя данные о мутациях mut RXR и mut FOX, можно предположить, что при мутации mut RXR может происходить нарушение связывания HNF4G, RXRB, NR4A2, COT2 и PPARG в MP-1, и RXRB и NR2C1 в Raji; а в случае мутации mut FOX – HNF4G и FOXA2 в MP-1, и NFATC2, NFATC3 в Raji. Таким



**Рис. 2.** Влияние аллельных вариантов полиморфизма rs3753381 на связывание транскрипционных факторов. **А** – влияние мутаций сайтов связывания RXR и FOX на активность энхансера E. Обозначения как на рис. 1Б. **Б** – экспрессия транскрипционных факторов, на эффективность связывания которых могли повлиять мутации mut RXR и mut FOX. Столбики соответствуют нормализованному количеству прочтений, полученных в результате экспрессионного профилирования клеточных линий MP-1 и Raji. «\*» обозначает значимое различие между образцами (FDR < 0.05)



образом, можно сделать вывод, что при изменении главного варианта полиморфизма rs3753381(G) на минорный rs3753381(A) может изменяться связывание транскрипционных факторов семейств RXR, FOX и NFAT, отличающихся в случае клеточных линий MP-1 и Raji. База мотивов HOCOMOCS покрывает только 600 более чем из 1500 факторов [42]

транскрипции человека. Нельзя исключить связывания с полиморфной областью энхансера и других членов описываемых семейств.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленной работе показана функциональная значимость полиморфизмов локуса *SLAMF1*,

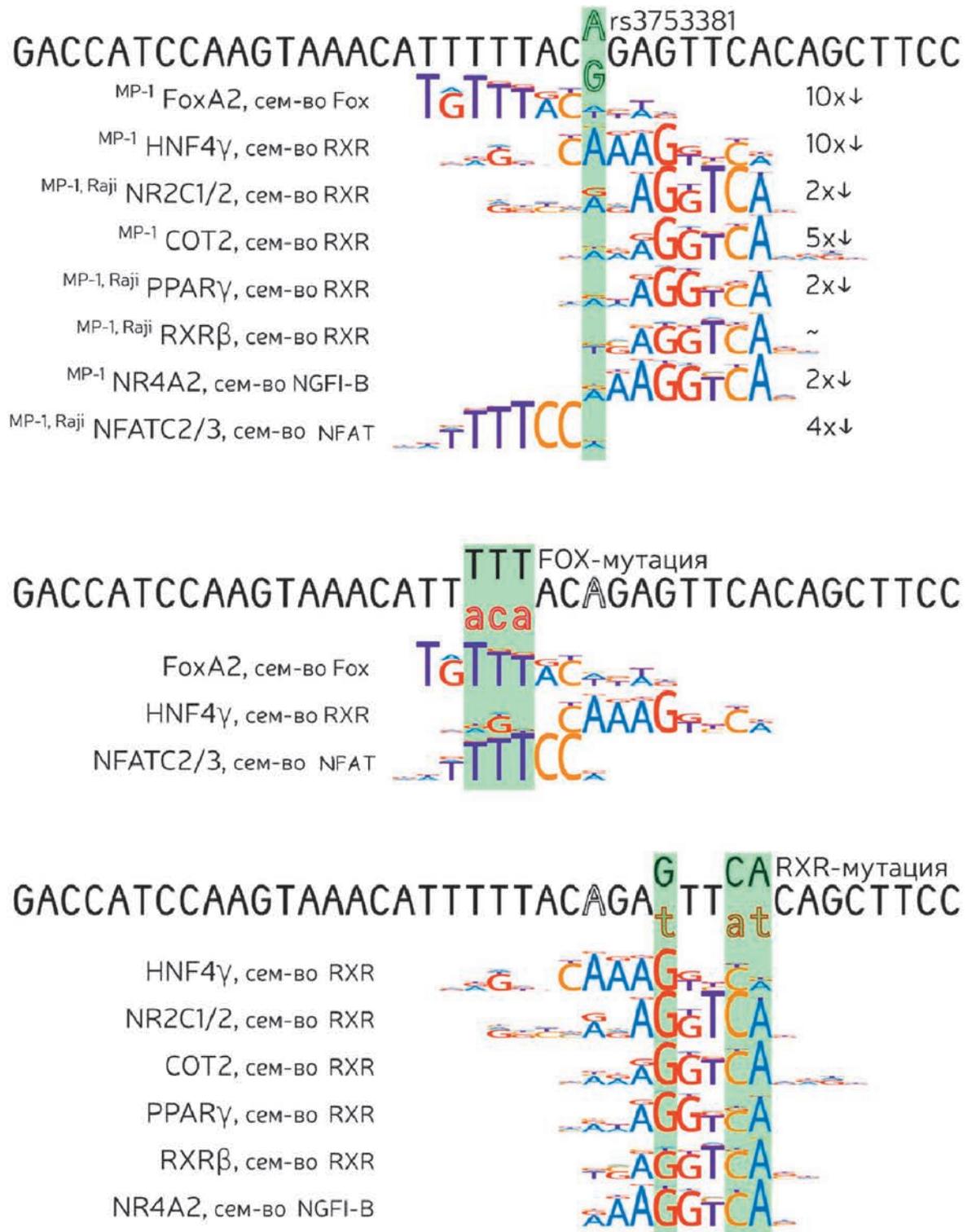


Рис. 3. Изменение ожидаемой эффективности связывания различных транскрипционных факторов при мутации сайтов связывания RXR и FOX и альтернативных вариантах полиморфизма rs3753381. Названия и визуализация сайтов связывания факторов расположены под соответствующим фрагментом последовательности энхансера E. Также указаны предсказанные изменения аффинности сайтов связывания, вызванные сменой аллельного варианта (G > A)

ассоциированных с аутоиммунными процессами, что указывает на возможную связь полиморфизмов rs3753381 и rs11265455 с регуляцией экспрессии гена *SLAMF1*. Используя экспериментальную модель В-лимфобластоидных клеточных линий человека, выявлена взаимосвязь между минорным вариантом rs3753381 и увеличением активности энхансера *SLAMF1* более чем в 2 раза. При использовании биоинформатического анализа последовательностей минорных и мажорных вариантов полиморфизмов предсказано, что транскрипционные факторы семейства FOX и NFAT и ядерные рецепторы семейства

RXR могут участвовать в повышении активности энхансера элемента E в случае минорного варианта полиморфизма rs3753381. Показано, что мутация предсказанных сайтов связывания снижает активность энхансера E, содержащего минорный вариант полиморфизма rs3753381. Также установлено, что изменение аллельного варианта полиморфизма rs11265455 не оказывает значимого воздействия на экспрессию *SLAMF1*. ●

Работа поддержана грантом РФФ  
(№ 14-14-01140).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Cannons J.L., Tangye S.G., Schwartzberg P.L. // *Annu. Rev. Immunol.* 2011. V. 29. P. 665–705.
- Sidorenko S.P., Clark E.A. // *Nat. Immunol.* 2003. V. 4. № 1. P. 19–24.
- Cocks B.G., Chang C.C., Carballido J.M., Yssel H., de Vries J.E., Aversa G. // *Nature.* 1995. V. 376. № 6537. P. 260–263.
- Bleharski J.R., Niazi K.R., Sieling P.A., Cheng G., Modlin R.L. // *J. Immunol.* 2001. V. 167. № 6. P. 3174–3181.
- Kiel M.J., Yilmaz O.H., Iwashita T., Yilmaz O.H., Terhorst C., Morrison S.J. // *Cell.* 2005. V. 121. № 7. P. 1109–1121.
- Aversa G., Carballido J., Punnonen J., Chang C.C., Hauser T., Cocks B.G., de Vries J.E. // *Immunol. Cell Biol.* 1997. V. 75. № 2. P. 202–205.
- Punnonen J., Cocks B.G., Carballido J.M., Bennett B., Peterson D., Aversa G., de Vries J.E. // *J. Exp. Med.* 1997. V. 185. № 6. P. 993–1004.
- Berger S.B., Romero X., Ma C., Wang G., Faubion W.A., Liao G., Compeer E., Keszei M., Rameh L., Wang N., et al. // *Nat. Immunol.* 2010. V. 11. № 10. P. 920–927.
- Berrih-Aknin S., Ragheb S., Le Panse R., Lisak R.P. // *Autoimmunity Rev.* 2013. V. 12. № 9. P. 885–993.
- Keszei M., Latchman Y.E., Vanguri V.K., Brown D.R., Detre C., Morra M., Arancibia-Carcamo C.V., Paul E., Calpe S., Castro W., et al. // *Internat. Immunol.* 2011. V. 23. № 2. P. 149–158.
- Huang Y.H., Tsai K., Ma C., Vallance B.A., Priatel J.J., Tan R. // *J. Immunol.* 2014. V. 193. № 12. P. 5841–5853.
- Snow A.L., Marsh R.A., Krummey S.M., Roehrs P., Young L.R., Zhang K., van Hoff J., Dhar D., Nichols K.E., Filipovich A.H., et al. // *J. Clin. Invest.* 2009. V. 119. № 10. P. 2976–2689.
- Kumar K.R., Li L., Yan M., Bhaskarabhatla M., Mobley A.B., Nguyen C., Mooney J.M., Schatzle J.D., Wakeland E.K., Mohan C. // *Science.* 2006. V. 312. № 5780. P. 1665–1669.
- Wang A., Batteux F., Wakeland E.K. // *Curr. Opin. Immunol.* 2010. V. 22. № 6. P. 706–714.
- Margraf S., Garner L.I., Wilson T.J., Brown M.H. // *Immunology.* 2015. V. 146. № 3. P. 392–400.
- Cunningham Graham D.S., Vyse T.J., Fortin P.R., Montpetit A., Cai Y.C., Lim S., McKenzie T., Farwell L., Rhodes B., Chad L., et al. // *Genes Immunity.* 2008. V. 9. № 2. P. 93–102.
- van den Reek J.M., Coenen M.J., van de L'Isle Arias M., Zweegers J., Rodijk-Olthuis D., Schalkwijk J., Vermeulen S.H., Joosten I., van de Kerkhof P.C., Seyger M.M., et al. // *Br. J. Dermatol.* 2017. V. 176. № 5. P. 1288–1296.
- Suzuki A., Yamada R., Kochi Y., Sawada T., Okada Y., Matsuda K., Kamatani Y., Mori M., Shimane K., Hirabayashi Y., et al. // *Nat. Genet.* 2008. V. 40. № 10. P. 1224–1229.
- Furukawa H., Kawasaki A., Oka S., Shimada K., Matsui T., Ikenaka T., Hashimoto A., Okazaki Y., Takaoka H., Futami H., et al. // *Lupus.* 2013. V. 22. № 5. P. 497–503.
- Tabassum R., Mahajan A., Dwivedi O.P., Chauhan G., Spurgeon C.J., Kumar M.V., Ghosh S., Madhu S.V., Mathur S.K., Chandak G.R., et al. // *J. Hum. Genet.* 2012. V. 57. № 3. P. 184–190.
- Na S.J., Lee J.H., Kim S.W., Kim D.S., Shon E.H., Park H.J., Shin H.Y., Kim S.M., Choi Y.C. // *Yonsei Med. J.* 2014. V. 55. № 3. P. 660–668.
- Winer D.A., Winer S., Shen L., Wadia P.P., Yantha J., Paltser G., Tsui H., Wu P., Davidson M.G., Alonso M.N., et al. // *Nature Medicine.* 2011. V. 17. № 5. P. 610–617.
- Lee H.M., Kim J.J., Kim H.J., Shong M., Ku B.J., Jo E.K. // *Diabetes.* 2013. V. 62. № 1. P. 194–204.
- Brooks-Worrell B., Palmer J.P. // *Clin. Exp. Immunol.* 2012. V. 167. № 1. P. 40–46.
- Theodorakopoulou E., Yiu Z.Z., Bundy C., Chularojanamontri L., Gittins M., Jamieson L.A., Motta L., Warren R.B., Griffiths C.E. // *Br. J. Dermatol.* 2016. V. 175. № 5. P. 1038–1044.
- Donath M.Y., Shoelson S.E. // *Nat. Rev. Immunol.* 2011. V. 11. № 2. P. 98–107.
- Kaya G.A., Coskun A.N., Yilmaz V., Oflazer P., Gulsen-Parman Y., Aysal F., Disci R., Direskeneli H., Marx A., Deymeer F., et al. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 8. P. e104760.
- Ramanujam R., Zhao Y., Pirskanen R., Hammarstrom L. // *BMC Med. Genet.* 2010. V. 11. P. 147.
- Richman D.P., Gomez C.M., Berman P.W., Burres S.A., Fitch F.W., Arnason B.G. // *Nature.* 1980. V. 286. № 5774. P. 738–739.
- Shigemoto K., Kubo S., Maruyama N., Hato N., Yamada H., Jie C., Kobayashi N., Mominoki K., Abe Y., Ueda N., et al. // *J. Clin. Invest.* 2006. V. 116. № 4. P. 1016–1024.
- Gajra A., Vajpayee N., Grethlein S.J. // *Am. J. Hematol.* 2004. V. 77. № 2. P. 196–197.
- Gregersen P.K., Kosoy R., Lee A.T., Lamb J., Sussman J., McKee D., Sempendorfer K.R., Pirskanen-Matell R., Piehl F., Pan-Hammarstrom Q., et al. // *Ann. Neurol.* 2012. V. 72. № 6. P. 927–935.
- van der Vliet H.J., von Blomberg B.M., Nishi N., Reijm M., Voskuyl A.E., van Bodegraven A.A., Polman C.H., Rustemeyer T., Lips P., van den Eertwegh A.J., et al. // *Clin. Immunol.* 2001. V. 100. № 2. P. 144–148.
- Jordan M.A., Fletcher J.M., Jose R., Chowdhury S., Gerlach N., Allison J., Baxter A.G. // *J. Immunol.* 2011. V. 186. № 7. P. 3953–3965.
- Schwartz A.M., Putlyaeva L.V., Covich M., Klepikova A.V., Akulich K.A., Vorontsov I.E., Korneev K.V., Dmitriev S.E., Polanovsky O.L., Sidorenko S.P., et al. // *Biochim. Biophys.*

- Acta. 2016. V. 1859. № 10. P. 1259–1268.
36. Rosenbloom K.R., Armstrong J., Barber G.P., Casper J., Clawson H., Diekhans M., Dreszer T.R., Fujita P.A., Guruvadoo L., Haeussler M., et al. // Nucl. Acids Res. 2015. V. 43. Database issue. P. D670–681.
37. Creighton M.P., Cheng A.W., Welstead G.G., Kooistra T., Carey B.W., Steine E.J., Hanna J., Lodato M.A., Frampton G.M., Sharp P.A., et al. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2010. V. 107. № 50. P. 21931–21936.
38. Thurman R.E., Rynes E., Humbert R., Vierstra J., Maurano M.T., Haugen E., Sheffield N.C., Stergachis A.B., Wang H., Vernot B., et al. // Nature. 2012. V. 489. № 7414. P. 75–82.
39. Smith E., Shilatifard A. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2014. V. 21. № 3. P. 210–219.
40. Kulakovskiy I.V., Vorontsov I.E., Yevshin I.S., Soboleva A.V., Kasianov A.S., Ashoor H., Ba-Alawi W., Bajic V.B., Medvedeva Y.A., Kolpakov F.A., et al. // Nucl. Acids Res. 2016. V. 44. № D1. P. D116–125.
41. Vorontsov E., Kulakovskiy I., Khimulya G., Nikolaeva D., Makeev V // BIOINFORMATICS 2015. V. 1. International Conference on Bioinformatics Models, Methods and Algorithms (BIOSTEC 2015). P. 102–108.
42. Wingender E., Schoeps T., Donitz J. // Nucl. Acids Res. 2013. V. 41. Database issue. P. D165–D170.

УДК 577.27

# Влияние рекомбинантного адресного токсина DARPin-PE40 на динамику роста HER2-положительных опухолей

Е. А. Соколова<sup>1,2\*</sup>, Г. М. Прошкина<sup>1\*</sup>, О. М. Кутова<sup>2</sup>, И. В. Балалаева<sup>1,2</sup>, С. М. Деев<sup>1,2,3</sup><sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10<sup>2</sup>Национальный исследовательский Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, 603950, Нижний Новгород, просп. Гагарина, 23<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 12

\*E-mail: malehanova@mail.ru, gmb@ibch.ru

Поступила в редакцию 06.06.2017

Принята к печати 04.09.2017

**РЕФЕРАТ** Разработка адресных токсинов на основе направляющих молекул неиммуноглобулиновой природы представляется актуальной для развития таргетной терапии злокачественных новообразований с высокой экспрессией рецептора-онкомаркера HER2. Ранее на ксенографтной модели HER2-положительной аденокарциномы нами было показано, что адресный токсин DARPin-PE40, содержащий HER2-специфичный полипептид неиммуноглобулиновой природы в качестве направляющего модуля и фрагмент псевдомонадного экзотоксина А в качестве токсического модуля, проявляет противоопухолевый эффект *in vivo*. В данной работе проведен углубленный анализ влияния DARPin-PE40 на динамику роста ксенографтных опухолей у мышей. Показано, что воздействие DARPin-PE40 в дозе 25 и 50 мкг/животное приводит к замедлению роста опухоли, а в дозе 80 мкг/животное вызывает сокращение опухолевого узла с последующим возобновлением роста по окончании терапии. Оценка динамики роста опухолей выявила статистически значимые различия в объеме опухолей у мышей опытных групп по сравнению с контрольной. Полученные результаты свидетельствуют о перспективности использования адресного токсина в качестве агента для таргетной терапии опухолей, сверхэкспрессирующих HER2.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** неиммуноглобулиновый модуль DARPin, псевдомонадный экзотоксин А, рецептор HER2, таргетная терапия.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** DARPin – искусственный белок с анкириновыми повторами (Designed Ankyrin Repeat Protein); EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота; HER 1–4 – рецепторы 1–4 семейства рецептора эпидермального фактора роста человека (human epidermal growth factor receptor 1–4); Ni<sup>2+</sup>-NTA – нитрилотриуксусная кислота с иммобилизованными ионами никеля; PE40 – фрагмент псевдомонадного экзотоксина А (*Pseudomonas exotoxin A*); PMSF – фенолметилсульфонилфторид; а.о. – аминокислотный остаток (при числе).

## ВВЕДЕНИЕ

Рак молочной железы согласно статистическим данным МНИОИ им. П.А. Герцена Минздрава России за 2015 год является ведущим по частоте встречаемости злокачественных заболеваний у женщин и составляет 20.9% от общего количества ежегодно выявляемых новообразований [1]. Рак молочной железы также занимает печально лидирующее место по смертности от онкологических заболеваний среди женского населения России, и в 2015 году этот показатель составлял 17%. Что касается мировой статистики, то ежегодно в мире пример-

но у 1.6 млн женщин диагностируют рак молочной железы, и примерно 500000 умирают от этого заболевания.

С учетом этих цифр, разработка новых противоопухолевых агентов и новых подходов к терапии онкологических заболеваний является актуальной задачей. Большое развитие в последнее время получила таргетная, или адресная, терапия. Этот подход предполагает нацеленное воздействие на опухолевые клетки за счет использования специфических бифункциональных терапевтических агентов, способных, с одной стороны, избирательно связываться

с опухолевыми клетками, а с другой – эффективно элиминировать их [2].

Одна из наиболее изученных терапевтических мишеней – рецептор HER2 семейства рецептора эпидермального фактора роста человека [3, 4]. Тирозинкиназный рецептор HER2 в норме присутствует во всех типах эпителиальных тканей человека, и его плотность составляет несколько тысяч молекул на клетку. Амплификация гена *HER2* при злокачественной трансформации клетки приводит к сверхэкспрессии кодируемого им рецептора, при этом рецептор HER2 обретает способность к конститутивной гетеродимеризации с другими рецепторами семейства (HER1, HER3, HER4). Непрерывная передача сигнала от мембраны к ядру приводит к повышению клеточной пролиферации, ингибированию апоптоза и, в конечном итоге, к формированию опухоли и метастазированию. Известно, что в 15–20% опухолей молочной железы и рака яичника человека повышен уровень экспрессии гена *HER2* [3, 5].

Одним из наиболее эффективных белковых токсинов, используемых в адресной терапии, является экзотоксин *Pseudomonas aeruginosa* [6]. Псевдомонадный экзотоксин представляет собой трехдоменный белок, состоящий из 613 а.о. Мы заменили первый домен экзотоксина (1–252 а.о.), отвечающий за связывание токсина с природным рецептором, на HER2-специфичный неиммуноглобулиновый модуль DARPIn [7], превратив таким образом экзотоксин в токсин направленного действия. Новый класс адресных молекул неиммуноглобулиновой природы на основе искусственных белков с анкириновыми повторами – DARPins (Designed Ankyrin Repeat Proteins), все шире и шире используется в молекулярно-биологических исследованиях в качестве адресных модулей [8–10]. DARPins не содержат остатков цистеина, что позволяет продуцировать эти белки непосредственно в цитоплазме *Escherichia coli*, отличаются высоким уровнем экспрессии в бактериальной системе, представлены мономерами в растворе, не склонны к агрегации и характеризуются высокой устойчивостью к протеазам [11]. Перечисленные особенности дают каркасным белкам значительные преимущества перед иммуноглобулинами в качестве альтернативных адресных компонентов в составе мультифункциональных соединений, предназначенных для диагностики и терапии различных заболеваний.

Нами проведен анализ динамики противоопухолевого эффекта адресного токсина на основе фрагмента псевдомонадного экзотоксина А и HER2-специфичного каркасного белка DARPIn *in vivo* на ксенографтной модели аденокарциномы молочной железы человека с высокой экспрессией рецептора-мишени HER2.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Получение высокоочищенного препарата адресного токсина DARPIn-PE40 для *in vivo* исследований

Ген *DARPIn-PE40* экспрессировали в клетках штамма *E. coli* BL21(DE3) как описано в [12]. Свежевыращенные трансформанты (из расчета 1 колония на 1 мл среды) вносили в 25 мл автоиндукционной среды TBP-5052 [13], содержащей 2 мМ MgSO<sub>4</sub>, 25 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 25 мМ KH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 50 мМ NH<sub>4</sub>Cl, 0.5% глицерина, 0.05% глюкозы, 0.2% лактозы, 0.5% дрожжевого экстракта, 1% триптона, 0.1 г/л ампициллина, и растили в 250-мл колбе в течение 24 ч при 25°C до достижения культурой оптической плотности OD<sub>600</sub> = 20–25. Клетки осаждали центрифугированием на охлажденной центрифуге при 6000 g в течение 10 мин. Осадок ресуспендировали в 10 мл буфера для лизиса (200 мМ Трис-НСl, 500 мМ сахароза, 1 мМ EDTA, pH 8.0, 60 мкг/мл лизоцима). Полученную суспензию разбавляли стерильной водой, инкубировали в течение 30 мин при комнатной температуре. Затем клетки помещали на ледяную баню и разрушали с использованием звукового дезинтегратора Vibra Cell (Sonic, США) в режиме – 10 с обработка ультразвуком, 10 с охлаждение, всего 30 циклов. Клеточный дебрис удаляли центрифугированием при 15000 g в течение 20 мин на охлажденной центрифуге. К осветленному супернатанту добавляли ингибитор протеаз PMSF (1 мМ) и 100 мМ NaCl. Для удаления нуклеиновых кислот к лизату при постоянном помешивании добавляли по каплям полиэтиленимин до конечной концентрации 0.03%. После добавления полиэтиленимина лизат перемешивали в течение 15 мин при 4°C, центрифугировали в течение 20 мин при 15000 g. Полученный лизат фильтровали через фильтр 0.22 мкм, добавляли имидазол (до конечной концентрации 30 мМ) и NaCl (500 мМ) и наносили на колонку Ni<sup>2+</sup>-NTA (GE Healthcare, США), предварительно уравновешенную буфером: 20 мМ Na-Pi, pH 7.5, 500 мМ NaCl, 30 мМ имидазол. Целевой белок DARPIn-PE40 элюировали, используя линейный градиент имидазола (30–500 мМ). Пик, сошедший с колонки при ~150 мМ имидазола, использовали для очистки с использованием ионообменной хроматографии. Белок переводили в буфер, содержащий 20 мМ Трис-НСl, pH 8.0, 150 мМ NaCl, с использованием колонки PD10 (GE Healthcare, США). Раствор белка разбавляли в 3 раза буфером 20 мМ Трис-НСl, pH 8.0 и наносили на колонку MonoQ5/50 GL (GE Healthcare, США), уравновешенную буфером 20 мМ Трис-НСl, pH 8.0. Для элюции белка использовали линейный градиент NaCl (0–1 М). DARPIn-PE40 элюировался с колонки при концентрации NaCl, рав-

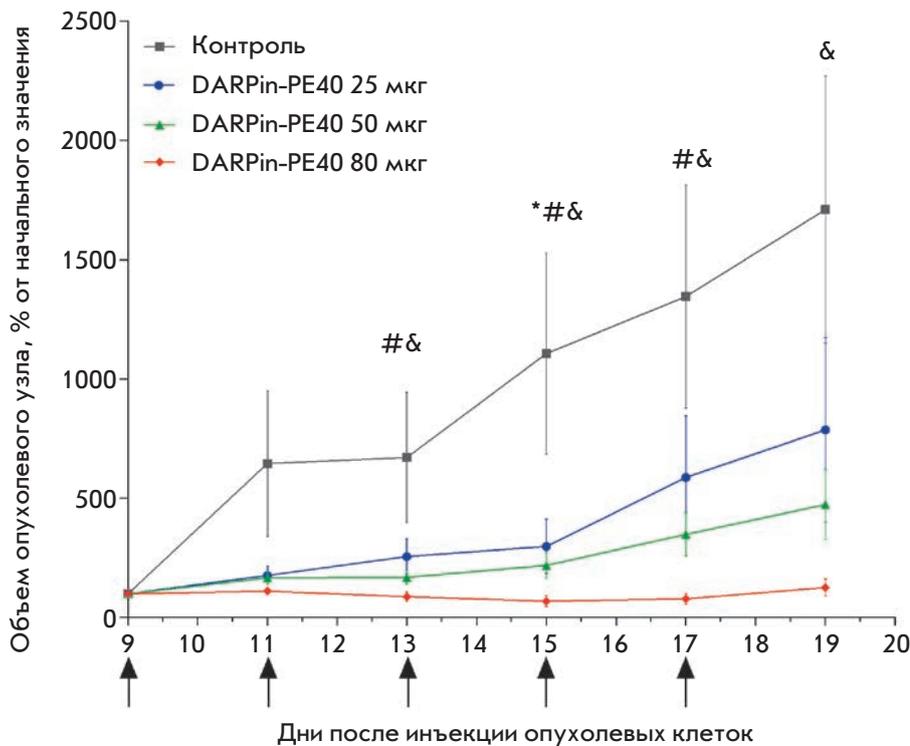


Рис. 1. Кривые роста ксенографтных опухолей SK-BR-3 у животных разных групп. За день 0 принят день подкожной инъекции клеток SK-BR-3 мышам. Дни инъекций DARPin-PE40 обозначены стрелками. \*, #, & – статистически значимое различие между контрольной и опытными группами: 25, 50 и 80 мкг DARPin-PE40 соответственно ( $p < 0.05$ , критерий Даннета,  $n = 5$ )

ной примерно 500 мМ. Выход целевого белка составил 140 мг на 1 л культуры.

### Оценка противоопухолевой эффективности DARPin-PE40 *in vivo*

Противоопухолевую активность определяли на ксенографтной опухоли человека. Бестимусным мышам линии BALB/c nude в возрасте 6–8 нед. вводили подкожно  $10^7$  клеток аденокарциномы молочной железы человека линии SK-BR-3 в 200 мкл фосфатно-солевого буфера. Сверхэкспрессию HER2 в опухолевой ткани подтверждали *ex vivo* методом иммуногистохимического анализа с использованием набора НерсерТест (Dako, США). Мониторинг роста опухоли проводили, используя стандартную методику определения размеров опухоли с помощью штангенциркуля, измеряя два диаметра. Объем опухоли рассчитывали по формуле:  $V = a \times b^2/2$ , где  $a$  – больший диаметр,  $b$  – меньший диаметр [14]. Начиная с 9 дня после инъекции опухолевых клеток, когда средний объем опухоли составлял  $\sim 100$  мм<sup>3</sup>, животных произвольным образом разделили на опытные и контрольную группы (по пять в каждой группе). Животным опытных групп через день вводили в хвостовую вену по 200 мкл DARPin-PE40 в фосфатно-солевом буфере в общей дозе 25 мкг/животное (пять инъекций по 5 мкг белка на 9, 11, 13, 15 и 17 дни), 50 мкг/животное (пять инъекций по 10

мкг белка на 9, 11, 13, 15 и 17 дни) или 80 мкг/животное (четыре инъекции по 20 мкг белка на 9, 11, 13 и 15 дни). Животным контрольной группы вводили по 200 мкл фосфатно-солевого буфера на 9, 11, 13, 15 и 17 дни после инъекции опухолевых клеток. При достижении опухолевым узлом объема  $\sim 2500$  мм<sup>3</sup> животных подвергали процедуре эвтаназии. Для построения кривых роста опухолей использовали рассчитанные значения объема опухоли, выраженные в процентах от значений на начальный момент времени (в день начала терапии). Данные представляли как среднее  $\pm$  стандартная ошибка среднего в каждой временной точке.

Для количественной оценки противоопухолевого эффекта начальную стадию кривой опухолевого роста у животных каждой группы описывали уравнением  $V = V_0 \times e^{kt}$ , где  $V_0$  – значение объема опухолевого узла в начальный момент времени, соответствующий началу терапии,  $k$  – коэффициент скорости роста опухоли. Значения  $k$  определяли путем линеаризации экспоненциальной фазы роста опухоли (логарифмирования значений объема опухоли) с последующей линейной аппроксимацией. Период удвоения опухоли рассчитывали по формуле  $\ln 2/k$ . Данные представляли с помощью диаграмм размаха, отражающих значения медианы, 25-го и 75-го перцентилей и разброса значений в каждой группе животных.

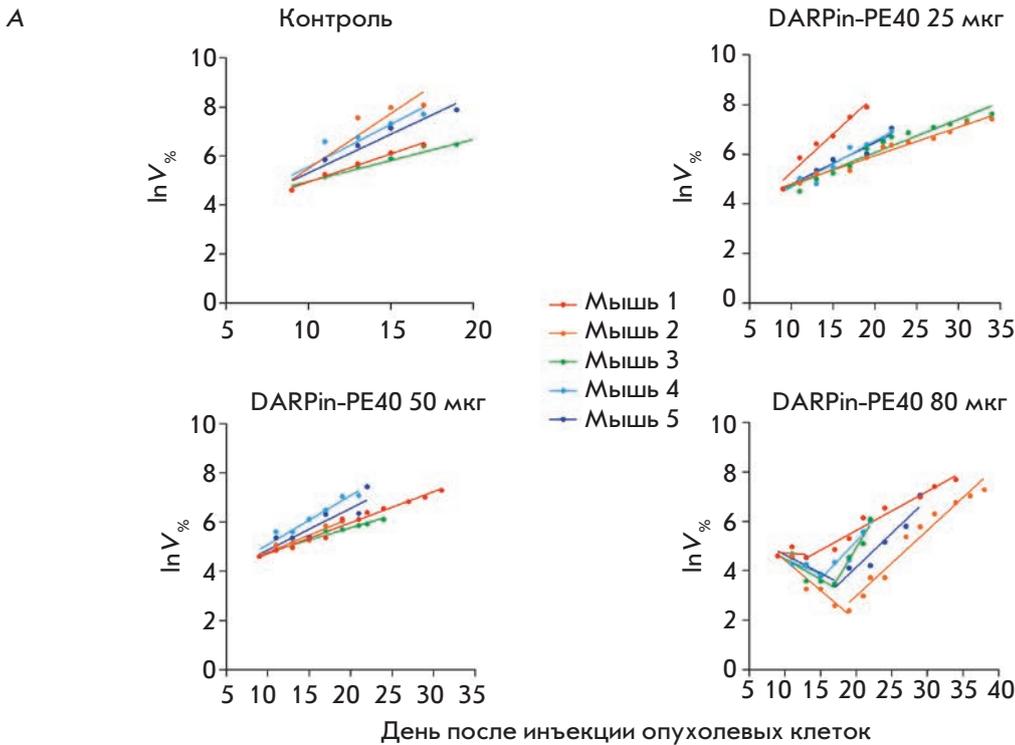
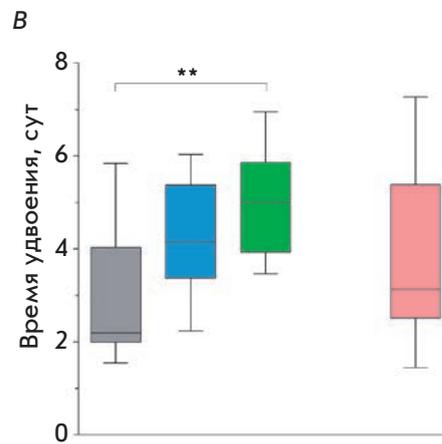
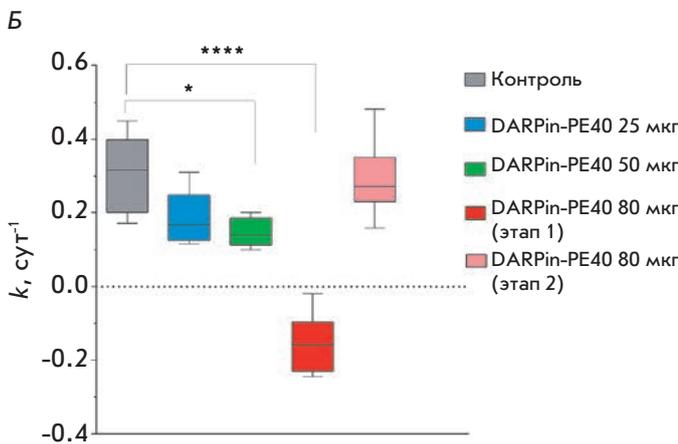


Рис. 2. Анализ роста ксенографтных опухолей SK-BR-3 у животных разных групп. А – линеаризация экспоненциальной фазы роста опухолей ( $V\%$  – значение объема опухоли в процентах от значения на момент начала терапевтического воздействия). Показаны данные для индивидуальных животных в каждой группе; Б – диаграмма значений коэффициента скорости роста опухоли  $k$ ; В – диаграмма размаха значений периода удвоения опухоли (\* $-p < 0.05$ , \*\* $-p < 0.01$ , \*\*\*\* $-p < 0.0001$ )



**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ**

На предыдущих этапах работы нами был создан и детально охарактеризован *in vitro* агент направленного действия для высокоэффективной таргетной терапии HER2-положительных опухолей – рекомбинантный адресный токсин DARPin-PE40. Данный агент обладает противоопухолевым эффектом, который выражается в торможении роста ксенографтных опухолей *in vivo* [15]. Адресный модуль в данной конструкции представлен молекулой неиммуноглобулиновой природы на основе искусственного белка с анкириновыми повторами – DARPin, способной узнавать рецептор HER2 с высокой аффинностью ( $K_D = 3.8 \text{ nM}$ ) [7]. В качестве цитотоксического моду-

ля в конструкции использовали фрагмент PE40 (молекулярная масса 40 кДа) псевдомонадного экзотоксина А, который лишен природного рецепторсвязывающего домена [16]. Генетическую конструкцию, кодирующую этот гибридный белок, экспрессировали в клетках *E. coli* BL21(DE3). Гибридный белок DARPin-PE40 очищали с помощью металл-хелатной и анионообменной хроматографии.

В данной работе проведен углубленный анализ влияния DARPin-PE40 на динамику роста экспериментальных опухолей *in vivo*. Использовали бестимусных мышей линии BALB/c nude (6–8 нед.) с подкожно привитой аденокарциномой молочной железы человека SK-BR-3 (см. «Экспериментальную часть»),

которым повторно внутривенно вводили DARPin-PE40 в общей дозе 25, 50 или 80 мкг на животное (1.25, 2.5 или 4 мг/кг соответственно).

Определение динамики роста опухолей выявило выраженный противоопухолевый эффект рекомбинантного адресного токсина DARPin-PE40: были обнаружены статистически значимые различия в объеме опухолей у мышей опытных групп по сравнению с контрольной ( $p < 0.05$ ) (рис. 1).

У опухолей как контрольной, так и опытных групп животных, получивших DARPin-PE40 в дозах 25 и 50 мкг, наблюдался экспоненциальный характер начальной стадии роста (рис. 2А). При этом на фоне воздействия DARPin-PE40 опухоли росли существенно медленнее: показано статистически значимое снижение коэффициента скорости роста опухоли (рис. 2Б) и соответственно увеличение периода удвоения опухоли (рис. 2В) в опытных группах по сравнению с контрольной. Этот эффект может объясняться сокращением доли делящихся клеток в растущем опухолевом узле в результате цитотоксического действия адресного токсина. Развитие экспериментальных опухолей при действии DARPin-PE40 в максимальной использованной дозе (80 мкг) характеризовалось наличием двух этапов. На первом этапе во время инъекций DARPin-PE40 наблюдалось экспоненциальное сокращение объема опухолей в среднем на 60% относительно объема к моменту начала терапии. На втором этапе после окончания инъекций DARPin-PE40 опухоли возобновили экспоненциальный рост (рис. 2).

Принимая во внимание гетерогенность опухоли и высокую генетическую нестабильность опухолевых клеток [17], одной из причин недостаточной эффективности DARPin-PE40 может быть наличие или появление устойчивой популяции опухолевых клеток, которая приводит к дальнейшей прогрессии опухоли по окончании терапевтического воздействия. Кроме того, поскольку условия эксперимента моделировали ситуацию терапевтического воздействия на уже сформировавшийся опухолевый узел, ограничения в эффективности адресного токсина можно связать и с его недостаточным проникновением вглубь опухолевой ткани. Это, в свою очередь, обусловлено рядом особенностей строения опухоли *in vivo*, включающих многочисленные межклеточные контакты, давление

интерстициальной жидкости, а также присутствие внеклеточного матрикса. Таким образом, наряду с увеличением дозировки и/или продолжительности терапии, перспективным подходом к усилению противоопухолевого эффекта рекомбинантного адресного токсина DARPin-PE40 может стать сочетание его действия с направленным повышением проникающей способности и накопления в опухоли. Подходы к решению данной проблемы довольно разнообразны и включают, в частности, контроль образования компонентов внеклеточного матрикса и/или их деградацию [18–20], а также временное нарушение межклеточных контактов в опухоли [21]. Последний подход показал свою эффективность при использовании HER2-специфичных полноразмерных терапевтических антител [22] и, по-видимому, является одним из перспективных путей развития таргетной противоопухолевой терапии.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Использование каркасных белков неиммуноглобулиновой природы, в частности, DARPins, в качестве адресных (направляющих) молекул актуально для разработки новых агентов для таргетной противоопухолевой терапии. В работе исследована динамика противоопухолевой активности адресного токсина DARPin-PE40, в составе которого HER2-специфичный DARPin объединен в единую полипептидную цепь с токсическим фрагментом псевдомонадного экзотоксина А. Эффективность и достоверность противоопухолевого действия DARPin-PE40 свидетельствуют о перспективности его дальнейшего исследования как агента для таргетной терапии опухолей с высокой экспрессией рецептора-онкомаркера HER2. ●

*Работа по получению рекомбинантного адресного токсина поддержана грантом РФ (проект № 14-24-00106П); анализ противоопухолевого эффекта адресного токсина на животных выполнен при поддержке Министерства образования и науки РФ (проект № 6.7109.2017/9.10).*

*Работа выполнена с использованием оборудования ЦКП ИБХ, поддержанного Минобрнауки России, идентификатор соглашения RFMEFI62117X0018.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Каприн А.Д., Старинский В.В., Петрова Г.В. Злокачественные новообразования в России в 2015 году (заболеваемость и смертность). М.: МНИОИ им. П.А. Герцена – филиал ФГБУ «НМИРЦ» Минздрава России, 2017. 250 с.
- Madhumathi J., Verma R.S. // *Curr. Opin. Microbiol.* 2012. V. 15. P. 300–309.
- Поляновский О.Л., Лебедеенко Е.Н., Деев С.М. // *Биохимия.* 2012. Т. 77. Вып. 3. С. 289–311.
- Deyev S.M., Lebedenko E.N. // *Bioessays.* 2008. V. 30. P. 904–918.
- Slamon D.J., Clark G.M., Wong S.G., Levin W.J., Ullrich A., McGuire W.L. // *Science.* 1987. V. 235. P. 177–182.
- Kreitman R.J. // *Aaps J.* 2006. V. 8. P. E532–E551.

7. Steiner D., Forrer P., Plückthun A. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 382. P. 1211–1227.
8. Deyev S.M., Lebedenko E.N., Petrovskaya L.E., Dolgikh D.A., Gabibov A.G., Kirpichnikov M.P. // *Russ. Chem. Rev.* 2015. V. 84. № 1. P. 1–26.
9. Proshkina G.M., Shilova O.N., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // *Biochimie.* 2015. V. 118. P. 116–122.
10. Verdurmen W.P., Luginbühl M., Honegger A., Plückthun A. // *J. Control Release.* 2015. V. 200. P. 13–22.
11. Plückthun A. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2015. V. 55. P. 489–511.
12. Соколова Е.А., Шульга А.А., Стрёмовский О.А., Балалаева И.В., Прошкина Г.М., Деев С.М. // *Биол. мембраны.* 2016. Т. 33. № 6. С. 429–434.
13. Studier F.W. // *Protein Expr. Purif.* 2005. V. 41. P. 207–234.
14. Geran R.I., Greenberg N.H., Macdonald M.M., Schumacher A.M., Abbott B.J. // *Cancer Chemother. Rep.* 1972. V. 3. P. 1–104.
15. Sokolova E., Proshkina G., Kutova O., Shilova O., Ryabova A., Schulga A., Stremovskiy O., Zdobnova T., Balalaeva I., Deyev S. // *J. Control Release.* 2016. V. 233. P. 48–56.
16. Соколова Е.А., Здобнова Т.А., Стрёмовский О.А., Балалаева И.В., Деев С.М. // *Биохимия.* 2014. Т. 79. Вып. 12. С. 1680–1686.
17. Pribluda A., de la Cruz C.C., Jackson E.L. // *Clin. Cancer Res.* 2015. V. 21. P. 2916–2923.
18. Eikenes L., Tufto I., Schnell E.A., Bjorkoy A., De Lange Davies C. // *Anticancer Res.* 2010. V. 30. P. 359–368.
19. Cheng J., Sauthoff H., Huang Y., Kutler D.I., Bajwa S., Rom W.N., Hay J.G. // *Mol. Ther.* 2007. V. 15. P. 1982–1990.
20. Zeisberger S.M., Odermatt B., Marty C., Zehnder-Fjällman A.H., Ballmer-Hofer K., Schwendener R.A. // *Br. J. Cancer.* 2006. V. 95. P. 272–281.
21. Beyer I., Cao H., Persson J., Song H., Richter M., Feng Q., Yumul R., van Rensburg R., Li Z., Berenson R., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2012. V. 18. P. 3340–3351.
22. Beyer I., van Rensburg R., Strauss R., Li Z., Wang H., Persson J., Yumul R., Feng Q., Song H., Bartek J., et al. // *Cancer Res.* 2011. V. 71. P. 7080–7090.

# Expression Levels of the Uridine-Cytidine Kinase Like-1 Protein As a Novel Prognostic Factor for Hepatitis C Virus-Associated Hepatocellular Carcinomas

A. Buivydiene<sup>1\*</sup>, V. Liakina<sup>2,3</sup>, J. Valantinas<sup>1</sup>, J. Norkuniene<sup>4,5</sup>, E. Mockiene<sup>6,7</sup>, S. Jokubauskiene<sup>8,9</sup>, R. Smaliukiene<sup>9</sup>, L. Jancoriene<sup>10</sup>, L. Kovalevska<sup>11</sup>, E. Kashuba<sup>11,12\*</sup>

<sup>1</sup>Vilnius University, Clinic of Gastroenterology, Nephrourology and Surgery, Centre of Hepatology, Gastroenterology and Dietetics, Vilnius, Lithuania

<sup>2</sup>Vilnius University, Center of Hepatology, Gastroenterology and Dietetics, Vilnius, Lithuania

<sup>3</sup>Vilnius Gediminas Technical University, Department of Biomechanics, Vilnius, Lithuania

<sup>4</sup>Vilnius Gediminas Technical University, Department of Mathematical Statistics, Vilnius, Lithuania

<sup>5</sup>Vilnius College of Higher Education, Vilnius, Lithuania

<sup>6</sup>Centre of Radiology and Nuclear Medicine, Vilnius, Lithuania

<sup>7</sup>Vilnius University, Faculty of Medicine, Vilnius, Lithuania

<sup>8</sup>Vilnius University, Department of Pathology, Forensic Medicine and Pharmacology, Vilnius, Lithuania

<sup>9</sup>National Center of Pathology, Vilnius, Lithuania

<sup>10</sup>Vilnius University, Clinic of Infectious, Chest Diseases, Dermatovenerology and Allergy, Center of Infectious Diseases, Vilnius, Lithuania

<sup>11</sup>R.E. Kavetsky Institute of Experimental Pathology, Oncology and Radiobiology, Kyiv, Ukraine

<sup>12</sup>Department of Microbiology, Tumor and Cell Biology, Karolinska Institutet, Stockholm, Sweden

\*E-mail: arida.buivydiene@santa.lt; Elena.Kashuba@ki.se

Received: September 10, 2016; in final form May 31, 2017

**ABSTRACT** The expression levels of the two novel oncoproteins uridine-cytidine kinase like-1 (UCKL-1) and mitochondrial ribosomal protein S18-2 (MRPS18-2) were assessed in samples of hepatitis C virus (HCV)-associated hepatocellular carcinoma (HCC) using immunohistochemistry. Tissue microarray (TMA) paraffin blocks were prepared from 42 HCC tumor samples with the corresponding peri-tumor tissues and from 11 tissues of a liver with HCV-induced cirrhosis. We found that the UCKL-1 signal in the liver tissues of the peri-tumor zone in the HCC samples was stronger than that in cirrhosis ( $50 \pm 49.44$  vs.  $24.27 \pm 14.53$ ;  $p = 0.014$ ). The MRPS18-2 expression was weak, and there was no differences between the groups ( $p = 0.26$ ). Noteworthy, the UCKL-1 protein was expressed at higher levels in peri-tumor tissues in the cases of HCC recurrence; this was confirmed for 27 older patients ( $63.78 \pm 9.22$  vs.  $53.53 \pm 4.07$  years,  $p < 0.001$ ), in parallel with enhanced UCKL-1 staining in former HCC nodules ( $62.69 \pm 50.4$  vs.  $26.0 \pm 30.19$ ,  $p = 0.006$ ) and microvascular invasion ( $p = 0.02$ ). A multivariate analysis of prognostic factors for HCC recurrence showed that the best predictive factors for these conditions were UCKL-1 expression in tumor, vascular invasion, and HCC treatment modality, other than liver transplantation (odds ratios: 1.029, 18.143 and 11.984,  $R^2 = 0.633$ ,  $p = 0.002$ ). In conclusion, the high UCKL-1 expression might be a prognostic factor for HCC relapse, in combination with age and microvascular invasion. MRPS18-2 protein expression has no prognostic significance in the cases of HCV-associated HCC.

**KEYWORDS** hepatitis C virus (HCV), hepatocellular carcinoma (HCC), recurrence of hepatocellular carcinoma, UCKL-1, MRPS18-2, prognostic factors.

## INTRODUCTION

Liver cancer (predominantly HCC) is the second-most deadly cancer for men worldwide [1]. HCC incidence in Nordic countries, including Lithuania, reaches up to 10/100,000 inhabitants [2]. In developed countries,

one factor that is responsible for the increased HCC incidence is HCV [3]. In Lithuania, anti-HCV prevalence in adults stands at about 2.78% [4]. HCV-induced HCC development is a multi-step process that may last 20–40 years and involves chronic hepatic inflamma-

tion, progressive liver fibrosis, initiation of neoplastic clones, and tumor progression in a carcinogenic tissue microenvironment [5]. Noteworthy, eradication of HCV reduces, but does not eliminate the risk of HCC development, especially when advanced hepatic fibrosis has already originated [6, 7]. It becomes difficult then and hardly manageable to follow patients at early-stage asymptomatic HCV-induced cirrhosis. Thus, it was discovered in a population-based study that less than 20% of patients with cirrhosis who had developed HCC were subject to regular monitoring [8]. Therefore, prognostic markers are now being actively developed to stratify HCV patients into clearly defined risk groups. Successful employ of these predictors in clinical practise could improve the clinical management of these patients [9]. Additionally, even with a successful HCC treatment by liver transplantation, liver resection, or radiofrequency-induced thermotherapy (RFITT), high risk of HCC recurrence persists [7, 8]. The recurrence rate of HCC is estimated at 70% after 5 years of liver resection [10]. The validated prediction markers of recurrence are the tumor size, multifocality, macroscopic and microscopic vascular invasion, as well as poor differentiation [11].

It is widely accepted that malignant transformation of liver cells is stimulated by various factors. However, studies on the mechanisms of HCV-induced cell transformation are inhibited by the lack of animal and cell models. Obviously, better understanding of molecular mechanisms would help us identify new diagnostic and/or prognostic markers, most importantly, for the early detection of HCC [11]. This would allow us to develop better approaches to clinical treatment.

Usually, the molecular mechanisms that are responsible for virus-induced cell transformation include the inactivation of the two tumor suppressor protein pathways: i.e., the p53 (TP53) and retinoblastoma (RB) pathways [12, 13]. There is little doubt that other proteins can play an important role in cell transformation: for example, the putative human enzyme UCKL-1 that is involved in cellular nucleotide metabolism [14, 15] and the new oncoprotein MRPS18-2 that can bind RB [13, 16, 17]. There are no data on the expression of both of these proteins in HCC, and we asked ourselves the question of whether the UCKL-1 and MRPS18-2 expressions in HCC tissues could be used as prognostic markers for the course of the disease in HCV-bearing patients.

## EXPERIMENTAL

### Patient samples

The retrospective cohort study was conducted at Vilnius University Hospital Santariskiu Klinikos, Vilnius, Lithuania, according to the guidelines of the Helsin-

ki Declaration. The study was approved by the Vilnius Regional Biomedical Research Ethics Committee (158200-13-698-224, from 2013-11-12). The HCC tumor and the corresponding peri-tumor (normal) liver tissue samples were collected from 53 patients who had undergone liver transplantation, liver resection, or RFITT for a complicated chronic HCV infection. Tissue sections from 42 HCV positive cirrhotic patients with HCC and 11 samples from transplanted HCV cirrhotic patients without HCC, as a control group, were analyzed. All the specimens are preserved at the National Lithuanian Center of Pathology. A histological activity index (HAI) was scored, according to K. Ishak et al., and liver fibrosis was assessed, according to METAVIR [18–20]. In HCC cases, tumor differentiation and microvascular invasion were evaluated.

### Analysis of UCKL-1 and MRPS18-2 expression in HCC and liver tissue specimens

Tissue samples after surgery, hepatic resection, and/or liver transplantation were fixed in a buffered 10% formalin solution. Expression of the UCKL-1 and MRPS18-2 proteins was performed by immunohistochemistry (IHC) on tissue microarrays (TMAs) constructed of paraffin-embedded tissues, selected by the pathologist. Cores one millimeter in diameter were punched from the selected areas. Paraffin sections of the TMAs were cut (2  $\mu$ m thick), dewaxed, deparaffinized, and rehydrated. Epitopes were heat-activated in a EnVision FLEX target retrieval solution for 20 min, while the pH of the buffer was low for UCKL-1 and high for MRPS18-2. The samples were cooled at room temperature for 15 min. A two-step IHC procedure was performed with the EnVision FLEX detection system (DAKO), using an automatic staining Link instrument (DAKO). The primary anti-UCKL-1 (diluted 1 : 200) and anti-MRPS18-2 (diluted 1 : 150) antibodies (Sigma-Aldrich) were applied for 60 and 30 min, respectively. The secondary antibody FLEX/HRP (DAKO) was applied for 20 min. The peroxidase enzyme was then visualized with 3,3'-diaminobenzidine, tetrahydrochloride, and hydrogen peroxide. Hematoxylin was used as a counterstain for 10 min. Visual evaluation of the UCKL-1 and MRPS18-2 signals was performed by an experienced pathologist. Each spot was graded individually. The UCKL-1 and MRPS18-2 cytoplasmic reactions were considered as negative if no positive cells were observed. If a MRPS18-2 signal was detected mainly in the perinuclear cytoplasm, this was noted in the table of results, as well. The results of IHC reactions were evaluated semiquantitatively, by counting the number of positively stained cells in 1,000 analysed cells as a specified percentage – a label index (LI%). LI values lower than the median expression of the marker

**Table 1.** Demographic, clinical, and laboratory characteristics of patient groups

Characteristics	HCC (n = 42)	Non-HCC (n = 11)	p-value
Follow up, mean ± SD*, years	2.82±1.76	5.27 ± 2.49	<0.005
Age, mean ± SD, years	60.1 ± 9.29	49.42 ± 9.29	0.001
Gender, count (rate, %): Women/ Men	16 (38.1%)/ 26 (61.9%)	4 (36.4%)/ 7 (63.6%)	0.917
BMI, mean ± SD, kg/m <sup>2</sup>	26.32 ± 4.61	26.75 ± 4.18	0.774
HCV genotype (GT*):			
GT-1, count (rate, %)	27 (64.3)	9 (81.8)	0.314
GT-2, count (rate, %)	3 (7.1)	0 (0)	
GT-3, count (rate, %)	12 (28.6)	2 (18.2)	

\*SD – standard deviation.

were considered as low, and if a LI value overran the median expression it was considered as high.

In addition, demographic information (age, body mass index (BMI), gender), laboratory data on the HCV infection (HCV genotype (GT)), the cumulative size of HCC assessed radiologically, the HCC treatment modality (liver transplantation, liver resection or RFITT), and the time period of follow-up were evaluated for each patient.

### Statistics

A statistical analysis was performed using the IBM SPSS 19.0 statistical program. The Kolmogorov–Smirnov test was used to assess data normality. Group differences were determined using the Student *t* test when data distribution was normal: in other cases, the Mann Whitney and the Kruskal–Wallis criteria were used.  $\chi^2$  tests were conducted for the categorical variables. To establish a connection between categorical variables, the Spearman correlation coefficient was calculated. A logistic regression model was constructed in order to investigate the association between the intensity of the UCKL-1 and MRPS18-2 signals in the HCC and microvascular invasion, the HCC treatment modality, and HCC recurrence after treatment. All hypotheses were verified with a selected significance level of  $p < 0.05$ .

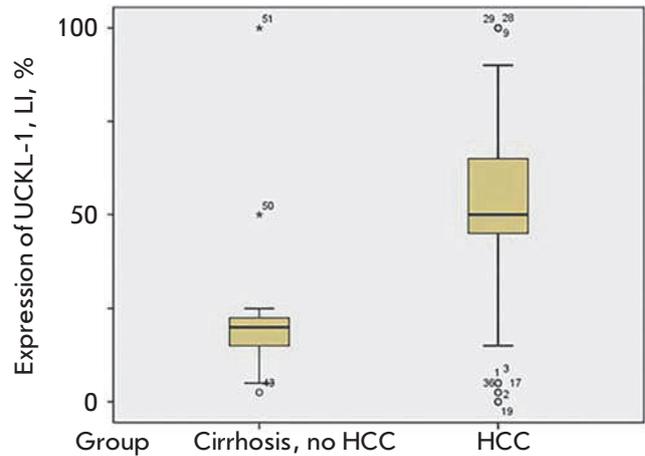
## RESULTS AND DISCUSSION

### Characterization of patients

Forty-two out of the 53 patients had developed the HCV-associated HCC and received treatment; 11 patients were diagnosed only with HCV-induced cir-

**Table 2.** Histological and immunohistochemical differences in liver tissue samples in groups

Characteristics	HCC (n = 42)	Non-HCC (n = 11)	p-value
HAI, mean ± SD	6.71 ± 1.49	6.64 ± 2.34	0.892
UCKL-1, mean ± SD, LI (%)	50 ± 49.44	24.27 ± 14.53	0.014
MRPS18-2, mean ± SD, LI (%)	8.68 ± 16.61	15.00 ± 15.17	0.260



**Fig. 1.** The UCKL-1 expression in the liver tissue. Notice the significant increase in the UCKL-1 staining in samples with HCC in comparison with patients with cirrhosis without HCC

rhosis. All participants were followed up for at least 1 year at the Santariškiu Klinikos of Vilnius University Hospital; the HCC patients were observed for about  $2.82 \pm 1.76$  years; and the patients with HCV-induced cirrhosis – for  $5.27 \pm 2.49$  years. Noteworthy, the HCC patients were significantly older than the individuals with cirrhosis ( $p = 0.001$ ): the mean age of the HCC patients was  $60.1 \pm 9.29$  years, while the persons in the cirrhosis group were about  $49.42 \pm 9.29$  years old. No differences in gender distribution (male/female ratio) in HCC and non-HCC (cirrhosis) groups were detected ( $p = 0.917$ ). The BMI value was also similar in these groups ( $p = 0.774$ ) (see Table 1).

All participants had histologically confirmed advanced fibrosis, and HAI did not differ between the HCC and non-HCC groups ( $p = 0.892$ ) (Table 2).

The expression of UCKL-1 was high in the liver tissues of patients with HCC. We found that the UCKL-1 signal was stronger in the peri-tumoral liver tissue in HCC cases, compared with non-HCC (cirrhosis) cases ( $50 \pm 49.44$  vs.  $24.27 \pm 14.53$ ,  $p = 0.014$ ), as is presented in Table 2 and Figs. 1 and 2.

On the contrary, the MRPS18-2 signal was observed rarely in the liver tissue and this low expression did not differ between the groups ( $p = 0.26$ ) (see *Table 2*).

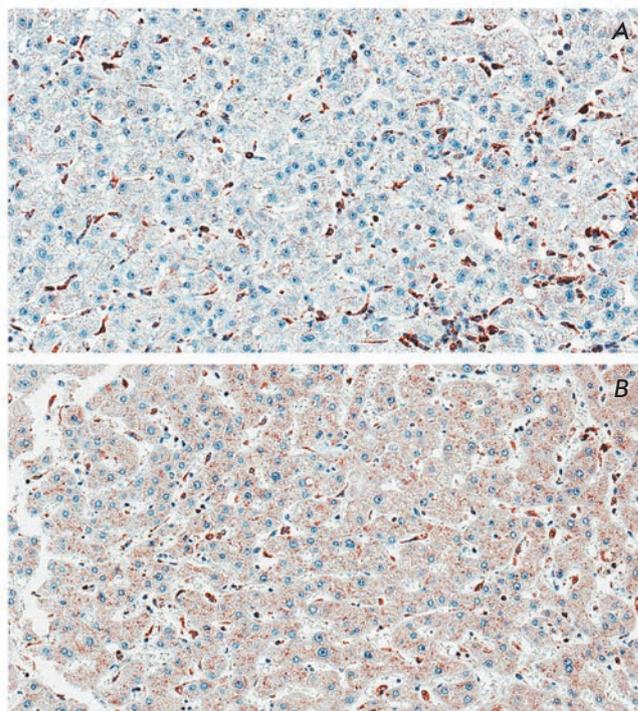
### A description of the cohort of patients with HCC relapse

HCC recurrence in patients with HCV-induced cirrhosis after curative treatment (liver transplantation, liver resection or RFITT) was confirmed radiologically in 27 of the 42 patients. All patients were observed for at least 1 year before the diagnosis of HCC relapse (the mean observation time was  $2.93 \pm 2.43$ ) (see *Table 3*). HCC relapse appeared usually after  $2.76 \pm 1.3$  years. The recurrence rate (62%) in the studied cohort and the time of relapse were similar to those reported earlier by other authors [10]. Moreover, the mortality rate in the relapsers was significantly higher than that in non-relapsers (59.3 and 6.7%, respectively,  $p = 0.001$ ) (see *Table 3*).

Importantly, the age of the patients in both groups differed significantly:  $63.78 \pm 9.22$  years in those that showed a relapse and  $53.53 \pm 4.07$  years in non-relapsers ( $p < 0.001$ )(see *Table 3*).

Noteworthy, women were diagnosed with HCC relapse more often than men: 87.5% (14 out of 16) and 50% (13 out of 26), respectively ( $p = 0.015$ ) (see *Table 3*). However, an absolutely larger number of men were diagnosed with HCC (26 men versus 16 women). It had also been reported earlier that older age and male gender are associated with an increased risk of HCC development in HCV cirrhotic patients [21, 22].

In our studied cohort of patients, no differences in BMI values, HAI, and HCC differentiation were detected between the groups of relapsers and non-relapsers (*Table 3*). We have to mention that in the studied cohort there were only two cases of poorly differentiated HCC (grade G3) in the group of relapsers and no G3 cases in the non-relapsers. Probably, this is one reason why in



**Fig. 2.** The UCKL-1 cytoplasmic expression in liver tissue. Notice that the UCKL-1 cytoplasmic signal was significantly lower in the hepatocytes (expression was observed in 40% of the cells) of a cirrhosis patient (A) in comparison with the UCKL-1 signal in 100% of the peritumor hepatocytes of a HCC patient (B). Objective  $\times 40$

our case the histological differentiation grade was not associated with HCC recurrence, contrary to published data [23].

When microvascular invasion was observed, HCC recurrence was diagnosed significantly more often ( $p = 0.02$ , *Table 4*). As a rule, tumors were larger in HCC

**Table 3.** Characteristics of patient groups with and without HCC recurrence

Characteristics	HCC recurrence (n = 27)	no HCC recurrence (n = 15)	p-value
Follow up, mean $\pm$ SD, years	2.76 $\pm$ 1.3	2.93 $\pm$ 2.43	0.8
Lethality, count (rate, %)	16 (59.3)	1 (6.7)	0.001
Age, mean $\pm$ SD, years	63.78 $\pm$ 9.22	53.53 $\pm$ 4.07	<0.001
Gender, count (rate, %): -women/men	14 (51.9%)/13 (48.1%)	2 (13.3%)/13 (86.7%)	0.015
BMI average $\pm$ SD, kg/m <sup>2</sup>	27.05 $\pm$ 4.88	25.3 $\pm$ 4.01	0.245
HCC treatment method:			
-resection, count (rate, %)	20 (74.1)	6 (40)	0.001
-RFITT, count (rate, %)	6 (22.2)	1 (6.7)	
-transplantation, count (rate, %)	1 (3.7)	8 (53.3)	

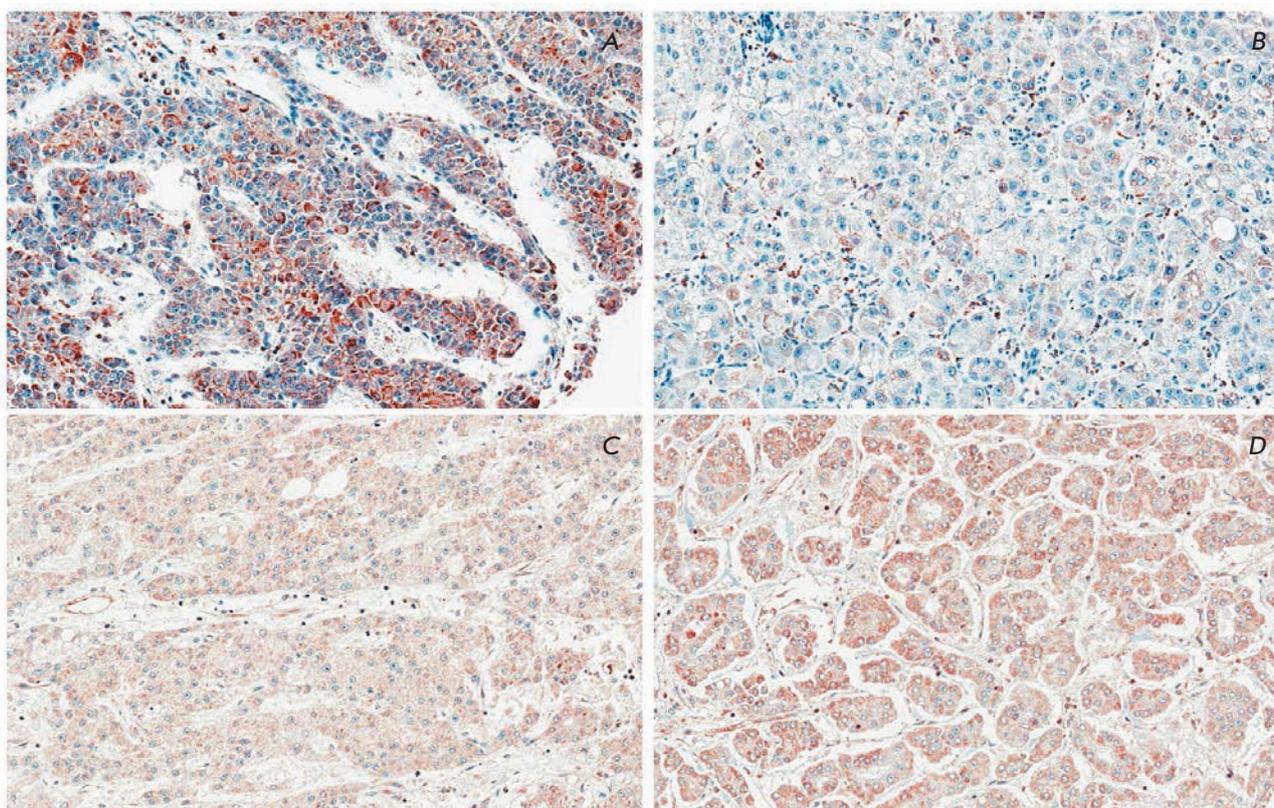
**Table 4.** Histological differences in liver tissue samples in HCC recurrence and non-HCC recurrence groups

Characteristics	HCC recurrence (n = 27)	no HCC recurrence (n = 15)	p-value
HAI, mean ± SD, count	6.89 ± 1.19	6.4 ± 1.92	0.381
HCC size, mean ± SD, mm	50.44 ± 17.831	41.47 ± 20.757	0.558
HCC grade of differentiation			
-G1, count (rate, %)	6 (23.07)	1 (6.67)	0.64
-G2, count (rate, %)	18 (69.23)	14 (93.33)	
-G3, count (rate, %)	2 (7.69)	0 (0)	
Vascular invasion, count (rate, %)	13 (50)	2 (13.33)	0.02

relapsers (50.44 ± 17.83 mm vs. 41.47 ± 20.76 mm), but these differences were not statistically significant (Table 4). Thus, in our study the microvascular invasion, proven histologically, was an independent predictive factor of a lower disease-free survival rate. Actually, tumor size and vascular invasion are well-known predictive factors of HCC recurrence [24, 25]. The studied cohort in the present paper was rather small, and that could be the reason why the size of the HCC nodules did not differ significantly between relapsers and non-relapsers, even when such a trend was observed.

**The high expression of UCKL-1 and MRPS18-2 in HCC tissues**

Comparing the expression of UCKL-1 and MRPS18-2 proteins in HCC nodules, a significantly stronger UCKL-1 signal was observed in HCC relapsers compared with non-relapsers: 62.69 ± 50.4 and 26.0 ± 30.19, respectively (p = 0.006). We have to emphasize that, at the same time, in the peri-tumor liver tissue no dramatic differences in UCKL-1 staining were detected when relapsers and non-relapsers were compared (Fig. 3 and Table 5). Hence, the UCKL-1 expression levels



**Fig. 3.** The UCKL-1 and MRPS18-2 expression pattern in cancer tissues. Notice that the UCKL-1 cytoplasmic signal was significantly higher in the HCC samples of relapsers (A) in comparison with the UCKL-1 signal in non-relapsing HCC (B). The MRPS18-2 signal was strong in cancer tissues, regardless relapsing (C) or non-relapsing (D) HCC. Objective ×40

**Table 5.** Immunohistochemical differences in liver tissue samples in groups of patients with and without HCC recurrence

Characteristics	HCC recurrence (n=27)	no HCC recurrence (n=15)	p-value
UCKL-1, mean ± SD, LI (%)	49 ± 32.44	50.27 ± 14.53	0.510
MRPS18-2 in liver tissue, mean ± SD, LI (%)	9.42 ± 18.239	7.40 ± 13.835	0.583
UCKL-1 in HCC nodule, mean ± SD, LI (%)	62.69 ± 50.4	26 ± 30.19	0.006
MRPS18-2 in HCC nodule, mean ± SD, LI (%)	78.08 ± 54.54	61.67 ± 60.52	0.378

**Table 6.** Logistic regression

Characteristics	B	SE	Wald	DV	p-value	Exp(B)
UCKL-1 in HCC	0.029	0.013	5.022	1	0.025	1.029
Vascular microinvasion	2.898	1.176	6.072	1	0.014	18.143
HCC treatment modality (transplantation->resection->RFITT)	2.484	0.933	7.084	1	0.008	11.984
Constant	-6.316	2.178	8.413	1	0.004	0.002

*Note.* B – regression coefficient, SE – standard error, Wald – Wald statistics value, DV – the dependent variable (1 – for HCC recurrence), Exp (B) – odds ratio.

might have a prognostic value in terms of HCC occurrence and recurrence.

At the same time, the MRPS18-2 expression was several folds greater in the HCC nodules than in the unaffected liver, but no differences were observed between HCC relapsers and non-relapsers (Table 5). Therefore, the levels of MRPS18-2 could be considered as lacking prognostic significance for patients with HCV cirrhosis.

**The high expression of UCKL-1 in HCC nodules can be a prognostic factor of HCC relapse**

As was expected based on the data published earlier [26], the method of HCC treatment on its own had a significant predictive value of HCC recurrence: in the case of liver transplantation, the HCC recurrence rate was significantly lower than that after liver resection or RFITT – there were the only cases of HCC recurrence after liver transplantation (Table 3). The high rate of tumor recurrence after surgical resection and RFITT corresponded to the data in the literature [27].

After a multivariate analysis of prognostic factors for HCC recurrence was performed, we could conclude that the most significant variables were the levels of UCKL-1 expression in tumor nodes, vascular invasion, and the modality of the primary HCC treatment (other than liver transplantation) with odds ratios of 1.029, 18.143, and 11.984, respectively ( $R^2 = 0.633$ ,  $p = 0.002$ ) (Table 6). As has already been mentioned, the expres-

sion levels of MRS18-2 and the differentiation of HCC could not be predictive factors for HCC relapse.

Thus, the addition of the expression levels of UCKL-1 as a predictive factor for the risk of HCC relapse resulted in a better prognosis of the course of the disease. A higher UCKL-1 expression in HCC nodules can be indicative of a higher risk of HCC relapse after curative treatment, especially if the treatment was not liver transplantation.

MRS18-2 was expressed at significantly higher levels in HCC nodules, compared with normal liver tissues, but it was not predictive of HCC recurrence.

These promising results regarding the prognostic value of UCKL-1 in terms of HCC occurrence and recurrence should be confirmed in a larger prospective-retrospective clinical study.

**CONCLUSIONS**

A high level of UCKL-1 expression in HCC nodules, in combination with microvascular invasion, and HCC treatment modality (other, than liver transplantation), is a predictor of a higher risk of HCC recurrence. ●

*This work was supported by the Swedish Cancer Society, matching grants from the Concern Foundation (Los Angeles) and the Cancer Research Institute (New York), the Ministry of Education and Science of Ukraine (No.0116U005456), and the Research Council of Lithuania (No.TAP-LU-15-003).*

REFERENCES

1. Torre L.A., Bray F., Siegel R.L., Ferlay J., Lortet-Tieulent J., Jemal A. // *CA: Cancer J Clinicians*. 2015. V. 65. № 2. P. 87–108.
2. McGlynn K.A., London W.T. // *Clinics Liver Disease*. 2011. V. 15. № 2. P. 223–243, vii–x.
3. El-Serag H.B. // *N. Eng. J. Med.* 2011. V. 365. № 12. P. 1118–1127.
4. Liakina V., Valantinas J. // *Med. Sci. Monitor: Internat. Med. J. Exp. Clin. Res.* 2012. V. 18. № 3. P. PH28–PH35.
5. Goossens N., Hoshida Y. // *Clin. Mol. Hepatol.* 2015. V. 21. № 2. P. 105–114.
6. van der Meer A.J., Veldt B.J., Feld J.J., Wedemeyer H., Dufour J.F., Lammert F., Duarte-Rojo A., Heathcote E.J., Manns M.P., Kuske L, et al. // *JAMA*. 2012. V. 308. № 24. P. 2584–2593.
7. Bruno S., Crosignani A., Roffi L., De Lisi S., Rossi S., Boccaccio V., Zermiani P., Mondelli V., Maisonneuve P. // *J. Hepatol.* 2014. V. 60. № 1. P. S224.
8. Davila J.A., Morgan R.O., Richardson P.A., Du X.L., McGlynn K.A., El-Serag H.B. // *Hepatology*. 2010. V. 52. № 1. P. 132–141.
9. Hoshida Y., Fuchs B.C., Bardeesy N., Baumert T.F., Chung R.T. // *J. Hepatol.* 2014. V. 61. (1 Suppl.). P. S79–90.
10. Waghray A., Murali A.R., Menon K.V.N. // *W.J. Hepatol.* 2015. V. 7. № 8. P. 1020–1029.
11. Colecchia A., Schiumerini R., Cucchetti A., Cescon M., Taddia M., Marasco G., Festi G. // *World J. Gastroenterol.* 2014. V. 20. № 20. P. 5935–5950.
12. Smirnova I.S., Aksenov N.D., Kashuba E.V., Payakurel P., Grabovetsky V.V., Zaberezhny A.D., Vonsky M.S., Buchinska L., Biberfeld P., Hinkula J., et al. // *Cell. Oncol.: Official J. Internat. Soc. Cell. Oncol.* 2006. V. 28. № 4. P. 177–190.
13. Darekar S.D., Mushtaq M., Gurrupu S., Kovalevska L., Drummond C., Petruchek M., Tirinato L., Di Fabrizio E., Carbone E., Kashuba E. // *Oncotarget*. 2015. V. 6. № 25. P. 21016–21028.
14. Ambrose E.C., Kornbluth J. // *Apoptosis: Internat. J. Programmed Cell Death*. 2009. V. 14. № 10. P. 1227–1236.
15. Kashuba E., Kashuba V., Sandalova T., Klein G., Szekely L. // *BMC Cell Biol.* 2002. V. 3. № 1. P. 1–12.
16. Kashuba E., Pavan Yenamandra S., Darekar S.D., Yurchenko M., Kashuba V., Klein G., Szekely L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 47. P. 19866–19871.
17. Shevchuk Z., Yurchenko M.Y., Darekar S.D., Holodnuka-Kholodnyuk I., Kashuba V.I., Kashuba E.V. // *Acta Naturae*. 2013. V. 5. № 1. P. 85–89.
18. Ishak K., Baptista A., Bianchi L., Callea F., De Groote J., Gudat F., Denk H., Desmet V., Korb G., MacSween R.N.M., et al. // *J. Hepatol.* 1995. V. 22. № 6. P. 696–699.
19. Bedossa P., Poynard T. // *Hepatology*. 1996. V. 24. № 2. P. 289–293.
20. Goodman Z.D. // *J. Hepatol.* 2007. V. 47. № 4. P. 598–607.
21. Llovet J.M., Burroughs A., Bruix J. // *Lancet*. 2003. V. 362. № 9399. P. 1907–1917.
22. El-Serag H.B., Rudolph K.L. // *Gastroenterology*. 2007. V. 132. № 7. P. 2557–2576.
23. Lauwers G.Y., Terris B., Balis U.J., Batts K.P., Regimbeau J.M., Chang Y., Graeme-Cook F., Yamabe H., Ikai I., Cleary K.R., et al. // *Am. J. Surgical Pathol.* 2002. V. 26. № 1. P. 25–34.
24. Wahab M.A., Shehta A., Hamed H., El Nakeeb A., Salah T. // *Eurasian J. Med.* 2014. V. 46. № 1. P. 36–41.
25. Llovet J.M., Schwartz M., Mazzaferro V. // *Semin. Liver Dis.* 2005. V. 25. № 2. P. 181–200.
26. Welker M.-W., Bechstein W.-O., Zeuzem S., Trojan J. // *Transplant Internat.* 2013. V. 26. № 2. P. 109–118.
27. Lim K.C., Chow P.K., Allen J.C., Siddiqui F.J., Chan E.S., Tan S.B. // *Br. J. Surgery*. 2012. V. 99. № 12. P. 1622–1629.

## ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

Журнал *Acta Naturae* публикует экспериментальные и обзорные статьи, посвященные наиболее актуальным вопросам фундаментальных и прикладных наук о живом и биотехнологий. Журнал выпускается издательским домом «Парк-медиа» 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 Редакцией 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](http://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  $\mu\text{M}$ ; нм, но не nm).
- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только « $\times$ ». Знак « $\times$ » ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом « $\cdot$ » обозначаются комплексы соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК:РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (A, T, G, C, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (ATP, AMP и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (T34, Ala89).
- При выборе единиц измерения необходимо придерживаться международной системы единиц СИ.
- Молекулярная масса выражается в дальтонах (Да, кДа, МДа).
- Количество пар нуклеотидов обозначается сокращениями (п.н., т.п.н.).
- Количество аминокислотных остатков обозначается сокращением (а.о.).
- Биохимические термины (в частности, названия ферментов) приводятся в соответствии с международными правилами IUPAC.
- Сокращения терминов и названий в тексте должны быть сведены к минимуму.
- Повторение одних и тех же данных в тексте, таблицах и графиках недопустимо.

## ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

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

## РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

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

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

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

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

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

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

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

## ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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