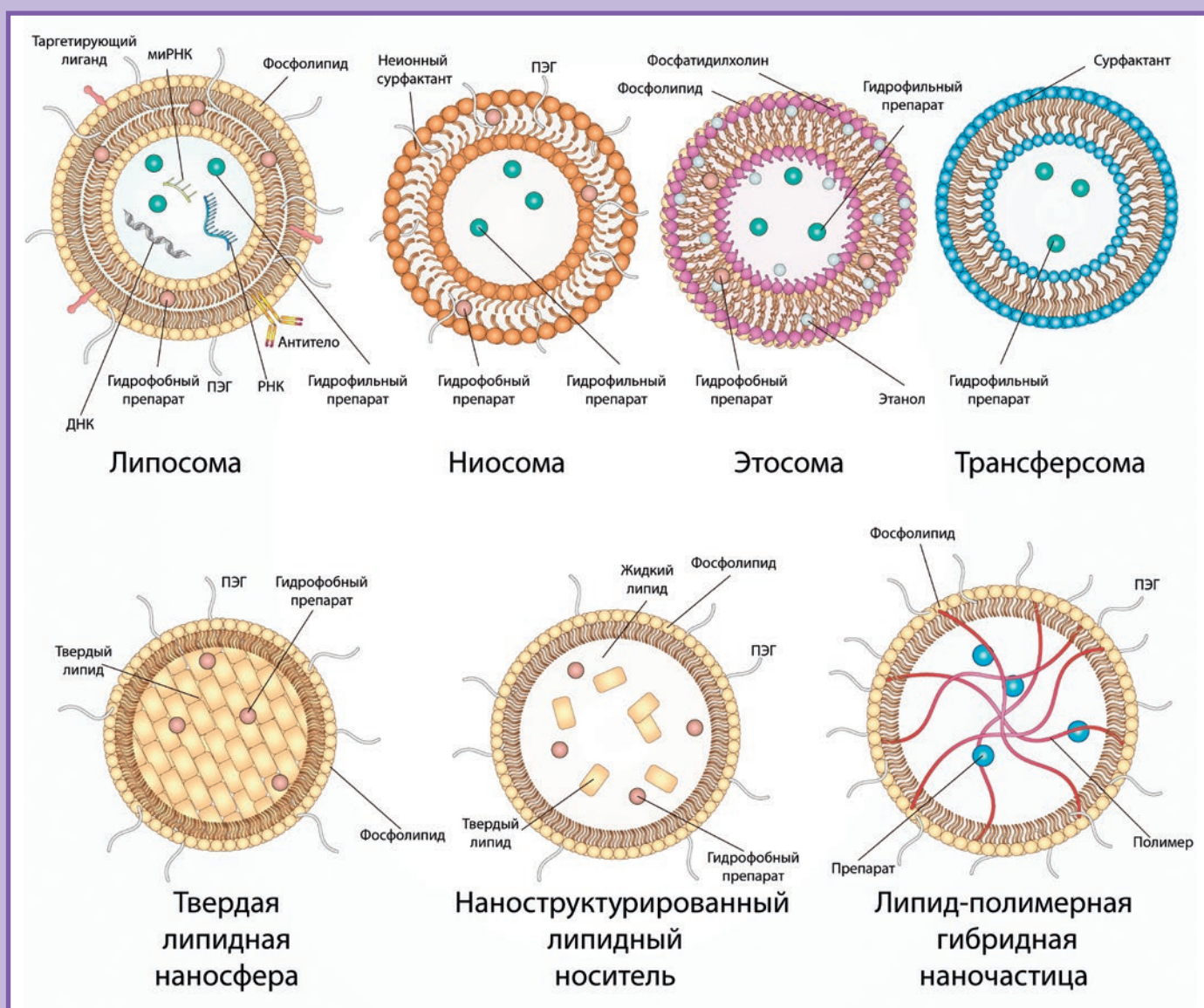


Acta Naturae

Направленный транспорт лекарственных препаратов в липидоподобных наноконтейнерах и внеклеточных везикулах



MERCK

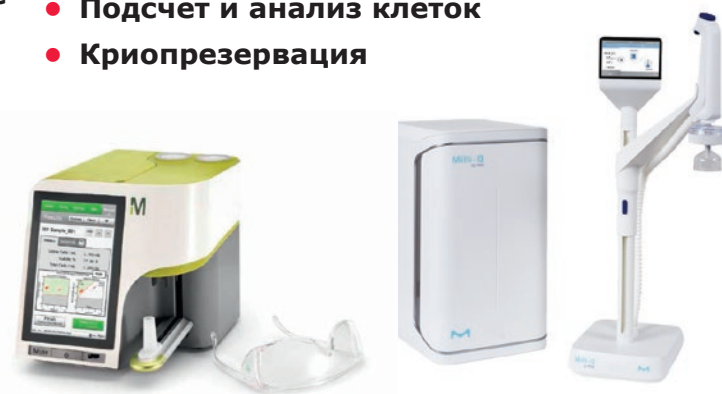
КОМПЛЕКСНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ КЛЕТОЧНОГО АНАЛИЗА



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



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



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

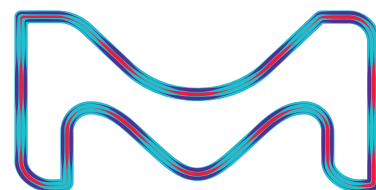
- 4000 клеточных линий животных и человека;
- Клетки 45 видов животных и 50 типов тканей;
- 370 эталонных В-лимфобластных клеточных линий с данными о типе лейкоцитарного антигена человека (HLA);
- 480 гибридных клеточных линий, секретирующих моноклональные антитела;
- ДНК, РНК, кДНК, экстрагированные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

SIGMAaldrich.com/ECACC

ООО «Мерк»

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

SIGMAaldrich.com/cellculture
MERCKmillipore.com/cellculture



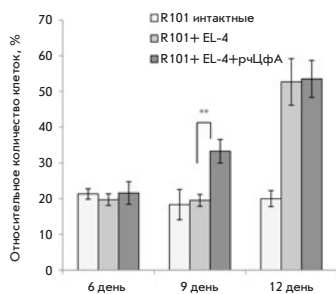
SIGMA-ALDRICH® is now MERCK

Профиль посттрансляционных модификаций гистона H1 в хроматине эмбриональных стволовых клеток мыши

Т. Ю. Старкова, Т. О. Артамонова, В. В. Ермакова, Е. В. Чихиржина, М. А. Ходорковский, А. Н. Томилин

С помощью масс-спектрометрии высокого разрешения (MALDI-FT-ICR-MS) обнаружены существенные различия в природе и положениях посттрансляционных модификаций в некоторых вариантах гистона H1 (H1.3–H1.5) из эмбриональных стволовых клеток и дифференцированных клеток – иммортализованных фибробластов линии NIH/3T3 и эмбриональных фибробластов.

Потенциальные посттрансляционные модификации вариантов H1 из клеток NIH/3T3, МЭФ и E14



Динамика накопления эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов в селезенке мышей после иммунизации клетками EL-4

Роль рекомбинантного циклофилина А человека в развитии противоопухолевого иммунного ответа

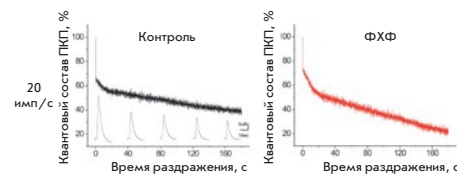
А. А. Калинина, Ю. Ю. Силаева, Д. Б. Казанский, Л. М. Хромых

Циклофилин А (ЦфА) – многофункциональный белок, обладающий изомеразной активностью и существующий во внутриклеточной и секретируемой формах. С использованием модельной системы отторжения лимфомы EL-4 мышами B10.D2(R101) показано, что рекомбинантный ЦфА человека стимулирует противоопухолевый иммунный ответ за счет раннего привлечения гранулоцитов в сайт локализации клеток-мишеней и ускоренного системного накопления эффекторных Т-киллерных клеток.

Полимеризация септинов замедляет рециклирование синаптических везикул в двигательном нервном окончании

П. Н. Григорьев, Г. А. Хисамиева, А. Л. Зефирова

Септины – наименее изученный элемент цитоскелета, входят в состав GTP-связывающих белков. В опытах на двигательных нервных окончаниях диафрагмы мыши с использованием внутриклеточного микроэлектродного отведения постсинаптических сигналов, флуоресцентной конфокальной микроскопии и красителя FM 1-43 исследованы процессы секреции медиатора и экзо-эндоцитоза синаптических везикул в условиях стимуляции полимеризации септинов форхлорфенуном. Сделано заключение, что септины принимают участие в процессах везикулярного цикла и повторного использования синаптических везикул в секреции медиатора при длительной высокочастотной активности нервно-мышечного синапса.



Секреция медиатора при высокочастотном раздражении в присутствии форхлорфенуона

Acta Naturae

ТОМ 11, № 2 (41), АПРЕЛЬ—ИЮНЬ 2019
издается с апреля 2009 года

Учредители:

ООО «Акта Натурэ»,
Национальный исследовательский университет
«Высшая школа экономики»

Редакционный совет:

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

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

Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре

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

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

Адрес редакции: 101000 Москва, ул. Мясницкая, 13, стр. 4
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, 2019

Номер подписан в печать 29 июня 2019 г.
Тираж 100 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

Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 2.00

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- А. П. Бонарцев, Г. А. Бонарцева,
И. В. Решетов, К. В. Шайтан,
М. П. Кирпичников
**Применение полиоксиканоатов в медицине
и биологическая активность природного
поли-3-оксибутирата 4**
- Н. А. Коновалов, Д. С. Асютин,
Е. Г. Шайхаев, С. В. Капровой, С. Ю. Тимонин
**Молекулярные биомаркеры астроцитом
головного и спинного мозга 17**
- А. В. Соколов, Н. Н. Костин,
Л. А. Овчинникова, Я. А. Ломакин,
А. А. Кудряева
**Направленный транспорт лекарственных
препаратов в липидоподобных нано-
контейнерах и внеклеточных везикулах. 28**

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

О. А. Батурина, А. А. Чернонос, В. В. Коваль, И. В. Морозов
Оценка степени проявления фенилкетонурии, обусловленной гомозиготной мутацией р.R155H, при помощи масс-спектрометрического анализа метаболитов крови 42

М. М. Белова, В. О. Шипунова, П. А. Котельникова, А. В. Бабёнышев, Е. А. Рогожин, М. Ю. Чередниченко, С. М. Деев
«Зеленый» синтез серебряных наночастиц, обладающих цитотоксической активностью, на основе вторичных метаболитов лаванды узколистной..... 47

П. Н. Григорьев, Г. А. Хисамиева, А. Л. Зефирова
Полимеризация септинов замедляет рециклирование синаптических везикул в двигательном нервном окончании 54

А. А. Калинина, Ю. Ю. Силаева, Д. Б. Казанский, Л. М. Хромых
Роль рекомбинантного циклофилина А человека в развитии противоопухолевого иммунного ответа 63

Г. В. Корнилаева, А. Э. Синявин, А. Schultz, А. Germann, С. Moog, Н. von Briesen, А. С. Тургиев, Э. В. Карамов
Дифференциальный анти-ВИЧ-эффект нового препарата на основе гуминовых веществ в различных клетках-мишенях иммунной системы 68

Н. В. Панин, М. В. Никулин, Е. С. Тюрин, В. В. Дробот, И. А. Морозова, В. К. Швядас
Изучение возможностей использования 2-галоген-замещенных ацетамидов в качестве ацильных доноров в реакциях, катализируемых пенициллинацилазами. 77

Т. Ю. Старкова, Т. О. Артамонова, В. В. Ермакова, Е. В. Чихиржина, М. А. Ходорковский, А. Н. Томилин
Профиль посттрансляционных модификаций гистона H1 в хроматине эмбриональных стволовых клеток мыши. 82

В. В. Шерстюк, Г. И. Давлетшина, Ю. В. Вяткин, Д. Н. Штокало, В. В. Власов, С. М. Закиан
Новый кластер микроРНК, ответственный за репрограммирование к плюрипотентному состоянию 92

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Е. Ф. Колесанова, М. В. Мельникова, Т. Н. Большакова, Е. Ю. Рыбалкина, И. Г. Сивов
Бактериофаг MS2 – средство доставки для таргетной химиотерапии солидных опухолей. 98

Правила для авторов 102

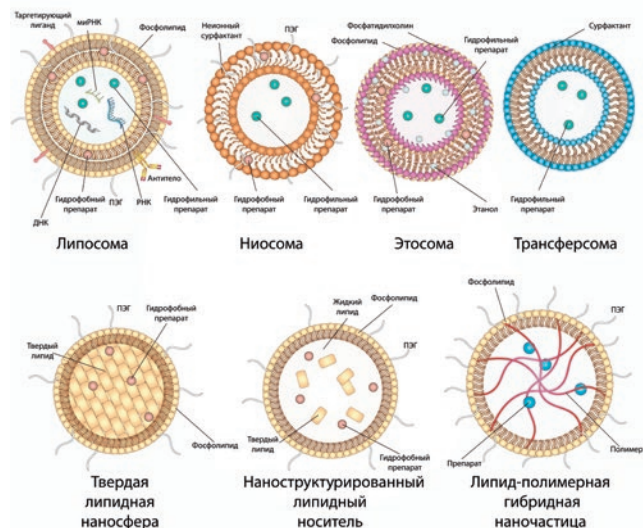


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью Соколова и др.)

УДК 577.1

Применение полиоксиалканоатов в медицине и биологическая активность природного поли-3-оксибутирата

А. П. Бонарцев^{1,2*}, Г. А. Бонарцева², И. В. Решетов³, К. В. Шайтан¹, М. П. Кирпичников¹

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

²Институт биохимии им. А.Н. Баха, Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, 119071, Москва, Ленинский просп., 33, корп. 2

³Первый МГМУ им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

*E-mail: ant_bonar@mail.ru

Поступила в редакцию 28.12.2018

Принята к печати 28.03.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-4-16

РЕФЕРАТ Биоразлагаемые и биосовместимые полимеры, полиоксиалканоаты, активно используются для изготовления различных медицинских изделий и лекарственных форм. В медицинской промышленности применяют полиоксиалканоаты, полученные химическим синтезом, но растет интерес и к природным полиоксиалканоатам, полученным биотехнологическим путем. Синтетические полиоксиалканоаты являются биомиметическими аналогами бактериального поли-3-оксибутирата и других природных полиоксиалканоатов. В обзоре рассмотрено наличие биологической активности у синтетических и природных полиоксиалканоатов (стимуляция пролиферации и дифференцировки клеток, регенерация тканей) и ее возможная связь с биологическими функциями поли-3-оксибутирата у бактерий и эукариот, в том числе у человека.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биodeградация, биомиметика, биосинтез, биосовместимость, полиоксиалканоаты, поли-3-оксибутират, регенеративная медицина.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПОА – полиоксиалканоаты; сПОА – синтетические полиоксиалканоаты; пПОА – природные полиоксиалканоаты, поли-3-оксиалканоаты; ПМК – поли-2-оксипропановая (поли-молочная) кислота, полилактид; ПГК – поли-2-оксиуксусная (полигликолевая) кислота, полигликолид; ПМГК – полимолочно-со-гликолевая кислота (полилактид-со-гликолиды); ПКЛ – поли-6-оксикапролактон (поли-ε-оксикапролактон); ПДС – поли-*n*-диоксанон; ПОБ – поли-3-оксимасляная кислота (поли-3-оксибутират); кПОБ – короткоцепочечный комплексообразующий эндогенный ПОБ; оПОБ – среднецепочечный или олиго-ПОБ; П4ОБ – поли-4-оксимасляная кислота (поли-4-оксибутират); ПОВ – поли-3-оксивалериановая кислота (поли-3-оксивалерат); ПОВВ – поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат; ПОГк – поли-3-оксигексаноат; ПОВГк – поли-3-оксибутират-со-3-гексаноат; ПОВВГк – поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат-со-3-оксигексаноат; ПОВОк – поли-3-оксибутират-со-3-оксиоктаноат; ПОВ4ОБ – поли-3-оксибутират-со-4-оксибутират; ЗГБ – 3-гидроксибутират; ГКИТ – гигантские клетки инородных тел; NO – оксид азота; TNF-α – фактор некроза опухолей альфа (tumor necrosis factor alpha); МСК – мезенхимальные стволовые клетки.

ВВЕДЕНИЕ

Полиоксиалканоаты (ПОА) – это биоразлагаемые полиэфиры оксикарбоновых кислот, которые получают как путем химического синтеза, так и с помощью бактериального биосинтеза. С начала 21 века наблюдается рост интереса к изучению этих полимеров и к внедрению их в медицинскую практику. В настоящее время как в научных исследованиях,

так и в клинической практике используют синтетические поли-2-оксипропановую (поли-молочная (ПМК), полилактиды), поли-2-оксиуксусную (полигликолевая (ПГК), полигликолиды) кислоты, поли-6-оксикапролактон (ПКЛ) и природные поли-3-оксимасляную (поли-3-оксибутират (ПОБ)), поли-4-оксимасляную (П4ОБ), поли-3-оксивалериановую (поли-3-оксивалерат (ПОВ)) кис-

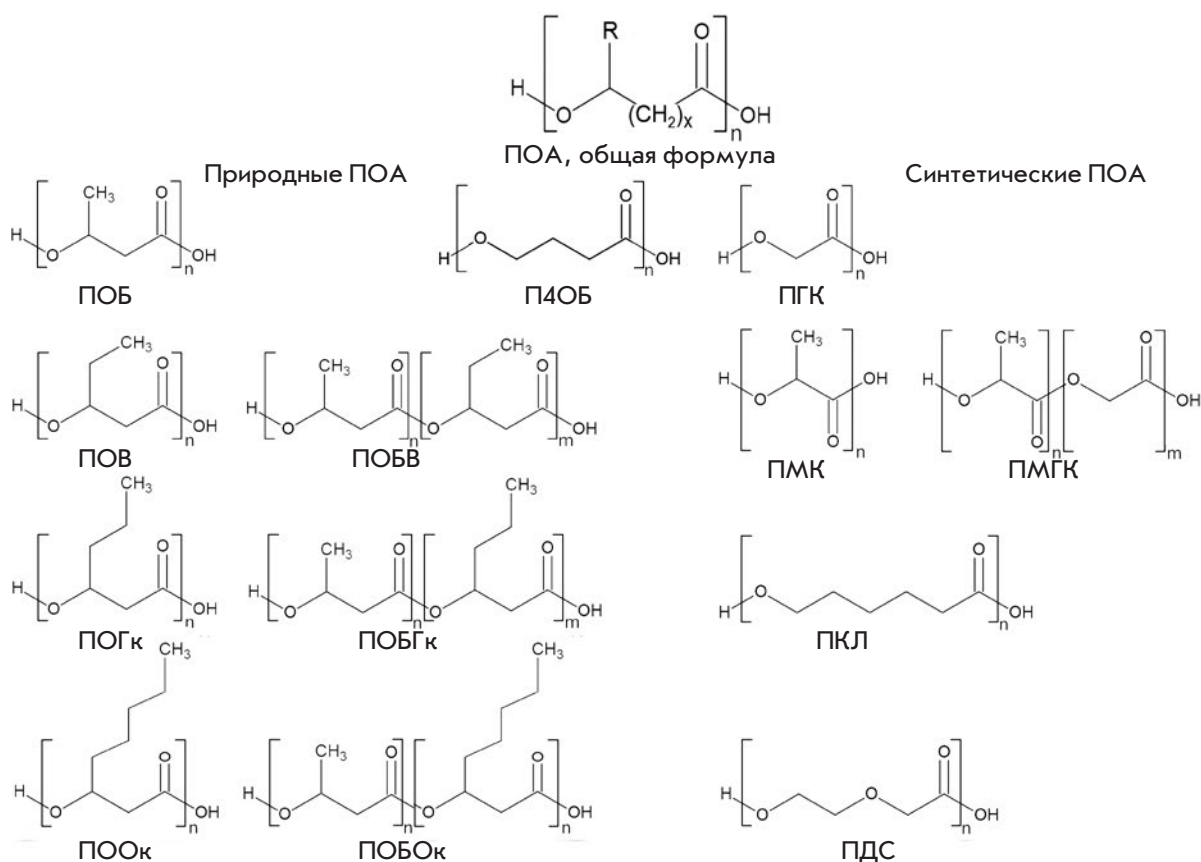


Рис. 1. Общая формула полиоксикалкоанатов и структурные формулы ряда природных и синтетических полиоксикалкоанатов биомедицинского применения. Сокращения: ПОБ – поли-3-оксибутират, ПОВ – поли-3-оксивалерат, ПОВВ – поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат, ПОГк – поли-3-оксигексаноат, ПОБГк – поли-3-оксибутират-со-3-оксигексаноат, ПООк – поли-3-оксиоктаноат, ПОБОк – поли-3-оксибутират-со-3-оксиоктаноат, П4ОБ – поли-4-оксимасляная кислота (поли-4-оксибутират), ПГК – поли-2-оксиуксусная кислота (полигликолевая кислота, полигликолид), ПМК – поли-2-оксипропановая кислота (полимолочная кислота, полилактид), ПМГК – полимолочно-со-гликолевая кислота (полилактид-со-гликолид), ПКЛ – поли-6-оксикапролактон, ПДС – поли-*l*-диоксанон

лоты, поли-3-оксигексаноат (ПОГк), их сополимеры и близкие по структуре полимеры, такие, как поли-*n*-диоксанон (ПДС) (рис. 1). Благодаря сходству химического строения эти полимеры обладают сходным сочетанием физико-химических и биомедицинских свойств: способностью к биодegradации в организме без образования токсичных продуктов, биосовместимостью с органами и тканями человека, оптимальными физико-химическими свойствами (термопластичность, относительно высокая гидрофобность, специфические диффузионные свойства, относительно высокая прочность, пластичность), возможностью использования эффективных технологических процессов при их получении. Такое уникальное сочетание свойств этих полимеров способствует активному их использованию и внедрению в медицинскую практику [1–4].

ПРИМЕНЕНИЕ ПОЛИОКСИКАЛКАНАТОВ В МЕДИЦИНЕ

ПОА стали активно использоваться в медицине еще с 70-х гг. прошлого века. Так, первые биоразлагаемые шовные нити марки «Викрил», изготовленные из полимеров, полученных с помощью химического синтеза, были выведены на рынок медицинских изделий еще в 1974 г. Уже используются или разрабатываются разнообразные изделия из ПОА: биоразлагаемые скобы, винты, пластины, штифты и шпигаты, биорассасываемые шовные нити и скобы для кожных степлеров, раневые и ожоговые покрытия, пародонтологические мембраны, хирургические сетчатые эндопротезы, хирургические заплатки для закрытия дефектов кишечника и перикарда, плаги-эндопротезы для колопроктологии и герниопластики, протезы сосудов, кардиоваскулярные стенты-эндопротезы

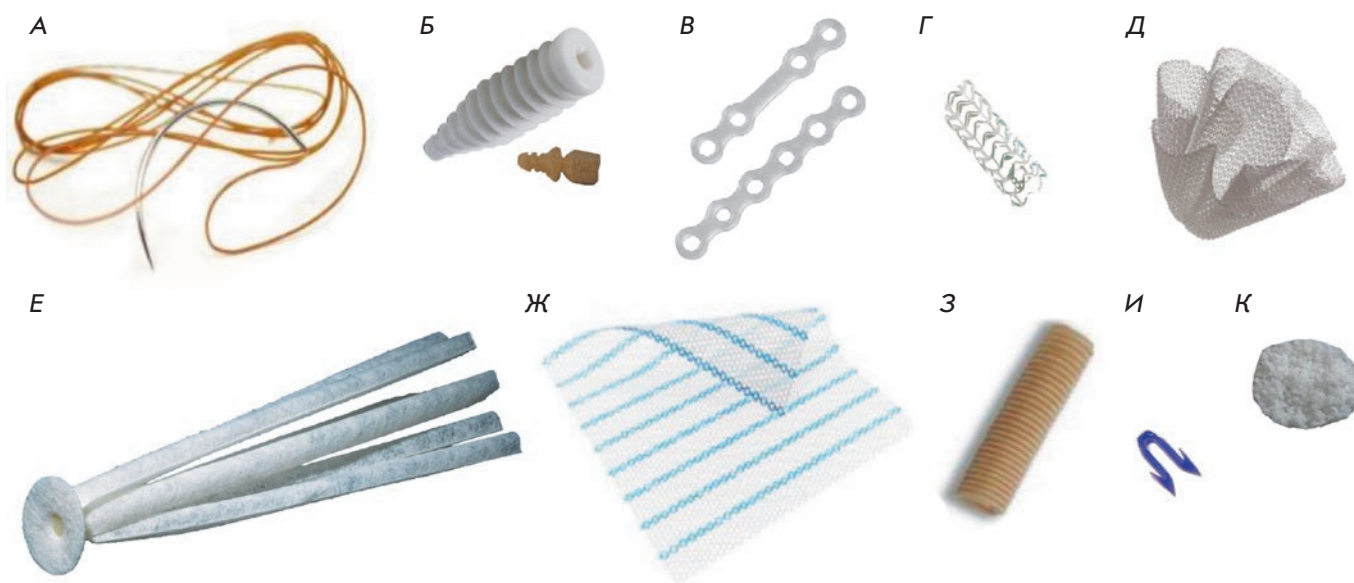


Рис. 2. Применяющиеся в медицинской практике и разрабатываемые медицинские изделия на основе синтетических и природных ПОО. А – биоразлагаемые шовные нити на основе ПГК (Ethicon, Johnson & Johnson, США); Б – биоразлагаемый интерференциальный шуруп для костной фиксации на основе ПМК с пластификатором Osteotwin™ (Biomatlante, Франция); В – биоразлагаемые пластины для костной фиксации LactoSorb® на основе ПМГК (Biomet, США); Г – биорассасывающийся кардиоваскулярный стент-эндопротез Absorb на основе ПМК (Abbott, США); Д – биорассасывающийся тканый плаг-эндопротез для герниопластики Phasix Plug на основе ПЧОБ (C.R. Bard Inc., США); Е – биорассасывающийся плаг-эндопротез для колопроктологии Gore Bio-A fistula plug на основе ПМК (W. L. Gore & Associates Inc., США); Ж – частично биоразлагаемый сетчатый эндопротез для герниопластики на основе тканого материала из монофиламентных нитей из полипропилена и ПМГК Ultrapro Advanced™ (Ethicon, Johnson & Johnson, США); З – эндопротез-гид на основе тканого материала из ПГК для сращивания нервов GEM Neurotube (Synovis Micro Companies Alliance, США); И – биоразлагаемая скрепка на основе ПМК для автоматического степлера для сшивания кожи и мягких тканей (Ethicon, Johnson & Johnson, США); К – биоразлагаемая биополимерная мембрана для замещения дефектов мягких и хрящевых тканей ЭластоПОО на основе ПООБ (АО «БИОМИР сервис», г. Краснознаменск, Московская область, РФ)

зы, каркасные проводники для регенерации нервов, искусственные клапаны сердца и другие изделия. ПОО используются и в фармацевтике как компонент новых лекарственных форм, придающий им такие свойства, как направленная доставка, пролонгированное действие, сниженная токсичность, увеличенная стабильность [1–4] (рис. 2).

Несмотря на то что уникальное сочетание свойств присуще всем представителям класса ПОО, в большинстве случаев в медицине используют такие синтетические ПОО (сПОО), как поли-2-оксипропановая (полимолочная кислота, или полилактид), поли-2-оксиуксусная (полигликолевая кислота, или полигликолид), их сополимеры – полимолочно-со-полигликолевые кислоты (полилактид-со-гликолиды) (ПМГК), поли-6-оксикапролактон и поли-*n*-диоксанон (рис. 1). Это связано с гораздо более масштабным использованием химического синтеза для получения полимеров медицинского назначения и более ранней разработкой способа промышленного получения

сПОО (ПМК, ПГК, ПКЛ и их сополимеров), более ранней сертификацией, проведением доклинических и клинических испытаний и введением этих полимеров в клиническую практику (в 70-х и 80-х гг. прошлого века). Важную роль сыграло также удобство применения этих полимеров, в частности, их быстрая биодegradация в тканях человека [4–6].

Однако ПМК, ПГК и их сополимеры являются синтетическими аналогами природных полиоксикапролатов, поли-3-оксикапролатов (пПОО). И хотя синтетические ПОО (в том числе ПМК, ПГК, ПМГК, ПКЛ) довольно часто называют биополимерами, имея в виду их способность к биодegradации и биосовместимость, это не вполне корректно, так как биополимерами принято называть полимерные продукты жизнедеятельности живых организмов: бактерий, растений, грибов, животных, т.е. биомакромолекулы природного происхождения [7]. Так, поли-3-оксикапролаты являются запасными полимерами многих видов бактерий [1], тогда как сПОО (ПМК, ПГК, ПМГК, ПКЛ и др.) в при-

роде не встречаются [4, 8], хотя методами генетической инженерии с использованием бактериальных штаммов-продуцентов синтезированы сополимеры поли-3-оксибутирата с полимолочной кислотой [9, 10], но это лишь подтверждает их искусственное происхождение. Тем не менее, основные свойства этих полимеров сходны, хотя имеются и важные отличия, уже указанные выше.

Природные поли-3-оксиалканоаты представляют собой полиэферы 3-оксиалкановых кислот, соответственно ПОб является линейным полиэфиром R-формы 3-оксимасляной кислоты (рис. 1). Различия разных пПОА определяются наличием бокового радикала: поли-3-оксибутирата, поли-3-оксивалерата, поли-3-оксигексаноата, поли-3-оксиоктаноата и т. д. (рис. 1). Все они довольно сильно различаются по своим физико-химическим свойствам, таким, как кристалличность, температуры плавления и стеклования, гидрофобность, пластичность, модуль упругости и другим. Причем при биосинтезе в бактериях образуются, как правило, не чистые гомополимеры поли-3-оксивалерата, поли-3-оксигексаноата и других более длинноцепочечных мономеров ПОА, а их блок-сополимеры с ПОб: поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат (ПОбВ), поли-3-оксибутират-со-3-гексаноат (ПОбГк), поли-3-оксибутират-со-3-оксивалерат-со-3-оксигексаноат (ПОбВГк), поли-3-оксибутират-со-3-оксиоктаноат (ПОбОк), поли-3-оксибутират-со-4-оксибутират (ПОб4Об) и др., но свойства этих сополимеров сильно отличаются от свойств ПОб и значительно зависят от мономерного состава этого сополимера [11–13].

Как правило, для изучения биомедицинских свойств, в том числе биологической активности различных ПОА, проводят тестирование одного из материалов, предназначенного для разработки какого-то определенного медицинского изделия, т.е. используют технический подход. Но что, если рассмотреть биомедицинские свойства ПОА на примере ПОб как природного родоначальника практически всех ПОА, используемых в медицине, с точки зрения тех функций, которые этот биополимер выполняет в природе? Т.е. использовать такое интересное направление в биологии, как биомиметика [14], тем более, что биомиметический подход в последнее время все активнее применяют для изучения различных полимеров [15].

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ ПОЛИОКСИАЛКАНОАТОВ

Биосовместимость полиоксиалканоатов и их биологическая активность

Как правило, природные биополимеры, такие, как белки и пептиды, полисахариды, липиды, ну-

клеиновые кислоты, полипренолы, а также их сополимеры обладают выраженной биологической активностью, непосредственно связанной с их специализированными функциями: ферментативной, регуляторной, сигнальной, защитной, транспортной и многими другими. Более того, даже такие биополимеры, как липополисахариды или пектины, выполняющие «нейтральные» функции – структурную или запасную, также могут обладать выраженной биологической активностью [16]. Соответственно медицинские изделия и лекарственные препараты на основе некоторых из этих биополимеров (коллагена, хитозана, полилизина) могут проявлять биологическую активность, иногда нежелательную, например, иммуноксичность [17]. Однако, несмотря на интенсивное исследование, вопрос биологической активности как синтетических, так и природных ПОА остается противоречивым и недостаточно изученным. С одной стороны, активное применение ПОА в медицине во многом обусловлено их высокой биосовместимостью, отсутствием или низким уровнем их токсичности, что, тем не менее, не исключает наличия биологической активности у этих полимеров [17]. Вместе с тем, основной причиной использования ПОА в медицине является их способность к биодegradации. Однако сам процесс биодegradации полимеров предполагает активное взаимодействие между полимером и окружающими его живыми клетками и тканями, зачастую участвующими в этом процессе, а также воздействие на клетки и ткани не только самого полимера, но и продуктов его биодegradации – олигомеров и мономеров. Кроме того, появляется все больше данных о собственной биологической активности ПОА по отношению к различным клеткам и тканям человека и лабораторных животных.

Все основные ПОА как синтетические (ПМК, ПГК, ПМГК и ПКЛ), так и природные ПОб, (ПОбВ, ПОбГк, П4Об) обладают довольно хорошей биосовместимостью по сравнению со многими другими материалами, достаточной для применения этих биоразлагаемых полимеров, в том числе, для изготовления имплантируемых изделий, контактирующих с мягкими тканями, костью и кровью согласно ISO 10993 [2, 4, 17, 18]. Однако сопоставление тканевой реакции ПОб и синтетических полиэфиров ПЛА, ПГА или их сополимеров выявило легкую или умеренную тканевую реакцию на ПОб [2, 3], тогда как ПЛА, ПГА и ПЛГА нередко вызывали выраженную хроническую воспалительную реакцию [18]. В большинстве случаев ПОб и его сополимеры характеризовались хорошей биосовместимостью при использовании в качестве имплантируемых биоматериалов [19–21]. Стандартное определение тканевой реакции на подкожную имплантацию ПОб и его

сополимеров в виде пленок, применяемое в протоколах доклинических исследований, выявляет слабую или умеренную реакцию на чужеродный материал. В течение одного месяца формируется тонкая фиброзная капсула (около 100 мкм), которая, как показано, рассасывается после биодеградации образцов [19–22]. Во многих работах выявлено малое количество лимфоцитов или практически полное их отсутствие (в частности, Т-лимфоцитов) в области имплантации ПОБ, что свидетельствует о значительном снижении или отсутствии иммунной реакции на этот полимерный биоматериал [23–26]. Показано, что подвергнутые глубокой очистке ПОБ и ПОБВ обладают также хорошей гемосовместимостью, что позволяет использовать их для получения изделий, контактирующих с кровью: заплат стенки перикарда, легочной артерии и правого предсердия, биоразлагаемых кардиоваскулярных стентов [25–30]. Но особенно ярко биосовместимость ПОБ проявляется при использовании изделий на его основе, например, пористых матриксов для регенерации костной ткани. При имплантации изделий из ПОБ в область дефекта костной ткани не происходит присущее многим биомедицинским материалам (например, ПМК) образование соединительнотканной капсулы, изолирующей полимерный материал от костной ткани, т.е. ПОБ полностью интегрируется в костную ткань. В случае имплантации пористого матрикса из ПОБ наблюдается активная васкуляризация матрикса и образование в порах матрикса островков (балок) новой костной ткани из грануляционной ткани [23, 24, 31]. Определение уровня экспрессии различных цитокинов и других белков-маркеров воспаления в области имплантации изделий из ПОБ (и его сополимера ПОБВ) выявило сниженный (по сравнению с другими материалами) уровень экспрессии провоспалительных цитокинов (интерлейкинов, фактора некроза опухоли, белка хемоаттрактанта моноцитов, индуцибельной NO-синтазы, С-реактивного белка) и повышенную экспрессию генов различных белков (коллагена I, кавеолина-1, цитокератина, гепарансульфатпротеогликана, тромбомодулина, простациклина) – маркеров регенеративных процессов в тканях сердца и сосудов, кишечника, нервной, костной ткани [23, 25, 27, 28, 32–35]. Однако в некоторых случаях наблюдалась хроническая воспалительная реакция на имплантацию изделий из ПОБ, например, прототипов стентов-эндопротезов. Следует отметить, что эти изделия получены плавлением или могли быть плохо очищены [36, 37]. На биосовместимость ПОБ и его сополимеров, как и в случае биодеградации, может сильно влиять способ формования изделий из этого полимера, особенно при использовании экструзии или формования из расплава. Плавление

вызывает перекристаллизацию полимера и резко замедляет диффузию воды в полимерной матрице, а именно вода играет ключевую роль в формировании ультраструктуры ПОБ, которая сильно влияет на его биологические свойства [38].

Благодаря своей высокой биосовместимости ПОБ представляет собой перспективный материал для клеточной биологии и инженерии. Хороший уровень клеточной адгезии, пролиферации и жизнеспособности в ходе культивирования *in vitro* на пленках или пористых матриксах из ПОБ проявляют различные клетки млекопитающих: фибробласты человека и мыши, мезенхимальные стволовые клетки (МСК) крысы, мыши и человека, остеобласты костной ткани кролика, остеогенные клетки саркомы человека, хондроциты суставного хряща кролика и клетки гладкой мускулатуры кролика [3]. Нано- и микрочастицы из ПОБ и его сополимеров не оказывают цитотоксического эффекта на различные клетки вплоть до концентрации 1 мг/мл [39, 40], а к их эндоцитозу способны не только макрофаги, но и остеобласты, фибробласты и опухолевые эпителиальные клетки [41–45]. Тогда как цитотоксичность наночастиц из ПМК и ПМГК не проявлялась лишь до концентрации 66–100 мкг/мл, но была выраженной при концентрации более 100 мкг/мл [41, 46]. Водорастворимые олигомеры ПОБ, состоящие примерно из 25 остатков 3-оксибутирата, конъюгированных с липоевой кислотой, также не оказывали цитотоксического действия *in vitro* на кератиноциты в концентрации до 9 мкг/мл [47].

Благодаря своей высокой биосовместимости ПОБ и другие ПОА могут использоваться для изготовления различных конструкций (пористых матриксов, микросфер, каркасов) для экспериментального моделирования 3D-роста *in vitro* различных клеток человека и млекопитающих: мезенхимальных стволовых клеток, фибробластов, различных линий опухолевых клеток, что позволит создавать экспериментальные модели различных заболеваний, прежде всего опухолей [48] (рис. 3).

Вместе с тем, следует принимать во внимание, что такие характеристики полимеров, как химический состав, морфология поверхности, поверхностная энергия и гидрофобность, оказывают большое влияние на жизнеспособность клеток и их рост [49], например, химическая обработка поверхности изделий из ПОБ способствует росту клеток на них [3].

Биодеградация полиоксисилканоатов и их биологическая активность

Скорость биодеградации широко используемых сПОА, ПМК и ПГК значительно выше, чем других ПОА, так как она происходит преимущественно путем гидролитической деструкции. Такой механизм

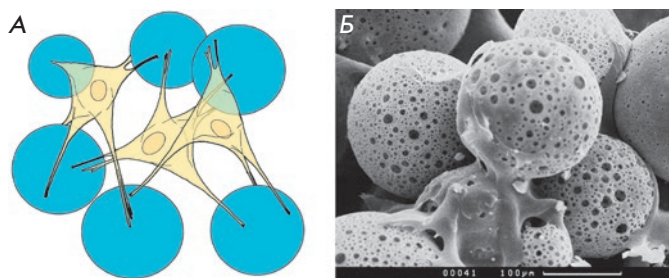


Рис. 3. Экспериментальная модель *in vitro* 3D-роста мезенхимальных стволовых клеток на микросферах из ПОб: схема (А) и микроскопическое изображение (СЭМ, $\times 300$) (Б) роста клеток на микросферах

деструкции сПОА является причиной многих проблем их медицинского использования. Так, продукты деградации ПМК, ПГК и ПМГК, образующиеся в процессе быстрого гидролиза, не успевают утилизироваться в организме, и вблизи имплантата резко снижается рН. Хроническое раздражение ткани в результате снижения рН считается серьезной проблемой применения полимерных имплантатов на основе ПМК, ПГК и ПМГК, оптимальное решение которой не найдено до сих пор [18]. Хроническое воспаление как ответ на деструкцию полилактидов и полигликолидов может усугубляться иммунным ответом на высвобождение нестереорегулярных водорастворимых олигомеров – продуктов деградации полимеров данного класса [18, 50]. Показана цитотоксичность продуктов гидролитической деструкции ПМК и ПГК [18, 41, 46]. В формировании воспалительной реакции на имплантированный ПМГК большую роль играют дендритные клетки, которые этот полимер способен активировать [51]. Такой воспалительный ответ является, в частности, одной из причин торможения биодеградации внутрикостных имплантатов из этих полимеров благодаря их «консервации» в соединительнотканной капсуле, что вызывает различные осложнения: миграцию имплантатов в кости, образование свищей, отторжение имплантата и др. [18]. Чтобы устранить хроническое воспаление приходится прибегать к различным ухищрениям. Так, в изделия из ПМГК вводят противовоспалительные лекарственные средства (дексаметазон, куркумин) [52, 53], антитела к провоспалительным цитокинам (интерферону- γ) [54], используют мезенхимальные стволовые клетки [51].

Природные поли-3-оксиалканоаты гораздо более устойчивы к гидролизу в водной среде [55], в том числе в присутствии различных эстераз [55–57], причем в живых тканях скорость биодеградации может быть многократно выше, чем в водной среде в модельных

условиях *in vitro*, даже в присутствии липолитических ферментов (например, липазы) в высоких концентрациях [22].

Появляется все больше данных в пользу того, что биодеградация ПОб и его сополимеров происходит преимущественно за счет фагоцитирующей активности специализированных клеток – макрофагов, а также гигантских клеток инородных тел (ГКИТ) и остеокластов, т.е. имеет место специализированная биодеградация этих полимеров. Введение в организм изделий из ПОб и его сополимеров вызывает привлечение в область повреждения макрофагов, которые плотно покрывают полимерный материал при формировании вокруг него соединительнотканной капсулы и активно участвуют в процессах его биодеградации. Полимерный биоматериал подвергается воздействию межклеточной жидкости и клеток, что может приводить к отщеплению от него микро- и наночастиц, олигомеров и мономеров [3, 19, 57–59]. Причем клетки вызывают поверхностную эрозию полимера, без существенного изменения его физико-химических свойств, которое происходит при гидролитической деструкции полимера в объеме. Показано, что после удаления макрофагов и ГКИТ на поверхности полимера оставались следы эрозии в виде углублений диаметром 20–50 мкм [25, 26, 60, 61]. Низкая скорость биодеградации приводит к снижению концентрации продуктов распада вблизи имплантата, среди которых в случае ПОб доминирует 3-гидроксимасляная кислота, гораздо более слабая ($pK_a = 4.41$), чем основной продукт биодеградации ПМК и ПМГК – молочная кислота ($pK_a = 3.73$). Соответственно при биодеградации ПОб и его сополимеров не происходит закисления среды [18–20].

При этом наблюдается активация макрофагов полимерным материалом, что способствует их фагоцитирующей активности [36, 40, 62]. Важную роль играет адгезия макрофагов на поверхности полимерного материала. Показано, что биодеградация полимерных мембран происходит только тогда, когда на их поверхности адгезируются макрофаги. Если же макрофаги не имеют физической возможности прикрепиться к мембране, то деградации полимера не происходит [63]. Макрофаги и остеокласты прочно прикрепляются к полимерным пленкам ПОб и пролиферируют на них [62]. Отмечено значительное увеличение экспрессии липаз двух типов после 7 и 14 дней контакта ПОб с тканями животных, при этом в печени увеличивалась экспрессия липаз этих же типов. Более того, наблюдалось повышение синтеза таких расщепляющих ферментов, как липаза 1-го типа, липаза 2-го типа, амилаза, химотрипсин и трипсин в стенке желудка непосредственно в области контакта тканей с заплатой на основе ПОб [34].

В тканях крыс найдены два фермента, расщепляющих ПОБ: сериновая эстераза печени с максимальной активностью в щелочной среде (рН 9.5) и эстераза почек, активная в нейтральной среде [64]. В опытах с частицами ПОБ низкой молекулярной массы показано участие макрофагов в биодegrадации ПОБ [40]. Установлено, что макрофаги и в меньшей степени фибробласты способны фагоцитировать частицы ПОБ размером 1–10 мкм. При высоких концентрациях частиц ПОБ (>10 мкг/мл) фагоцитоз сопровождается токсическим действием и изменением функционального состояния макрофагов, но не фибробластов [40], тогда как наночастицы (15–250 нм) из ПОБ и его сополимеров не оказывали значительного цитотоксического действия на макрофаги даже при такой большой концентрации, как 1 мг/мл, в отличие от наночастиц ПМК [41]. Фагоцитоз микрочастиц ПОБ сопровождался увеличением продукции оксида азота (NO) и фактора некроза опухолей альфа (TNF- α) в активированных макрофагах, а при фагоцитозе большого количества микрочастиц происходила гибель макрофагов. Показано также, что фагоцитоз частиц ПОБ постепенно снижается благодаря активному процессу биодegrадации ПОБ [40]. Интересно, что к эндоцитозу микрочастиц из низкомолекулярного ПОБ *in vitro* способны не только макрофаги, но и остеобласты. Причем при сокультивировании этих клеток фагоцитирующую способность остеобластов, как и их остеогенную активность (активность щелочной фосфатазы), стимулировали макрофаги, фагоцитирующие полимерные микрочастицы [40].

Таким образом, контакт с живыми тканями полимеров даже с высокой биосовместимостью может сочетаться с развитием естественной воспалительной реакции организма на имплантацию чужеродного тела, активацией макрофагов и остеокластов при расщеплении ими полимера. Однако следует отличать такую биологическую активность ПОА от собственной биологической активности полимеров, связанной с их специфическими свойствами.

Собственная биологическая активность полиоксисилканоатов

ПОБ и его сополимеры, по-видимому, обладают и собственной биологической активностью. Они, как уже отмечено, активируют при имплантации клетки иммунной системы, вызывая секрецию ими провоспалительных цитокинов [34, 35], что характерно для обычной тканевой реакции на имплантацию практически любых материалов, особенно биодegrадируемых. Показано, что изделия из ПОБ (неплетеные заплатки, пористые матриксы) способствуют регенерации тканей различных органов: костной, сердца и сосудов, нервов, кишечника. Использование

изделий из ПОБ приводит к высокой васкуляризации в зоне восстановления дефектов ткани [23–28, 32, 35, 65]. На критических (теменная кость черепа крысы) и некритических (бедренная кость крысы) моделях костных дефектов показано, что пористые матриксы из ПОБ способствуют регенерации костной ткани. На всех стадиях регенерации костного дефекта отмечена минимально выраженная тканевая реакция на имплантацию, связанная с постепенной биорезорбцией полимерного материала, активная васкуляризация матриксов и прорастание образующейся костной ткани в порах матрикса из ПОБ. На регенерацию костной ткани в матриксе из ПОБ указывает также экспрессия остеогенных маркеров, например, коллагена типа I [23, 24]. Мы наблюдали равномерное появление новообразующейся костной ткани по всему объему пористого биополимерного матрикса в виде островков, а не с краев, при этом вокруг биополимерного материала не образовывалась фиброзная капсула, что указывает на его полную интеграцию с костной тканью [24, 65]. Все это свидетельствует о превосходной биосовместимости ПОБ с костной тканью, о выраженной остеокондуктивной и даже остеоиндуктивной способности. Биологическую активность ПОБ и его сополимеров, полученных бактериальным биосинтезом, связывают с возможностью плохой очистки полимерного материала от бактериального липополисахарида или ДНК. Однако даже очень хорошо очищенный полимер способен активировать клеточный ответ [36].

Биологическая активность пористых матриксов из ПОБ и его сополимеров (ПОВВ, ПОВГк, ПОВВГк) показана и на клеточном уровне *in vitro*. Так, терполимер ПОВВГк стимулировал пролиферацию линии HaCaT кератиноцитов человека при росте на полимерных пленках, полученных осаждением из раствора. Исследование механизма стимуляции пролиферации клеток с использованием наночастиц из этого биополимера показало, что добавление наночастиц из ПОВВГк в концентрации 0.02–0.1 г/л стимулировало увеличение тока ионов кальция в цитоплазму, что является одним из основных сигнальных путей активации деления клеток. Продукт дегградации ПОА мономер 3-гидроксипропанат (*D*-3-гидроксимасляная кислота, ЗГБ) также самостоятельно вызывает активацию пролиферации кератиноцитов линии HaCaT человека и фибробластов мыши L929 в концентрации от 0.01 до 0.1 г/л (0.1–1.0 мМ) по механизму увеличения концентрации ионов кальция в цитоплазме клетки, а также подавляет апоптоз и некроз фибробластов [66–68]. Подобная активность ЗГБ неудивительна, поскольку это кетонное тело – естественный метаболит млекопитающих, обладающий выраженной биологической активностью [16]. Однако биоло-

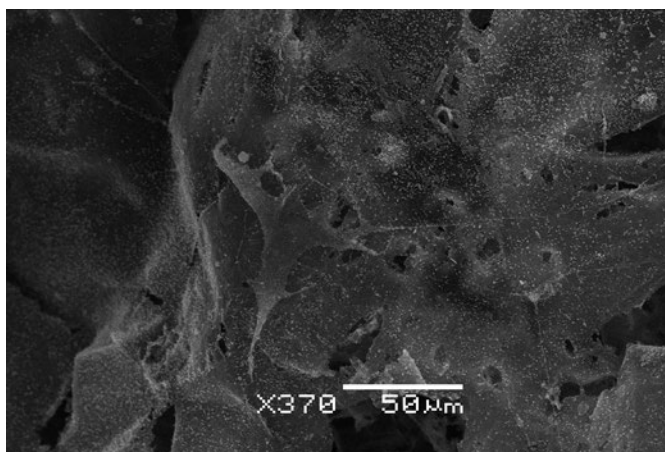


Рис. 4. Мезенхимальная стволовая клетка на матриксе из ПОБ на 21 сутки культивирования, обладающая морфологией остеобласта, и отложения вокруг нее солей кальция на матриксе. Сканирующая электронная микроскопия, $\times 370$

гической активностью могут обладать не только ЗГБ, но и олигомеры ПОА. Так, олигомеры ПОБ и его сополимеры с 4-оксибутиратом и 3-оксигексаноатом (с длиной цепи 20–25 мономеров) не токсичны для клеток (до концентрации 20 мкг/мл) и стимулируют пролиферацию, подавляют апоптоз, выброс кальция в цитоплазму и образование межклеточных контактов между бета-клетками поджелудочной железы мышей [69].

Показано, что скаффолды из ПОБ и его сополимеров (ПОБВ, ПОБГк) стимулируют дифференцировку остеобластов и мезенхимальных стволовых клеток человека, крысы, кролика (выделенных как из жировой ткани, так и из костного мозга) в остеогенном направлении при росте клеток на них [23, 24, 39, 63, 70–72]. Дифференцировка МСК при росте на скаффолдах из пПОА подтверждена изменением морфологии клеток (рис. 4), угнетением их пролиферации, увеличением активности щелочной фосфатазы, отложением солей кальция в клетке [24, 39, 70–72] и экспрессией маркеров остеогенной дифференцировки и формированием костной ткани (щелочной фосфатазы, коллагена типа 1, *Runx2*, остеокальцина, остеопонтин) с помощью иммуноферментных методов и ПЦР [23, 24, 70]. Впрочем, в некоторых работах индукция остеогенной дифференцировки при росте эмбриональных предшественников остеобластов на матриксах не была подтверждена [73]. Здесь необходимо отметить, что значительное влияние на рост и дифференцировку МСК могут влиять их физико-химические свойства, а также микроструктура и топография конструкций из этих полимеров, на которых растут клетки. Этот эффект

может даже нивелировать воздействие биоактивных молекул, стимулирующих рост или дифференцировку клеток в том или ином направлении [49, 74, 75]. Влияние ПОА на дифференцировку МСК также может быть связано с биоактивностью продукта их биодegradации – ЗГБ. Так, ЗГБ в концентрации 0.005–0.1 г/л (0.05–1 мМ) вызывает остеогенную дифференцировку остеобластов мыши линии МС3Т3-Е1, определенную по увеличению активности щелочной фосфатазы, отложению кальция (тест на краситель Ализариновый красный S) и экспрессии остеокальцина. Остеоиндуктивное действие ЗГБ *in vivo* показано на модели остеопороза у самок крыс с удаленными яичниками. Тем не менее, ЗГБ в меньших концентрациях не оказывал подобного действия, а при медленной биодegradации ПОА ЗГБ образуется в концентрациях, гораздо меньших 0.05 мМ [76]. ПОБГк вызывает также дифференцировку МСК в хондрогенном направлении, что показано по изменению экспрессии хондрогенных генов-маркеров МСК: агрегана, *col2*, *sox9*, *col10* и *pthrp* [74]. В других исследованиях показано, что ПОБ, ПОБГк, ПОБВГк, ПОБО и их композиты, а также ПМК стимулируют дифференцировку МСК в нейрогенном направлении, что выражается в изменении морфологии клеток и экспрессии ими генов специфических белков: нестина, фибриллярного кислого белка глии и β III-тубулина [77, 78]. Теоретически это могло быть связано с показанным ранее нейропротективным действием ЗГБ, если бы не тот факт, что позитивное воздействие ЗГБ на нервную систему обусловлено питательной (энергетической) функцией жирных кислот, в том числе ЗГБ, в нейронах и проявляется при очень больших дозах этих веществ [79]. Однако показано также, что ЗГБ стимулирует образование целевых контактов между нейронами для передачи электрического сигнала, чем может объясняться вызываемое им улучшение памяти и обучаемости [80]. Интересно, что реализация эффектов ПОА на пролиферацию, дифференцировку и апоптоз клеток может осуществляться через интегрины – молекулы межклеточных контактов и распознавания. Дифференцировка МСК и апоптоз остеобластов осуществляются по каскадному механизму, который запускается при взаимодействии ПОА с интегринными на поверхности клетки [81, 82].

БИОЛОГИЧЕСКАЯ АКТИВНОСТЬ И ПРИРОДНЫЕ ФУНКЦИИ ПОЛИ-3-ОКСИБУТИРАТА

Поли-3-оксибутират как запасной полимер бактерий

Природные поли-3-оксиалканоаты возникли в процессе эволюции, прежде всего, как резервные биопо-

лимеры, т.е. такие полимеры, которые предназначены для биодegradации ферментными системами живых организмов с целью извлечения из них энергии и углерода для обеспечения жизнедеятельности клеток и биосинтеза ими других биомолекул. Способность к синтезу резервных пПОА, преимущественно ПОБ, широко распространена у прокариот, сотни видов бактерий используют этот биополимер в качестве запасного вещества. Для большинства микроорганизмов накопленные пПОА служат источником углерода и энергии при их недостатке. Бактерии, способные к синтезу пПОА, запасают биополимер в цитоплазме в виде дискретных включений (гранул) обычно от 100 до 800 нм в диаметре (рис. 5). Роль пПОА, прежде всего ПОБ, как резервного материала бактерий подробно освещена в обзоре Anderson и Dawes [83].

Более того, к синтезу ПОБ способны или обладают ферментами (и их генами) его биосинтеза (прежде всего, ПОА-полимеразой) симбиотические и инфекционные бактерии человека, такие, как *Agrobacterium*, *Clostridium*, *Ralstonia*, *Bacillus*, *Burkholderia*, *Vibrio*, *Legionella*, *Pseudomonas*, *Mycobacterium*, *Acinetobacter*, *Sphingomonas*, *Fusobacterium*, *Neisseria*, *Streptomyces*, *Bordetella*, *Rickettsia*. Некоторые из этих бактерий, например *Pseudomonas sp.*, способны к синтезу не только ПОБ, но и различных его сополимеров [84]. Многие из этих бактерий формируют значительную долю нормальной микрофлоры кишечника, играющего важнейшую роль в формировании иммунитета человека, и других органов (ротовой полости, легких, кожи) или являются возбудителями многих широко распространенных инфекционных заболеваний. Соответственно иммунная система человека распознает антигены этих бактерий, вероятно, с момента формирования иммунитета в младенчестве. Одним из таких обычных и привычных для иммунитета антигенов является ПОБ, чем, по-видимому, можно объяснить высокую биосовместимость этого биополимера и его синтетических аналогов, близких по своей структуре и физико-химическим свойствам. Однако с липополисахаридом иммунная система также контактирует на этапе формирования иммунитета, что не мешает этому биополимеру быть мощным стимулятором иммунитета. А ПОБ является таким же продуктом как симбиотических, так и инфекционных бактерий. Возможно, в организме человека ПОБ выполняет какую-то функцию, отличную от функции запасного вещества у представителей микрофлоры.

Эндогенный поли-3-оксибутират в тканях животных и его предполагаемые функции

Вопреки мнению, что ПОБ синтезируется только в клетках прокариот, этот биополимер обнаружен

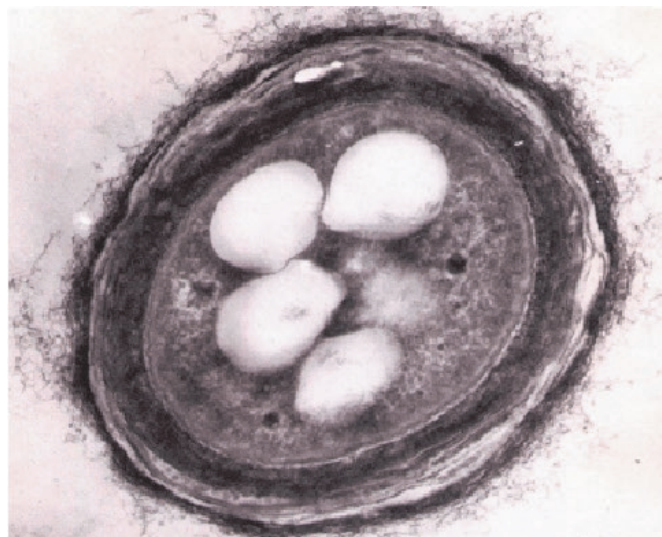


Рис. 5. Штамм-продуцент ПОА *Azotobacter chroococcum* 7Б с гранулами ПОБ в бактериальной клетке в процессе биосинтеза биополимера (сканирующая электронная микроскопия, $\times 50000$)

группой Reusch у организмов практически всех типов [85]. Короткоцепочечный комплексообразующий ПОБ (кПОБ, не более 30 мономеров 3-оксибутирата) и среднецепочечный, или олиго-ПОБ (оПОБ, 100–200 мономеров 3-оксибутирата), найдены в различных органах и тканях млекопитающих, включая человека (а также коровы, овцы, свиньи) и птиц (курицы, индейки), – в крови, мозгу, сердце, печени, почках, сосудах, нервах, липопротеиновых частицах, тромбоцитах и др. Концентрация кПОБ/оПОБ варьирует от 3–4 мкг/г в нервных тканях и мозгу до 12 мкг/г в плазме крови. Концентрация оПОБ в плазме крови человека может изменяться в достаточно широких пределах – от 0.6 до 18.2 мкг/мл при усредненном значении 3.5 мкг/мл [85]. Следует отметить, что промежуточный продукт биодegradации ПОБ – ЗГБ – является так называемым кетоновым телом. В норме он содержится в крови и тканях млекопитающих в концентрациях 0.3–1.3 мМ, а при патологических состояниях и намного выше [86].

Reusch с соавт. [85] предполагают, что ПОБ, помимо роли запасного вещества и энергетического депо у бактерий, выполняет также и различные регуляторные функции у эукариот и прокариот. При этом ПОБ (а именно короткоцепочечные кПОБ и оПОБ) влияет на функционирование белковых рецепторов и каналов, а также ДНК путем образования с ними как нековалентных, так и ковалентных связей. Наличие ПОБ в различных тканях человека эти исследователи объясняют существованием неких биохимических

механизмов синтеза этого биополимера. Показано, что кПОБ и оПОБ образуют нековалентные комплексы с неорганическими полифосфатами и ионами кальция, которые могут функционировать как небелковые каналы, способные к проведению неорганических ионов через плазматическую мембрану. Эти структуры образуют также нековалентные комплексы с белками ионных каналов и входят в их состав, а также влияют на функции рецепторов и каналов за счет ковалентного связывания. Так, олигомеры ПОБ ковалентно связываются с кальциевой АТФ-азой плазматической мембраны эритроцитов человека, формируя одновременно комплекс с неорганическими фосфатами [86]. Получены косвенные подтверждения существования определенной физиологической функции у конъюгатов кПОБ с белками. Так, активность противоопухолевых пептидов DP18L усиливается при их конъюгации с 3-гидроксидеканоатом [87].

Предполагаемые функции поли-3-оксибутирата в микробиоте животных

Однако ПОБ может выполнять и другие функции в организме человека, не требующие его обязательного синтеза. Можно предположить, что ПОБ каким-то образом участвует во взаимодействии бактерий микробиоты кишечника, где этот биополимер синтезируется, с клетками иммунной системы и эпителием слизистой кишечника. В пользу этой версии свидетельствует особая роль ПОБ в симбиозе бактерий микробиоты и организма животного-хозяина. Например, синтез ПОБ играет важную роль во взаимодействии бактерий рода *Burkholderia* с их организмом-хозяином клопом *Riptortus pedestris*, повышая устойчивость бактерий к иммунной системе этого клопа [88]. Показано также, что биосинтез ПОБ имеет большое значение для микробиоты голотурии (морской огурец) *Apostichopus japonicus*. Синтез ПОБ, по-видимому, модулирует микробиоту голотурии, что способствует многократному увеличению размеров животного [89]. Заслуживает внимания работа, в которой изучали способность гистамина регулировать синтез низкомолекулярного кПОБ у *Escherichia coli*. Гистамин играет важную роль как средство коммуникации бактерий с организмом-хозяином и регулятор иммунной системы кишечника, позволяющий бактериям быть «своими» для организма-хозяина, поэтому влияние гистамина на синтез кПОБ может свидетельствовать о вовлечении этого биополимера в процессы адаптации и сосуществования с организмом-хозяином [90]. Более того, показана эффективность ПОБ при инфекционных заболеваниях: использование в качестве корма порошка ПОБ защищало рачков *Artemia nauplii* от заболевания, вызываемого *Vibrio campbellii*, причем эффективность

ПОБ была в 100 раз выше, чем у 3-гидроксимасляной кислоты [91]. Кроме того, ПОБ способен подавлять не только *Vibrio sp.*, но также *E. coli* и *Salmonella sp.* [92]. Показано также, что продукты биodeградации некоторых пПОА, например, 3-гидроксиоктаноат, обладают антимикробной активностью в отношении целого ряда грамотрицательных и грамположительных бактерий, а также ингибируют продукцию метаболитов, ассоциированных с патогенной активностью этих бактерий, тогда как для цитотоксического воздействия на фибробласты человека необходима значительно большая концентрация пПОА [93].

На возможность того, что ПОБ может выполнять какие-то сигнальные функции в организме, указывает также и такой интересный факт, что димеры и тримеры 3-оксибутирата являются половыми феромонами у пауков [94]. Не исключено, что эти феромоны могут быть продуктами биосинтеза бактериями микробиоты членистоногого. Так, например, у жуков *Costelytra zealandica* половым феромоном является фенол, который синтезируется из тирозина в специальных железах симбиотическими бактериями *Morganella morganii* [95]. Димеры и тримеры 3-оксибутирата обнаружены у гриба *Hypoxylon truncatum*, однако механизм их синтеза не установлен [96].

На основе П4ОБ и ПОБ4ОБ получают целый ряд биоразлагаемых медицинских изделий: хирургических нитей, тканых сетчатых эндопротезов и плаг-эндопротезов, скаффолдов для регенерации мягких тканей. Благодаря измененной химической структуре П4ОБ, как ПМК и ПГК, подвергаются преимущественно гидролитической деградации. В природе этих полимеров не существует, их получают биотехнологическим путем с помощью биосинтеза генетически модифицированным штаммом-продуцентом *E. coli* K12. Мономер П4ОБ – 4-гидроксибутират (γ-оксимасляная кислота), как и 3-оксибутират, является естественным метаболитом и одним из нейромедиаторов, который используется как мощное психоактивное вещество и даже входит в перечень наркотических средств [97].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, наблюдаемая многими исследователями биологическая активность ПОА, например, способность этих полимеров стимулировать регенерацию костных и хрящевых тканей, может быть связана не только с физико-химическими свойствами ПОА или со структурой изделий на их основе, но и с наличием собственной активности ПОА, которая, в свою очередь, обусловлена природными функциями предшественника этих полимеров – ПОБ (таблица). Подобная связь имеется также и между способностью ПОА, используемых для изготовле-

Биологическая активность синтетических и природных ПОА в организме человека и природные функции поли-3-оксибутирата

Биологическая активность	Возможные причины	Природные функции
Активация макрофагов и остеокластов [36, 40, 63].	Способность к гидролитической и ферментативной деструкции [1–4, 19, 58–60]. Преимущественно клеточная биodeградация пПОА [25, 26, 61, 62].	Способность ПОБ к контролируемой биodeградации как внутриклеточного запасного вещества бактерий [83].
Стимуляция пролиферации клеток (кератиноцитов, фибробластов, бета-клеток) [67–70].	Собственная биоактивность пПОА [69, 81, 82] и ЗГБ [67, 68].	Возможная сигнальная функция ПОБ при взаимодействии бактерий микробиоты, его синтезирующих, с клетками иммунной системы и эпителием слизистой кишечника [88–90, 94]. Возможная функциональность эндогенного ПОБ [85]. Разнообразные функции кетонного тела ЗГБ и других 3-гидроксиалканоатов в организме млекопитающих [76, 79, 93].
Стимуляция дифференцировки остеобластов и МСК в остеогенном, хондрогенном и нейрогенном направлении [23, 24, 39, 63, 70–72, 77, 78].	Физико-химические свойства ПОА [24, 49, 71], микроструктура и топография изделий [74, 75], способность к биodeградации [1–4], собственная биоактивность пПОА [69, 81, 82] и ЗГБ [77, 80].	
Активация регенерации различных тканей (сердца и сосудов, кишечника, нервной, костной) [1, 2, 4, 23, 25, 27, 28, 32–35, 36].		
Хроническая воспалительная реакция (низкая [1–4, 19–35], выраженная [18, 36, 37]).	Защисление тканей продуктами биodeградации ПМК [18], иммунная реакция на сПОА с измененной химической структурой [18, 50, 51], плохая очистка, жесткая обработка полимеров (например, плавлением) [38, 49], микроструктура и форма изделий [18].	Низкая токсичность ПОБ как внутриклеточного запасного вещества бактерий [83]; низкая иммуногенность ПОБ благодаря его наличию у бактерий микробиоты млекопитающих [84] и возможному наличию эндогенного ПОБ у млекопитающих [85].
Цитотоксичность (низкая [1–4, 39–45, 47], выраженная [18, 41, 46]).	Защисление тканей продуктами биodeградации сПОА [18, 41, 46].	

ния медицинских изделий, к биodeградации в тканях человека и природной функцией ПОБ как запасного биополимера в бактериальной клетке, так как, чтобы выполнять свою функцию, запасное вещество должно обладать способностью к расщеплению клеточными ферментами. Возможно, что этот биополимер выполняет некие сигнальные функции в нашем организме, посредством которых бактерии микробиоты взаимодействуют с клетками иммунной системы, слизистой кишечника и других тканей, вызывая у них тот или иной физиологический ответ. Можно предположить, что структура ПОА, полученных с помощью как химического синтеза, так и биотехнологических методов, сходна со структурой ПОБ, что позволяет имитировать биологические свойства ПОБ, связанные с теми его функциями, которые этот биополимер приобрел в процессе долгой эволюции синтезирующих его организмов.

Несмотря на то что подавляющее большинство изделий и лекарственных форм на основе ПОА изготовлены из синтетических ПОА, уже разработаны и применяются несколько изделий на основе природных ПОА. Это, например, биополимерная мембрана для замещения дефектов мягких и хря-

щевых тканей ЭластоПОБ (АО «БИОМИР сервис», г. Краснознаменск, Московская область, РФ) [98] и композитный сетчатый эндопротез TerphaFLEX (Terpha Inc., США) Phasix™ Plug [97] (рис. 2). Незатихающий интерес к природным ПОА, используемым как в промышленности (упаковка, текстиль, косметика, бытовые изделия), так и в медицине доказывает также строящийся биотехнологический завод итальянской компании Bio-on (<http://www.bio-on.it/index.php>) для крупнотоннажного промышленного производства ПОБ и его сополимеров.

Таким образом, рассмотренная нами область науки требует глубокого и тщательного исследования, которое позволит установить природные функции используемых в медицине полимеров – биомиметических аналогов природных предшественников, и разработать новые природоподобные технологии создания полимерных медицинских изделий и лекарственных препаратов нового поколения. ●

Работа получила финансовую поддержку РФФИ офи-м (проект № 15-29-04856 в рамках раздела 1) и РФФИ офи-м (проект № 18-29-09099 в рамках разделов 2 и 3).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Mokhtarzadeh A., Alibakhshi A., Hejazi M., Omidi Y., Dolatabadi J.E.N. // *Trends Analyt. Chem.* 2016. V. 82. P. 367–384.
2. Lim J., You M., Li J., Li Z. // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2017. V. 79. P. 917–929.
3. Бонарцев А.П., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В., Кирпичников М.П. // *Биомед. химия.* 2011. Т. 57. № 4. С. 374–391.
4. Farah S., Anderson D.G., Langer R. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016. V. 107. P. 367–392.
5. Athanasiou K.A., Niederauer G.G., Agrawal C.M. // *Biomaterials.* 1996. V. 17. № 2. P. 93–102.
6. Middleton J.C., Tipton A.J. // *Biomaterials.* 2000. V. 21. № 23. P. 2335–2346.
7. Vert M., Doi Y., Hellwich K.H., Hess M., Hodge P., Kubisa P., Rinaudo M., Schue F. // *Pure Appl. Chem.* 2012. V. 84. № 2. P. 377–410.
8. *Biomedical polymers* / Ed. Jenkins M. Birmingham, UK: Univ. Birmingham, 2007. 203 p.
9. Park S.J., Kang K.H., Lee H., Park A.R., Yang J.E., Oh Y.H., Song B.K., Jegal J., Lee S.H., Lee S.Y. // *J. Biotechnol.* 2013. V. 165. № 2. P. 93–98.
10. Jung Y.K., Lee S.Y. // *J. Biotechnol.* 2011. V. 151. № 1. P. 94–101.
11. Bloembergen S., Holden D.A., Hamer G.K., Bluhm T.L., Marchessault R.H. // *Macromolecules.* 1986. V. 19. № 11. P. 2865–2871.
12. Barcham P.J. // *Novel biosynthetic biodegradable polymers of industrial interest from microorganisms* / Ed. Dawes E.A. Dordrecht: Kluwer Acad. Publ., 1990. P. 81–96.
13. Akhtar S., Pouton C.W., Notarianni L.J. // *Polymer.* 1992. V. 33. № 1. P. 117–126.
14. Vincent J.F., Bogatyreva O.A., Bogatyrev N.R., Bowyer A., Pahl A.K. // *J. R. Soc. Interface.* 2006. V. 3. № 9. P. 471–482.
15. Kushner A.M., Guan Z. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2011. V. 50. № 39. P. 9026–9057.
16. Nelson D.L., Cox M.M. *Lehninger Principles of Biochemistry*, 5th Edition. New York: W.H. Freeman and Company, 2008. P. 852–860.
17. Севастьянов В.И., Кирпичников М.П. (под ред.). *Биосовместимые материалы: Учебное пособие.* М.: Мед. информ. агентство, 2011. 540 с.
18. Ramot Y., Haim-Zada M., Domb A.J., Nyska A. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016. V. 107. P. 153–162.
19. Qu X.H., Wu Q., Zhang K.Y., Chen G.Q. // *Biomaterials.* 2006. V. 27. № 19. P. 3540–3548.
20. Freier T., Kunze C., Nischan C., Kramer S., Sternberg K., Sass M., Hopt U.T., Schmitz K.P. // *Biomaterials.* 2002. V. 23. № 13. P. 2649–2657.
21. Kawaguchi T., Tsugane A., Higashide K., Endoh H., Hasegawa T., Kanno H., Seki T., Juni K., Fukushima S., Nakano M. // *J. Pharm. Sci.* 1992. V. 87. № 6. P. 508–512.
22. Босхонджиев А.П., Бонарцев А.П., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Иванов Е.А., Баргов Д.В., Филатова Е.В., Иорданский А.Л., Бонарцева Г.А. // *Биомед. химия.* 2009. Т. 55. № 6. С. 625–635.
23. Shumilova A.A., Myltygashev M.P., Kirichenko A.K., Nikolaeva E.D., Volova T.G., Shishatskaya E.I. // *J. Biomed. Mater. Res.* 2017. V. 105. № 2. P. 566–577.
24. Жаркова И.И. Матрикс из биосинтетического сополимера поли-3-оксибутирата с полиэтиленгликолем для инженерии костной ткани. М.: МГУ, 2017.
25. Malm T., Bowald S., Karacagil S., Bylock A., Busch C. // *Scand. J. Thorac. Cardiovasc. Surg.* 1992. V. 26. № 1. P. 9–14.
26. Malm T., Bowald S., Bylock A., Busch C., Saldeen T. // *Eur. Surg. Res.* 1994. V. 26. P. 298–308.
27. Malm T., Bowald S., Bylock A., Busch C. // *J. Thoracic Cardiovasc. Surgery.* 1992. V. 104. P. 600–607.
28. Malm T., Bowald S., Bylock A., Saldeen T., Busch C. // *Scandinavian J. Thoracic Cardiovasc. Surgery.* 1992. V. 26. № 1. P. 15–21.
29. Sevastianov V.I., Perova N.V., Shishatskaya E.I., Kalacheva G.S., Volova T.G. // *J. Biomat. Sci. Polymer Ed.* 2003. V. 14. № 10. P. 1029–1042.
30. Unverdorben M., Spielberger A., Schywalsky M., Labahn D., Hartwig S., Schneider M., Loozt D., Behrend D., Schmitz K., Degenhardt R., et al. // *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* 2002. V. 25. № 2. P. 127–132.
31. Kostopoulos L., Karring T. // *Clin. Oral. Implants Res.* 1994. V. 5. № 2. P. 66–74.
32. Castellano D., Blanes M., Marco B., Cerrada I., Ruiz-Sauri A., Pelacho B., Arana M., Montero J.A., Cambra V., Prosper F., et al. // *Stem. Cells Dev.* 2014. V. 23. № 13. P. 1479–1490.
33. Pontailier M., Illangakoon E., Williams G.R., Marijon C., Bellamy V., Balvay D., Autret G., Vanneaux V., Larghero J., Planat-Benard V., et al. // *Tissue Eng. Part A.* 2015. V. 21. № 9–10. P. 1552–1564.
34. Lobler M., Sass M., Kunze C., Schmitz K.P., Hopt U.T. // *Biomaterials.* 2002. V. 23. № 2. P. 577–583.
35. Lobler M., Sass M., Schmitz K.P., Hopt U.T. // *J. Biomed. Mater. Res.* 2003. V. 61. P. 165–167.
36. Wu A.C., Grondahl L., Jack K.S., Foo M.X., Trau M., Hume D.A., Cassady A.I. // *Biomaterials.* 2006. V. 27. № 27. P. 4715–4725.
37. Unverdorben M., Spielberger A., Schywalsky M., Labahn D., Hartwig S., Schneider M., Loozt D., Behrend D., Schmitz K., Degenhardt R., et al. // *Cardiovasc. Intervent. Radiol.* 2002. V. 25. № 2. P. 127–132.
38. Iordanskii A.L., Ol'khov A.A., Pankova Yu.N., Bonartsev A.P., Bonartseva G.A., Popov V.O. // *Macromolecular symposia.* 2006. V. 233. P. 108–116.
39. Saad B., Ciardelli G., Matter S., Welti M., Uhlschmid G.K., Neuenschwander P., Suter U.W. // *J. Biomed. Mater. Res.* 1998. V. 39. № 4. P. 594–602.
40. Saad B., Ciardelli G., Matter S., Welti M., Uhlschmid G.K., Neuenschwander P., Suter U.W. // *J. Biomed. Mater. Res.* 1996. V. 30. P. 429–439.
41. Xiong Y.C., Yao Y.C., Zhan X.Y., Chen G.Q. // *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.* 2010. V. 21. № 1. P. 127–140.
42. Bonartsev A.P., Zernov A.L., Yakovlev S.G., Zharkova I.I., Myshkina V.L., Mahina T.K., Bonartseva G.A., Andronova N.V., Smirnova G.B., Borisova J.A., et al. // *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.* 2017. V. 17. № 3. P. 434–441.
43. Ermakova N.P., Bonartsev A.P., Zernov A.L., Konyaeva O.I., Kulbachevskaya N.Y., Merkulova I.B., Abramova T.V., Chaley V.A., Yakovlev S.G., Bonartseva G.A., et al. // *Anti-Cancer Agents in Med. Chem.* 2017. V. 17. № 15. P. 1661–1668.
44. Lu X.Y., Li M.C., Zhu X.L., Fan F., Wang L.L., Ma J.G. // *BMC Biotechnol.* 2014. V. 14. P. 4.
45. Penalzoza J.P., Marquez-Miranda V., Cabana-Brunod M., Reyes-Ramírez R., Llancalahuen F.M., Vilos C., Maldonado-Biermann F., Velásquez L.A., Fuentes J.A., González-Nilo F.D. // *J. Nanobiotechnol.* 2017. V. 15. № 1. P. 1.
46. Stevanovic M., Pavlovic V., Petkovic J. // *Express. Polymer Lett.* 2011. V. 5. № 11. P. 996–1008.
47. Maksymiak M., Debowska R., Jelonek K., Kowalczyk M., Adamus G. // *Rapid. Commun. Mass Spectrom.* 2013. V. 27. P. 773–783.

48. Solorio L.D., Vieregge E.L., Dhami C.D., Alsberg E. // *Tissue Eng. Part B Rev.* 2013. V. 19. № 3. P. 209–220.
49. Fischer D., Li Y., Ahlemeyer B., Kriegelstein J., Kissel T. // *Biomaterials.* 2003. V. 24. № 7. P. 1121–1131.
50. Rihova B. // *Adv. Drug. Delivery Rev.* 1996. V. 21. P. 157–176.
51. Zhu H., Yang F., Tang B., Li X.M., Chu Y.N., Liu Y.L., Wang S.G., Wu D.C., Zhang Y. // *Biomaterials.* 2015. V. 53. P. 688–698.
52. Vacanti N.M., Cheng H., Hill P.S., Guerreiro J.D., Dang T.T., Ma M., Watson S., Hwang N.S., Langer R., Anderson D.G. // *Biomacromolecules.* 2012. V. 13. № 10. P. 3031–3038.
53. Su S.H., Nguyen K.T., Satasiya P., Greilich P.E., Tang L., Eberhart R.C. // *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.* 2005. V. 16. № 3. P. 353–370.
54. Khouw I.M., van Wachem P.B., de Leij L.F., van Luyn M.J. // *J. Biomed. Mater. Res.* 1998. V. 41. P. 202–210.
55. Жуйков В.А., Бонарцев А.П., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Воинова В.В., Бонарцева Г.А., Шайтан К.В. // *Биофизика.* 2018. Т. 63. № 2. С. 249–257.
56. Zhuikov V.A., Bonartsev A.P., Bagrov D.V., Yakovlev S.G., Myshkina V.L., Makhina T.K., Bessonov I.V., Kopitsyna M.N., Morozov A.S., Rusakov A.A., et al. // *Molecular Crystals Liquid Crystals.* 2017. V. 648. № 1. P. 236–243.
57. Abe H., Doi Y. // *Biomacromolecules.* 2002. V. 3. № 1. P. 133–138.
58. Renstad R., Karlsson S., Albertsson A.C. // *Polym. Degrad. Stab.* 1999. V. 63. P. 201–211.
59. Kramp B., Bernd H.E., Schumacher W.A., Blynov M., Schmidt W., Kunze C., Behrend D., Schmitz K.P. // *Laryngorhinootologie.* 2002. V. 81. № 5. P. 351–356.
60. Baptist J.N., Ziegler J.B. // *Патент № 3229766.* США. 1965.
61. Shishatskaya E.I., Volova T.G., Gordeev S.A., Puzyr A.P. // *J. Biomater. Sci. Polymer Ed.* 2005. V. 16. № 5. P. 643–657.
62. Cool S.M., Kenny B., Wu A., Nurcombe V., Trau M., Cassidy A.I., Grøndahl L. // *J. Biomed. Mater. Res A.* 2007. V. 82. № 3. P. 599–610.
63. Bat E., van Kooten T.G., Feijen J., Grijpma D.W. // *Biomaterials.* 2009. V. 30. № 22. P. 3652–3661.
64. Saito T., Tomita K., Juni K., Ooba K. // *Biomaterials.* 1991. V. 12. № 3. P. 309–312.
65. Иванов С.Ю., Бонарцев А.П., Гажва Ю.В., Жаркова И.И., Мухаметшин Р.Ф., Махина Т.К., Мышкина В.Л., Бонарцева Г.А., Андреева Н.В., Акулина Е.А. и др. // *Биомед. химия.* 2015. Т. 61. № 6. С. 717–723.
66. Ji Y., Li X.T., Chen G.Q. // *Biomaterials.* 2008. V. 29. P. 3807–3814.
67. Cheng S., Chen G.Q., Leski M., Zou B., Wang Y., Wu Q. // *Biomaterials.* 2006. V. 27. P. 3758–3765.
68. Cheng S., Yang F., Xu M., Wu Q., Leski M., Chen G.Q. // *Biomacromolecules.* 2005. V. 6. P. 593–597.
69. Yang X.D., Zou X.H., Dai Z.W., Luo R.C., Wei C.J., Chen G.Q. // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 2009. V. 20. № 12. P. 1729–1746.
70. de Paula A.C., Zonari A.A., Martins T.M., Novikoff S., da Silva A.R., Correló V.M., Reis R.L., Gomes D.A., Goes A.M. // *Tissue Eng. Part A.* 2013. V. 19. № 1–2. P. 277–289.
71. Wang Y.W., Wu Q., Chen G.Q. // *Biomaterials.* 2004. V. 25. № 4. P. 669–675.
72. Misra S.K., Ansari T., Mohn D., Valappil S.P., Brunner T.J., Stark W.J., Roy I., Knowles J.C., Sibbons P.D., Jones E.V., et al. // *J. R. Soc. Interface.* 2010. V. 7. № 44. P. 453–465.
73. Zhang S., Prabhakaran M.P., Qin X., Ramakrishna S. // *J. Biomater. Appl.* 2015. V. 29. № 10. P. 1394–1406.
74. Wang Y., Jiang X.L., Yang S.C., Lin X., He Y., Yan C., Wu L., Chen G.Q., Wang Z.Y., Wu Q. // *Biomaterials.* 2011. V. 32. № 35. P. 9207–9217.
75. Criscenti G., Vasilevich A., Longoni A., De Maria C., van Blitterswijk C.A., Truckenmuller R., Vozzi G., De Boer J., Moroni L. // *Acta Biomater.* 2017. V. 55. P. 310–322.
76. Zhao Y., Zou B., Shi Z., Wu Q., Chen G.Q. // *Biomaterials.* 2007. V. 28. № 20. P. 3063–3073.
77. Wang L., Wang Z.H., Shen C.Y., You M.L., Xiao J.F., Chen G.Q. // *Biomaterials.* 2010. V. 31. № 7. P. 1691–1698.
78. Lizarraga-Valderrama L.R., Nigmatullin R., Taylor C., Haycock J.W., Claeysens F., Knowles J.C., Roy I. // *Eng. Life Sci.* 2015. V. 15. P. 612–621.
79. Zhang J., Cao Q., Li S., Lu X., Zhao Y., Guan J.S., Chen J.C., Wu Q., Chen G.Q. // *Biomaterials.* 2013. V. 34. № 30. P. 7552–7562.
80. Zou X.H., Li H.M., Wang S., Leski M., Yao Y.C., Yang X.D., Huang Q.J., Chen G.Q. // *Biomaterials.* 2009. V. 30. № 8. P. 1532–1541.
81. Wang Y., Gao R., Wang P.P., Jian J., Jiang X.L., Yan C., Lin X., Wu L., Chen G.Q., Wu Q. // *Biomaterials.* 2012. V. 33. № 2. P. 485–493.
82. Wang Y., Jiang X.L., Peng S.W., Guo X.Y., Shang G.G., Chen J.C., Wu Q., Chen G.Q. // *Biomaterials.* 2013. V. 34. № 15. P. 3737–3746.
83. Anderson A.J., Dawes E.A. // *Microbiol. Rev.* 1990. V. 54. № 4. P. 450–472.
84. Бонарцев А.П., Воинова В.В., Бонарцева Г.А. // *Прикладная биохимия и микробиология.* 2018. Т. 54. № 6. С. 561–584.
85. Reusch R.N. // *Chem. Biodivers.* 2012. V. 9. № 11. P. 2343–2366.
86. Larsen T., Nielsen N.I. // *J. Dairy Sci.* 2005. V. 88. № 6. P. 2004–2009.
87. Szwej E., Devocelle M., Kenny S., Guzik M., O'Connor S., Nikodinovic-Runic J., Radivojevic J., Maslak V., Byrne A.T., Gallagher W.M., et al. // *J. Biotechnol.* 2015. V. 204. P. 7–12.
88. Kim J.K., Won Y.J., Nikoh N., Nakayama H., Han S.H., Kikuchi Y., Rhee Y.H., Park H.Y., Kwon J.Y., Kurokawa K., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 26. P. E2381–E2389.
89. Yamazaki Y., Meirelles P.M., Mino S., Suda W., Oshima K., Hattori M., Thompson F.L., Sakai Y., Sawabe T., Sawabe T. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 21631.
90. Kyriakidis D.A., Tiligada E. // *Amino Acids.* 2009. V. 37. № 3. P. 443–458.
91. Defoirdt T., Halet D., Vervaeren H., Boon N., van de Wiele T., Sorgeloos P., Bossier P., Verstraete W. // *Environ. Microbiol.* 2007. V. 9. № 2. P. 445–452.
92. Defoirdt T., Boon N., Sorgeloos P., Verstraete W., Bossier P. // *Biotechnol. Adv.* 2009. V. 27. № 6. P. 680–685.
93. Radivojevic J., Skaro S., Senerovic L., Vasiljevic B., Guzik M., Kenny S.T., Maslak V., Nikodinovic-Runic J., O'Connor K.E. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2016. V. 100. № 1. P. 161–172.
94. Schulz S., Toft S. // *Science.* 1993. V. 260. № 5114. P. 1635–1637.
95. Marshall D.G., Jackson T.A., Unelius C.R., Wee S.L., Young S.D., Townsend R.J., Suckling D.M. // *Naturwissenschaften.* 2016. V. 103. № 7–8. P. 59.
96. Quang D.N., Hashimoto T., Toyota M., Asakawa Y. // *J. Nat. Prod.* 2003. V. 66. № 12. P. 1613–1614.
97. Williams S.F., Martin D.P., Moses A.C. // *Aesthet. Surg. J.* 2016. V. 6 (suppl 2). P. S33–S42.
98. Nemets E.A., Efimov A.E., Egorova V.A., Tonevitsky A.G., Sevastianov V.I. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2008. V. 145. № 3. P. 371–373.

УДК 577.2:616-06

Молекулярные биомаркеры астроцитом головного и спинного мозга

Н. А. Коновалов¹, Д. С. Асютин¹, Е. Г. Шайхаев², С. В. Капровой¹, С. Ю. Тимонин^{1*}¹Национальный медицинский исследовательский центр нейрохирургии Минздрава России им. акад. Н.Н. Бурденко, 125047, Россия, Москва, 4-я Тверская-Ямская ул., 16²Российский научный центр рентгенорадиологии Минздрава России, 117485, Россия, Москва, Профсоюзная ул., 86

*E-mail: md.timonin@gmail.com

Поступила в редакцию 01.02.2019

Принята к печати 30.04.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-17-27

РЕФЕРАТ Астроцитомы спинного мозга относятся к редким заболеваниям центральной нервной системы. Локализация этих опухолей и их инфильтративный характер осложняет хирургическую резекцию и повышает риск послеоперационных осложнений, а также требует более осторожного применения радио- и химиотерапии. Знание генетических мутаций, связанных с возникновением и развитием астроцитомы, обеспечивает более точную диагностику и классификацию новообразования и в ряде случаев позволяет определить оптимальные методы терапии, а также прогнозировать исход лечения и риски рецидивов. К настоящему времени выявлен и описан ряд молекулярных маркеров, ассоциированных с астроцитомами головного мозга и обладающих прогностическим значением. Астроцитомы спинного мозга встречаются существенно реже, поэтому данные об аналогичных маркерах этих астроцитом присутствуют в гораздо меньшем объеме и с меньшей степенью систематизации. Однако благодаря активно проводимым за рубежом ретроспективным исследованиям клинического материала началось формирование статистически значимых генетических ландшафтов опухолей различного типа, включая и интрадуральные опухоли спинного мозга. В связи с этим целью настоящего обзора стал анализ и систематизация информации о наиболее значимых генетических мутациях, ассоциированных с различными типами астроцитом, а также обсуждение перспектив диагностического и прогностического применения соответствующих молекулярных маркеров.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА астроцитома спинного мозга, глиобластома, мутации, диагностика, молекулярные маркеры, механизмы возникновения новообразований, прогностическое значение.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЦНС – центральная нервная система; IMSCT – интрамедуллярные опухоли спинного мозга; ПА – пилоидная астроцитома; АСМ – астроцитома спинного мозга; ДА – диффузная астроцитома; АА – анапластическая астроцитома; ГБ – глиобластома; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения.

ВВЕДЕНИЕ

Первичные опухоли спинного мозга относятся к редким заболеваниям и составляют всего 2–4% от всех опухолевых заболеваний центральной нервной системы (ЦНС) [1, 2]. Симптомы, связанные с развитием таких опухолей, могут значительно варьировать в зависимости от типа и расположения опухоли и включают болевой синдром, вегетативные, двигательные и чувствительные нарушения, нарушения функции тазовых органов [3]. В отсутствие терапии они могут привести к серьезным нарушениям в функционировании нервной системы и смерти пациента.

Исторически выделяют три основные группы опухолей спинного мозга: экстрамедуллярные экстрадуральные, интрадуральные экстрамедуллярные и интрамедуллярные (рис. 1). Последняя группа (интрамедуллярные опухоли спинного мозга, IMSCT) представляет собой наиболее редкие неопластические образования ЦНС (5–10% от всех первичных опухолевых заболеваний спинного мозга) [4, 5].

Наиболее частыми вариантами IMSCT считаются эпендимомы и астроцитомы, суммарно составляющие около 90% (60 и 30% соответственно) диагностируемых IMSCT у взрослых; остальные 10% прихо-

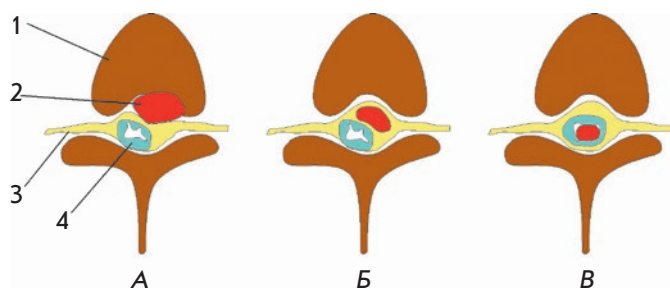


Рис. 1. Типы опухолей спинного мозга: экстрамедуллярная экстрадуральная (А), интрадуральная экстрамедуллярная (Б), интрадуральная интрамедуллярная (В). 1 – Тело позвонка, 2 – опухоль, 3 – твердая мозговая оболочка, 4 – спинной мозг

дятся на долю гемангиобластом и метастатических опухолей [6, 7]. У детей до 10 лет, наоборот, астроцитомы в сумме встречаются чаще, чем эпендимомы (рис. 2) [8].

Астроцитомы развиваются из астроцитов – клеток глиальной ткани, и, следовательно, относятся к классу глиальных опухолей. Согласно классификации ВОЗ, выделяют четыре типа астроцитом [9]. пилоидная астроцитома (ПА, I степень) представляет собой доброкачественную медленно растущую опухоль, ограниченную от здоровых тканей и включающую параллельно расположенные волосовидные пучки глиальных волокон. Встречается в основном у пациентов в возрасте до 20 лет; 10-летняя выживаемость превышает 90% [10, 11]. Диффузная, или низкостадийная астроцитома (II степень), – это инфильтративная опухоль без четких границ, характеризующаяся медленным инвазивным ростом

и постепенно прогрессирующая до анапластической формы. Анапластическая астроцитома (III степень) представляет собой инфильтративную злокачественную опухоль гетерогенного строения, способную либо возникнуть независимо, либо развиваться из опухолей более низкой градации злокачественности. Анапластическая астроцитома характеризуется быстрым прогрессом и неуклонным понижением дифференцировки клеток до степени атипичии глиобластомы. Глиобластома (IV степень) – опухоль высокой степени злокачественности с быстрым инфильтративным ростом. Глиобластомы могут возникать *de novo* или развиваться из опухолей более низкой градации, они диагностируются преимущественно у пациентов старшего возраста [12].

В большинстве случаев выявляемые астроцитомы относятся к I или II степеням злокачественности (85–90%); на долю наиболее опасных III и IV степеней приходится около 10–15% случаев, причем частота диагностирования глиобластомы составляет всего 0.2–1.5% [4]. В целом, встречаемость первичных астроцитом спинного мозга (АСМ) составляет около 2.5 на 100000 человек в год [4]. Клинические проявления АСМ в значительной степени зависят от их расположения и стадии и чаще всего представляют собой боль (~70%), нарушения чувствительности (~65%) и двигательной функции (~50%) [13].

За последние 10 лет представления о молекулярной биологии интракраниальных астроцитом существенно расширились, что, в частности, отражено в добавлении некоторых молекулярных параметров в классификацию опухолей ЦНС, предложенную ВОЗ в 2016 г. [14]. В то же время изучение механизмов возникновения и развития злокачественных

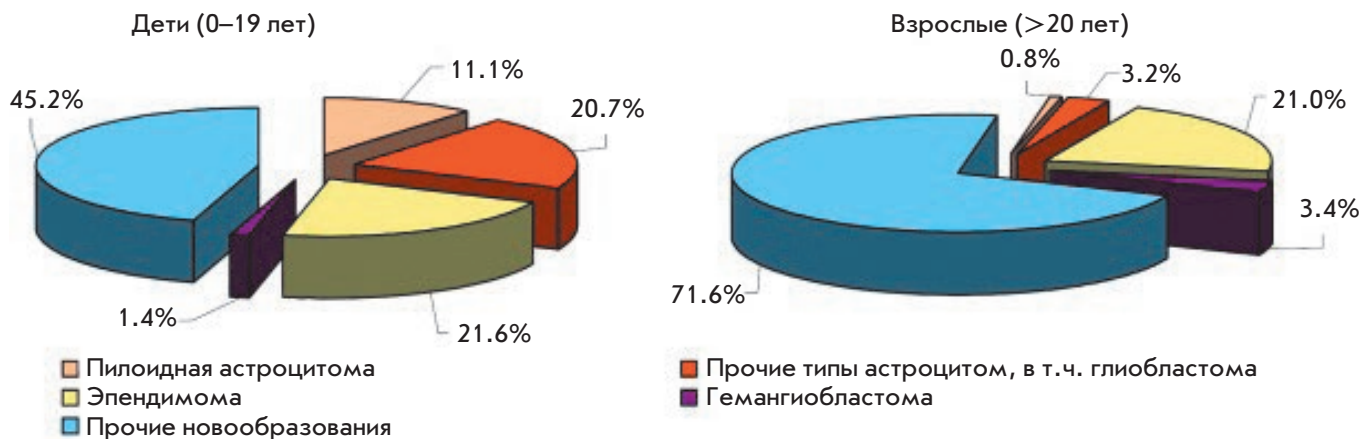


Рис. 2. Встречаемость интрадуральных интрамедуллярных первичных опухолей спинного мозга у детей до 19 лет ($n = 1238$) и взрослых пациентов ($n = 14822$) по данным статистического отчета Central Brain Tumor Registry (CBTRUS) США за период 2007–2011 гг. Данные приведены по [15] (с изменениями)

астроцитом спинного мозга, а также разработка эффективных методик их терапии продвигается достаточно медленно, а количество публикаций, посвященных опухолям этого типа, очень невелико в сравнении с накопленным массивом данных по интракраниальным астроцитомам. Это связано, в первую очередь, с редкостью данного вида опухолей и, следовательно, сложностью получения статистически значимого количества образцов для анализа. Кроме того, гетерогенность клинической картины и различные стратегии терапии осложняют проведение рандомизированного исследования в стандартизированных условиях [15]. Наконец, небольшой размер, локализация этих опухолей в паренхиме и степень их инфильтрации в окружающие здоровые ткани, существенно повышающая риск осложнений, связанных с их хирургической резекцией, сильно затрудняет задачу получения достаточного для проведения исследований количества ткани. Между тем, данные о генетических изменениях в клетках АСМ дают информацию о патофизиологическом происхождении новообразования и возможных опухолевых маркерах, а также могут определять выбор методов терапии, прогноз состояния пациентов и риск рецидивов [16]. Генетические исследования интракраниальных астроцитом обеспечили базу для идентификации генов-кандидатов, ответственных за возникновение АСМ, однако онкогенез этих двух типов астроцитом имеет и определенные различия [14].

Целью настоящего обзора стало обобщение данных о некоторых генетических мутациях, связанных с возникновением и развитием астроцитом и глиом различной степени злокачественности, и возможностях их применения для прогнозирования и диагностики новообразований этого типа, включая АСМ.

Генетические маркеры, ассоциированные с астроцитомами

Существует множество свидетельств ведущей роли генетических aberrаций в возникновении и прогрессировании первичных злокачественных опухолей ЦНС [17–20]. Такие aberrации могут включать полную потерю или частичную делецию хромосомы, потерю специфических аллелей, инактивирующие мутации и метилирование промотора-гена. Далее мы подробно опишем некоторые из важнейших генетических маркеров, ассоциированных с астроцитомами, а также потенциальные гены-маркеры, рассмотрим перспективы их применения в диагностических и прогностических целях.

BRAF. Ген *BRAF*, кодирующий серин/треониновую протеинкиназу семейства белков RAF, представляет собой протоонкоген, участвующий в регуляции про-

лиферации и роста клеток [21]. Мутации в этом гене способны привести к развитию разных типов опухолей. Так, дупликацию гена *BRAF* и его активацию обнаруживают при ювенильной ПА, локализованной в мозжечке (80%) и гипоталамо-хиазмальном отделе мозга (62%) [22]. В некоторых случаях ПА выявлена также гибридная форма гена *BRAF*, образованная слиянием с ранее неохарактеризованным геном *KIAA1549* и отличающаяся конститутивной активацией *BRAF*-киназы [23, 24]. Известна также точечная активирующая мутация – замена валина на глутамат в позиции 600 (*BRAF V600E*) [25], а также несколько других инсерционных мутаций [26, 27]. Поскольку эта мутация практически не встречается при других глиомах и неглиальных опухолях, ее можно использовать для дифференциальной диагностики и таргетной терапии ПА [28]. Следует, однако, отметить, что мутации в гене *BRAF* могут иногда обнаруживаться и в диффузных глиомах и злокачественных астроцитомах в комбинации с мутациями в других генах, таких, как *CDKN2A* или *IDH* [29, 30]. Согласно ряду исследований, точечную мутацию *BRAF V600E* чаще находят в супратенториальных ПА, в то время как гибридные онкогены ассоциированы в большей степени с ПА, локализованными у основания черепа и в спинном мозге [31]. По данным мультицентрового исследования АСМ более 80% ПА содержат мутации в гене *BRAF* – из них в 40% случаев это мутация *BRAF-KIAA1549*, а остальные 60% – варианты дупликации гена *BRAF* [32].

CDKN2A. Еще один ген, важный для онкогенеза АСМ и ПА в частности, – это *CDKN2A*, кодирующий циклинзависимую киназу, выполняющую функции супрессора опухолевого роста [31]. В когорте, включающей 140 случаев ПА, гомозиготные делеции в этом гене встречались намного чаще в ПА, локализованных в стволе головного мозга и спинном мозге, чем при локализации ПА в головном мозге или мозжечке [33]. Помимо ПА, делеции *CDKN2A* достаточно часто выявляются в глиобластомах у взрослых пациентов. Так, согласно результатам двух исследований, эта мутация обнаружена примерно в половине изученных глиобластом [34, 35]. Еще в одной работе мутация в этом гене обнаружена у трех из девяти пациентов с глиобластомами спинного мозга высокой степени злокачественности [36].

IDH1/IDH2. Одним из самых важных открытий в исследовании глиом (в том числе астроцитом) стало обнаружение в этих опухолях мутаций в генах *IDH1* и *IDH2*, кодирующих NADP⁺-зависимые гомодимеры изоцитратдегидрогеназ 1 и 2, локализованные в цитоплазме и митохондриях соответственно и ката-

лизирующие окислительное декарбоксилирование изоцитрата до α -кетоглутарата (α -КГ) [37]. Мутация в гене *IDH1* редко встречается в первичных глиобластомах (<5%), однако отмечается в 70–80% случаев астроцитом II–III степени злокачественности и вторичных глиобластом [38, 39]. Мутацию в гене *IDH2* обнаруживают гораздо реже (менее 3% глиом) и никогда не находят вместе с *IDH1* [39]. В подавляющем большинстве случаев (>90%) мутация *IDH1* представляет собой замену аргинина на гистидин в положении 132 (активный центр фермента). Мутантный фермент катализирует восстановление α -КГ до 2-гидроксиглутарата (2-НГ), конкурентного ингибитора α -КГ-зависимых диоксигеназ, что приводит к гиперметилированию генома, предположительно, вследствие ингибирования метилцитозингидроксилазы ТЕТ [40, 41]. Кроме того, эти мутации могут изменять уровень метилирования гистонов, блокируя дифференцировку клеток [42], а также способствовать накоплению индуцируемого гипоксией фактора HIF-1 α , влияющего на целый ряд процессов, таких, как ангиогенез, клеточный метаболизм, рост и дифференцировка клеток и апоптоз [43].

Опухоли с мутациями гена *IDH*, как правило, несут также мутацию в гене *TP53* либо делецию 1p/19q. Эти дополнительные мутации являются взаимоисключающими, они характерны для астроцитом (*TP53*) и олигодендроглиом (1p/19q) [44]. Встречаемость мутации *IDH1* в низкоуровневых диффузных астроцитомах и вторичных глиобластомах составляет 88 и 82% соответственно, причем в 63% случаев диффузных астроцитом обнаруживается мутация *TP53* [44]. Лишь в нескольких процентах случаев в клетках с мутациями в генах *IDH1* или *IDH2* выявлены также изменения в генах *PTEN*, *EGFR*, *CDKN2A* и *CDKN2B*. В то же время в образцах с немутантными генами *IDH1* и *IDH2* встречаемость мутаций *TP53* была существенно ниже (18%), а мутации *PTEN*, *EGFR*, *CDKN2A* и *CDKN2B* присутствовали намного чаще (74%). Не обнаружено ни одного случая появления мутации *IDH1* позже мутации *TP53* или делеции, что позволяет прийти к выводу о возникновении мутации *IDH1* на самых начальных этапах онкогенеза и, возможно, является общим ранним событием в патогенезе глиом различных гистологических вариантов.

Мутации *IDH* ни разу не были выявлены в ПА, что соответствует чрезвычайно редкой трансформации ПА в злокачественные опухоли [44]. Кроме того, мутации *IDH* очень редко обнаруживаются в первичных глиобластомах [38]. Этот факт позволяет использовать маркеры *IDH1* и *IDH2* для дифференциации низкостадийных диффузных астроцитом и вторичных глиобластом от ПА и первичных глиобластом.

Согласно некоторым данным, частота мутаций *IDH1* и *IDH2* в интракраниальных астроцитомах и глиобластомах составляет 68 и 12% соответственно [45]. Точные данные о частоте таких мутаций в АСМ пока отсутствуют, что, возможно, связано с редкостью астроцитом такого типа и малым размером выборок, не позволяющих провести статистические подсчеты [3, 14]. Так, исследование АСМ II и III степени ($n = 9$) не выявило наиболее частой для интракраниальных астроцитом мутации *IDH1* R132H [35]. Еще одно мультицентровое исследование АСМ ($n = 17$) также показало отсутствие у пациентов мутаций *IDH* [32]. Эти результаты позволяют предположить существование потенциальных генетических различий между интракраниальными и спинальными опухолями одинаковых гистопатологических стадий.

ATRX. Помимо сопутствующих мутаций *TP53* и 1p/19q, глиомы с мутациями в гене *IDH* различаются присутствием мутаций в генах *TERT* и *ATRX*, участвующих в удлинении теломер. Мутация *TERT* коррелирует с делецией 1p/19q и первичными глиобластомами, она крайне редко выявляется в астроцитомах II и III степени и вторичных глиобластомах [46]. Мутация *ATRX* считается отличительной чертой астроцитарных опухолей, она тесно ассоциирована с мутацией *IDH* в диффузных астроцитомах и вторичных глиобластомах [47]. Мутация *ATRX* довольно редко встречается в отсутствие мутации *IDH* [48]. Кроме того, мутации *IDH* и *ATRX* очень часто ассоциированы с мутацией *TP53*, что позволяет предположить кооперативный механизм патогенеза с участием этих трех белков [49].

Ген *ATRX* кодирует белок, участвующий в метилировании ДНК и регуляции экспрессии ряда генов. Кроме того, *ATRX* ассоциирован с ALT-фенотипом опухолей, связанным с появлением в клетке гетерогенных по длине теломер, а также контролирует ассоциацию гистона H3.3 с теломерными участками ДНК и несколькими сайтами связывания [50]. Мутации в гене *ATRX*, приводящие к потере активности его белкового продукта, вызывают характерные нарушения развития, такие, как умственная отсталость, отклонения в урогенитальной сфере и альфа-талассемия; на клеточном уровне они выражаются в изменении паттерна метилирования ДНК, нарушении расхождения хромосом и в дисфункции теломер [51].

Встречаемость мутации *ATRX* у детей с диагнозом глиома составляет 30% [52]. У взрослых пациентов эта мутация отмечена в 71% астроцитом II–III степени и 57% вторичных глиобластом; в первичных глиобластомах частота этой мутации составила всего

4% [48]. Мутация *ATRX* встречается и в пилоидных астроцитомах с признаками анаплазии [53]. Следует отметить, что мутация характерна скорее для молодых пациентов и может служить диагностическим и прогностическим фактором, поскольку позволяет дифференцировать астроцитомы и олигодендроглиомы и (при потере активности белка *ATRX*) ассоциирована с более благоприятным прогнозом [54].

Сведения о частоте выявления мутации *ATRX* в АСМ практически отсутствуют. Описаны два случая обнаружения такой мутации в диффузной астроцитоме спинного мозга II и III степени [55, 56]. Сводные данные анализа двух групп пациентов (≤ 20 лет и > 20 лет) с глиомами спинного мозга высокой степени злокачественности указывают на отсутствие этой мутации в младшей группе ($n = 5$) и ее присутствие в 43% случаев в старшей группе ($n = 7$) [57]. Кроме того, такая мутация выявлена в *IDH*-отрицательной глиобластоме спинного мозга [57].

H3F3A. Ген *H3F3A* кодирует независимый от репликации гистон H3.3, участвующий в структурной организации хроматина путем активного связывания с сайтами транскрипции и ассоциации с активным и открытым хроматином [58]. Гетерозиготные мутации гена *H3F3A* выявлены почти в 80% глиобластом ствола головного мозга, причем в двух взаимоисключающих вариантах – замене лизина на метионин в позиции 27 (K27M) и замене глицина на аргинин или валин в позиции 34 (G34R/V) [52, 59]. Обе мутации локализируются в позициях, близких к N-концу молекулы, который подвергается посттрансляционной модификации. Триметилирование Lys27 ассоциировано с подавлением генной экспрессии, в то время как ацетилирование активирует транскрипцию. Кроме того, метилирование Lys27 важно для нормального функционирования комплекса PRC2, участвующего в подавлении транскрипции и дифференцировки клеток [60, 61]. В результате мутации эти модификации и процессы становятся невозможными, что, предположительно, может запускать развитие глиомы.

Известно, что мутации определенного типа гена *H3F3A* встречаются в опухолях определенной локализации с определенным уровнем экспрессии факторов транскрипции *OLIG1*, *OLIG2* и *FOXG1*. Предполагается, что глиомы с разными мутациями *H3F3A* имеют различное клеточное происхождение [52, 62]. Мутацию G34R/V находят в основном у детей с диагностированными интракраниальными глиобластомами, расположенными не на срединной линии [52, 59]; частота этой мутации составляет 20–30% [63]. Мутация K27M встречается главным образом

в злокачественных астроцитомах, развивающихся в таламусе, стволе головного мозга и спинном мозге, причем в основном у подростков и молодых пациентов [57, 64]. Мутация K27M ассоциирована с высокой агрессивностью опухоли, даже если по гистологической классификации она относится к низкоуровневым астроцитомам [65]. Однако по некоторым данным прогноз таламических глиом у взрослых носителей этой мутации может быть не хуже, чем у пациентов без этой мутации, что позволяет предположить гетерогенность этой молекулярной подгруппы диффузных глиом [66].

Мутация K27M часто ассоциирована с мутациями *TP53* (таламические глиомы) и моносомией хромосомы 10, редко – с мутацией *BRAF V600E* и *ATRX* и никогда – с *IDH1* и *EGFR* [64, 66, 67]. Несовместимость с *IDH1* объясняется тем, что данная мутация обеспечивает возможность метилирования Lys27 [62, 68]. Согласно Schwartzentruber и соавт. [52], мутация *ATRX* гораздо чаще ассоциирована с мутациями *H3F3A G34R/V*, чем с K27M.

Мутация *H3F3A K27M* у пациентов с астроцитомами, локализованными в спинном мозге, ассоциирована с опухолями III и IV степени злокачественности. Эта мутация выявлена у 61% пациентов старше 20 лет ($n = 18$) и у 54% пациентов младше 19 лет ($n = 24$) с диагностированной АСМ III–IV степени [57]. В другой работе эта мутация обнаружена у 28% ($n = 32$) пациентов с диагностированной АСМ, но не указана степень злокачественности астроцитом с подтвержденной мутацией [69]. Johnson и соавт. [36] выявили мутацию K27M в 77.8% случаев ($n = 9$) глиобластом спинного мозга. Еще одно исследование, проведенное в когорте из 36 первичных диффузных глиом спинного мозга, показало примерно одинаковую частоту мутации в глиомах III–IV степени у взрослых и детей (52 и 54%, $n = 11$ и 19 соответственно) [70]. Таким образом, эта мутация достаточно часто ассоциирована с глиомами спинного мозга III–IV степени. Следует отметить, что K27M не встречается в других типах злокачественных опухолей [71] и, следовательно, может быть патогномичной в отношении первичной глиобластомы спинного мозга, а также служить индикатором наихудшего прогноза [64].

TP53. Белок P53 – это фактор транскрипции, регулирующий несколько тысяч генов, отвечающих за клеточный цикл, дифференцировку клеток и апоптоз. Мутации в гене *TP53* относятся к наиболее ранним генетическим изменениям в опухолевых клетках, их находят в 60% клеток-предшественников астроцитом низкой степени злокачественности [72]. Эти мутации присутствуют в большинстве вторичных глиобластом (65%), преимущественно в кодонах 248 и 273. В пер-

вичных глиобластомах мутации *TP53* обнаружены у 30% пациентов, причем в различных кодонах [73].

Мутации *TP53* провоцируют более агрессивный рост астроцитом I–II степени, т.е. рассматриваются как неблагоприятный прогностический фактор [74]. Как и в случае *ATRX*, мутация *TP53* оказывается взаимоисключающей с делецией 1p/19q, характерной для олигодендроглиомы. Обнаружение этой мутации может уточнить диагноз в пользу астроцитомы [75]. Интересно, что, в отличие от интракраниальных глиобластом, в глиобластомах спинного мозга мутация *TP53* часто обнаруживается без ассоциированной мутации *IDH1* [14].

Мутация *TP53* часто встречается в АСМ III–IV степени. Так, в одном исследовании эта мутация выявлена в пяти из шести глиобластом [76], а в другом обнаружена в 60% диффузных астроцитом [77]. Близкие данные получены Johnson и соавт. [36] для пациентов с глиобластомами спинного мозга высокой степени злокачественности (66.7%). Сверхэкспрессию P53 выявили у 57% пациентов с глиобластомами спинного мозга III–IV степени старше 20 лет ($n = 7$) и у 40% в группе младше 20 лет ($n = 5$) [57].

***PTEN*.** Ген *PTEN*, кодирующий фосфатазу PTEN, относится к генам-супрессорам опухолевого роста. Фосфатаза PTEN участвует в дефосфорилировании связанного с мембраной фосфатидилинозита PIP3 до PIP2, регулирующего сигнальный путь РКВ/АКТ. При потере или мутации этого гена его функции не могут выполнять другие ферменты [78]. Нарушение экспрессии гена *PTEN* приводит к конститутивной активации сигнального пути РКВ/АКТ, запускающего, в свою очередь, ряд процессов, связанных с клеточным циклом, пролиферацией, миграцией клеток и ангиогенезом. PTEN также регулирует сигнальный путь mTOR, контролирующей обновление и дифференцировку стволовых опухолевых клеток. Делеция в гене *PTEN* приводит к увеличению размера этих клеток и их пролиферации, а также к подавлению апоптоза нейральных клеток-предшественников [79]. Нетипичная миграция клеток-предшественников с мутацией *PTEN* способна привести к дисплазии мозжечка и гиппокампа с последующим глиоматозом, однако для начала неопластических изменений необходимы дополнительные мутации, например в *TP53* [80]. Делеции хромосомы 10 в области локализации гена *PTEN* часто обнаруживаются в опухолях, характеризующихся амплификацией *EGFR* [72], однако мутации в этом гене, наоборот, слабо ассоциированы с *EGFR* [81].

Инактивация гена *PTEN*, обычно обусловленная точечной инактивирующей мутацией (12%) или деле-

цией длинного плеча хромосомы 10q (32%) [82], встречается в различных типах опухолей, в том числе в астроцитомах. В последнем случае мутации *PTEN* крайне редко обнаруживаются в ПА, но присутствуют в 18% анапластических астроцитом и до 40% глиобластом, преимущественно первичных [31, 82, 83]. Редкое выявление мутаций *PTEN* в астроцитомах I–II степени и вторичных глиобластомах может быть связано с метилированием промотора *PTEN*, которое часто встречается в низкоуровневых глиомах и обеспечивает снижение продукции белка PTEN по сравнению с нормой [84]. Мутации в гене *PTEN* чаще встречаются у пациентов старшего возраста с анапластической астроцитомой и у молодых пациентов с глиобластомой [83]. Известны лишь единичные сообщения о мутациях *PTEN* в такой редко встречающейся опухоли, как АСМ III и IV степени [56].

В прогностическом аспекте потеря функции PTEN ассоциирована с более высокой агрессивностью опухоли и снижением выживаемости пациентов с анапластической астроцитомой, тогда как в глиобластомах такие корреляции не выявлены [12].

***EGFR*.** Ген *EGFR* кодирует рецептор к эпидермальному фактору роста. EGFR представляет собой трансмембранный гликопротеин, состоящий из внеклеточного лигандсвязывающего домена, гидрофобного домена, расположенного в мембране, и тирозинкиназного цитоплазматического домена. Связывание EGFR с лигандом приводит к димеризации и аутофосфорилированию рецептора, а также к фосфорилированию клеточных субстратов, запускающему каскад внутриклеточных реакций, связанных с процессом деления и пролиферации клеток.

Повышенная экспрессия или амплификация гена *EGFR* характерна для многих опухолей. Помимо сверхэкспрессии и амплификации, в гене могут возникать точечные мутации и структурные перестройки, изменяющие функциональные характеристики его продукта. Нуклеотидные последовательности *EGFR*, соответствующие его внеклеточному и внутриклеточному доменам, имеют определенные позиции, наиболее подверженные мутагенезу [85]. Большинство мутаций *EGFR* в глиомах, включая EGFRvIII, затрагивают внеклеточный домен рецептора, в то время как в неглиомах опухолях они в основном ассоциированы с внутриклеточным доменом [86, 87]. Примерно половина глиобластом с амплификацией *EGFR* содержит также делеции в экзонах 2–7. Продукт мутации EGFRvIII представляет собой конститутивно активный EGFR, стимулирующий опухолевый ангиогенез в злокачественных глиомах [88]. Будучи индуктором клеточной пролиферации, EGFRvIII экспрессируется лишь в определенной

фракции клеток глиобластомы, индуцируя при этом пролиферацию не только этих клеток, но и расположенных рядом с ними клеток с EGFR дикого типа [89].

Мутации в генах *EGFR* и *TP53* являются взаимоисключающими при глиобластомах [90]. Как и в случае мутаций гена *PTEN*, мутация *EGFR* типична для первичных глиобластом и редко встречается во вторичных [91]. Сверхэкспрессия этого гена выявлена в 60% первичных глиобластом, в оставшихся 40% ген амплифицирован. Кроме того, сверхэкспрессия или амплификация *EGFR* обнаруживается у 33% пациентов с анапластическими астроцитомами и менее чем у 10% пациентов с олигодендроглиомами [85]. Известно также, что изменения, обусловленные нарушениями гена *EGFR*, возникают лишь в 3% астроцитом и глиобластом с *IDH*-мутациями, но частота таких изменений намного выше в присутствии *IDH* дикого типа [35, 37].

АСМ – это редкая опухоль, поэтому данных по встречаемости этого маркера пока недостаточно для статистических обобщений. Два случая *EGFR*-положительной анапластической астроцитомы описаны в двух публикациях корейских исследователей [92, 93]. Еще два исследования упоминают *EGFR*-положительные глиобластомы спинного мозга. В первом случае этот маркер обнаружен в двух из шести случаев [76], а во втором – в трех из девяти [56].

Считается, что амплификация и повышенная экспрессия гена *EGFR* ассоциированы с высокой степенью злокачественности глиомы, анеуплоидией и пролиферативным индексом, а мутация *EGFRvIII* потенциально ассоциирована с агрессивным течением болезни, рефрактерностью к терапии и плохим прогнозом [94, 95]. Кроме того, повышенная экспрессия *EGFR* значительно ухудшает выживаемость пациентов с анапластическими астроцитомами [96], что позволяет выделить их в подгруппу с плохим прогнозом [97].

Практическое значение молекулярных маркеров, ассоциированных с астроцитомами

В настоящее время основой для прогнозирования течения онкологических заболеваний и выбора наиболее подходящей терапии служит гистоморфологическая классификация опухолей. Однако такая диагностика, основанная на визуальных критериях оценки, является в определенной степени субъективной, что порой приводит к существенным расхождениям в оценках гистологических препаратов. Кроме того, в ряде случаев клиническое течение заболевания плохо коррелирует с гистоморфологической классификацией, а опухоли с одинаковой гистологической оценкой могут по-разному реагировать

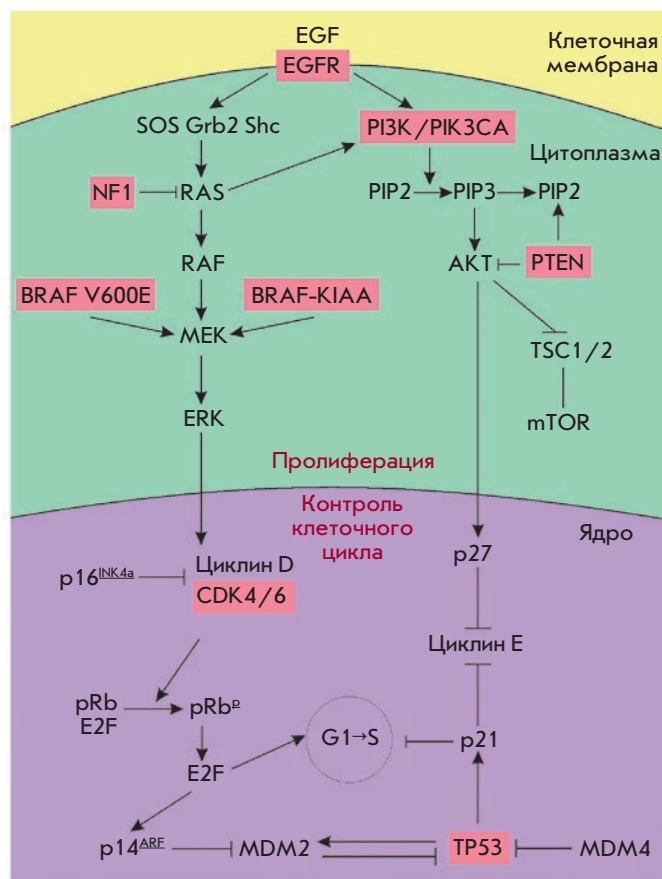


Рис. 3. Упрощенная схема сигнальных путей, связанных с патогенезом глиальных опухолей, и влияния на них мутаций, ассоциированных с астроцитомами. Приведено по [99] с изменениями

на одну и ту же терапию. В связи с этим в последние годы возрос интерес к молекулярным маркерам как средствам более точной классификации и прогноза течения заболевания.

Значительное число исследований, проведенных за последние 10–15 лет, позволило существенно улучшить понимание механизмов возникновения и развития глиальных опухолей ЦНС и выявить ключевые гены, мутации или aberrации в экспрессии которых могут рассматриваться как потенциальные прогностические и диагностические факторы (рис. 3). В 2016 г. некоторые молекулярные маркеры были включены ВОЗ в классификацию опухолей ЦНС. Например, тест на мутацию *IDH* стал частью рутинной диагностики и классификации глиом [14].

Поскольку объем исследований, связанных с АСМ-ассоциированными генетическими изменениями, существенно меньше, чем для астроцитом головного мозга, в настоящем обзоре рассмотрены маркеры глиом головного мозга, включая как хорошо

Молекулярные маркеры, ассоциированные с астроцитомами головного и спинного мозга

Ген/ мутация	Встречаемость в астроцитомах				Примечания
	ПА	ДА	АА	ГБ (перв. и втор.)	
BRAF- K1A1549	32%	Редко			Чаще встречается в ПА, локализованных в спинном мозге и у основания черепа.
BRAF V600E	48%	Редко			Возможно применение для дифференциации ПА. Чаще встречается в супратенториальных ПА. Положительный прогностический маркер у детей и молодых пациентов.
IDH1	-	>70%	70–80% (втор.) <5% (перв.)		<i>IDH1</i> и <i>IDH2</i> – взаимоисключающие. <i>mutIDH</i> : положительный прогностический маркер. <i>wtIDH</i> : более агрессивное течение. <i>IDH1</i> : возможно применение для исключения ПА и ГБ1.
IDH2	-	<3%			
TP53	-	29% (повышенная экспрессия)	65% (втор.) 30% (перв.)		Более агрессивное течение болезни. Взаимоисключающая с коделецией 1p/19q, возможно применение для дифференциации астроцитомы. Выявляется в 60–67% АСМ III–IV степени.
ATRX	+	60–70%	57% (втор.) 4% (перв.)		Редко встречается без мутации <i>IDH</i> и <i>TP53</i> , взаимоисключающая с коделецией 1p/19q. Возможно применение для дифференциации астроцитом и коделеции 1p/19q. При потере активности <i>ATRX</i> – прогноз более благоприятный.
H3F3A K27M		+	+ (50% при перв. ГБ в спинном мозге)		Присутствует в основном у детей. Срединные опухоли головного и спинного мозга. Более агрессивное течение. Никогда не встречается с <i>IDH1</i> и <i>EGFR</i> , часто – с <i>TP53</i> . Возможно, патогномична для первичной ГБ спинного мозга.
H3F3A G34R/V			20–30%		Присутствует у подростков и молодых пациентов. Более благоприятный прогноз. Немедиальные интракраниальные глиобластомы. Часто встречается с мутациями <i>ATRX</i> , <i>TP53</i> и <i>PDGFRA</i> .
EGFR	-	+	33%	100% (перв.) редко (втор.)	Типична для первичных ГБ. Редко встречается с мутацией <i>IDH</i> , взаимоисключающая с <i>TP53</i> . Ассоциирована с высокой злокачественностью и ухудшенным прогнозом.
FGFR2	+	3.5%		2.5%	Взаимоисключающая с <i>IDH</i> и <i>EGFR</i> . Уровень экспрессии снижается по мере увеличения степени злокачественности.
PDGFRA	-	3–69%	12–33%	31% (в основном втор.)	
PTEN	Крайне редко	Редко	18%	40% (в основном перв.)	Более агрессивное течение в случае анапластической астроцитомы.
NF1	15–20%	+	+	15–18% (перв.)	Ассоциирована в основном с астроцитомами.
CDKN2A	+		+	+	

Примечание. Мутации, обнаруженные в астроцитомах не только головного, но и спинного мозга, выделены жирным шрифтом. Знаки + и – выявление или отсутствие мутации в данном типе астроцитомы; пустая клетка – отсутствие информации. Приведенные данные основаны на рассмотренной в обзоре информации.

изученные, так и находящиеся пока в процессе оценки перспективности. Общая информация о частоте выявления рассмотренных 16 маркеров в различных типах астроцитом, их особенностях и прогностическом значении представлена в таблице.

Накопленная на сегодняшний день информация позволяет сделать определенные выводы и предположения об ассоциации конкретных мутаций с типами астроцитом (рис. 4), возрастом пациента, другими мутациями, а также с возможным прогнозом развития болезни. Так, например:

- пилоидные астроцитомы содержат в основном мутации в генах *BRAF*, *NF1* и *CDKN2A*;

- мутации *IDH1*, *ATRX* и *TP53* связаны преимущественно со вторичными глиобластомами и астроцитомами II–III степени (довольно часто встречаются в комбинации);

- мутации *H3F3A* встречаются преимущественно в астроцитомах III–IV степени злокачественности и, возможно (в случае мутации K27M), патогномичны для первичных глиобластом спинного мозга;

- мутации в *EGFR* и *PTEN* ассоциированы, прежде всего, с первичной глиобластомой, а также с анапластическими астроцитомами;

- мутация *PDGFRA* чаще встречается во вторичных, а не в первичных глиобластомах.

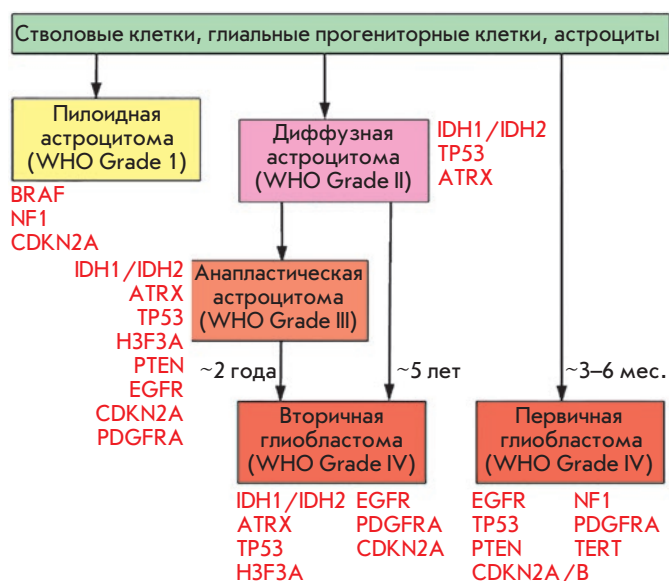


Рис. 4. Наиболее частые генетические изменения, ассоциированные с развитием астроцитом различной степени злокачественности. Адаптировано из [100] с изменениями

Положительным прогностическим маркером астроцитом I и II степени является мутация *BRAF* V600E (у детей и молодых пациентов) [98]. К мутациям, ухудшающим течение болезни и общий прогноз, относятся *H3F3A* K27M, *TP53*, *EGFR* и *PTEN*.

Мутации в гене *IDH* – важный прогностический признак, который позволяет разделить диффузные инфильтративные глиомы на три группы [99]. Наилучший прогноз обеспечивает комбинация мутантного *IDH* (*mutIDH*) и коделеции 1p/19q. Наихудшим течением отличаются опухоли с *IDH* дикого типа (*wtIDH*); такие опухоли обычно агрессивны и по своим молекулярным характеристикам (нарушения генов *EGFR*, *PTEN*, *NF1*, *CDKN2A/B*) сходны с первичными глиобластомами. Третья группа, прогноз которой оказывается промежуточным между двумя указанными, содержит *mutIDH* при отсутствии коделеции 1p/19q. В подавляющем большинстве случаев этот вариант ассоциирован с мутациями *TP53* и *ATRX*. Независимо от степени злокачественности и гистологических характеристик опухоли прогноз при этом варианте всегда более благоприятный, чем в случае *wtIDH*.

Следует отметить, что молекулярные профили детских астроцитом существенно отличаются от взрослых вариантов и содержат преимущественно мутации в генах *BRAF*, *H3F3A* и *ATRX* [99].

В настоящее время отсутствует какая-либо информация о выявлении в АСМ таких маркеров,

как *IDH1/2*, *H3F3A* G34R/V и *FGFR2*. Пилоидные астроцитомы спинного мозга, как показано, ассоциированы с мутациями в генах *BRAF*, *CDKN2*, *NF1* и *PTEN*, а злокачественные АСМ III–IV степени ассоциированы прежде всего с *H3F3A* K27M (преимущественно молодые пациенты и дети), *TP53* и *PTEN* [32]. Остальные включенные в обзор мутации описаны в основном в единичных случаях и не могут использоваться для статистических обобщений.

Помимо прогностического и диагностического значения, биомаркеры могут использоваться и в случае разработки препаратов для таргетной терапии астроцитом. Так, например, показана частичная эффективность селективных ингибиторов изоцитратдегидрогеназ с мутацией *IDH1* R132H как *in vitro*, так и на моделях глиом [100]. Предварительные испытания препарата JNJ-42756493 *in vitro* и *in vivo* подтвердили ингибирование роста опухоли с рекомбинантным геном *FGFR-TACC* у двух пациентов, стандартная терапия у которых оказалась нерезультативной [101]. Некоторые таргетные препараты, такие, как MAb-425 и нимотузумаб (направленные на *EGFR*), а также креноланиб и нилотиниб (действующие на *PDGFR*), уже проходят II–III фазы клинических испытаний [102]. В то же время необходимо понимать, что препараты, показавшие хорошие результаты в терапии интракраниальных астроцитом, могут оказаться неэффективными в отношении АСМ из-за возможных различий их генетических профилей.

К настоящему времени далеко не все молекулярные маркеры, ассоциированные с астроцитомами (особенно с более редкими АСМ), имеют перспективы клинического применения, учитывая их прогностическую, диагностическую или терапевтическую пригодность. В ряде случаев это объясняется недостаточным объемом информации по выявляемым генетическим aberrациям. В последнее время проводятся ретроспективные исследования клинических образцов тканей, направленные на выявление целевых молекулярных маркеров. Такие исследования позволяют охватывать до нескольких сотен образцов и получать статистически значимые генетические ландшафты целевых типов опухолей. Работа в этом направлении способна обеспечить намного более высокую детализацию генетических и эпигенетических изменений, происходящих в опухолевых клетках, выявить новые перспективные биомаркеры и разработать инновационные стратегии диагностики и лечения астроцитом. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (номер проекта 18-29-01042).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Samartzis D., Gillis C.C., Shih P., O'Toole J.E., Fessler R.G. // *Global Spine J.* 2015. V. 5. № 5. P. 425–435.
2. Kaprelian T. / *Astrocytic Tumors of the Spinal Cord. In: Adult CNS Radiation Oncology. Principles and Practice* // Eds Chang E., Brown P., Lo S., Sahgal A., Suh J. Cham: Springer, 2018. P. 129–145.
3. Zadnik P.L., Gokaslan Z.L., Burger P.C., Bettegowda C. // *Nat. Rev. Neurol.* 2013. V. 9. № 5. P. 257–266.
4. Mechtler L.L., Nandigam K. // *Neurol. Clin.* 2013. V. 31. P. 241–268.
5. Chamberlain M.C., Tredway T.L. // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2011. V. 11. P. 320–328.
6. Duong L.M., McCarthy B.J., McLendon R.E., Dolecek T.A., Kruchko C., Douglas L.L., Ajani U.A. // *Cancer.* 2012. V. 118. P. 4220–4227.
7. Lonser R.R., Weil R.J., Wanebo J.E., DeVroom H.L., Oldfield E.H. // *J. Neurosurg.* 2003. V. 98. P. 106–116.
8. Chamberlain M.C., Tredway T.L. // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2011. V. 11. P. 320–328.
9. Louis D.N., Ohgaki H., Wiestler O.D., Cavenee W.K., Burger P.C., Jouvet A., Scheithauer B.W., Kleihues P. // *Acta Neuropathol.* 2007. V. 114. P. 97–109.
10. Teng Y.D., Abd-El-Barr M., Wang L., Hajiali H., Wu L., Zafonte R.D. // *Exp. Neurol.* 2019. V. 311. P. 135–147.
11. Collins V.P., Jones D.T., Giannini C. // *Acta Neuropathol.* 2015. V. 129. № 6. P. 775–788.
12. Smith J.S., Jenkins R.B. // *Front. Biosci.* 2000. V. 5. P. 213–231.
13. Raco A., Esposito V., Lenzi J., Piccirilli M., Delfini R., Cantore G. // *Neurosurgery.* 2005. V. 56. P. 972–981.
14. Abd-El-Barr M.M., Huang K.T., Moses Z.B., Iorgulescu J.B., Chi J.H. // *Neuro-Oncol.* 2018. V. 20. № 6. P. 729–742.
15. Karsy M., Neil J.A., Guan J., Mark M.A., Colman H., Jensen R.L. // *Neurosurg. Focus.* 2015. V. 38. № 3. Article ID E4.
16. Harrop J.S., Ganju A., Groff M., Bilsky M. // *Spine.* 2009. V. 34(Suppl). P. 69–77.
17. Ohgaki H., Kleihues P. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2005. V. 64. № 6. P. 479–489.
18. Ohgaki H. // *Neuropathol.* 2005. V. 25. № 1. P. 1–7.
19. Kanu O.O., Hughes B., Di C., Lin N., Fu J., Bigner D.D., Yan H., Adamson C. // *Clin. Med. Oncol.* 2009. V. 3. P. 39–52.
20. Jones T.S., Holland E.C. // *Toxicol. Pathol.* 2011. V. 39. № 1. P. 158–166.
21. Penman C.L., Faulkner C., Lowis S.P., Kurian K.M. // *Front. Oncol.* 2015. V. 5. Article ID 54.
22. Jacob K., Albrecht S., Sollier C., Faury D., Sader E., Montpetit A., Serre D., Hauser P., Garami M., Bogner L., et al. // *Br. J. Cancer.* 2009. V. 101. № 4. P. 722–733.
23. Jeuken J.W., Wesseling P. // *J. Pathol.* 2010. V. 222. P. 324–328.
24. Hawkins C., Walker E., Mohamed N., Zhang C., Jacob K., Shirinian M., Alon N., Kahn D., Fried I., Scheinemann K., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2011. V. 17. P. 4790–4798.
25. Ida C.M., Lambert S.R., Rodriguez F.J., Voss J.S., McCann B.E., Seys A.R., Halling K.C., Collins V.P., Giannini C. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2012. V. 71. P. 631–639.
26. Jones D.T., Hutter B., Jager N., Korshunov A., Kool M., Warnatz H.J., Zichner T., Lambert S.R., Ryzhova M., Quang D.A.K., et al. // *Nat. Genet.* 2013. V. 45. P. 927–932.
27. Jones D.T., Kocialkowski S., Liu L., Pearson D.M., Ichimura K., Collins V.P. // *Oncogene.* 2009. V. 28. P. 2119–2123.
28. Schindler G., Capper D., Meyer J., Janzarik W., Omran H., Herold-Mende C., Schmieder K., Wesseling P., Mawrin C., Hasselblatt M., et al. // *Acta Neuropathol.* 2011. V. 121. № 3. P. 397–405.
29. Badiali M., Gleize V., Paris S., Moi L., Elhouadani S., Arcella A., Morace R., Antonelli M., Buttarelli F.R., Figarella-Branger D., et al. // *Brain Pathol.* 2012. V. 22. P. 841–847.
30. Huillard E., Hashizume R., Phillips J.J., Griveau A., Thrie R.A., Aoki Y., Nicolaidis T., Perry A., Waldman T., McMahon M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. P. 8710–8715.
31. Horbinski C., Nikiforova M.N., Hagenkord J.M., Hamilton R.L., Pollack I.F. // *Neuro-Oncology.* 2012. V. 14. P. 777–789.
32. Shankar G.M., Lelic N., Gill C.M., Thorner A.R., van Hummelen P., Wisoff J.H., Loeffler J.S., Brastianos P.K., Shin J.H., Borges L.F., et al. // *Acta Neuropathol.* 2016. V. 131. P. 147–150.
33. Horbinski C., Hamilton R.L., Nikiforov Y., Pollack I.F. // *Acta Neuropathol.* 2010. V. 119. № 5. P. 641–649.
34. Cancer Genome Atlas Research Network // *Nature.* 2008. V. 455. P. 1061–1068.
35. Parsons D.W., Jones S., Zhang X., Lin J.C.-H., Leary R.J., Angenendt P., Mankoo P., Carter H., Siu I.-M., Gallia G.L., et al. // *Science.* 2008. V. 321. № 5897. P. 1807–1812.
36. Johnson A., Severson E., Gay L., Vergilio J.A., Elvin J., Suh J., Daniel S., Covert M., Frampton G.M., Hsu S., et al. // *Oncologist.* 2017. V. 22. № 12. P. 1478–1490.
37. Yang H., Ye D., Guan K.L., Xiong Y. // *Clin. Cancer Res.* 2012. V. 18. P. 5562–5571.
38. Yan H., Parsons D.W., Jin G., McLendon R., Rasheed B.A., Yuan W., Kos I., Batinic-Haberle I., Jones S., Riggins G.J., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2009. V. 360. № 8. P. 765–773.
39. Huse J.T., Aldape K.D. // *Clin. Cancer Res.* 2014. V. 20. № 22. P. 5601–5611.
40. Dang L., White D.W., Gross S., Bennett B.D., Bittinger M.A., Driggers E.M., Fantin V.R., Jang H.G., Jin S., Keenan M.C., et al. // *Nature.* 2009. V. 462. № 7274. P. 739–744.
41. Noushmehr H., Weisenberger D.J., Diefes K., Phillips H.S., Pujara K., Berman B.P., Pan F., Pelloski C.E., Sulman E.P., Bhat K.P., et al. // *Cancer Cell.* 2010. V. 17. № 5. P. 510–522.
42. Lu C., Ward P.S., Kapoor G.S., Rohle D., Turcan S., Abdel-Wahab O., Edwards C.R., Khanin R., Figueroa M.E., Melnick A., et al. // *Nature.* 2012. V. 483. № 7390. P. 474–478.
43. Fu Y., Zheng S., Zheng Y., Huang R., An N., Liang A., Hu C. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2012. V. 44. № 5. P. 770–775.
44. Watanabe T., Nobusawa S., Kleihues P., Ohgaki H. // *Am. J. Pathol.* 2009. V. 174. № 4. P. 1149–1153.
45. Ellezam B., Theeler B.J., Walbert T., Mammoser A.G., Horbinski C., Kleinschmidt-DeMasters B.K., Perry A., Puduvalli V., Fuller G.N., Bruner J.M., et al. // *Acta Neuropathol.* 2012. V. 124. № 3. P. 449–451.
46. Anderson M.D., Gilbert M.R. // *J. Nat. Comp. Canc. Netw.* 2014. V. 12. № 5. P. 665–672.
47. Jiao Y., Killela P.J., Reitman Z.J., Rasheed A.B., Heaphy C.M., de Wilde R.F., Rodriguez F.G., Rosemberg S., Oba-Shinjo S.M., Nagahashi M.S.K., et al. // *Oncotarget.* 2012. V. 3. P. 709–722.
48. Karsy M., Guan J., Cohen A.L., Jensen R.L., Colman H. // *Curr. Neurol. Neurosci. Rep.* 2017. V. 17. Article ID 19.
49. Kannan K., Inagaki A., Silber J., Gorovets D., Zhang J., Kastenhuber E.R., Hequy A., Petrini J.H., Chan T.A., Huse J.T. // *Oncotarget.* 2012. V. 3. P. 1194–1203.
50. Clynes D., Jelinska C., Xella B., Ayyub H., Scott C., Mitson M., Taylor S., Higgs D.R., Gibbons R.J. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 1–11.
51. Clynes D., Gibbons R.J. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2013. V. 23. P. 289–294.
52. Schwartzentruber J., Korshunov A., Liu X.-Y., Jones D.T.W., Pfaff E., Jacob K., Sturm D., Fontebasso A.M., Quang D.-A.K., Tonjes M., et al. // *Nature.* 2012. V. 482. P. 226–231.

53. Rodriguez F.J., Brosnan-Cashman J.A., Allen S.J., Vizcaino M.A., Giannini C., Camelo-Piragua S., Webb M., Matsushita M., Wadhvani N., Tabbarah A., et al. // *Brain Pathol.* 2019. V. 29. № 1. P. 126–140.
54. Wiestler B., Capper D., Holland-Letz T., Korshunov A., von Deimling A., Pfister S.M., Platten M., Weller M., Wick W. // *Acta Neuropathol.* 2013. V. 126. № 3. P. 443–451.
55. Takai K., Tanaka S., Sota T., Mukasa A., Komori T., Taniguchi M. // *World Neurosurg.* 2017. V. 108. P. 991.e13–991.e16.
56. Shows J., Marshall C., Perry A., Kleinschmidt-DeMasters B.K. // *Brain Pathol.* 2016. V. 26. № 1. P. 120–123.
57. Nagaishi M., Nobusawa S., Yokoo H., Sugiura Y., Tsuda K., Tanaka Y., Suzuki K., Hyodo A. // *Brain Tumor Pathol.* 2016. V. 33. P. 267–269.
58. Talbert P.B., Henikoff S. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2010. V. 11. P. 264–275.
59. Wu G., Broniscer A., McEachron T.A., Lu C., Paugh B.S., Beckfort J., Qu C., Ding L., Huether R., Parker M., et al. // *Nat. Genet.* 2012. V. 44. P. 251–253.
60. Caren H., Pollard S.M., Beck S. // *Mol. Aspects Med.* 2013. V. 34. P. 849–862.
61. Lewis P.W., Muller M.M., Koletsky M.S., Cordero F., Lin S., Banaszynski L.A., Garcia B.A., Muir T.W., Becher O.J., Allis C.D. // *Science.* 2013. V. 340. P. 857–861.
62. Sturm D., Witt H., Hovestadt V., Khuong-Quang D.A., Jones D.T.W., Konermann C., Pfaff E., Tonjes M., Sill M., Bender S., et al. // *Cancer Cell.* 2012. V. 22. P. 425–437.
63. Lee J., Solomon D.A., Tihan T. // *J. Neurooncol.* 2017. V. 132. P. 1–11.
64. Solomon D.A., Wood M.D., Tihan T., Bollen A.W., Gupta N., Phillips J.J., Perry A. // *Brain Pathol.* 2016. V. 26. P. 569–580.
65. Aihara K., Mukasa A., Gotoh K., Saito K., Nagae G., Tsuji S., Tatsuno K., Yamamoto S., Takayanagi S., Narita Y., et al. // *Neuro-Oncol.* 2014. V. 16. P. 140–146.
66. Feng J., Hao S., Pan C., Wang Y., Wu Z., Zhang J., Yan H., Zhang L., Wan H. // *Hum. Pathol.* 2015. V. 46. P. 1626–1632.
67. Nguyen A.T., Colin C., Nanni-Metellus I., Padovani L., Mourage C.A., Varlet P., Miguel C., Uro-Coste E., Godfraind C., Lechapt-Zalcman E., et al. // *Neuropathol. Appl. Neurobiol.* 2015. V. 41. P. 403–408.
68. Khuong-Quang D.A., Buczkowicz P., Rakopoulos P., Liu X.-Y., Fontebasso A.M., Bouffet E., Bartels U., Albrecht S., Schwartzentruber J., Letourneau L., et al. // *Acta Neuropathol.* 2012. V. 124. P. 439–447.
69. Tanaka S., Otani R., Hongo H., Matsuda H., Ikemura M., Nomura M., Takayanagi S., Nejo T., Takahashi S., Kitagawa Y., et al. // *Neuro-Oncol.* 2017. V. 19(suppl. 6). P. vi176.
70. Gessi M., Gielen G.H., Dreschmann V., Waha A., Pietsch T. // *Acta Neuropathol.* 2015. V. 130. P. 435–437.
71. Je E.M., Yoo N.J., Lee S.H. // *Acta Pathol. Microbiol. Immunol. Scand.* 2014. V. 122. № 1. P. 81–82.
72. Khani P., Nasri F., Chamani F.K., Saeidi F., Nahand J.S., Tabibkhouei A., Mirzaei H. // *J. Neurochem.* 2019. V. 148. № 2. P. 188–203.
73. Kanu O.O., Hughes B., Di C., Lin N., Fu J., Bigner D.D., Yan H., Adamson C. // *Clin. Med. Oncol.* 2009. V. 3. P. 39–52.
74. England B., Huang T., Karsy M. // *Tumor Biol.* 2013. V. 34. P. 2063–2074.
75. Lipp E.S., McLendon R.E. // *Semin. Oncol. Nurs.* 2018. V. 34. № 5. P. 430–442.
76. Govindan A., Chakraborti S., Mahadevan A., Chickabasa-vaiah Y.T., Santosh V., Shankar S.K. // *Brain Tumor Pathol.* 2011. V. 28. P. 297–303.
77. Walker C., Baborie A., Crooks D., Wilkins S., Jenkinson M.D. // *Br. J. Radiol.* 2011. V. 84. № S2. P. S90–S106.
78. Sami A., Karsy M. // *Tumor Biol.* 2013. V. 34. № 4. P. 1991–2002.
79. Groszer M., Erickson R., Scripture-Adams D.D., Lesche R., Trumpp A., Zack J.A., Kornblum H.I., Liu X., Wu H. // *Science.* 2001. V. 294. P. 2186–2189.
80. Marino S., Krimpenfort P., Leung C., van der Korput H.A., Trapman J., Camenisch I., Berns A., Brandner S. // *Development.* 2002. V. 129. P. 3513–3522.
81. Ohgaki H., Dessen P., Jourde B., Horstmann S., Nishikawa T., Di Patre P.L., Burkhard C., Schüler D., Probst-Hensch N.M., Maiorka P.C., et al. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 6892–6899.
82. Ohgaki H., Kleihues P. // *Am. J. Pathol.* 2007. V. 170. № 5. P. 1445–1453.
83. Smith J.S., Tachibana I., Passe S.M., Huntley B.K., Borell T. J., Iturria N., O'Fallon J.R., Schaefer P.L., Scheithauer B.W., James C.D., et al. // *J. Nat. Canc. Inst.* 2001. V. 93. № 16. P. 1246–1256.
84. Wiencke J.K., Zheng S., Jelluma N., Tihan T., Vandenberg S., Tamgüney T., Baumber R., Parsons R., Lamborn K.R., Berger M.S., et al. // *Neuro-Oncol.* 2007. V. 9. P. 271–279.
85. Ekstrand A., James C., Cavenee W., Seliger B., Pettersson R.F., Collins V.P. // *Canc. Res.* 1991. V. 8. P. 2164–2172.
86. Janne P.A., Engelman J.A., Johnson B.E. // *J. Clin. Oncol.* 2005. V. 23. P. 3227–3234.
87. Lee J.C., Vivanco I., Beroukhi R., Huang J.H., Feng W.L., DeBiasi R.M., Yoshimoto K., King J.C., Nghiemphu P., Yuza Y., et al. // *PLoS Med.* 2006. V. 3. Article ID: e485.
88. Katanasaka Y., Kodera Y., Kitamura Y., Morimoto T., Tamura T., Koixumi F. // *Mol. Cancer.* 2013. V. 12. Article ID: 31.
89. Inda M.M., Bonavia R., Mukasa A., Narita Y., Sah D.W., Vandenberg S., Brennan C., Johns T.G., Bachoo R., Hadwiger P., et al. // *Genes Dev.* 2010. V. 24. P. 1731–1745.
90. McNamara M.G., Sahebjam S., Mason W.P. // *Cancers (Basel).* 2013. V. 5. № 3. P. 1103–1119.
91. Rasheed B.K., Wiltshire R.N., Bigner S.H., Bigner D.D. // *Curr. Opin. Oncol.* 1999. V. 11. P. 162–167.
92. Ryu S.J., Kim J.Y., Kim K.H., Park J.Y., Kuh S.U., Chin D.K., Kim L.S., Chi Y.E., Kim S.H. // *Eur. Spine J.* 2016. V. 25. P. 4067–4079.
93. Jeong S.M., Chung Y.G., Lee J.B., Shin I.Y. // *J. Korean Neurosurg. Soc.* 2010. V. 47. № 1. P. 68–70.
94. Shinojima N., Tada K., Shiraishi S., Kamiryo T., Kochi M., Nakamura H., Makino K., Saya H., Hirano H., Kuratsu J., et al. // *Cancer Res.* 2003. V. 63. P. 6962–6970.
95. Aldape K., Zadeh G., Mansouri S., Reifenberger G., von Deimling A. // *Acta Neuropathol.* 2015. V. 129. P. 829–848.
96. Wrensch M., Wiencke J., Wiemels J., Miike R., Patoka J., Moghadassi M., McMillan A., Kelsey K.T., Aldape K., Lamborn K.R., et al. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. P. 4531–4541.
97. Batchelor T., Betensky R., Esposito J.M., Pham L.D., Dorfman M.V., Piscatelli N., Jhung D., Rhee D., Louis D.N. // *Clin. Cancer Res.* 2004. V. 10. P. 228–233.
98. Aquilanti E., Miller J., Santagata S., Cahill D.P., Brastianos P.K. // *Neuro-Oncol.* 2018. V. 20(S7). P. 17–26.
99. Camelo-Piragua S., Kesari S. // *Exp. Rev. Neurotherapeut.* 2016. V. 16. № 9. P. 1055–1065.
100. Rohle D., Popovici-Muller J., Palaskas N., Turcan S., Grommes C., Campos C., Tsoi J., Clark O., Oldrini B., Komisopoulou E., et al. // *Science.* 2013. V. 340. P. 626–630.
101. Di Stefano A.L., Fucci A., Frattini V., Labussiere M., Mokhtari K., Zoppoli P., Marie Y., Bruno A., Boisselier B., Giry M., et al. // *Clin. Cancer Res.* 2015. V. 21. № 14. P. 3307–3317.
102. Liang S., Shen G. *Molecular Targets of CNS Tumors.* Rijeka: InTech Press, 2011. P. 325–342.

УДК 577.1

Направленный транспорт лекарственных препаратов в липидоподобных наноконтейнерах и внеклеточных везикулах

А. В. Соколов, Н. Н. Костин, Л. А. Овчинникова, Я. А. Ломакин, А. А. Кудряева*

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

*E-mail: anna.kudriaeva@gmail.com

Поступила в редакцию 15.01.2019

Принята к печати 13.05.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-28-41

РЕФЕРАТ Возможность адресной доставки препаратов к определенным органам-мишеням, тканям и клеткам открыла невероятные перспективы для разработки новых способов терапии. Технология направленного транспорта нацелена на создание многофункциональных носителей, способных к длительной циркуляции в организме пациента и обладающих низкой токсичностью. Поверхность современных синтетических носителей обладает высоким структурным сходством с клеточной мембраной, что в сочетании с дополнительными модификациями способствует передаче и биологических свойств, позволяя эффективно преодолевать физиологические барьеры. Наряду с искусственными контейнерами все большее внимание уделяется исследованию внеклеточных везикул в качестве естественных переносчиков лекарственных средств. В обзоре рассмотрены системы направленного транспорта с помощью липидных и липидоподобных наночастиц, а также внеклеточных везикул, обладающих высоким уровнем биосовместимости. Особое внимание уделено генетически кодируемым переносчикам терапевтических средств.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА внеклеточные везикулы, липосомы, наноконтейнеры, полимерные носители, самособирающиеся везикулы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БТ – бактериальные тени; ВВ – внеклеточные везикулы; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ГКВВ – генетически кодируемые внеклеточные везикулы; ГКГС – главный комплекс гистосовместимости; ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; ДК – дендритные клетки; ИЛ – интерлейкин; ЛПС – липополисахарид; миРНК – малые интерферирующие РНК; МСК – мезенхимальные стволовые клетки; ПЭГ – полиэтиленгликоль; РЭС – ретикулоэндотелиальная система; ФНО – фактор некроза опухоли; ЭАЭ – экспериментальный аутоиммунный энцефаломиелит; EDTA – этилендиаминтетрауксусная кислота.

ВВЕДЕНИЕ

При создании современных терапевтических препаратов наряду с низкомолекулярными соединениями все чаще используют биополимеры и их фрагменты: белки, пептиды, олигонуклеотиды, РНК или ДНК. Для исключения потери активности из-за внешних факторов способы приготовления лекарственных средств и их введения в организм пациента должны удовлетворять определенным требованиям. Однако основной проблемой на пути внедрения потенциальных терапевтических соединений в клиническую практику представляет сложность доставки препарата в целевые клетки. Доставку без использования носителей в значительной степени затрудняют пре-

ждевременная деградация препарата в организме и низкая проницаемость клеточных мембран, поэтому разработка и оптимизация методов доставки лекарственных веществ относятся к одним из наиболее изучаемых направлений нанобиомедицины.

Существующие системы доставки можно разделить на две группы: вирусные (лентивирусы, аденовирусы, ретровирусы) [1] и невирусные (макро- и наночастицы, полимерные частицы) [2]. Быстрое развитие нанотехнологий способствует созданию новых методов доставки на основе наночастиц из различных материалов, обладающих разнообразными поверхностными характеристиками и физико-химическими свойствами, удовлетворяющими

условиям конкретной задачи [3]. Однако каждый тип наночастиц обладает как преимуществами, так и определенными недостатками, ограничивающими их применение. Разрабатываемые наноконтейнеры способны выступать в качестве носителей как белковых препаратов [4], так и ДНК [5], и РНК [6]. Наночастицы, полученные из природных полимеров, таких, как фосфолипиды, полисахариды, белки и пептиды, более эффективны, чем наночастицы из синтетических полимеров, благодаря их биосовместимости [7] и отсутствию токсичных продуктов деградации [8]. Используемые в настоящее время наноразмерные фармацевтические контейнеры-носители обладают множеством полезных свойств, включая эффективную внутриклеточную доставку и длительную циркуляцию в кровотоке, сниженную токсичность благодаря преимущественному накоплению в целевой области, улучшенную фармакокинетику и биораспределение терапевтического агента, а также способность к высвобождению содержимого контейнера под действием определенных физиологических условий [9]. Кроме того, активно изучается возможность использования внеклеточных везикул в качестве природной системы доставки лекарственных препаратов. При этом исследуют как интактные везикулы, так и везикулы, предварительно нагруженные терапевтическим агентом [10]. В данном обзоре мы подробнее рассмотрим особенности липидных и липидоподобных систем доставки, уделив особое внимание перспективам использования внеклеточных везикул.

ЛИПИДНЫЕ И ЛИПИДОПОДОБНЫЕ СИСТЕМЫ ДОСТАВКИ

Первым, универсальным, наиболее изученным и широко применяемым носителем лекарств является липосома и ее производные. За последние 10 лет разработано множество систем с использованием наноносителей на основе липидных и липидоподобных везикул, включая липосомы (liposomes), ниосомы (niosomes), этосомы (ethosomes), трансферсомы (transfersomes), твердые липидные наночастицы (SLN, solid lipid nanoparticles), наноструктурированные липидные носители (NLC, nanostructured lipid carriers), а также гибридные липид-полимерные наночастицы (LPN, lipid-polymer hybrid nanoparticles). Схематическая структура перечисленных наноносителей показана на *рис. 1*. Липидные наноносители чаще всего состоят из физиологических липидов, что обеспечивает безопасную и эффективную доставку, а также повышенную биодоступность терапевтических агентов. Эти наночастицы нетоксичны и расщепляются в организме наряду с эндогенными липидами.

Липосомы

Липосомы, являющиеся самым распространенным способом доставки, впервые были описаны в 1965 году [11]. Функциональный каркас липосомы, состоящий из двухслойной липидной оболочки, обуславливает не только высокую подвижность формы, но и способность везикул имитировать биофизические свойства живых клеток.

Липосомы состоят в основном из природных и/или синтетических фосфо- и сфинголипидов, чаще всего фосфатидилхолина и фосфатидилэтаноламина – основных структурных элементов биологических мембран. Но и другие фосфолипиды, такие, как фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин и фосфатидилинозит могут дополнительно использоваться при получении липосом [12]. Размер липосом варьирует практически в пределах трех порядков: различают двухслойные (моноламеллярные), которые в свою очередь делятся на малые SUV (25–50 нм) и большие LUV (≥ 100 нм), а также многослойные (мультиламеллярные) липосомы MLV размером 0.05–10 мкм. Самый простой способ получения SUV – обработка дисперсии липидов ультразвуком. MLV получают путем смешивания предварительно полученных SUV с водным раствором терапевтического агента с последующей лиофилизацией [13] или гидратацией липидных пленок, при этом добавление органических растворителей в процессе гидратации увеличивает эффективность инкапсуляции с 10 до 40% [14]. LUV получают с помощью обратного фазового испарения [15] или методом удаления детергента [16]. Помимо классификации липосом по размеру, существует разделение и по заряду в зависимости от входящих в состав липидов и фосфолипидов: нейтральные (фосфатидилхолин и фосфатидилэтаноламин), анионные (фосфатидилсерин, фосфатидилглицерин, фосфатидные кислоты и фосфатидилинозит), катионные (стеариламин или ДС-холестерин) [17–19].

Традиционные «липосомы первого поколения» на основе фосфолипидов обладают низкой стабильностью и быстро деградируют после введения в организм, что является существенным недостатком, особенно при доставке цитотоксических препаратов [20]. Для стабилизации липосом может использоваться хитозан – природный гидрофильный биоразлагаемый полимер с низкой токсичностью [21]. Но даже стабильные липосомы, независимо от их заряда и размера, весьма эффективно поглощаются клетками ретикулоэндотелиальной системы (РЭС), находящимися в печени и селезенке, что активно используется при заболеваниях, связанных с поражением данных органов. Однако для увеличения времени циркуляции и эффективности доставки в другие

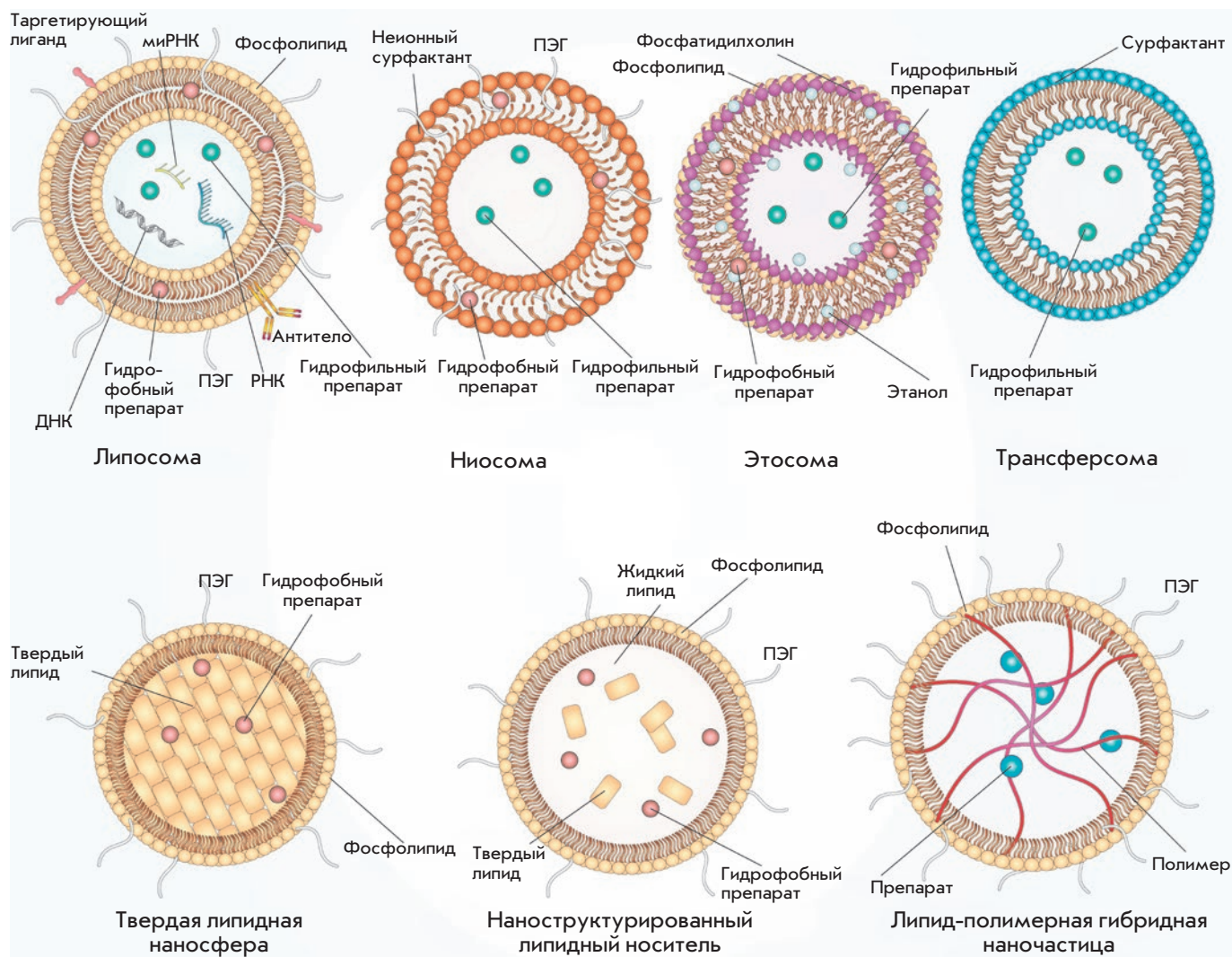


Рис. 1. Строение липидных и липидоподобных наночастиц. Липосомы, как правило, состоят из природных фосфолипидов, основного компонента биологических мембран. Ниосомы состоят из неионного сурфактанта и холестерина или его производных. Этосомы представляют собой липидные везикулы, состоящие из фосфолипидов и большого количества этанола. Трансферсома – это эластичные липосомы, легко поддающиеся деформации, что позволяет им проникать в глубокие слои кожи. Ядра твердых липидных наночастиц состоят из смеси твердых липидов. Наноструктурированные липидные носители образованы из смеси твердых и жидких липидов. Гибридные липидные наночастицы имеют полимерное ядро, оболочка – липидный бислой

ткани и органы липосомы делают «невидимыми» для РЭС (stealth liposome) путем модификации их поверхности биосовместимым инертным гидрофильным полимером – полиэтиленгликолем (ПЭГ) [22, 23], дополнительно блокируя взаимодействия с белками крови [24, 25]. Также разработаны «суперневидимые» липосомы (SSL, super stealth liposomes), где ПЭГ закреплен посредством β-глутаминовой кислоты на нескольких молекулах фосфоэтаноламина [26]. Данная композиция, как и увеличение длины цепи ПЭГ, повышает стабильность липосом, продлевает период полувыведения, улучшает профиль биораспределения [26, 27]. Совсем недавно было показано,

что доставка терапевтических агентов путем транс-портировки наночастиц на поверхности эритроцитов может быть чрезвычайно эффективной даже при малом времени циркуляции в кровотоке [28].

Помимо увеличения стабильности и времени циркуляции препарата в кровотоке, в большинстве случаев требуется направленная доставка к определенным клеткам-мишеням. Для решения подобных задач разработано множество дополнительных модификаций липосом, например, включение диолеилфосфатидилэтаноламина (DOPE) в состав катионных липосом способствует эффективной доставке в предшественники дендритных клеток (ДК) [29],

а маннозилирование липосом увеличивает их захват непосредственно ДК [30]. Модификация липосом искусственным полипептидом DARPin, специфичным к опухолевому рецептору HER2, способствует эффективной доставке наночастиц в клетки, экспрессирующие данный рецептор [31]. В настоящее время на стадии клинических испытаний находятся несколько препаратов на основе таргетированных липосом. Среди них наиболее перспективными кажутся препараты MCC-465 (модифицированные ПЭГ липосомы, несущие доксорубин и димеры F(ab')-фрагментов) [32], MM-302 (модифицированные ПЭГ липосомы, специфичные к HER2, несущие доксорубин) [33], 2B3-101 (липосомы, несущие на поверхности глутатион), MBP-426 и SGT-53 (липосомы, несущие в качестве вектора трансферрин и TfRscFv (anti-transferrin receptor single-chain antibody) соответственно) [34, 35]. Помимо антител, их фрагментов и пептидов, для модификации поверхности липосом с целью повышения их селективности могут также использоваться нуклеиновые кислоты и небольшие молекулы [36]. Среди перечисленных лигандов для адресной доставки особое место занимают аптамеры, которые считаются одними из самых перспективных кандидатов с уникальными характеристиками [37]. Таким образом, липосомы на настоящий момент являются одним из самых универсальных способов доставки: с их помощью возможна доставка широкого спектра лекарственных средств, в том числе противоопухолевых и противомикробных препаратов, ферментов, вакцин, ДНК и РНК.

В настоящее время в клинической практике применяется множество терапевтических агентов, инкапсулированных в липосомы, еще большее их число находится на стадии клинических испытаний [38]. Впервые липосомный носитель был введен в клиническую практику в 1995 году. Им стал противоопухолевый препарат Doxil[™]/Caelyx[™] [39]. Кроме того, в терапии злокачественной трансформации используют препараты Myocet[™], DaunoXome[™], Depocyt[™], Marqibo[™], Onivyde[™], AmBisome[™], DepoDur[™], Visudyne[™], Abelcet[™] и Curosurf[™].

Липосомы также проходят испытания в качестве носителей средств против аутоиммунных заболеваний, в частности ревматоидного артрита и рассеянного склероза (РС). Например, препарат Xemys – это инкапсулированная в маннозилированные SUV смесь иммунодоминантных пептидов основного белка миелина (MBP, myelin basic protein), одного из основных аутоантигенов при рассеянном склерозе. Полноразмерный основной белок миелина, а также его фрагменты долгое время рассматривали в качестве средства, эффективного при аутоиммунной нейродегенерации [40]. Показано, что введение опре-

деленных пептидов MBP, инкапсулированных в липосомы, подавляет развитие экспериментального аутоиммунного энцефаломиелита (ЭАЭ) у модельных животных [41]. На настоящий день успешно проведены I и II стадии клинических испытаний препарата Xemys, одобрено проведение III стадии [42]. Благодаря модификации поверхности липосом остатками маннозы, инкапсулированные в липосомы пептиды MBP захватываются в основном профессиональными АПК (антигенпредставляющими клетками) – макрофагами и ДК через маннозные рецепторы CD206. Предполагается, что избыточная презентация фрагментов MBP в составе молекул МНС класса II на поверхности АПК способствует индукции толерантности к данному белку и, как следствие, уменьшению аутоиммунного воспаления. В сыворотке больных РС, получавших препарат Xemys, выявлено снижение уровней моноцитарного хемотаксического фактора-1 (MCP-1/CCL2), макрофагов, воспалительного белка-1 (MIP-1/CCL4), интерлейкинов ИЛ-2 и ИЛ-7 [43]. Кроме того, исследовано влияние пептидов MBP46–62, 124–139 и 147–170, входящих в состав препарата, на высвобождение цитокинов и активацию иммунных клеток у больных РС и здоровых доноров [44].

Способность липосом направленно доставлять требуемый антиген к АПК и тем самым модулировать иммунный ответ широко используется при разработке противовирусных и бактериальных вакцин. В настоящее время ряд липосомных препаратов находится на стадии клинических испытаний в качестве адъювантов профилактических и терапевтических вакцин против малярии, гриппа, туберкулеза, вируса иммунодефицита человека (ВИЧ) и лихорадки денге [45], тогда как препараты Cervarix[™], Inflexal[™] и Erahal[™] уже являются коммерчески доступными липосомными вакцинами против вируса папилломы человека (ВПЧ), вируса гриппа и вируса гепатита А соответственно [46].

Ниосомы

Ниосомы представляют собой везикулы (50–800 нм), состоящие из двойного слоя неионного сурфактанта, часто дополнительно содержащие холестерин или его производные [47]. Структура ниосом позволяет инкапсулировать в них как гидрофильные, так и липофильные соединения, при этом гидрофильный агент располагается во внутреннем водном пространстве, в то время как липофильный – внутри бислоя. Свойства данных везикул могут варьировать в зависимости от размера, ламеллярности и заряда поверхности. В качестве системы доставки ниосомы обладают некоторыми преимуществами перед классическими липосомами: имеют большее время полужизни, просты в получении и легко подвергаются

модификациям, обладают высокой совместимостью с биологическими системами и низкой токсичностью благодаря своей неионной природе, неиммуногенны и подвергаются биодegradации [48]. Кроме того, ниосомы практически не распознаются ретикулоэндотелиальной системой. К недостаткам ниосом относится невысокая стабильность (хотя и более высокая, чем у липосом), склонность к агрегации и частичный выход инкапсулированного агента из наноконтейнера в процессе доставки [49].

Несмотря на большое количество публикаций, посвященных изучению возможных составов и применению ниосом, лишь немногие препараты доведены до клинических испытаний [47]. Большинство испытаний показало, что инкапсуляция лекарственных препаратов в ниосомы имеет ряд преимуществ, таких, как большая эффективность, уменьшение количества побочных эффектов, удобный способ введения. Так, ниосомы эффективны при внутривенном, внутримышечном, пероральном, внутриглазном, подкожном, легочном, внутрибрюшинном и трансдермальном введении [50]. Данный вид везикул используется для инкапсуляции таких препаратов, как доксорубин, инсулин, овальбумин, олигонуклеотиды, EGFP, гемагглютинин, ДНК-вакцины, α -интерферон и многие другие [51]. Кроме того, ниосомы используют для введения в глаз препарата такролимус после трансплантации роговицы [52], пероральной доставки метформина [53], а также в косметической промышленности.

Этосомы

Этосомы, впервые описанные в 1996 году, представляют собой модификацию классических липосом и состоят из фосфолипидов, этанола (20–45%) и воды [54]. Помимо этанола, этосомы могут содержать пропиленгликоль или изопропиловый спирт. В зависимости от способа приготовления этосомы имеют размер от нескольких десятков нанометров до нескольких микрон. В этосомы могут быть инкапсулированы как гидрофильные, так и липофильные лекарственные средства; увеличение концентрации этанола в этосомах способствует повышению растворимости соединений и тем самым включению большего количества терапевтического агента. Известно, что этосомы значительно превосходят классические липосомы для доставки трансдермальных форм лекарственных средств из-за наличия отрицательного ζ -потенциала. Кроме того, этанол приводит к дезорганизации липидов рогового слоя кожи, что значительно повышает эффективность проникновения частиц лекарственных средств в глубокие слои дермы. Накопление препарата в дермальных слоях приводит к эффекту замедленного высвобождения вещества

из этосом, что способствует пролонгации лечебного действия [55]. К недостаткам этосом относят довольно частые аллергические реакции на спирт или другие их компоненты [56], а также возможность применения исключительно для трансдермальной доставки. Кроме того, легкая воспламеняемость этанола требует повышенных мер предосторожности при приготовлении, применении, транспортировке и хранении данных наноконтейнеров [57].

Трансферсомы

Трансферсомы – везикулы, состоящие из фосфатидилхолина, сурфактанта и этанола, обладают повышенной проникающей способностью через межклеточные поры, что достигается путем добавления мембранных модификаторов – холата натрия, стеариламина, Span 60, Span 80, Tween 60 и Tween 80 – поверхностно-активных веществ, способствующих дестабилизации липидных бислоев и увеличению деформируемости липосомных мембран [58]. В зависимости от состава трансферсомы, проникающие в слои кожи, либо сохраняют свою интактную структуру, либо происходит их слияние с клеточной мембраной [59]. Благодаря способности легко менять форму, они проходят через поры, диаметр которых в 5–10 раз меньше их собственного диаметра, что обеспечивает высокий уровень проникновения лекарственных веществ [60]. Эффективность трансферсом в качестве системы доставки показано на ибупрофене [61], тербинафине [62] и эмодине [63].

Кроме перечисленных универсальных липидоподобных систем доставки, существует множество модификаций, разработанных для многих конкретных случаев. Известны термочувствительные [64], магнитные [65], мультифункциональные SMART-липосомы [66], а также фармакосомы – амфифильные фосфолипидные комплексы лекарственных соединений [67].

Твердые липидные наночастицы

В начале 1990-х годов был разработан новый класс липидных частиц – липосферы, или твердые липидные наносферы SLN (solid lipid nanospheres) [68, 69]. В везикулах данного типа твердый липид – чаще всего нейтральный триглицерид, используют как матрицу для инкапсуляции лекарственного средства. Возможно также использование насыщенных жирных кислот, тогда как полярные фосфолипиды служат липофильными эмульгаторами. Моно- и диглицериды применяют значительно реже из-за их полярности. SLN могут быть получены различными способами: гомогенизацией при высоком давлении, микроэмульсионным методом и преципитацией липидных частиц при выпаривании растворителя [70]. SLN отличаются от липосом повышенной стабильностью, возможно-

стью контролируемого высвобождения, сравнительно легкими и дешевыми методами приготовления [71], а от везикул из полимерных материалов их отличает отсутствие токсичности [72]. Хотя SLN имеют много преимуществ по сравнению с существующими системами доставки, они обладают и некоторыми недостатками, например, низкой эффективностью инкапсулирования гидрофильных препаратов [18]. Вероятной причиной этого является низкая растворимость гидрофильных соединений в липидном бислое и матрице. Для улучшения захвата гидрофильных лекарственных средств, например доксорубицина [73] и диминазена [74], применяют два подхода. В первом используют SLN, загруженные маслом, а во втором – модифицируют липидную матрицу путем включения в нее амфифильных соединений, фосфатидилхолина, полиглицерил-3-диизостеарата и сорбита [75].

Кроме того, SLN характеризуются неравномерным по времени высвобождением лекарственного средства [68, 76]. Данный недостаток пока не удается решить, что накладывает довольно большие ограничения на применение этих наночастиц, так как высокая начальная скорость высвобождения может способствовать серьезным осложнениям, например, при доставке цитотоксичных противоопухолевых препаратов [68].

Наноструктурированные липидные носители

Наноструктурированные липидные носители (NLC, nanostructured lipid carriers) – второе поколение липидных наночастиц SLN, разработаны в 1999 году с целью устранения проблемы быстрого высвобождения терапевтического средства, наблюдаемого при использовании SLN [77]. NLC представляют собой наночастицы, состоящие из твердой липидной матрицы и содержащие дополнительно жидкий липид или масло. Смесь твердого и жидкого липида способствует равномерной инкапсуляции соединений и предотвращает их быструю диффузию [78, 79]. NLC могут быть получены несколькими способами, из которых наиболее часто используется гомогенизация при высоком давлении, а также микроэмульсионным методом, фазовой инверсией и др. Первые препараты, содержащие NLC, крем NanoRepair Q10™ и сыворотка NanoRepair Q10™ (Dr. Rimpler GmbH, Германия) были впервые представлены на косметическом рынке в 2005 году. В настоящее время в продаже представлено более 30 косметических средств, содержащих NLC, однако, фармацевтические препараты отсутствуют [80, 81].

Липид-полимерные гибридные наночастицы

Наконец, сравнительно недавно были разработаны липид-полимерные гибридные наночастицы (LPN,

lipid-polymer hybrid nanoparticles), которые сочетают в себе характеристики как полимерных наночастиц, так и липосом. В наноконтейнерах этого вида терапевтический препарат инкапсулирован в полимерное ядро, окруженное липидным бислоем, модифицированным ПЭГ [82]. LPN обладают высокой стабильностью и характеризуются равномерным высвобождением загруженного соединения, тогда как липидный бислой обеспечивает высокую биосовместимость [83]; сочетание этих факторов сулит им большое будущее в качестве новых эффективных носителей, однако пока их терапевтический эффект не доказан.

ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ НА ОСНОВЕ МЕМБРАН ЕСТЕСТВЕННОГО ПРОИСХОЖДЕНИЯ

Отдельный интерес представляют средства доставки на основе мембран природного происхождения, основные достоинства которых – высокая биосовместимость и стабильность получаемого носителя (рис. 2). У этих методов имеется огромный потенциал для создания на их основе интеллектуальных систем доставки [84, 85]. Предполагается возможность использования этих методов для молекулярно-направленной терапии, эффективной и легко управляемой. Однако скорее всего вероятными недостатками будут высокая стоимость получения, трудность очистки, а также пониженная стабильность при хранении.

Виросомы

Виросомы – везикулы, содержащие встроенные в фосфолипидный бислой вирусные гликопротеиды (рис. 2А). В качестве последних выступают такие белки, как нейраминидаза [86], гемагглютинин вируса гриппа [87] и белок L оболочки вируса гепатита В [88]. Присутствие этих белковых молекул придает везикулам ряд положительных свойств: структурную стабильность, направленность доставки, а также способствует рецептор-опосредованному эндоцитозу и последующему высвобождению содержимого носителей в цитоплазму за счет слияния с мембраной лизосомы [89]. Благодаря этим характеристикам виросомы могут использоваться как носители терапевтических препаратов [87, 90], выступать в роли адъюванта и в качестве вакцин, некоторые из которых уже допущены к клиническому применению [91, 92]. Ввиду того, что для получения виросом используются вирусы, патогенные для человека, опасность и потенциально сильная *in vivo* иммуногенность являются основными недостатками данного носителя. В настоящее время изучение виросом направлено на возможность их применения в качестве вакцин и адъювантов, используемых в терапии опухолей [93] и при ВИЧ-инфекции [94].

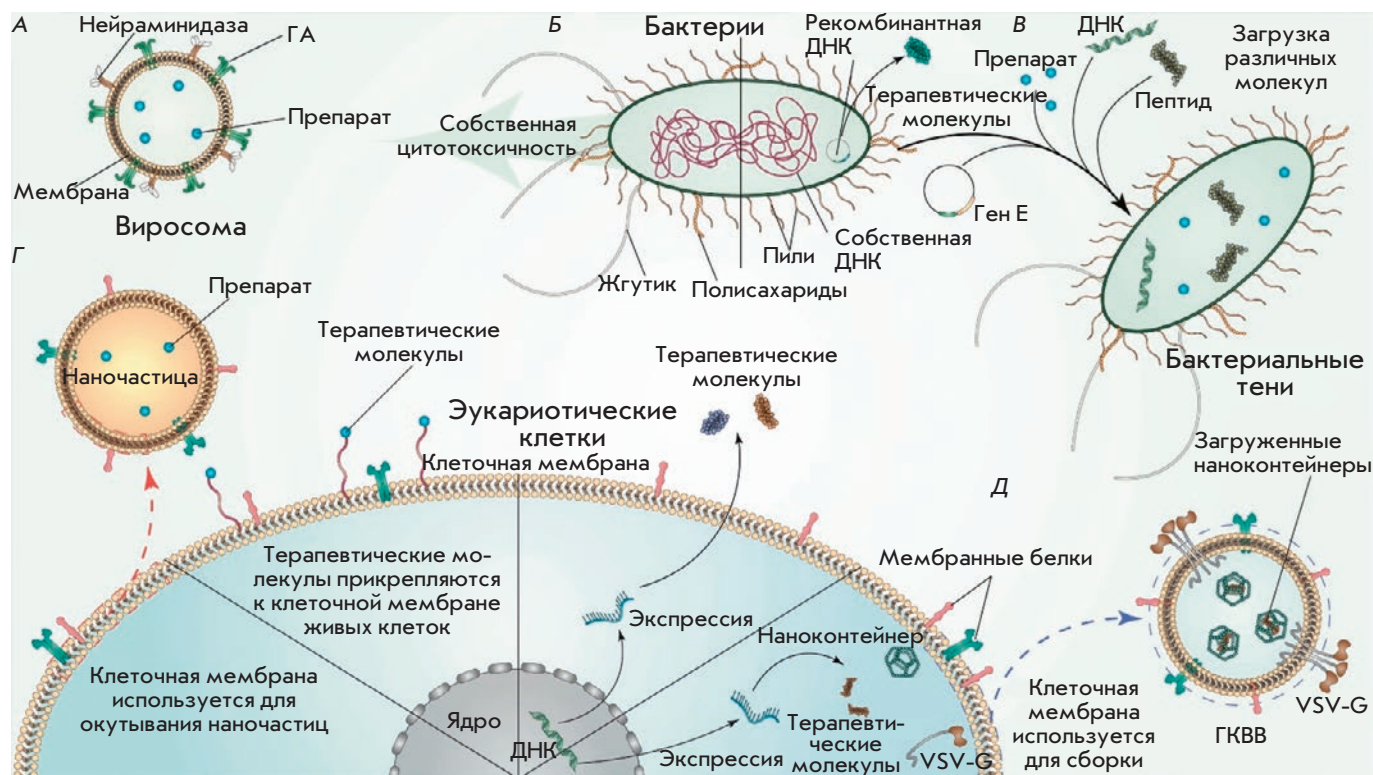


Рис. 2. Средства доставки на основе мембран естественного происхождения. Виросомы (А) представляют собой везикулы, модифицированные вирусными белками. Средства доставки на основе бактерий (Б) могут обладать собственной цитотоксичностью и быть генетически модифицированы для секреции различных молекул. Исключение содержимого цитоплазмы позволяет получить бактериальные тени, используемые для доставки не только плазмидной ДНК, но и низкомолекулярных препаратов, пептидов и нуклеиновых кислот (В). Эукариотические клетки используются для инкапсулирования искусственных наночастиц (Г), привязки лигандов к поверхности живой клетки, для экспрессии терапевтических молекул, а также для продукции ГКВВ (генетически кодируемых внеклеточных везикул, Д), которые также окружены мембраной клетки-родителя. ГА – гемагглютинин

Бактерии

С самого рождения ребенок получает от родителей множество видов бактерий, которые населяют его органы, ткани и полости. Подвергнутые генетическим модификациям или трансплантации бактерии могут использоваться для доставки различных соединений (рис. 2Б). С этой целью применяют, например, непатогенные бактерии, такие, как *Lactococcus lactis*, *Streptococcus gordonii* и др. Активно изучают рекомбинантные молочнокислые бактерии, способные доставлять нужные вещества в слизистые человека и животных [95, 96]. Другие виды бактерий применяют для разработки подходов к терапии опухолей и диагностике, что во многом обусловлено способностью таких бактерий, как грамположительные анаэробы рода *Clostridium*, проникать, колонизировать и накапливаться в гипоксических и некротических опухолевых тканях. Эти бактерии обладают собственной цитотоксичностью, а с помощью генетиче-

ских модификаций можно придавать им дополнительные полезные свойства, такие, как регулируемая экспрессия различных терапевтических и визуализирующих агентов [97, 98].

Бактериальные тени

Бактериальные тени (БТ) – носители на основе клеточных оболочек, которые получают путем экспрессии гена лизиса E бактериофага в грамотрицательных бактериях (рис. 2В) [99]. В результате лизиса из клеток удаляется все содержимое цитоплазмы, в том числе и генетический материал, а остаются поверхностные антигенные элементы, такие, как жгутик, фимбрии и полисахариды. Оболочки на основе БТ обладают собственной адъювантной активностью, что делает их перспективными для разработки вакцин [100]. БТ можно также нагружать низкомолекулярными агентами, пептидами и ДНК. Для более контролируемой загрузки частиц разработаны раз-

личные варианты модификации внутренней поверхности клеток, в том числе такие, как изменение живых клеток перед лизисом [101, 102].

Эукариотические клетки

Рассматривается также возможность использования в качестве носителей эукариотических клеток, таких, как эритроциты, тромбоциты, лимфоциты, макрофаги, стволовые и дендритные клетки (рис. 2Г) [84, 103]. Среди этих клеток особо выделяют эритроциты, самые распространенные клетки крови, лишенные генетического материала и обладающие большим временем циркуляции в кровотоке. Для загрузки агента можно использовать внутренний объем эритроцитов или прикреплять лекарственные средства/частицы/модификаторы к поверхности клетки [104, 105]. Возможно использование клеток иммунной системы и стволовых клеток в качестве носителей благодаря их тропизму к очагам воспаления и опухолям, а также способности преодолевать гематоэнцефалический барьер (ГЭБ). Кроме того, стволовые клетки могут быть трансдуцированы с целью продукции интерферонов и интерлейкинов *in situ*. Показано, что они способны поглощать кремниевые, полимерные и липидные наночастицы без потери жизнеспособности [84, 106]. Макрофаги могут преодолевать ГЭБ, они активно используются в качестве носителей наночастиц благодаря способности фагоцитировать частицы и концентрироваться в пораженных тканях, где загруженные препараты постепенно высвобождаются. Этот подход, получивший название «тройного коня», применяется в терапии глиом [107], ВИЧ-пораженных участках мозга и гипоксических солидных опухолей [84].

Генетически кодируемые внеклеточные везикулы

Совсем недавно создан новый тип носителей – генетически кодируемые внеклеточные везикулы (ГКВВ) (рис. 2Д). При помощи расчетных методов разработан самособирающийся трехмерный полый белковый додекаэдрический каркас из 20 молекул KDPG-альдолазы [108], на основе которого созданы ГКВВ. Структурной единицей данных везикул является трехдоменный полипептид, каждый из доменов которого осуществляет необходимую для сборки ГКВВ функцию. Первый домен действует как сигнал мистриоилирования, который определяет мембранную локализацию конструкции; второй домен образует трехмерный белковый каркас, а третий рекрутирует эндосомальный комплекс сортировки ESCRT, необходимый для транспорта, который отвечает за отпочкование от мембраны. Второй важный компонент везикул, определяющий их способность проникать в клетки-мишени, – наличие на поверхности заяко-

ренного в мембране белка оболочки вируса везикулярного стоматита VSV-G, отвечающего за транспорт из эндосомы. При экспрессии этих конструкций в эукариотических клетках образуются везикулы со средним радиусом 100 нм, покрытые клеточной мембраной и содержащие несколько белковых додекаэдров [109]. Полученные частицы способны загружать и доставлять необходимые вещества – низкомолекулярные соединения, РНК, пептиды, белки – в другие клетки, при этом защищая их от деградации. Кроме того, поверхность ГКВВ может быть дополнительно модифицирована антителами, рецепторами или низкомолекулярными лигандами для направленного транспорта.

ПРИРОДНЫЕ ВНЕКЛЕТОЧНЫЕ ВЕЗИКУЛЫ

Внеклеточные везикулы (ВВ) – это липидные пузырьки, которые секретируются практически всеми типами клеток. Будучи переносчиками РНК, мембранных и цитоплазматических белков, липидов и углеводов, ВВ выполняют различные функции в организме, например, участвуют в межклеточной коммуникации. В зависимости от происхождения ВВ подразделяют на эктосомы (происходят от нейтрофилов/моноцитов), простатосомы (выделены из семенной жидкости), вексосомы (ассоциированы с аденовирусным вектором) и т.д. По механизму биогенеза ВВ разделяют на экзосомы, микровезикулы и апоптотические тельца [110]. Размер ВВ также варьирует, например, размер экзосом находится в пределах 40–120 нм, а микровезикул 50–1000 нм [111].

Благодаря таким свойствам, как биосовместимость, неиммуногенность (при получении из подходящего типа клеток), а также способности проходить через ГЭБ, ВВ рассматривают как перспективное средство доставки различных молекул [112]. Однако лишь небольшая часть внутривенно введенных ВВ проникала в сердце и мозг мышей, а наибольшее количество обнаруживалось в селезенке и печени [113]. Следует отметить, что ВВ преимущественно обладают отрицательным зарядом, что делает их фармакокинетику схожей с отрицательно заряженными липосомами [113]. Кроме того, фармакокинетика ВВ сильно зависит от набора белков и липидов на поверхности. Например, фосфатидилсерин, локализованный на поверхности экзосом, способствует их связыванию с клетками, экспрессирующими на поверхности рецептор Timd4 (T-cell immunoglobulin and mucin-domain-containing molecule), что, в свою очередь, может указывать на усиленный захват таких экзосом макрофагами [114]. Изменение состава поверхностных белков ВВ также вызывает определенный эффект. Например, деградация интегринов- $\alpha 6$ и $-\beta 1$ значительно уменьшала накопление ВВ в легочной ткани мыши. При этом та-

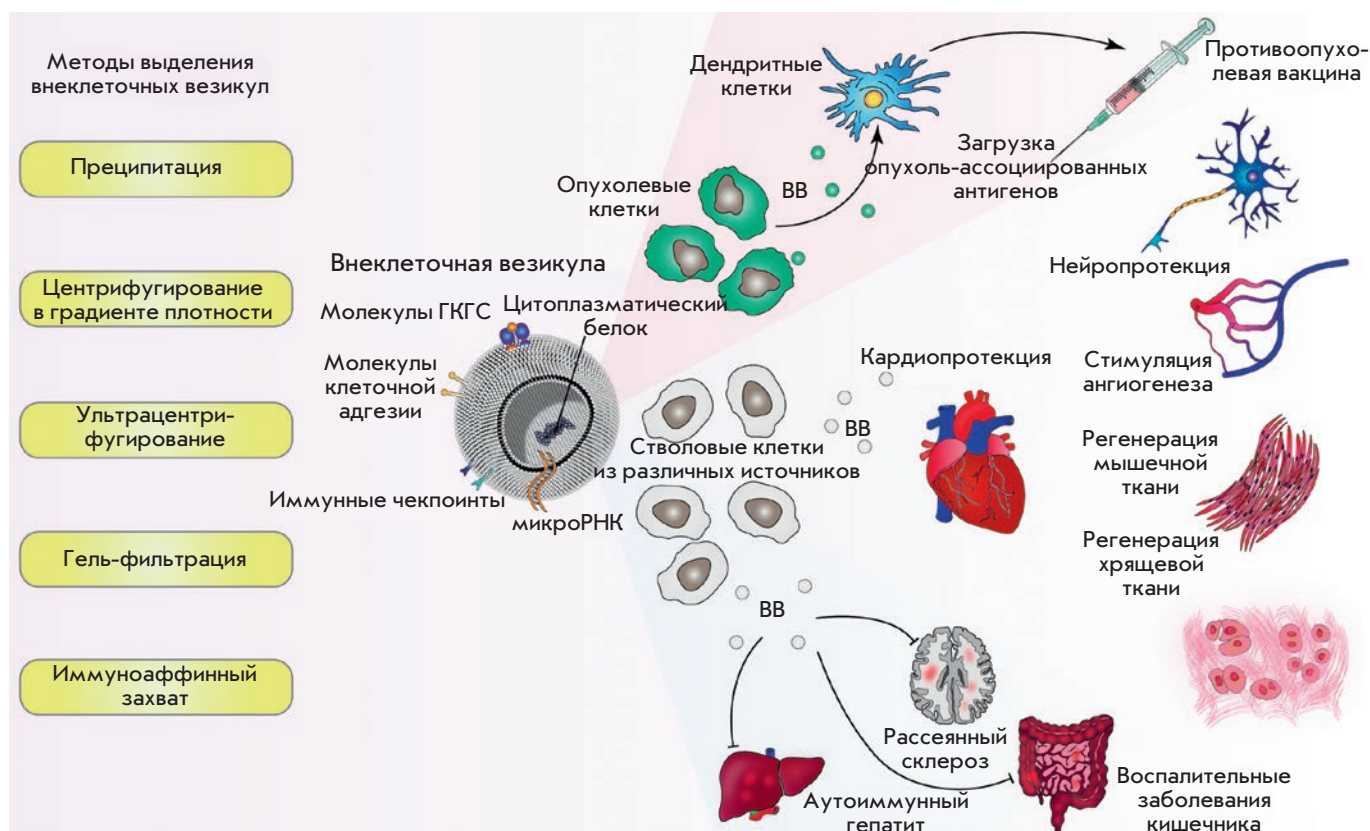


Рис. 3. Строение, способы выделения и области применения внеклеточных везикул. Внеклеточные везикулы (ВВ) представляют собой липидные комплексы, производимые многими клетками. На их поверхности, а также во внутренней полости содержатся биологически активные молекулы, среди которых микроРНК, иммунные чекпоинты, молекулы клеточной адгезии и ГКГС. Существует несколько основных методов выделения и очистки внеклеточных везикул (слева). Опухолевые ВВ могут применяться для доставки антигенов в дендритные клетки с целью получения дендритно-клеточных вакцин. Природные ВВ, полученные из стволовых клеток, обладают множественными эффектами и могут найти применение как в регенеративной медицине (например, для регенерации и протекции различных тканей и органов), так и при аутоиммунных заболеваниях различной этиологии и локализации (справа)

кие физико-химические свойства ВВ, как размер и ζ -потенциал, практически не изменяются [115]. Таким образом, ВВ могут селективно накапливаться в тканях в зависимости от набора лигандов на поверхности, что делает их перспективными носителями для направленной доставки.

Методы выделения и очистки ВВ достаточно сложны и требуют дорогостоящего оборудования. Основными способами очистки являются ультрацентрифугирование, центрифугирование в градиенте плотности, ультрафильтрация, преципитация, а также гель-фильтрация [116–119].

Помимо доставки терапевтических молекул, ВВ из разных типов клеток обладают различными свойствами, которые могут использоваться в терапии самых разнообразных заболеваний от ишемии и осте-

онекроза до рассеянного склероза и онкопатологии (рис. 3).

Природные внеклеточные везикулы в модуляции иммунного ответа

Прежде всего, ВВ способны оказывать значительное влияние на функционирование иммунной системы, они могут как стимулировать, так и подавлять иммунный ответ. Например, экзосомы из ДК, содержат молекулы ГКГС в комплексе с антигеном и способны вызывать специфический иммунный ответ [120]. Еще одна интересная особенность экзосом, произошедших из ДК, – способность захватывать лиганды Толл-подобных рецепторов и активировать другие дендритные клетки, что также может стать причиной иммунного ответа [121].

Известны также иммуносупрессивные ВВ. Например, мышцы линии BALB/c, иммунизированные овалальбумином, вырабатывают ВВ, которые индуцируют у мышей-реципиентов развитие специфической иммунной толерантности к овалальбумину [122]. Иммуносупрессивные ВВ считают потенциальными терапевтическими агентами при различных аутоиммунных и воспалительных заболеваниях. Например, везикулы, полученные от мезенхимальных стволовых клеток (МСК), способны подавлять пролиферацию мононуклеарных клеток, полученных от мыши с экспериментальным аутоиммунным энцефаломиелитом (ЭАЭ), моделирующим рассеянный склероз [123]. Иммуномодулирующее действие внеклеточных везикул показано и на моделях воспалительных заболеваний кишечника и аутоиммунного гепатита [107, 108].

Опухолевые ВВ перспективны при создании противоопухолевых вакцин, поскольку они способны переносить белки, которые могут быть онкоантигенами. Например, в мышинной модели глиобластомы доставка опухолеассоциированных антигенов к ДК была значительно более эффективной при использовании экзосом, чем опухолевого лизата [124]. Однако опухолевые ВВ следует применять с большой осторожностью. Так, апоптотические ВВ из клеток глиобластомы могут индуцировать резистентность к терапии и более агрессивное поведение соседних опухолевых клеток за счет переноса компонентов сплайсосом [125].

Природные внеклеточные везикулы в регенеративной медицине

Большие перспективы использования ВВ лежат в области регенеративной медицины и трансплантологии. Показано непосредственное плеiotропное регенеративное действие ВВ на различные органы и системы. Так, например, ВВ способны стимулировать рост сосудов, что может найти применение в трансплантологии, при ишемических нарушениях и язвах при диабетической стопе, а также для предотвращения остеонекроза [126–129]. Экзосомы, полученные от МСК, могут способствовать синтезу коллагена, регенерации хрящевой и мышечной ткани [130–132].

Описано также тканепротекторное действие ВВ, полученных от стволовых клеток. Например, благодаря активации Wnt/ β -катенин сигнального каскада экзосомы от МСК способны усиливать выживаемость кардиомиоцитов даже в условиях циклической ишемии и реперфузии [133]. На мышинной модели инфаркта миокарда показано, что экзосомы от эмбриональных стволовых клеток, содержащие различные микроРНК, улучшали функционирование сердечной мышцы, а также способствовали выживаемости ми-

оцитов [78]. Выявлено и нейропротекторное действие экзосом, полученных от различных МСК [134, 135]. Так, ВВ уменьшали глиоз, вызванный воспалением мозга при инъекции липополисахарида (ЛПС) незрелым мышам, уменьшали апоптоз нейронов, а также снижали выраженность структурных нарушений в белом веществе головного мозга [134]. Более того, под воздействием ВВ наблюдалось улучшение результатов поведенческих тестов на пространственную память у мышей. Однако механизм нейропротекторного действия ВВ не определен [134].

Природные ВВ определенно имеют огромный терапевтический потенциал. Однако из-за комплексного, часто малоизученного механизма действия, вероятной неоднородности состава, нежелательной иммуносупрессии в некоторых случаях, а также активации пролиферативных сигнальных путей эти комплексы должны применяться с повышенной осторожностью.

ВЕЗИКУЛЫ, ЗАГРУЖЕННЫЕ ИСКУССТВЕННО

Помимо перечисленных способов применения ВВ возможна их искусственная загрузка различными веществами. Основным преимуществом доставки терапевтических препаратов с помощью везикул является их природное происхождение, что обуславливает низкую иммуногенность. Дополнительное преимущество ВВ – облегченный захват клетками-мишенями за счет различных рецептор-опосредованных взаимодействий между мембраной ВВ и клеткой [10].

Существуют две стратегии получения искусственно загруженных везикул – совместная *in vitro* инкубация ВВ и терапевтических агентов, чаще всего низкомолекулярных, а также создание генетических конструкций с последующей трансфекцией клеток с целью получения клеток-доноров, вырабатывающих ВВ, загруженных необходимыми веществами. Как правило, для *in vitro* загрузки везикул используют малые липофильные молекулы, способные пассивно проникать в везикулы при совместной инкубации. Показано, что инкубация раствора куркумина и экзосом в фосфатном буфере при комнатной температуре в течение 5 мин приводит к проникновению терапевтического агента внутрь ВВ [136]. Загруженные таким способом экзосомы усиливают противовоспалительный эффект куркумина, а также ингибируют секрецию ИЛ-6 и ФНО- α у модельных животных и обладают способностью проникать через ГЭБ. Этот метод использован также для загрузки ВВ такими цитостатическими агентами, как паклитаксел и доксирубицин [137]. Показано, что везикулы, в отличие от свободных форм терапевтических агентов, обладали способностью про-

никать через ГЭБ и распределяться в тканях мозга. Наблюдалось увеличение цитотоксической активности паклитаксела и доксирубина в составе экзосом. Возможность снижения терапевтической дозы цитостатиков при онкологических заболеваниях является несомненным преимуществом данной лекарственной формы, так как до сих пор не удается избавиться от таких побочных эффектов этих препаратов, как системное воспаление и токсическое воздействие на органы [138].

Пассивный транспорт в экзосомы не всегда осуществляется эффективно. Для увеличения эффективности загрузки используют различные модификации. Так, везикулы и терапевтические агенты инкубируют в присутствии поверхностно-активных веществ, например сапонаина [139]. Механизм действия сапонаина основан на образовании комплекса с холестерином экзосом, что облегчает проникновение терапевтического агента [140]. Другой способ увеличения эффективности загрузки везикул – применение электропорации. Использование этого метода позволило увеличить эффективность загрузки везикул доксирубицином до 20%. Широкого распространения достигло использование электропорации для загрузки везикул препаратами нуклеиновых кислот. В качестве терапевтического агента в данном случае чаще всего используются мРНК и микроРНК. Так, разработаны экзосомы, несущие микроРНК, специфичные к мутантной форме GTP-азы KRAS^{G12D}, которая способна спровоцировать развитие рака поджелудочной железы [141]. Инкубация таких везикул с клетками рака поджелудочной железы приводит к снижению уровня мРНК KRAS^{G12D}. При тестировании препарата на мышах наблюдалось увеличение выживаемости, супрессия пролиферации раковых клеток, снижение метастазирования по сравнению с контрольными животными. Помимо терапии онкологических заболеваний, комплексы микроРНК-везикулы могут быть использованы при нейродегенеративных заболеваниях. Показана эффективность таких комплексов для снижения в культуре клеток количества α -синуклеина – белка, ассоциированного с болезнью Паркинсона [142]. После внутривенного введения мышам экзосом, нагруженных микроРНК, наблюдалось снижение концентрации мРНК α -синуклеина и уровня самого белка в исследованных областях мозга. Также созданы экзосомы, нагруженные микроРНК к β -секретазе (BACE1). Продукт этого гена участвует в образовании β -амилоидов, ассоциированных с болезнью Альцгеймера. Таргетинг нейронов экзосомами осуществляли при помощи нейрон-специфичного RVG-пептида, при этом удалось достичь снижения уровня белка (62%) и синтеза мРНК (60%) BACE1 [112].

Несмотря на то что электропорация считается достаточно эффективным способом доставки нуклеиновых кислот в везикулы, этот метод имеет существенный недостаток, а именно, образование агрегатов РНК в везикулах [143]. Уменьшение агрегации наблюдается при добавлении EDTA, а также при использовании специальных полимерных электродов и кислого ацетатного буфера для электропорации.

Для увеличения эффективности загрузки предложена принципиально отличная стратегия получения нагруженных везикул. Она заключалась в трансфекции клеток-доноров, секретирующих везикулы, рекомбинантными ДНК, кодирующими, например, микроРНК. Таким образом получают клетки, секретирующие в среду нужную микроРНК [144]. Также удалось вызвать супрессию роста ксенотрансплантата рака молочной железы при помощи адресной доставки микроРНК в везикулах, изолированных из культуры трансфицированных клеток [145]. При помощи трансформации клеток можно получить ВВ, несущие не только нуклеиновые кислоты, но и белки. При этом заякоренные в мембране белки переносятся в экзосомы путем слияния белка интереса с участком миристилирования и доменом, связывающим фосфатидилинозит-4,5-бисфосфат [146].

Таким образом, использование для адресной доставки как немодифицированных, так и дополнительно нагруженных терапевтическими агентами ВВ является современным и актуальным направлением исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Технология создания и загрузки наночастиц терапевтическими препаратами, разработанная во второй половине прошлого века, до сих пор остается одной из основных и, пожалуй, самой перспективной стратегией доставки лекарственных агентов. На первых порах изучения липидоподобных наноконтейнеров основное внимание уделялось увеличению стабильности, биосовместимости и биораспределения искусственно создаваемых наноносителей. Варьирование состава липидного слоя позволяет инкапсулировать как гидрофобные, так и гидрофильные соединения, благодаря чему можно подобрать свой способ транспортировки практически любого вещества. К перспективным направлениям следует отнести применение генетических конструкций с контролируемой экспрессией [147], а также одновременную загрузку наноконтейнеров разными по механизму действия веществами, что позволяет существенно увеличить эффективность воздействия [148]. В настоящий момент приоритетным направлением является увеличение таргетности доставки. Данная задача решается как путем модификации уже давно известных искус-

ственных наноконтейнеров, так и с помощью сравнительно недавно открытых генетически кодируемых или природных внеклеточных везикул. Высокая биосовместимость и биоразлагаемость дают им огромное преимущество перед другими искусственными наночастицами. И хотя пока сложно оценить их реальное фармацевтическое будущее во многом из-за относительно высокой себестоимости, нет сомнений в способности ВВ и ГКВВ эффективно доставлять лекарственные препараты *in vivo*. Таким образом, в ближайшие 10–20 лет можно с уверенностью ожи-

дать выхода на рынок перспективных препаратов, основанных на везикулярном транспорте, для терапии тяжелых и плохо поддающихся лечению хронических, аутоиммунных и онкологических заболеваний. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ № 18-74-10079 «Самособирающиеся генетически кодируемые наноконтейнеры как инструмент лечения рассеянного склероза».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Yin H., Kauffman K.J., Anderson D.G. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2017. V. 16. № 6. P. 387–399.
- Ragelle H., Danhier F., Préat V., Langer R., Anderson D.G. // *Expert Opin. Drug Deliv.* 2017. V. 14. № 7. P. 851–864.
- Kreuter J. // *Int. J. Pharm.* 2007. V. 331. № 1. P. 1–10.
- Yu M., Wu J., Shi J., Farokhzad O.C. // *J. Control. Release.* 2016. V. 240. P. 24–37.
- Shah M.A.A., Ali Z., Ahmad R., Qadri I., Fatima K., He N. // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2015. V. 15. № 1. P. 41–53.
- Nikitenko N.A., Prassolov V.S. // *Acta Naturae.* 2013. V. 5. № 3. P. 35–53.
- Liu Z., Jiao Y., Wang Y., Zhou C., Zhang Z. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2008. V. 60. № 15. P. 1650–1662.
- Sahin S., Selek H., Ponchel G., Ercan M.T., Sargon M., Hincal A.A., Kas H.S. // *J. Control. Release.* 2002. V. 82. № 2–3. P. 345–358.
- Blanco E., Shen H., Ferrari M. // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. № 9. P. 941–951.
- György B., Hung M.E., Breakefield X.O., Leonard J.N. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2014. V. 55. № 1. P. 439–464.
- Bangham A.D. // *Chem. Phys. Lipids.* 1993. V. 64. № 1–3. P. 275–285.
- Vemuri S., Rhodes C. // *Pharm. Acta Helv.* 1995. V. 70. № 2. P. 95–111.
- Kirby C., Gregoriadis G. // *Nat. Biotechnol.* 1984. V. 2. № 11. P. 979–984.
- Gruner S.M., Lenk R.P., Janoff A.S., Ostro N.J. // *Biochemistry.* 1985. V. 24. № 12. P. 2833–2842.
- Szoka F., Papahadjopoulos D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1978. V. 75. № 9. P. 4194–4198.
- Milsmann M.H., Schwendener R.A., Weder H.G. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1978. V. 512. № 1. P. 147–155.
- Miller C.R., Bondurant B., McLean S.D., McGovern K.A., O'Brien D.F. // *Biochemistry.* 1998. V. 37. № 37. P. 12875–12883.
- Campbell R.B., Ying B., Kuesters G.M., Hemphill R. // *J. Pharm. Sci.* 2009. V. 98. № 2. P. 411–429.
- Broekgaarden M., de Kroon A.I.P.M., Gulik T.M. van, Heger M. // *Curr. Med. Chem.* 2014. V. 21. № 3. P. 377–391.
- Lowe S.W., Ruley H.E., Jacks T., Housman D.E. // *Cell.* 1993. V. 74. № 6. P. 957–967.
- Guo J., Ping Q., Jiang G., Huang L., Tong Y. // *Int. J. Pharm.* 2003. V. 260. № 2. P. 167–173.
- Allen C., Dos Santos N., Gallagher R., Chiu G.N.C., Shu Y., Li W.M., Johnstone S.A., Janoff A.S., Mayer L.D., Webb M.S., et al. // *Biosci. Rep.* 2002. V. 22. № 2. P. 225–250.
- Suk J.S., Xu Q., Kim N., Hanes J., Ensign L.M. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016. V. 99. P. 28–51.
- Sharma A., Sharma U.S. // *Int. J. Pharm.* 1997. V. 154. № 2. P. 123–140.
- Bergström K., Osterberg E., Holmberg K., Hoffman A.S., Schuman T.P., Kozłowski A., Harris J.H. // *J. Biomater. Sci. Polym. Ed.* 1994. V. 6. № 2. P. 123–132.
- Pasut G., Paolino D., Celia C., Mero A., Joseph A.S., Wolfram J., Cosco D., Schiavon O., Shen H., Fresta M. // *J. Control. Release.* 2015. V. 199. P. 106–113.
- Kabilova T., Shmendel E., Gladkikh D., Morozova N., Maslov M., Chernolovskaya E., Vlassov V., Zenkova M., Kabilova T., Shmendel E., et al. // *Molecules.* 2018. V. 23. № 12. P. 3101.
- Zelepukin I.V., Yaremenko A.V., Shipunova V.O., Babenyshev A.V., Balalaeva I.V., Nikitin P.I., Deyev S.M., Nikitin M.P. // *Nanoscale.* 2019. V. 11. № 4. P. 1636–1646.
- Markov O.O., Mironova N.L., Maslov M.A., Petukhov I.A., Morozova N.G., Vlassov V.V., Zenkova M.A. // *J. Control. Release.* 2012. V. 160. № 2. P. 200–210.
- 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.
- Deyev S., Proshkina G., Baryshnikova O., Ryabova A., Avishai G., Katrivas L., Giannini C., Levi-Kalisman Y., Kotlyar A. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018. V. 130. P. 296–305.
- Matsumura Y., Gotoh M., Muro K., Yamada Y., Shirao K., Shimada Y., Okuwa M., Matsumoto S., Miyata Y., Ohkura H., et al. // *Ann. Oncol. Off. J. Eur. Soc. Med. Oncol.* 2004. V. 15. № 3. P. 517–525.
- Espelin C.W., Leonard S.C., Geretti E., Wickham T.J., Hendriks B.S. // *Cancer Res.* 2016. V. 76. № 6. P. 1517–1527.
- Sankhala K.K., Mita A.C., Adinin R., Wood L., Beeram M., Bullock S., Yamagata N., Matsuno K., Fujisawa T., Phan A.T. // *J. Clin. Oncol.* 2009. V. 27. 15S; abstr. 2535.
- // clinicaltrials.gov. 2008. P. 2/1/2008-12/1/2013.
- Torchilin V.P. // *Handbook of experimental pharmacology.* New York: Springer, 2010. P. 3–53.
- Zhou G., Wilson G., Hebbard L., Duan W., Liddle C., George J., Qiao L. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 12. P. 13446–13463.
- Bobo D., Robinson K.J., Islam J., Thurecht K.J., Corrie S.R. // *Pharm. Res.* 2016. V. 33. № 10. P. 2373–2387.
- Barenholz Y. (Chezy). // *J. Control. Release.* 2012. V. 160. № 2. P. 117–134.
- Stepanov A., Lomakin Y., Gabibov A., Belogurov A. // *Curr. Med. Chem.* 2017. V. 24. № 17. P. 1761–1771.
- Belogurov A.A., Stepanov A.V., Smirnov I.V., Melamed D., Bacon A., Mamedov A.E., Boitsov V.M., Sashchenko L.P., Ponomarenko N.A., Sharanova S.N., et al. // *FASEB J.* 2013. V. 27. № 1. P. 222–231.
- Belogurov A., Zakharov K., Lomakin Y., Surkov K.,

- Avtushenko S., Kruglyakov P., Smirnov I., Makshakov G., Lockshin C., Gregoriadis G., et al. // *Neurotherapeutics*. 2016. V. 13. № 4. P. 895–904.
43. Lomakin Y., Belogurov A., Glagoleva I., Stepanov A., Zakharov K., Okunola J., Smirnov I., Genkin D., Gabibov A. // *Mediators Inflamm*. 2016. V. 2016. P. 1–8.
44. Ivanova V.V., Khaiboullina S.F., Gomzikova M.O., Martynova E.V., Ferreira A.M., Garanina E.E., Sakhapov D.I., Lomakin Y.A., Khaibullin T.I., Granatov E.V., et al. // *Front. Immunol*. 2017. V. 8. P. 1335.
45. Bernasconi V., Norling K., Bally M., Höök F., Lycke N.Y. // *J. Immunol. Res*. 2016. V. 2016. P. 1–16.
46. Nisini R., Poerio N., Mariotti S., De Santis F., Fraziano M. // *Front. Immunol*. 2018. V. 9. P. 155.
47. Bartelds R., Nematollahi M.H., Pols T., Stuart M.C.A., Pardakhty A., Asadikaram G., Poolman B. // *PLoS One*. 2018. V. 13. № 4. P. e0194179.
48. Rajera R., Nagpal K., Singh S.K., Mishra D.N. // *Biol. Pharm. Bull*. 2011. V. 34. № 7. P. 945–953.
49. Kaur D., Kumar S. // *J. Drug Deliv. Ther*. 2018. V. 8. № 5. P. 35–43.
50. Moghassemi S., Hadjizadeh A. // *J. Control. Release*. 2014. V. 185. P. 22–36.
51. Shilpa S., Srinivasan B.P., Chauhan M. // *Int. J. Drug Deliv*. 2011. V. 3. № 1. P. 14–24.
52. Zeng W., Li Q., Wan T., Liu C., Pan W., Wu Z., Zhang G., Pan J., Qin M., Lin Y., et al. // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2016. V. 141. P. 28–35.
53. Marianecchi C., Di Marzio L., Rinaldi F., Celia C., Paolino D., Alhaique F., Esposito S., Carafa M. // *Adv. Colloid Interface Sci*. 2014. V. 205. P. 187–206.
54. Touitou E. US Pat. 5,716,638. 1996.
55. Yang L., Wu L., Wu D., Shi D., Wang T., Zhu X. // *Int. J. Nanomedicine*. 2017. V. 12. P. 3357–3364.
56. Bansal S., Prasad Kashyap C., Aggarwal G., Harikumar S. // *IJRPC*. 2012. V. 2. № 3. P. 704–713.
57. Sankar V., Ramesh S., Siram K. Alopecia. London: InTech., 2018. P. 138.
58. Duangjit S., Opanasopit P., Rojanarata T., Ngawhirunpat T. // *Adv. Mater. Res*. 2011. V. 194–196. P. 537–540.
59. Chen J., Lu W.-L., Gu W., Lu S.-S., Chen Z.-P., Cai B.-C. // *Expert Opin. Drug Deliv*. 2013. V. 10. № 6. P. 845–856.
60. Gupta A., Aggarwal G., Singla S., Arora R. // *Sci. Pharm*. 2012. V. 80. № 4. P. 1061–1080.
61. Irfan M., Verma S., Ram A. // *Asian J. Pharm. Clin. Res*. 2012. V. 5. № 3. P. 162–165.
62. Ghannoum M., Isham N., Herbert J., Henry W., Yurdakul S. // *J. Clin. Microbiol*. 2011. V. 49. № 5. P. 1716–1720.
63. Lu K., Xie S., Han S., Zhang J., Chang X., Chao J., Huang Q., Yuan Q., Lin H., Xu L., et al. // *J. Transl. Med*. 2014. V. 12. № 1. P. 72.
64. May J.P., Li S.-D. // *Expert Opin. Drug Deliv*. 2013. V. 10. № 4. P. 511–527.
65. Nobuto H., Sugita T., Kubo T., Shimose S., Yasunaga Y., Murakami T., Ochi M. // *Int. J. Cancer*. 2004. V. 109. № 4. P. 627–635.
66. Sawant R.R., Torchilin V.P. // *Soft Matter*. 2010. V. 6. № 17. P. 4026.
67. Khulbe P. Novel Approaches for Drug Delivery. Hershey: IGI Global, 2017. 515 p.
68. Wong H.L., Bendayan R., Rauth A.M., Li Y., Wu X.Y. // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2007. V. 59. № 6. P. 491–504.
69. Mukherjee S., Ray S., Thakur R. // *Indian J. Pharm. Sci*. 2009. V. 71. № 4. P. 349.
70. Mehnert W., Mäder K. // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2001. V. 47. № 2–3. P. 165–196.
71. Wissing S., Kayser O., Müller R. // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2004. V. 56. № 9. P. 1257–1272.
72. Müller R.H., Mäder K., Gohla S. // *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2000. V. 50. № 1. P. 161–177.
73. Maheswaran A., Brindha P., Mullaicharam A.R., Masilamani K. // *Int. J. Pharm. Sci. Rev. Res*. 2013. V. 23. № 1. P. 295–301.
74. Olbrich C., Gessner A., Schröder W., Kayser O., Müller R.H. // *J. Control. Release*. 2004. V. 96. № 3. P. 425–435.
75. Dolatabadi J.E.N., Valizadeh H., Hamishehkar H. // *Adv. Pharm. Bull*. 2015. V. 5. № 2. P. 151–159.
76. zur Mühlen A., Schwarz C., Mehnert W. // *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 1998. V. 45. № 2. P. 149–155.
77. Müller R.H., Radtke M., Wissing S.A. // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2002. V. 54. P. S131–S155.
78. Li Q., Cai T., Huang Y., Xia X., Cole S., Cai Y. // *Nanomaterials*. 2017. V. 7. № 6. P. 122.
79. Iqbal M.A., Md S., Sahni J.K., Baboota S., Dang S., Ali J. // *J. Drug Target*. 2012. V. 20. № 10. P. 813–830.
80. Khan S., Baboota S., Ali J., Khan S., Narang R., Narang J. // *Int. J. Pharm. Investig*. 2015. V. 5. № 4. P. 182.
81. Czajkowska-Kośnik A., Szekalska M., Winnicka K. // *Pharmacol. Reports*. 2019. V. 71. № 1. P. 156–166.
82. Hadinoto K., Sundaresan A., Cheow W.S. // *Eur. J. Pharm. Biopharm*. 2013. V. 85. № 3. P. 427–443.
83. Chan J.M., Zhang L., Yuet K.P., Liao G., Rhee J.-W., Langer R., Farokhzad O.C. // *Biomaterials*. 2009. V. 30. № 8. P. 1627–1634.
84. Yoo J.-W., Irvine D.J., Discher D.E., Mitragotri S. // *Nat. Rev. Drug Discov*. 2011. V. 10. № 7. P. 521–535.
85. Zhang P., Liu G., Chen X. // *Nano Today*. 2017. V. 13. P. 7–9.
86. Almeida J., Edwards D.C., Brand C., Heath T. // *Lancet*. 1975. V. 306. № 7941. P. 899–901.
87. de Jonge J., Leenhouts J.M., Holtrop M., Schoen P., Scherrer P., Cullis P.R., Wilschut J., Huckriede A. // *Biochem. J*. 2007. V. 405. № 1. P. 41–49.
88. Kuroda S., Liu Q., Jung J., Iijima M., Yoshimoto N., Niimi T., Maturana A., Shin S.H., Jeong S.-Y., Choi E.K., et al. // *Int. J. Nanomedicine*. 2015. V. 10. № 1. P. 4159.
89. Liu H., Tu Z., Feng F., Shi H., Chen K., Xu X. // *Acta Pharm*. 2015. V. 65. № 2. P. 105–116.
90. Mohammadzadeh Y., Rasouli N., Aref M.H.S., Tabib N.S.S., Abdoli A., Biglari P., Saleh M., Tabatabaieian M., Kheiri M.T., Jamali A. // *Biotechnol. Lett*. 2016. V. 38. № 8. P. 1321–1329.
91. Bovier P.A. // *Expert Rev. Vaccines*. 2008. V. 7. № 8. P. 1141–1150.
92. Blom R.A.M., Amacker M., van Dijk R.M., Moser C., Stumbles P.A., Blank F., von Garnier C. // *Front. Immunol*. 2017. V. 8. P. 359.
93. Kaneda Y. // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2012. V. 64. № 8. P. 730–738.
94. Leroux-Roels G., Maes C., Clement F., van Engelenburg F., van den Dobbelen M., Adler M., Amacker M., Lopalco L., Bomsel M., Chalifour A., et al. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 2. P. e55438.
95. Wang M., Gao Z., Zhang Y., Pan L. // *Appl. Microbiol. Biotechnol*. 2016. V. 100. № 13. P. 5691–5701.
96. Bron P.A., Kleerebezem M. // *Front. Microbiol*. 2018. V. 9. P. 1821.
97. Forbes N.S. // *Nat. Rev. Cancer*. 2010. V. 10. № 11. P. 785–794.
98. Hosseinioust Z., Mostaghaci B., Yasa O., Park B.-W., Singh A.V., Sitti M. // *Adv. Drug Deliv. Rev*. 2016. V. 106. № Pt A. P. 27–44.
99. Langemann T., Koller V.J., Muhammad A., Kudela P., Mayr

- U.B., Lubitz W. // *Bioeng. Bugs*. 2010. V. 1. № 5. P. 326–336.
100. Lubitz P., Mayr U.B., Lubitz W. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2009. V. 655. P. 159–170.
101. Farjadian F., Moghoofoei M., Mirkiani S., Ghasemi A., Rabiee N., Hadifar S., Beyzavi A., Karimi M., Hamblin M.R. // *Biotechnol. Adv.* 2018. V. 36. № 4. P. 968–985.
102. Kudela P., Koller V.J., Lubitz W. // *Vaccine*. 2010. V. 28. № 36. P. 5760–5767.
103. Chen Z., Hu Q., Gu Z. // *Acc. Chem. Res.* 2018. V. 51. № 3. P. 668–677.
104. Villa C.H., Anselmo A.C., Mitragotri S., Muzykantov V. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2016. V. 106. № Pt A. P. 88–103.
105. Yan J., Yu J., Wang C., Gu Z. // *Small Methods*. 2017. V. 1. № 12. P. 1700270.
106. Stuckey D.W., Shah K. // *Nat. Rev. Cancer*. 2014. V. 14. № 10. P. 683–691.
107. Ngandeu Neubi G.M., Opoku-Damoah Y., Gu X., Han Y., Zhou J., Ding Y. // *Biomater. Sci.* 2018. V. 6. № 5. P. 958–973.
108. Hsia Y., Bale J.B., Gonen S., Shi D., Sheffler W., Fong K.K., Nattermann U., Xu C., Huang P.-S., Ravichandran R., et al. // *Nature*. 2016. V. 535. № 7610. P. 136–139.
109. Votteler J., Ogohara C., Yi S., Hsia Y., Nattermann U., Belnap D.M., King N.P., Sundquist W.I. // *Nature*. 2016. V. 540. № 7632. P. 292–295.
110. Gusachenko O.N., Zenkova M.A., Vlassov V.V. // *Biochem.* 2013. V. 78. № 1. P. 1–7.
111. EL Andaloussi S., Mäger I., Breakefield X.O., Wood M.J.A. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2013. V. 12. № 5. P. 347–357.
112. Loughmiller J., Klintworth G. // *Nat. Biotechnol.* 2011. V. 29. № 4. P. 306–309.
113. Lai C.P., Mardini O., Ericsson M., Prabhakar S., Maguire C., Chen J.W., Tannous B.A., Breakefield X.O. // *ACS Nano*. 2014. V. 8. № 1. P. 483–494.
114. Miyanishi M., Tada K., Koike M., Uchiyama Y., Kitamura T., Nagata S. // *Nature*. 2007. V. 450. № 7168. P. 435–439.
115. Charoenviriyakul C., Takahashi Y., Morishita M., Nishikawa M., Takakura Y. // *Mol. Pharm.* 2018. V. 15. № 3. P. 1073–1080.
116. Merchant M.L., Rood I.M., Deegens J.K.J., Klein J.B. // *Nat. Rev. Nephrol.* 2017. V. 13. № 12. P. 731–749.
117. Vaswani K., Koh Y.Q., Almughlliq F.B., Peiris H.N., Mitchell M.D. // *Reprod. Biol.* 2017. V. 17. № 4. P. 341–348.
118. Foers A.D., Chatfield S., Dagley L.F., Scicluna B.J., Webb A.I., Cheng L., Hill A.F., Wicks I.P., Pang K.C. // *J. Extracell. Vesicles*. 2018. V. 7. № 1. P. 1490145.
119. Lane R.E., Korbie D., Trau M., Hill M.M. // *Methods Mol. Biol.* 2017. V. 1660. P. 111–130.
120. Montecalvo A., Shufesky W.J., Stolz D.B., Sullivan M.G., Wang Z., Divito S.J., Papworth G.D., Watkins S.C., Robbins P.D., Larregina A.T., et al. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. № 5. P. 3081–3090.
121. Sobo-Vujanovic A., Munich S., Vujanovic N.L. // *Cell. Immunol.* 2014. V. 289. № 1–2. P. 119–127.
122. Östman S., Taube M., Teleme E. // *Immunology*. 2005. V. 116. № 4. P. 464–476.
123. Mokarizadeh A., Delirezh N., Morshedi A., Mosayebi G., Farshid A.-A., Mardani K. // *Immunol. Lett.* 2012. V. 147. № 1–2. P. 47–54.
124. Liu H., Chen L., Liu J., Meng H., Zhang R., Ma L., Wu L., Yu S., Shi F., Li Y., et al. // *Cancer Lett.* 2017. V. 411. P. 182–190.
125. Pavlyukov M.S., Yu H., Bastola S., Minata M., Shender V.O., Lee Y., Zhang S., Wang J., Komarova S., Wang J., et al. // *Cancer Cell*. 2018. V. 34. № 1. P. 119–135.
126. Hu Y., Rao S.-S., Wang Z.-X., Cao J., Tan Y.-J., Luo J., Li H.-M., Zhang W.-S., Chen C.-Y., Xie H. // *Theranostics*. 2018. V. 8. № 1. P. 169–184.
127. Komaki M., Numata Y., Morioka C., Honda I., Tooi M., Yokoyama N., Ayame H., Iwasaki K., Taki A., Oshima N., et al. // *Stem Cell Res. Ther.* 2017. V. 8. № 1. P. 219.
128. Li X., Xie X., Lian W., Shi R., Han S., Zhang H., Lu L., Li M. // *Exp. Mol. Med.* 2018. V. 50. № 4. P. 29.
129. Liu X., Li Q., Niu X., Hu B., Chen S., Song W., Ding J., Zhang C., Wang Y. // *Int. J. Biol. Sci.* 2017. V. 13. № 2. P. 232–244.
130. Zhang J., Guan J., Niu X., Hu G., Guo S., Li Q., Xie Z., Zhang C., Wang Y. // *J. Transl. Med.* 2015. V. 13. № 1. P. 49.
131. Zhang S., Chu W.C., Lai R.C., Lim S.K., Hui J.H.P., Toh W.S. // *Osteoarthr. Cartil.* 2016. V. 24. № 12. P. 2135–2140.
132. Nakamura Y., Miyaki S., Ishitobi H., Matsuyama S., Nakasa T., Kamei N., Akimoto T., Higashi Y., Ochi M. // *FEBS Lett.* 2015. V. 589. № 11. P. 1257–1265.
133. Cui X., He Z., Liang Z., Chen Z., Wang H., Zhang J. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2017. V. 70. № 4. P. 225–231.
134. Drommelschmidt K., Serdar M., Bendix I., Herz J., Bertling F., Prager S., Keller M., Ludwig A.-K., Duhan V., Radtke S., et al. // *Brain. Behav. Immun.* 2017. V. 60. P. 220–232.
135. Liu W., Wang Y., Gong F., Rong Y., Luo Y., Tang P., Zhou Z., Zhou Z., Xu T., Jiang T., et al. // *J. Neurotrauma*. 2018. P. neu.2018.5835.
136. Zhuang X., Xiang X., Grizzle W., Sun D., Zhang S., Axtell R.C., Ju S., Mu J., Zhang L., Steinman L., et al. // *Mol. Ther.* 2011. V. 19. № 10. P. 1769–1779.
137. Yang T., Martin P., Fogarty B., Brown A., Schurman K., Phipps R., Yin V.P., Lockman P., Bai S. // *Pharm. Res.* 2015. V. 32. № 6. P. 2003–2014.
138. Wang L., Chen Q., Qi H., Wang C., Wang C., Zhang J., Dong L. // *Cancer Res.* 2016. V. 76. № 22. P. 6631–6642.
139. Fuhrmann G., Serio A., Mazo M., Nair R., Stevens M.M. // *J. Control. Release*. 2015. V. 205. P. 35–44.
140. Wassler M., Jonasson I., Persson R., Fries E. // *Biochem. J.* 2015. V. 247. № 2. P. 407–415.
141. Kamerkar S., Lebleu V.S., Sugimoto H., Yang S., Ruivo C.F., Melo S.A., Lee J.J., Kalluri R. // *Nature*. 2017. V. 546. № 7659. P. 498–503.
142. Cooper J.M., Wiklander P.B.O., Nordin J.Z., Al-Shawi R., Wood M.J., Vithlani M., Schapira A.H.V., Simons J.P., El-Andaloussi S., Alvarez-Erviti L. // *Mov. Disord.* 2014. V. 29. № 12. P. 1476–1485.
143. Kooijmans S.A.A., Stremersch S., Braeckmans K., De Smedt S.C., Hendrix A., Wood M.J.A., Schiffelers R.M., Raemdonck K., Vader P. // *J. Control. Release*. 2013. V. 172. № 1. P. 229–238.
144. Kosaka N., Iguchi H., Yoshioka Y., Takeshita F., Matsuki Y., Ochiya T. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 23. P. 17442–17452.
145. Ohno S.I., Takanashi M., Sudo K., Ueda S., Ishikawa A., Matsuyama N., Fujita K., Mizutani T., Ohgi T., Ochiya T., et al. // *Mol. Ther.* 2013. V. 21. № 1. P. 185–191.
146. Shen B., Wu N., Yang M., Gould S.J. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 16. P. 14383–14395.
147. Glinka E.M., Edelweiss E.F., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // *Gene*. 2006. V. 366. № 1. P. 97–103.
148. Guryev E.L., Volodina N.O., Shilyagina N.Y., Gudkov S.V., Balalaeva I.V., Volovetskiy A.B., Lyubeshkin A.V., Sen' A.V., Ermilov S.A., Vodenev V.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. № 39. P. 9690–9695.

УДК 577.122.332

Оценка степени проявления фенилкетонурии, обусловленной гомозиготной мутацией p.R155H, при помощи масс-спектрометрического анализа метаболитов крови

О. А. Батурина¹, А. А. Чернонос¹, В. В. Коваль^{1,2}, И. В. Морозов^{1,2*}¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8²Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

*E-mail: mor@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 21.12.2018

Принята к печати 27.03.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-42-46

РЕФЕРАТ Мы сравнили проявления фенилкетонурии (ФКУ) у двух гомозиготных носителей редкой мутации p.R155H – брата и сестры, детей одних и тех же родителей, получавших различное лечение. Такие пациенты представляют собой уникальную модель, позволяющую оценить как степень фенотипического проявления мутации, так и эффективность терапии. ФКУ, обусловленная мутациями с достаточной остаточной активностью фенилаланингидроксилазы, зачастую не выявляется, если диагноз основан исключительно на концентрации фенилаланина в крови. Подобная ошибка была допущена в случае одного из наших пациентов. Для уменьшения вероятности ошибок мы предлагаем использовать для диагностики более точные методы, например, масс-спектрометрический анализ метаболитов крови, эффективность которого показана в данной работе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА p.R155H, гиперфенилаланинемия, карнитин в крови, масс-спектрометрия, мутация, фенилаланин в крови, фенилкетонурия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ФКУ – фенилкетонурия; ФАГ – фенилаланингидроксилаза; ЦНС – центральная нервная система; C0 – свободный карнитин; C2–C18 – ацилкарнитины.

ВВЕДЕНИЕ

Фенилкетонурия типа I (классическая) (ФКУ; MIM 261600) – аутомное рецессивно наследуемое заболевание, обусловленное недостаточной активностью фенилаланингидроксилазы (ФАГ; [КФ 1.14.16.1]) [1, 2]. Недостаток ферментативной активности обычно обусловлен мутациями в гене фенилаланингидроксилазы [1]. Неполное превращение фенилаланина в тирозин из-за недостаточной активности ФАГ приводит к накоплению в тканях и биологических жидкостях фенилаланина и токсичных продуктов альтернативных путей его метаболизма, таких, как фенилпируват, винилацетат, фениллактат и фенилацетилглутамин, что приводит к развитию симптомов заболевания, в частности слабоумия.

Распространенными признаками фенилкетонурии также являются уменьшение концентрации тирозина и изменение баланса аминокислот в биологических жидкостях. Повсеместно используемая классификация степени проявления ФКУ, основанная на концентрации фенилаланина в крови, была предложена C.R. Scriver и S. Kaufman [3]. Согласно N. Blau и соавт. [4] ФКУ рассматривается как классическая (тяжелая) при концентрации фенилаланина в крови до лечения более 1200 мкМ; как ФКУ средней тяжести – при концентрации фенилаланина в пределах 900–1200 мкМ; как легкая форма – при концентрации 600–900 мкМ; концентрации менее 600 мкМ до лечения рассматриваются как гиперфенилаланинемия.

Неонатальный биохимический анализ является наиболее широко используемым в настоящее время методом ранней диагностики генетических заболеваний и предотвращения их последствий. Всемирная организация здравоохранения определила социальные и экономические предпосылки для включения заболевания в национальные программы неонатальной диагностики [5]. В настоящее время неонатальная диагностика ФКУ, как одного из наиболее распространенных генетических заболеваний (частота от 1 : 10000 до 1 : 25000 среди европеоидов [6]), проводится в большинстве стран. В Российской Федерации такая диагностика предусматривает несколько измерений уровня фенилаланина в плазме крови, первое из которых проводится на 4 или 5 день после рождения. Если обнаруживается повышенный уровень, то измерение проводится повторно. Однако диагностика, основанная только на уровне фенилаланина в крови, может быть недостоверной, особенно при пограничных уровнях. Для точной диагностики требуются более совершенные методы, особенно в случае мутаций с относительно высокой остаточной активностью ФАГ, при которых уровень фенилаланина в крови повышается незначительно, оставаясь менее 500 мкМ, что недостаточно для однозначной диагностики. Масс-спектрометрический анализ метаболитов крови может обеспечить постановку более точного диагноза, основанного на оценке концентрации не только фенилаланина, но также тирозина и других аминокислот, что, в частности, позволяет определить соотношение фенилаланина и тирозина. Основанный на уровне метаболитов диагноз должен подтверждаться генетическим анализом с идентификацией мутаций гена ФАГ и характера их наследования при помощи определения нуклеотидных последовательностей соответствующих локусов.

В настоящее время основным и наиболее широко используемым методом коррекции ФКУ является диетотерапия [7, 8], направленная прежде всего на предотвращение повреждений центральной нервной системы (ЦНС), ведущих к деградации умственных способностей. Для достижения этой цели диетотерапия должна начинаться не позднее нескольких недель после рождения. Будучи в целом достаточно эффективной, такая диета ограничивает потребление белков животного происхождения, что может привести к уменьшению концентраций свободного карнитина (C0) и ацилкарнитинов (C2–C18), и, как следствие, к нарушениям метаболизма и функционирования митохондрий у некоторых пациентов [9].

В данной работе мы определяли уровни метаболитов в крови при наличии и отсутствии диетотерапии у двух родственных гомозиготных носителей

ассоциированной с ФКУ мутации р.155Н гена ФАГ с использованием масс-спектрометрического анализа высушенных образцов крови. Близкородственных гомозиготных пациентов с различными историями использования диетотерапии можно рассматривать как уникальную модель для исследования как фенотипического проявления мутации, так и эффективности терапии.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Оба пациента являются детьми одних и тех же родителей. У девочки (1), рожденной в июне 2009 года в России, ФКУ выявлена в процессе неонатальной биохимической диагностики, и она получала диету с ограниченным содержанием фенилаланина со второго месяца жизни. У мальчика (2), рожденного в июле 2001 года в Узбекистане, неонатальная диагностика не выявила ФКУ, и к нему не применяли диетотерапию. Образцы крови для масс-спектрометрического анализа были взяты в 2010 году, примерно через год после начала диетотерапии у пациента 1. В это же время проведена оценка физического развития и статуса ЦНС пациентов, которая не выявила каких-либо существенных отклонений. Исследование проводили в соответствии с требованиями комитета по медицинской этике ИХБФМ СО РАН.

В процессе неонатальной диагностики образцы крови собирали, используя бумажные фильтры (Perkin Elmer, Финляндия), концентрацию фенилаланина в крови определяли с использованием анализатора Delfia/Victor и набора реактивов производителя (Wallac Oy, Финляндия). Геномную ДНК выделяли из крови как описано ранее [10]. Мутации в гене ФАГ идентифицировали, определяя методом Сэнгера по двум цепям ДНК нуклеотидные последовательности продуктов ПЦР-амплификации областей всех экзонов и прилежащих районов интронов гена ФАГ с использованием набора BigDye Terminator Cycle Sequencing Kit v.3.1 и генового анализатора ABI 3130xl (Applied Biosystems, США) в ЦКП «Геномика» ИХБФМ СО РАН. Нуклеотидные последовательности ДНК обоих пациентов были идентичными и соответствовали известным последовательностям гена ФАГ за исключением мутации р.155Н. Нуклеотидные последовательности родителей пациентов позволили подтвердить наследование мутации р.155Н. Масс-спектрометрический анализ содержания фенилаланина, тирозина и ацилкарнитинов проводили в ЦКП масс-спектрометрического анализа ИХБФМ СО РАН с использованием стандартной процедуры [11]. Использовали реактивы для подготовки образцов и внутренние стандарты из набора для диагностики новорожденных Amino

acids and acylcarnitines kit # 55000 (Chromsystems Instruments & Chemicals, Германия), образцы готовили согласно протоколу производителя набора. Анализ проводили с использованием системы tandemного масс-спектрометра Agilent 6410 QQQ с системой ионизации ESI, объединенного с системой жидкостной хроматографии Agilent 1200 (Agilent Technologies, США). Количественный анализ проводили в режиме мониторинга множественных реакций (MRM) с общим временем анализа 2.5 мин. Сигнал регистрировали и анализировали с использованием программы MassHunter v.1.3.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Точечная мутация p.R155H является заменой G на A в структуре экзона 5 гена ФАГ, приводящей к замене аргинина в каталитическом домене ФАГ на гистидин. Остаточная активность фермента, содержащего мутацию, остается достаточно высокой, примерно 44% от исходной, согласно данным <http://www.biorku.org> [12]. Поэтому мутация p.R155H считается ассоциированной с гиперфенилаланинемией с относительным коэффициентом корреляции генотипа и фенотипа 8 по шкале, предложенной Guldberg и соавт. [1]. Эта редкая мутация ранее была описана лишь в одном случае в сочетании с мутацией p.D143G у пациента с диагнозом гиперфенилаланинемия [13]. Нами изучены два рожденных от одних родителей гомозиготных носителя мутации p.R155H, один из которых подвергался диетотерапии, в то время как другой –

нет. Будучи гомозиготными носителями мутации, такие пациенты дают уникальную возможность непосредственно изучить степень проявления мутации на уровне фенотипа, в то время как существенные различия в применявшейся терапии позволяют оценить ее сравнительную эффективность.

Первоначальное фенотипическое проявление мутации p.R155H у пациентов 1 и 2 несколько различалось, несмотря на одинаковый генотип по локусу ФАГ и общую родословную. Концентрация фенилаланина в крови в момент неонатальной диагностики у пациента 1 составила 1100 мкМ, на основании чего был поставлен диагноз ФКУ средней тяжести и предписана диетотерапия. У пациента 2 ФКУ не была диагностирована в процессе неонатальной диагностики, проводившейся в Республике Узбекистан, возможно, в силу разных сроков и стандартов диагностики. В 2010 году уровень фенилаланина в крови этого пациента составил 497 ± 13 мкМ (таблица), что соответствует максимум гиперфенилаланиемии. Таким образом, при использовании в качестве критерия только уровня фенилаланина крови можно заключить, что генотип p.R155H/p.R155H может проявляться достаточно широким спектром симптомов – от слабо выраженной гиперфенилаланиемии до ФКУ средней тяжести, в зависимости от других биохимических особенностей пациента, ассоциированных, например, с полом, составом питания в неонатальный период и т.п. При этом неонатальная диагностика, основанная на концентрации фени-

Концентрации метаболитов крови по данным масс-спектрометрии

Метаболит	Концентрация метаболита, мкМ		Медианное значение у здоровых детей (5-й–95-й процентиля), мкМ (по данным [14])
	пациент 1	пациент 2	
Фенилаланин	298 ± 10	497 ± 13	45 (32–64)
Тирозин	43 ± 2	86 ± 2	84 (48–159)
Фенилаланин / Тирозин	6.9 ± 0.3	5.8 ± 0.1	
Свободный карнитин (C0)	31.7 ± 0.4	44.0 ± 1.1	15.5 (9.2–26.4)
Ацетилкарнитин (C2)	10.4 ± 0.7	11.9 ± 0.3	17.3 (10.1–29.4)
Пропионилкарнитин (C3)	1.48 ± 0.04	2.68 ± 0.2	1.42 (0.81–2.56)
Бутирилкарнитин (C4)	0.11 ± 0.02	0.15 ± 0.02	0.19 (0.12–0.30)
Изовалерилкарнитин (C5)	0.11 ± 0.01	0.11 ± 0.01	0.09 (0.06–0.17)
Гексаноилкарнитин (C6)	0.04 ± 0.01	0.09 ± 0.002	0.05 (0.02–0.10)
Октаноилкарнитин (C8)	0.02 ± 0.002	0.06 ± 0.02	0.05 (0.03–0.08)
Деканоилкарнитин (C10)	0.02 ± 0.002	0.07 ± 0.002	0.07 (0.04–0.13)
Додеканоилкарнитин (C12)	0.03 ± 0.02	0.09 ± 0.002	0.08 (0.04–0.19)
Тетрадеканоилкарнитин (C14)	0.06 ± 0.003	0.07 ± 0.002	0.18 (0.11–0.31)
Гексадеканоилкарнитин (C16)	0.56 ± 0.02	0.53 ± 0.02	2.93 (1.65–4.76)
Октадеканоилкарнитин (C18)	0.34 ± 0.01	0.32 ± 0.01	0.86 (0.52–1.43)

Примечание. Представлены средние значения ± стандартная ошибка среднего пяти или шести измерений.

лаланина в крови, может не выявить заболевание, что и произошло с пациентом 2.

Эффективное использование масс-спектрометрии для точной диагностики ФКУ, особенно при промежуточных концентрациях фенилаланина в крови, описано в работах Chase и соавт. [15, 16]. В качестве более точного и селективного критерия диагностики вместо концентрации фенилаланина они предложили использовать отношение концентрации фенилаланина и тирозина, поскольку при этом корректируются изменения общего уровня аминокислот. Отношение концентраций фенилаланина и тирозина в крови в норме находится в диапазоне от 0.49 до 0.93, повышаясь до значений от 1.3 до 14.3 у больных ФКУ [15, 16]. Мы зарегистрировали высокие значения этого параметра, явно и однозначно соответствующие ФКУ как у пациента 1 (6.9 ± 0.3), так и у пациента 2 (5.8 ± 0.1) (таблица). В то же время родители пациентов – гетерозиготные носители мутации, имели отношения, характерные для здоровых людей: 0.9 ± 0.1 (мать) и 0.7 ± 0.02 (отец).

Мы также определили уровни карнитинов в крови пациентов (таблица) и сравнили их с данными 20 здоровых детей [17]. Ранее было показано, что уровни карнитинов могут быть полезным критерием при идентификации врожденных сбоев метаболизма, и они существенно меняются при различных метаболических нарушениях [18]. Также отмечено, что концентрации карнитинов значительно понижаются в крови пациентов с ФКУ после диетотерапии с пониженным содержанием фенилаланина, если она не дополняется карнитинами [19]. У наших пациентов выявлено незначительное снижение общего уровня карнитинов (44.9 мкМ у пациента 1 и 55.2 мкМ у пациента 2) относительно нормальных уровней, которые составляют 60–100 мкМ [20]. Общие уровни ацилкарнитинов (13.2 мкМ у пациента 1 и 13.9 мкМ у пациента 2) полностью соответствовали норме. Возможный дефицит карнитинов мы определяли по отношению концентраций ацилкарнитинов и свободных карнитинов. Значения (0.42 у пациента 1 и 0.33 у пациента 2) были значительно ниже верхнего предела нормы (0.6), что свидетельствует о до-

статочных уровнях свободного карнитина, а также о соответствующей норме доле связанных форм карнитина. Таким образом, концентрации ацилкарнитинов у наших гомозиготных носителей р.R155H были в пределах нормы, несмотря на то, что ряд исследований [21, 22] свидетельствуют о значительных отличиях концентраций ацилкарнитинов у пациентов с классической ФКУ от нормы.

ВЫВОДЫ

Мы обследовали двух близкородственных гомозиготных носителей мутации р.R155H, ассоциированной с ФКУ, с различными историями терапии: один подвергался диетотерапии, а другой лечения не получал. В случае использования концентрации фенилаланина в крови в качестве единственного диагностического критерия ФКУ состояние одного пациента следует классифицировать как гиперфенилаланинемию, а другого – как ФКУ средней тяжести. В то же время использование отношения концентраций фенилаланина и тирозина в качестве критерия позволяет достоверно диагностировать ФКУ у обоих пациентов. Таким образом, уровень фенилаланина в крови сам по себе не может служить достоверным критерием диагностики ФКУ во всех случаях и не должен использоваться в качестве единственного диагностического критерия. Наши данные подтверждают возможность использования соотношения концентраций фенилаланина и тирозина в качестве более точного и достоверного критерия при неонатальной диагностике. Мы также показали возможность использования масс-спектрометрического анализа в качестве основного метода неонатальной диагностики ФКУ.

Определенные нами концентрации свободной и связанных форм карнитинов в крови свидетельствуют о том, что гомозиготные носители мутации р.R155H, вероятно, не испытывают существенных ограничений энергетического обмена в клетках, в отличие от пациентов с классической ФКУ или ФКУ средней тяжести. ●

Работа выполнена при поддержке проектов ГЗ (№ 0309-2019-0020 и 0309-2019-0007).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Guldborg P., Rey F., Zschocke J., Romano V., Francois B., Michiels L., Ullrich K., Hoffmann G.F., Burgard P., Schmidt H., et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 1998. V. 63. P. 71–79.
- DiLella A.G., Kwok S.C., Ledley F.D., Marvit J., Woo S.L. // *Biochemistry.* 1986. V. 25. P. 743–749.
- Scriver C.R., Kaufman S., Woo S.L. // *Annu. Rev. Genet.* 1988. V. 22. P. 301–321.
- Blau N., van Spronsen F.J., Levy H.L. // *Lancet.* 2010. V. 376. P. 1417–1427.
- Приказ Министерства здравоохранения и социального развития РФ от 22.03.2006 № 185 «О массовом обследовании новорожденных детей на наследственные заболевания».
- Williams R.A., Mamotte C.D., Burnett J.R. // *Clin. Biochem. Rev.* 2008. V. 29. P. 31–41.
- Ahring K., Bélanger-Quintana A., Dokoupil K., Gokmen Ozel H., Lammardo A.M., MacDonald A. // *Clin. Nutr.* 2009. V. 28. P. 231–237.
- Bushueva T.V. // *Questions of Modern Pediatrics.* 2010. V. 9. P. 157–162.

9. Mutze U., Beblo S., Kortz L., Matthies C., Koletzko B., Bruegel M., Rohde C., Thiery J., Kiess W., Ceglarek U. // *PLoS One*. 2012. V. 7. P. 1–9.
10. Baturina O.A., Tupikin A.E., Lukjanova T.V., Sosnitskaya S.V., Morozov I.V. // *J. Med. Biochem*. 2014. V. 33. P. 333–340.
11. Chace D.H., Kalas T., Naylor E.W. // *Clin. Chem*. 2003. V. 49. P. 1797–1817.
12. Databases of Pediatric Neurotransmitter Disorders (PND), including the locus-specific database of PAH variants and BIOPKU genotypes database [Internet]. Division of Metabolism University Children's Hospital Steinwiesstrasse 75 CH-8032 Zürich Switzerland [cited 2018 Sep 10]. Available from: <http://www.biopku.org>
13. Dobrowolski S.F., Pey A.L., Koch R., Levy H., Ellingson C.C., Naylor E.W., Martinez A. // *J. Inherit. Metab. Dis*. 2009. V. 32. P. 10–21.
14. Liu Q., Wu J., Shen W., Wei R., Jiang J., Liang J., Chen M., Zhong M., Yin A. // *J. Matern. Fetal Neonatal. Med*. 2017. V. 30 (22). P. 2697–2704.
15. Chace D.H., Millington D.S., Terada N., Kahier S.G., Roe C.R., Hofman L.F. // *Clin. Chem*. 1993. V. 39. P. 66–71.
16. Chace D.H., Sherwin J.E., Hillman S.L., Lorey F., Cunningham G.C. // *Clin. Chem*. 1998. V. 44. P. 2405–2409.
17. Leontieva I.V., Nikolaeva E.A., Alimina E.G., Zolkina I.V. // *Practice Pediatrician*. 2012. V. 10. P. 74–79.
18. Jones L.L., McDonald D.A., Borum P.R. // *Prog. Lipid Res*. 2010. V. 49 (1). P. 61–75.
19. Vilaseca M.A., Briones P., Ferrer I., Campistol J., Riverola A., Castillo P., Ramon F. // *J. Inherit. Metab. Dis*. 1993. V. 16 (1). P. 101–104.
20. Weigel C., Kiener C., Meier N., Schmid P., Rauh M., Rascher W., Knerr I. // *Ann. Nutr. Metab*. 2008. V. 53. P. 91–95.
21. Fischer G.M., Nemeti B., Farkas V., Debreceni B., Laszlo A., Schaffer Z., Somogyi C., Sandor A. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2000. V. 150. P. 200–210.
22. Engel A.G., Rebouche C.J. // *J. Inherit. Metab. Dis*. 1984. V. 7 (Suppl. 1). P. 38–43.

УДК 620.3

«Зеленый» синтез серебряных наночастиц, обладающих цитотоксической активностью, на основе вторичных метаболитов лаванды узколистной

М. М. Белова^{1*}, В. О. Шипунова^{2,3,*,*}, П. А. Котельникова², А. В. Бабёнышев³, Е. А. Рогожин², М. Ю. Чередниченко¹, С. М. Деев^{2,4,5}

¹Российский государственный аграрный университет – МСХА им. К.А. Тимирязева, 127550, Москва, ул. Тимирязевская, 49

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

³Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), 141701, Долгопрудный, Институтский пер., 9

⁴Национальный исследовательский ядерный университет «МИФИ», 115409, Москва, Каширское ш., 31

⁵Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Министерства здравоохранения Российской Федерации (Сеченовский университет), 119991, Москва, ул. Трубецкая, 8, стр. 2

*E-mail: viktoriya.shipunova@phystech.edu

*Равный вклад.

Поступила в редакцию 07.02.2019

Принята к печати 06.05.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-47-53

РЕФЕРАТ Методом «зеленого» синтеза получены наночастицы серебра (НЧ). Коллоидно стабильные в фосфатно-солевом растворе наночастицы размером 35.4 ± 1.6 нм получены при синтезе с растительным экстрактом лаванды узколистной *Lavandula angustifolia* Mill. и 56.4 ± 2.4 нм – с ее каллусным экстрактом. НЧ охарактеризованы методами спектрофотометрии, динамического светорассеяния и сканирующей электронной микроскопии. Была изучена динамика синтеза НЧ, а также цитотоксические свойства частиц, полученных с использованием растительного экстракта. Посредством модификации НЧ бычьим сывороточным альбумином показано, что блокировка поверхности НЧ полностью подавляет их цитотоксическое действие в условиях *in vitro*. Синтезированные НЧ обладают свойством локализованного поверхностного плазмонного резонанса, малым размером и возможностью модификации поверхности белковыми молекулами, что в совокупности определяет их перспективность в качестве агентов для онкотераностики.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вторичные метаболиты, «зеленый» синтез, лаванда, серебряные наночастицы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БСА – бычий сывороточный альбумин; ВМ – вторичные метаболиты; ЛППР – локализованный поверхностный плазмонный резонанс; МС – среда Мурасиге и Скуга; НЧ – наночастицы; ПЭГ – полиэтиленгликоль; ТДЗ – тидиазурон.

ВВЕДЕНИЕ

Современные бионанотехнологии открывают широкие перспективы в создании лекарств нового поколения для борьбы с социально значимыми заболеваниями. Средства и методы бионанотехнологий позволяют получать различного рода наноструктуры, служа-

щие эффективными инструментами терапии и диагностики, а также тераностики различных заболеваний, особенно раковых.

Для разработки методов тераностики необходимо создание агентов, обладающих мультифункциональностью: сочетающих в себе диагностические

и терапевтические функции [1–5]. Такими агентами могут быть металлические наночастицы (НЧ), обладающие свойством локализованного поверхностного плазмонного резонанса (ЛППР) [6]. Высокая химическая активность поверхности таких наночастиц позволяет модифицировать их нацеливающими агентами для доставки к клеткам-мишеням, при этом наличие у данных наночастиц ЛППР делает возможным их применение как для детекции, так и для селективного уничтожения клеток посредством гипертермии [7, 8]. «Зеленый» синтез, подразумевающий экологически чистый метод получения частиц без использования агрессивных токсичных и дорогостоящих веществ, является альтернативным, экономически более выгодным и экологически безопасным способом получения наноструктур по сравнению с рядом традиционных физико-химических методов синтеза НЧ, часто дорогих, трудоемких и неэкологичных [9].

В качестве восстанавливающих агентов в таком синтезе широко используются вторичные метаболиты (ВМ), продуцируемые растениями [10–12]. Они особенно перспективны для «зеленого» синтеза благодаря низкой стоимости продукции, короткой продолжительности синтеза и биобезопасности. Также с помощью культивирования растений *in vitro* можно масштабировать производство необходимых веществ, так как такие методы позволяют получать в короткие сроки большое количество стандартизированного растительного материала, а также выделять необходимые ВМ круглый год.

При создании успешного наноагента для эффективного воздействия на раковые клетки необходимо учитывать целый ряд параметров, таких, как размер, состав, покрытие, другие физико-химические свойства, параметры циркуляции в кровотоке и т.д. Биосовместимость – один из наиболее существенных параметров, влияющих на принципиальную возможность использования препарата *in vivo*. НЧ, полученные методом «зеленого» синтеза, часто обладают большей биосовместимостью за счет использования природных веществ с необходимой биологической активностью (благородные металлы, ВМ, белки), что успешно используется для проведения различных исследований как в условиях *in vitro*, так и *in vivo*. Такие частицы рассматриваются как перспективные для применения в тераностике [13, 14].

В данной работе методом «зеленого» синтеза с использованием водных экстрактов лаванды узколистной (*Lavandula angustifolia* Mill.) получены НЧ серебра. Изучена динамика синтеза НЧ, а также их цитотоксические свойства до и после модификации поверхности в условиях *in vitro*.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Введение растительного материала в культуру *in vitro*

Семена лаванды узколистной *L. angustifolia* Mill. сорт Munstead (семейство Яснотковые, Lamiaceae Mart.) стерилизовали 5% раствором гипохлорита натрия (экспозиция 10 мин). После стерилизации семена двукратно отмывали в стерильной дистиллированной воде и помещали в чашки Петри с безгормональной средой Мурасиге и Скуга (МС) [15]. Контрольные семена проращивали в нестерильных условиях на фильтровальной бумаге, смоченной дистиллированной водой. Всхожесть семян оценивали на 15-е сутки по ГОСТ 30556-98 [16]. Через 3 недели после посадки семян проростки пересаживали в контейнеры на среду МС для дальнейшего развития.

Клональное микроразмножение

Растения высотой 10 см (4–6 узлов) нарезали на черенки (узел с сегментами междоузлия) и размножали в два этапа: посадка на среду МС с добавлением 0.5 мг/л тидиазурона (ТДЗ) для стимуляции роста надземной части, затем пересаживали на среду ¼ МС с добавлением 0.2 мг/л α-нафтилуксусной кислоты для индукции ризогенеза [17].

Индукция каллусогенеза

Стеблевые экспланты помещали на среду МС с добавлением 0.5 мг/л 2,4-дихлорфеноксиуксусной кислоты (2,4-Д). Для индукции каллусогенеза использовали ранее культивированные *in vitro* растения.

Получение водных экстрактов

Водные экстракты получали из надземной части асептических растений и каллуса. Растительный материал, замороженный в жидком азоте, растирали в ступке. По достижении гомогенатом комнатной температуры к нему добавляли дистиллированную воду в соотношении 1 : 3. Смесь помещали на водяную баню и кипятили в течение 30 мин [18], экстракт фильтровали, центрифугировали в течение 60 мин при 20000 g, отбирали супернатант и использовали его для синтеза наночастиц.

Выделение преобладающих фракций растительного экстракта

Водный экстракт растений лаванды исследовали с помощью аналитической хроматографии. Анализировали хроматограммы образцов водного экстракта растения и каллуса лаванды на трех длинах волн (214, 280 и 320 нм). Фракции, соответствующие максимальным пикам (обозначены цифрами на рис. 5А), где высушивали с использованием лиофилизатора, растворяли в среде RPMI-1640

с 10% фетальной бычьей сыворотки и использовали для оценки цитотоксичности.

Синтез наночастиц

Серебряные наночастицы получены методом «зеленого» синтеза путем смешивания 50 мкл раствора нитрата серебра в воде (1 г/л) и 50 мкл экстрактов либо растений, либо каллусов лаванды в диапазоне концентраций от 30 до 0.5%. В процессе синтеза частиц измеряли спектры поглощения при 350–800 нм в четырех временных точках (30, 60, 150, 240 мин) с использованием планшетного анализатора Infinite M100 Pro (Tecan, Австрия). Эффективность синтеза НЧ оценивали по интенсивности пика ЛППР. Наличие пика поверхностного плазмонного резонанса считается качественным критерием присутствия в системе металлических НЧ [19, 20].

Морфологию синтезированных наночастиц исследовали методом сканирующей электронной микроскопии при ускоряющем напряжении 10 кВ на микроскопе MAIA3 Tecan (Чехия).

Модификация наночастиц

НЧ модифицировали бычьим сывороточным альбумином (БСА) путем сорбции белка на поверхности частиц. Эффективность модификации НЧ косвенно подтверждена путем измерения их гидродинамического размера. Размер частиц определяли методом динамического рассеяния света на анализаторе Zetasizer Nano ZS (Malvern Instruments, Ltd.).

Изучение цитотоксических свойств

Цитотоксические свойства растительного экстракта, его преобладающих фракций и НЧ, полученных с помощью данного экстракта до и после стабилизации БСА, изучали при помощи стандартного МТТ-теста. Исследование проводили на клеточных линиях различного происхождения: СНО (клетки яичника китайского хомячка), SK-BR-3 (аденокарцинома молочной железы человека), SKOV3-lip (аденокарцинома яичника человека), а также на линии SKOV-kat, трансфицированной красным флуоресцентным белком Katushka, для прижизненного мониторинга развития злокачественных образований *in vivo* на модельных лабораторных животных [21].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Наночастицы серебра для биомедицинских применений синтезированы с использованием водного экстракта лаванды узколистной – эфиромасличного растения, широко применяющегося в пищевой, косметической и фармацевтической промышленности. Использование вторичных метаболитов (ВМ) лаван-

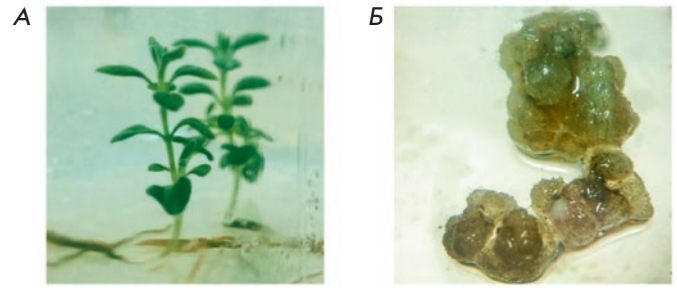


Рис. 1. Растения (А) и каллус (Б) *Lavandula angustifolia* Mill. сорта Munstead, полученные в культуре *in vitro*

ды, способных восстанавливать ионы металлов из их солей, является перспективным экологически безопасным способом создания НЧ с антибактериальными и цитотоксическими свойствами. Ряд наночастиц, полученных путем восстановления ионов металлов, обладает свойством поверхностного плазмонного резонанса и, как следствие, возможностью нагрева, что может использоваться в онкотерапии для гипертермии тканей.

Культура клеток и тканей лаванды узколистной

В процессе культивирования *in vitro* получены проростки лаванды узколистной (рис. 1А). Всхожесть семян при введении в культуру *in vitro* не отличалась достоверно от всхожести в контрольном образце и составляла $80.0 \pm 19.6\%$, что свидетельствует об эффективности выбранного способа стерилизации.

При размножении растений на среде МС с добавлением 0.5 мг/л ТДЗ получены проростки средней высотой 6.4 ± 2.1 см. Наблюдалось множественное побегообразование, что считается хорошим показателем эффективности увеличения вегетативной массы растений. Также у 4% черенков наблюдался спонтанный ризогенез, такие растения не нуждались в дальнейшей пересадке.

Для укоренения оставшихся растений использована среда, содержащая низкие концентрации макроэлементов, $\frac{1}{4}$ МС с добавлением 0.2 мг/л α -нафтилуксусной кислоты, при этом частота ризогенеза составила 90.7–93.3%. Этот этап клонального микроразмножения помог значительно повысить эффективность образования корней у полученных ранее растений.

Частота каллусогенеза стеблевых эксплантов составила 95–99%. Каллус имел рыхлую консистенцию, а также светло-зеленый оттенок (рис. 1Б). Каллус с такими свойствами в дальнейшем можно использовать для получения суспензии растительных клеток, что позволит увеличить выход ВМ в культуре *in vitro*.

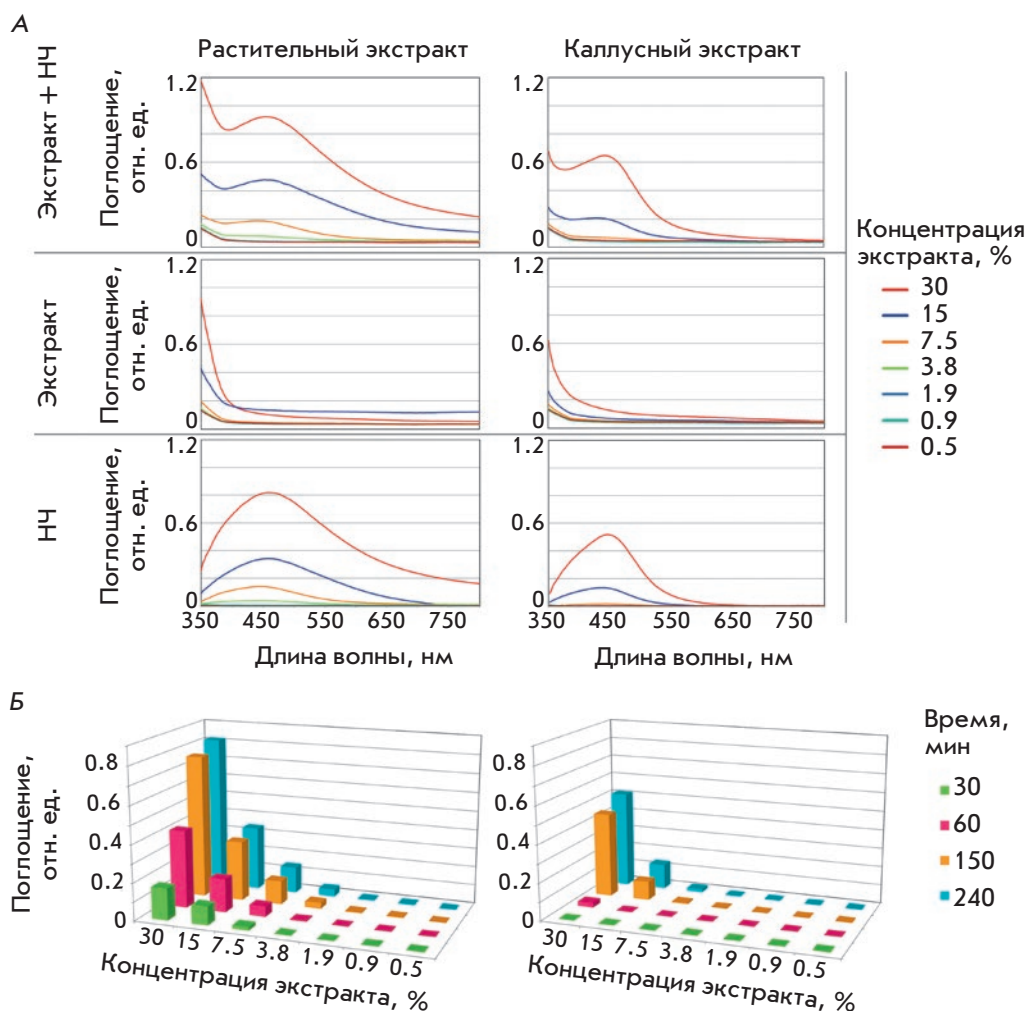


Рис. 2. Анализ эффективности синтеза НЧ. А – спектры поглощения смеси экстракта и НЧ (верхние панели), экстракта (средние панели) и НЧ (нижние панели) в диапазоне длин волны 350–800 нм, полученные в ходе инкубации в течение 240 мин водного раствора нитрата серебра (1 г/л) и растительного (левые панели), и каллусного (правые панели) экстрактов в концентрациях 0.5–30% (показано цветом). Б – интенсивность пиков плазмонного резонанса при синтезе серебряных НЧ в зависимости от концентраций растительного (левая панель) и каллусного (правая панель) экстрактов и времени инкубации (показано цветом) экстрактов с водным раствором нитрата серебра (1 г/л)

Синтез наночастиц

Частицы были получены посредством длительного инкубирования раствора нитрата серебра и экстрактов из растений и каллуса лаванды как описано в разделе «Экспериментальная часть». Для количественной оценки эффективности синтеза наночастиц, обладающих пиком ЛППР, оценивали спектрофотометрическим методом, что позволяет выявить пик ЛППР и определить его интенсивность. Спектры смесей раствора нитрата серебра и экстрактов из растений и каллуса лаванды, полученные в разных временных точках (рис. 2), позволяют сделать вывод о монотонно возрастающей зависимости между поглощением образца НЧ на длине волны, соответствующей пику ЛППР, и концентрацией экстрактов, а также временем инкубации соли серебра с экстрактом. Наибольшее поглощение образцов, наблюдаемое при синтезе с растительным экстрактом (30%) в течение 240 мин инкубации, составило 0.82 отн.ед., что превышает аналогичный показатель для кал-

лусного экстракта в 1.6 раза (рис. 2). В дальнейшем для синтеза НЧ использовали экстракт в концентрации 7.5%, так как при этой концентрации наблюдался достаточно интенсивный пик плазмонного резонанса, подтверждающий формирование наноструктур, а также поддерживался избыток соли серебра в растворе.

Далее была изучена коллоидная стабильность НЧ. Частицы проявляли агрегационную и седиментационную стабильность в фосфатно-солевом растворе в течение длительного времени (3 месяца, дальнейшие наблюдения не проводили) без какой-либо поверхностной модификации, что считается хорошим показателем выбранного метода синтеза. Стоит отметить, что в большинстве случаев металлические частицы требуют дополнительной обработки различными стабилизаторами (цитратом натрия, различными белками, ПЭГом и другими полимерами) для достижения коллоидной стабильности в буферных растворах. Синтезированные НЧ могут быть исполь-

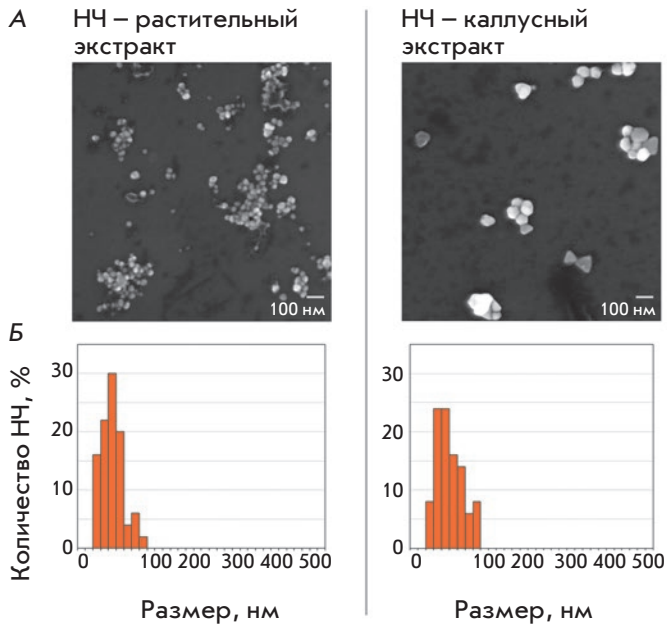


Рис. 3. Анализ морфологии серебряных НЧ. А – электронные микрофотографии НЧ, полученные с использованием сканирующей электронной микроскопии при ускоряющем напряжении 10 кВ на микроскопе MAIA3 Tescan (Чехия). Б – гистограммы распределения количества НЧ (%) по размеру (нм)

зованы для последующей модификации биологически активными молекулами, в том числе распознающими раковые клетки полипептидами (антителами, скаффолдами), требующими длительного хранения в солевых растворах.

В результате обработки изображений, полученных методом электронной микроскопии, определен средний размер наночастиц – 35.4 ± 1.6 нм при синтезе с растительным экстрактом и 56.4 ± 2.4 нм при синтезе с каллусным экстрактом (рис. 3Б). НЧ в основном имели округлую форму, однако часть частиц, полученных с использованием каллусного экстракта, имела форму тетраэдра или более сложных многогранников (рис. 3А).

Следует отметить, что размер НЧ, используемых *in vivo*, имеет большое значение, поскольку он определяет свойства наночастиц и влияет на прохождение ими гематоэнцефалического барьера [22–24].

Следовательно, при синтезе наночастиц необходимо учитывать все параметры, влияющие на их размер, а также иметь возможность воздействовать на эти параметры для получения наночастиц оптимального размера для успешного проникновения в клетку.

В дальнейших экспериментах использовали серебряные НЧ, полученные с растительным экстрактом,

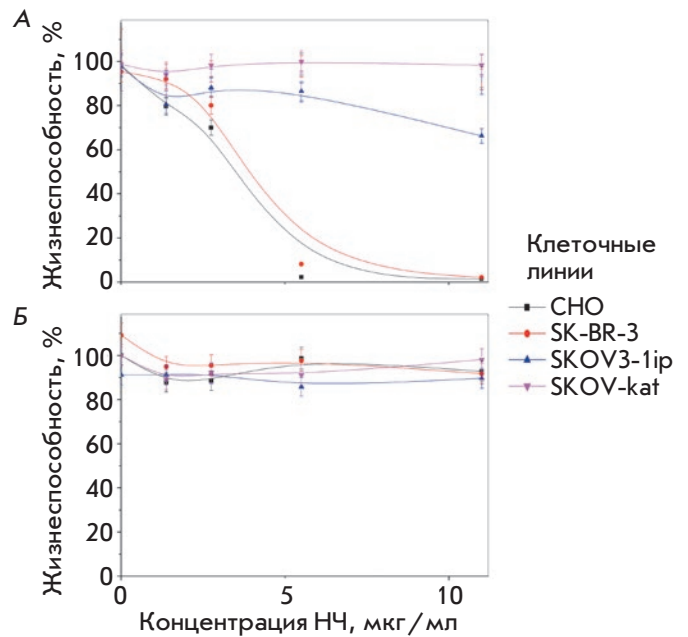


Рис. 4. Исследование цитотоксичности серебряных НЧ с помощью МТТ-теста. Зависимость жизнеспособности (%) клеточных линий CHO, SK-BR-3, SKOV3-1ip и SKOV-kat (показаны цветом) от содержания в среде серебряных НЧ (мкг/мл) до (А) и после (Б) стабилизации бычьим сывороточным альбумином (БСА)

так как они по всем параметрам превосходили НЧ, синтезированные с помощью каллусного экстракта – имели большую интенсивность пика ЛППР, меньший размер и более стабильную форму. Поскольку применение наночастиц для задач онкотерапии подразумевает модификацию их поверхности различными соединениями (антитела, аффибоды и др.), которая значительно влияет на конечный гидродинамический размер, поэтому для работы выбраны наночастицы с меньшим средним диаметром.

Изучение цитотоксических свойств НЧ

С целью изучения перспективности синтезированных НЧ для различных биомедицинских применений, в частности для онкотерапии, исследована биосовместимость данных НЧ в культуре *in vitro*. С использованием стандартного МТТ-теста исследовано действие НЧ, полученных с помощью растительного экстракта, а также выделенных из него фракций, которые, вероятно, влияют на цитотоксичность как самого экстракта, так и НЧ.

По данным МТТ-теста (рис. 4А) синтезированные немодифицированные наночастицы обладали цитотоксическими свойствами по отношению к клеточным линиям CHO и SK-BR-3 в большей степени, SKOV3-1ip – в меньшей. На жизнеспособность

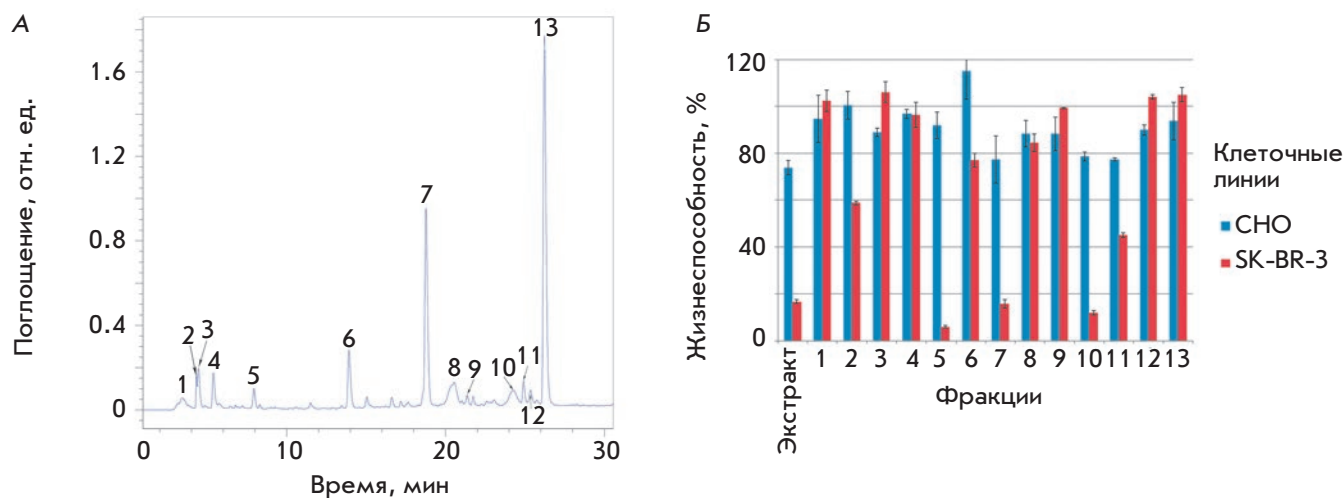


Рис. 5. Цитотоксичность растительного экстракта лаванды узколистной. А – хроматограмма растительного экстракта ($\lambda = 280$ нм). Цифрами показаны пики поглощения, соответствующие преобладающим фракциям, полученным из экстракта. Б – исследование цитотоксичности растительного экстракта и его основных фракций с помощью МТТ-теста. Зависимость жизнеспособности (%) клеточных линий CHO, SK-BR-3 (показаны цветом) от содержания в среде растительного экстракта и его фракций (1–13)

клеток линии SKOV-kat, немодифицированные НЧ, не влияли.

Действие растительного экстракта и его основных фракций, выделенных методом аналитической хроматографии, на клеточные линии CHO и SK-BR-3 оценили с использованием МТТ-теста. Были выделены фракции, соответствующие пикам с наибольшим поглощением при $\lambda = 280$ нм (рис. 5А). На основании данных, представленных на рис. 5А, предположили, что цитотоксичность полученных НЧ по отношению к этим клеточным линиям обусловлена наличием на поверхности НЧ биологически активных веществ, а именно, вторичных метаболитов из растительного экстракта, используемого в процессе синтеза НЧ. Для подтверждения этой гипотезы проанализировано цитотоксическое действие как 1% экстракта, так и его фракций, высушенных и растворенных в ростовой среде. По данным МТТ-теста (рис. 5Б), фракции 2 и 6 проявляли значительно большую цитотоксичность по отношению к линии SK-BR-3, но не влияли на жизнеспособность линии CHO. Фракции 3, 9 и 12 вызывали противоположный эффект. Наибольшее цитотоксическое действие на обе клеточные линии оказывал сам экстракт, а также фракции 5, 7, 10 и 11, причем воздействие на жизнеспособность клеточной линии SK-BR-3 было более выражено. Таким образом, можно сделать вывод, что цитотоксические свойства растительного экстракта и, вероятно, цитотоксические свойства НЧ определяют в основном фракции 5, 7, 10 и 11.

Поскольку НЧ оказывали цитотоксическое действие на некоторые клеточные линии, предположили, что блокирование поверхности частиц биосовместимым белком может уменьшить данный эффект. В качестве блокирующего белка был выбран бычий сывороточный альбумин (БСА), не влияющий на жизнеспособность клеток.

Диаметр частиц БСА после стабилизации увеличился в среднем на 71.9 нм. Согласно результатам МТТ-теста, в культуре *in vitro* модифицированные таким образом наночастицы не оказывали цитотоксического воздействия на все изученные клеточные линии (рис. 4Б). Полученные данные свидетельствуют о том, что БСА экранирует поверхность НЧ, блокируя таким образом их цитотоксичность.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Методом «зеленого» синтеза с использованием водных экстрактов растений и каллуса лаванды узколистной получены коллоидно стабильные наночастицы серебра. Отработаны условия синтеза стабильных в фосфатно-солевом буфере НЧ, имеющих оптимальный для применения в онкотераностике размер – 35.4 ± 1.6 нм. НЧ охарактеризованы методами спектрофотометрии, динамического светорассеяния и сканирующей электронной микроскопии. Изучены цитотоксические свойства частиц, полученных с использованием растительного экстракта. Доказано, что блокировка поверхности НЧ белком БСА полностью подавляет их цитотоксическое действие в усло-

виях *in vitro*. Полученные НЧ обладают совокупностью свойств, предопределяющих перспективность создания на их основе мультифункциональных агентов, сочетающих в себе диагностические и терапевтические функции. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда, проект № 19-14-00112, и программы повышения конкурентоспособности НИЯУ МИФИ (договор № 02.а03.21.0005).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bazak R., Houry M., El Achy S., Kamel S., Refaat T. // *J. Cancer Res. Clin. Oncol.* 2015. V. 141. № 5. P. 769–784.
2. Guryev E.L., Volodina N.O., Shilyagina N.Y., Gudkov S.V., Balalaeva I.V., Volovetskiy A.B., Lyubeshkin A.V., Sen' A.V., Ermilov S.A., Vodeneev V.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 39. P. 9690–9695.
3. Nikitin M.P., Shipunova V.O., Deyev S.M., Nikitin P.I. // *Nat. Nanotechnol.* 2014. V. 9. P. 716–722.
4. Shipunova V.O., Zelepukin I.V., Stremovskiy O.A., Nikitin M.P., Care A., Sunna A., Zvyagin A.V., Deyev S.M. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018. V. 10. № 20. P. 17437–17447.
5. Zelepukin I.V., Shipunova V.O., Mirkasymov A.B., Nikitin P.I., Nikitin M.P., Deyev S.M. // *Acta Naturae.* 2017. V. 9. № 14. P. 58–65.
6. Abramenko N.B., Demidova T.B., Abkhalimov E.V., Ershov B.G., Krysanov E.Yu., Kustov L.M. // *J. Hazardous Materials.* 2018. V. 347. P. 89–94.
7. Deyev S., Proshkina G., Ryabova A., Tavanti F., Menziani M.C., Eidelstein G., Avishai G., Kotlyar A. // *Bioconjugate Chem.* 2017. V. 28. № 10. P. 2569–2574.
8. Tregubov A.A., Nikitin P.I., Nikitin M.P. // *Chem. Rev.* 2018. V. 118. № 20. P. 10294–10348.
9. Sharma V.K., Yngard R.A., Lin Y. // *Adv. Colloid Interface Sci.* 2009. V. 145. P. 83–96.
10. Ghosh S., Patil S., Ahire M., Kitture R., Gurav D.D., Jabgunde A.M., Kale S., Pardesi K., Shinde V., Bellare J. // *J. Nanobiotechnol.* 2012. V. 10. № 17. P. 1–10.
11. Harris A.T., Bali R. // *J. Nanoparticle Res.* 2008. V. 10. № 4. P. 691–695.
12. Rai M., Yadav A. // *IET Nanobiotechnol.* 2013. V. 7. № 3. P. 117–124.
13. Ovais M., Khalil A.T., Raza A., Khan M.A., Ahmad I., Islam N.U., Saravanan M., Ubaid M.F., Ali M., Shinwari Z.K. // *Nanomedicine.* 2016. V. 11. № 23. P. 3157–3177.
14. Soundarrajan C., Sankari A., Dhandapani P., Maruthamuthu S., Ravichandran S., Sozhan G., Palaniswamy N. // *Bioprocess. Biosyst. Eng.* 2012. V. 35. № 5. P. 827–833.
15. Murashige I., Skoog F. // *Physiol. Plant.* 1962. № 15. P. 473–497.
16. ГОСТ 30556-98. Семена эфиромасличных культур. Методы определения всхожести. – Введ. 2000-07-01 – Семена масличных культур: Сб. ГОСТов. М.: Стандартинформ, 2010.
17. Gonçalves S., Romano A. // *Biotechnol. Adv.* 2012. V. 6. P. 1–9.
18. Makarov V.V., Makarova S.S., Love A.J. // *Langmuir.* 2012. V. 28. P. 1–5.
19. Сотников Д.В., Жердев А.В., Дзантиев Б.Б. // *Успехи биол. химии.* 2015. Т. 55. С. 391–420.
20. Vasileva P., Donkova B., Karadjova I., Dushkin C. // *Colloids Surfaces A: Physicochem. Eng. Aspects.* 2011. V. 382. P. 203–210.
21. Zdobnova T., Sokolova E., Stremovskiy O., Karpenko D., Telford W., Turchin I., Balalaeva I., Deyev S. // *Oncotarget.* 2015. V. 6. № 31. P. 30919–30928.
22. Kelf T.A., Sreenivasan V.K., Sun J., Kim E.J., Goldys E.M., Zvyagin A.V. // *Nanotechnology.* 2010. V. 21. № 28. P. 1–8.
23. Xin H., Sha X., Jiang X., Chen L., Law K., Gu J., Chen Y., Wang X., Fang X. // *Biomaterials.* 2012. V. 33. № 5. P. 1673–1681.
24. Zhou Y., Peng Z., Seven E.S., Leblanc R.M. // *J. Controlled Release.* 2018. V. 270. P. 290–303.

УДК 612.816

Полимеризация септинов замедляет рециклирование синаптических везикул в двигательном нервном окончании

П. Н. Григорьев, Г. А. Хисамиева, А. Л. Зефилов*

Казанский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, 420012, Казань, ул. Бутлерова, 49

*E-mail: zefiroval@rambler.ru

Поступила в редакцию 03.12.2018

Принята к печати 14.03.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-54-62

РЕФЕРАТ Септины – наименее изученный элемент цитоскелета, входят в состав консервативного, недавно открытого семейства GTP-связывающих белков. Септины экспрессируются нейронами и взаимодействуют с целым рядом белков, принимающих участие в процессах экзо-эндоцитоза синаптических везикул. Однако наши знания о роли септинов в механизмах синаптической передачи и пресинаптического везикулярного цикла недостаточны. В опытах на двигательных нервных окончаниях диафрагмы мыши с использованием внутриклеточного микроэлектродного отведения постсинаптических сигналов, флуоресцентной конфокальной микроскопии и красителя FM 1-43 исследованы процессы секреции медиатора и экзо-эндоцитоза синаптических везикул в условиях стимуляции полимеризации септинов форхлорфенурином. Обнаружено, что аппликация форхлорфенурина приводит к усилению депрессии секреции медиатора в процессе длительного высокочастотного раздражения (20 и 50 имп/с). Раздражение двумя короткими высокочастотными пачками импульсов показало, что форхлорфенурин вызывает снижение скорости восполнения запаса готового к освобождению медиатора. На фоне действия форхлорфенурина в нервном окончании увеличивалось количество везикул, захвативших краситель во время эндоцитоза, замедлялся темп выброса флуоресцентного красителя в предварительно загруженных FM 1-43 нервных окончаниях при экзоцитозе. Сделано заключение, что стимуляция полимеризации септинов форхлорфенурином приводит к замедлению рециклирования (повторного использования) синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях, связанного с нарушением процессов везикулярного транспорта.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА везикулярный цикл, двигательное нервное окончание, секреция медиатора, септины, форхлорфенурин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПКП – потенциал концевой пластинки; ФХФ – форхлорфенурин.

ВВЕДЕНИЕ

Секреция медиатора в химическом синапсе осуществляется посредством экзоцитоза во время слияния мембраны синаптической везикулы, заполненной медиатором, с пресинаптической мембраной. Этот процесс происходит в области специализированных образований – активных зон при открытии Ca-каналов пресинаптической мембраны. Порция медиатора, освобождаемая во время экзоцитоза отдельной везикулы, носит название кванта. Источающийся в процессе секреции запас синаптических везикул восполняется в процессах эндоцитоза и транспорта везикул. Из пресинаптической мембраны образу-

ются новые везикулы, которые вновь заполняются медиатором, транспортируются к активным зонам и повторно используются в секреции (механизм рециклирования). Совокупность процессов экзоцитоза, эндоцитоза и транспорта синаптических везикул составляет везикулярный цикл – важный пресинаптический механизм, обеспечивающий эффективную секрецию медиатора нейроном в течение длительного времени. Известно, что синаптические везикулы в двигательных нервных окончаниях функционально разнородны, они составляют несколько везикулярных пулов. Пул везикул, готовых к освобождению медиатора (readily releasable pool), представлен

везикулами, расположенными в непосредственной близости к активной зоне. Этот пул, имеющий ограниченный размер, довольно быстро истощается и эффективно восполняется везикулами рециклирующего (мобилизационного) пула, которые образуются из пресинаптической мембраны за счет эндоцитоза (короткий путь). При длительной высокочастотной активности нейрона в процесс секреции могут вовлекаться синаптические везикулы, которые составляют большой резервный пул и формируются с поверхности эндосом нервного окончания (длинный путь) [1–3]. Большой научный интерес представляют механизмы, регулирующие работу пресинаптического везикулярного цикла и везикулярного транспорта. Одним из них может быть цитоскелет, включающий несколько динамично полимеризующихся/деполимеризующихся элементов: актиновые филаменты, промежуточные филаменты, микротрубочки, септины.

Септины, представляющие собой наименее изученный элемент цитоскелета, входят в состав консервативного, недавно открытого семейства GTP-связывающих белков [4]. Септины вовлечены в такие клеточные процессы, как деление, реорганизация других элементов цитоскелета, внутриклеточный транспорт. Служа специфическим барьером, септины могут отделять специализированные мембранные участки друг от друга [5]. У млекопитающих известно 13 видов септинов (обозначаемые SEPT1–SEPT12, SEPT14) [6], которые, объединяясь друг с другом, образуют гетероолигомерные комплексы, способные полимеризоваться в более сложные структуры (филаменты, кольца и сети). В зрелых нервных окончаниях выявлены SEPT3, SEPT5–7 и SEPT11 [7], однако их функции недостаточно изучены. Так, SEPT5 и SEPT7 вовлечены в рост аксонов [7] и дендритов [8, 9]. Обнаружена колокализация SEPT5, SEPT6, SEPT3 с синаптическими везикулами [7, 10, 11]. Также показано взаимодействие септинов с целым рядом белков, принимающих участие в процессах экзоцитоза: Munc-18-1, синапсином-2, VAMP2, синаптофизин, синаптотагмин-1, NSF, Hsc70 и др. Предполагается, что динамическая реорганизация септинов необходима для процессов экзоцитоза синаптических везикул и секреции медиатора [12–15]. Еще меньше мы знаем о роли септинов в процессах эндоцитоза и транспорта синаптических везикул. Предпосылкой к возможному участию септинов в данных процессах служит обнаружение взаимодействия септинов с белками, участвующими в процессах эндоцитоза – клатрином, флотилином и динамином [12, 16], а также колокализация септинов и насыщенных фосфоинозитол-4,5-бисфосфатом участков цитоплазматической мембраны, необходимых для клатринзависимого эндоцитоза [17, 18].

С использованием комбинации электрофизиологического подхода и флуоресцентной конфокальной микроскопии оценены процессы рециклирования синаптических везикул в условиях стимуляции полимеризации септинов форхлорфенураном (ФХФ). ФХФ селективно стимулирует полимеризацию септинов, не влияя на другие формы цитоскелета (микротрубочки и актиновые филаменты), и не обладает цитотоксичностью в концентрациях до 500 мкМ [19].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Объект исследования, растворы

Эксперименты проведены на изолированных нервно-мышечных препаратах диафрагмы мыши. Работа проведена в соответствии с международными правилами работ с использованием экспериментальных животных. После выделения препарат помещали в ванночку и постоянно перфузировали раствором для теплокровных следующего состава (в мМ): NaCl – 125, KCl – 2.5, NaH₂PO₄ – 1, CaCl₂ – 2, MgCl₂ – 1, глюкоза – 11, NaHCO₃ – 12. Значения pH поддерживали на уровне 7.3–7.4; температура 24°C. Перфузионный раствор постоянно насыщали карбогеном (95%O₂/5%CO₂). Все исследования проводили только на поверхностно расположенных синапсах. Раздражение двигательного нерва осуществляли прямоугольными электрическими импульсами длительностью 0.2–0.3 мс сверхпороговой силы с частотой 0.2 имп/с (редкое раздражение) или 20, 50 имп/с (высокочастотное раздражение). Для блокирования сокращений препарата использовали μ-котококсин GIIIB в концентрации 1–2 мкМ (фирма Peptide Institute, Inc, Япония). Полимеризацию септинов стимулировали, добавляя в перфузионный раствор форхлорфенуран (50 мкМ) на 40 мин. Все использованные вещества за исключением μ-котококсина GIIIB были фирмы Merck (Германия).

Электрофизиология

Регистрацию одноквантовых миниатюрных потенциалов концевой пластинки (МПКП), возникающих спонтанно в покое, и многоквантовых потенциалов концевой пластинки (ПКП) в ответ на раздражение двигательного нерва производили с помощью стеклянных микроэлектродов с диаметром кончика менее 1 мкм и сопротивлением 8–10 МОм, заполненных 2.5 М раствором KCl. Микроэлектрод вводили в мышечное волокно в области нервного окончания под визуальным контролем. Уровень мембранного потенциала покоя контролировали при помощи милливольтметра. Эксперименты, в которых изменение мембранного потенциала

покоя превышало 5 мВ, не учитывали. Сигналы оцифровывали с помощью платы АЦП Ла-2USB. Перед подачей высокочастотного раздражения регистрировали 35–100 МПКП и 7–10 ПКП при редком раздражении. Для анализа количества квантов медиатора, освобожденных в ответ на каждое раздражение (квантовый состав ПКП), амплитуду каждого зарегистрированного ПКП и МПКП нормировали по уровню мембранного потенциала – 75 мВ; квантовый состав рассчитывался как отношение амплитуды ПКП на среднюю амплитуду МПКП с использованием коррекции на нелинейную сумму [20, 21].

Флуоресцентная микроскопия

Процессы экзо- и эндоцитоза синаптических везикул изучали с использованием флуоресцентного красителя FM 1-43 (SynaptoGreen C4, Merck) в концентрации 6 мкМ. Краситель обратимо связывается с пресинаптической мембраной и во время эндоцитоза (после стимуляции экзоцитоза) оказывается внутри вновь образующихся синаптических везикул («загружается» в нервные окончания) [22, 23]. В этом случае в нервном окончании наблюдалось яркое свечение, отражающее процесс захвата красителя синаптическими везикулами, прошедшими экзоэндоцитоз [23]. Стимуляция экзоцитоза предварительно загруженных везикул вызывает освобождение («выгрузку») красителя из нервных окончаний. Флуоресценцию наблюдали с помощью моторизованного микроскопа VX51W1 (Olympus, Германия), оснащенного конфокальным сканирующим диском DSU, светодиодным осветителем CoolLed рЕ-1 (CoolLed, Великобритания) и CCD-камерой OrcaR2 (Hamamatsu, Япония), совмещенной с персональным компьютером через специализированный софт Olympus Cell[^]P. Оптика для анализа свечения FM 1-43 включала набор светофильтров Olympus U-MNB2 и водно-иммерсионный объектив Olympus LUMPLFL60xw (1.0 NA). Интенсивность свечения оценивали, используя программу ImagePro, в относительных единицах (отн. ед.) как среднее свечение пикселей изображения нервного окончания за вычетом фоновой флуоресценции. Фоновое значение флуоресценции определяли как среднюю интенсивность свечения в квадрате 50 × 50 пикселей в участке изображения без нервных окончаний [24].

Статистический анализ проводили с использованием программы Origin (Origin Lab Corp.). Количественные результаты исследования представлены в форме среднее значение ± стандартная ошибка, *n* – число независимых экспериментов. Статистическую значимость определяли с помощью критерия ANOVA.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Секреция медиатора в процессе длительного высокочастотного раздражения при действии форхлорфенурана

Обнаружено, что экспозиция ФХФ (40 мин) не вызывала значимых изменений мембранного потенциала покоя мышечных волокон (-73.0 ± 2.8 мВ, *n* = 20 и -71.7 ± 3.4 , *n* = 20 в контроле и опыте, *p* > 0.05). При редком раздражении отмечено недостоверное снижение квантового состава ПКП, составлявшего в контрольных и опытных препаратах 59.0 ± 5.8 кванта (*n* = 18) и 53.3 ± 4.7 кванта (*n* = 15) соответственно (*p* > 0.05).

В процессе длительного (3 мин) высокочастотного раздражения с частотой 20 имп/с в контроле наблюдалось трехфазное снижение (депрессия) квантового состава ПКП (рис. 1Аа). Первоначальный быстрый спад в течение 0.4 с раздражения до $64.7 \pm 4.1\%$ (*n* = 9) от исходной величины. После короткого состояния «плато» продолжительностью около 1.5–2 с отмечалась вторая фаза более медленного снижения (к 15 с раздражения до $54.2 \pm 5.5\%$ (*n* = 9)). Последующее, еще более медленное, снижение приводило к снижению квантового состава ПКП к 3 мин раздражения до $35.9 \pm 6.5\%$ (*n* = 9) от исходного уровня. Аналогичная трехфазная динамика снижения квантового состава наблюдалась и при раздражении двигательного нерва с более высокой частотой (50 имп/с, 2 мин), но депрессия секреции медиатора была более выражена (рис. 1Ба). Приблизительно к 0.16 с завершился первоначальный быстрый спад, достигавший $72.3 \pm 3.0\%$ (*n* = 9) от исходной. После короткой фазы плато, продолжавшейся 0.5–0.8 с, была заметна вторая фаза снижения, которая характеризовалась более медленной кинетикой спада, начиная с 5-й секунды раздражения отмечалась третья, еще более медленная фаза. К окончанию второй минуты раздражения квантовый состав составлял $22.7 \pm 7.0\%$ (*n* = 9) от исходной величины.

На фоне действия ФХФ динамика спада квантового состава ПКП качественно не изменялась (наблюдалось трехфазное снижение), однако глубина депрессии была значительно больше. В процессе высокочастотного раздражения (20 имп/с, рис. 1Аб) к 3-й мин раздражения квантовый состав ПКП снижался до $20.2 \pm 6.8\%$ (*n* = 7) от исходного уровня. При раздражении с частотой 50 имп/с снижение квантового состава ПКП также было более выраженным (рис. 1Бб). К окончанию второй минуты раздражения в опытных препаратах квантовый состав снижался до $6.2 \pm 3.6\%$ (*n* = 9) от исходной.

Построение кумулятивных кривых количества освобожденных квантов медиатора выявило статисти-

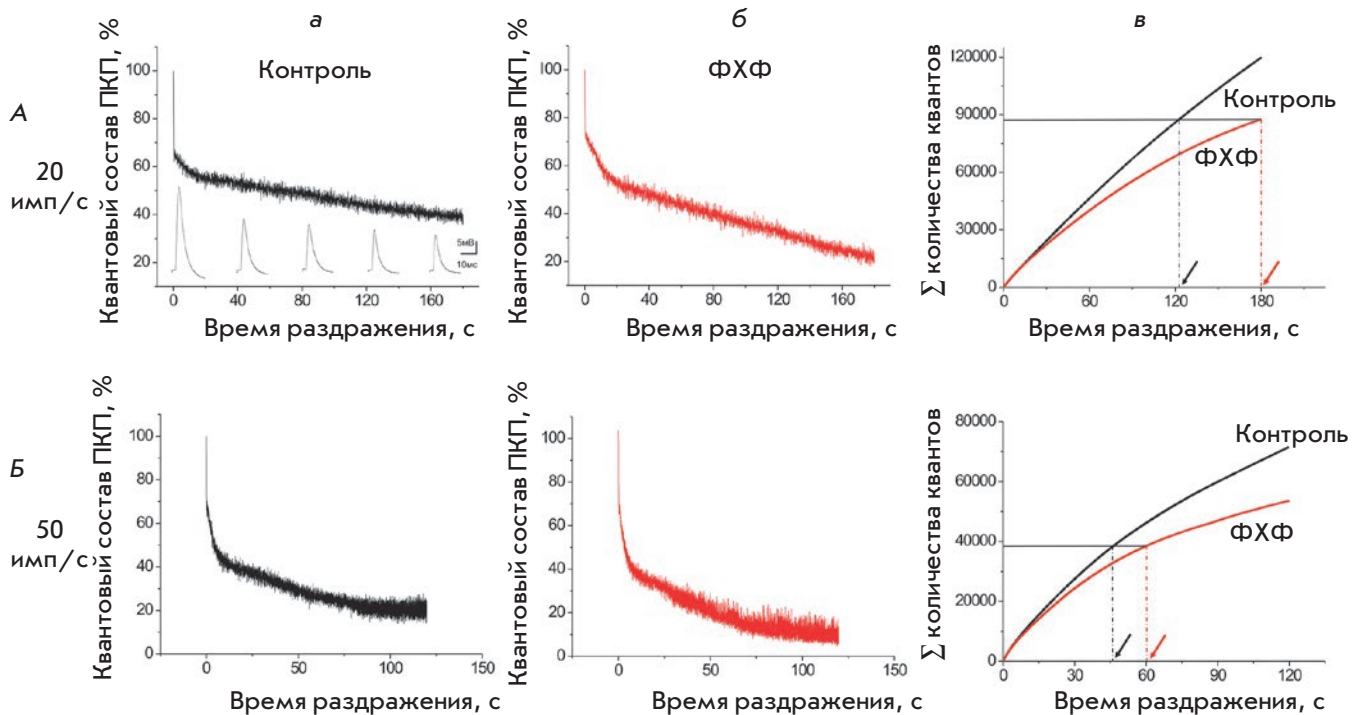


Рис. 1. Секретия медиатора при высокочастотном раздражении в присутствии форхлорфенурана. А – динамика спада квантового состава ПКП в процессе длительного высокочастотного раздражения (20 имп/с) в контроле (а) и на фоне действия ФХФ (б). Квантовый состав первого ПКП принят за 100%. Представлены усредненные данные по всем экспериментам (см. текст). Б – аналогичные кривые при частоте раздражения 50 имп/с. Ав и Бв – кумулятивные кривые количества освобожденных квантов медиатора в процессе высокочастотного раздражения. Пунктирные линии указывают время, за которое при раздражении в контроле и в присутствии ФХФ освобождается одинаковое количество квантов

чески значимое снижение интенсивности секреции медиатора в присутствии ФХФ. Трехминутное раздражение с частотой 20 имп/с в контрольных препаратах приводило к высвобождению 119796 ± 8161 квантов ($n = 9$), тогда как на фоне действия ФХФ оно было на 27% меньше – 87611 ± 9025 квантов ($n = 7$), $p < 0.05$ (рис. 1Ав). Двухминутное раздражение с частотой 50 имп/с приводило к высвобождению 71505 ± 5543 квантов ($n = 9$) в контроле, в присутствии ФХФ высвобождение было на 25% меньше – 53553 ± 8904 квантов ($n = 9$), $p < 0.05$ (рис. 1Бв).

Углубление депрессии секреции медиатора при высокочастотном раздражении в условиях стимуляции полимеризации септинов ФХФ может быть связано с замедлением мобилизации – темпа восполнения запаса готового к освобождению медиатора.

Скорость восполнения готового к освобождению запаса медиатора при высокочастотном раздражении в присутствии форхлорфенурана

Для оценки темпа восполнения готового к освобождению запаса медиатора мы подавали раздраже-

ние короткими (1 с) пачками импульсов с частотой 50 имп/с с различными интервалами времени между ними (0,5, 3 и 60 с) в норме и на фоне действия ФХФ [25]. В ответ на первую пачку в течение первых 6–8 импульсов происходило резкое снижение квантового состава ПКП, которое сменялось состоянием плато (квантовый состав оставался на одинаковом уровне) (рис. 2Б,В). Суммирование количества освобожденных квантов показало, что как в контроле, так и на фоне действия ФХФ на первую пачку импульсов освобождалось одинаковое количество квантов (2214 ± 192 ($n = 12$) и 2205 ± 194 квантов ($n = 12$), $p > 0.05$). Следовательно, первая пачка раздражения вовлекала в секрецию весь готовый к освобождению запас медиатора, составляющий в двигательных нервных окончаниях мыши около 1700 квантов [25, 26], и практически не затрагивала запас мобилизационного (рециклирующего) пула, составляющего около 80000 квантов [27]. На вторую пачку, поданную через 0,5 и 3,0 с после первой, отмечался более низкий уровень секреции (рис. 2Б,В) вследствие неполного восстановления готового к освобождению запаса ме-

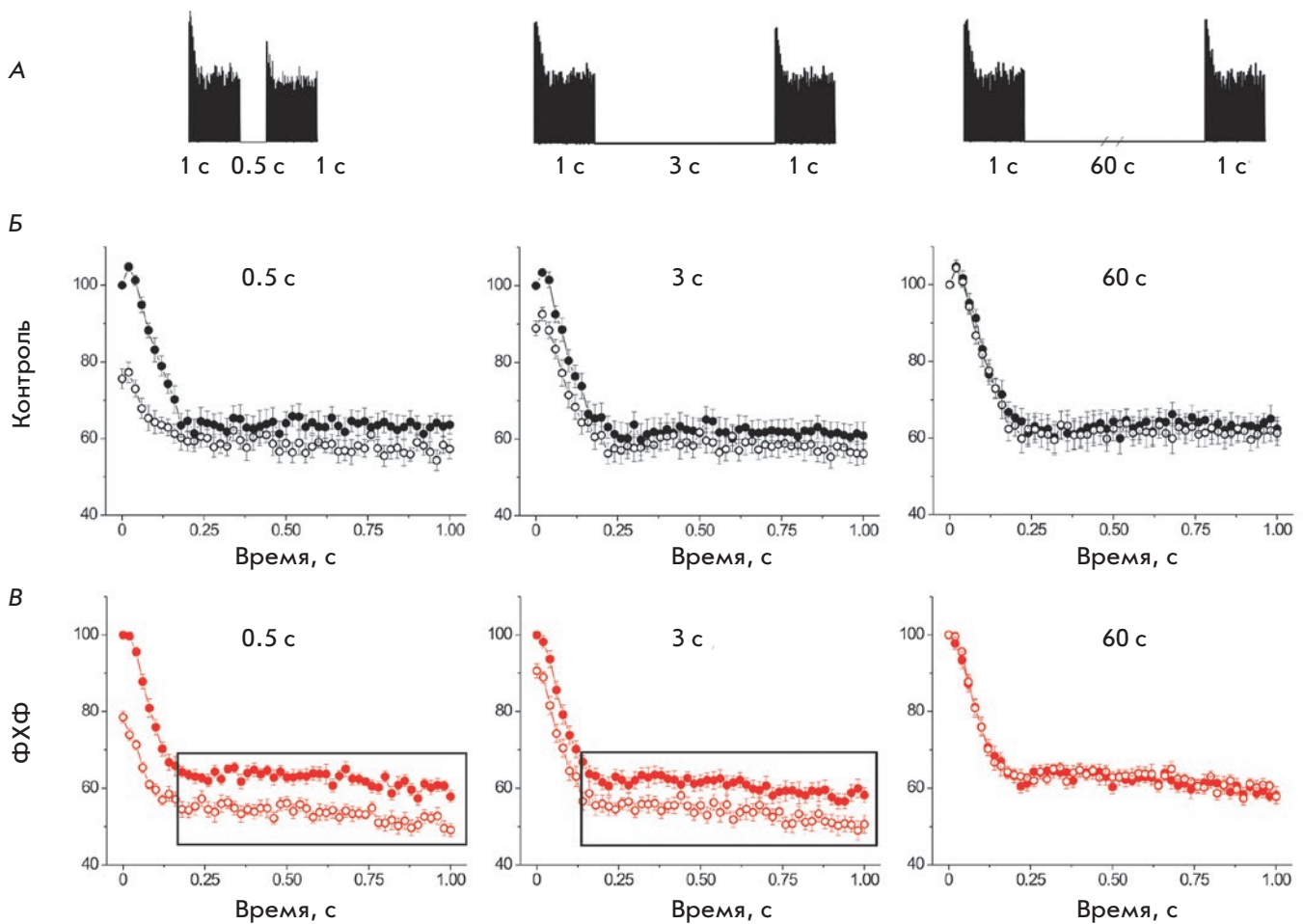


Рис. 2. Восполнение готового к освобождению запаса медиатора при высокочастотном раздражении в присутствии форхлорфенурана. А – схема эксперимента. Раздражение двумя короткими (1 с) пачками импульсов с частотой (50 имп/с), интервал времени между пачками 0.5, 3 и 60 с. Б, В – динамика секреции медиатора во время первой (темные кружки) и второй пачки (белые кружки) импульсов в контроле и при действии ФХФ. В каждом эксперименте квантовый состав первого ПКП в первой пачке принят за 100%. Видно, что при действии ФХФ глубина депрессии квантового состава ПКП на вторую пачку раздражения при интервалах 0.5 и 3.0 с увеличивается

диатора. Так, в контроле и на фоне действия ФХФ при интервале времени между пачками 0.5 с сумма квантов, освобожденных за вторую пачку раздражений, составила $88.3 \pm 1.0\%$ ($n = 12$) и $83.9 \pm 1.0\%$ ($n = 12$) от количества квантов, освобожденных за первую пачку ($p < 0.01$); а при интервале между пачками 3 с – $93.0 \pm 0.8\%$ ($n = 13$) и $88.5 \pm 1.2\%$ соответственно ($n = 13$), $p < 0.01$. Следовательно, на фоне действия ФХФ секреция медиатора восстанавливалась значительно слабее, чем в контроле, а особенно сильные изменения отмечены в фазе плато (рис. 2В,В). При большем интервале между пачками (60 с) наблюдалось полное восстановление секреции – $100.1 \pm 1.0\%$ ($n = 12$) в норме и $98.9 \pm 0.7\%$ ($n = 12$) на фоне действия ФХФ. Учитывая, что среднее время рецикли-

рования синаптических везикул в двигательных нервных окончаниях мышцы составляет около 50 с [27], можно предполагать, что восполнение готового к освобождению медиатора во время короткой паузы между пачками (0.5 и 3 с) происходит только за счет запаса мобилизационного пула, но не эндоцитоза синаптических везикул. Таким образом, использование ФХФ не изменяет запас готового к освобождению медиатора, однако замедляет темп его восполнения за счет мобилизационного пула.

Загрузка FM 1-43 в нервные окончания на фоне действия форхлорфенурана

Углубление депрессии секреции медиатора при длительном высокочастотном раздражении на фоне

действия форхлорфенурана (рис. 1) также может быть связано и с нарушением процессов эндоцитоза синаптических везикул. Мы попытались проверить это предположение в опытах с флуоресцентным красителем FM 1-43. Известно, что процессы эндоцитоза синаптических везикул следуют за процессами экзоцитоза и осуществляются в соотношении 1 : 1. Поэтому для оценки эндоцитоза необходимо подобрать такие экспериментальные условия, при которых уровень секреции медиатора одинаков в контрольной и опытной (действие ФХФ) сериях, и происходит экзоцитоз одинакового количества везикул. Анализ кумулятивных кривых секреции медиатора (рис. 1Ав) показал, что раздражение контрольных и опытных препаратов с частотой 20 имп/с и продолжительностью 2 и 3 мин соответственно приводит к освобождению примерно одинакового количества квантов медиатора. Такие времена раздражения использованы при изучении загрузки FM 1-43. Если процессы эндоцитоза не страдают, то можно ожидать одинаковой загрузки красителя и одинаковой интенсивности свечения. Однако интенсивность свечения в нервных окончаниях при действии ФХФ оказалась значительно больше, чем в контрольных препаратах: 71.6 ± 2.7 отн. ед. ($n = 123$) и 54.1 ± 2.3 отн. ед. ($n = 123$) соответственно, $p < 0.01$ (рис. 3А). В случае более высокой частоты раздражения, 50 имп/с, продолжительностью 45 с в контрольной и 1 мин в опытной сериях (в данных условиях также освобождается одинаковое количество квантов (рис. 1Бв)) обнаружена статистически значимо более высокая интенсивность флуоресценции при действии ФХФ – 42.9 ± 2.1 отн. ед. ($n = 125$) по сравнению с контролем – 37.0 ± 1.7 отн. ед. ($n = 125$), $p < 0.05$ (рис. 3А). Таким образом, стимуляция полимеризации септинов ФХФ увеличивала количество везикул в нервном окончании, захвативших краситель.

Выгрузка FM 1-43 из нервных окончаний на фоне действия форхлорфенурана

В данной серии экспериментов оценено влияние ФХФ на процессы экзоцитоза синаптических везикул. На первом этапе все препараты загружали FM 1-43. С этой целью проводили длительное раздражение двигательного нерва с частотой 20 имп/с в течение 3 мин в растворе с FM 1-43 [28]. Далее препараты контрольной группы перфузировали стандартным раствором, а опытной – раствором с ФХФ. Спустя 40 мин проводили длительное высокочастотное раздражение (рис. 3Б). При этом наблюдали эффективное снижение интенсивности свечения нервных окончаний вследствие выброса флуоресцентного красителя вместе с медиатором при экзоцитозе синаптических везикул. Обнаружено, что на фоне действия ФХФ

темп выгрузки красителя уменьшался. К окончанию 1-й минуты раздражения с частотой 20 имп/с интенсивность свечения в контрольных и опытных препаратах снижалась до 78.9 ± 1.0 % ($n = 8$) и 77.3 ± 1.3 % ($n = 10$) ($p > 0.05$), а через 10 мин – до 22.7 ± 2.2 % ($n = 8$) и 36.0 ± 3.5 % ($n = 10$) ($p < 0.05$) от исходной величины соответственно (рис. 3Б). При раздражении с частотой 50 имп/с через 1 мин в контрольных и опытных препаратах интенсивность свечения составляла 63.2 ± 2.3 % ($n = 11$) и 68.2 ± 1.8 % ($n = 11$) ($p > 0.05$), а через 10 мин снижалась до 28.3 ± 1.8 % ($n = 11$) и 34.7 ± 2.3 % ($n = 11$) ($p < 0.05$) от исходной величины соответственно (рис. 3Б). Заметно, что статистически значимые отличия контрольной и опытной кривых при использовании раздражения 20 и 50 имп/с отмечались только с 1.5–2.5 мин. Замедление выгрузки указывает на снижение темпа передвижения синаптических везикул рециклирующего и, возможно, резервного пула к местам секреции в активных зонах при действии ФХФ.

ОБСУЖДЕНИЕ

Септины, как и другие элементы цитоскелета, присутствуют в клетке в полимеризованной и деполимеризованной формах. Полимеризованные формы септинов формируются около цитоплазматической мембраны [29], поэтому можно ожидать, что они принимают непосредственное участие в регуляции процессов везикулярного цикла, протекающих около пресинаптической мембраны. Один из наиболее валидных и удобных инструментов при изучении функции септинов – использование форхлорфенурана. Эффекты ФХФ и других способов нарушения работы септинов (использование малых интерферирующих РНК и трансгенных животных) оказались идентичными при изучении самых разнообразных клеточных механизмов [12, 30–34].

Септины в процессах секреции медиатора и экзоцитоза синаптических везикул

Роль септинов в регуляции процессов экзоцитоза и секреции медиатора весьма противоречива. Так, предполагается, что SEPT8 способствует процессам экзоцитоза, разобщая комплекс везикулярных белков VAMP2/синаптофизина, что приводит к последующему их взаимодействию с SNAP25 и сборке комплекса SNARE [14]. В то же время обнаружено, что полимеризованный SEPT5 может образовывать физический барьер в области активных зон, препятствующий процессам экзоцитоза синаптических везикул, а также способен влиять на расстояние между Ca-каналом и синаптической везикулой [10]. У мышей, утративших в результате нокаута возможность экспрессии SEPT4, обнаружено снижение

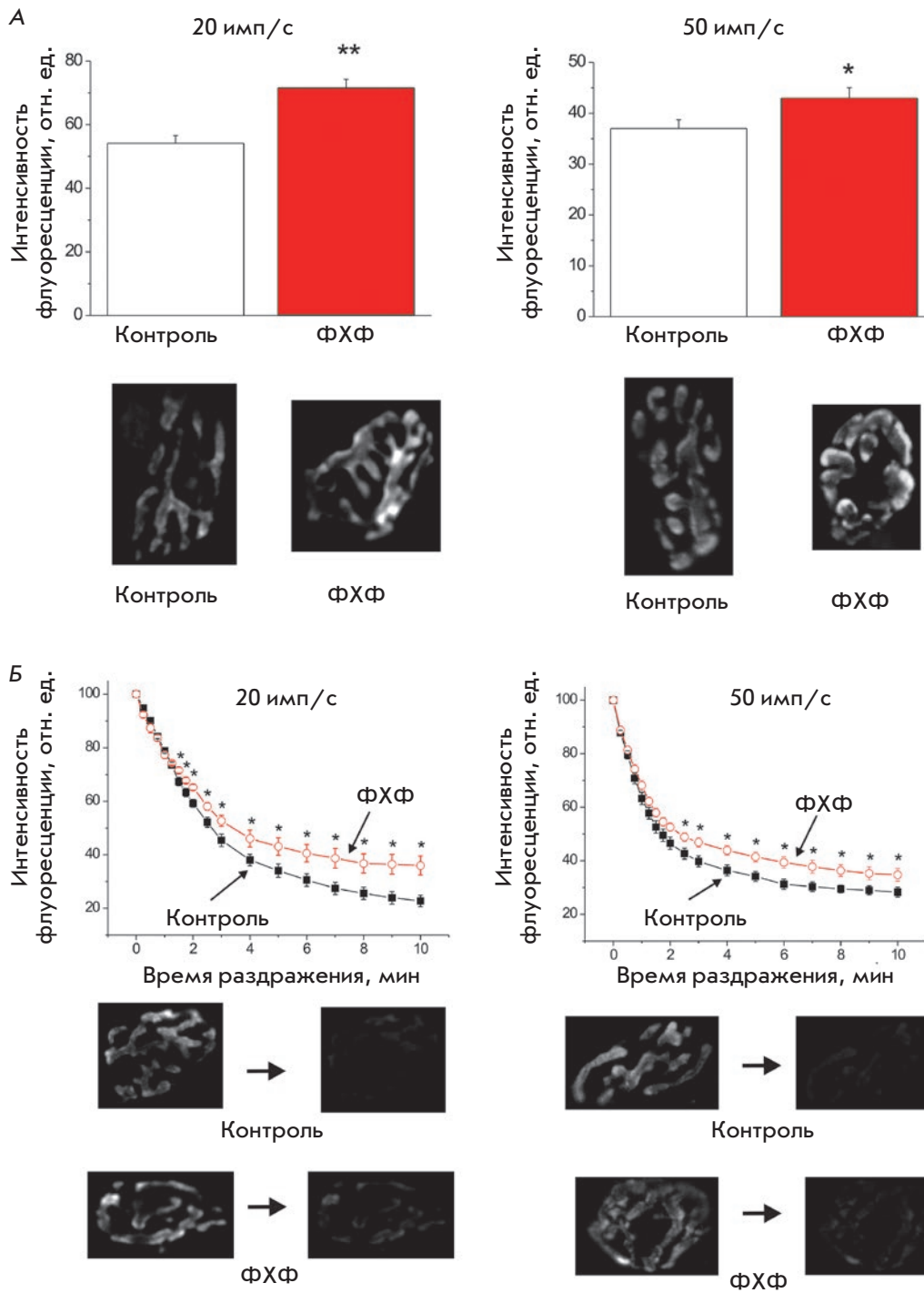


Рис. 3. Загрузка и выгрузка FM 1-43 при высокочастотном раздражении в присутствии форхлорфенуона. А – интенсивность флуоресценции нервных окончаний загруженных FM 1-43 при частоте раздражения 20 или 50 имп/с в контроле и на фоне действия ФХФ при одинаковом уровне секреции медиатора (подробнее в тексте). Ниже представлены картины флуоресценции в отдельных экспериментах. Б – динамика спада интенсивности флуоресценции (выгрузка красителя) при высокочастотном раздражении 20 и 50 имп/с предварительно загруженных нервных окончаний в контроле (черные квадраты) и в присутствии ФХФ (белые кружки), в % от первоначальной величины. Ниже приведены картины флуоресценции в начале и в конце высокочастотного раздражения

интенсивности секреции медиатора [35]. Нарушение работы повсеместно экспрессируемого варианта септина SEPT2 выявило изменения процессов экзоцитоза [12]. В то же время не выявлено значимых нарушений секреции медиатора у мышей, не способных экспрессировать SEPT5 и SEPT3 [36]. Показано снижение интенсивности вызванной синхронной и асинхронной, а также спонтанной секреции медиатора

в нервно-мышечном синапсе мышцы при стимуляции полимеризации септинов ФХФ [12]. Мы также обнаружили менее выраженное, но недостоверное снижение уровня квантового состава при действии ФХФ. Полученные различия, вероятно, связаны с использованием разного времени экспозиции ФХФ и неодинаковыми внеклеточными концентрациями кальция. Известно, что действие форхлорфенуона

усиливается при увеличении концентрации или времени экспозиции [19]. Мы использовали экспозицию 40 мин, тогда как в работе [12] экспозиция была более продолжительной – 1 ч. В связи с этим мы могли получить более слабый эффект стимуляции полимеризации септинов на работу белков SNARE-комплекса.

Септины и процессы эндоцитоза синаптических везикул

Интенсивность загрузки флуоресцентного красителя и свечения нервных окончаний на фоне действия ФХФ при одинаковой интенсивности секреции медиатора (одинаковом экзоцитозе) оказалась значительно больше, чем в контрольных препаратах (рис. 3А), т.е. наблюдалось увеличение количества окрашенных везикул в нервном окончании. Эти данные можно было интерпретировать как усиление процессов эндоцитоза синаптических везикул. Однако такое заключение возможно только в том случае, если загруженные красителем везикулы повторно вовлекаются в секрецию медиатора с одинаковой скоростью. Анализ кривых выгрузки красителя (рис. 3Б) показал, что при раздражении с частотой как 20, так и 50 имп/с снижается темп выброса предварительно загруженного флуоресцентного красителя FM 1-43. Это свидетельствует не об усилении эндоцитоза, а о замедлении поступления везикул, захвативших краситель, к местам секреции. В то же время расхождение кривых динамики выгрузки в первые минуты регистрации было не столь значительным, чтобы самостоятельно вызывать снижение на 25–27% количества секретиромых квантов медиатора в условиях действия ФХФ. Поэтому в качестве другого объяснения снижения секреции медиатора в условиях полимеризации септинов можно рассматривать нарушение процессов транспорта и повторного использования синаптических везикул, образованных путем эндоцитоза непосредственно во время высокочастотного раздражения. На это и может указывать обнаруженное усиление захвата флуоресцентного красителя FM 1-43 (рис. 3А). Так, если при высокочастотном раздражении в контроле определенная популяция везикул успевает повторно участвовать в экзоцитозе, освобождая вместе с медиатором FM 1-43, то количество содержащих краситель синаптических везикул в нервном окончании становится меньше ожидаемого. В условиях действия ФХФ вследствие нарушения транспорта синаптических везикул, вновь образованных путем эндоцитоза, уменьшается доля везикул, которая подвергается повторному участию в секреции. В результате количество синаптических везикул, содержащих флуоресцентный краситель, в опыте оказывается выше, чем в контроле, что обуславливает более яркую окра-

ску FM 1-43 в присутствии ФХФ (рис. 3А). В то же время в присутствии ФХФ параллельно может нарушаться сам механизм эндоцитоза, что может вызывать замедление процесса. На возможность участия септинов в процессах эндоцитоза синаптических везикул указывают результаты иммуногистохимических исследований, которые показали выраженную колокализацию SEPT3 с динамином [37]. Также обнаружено взаимодействие с динамином других септинов – SEPT5 и SEPT9 [16].

Септины и процессы транспорта синаптических везикул

В начале длительного высокочастотного раздражения в секреции медиатора принимают участие везикулы пула, готового к освобождению, и рециклирующего пула. Позже (через несколько десятков секунд) в секрецию повторно вовлекаются вновь образованные везикулы. Для этого новая синаптическая везикула должна образоваться посредством эндоцитоза, заполниться медиатором и поступить в рециклирующий пул, а затем посредством мобилизации восполнить пул везикул, готовых к освобождению в активной зоне. Другими словами, существуют две части везикулярного транспортного пути: рециклирующий пул – пул, готовый к освобождению, и эндоцитоз – рециклирующий пул. По всей видимости, септины обеспечивают функционирование обеих этих частей. О снижении эффективности транспорта везикул к активным зонам в условиях полимеризации септинов свидетельствуют электрофизиологические данные о замедленной динамике восстановления готового к освобождению медиатора пула после высокочастотного раздражения (рис. 2). На угнетение транспорта везикул от мест эндоцитоза указывают данные об усилении загрузки и замедлении выгрузки FM 1-43 (рис. 3А,Б).

В качестве механизма участия септинов в транспорте синаптических везикул можно рассматривать обеспечение ими работы актомиозинового мотора. Обнаружено, что септины способны взаимодействовать с актином [38], а также с немышечным миозином II [39], которые участвуют в транспорте синаптических везикул [40–42]. Одним из механизмов, объясняющих нарушение внутриклеточного транспорта, может быть способность полимеризованных септинов образовывать преграды, затрудняющие движение синаптических везикул [5, 10].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные нами данные свидетельствуют о том, что септины принимают участие в процессах везикулярного цикла и повторного использования синаптических везикул в секреции медиатора

при длительной высокочастотной активности нервно-мышечного синапса. ●

*Работа поддержана грантом
РФФИ № 17-04-01870-а, а также грантом*

*Российского научного фонда № 14-15-00847-
П (в части реализации научно-методических
аспектов экспериментального моделирования
нарушений процессов рециклирования
синаптических везикул).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Gan Q., Watanabe S. // *Front. Cell Neurosci.* 2018. V. 12. Article 171.
2. Зефирова А.Л. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2007. Т. 93. № 5. С. 544–562.
3. Rizzoli S.O., Betz W.J. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2005. V. 6. № 1. P. 57–69.
4. Byers B., Goetsch L. // *J. Cell. Biol.* 1976. V. 69. P. 717–721.
5. Mostowy S., Cossart P. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2012. V. 13. № 3. P. 183–194.
6. Hall P.A., Russell S.E. // *J. Pathol.* 2004. V. 204. P. 489–505.
7. Tsang C.W., Estey M.P., DiCiccio J.E., Xie H., Patterson D., Trimble W.S. // *Biol. Chem.* 2011. V. 392. № 8–9. P. 739–749.
8. Tada T., Simonetta A., Batterton M., Kinoshita M., Edbauer D., Sheng M. // *Curr. Biol.* 2007. V. 17. № 20. P. 1752–1758.
9. Xie Y., Vessey J.P., Konecna A., Dahm R., Macchi P., Kiebler M.A. // *Curr. Biol.* 2007. V. 17. № 20. P. 1746–1751.
10. Yang Y.M., Fedchyshyn M.J., Grande G., Aitoubah J., Tsang C.W., Xie H., Ackerley C.A., Trimble W.S., Wang L.Y. // *Neuron.* 2010. V. 67. P. 100–115.
11. Kinoshita A., Noda M., Kinoshita M. // *J. Comp. Neurol.* 2000. V. 428. № 2. P. 223–239.
12. Tokhtaeva E., Capri J., Marcus E.A., Whitelegge J.P., Khuzakhmetova V., Bukharaeva E., Deiss-Yehiely N., Dada L.A., Sachs G., Fernandez-Salas E., et al. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 9. P. 5280–5297.
13. Beites C.L., Campbell K.A., Trimble W.S. // *Biochem. J.* 2005. V. 385. Pt 2. P. 347–353.
14. Ito H., Atsuzawa K., Morishita R., Usuda N., Sudo K., Iwamoto I., Mizutani K., Katoh-Semba R., Nozawa Y., Asano T., Nagata K. // *J. Neurochem.* 2009. V. 108. № 4. P. 867–880.
15. Khuzakhmetova V., Nurullin L., Bukharaeva E. // *Bio-NanoSci.* 2016. V. 6. P. 249–251.
16. Maimaitiyiming M., Kobayashi Y., Kumanogoh H., Nakamura S., Morita M., Maekawa S. // *Neurosci. Lett.* 2013. V. 534. P. 322–326.
17. Zhang J., Kong C., Xie H., McPherson P.S., Grinstein S., Trimble W.S. // *Curr. Biol.* 1999. V. 9. P. 1458–1467.
18. Krauss M., Haucke V. // *Rev. Physiol. Biochem. Pharmacol.* 2011. V. 161. P. 45–66.
19. Hu Q., Nelson W.J., Spiliotis E.T. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. № 43. P. 29563–29571.
20. del Castillo J., Katz B. // *J. Physiol.* 1954. V. 124. P. 560–573.
21. McLachlan E.M., Martin A.R. // *J. Physiol.* 1981. V. 311. P. 307–324.
22. Betz W.J., Bewick G.S., Ridge R.M. // *Neuron.* 1992. V. 9. № 5. P. 805–813.
23. Зефирова А.Л., Григорьев П.Н., Петров А.М., Минлебаев М.Г., Ситдикова Г.Ф. // *Цитология.* 2003. Т. 45. № 12. С. 34–41.
24. Zefirov A.L., Abdrakhmanov M.M., Mukhamedyarov M.A., Grigoryev P.N. // *Neuroscience.* 2006. V. 143. № 4. P. 905–910.
25. Ruiz R., Cano R., Casanas J.J., Gaffield M.A., Betz W.J., Tabares L. // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. № 6. P. 2000–2008.
26. Zefirov A.L. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 1985. V. 98. № 5. P. 1462–1465.
27. Зефирова А.Л., Захаров А.В., Мухаметзянов Р.Д., Петров А.М., Ситдикова Г.Ф. // *Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова.* 2008. Т. 94. № 2. С. 129–141.
28. Grigoryev P.N., Zefirov A.L. // *Acta Naturae.* 2015. V. 7. № 3. P. 81–88.
29. Bridges A.A., Zhang H., Mehta S.B., Occhipinti P., Tani T., Gladfelter A.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 6. P. 2146–2151.
30. Vagin O., Tokhtaeva E., Garay P. E., Souda P., Bassilian S., Whitelegge J.P., Lewis R., Sachs G., Wheeler L., Aoki R., et al. // *J. Cell. Sci.* 2014. V. 127. P. 3294–3308.
31. Wasik A.A., Polianskyte-Prause Z., Dong M.Q., Shaw A.S., Yates J.R. 3rd, Farquhar M. G., Lehtonen S. // *Mol. Biol. Cell.* 2012. V. 23. P. 3370–3379.
32. Ghossoub R., Hu Q., Failler M., Rouyez M.C., Spitzbarth B., Mostowy S., Wolfrum U., Saunier S., Cossart P., Jamesnelson W., et al. // *J. Cell. Sci.* 2013. V. 126. P. 2583–2594.
33. Kim S.K., Shindo A., Park T.J., Oh E.C., Ghosh S., Gray R.S., Lewis R.A., Johnson C.A., Attie-Bittach T., Katsanis N., et al. // *Science.* 2010. V. 329. P. 1337–1340.
34. Mostowy S., Danckaert A., Tham T.N., Machu C., Guadagnini S., Pizarro-Cerdá J., Cossart P. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 11613–11621.
35. Ihara M., Yamasaki N., Hagiwara A., Tanigaki A., Kitano A., Hikawa R., Tomimoto H., Noda M., Takashi M., Mori H., et al. // *Neuron.* 2007. V. 53. № 4. P. 519–533.
36. Tsang C.W., Fedchyshyn M., Harrison J., Xie H., Xue J., Robinson P.J., Wang L.Y., Trimble W.S. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. № 23. P. 7012–7029.
37. Xue J., Tsang C.W., Gai W.P., Malladi C.S., Trimble W.S., Rostas J.A., Robinson P.J. // *J. Neurochem.* 2004. V. 91. № 3. P. 579–590.
38. Kinoshita M., Field C.M., Coughlin M.L., Straight A.F., Mitchison T.J. // *Dev. Cell.* 2002. V. 3. № 6. P. 791–802.
39. Joo E., Surka M.C., Trimble W.S. // *Dev. Cell.* 2007. V. 13. № 5. P. 677–690.
40. Miki T., Malagon G., Pulido C., Llano I., Neher E., Marty A. // *Neuron.* 2016. V. 91. № 4. P. 808–823.
41. Grigoryev P.N., Zefirov A.L. // *Dokl. Biol. Sci.* 2016. V. 470. № 1. P. 217–219.
42. Hayashida M., Tanifuji S., Ma H., Murakami N., Mochida S. // *J. Neurosci.* 2015. V. 35. № 23. P. 8901–8913.

УДК 571.27; 57.016.4

Роль рекомбинантного циклофилина А человека в развитии противоопухолевого иммунного ответа

А. А. Калинина¹, Ю. Ю. Силаева², Д. Б. Казанский¹, Л. М. Хромых^{1*}¹«Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения России, 115478, Москва, Каширское ш., 24²Институт биологии гена РАН, 119334, Москва, ул. Вавилова, 34/5

*E-mail: lkhromykh@list.ru

Поступила в редакцию 13.02.2019

Принята к печати 13.05.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-63-67

РЕФЕРАТ Циклофилин А (ЦфА) – многофункциональный белок, обладающий изомеразной активностью и существующий во внутриклеточной и секретируемой формах. Секретируемый ЦфА способствует регенерации кроветворной и иммунной систем организма, усиливая миграцию стволовых клеток из костного мозга. В настоящее время разрабатываются стратегии применения ЦфА при ишемии конечностей, для устранения побочных эффектов циклоспорина А (ЦсА) и др. Однако роль ЦфА в развитии противоопухолевого иммунного ответа не изучена. Используя модельную систему отторжения лимфомы EL-4 мышами B10.D2(R101), нами показано, что рекомбинантный ЦфА человека стимулирует противоопухолевый иммунный ответ за счет раннего привлечения гранулоцитов в сайт локализации клеток-мишеней и ускоренного системного накопления эффекторных Т-киллерных клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА провоспалительный фактор, противоопухолевый иммунный ответ, трансгенные мыши, Т-клеточный рецептор, циклофилин А.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЦфА – циклофилин А; ЦсА – циклоспорин А; рЦфА – рекомбинантный циклофилин А человека; ТКР – Т-клеточный рецептор; МНС – главный комплекс гистосовместимости; PBS – фосфатно-солевой буфер; i.p. – внутрибрюшинное введение; АПК – антигенпредставляющие клетки; CD – кластер дифференцировки.

ВВЕДЕНИЕ

Циклофилин А (ЦфА) – белок семейства пептидил-пролилизомераз, существующий во внутриклеточной и секретируемой формах. Цитозольный ЦфА присутствует во всех тканях и выполняет множество функций [1]. ЦфА участвует в проведении сигнала через Т-клеточный рецептор [1] и служит лигандом для циклоспорина А, за счет чего и реализуется иммуносупрессорное действие последнего [1].

Секретируемый ЦфА является провоспалительным фактором, он привлекает клетки врожденного иммунитета (гранулоциты, макрофаги, дендритные клетки) в очаг воспаления и участвует в патогенезе различных заболеваний [1]. Будучи хемоаттрактантом стволовых клеток, а также незрелых гранулоцитов, предшественников дендритных клеток, Т- и В-лимфоцитов, и индуцируя их миграцию из костного мозга на периферию, секретируемый

ЦфА осуществляет регенеративные функции [2]. ЦфА способен регулировать действие других хемокинов и продукцию провоспалительных цитокинов [3]. ЦфА индуцирует дифференцировку и созревание дендритных клеток, а также захват и представление антигена этими клетками [4]. Таким образом, ЦфА может быть фактором модуляции как врожденного, так и адаптивного иммунитета. Накапливающиеся экспериментальные данные указывают на потенциальную возможность применения данного белка при таких заболеваниях, как ишемия конечностей, устранение побочных эффектов, вызванных действием циклоспорина А, вирусных заболеваний и др.

Однако роль ЦфА в индукции и развитии противоопухолевого иммунного ответа остается малоизученной. Цель нашей работы состояла в оценке вклада ЦфА как фактора иммунитета, участвующего в начальных этапах развития противоопухолевого

иммунного ответа. Определено влияние рекомбинантного ЦфА человека (рчЦфА) на отторжение лимфомы EL-4 мышами B10.D2(R101). Выявлено иммуномодулирующее действие рчЦфА, направленное на стимуляцию врожденного и адаптивного звеньев иммунитета и, как следствие, на ускоренную элиминацию опухолевых клеток. Кроме того, в модели формирования противоопухолевого иммунного ответа у мышей трансгенной линии 1D1b [5] на клетки лимфомы EL-4 показана роль рчЦфА в стимуляции накопления опухолевых специфических цитотоксических Т-лимфоцитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Мыши

Мышей линий C57BL/6 ($K^bI-A^bD^b$) и B10.D2(R101) ($K^dI-A^dI-E^dD^b$) получали из экспериментально-биологической лаборатории НИИ ЭДИТО НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России. Трансгенные мыши линии 1D1b, в Т-лимфоцитах которых экспрессируются β -цепи Т-клеточного рецептора (ТКР) клеток памяти, специфичного к молекуле главного комплекса гистосовместимости (МНС) класса I H-2K^b, выведены на генетической основе линии B10.D2(R101) в лаборатории механизмов регуляции иммунитета НИИ канцерогенеза НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина [5]. В исследованиях использовали самцов и самок массой 16–18 г. Экспериментальные группы включали 6–8 животных. Работу с животными проводили в соответствии с протоколом этической комиссии НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России.

Получение рчЦфА

Белок выделяли из биомассы клеток *Escherichia coli* BL21(DE3)Gold, трансформированных рекомбинантной плазмидой рЕТСУРopti, содержащей полноразмерный ген ЦфА человека [6]. рчЦфА использовали в виде раствора в натрий-калий фосфатно-солевом буфере (PBS, pH 7.3) с чистотой более 95% по данным электрофореза. По результатам LAL-теста содержание эндотоксина в образцах рчЦфА не превышало 0.038 нг/мг белка.

Иммунизация животных

Мышей линии B10.D2(R101) и 1D1b иммунизировали внутрибрюшинно (i.p.) клетками лимфомы EL-4 (K^bD^b) в количестве 3.0×10^5 и 1.0×10^6 клеток/мышь соответственно в 500 мкл PBS.

Схемы введения рчЦфА

Мышам линии B10.D2(R101) вводили белок i.p. в дозе 5 мг/кг (100 мкг/мышь) в течение 3 дней после им-

мунизации лимфомой EL-4. Первую инъекцию белка проводили через 3 ч после имплантации клеток EL-4. Мышам линии 1D1b вводили 10 мг/кг рчЦфА подкожно в течение 10 дней после иммунизации. Контрольным животным вводили PBS в качестве плацебо.

Подготовка суспензий клеток

Через 6, 9 и 12 дней после иммунизации мышей линии B10.D2(R101) умерщвляли путем цервикальной дислокации. Для получения лаважа проводили смыв брюшной полости 2 мл PBS при помощи шприца. Для получения суспензии спленоцитов извлекали селезенку и гомогенизировали в 3 мл PBS в гомогенизаторе Поттера. Трансгенных мышей 1D1b умерщвляли на 12 день после иммунизации и подготавливали суспензию спленоцитов аналогичным образом. Лизис эритроцитов проводили в лизирующем буфере (BD, США), затем отмывали клетки в PBS и осаждали центрифугированием (200 g, 5 мин). Жизнеспособные клетки подсчитывали в камере Горяева в присутствии трипанового синего и эозина.

Антитела

В работе использовали моноклональные антитела: анти-CD3 ϵ – eFluor450 (клон 17A2) (eBioscience, США); анти-CD8 – Pacific blue (клон 53-6.7) (BD Pharmingen, США); анти-CD44 – APC (клон IM7) (eBioscience, США); анти-CD62L-APC – Cy7 (клон MEL-14) (eBioscience, США); анти-Vb6 – PE (клон RR4-7) (eBioscience, США); анти-Gr1 – APC (клон RB6-8C5) (BD Pharmingen, США); анти-CD11b-PE – Cy7 (клон M1/70) (BD Pharmingen, США).

Цитофлуориметрический анализ

Пробы клеток лаважа и селезенки ($1.0\text{--}5.0 \times 10^6$) обрабатывали антителами Fc block (клон 2.4G2, BD Pharmingen, США) в течение 5 мин при 4°C и инкубировали с моноклональными антителами нужной специфичности в течение 40 мин при 4°C. Клетки отмывали PBS путем центрифугирования (200 g, 5 мин) и анализировали на проточном цитофлуориметре FACS CantoII (BD, США) с использованием программы FACSDiva 6.0. Мертвые клетки исключали из анализа по окрашиванию йодидом пропидия (BD, США). Для характеристики популяций анализировали $0.5\text{--}1.0 \times 10^6$ событий. Обработку результатов проводили в программе FlowJo 7.6. (BD, США).

Статистическая обработка данных

Статистическую обработку данных проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента в программе Exel (Microsoft, США). Различия признавали значимыми при $p \leq 0.05$.

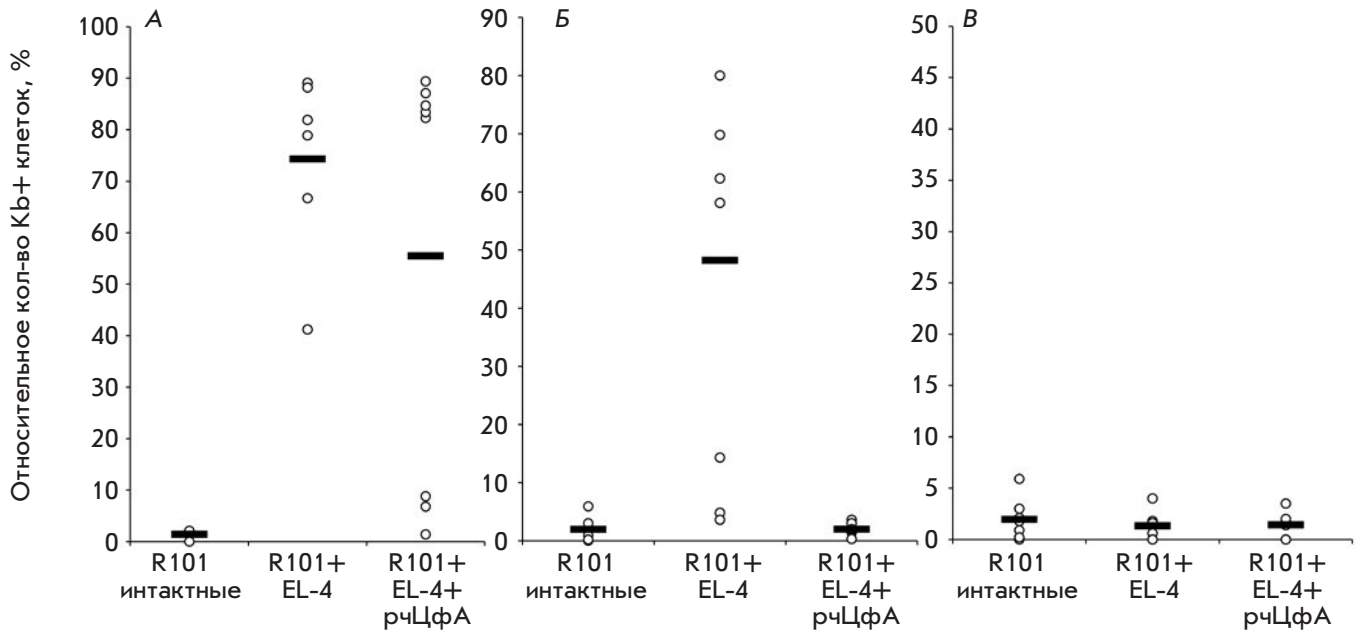


Рис. 1. Относительное количество клеток лимфомы EL-4 (K^{b+}, %) в брюшной полости мышей линии B10.D2(R101) на 6 (A), 9 (Б) и 12 (B) день после иммунизации. Представлены результаты 3 репрезентативных экспериментов (M ± SD, n = 6 – 8). Относительное количество K^{b+} клеток в лаваже intactных мышей отображает уровень неспецифического связывания моноклональных анти-K^b-антител

РЕЗУЛЬТАТЫ

В исследовании использовали аллогенную систему, в которой отторжение клеток лимфомы EL-4 (K^bD^b) в организме мышей линии B10.D2(R101) (K^dI-A^dI-E^dD^b) происходило в силу различий по одной молекуле МНС класса I – H-2K^b. Показано, что введение рЧЦФА приводит к полной элиминации EL-4 на 9 день после трансплантации опухолевых клеток, тогда как в норме отторжение лимфомы наблюдается к 12 дню (рис. 1).

Развитие иммунного ответа на лимфому EL-4 сопровождалось привлечением гранулоцитов в сайт локализации клеток-мишеней. К 6 дню после иммунизации рЧЦФА индуцировал интенсивное накопление зрелых нейтрофилов в брюшной полости иммунизированных мышей, увеличивая относительное количество данных клеток в 3 раза по сравнению с контрольными иммунизированными животными (рис. 2A). К 9 дню после иммунизации под действием рЧЦФА происходило увеличение незрелых гранулоцитов, а также промиелоцитов и миелоцитов в 2.5 и 4.5 раза соответственно по сравнению с контрольными иммунизированными животными (рис. 2B).

На следующем этапе проведена оценка влияния рЧЦФА на количественные и субпопуляционные изменения CD8⁺ Т-лимфоцитов у мышей-опухоленосителей. Нам не удалось обнаружить влияния рЧЦФА

на динамику накопления CD8⁺ Т-лимфоцитов в локальном очаге опухоли (при оценке лаважа) или на системном уровне (при оценке спленоцитов, данные не приведены). Однако анализ субпопуляций наивных клеток (CD62L⁺CD44⁻), центральных клеток памяти (CD62L⁺CD44⁺) и эффекторных клеток (CD62L⁻CD44⁺) в пуле CD8⁺ Т-лимфоцитов селезенки показал, что под влиянием рЧЦФА значительно увеличивается (на 65% относительно контрольных животных) количество эффекторных цитотоксических Т-клеток на 9 день после введения опухоли (данные не представлены, рис. 3), что коррелирует с динамикой элиминации клеток лимфомы (рис. 1).

Таким образом, показано, что рЧЦФА при внутрибрюшинном введении стимулирует противоопухолевый иммунный ответ за счет раннего привлечения гранулоцитов в сайт локализации клеток-мишеней и ускоренного накопления эффекторных Т-киллерных клеток на системном уровне.

Ранее в нашей лаборатории было показано, что у трансгенных мышей линии 1D1b в ходе иммунного ответа на клетки EL-4 формируется значительно меньший пул эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов по сравнению с мышами дикого типа, вследствие чего они не способны отторгать данную опухоль [5, 7].

В настоящей работе у мышей 1D1b оценено влияние рЧЦФА на относительное количество эффектор-

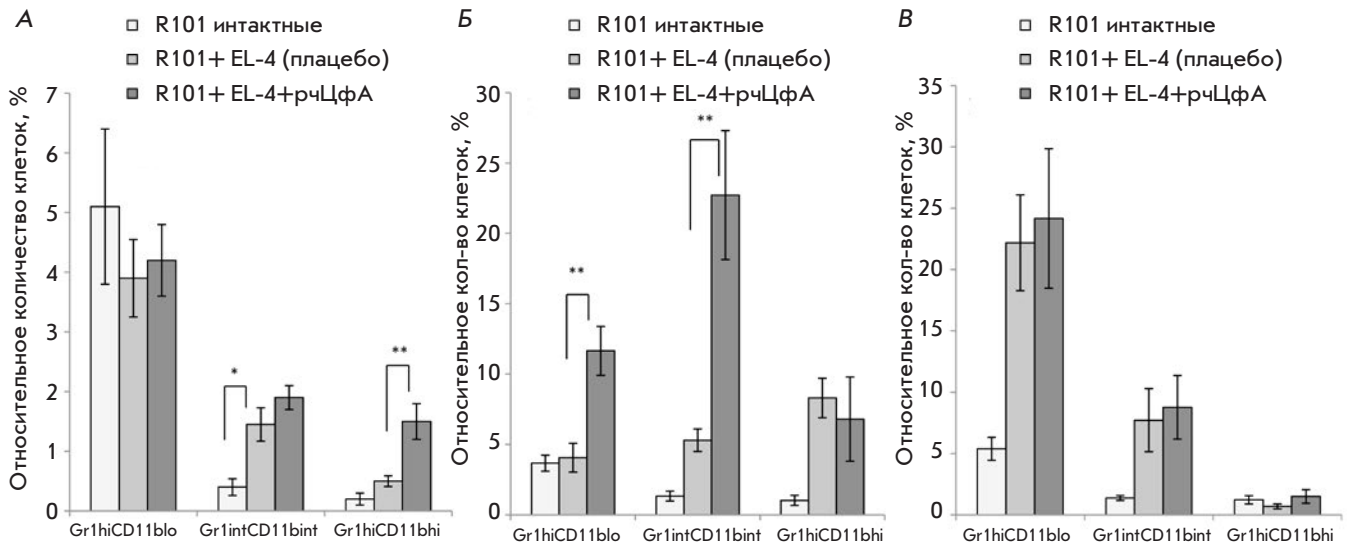


Рис. 2. Динамика изменения относительного количества незрелых нейтрофилов (Gr1hi CD11blo), промиелоцитов и миелоцитов (Gr1int CD11bint), зрелых гранулоцитов (Gr1hi CD11bhi) в брюшной полости мышей линии B10.D2(R101) на 6 (A), 9 (B) и 12 (B) день после иммунизации клетками лимфомы EL-4. Представлены данные 3 репрезентативных экспериментов ($M \pm SD$, $n = 6 - 8$). * $p \leq 0.05$; ** $p \leq 0.01$

ных Т-лимфоцитов, несущих на своей поверхности эндогенные или трансгенную β -цепь ТКР, которую идентифицировали с помощью коммерческих антител к V β 6.

Показали, что рЧЦФА не влиял на относительное количество эффекторных Т-лимфоцитов, экспрессирующих эндогенные β -цепи ТКР, у мышей 1D1b, иммунизированных лимфомой EL-4 (рис. 4), но способствовал значительному (в 2 раза относительно контрольных животных) увеличению пула эффекторных Т-лимфоцитов, несущих трансгенную β -цепь ТКР (рис. 4).

Полученные данные позволяют предполагать, что рЧЦФА способен модулировать противоопухолевый иммунный ответ как у мышей с нормальным репертуаром Т-лимфоцитов (B10.D2(R101)), так и в условиях ограниченного репертуара ТКР Т-лимфоцитов у трансгенных мышей линии 1D1b путем увеличения пула эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов.

ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы изучали роль рЧЦФА в развитии противоопухолевого иммунного ответа на лимфому EL-4 у мышей линии B10.D2(R101) и показали, что этот белок стимулирует накопление гранулоцитов в сайте локализации опухолевых клеток и системное увеличение пула эффекторных цитотоксических Т-лимфоцитов, приводящее к ускоренной элиминации клеток опухоли. Известно, что инфильтрация тканей нейтрофилами является первой фазой иммунного ответа при инфицировании или воспалении. Эти клетки способны захватывать антиген и мигрировать в дренирующие лимфоузлы и селезенку, где они взаимодействуют с антигенпредставляющи-

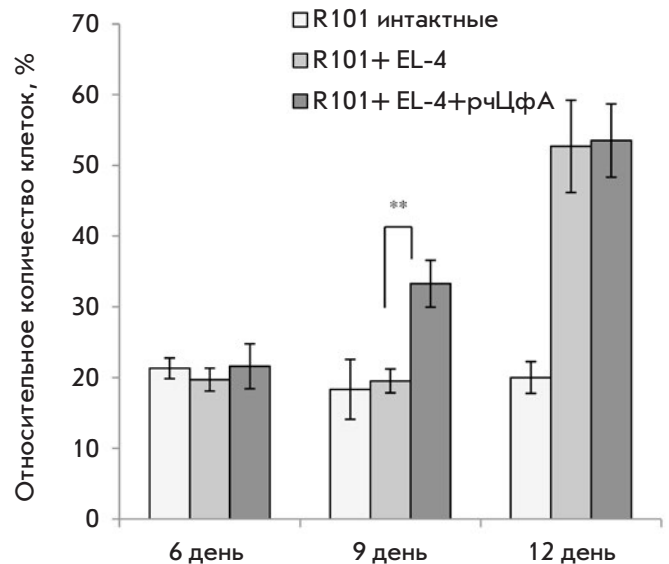


Рис. 3. Динамика накопления эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов (CD62L-CD44⁺) в селезенке мышей линии B10.D2(R101) после иммунизации клетками EL-4. Представлены результаты 3 репрезентативных экспериментов ($M \pm SD$, $n = 6 - 8$). ** $p \leq 0.01$

мигрантами. Эти клетки способны захватывать антиген и мигрировать в дренирующие лимфоузлы и селезенку, где они взаимодействуют с антигенпредставляющи-

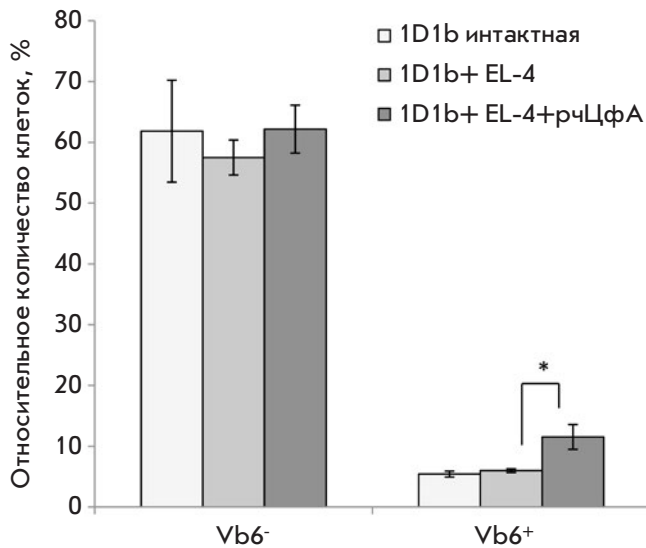


Рис. 4. Относительное количество (%) эффекторных CD8⁺ Т-лимфоцитов (CD62L⁻CD4⁺) с эндогенными β-цепями ТКР (Vb6⁻) или трансгенной β-цепью (Vb6⁺) ТКР в селезенке мышей трансгенной линии 1D1b на 12 день после иммунизации. Представлены результаты 3 репрезентативных экспериментов (M ± SD, n = 7). *p ≤ 0.05

ми клетками (АПК) и лимфоцитами [8] или сами выступают в роли АПК [9], участвуя в формировании адаптивного иммунного ответа. Ранее мы показали, что нейтрофилы участвуют в развитии иммунного ответа на клетки аллогенной опухоли [10]. Роль дан-

ных клеток может заключаться в обеспечении костимуляторных сигналов (CD80 и CD86) и цитокинового окружения (интерлейкин 12), необходимых для дифференцировки цитотоксических Т-лимфоцитов [10, 11]. Показано, что процессы, происходящие в брюшной полости при внутрибрюшинном введении рчЦфА, коррелируют с иммунным ответом на уровне организма.

У мышей 1D1b экспрессия трансгенной β-цепи ТКР приводит не только к сокращению репертуара ТКР, но и снижает количество активированных Т-лимфоцитов [5]. Иммунный ответ мышей 1D1b на лимфому EL-4 недостаточен для полного отторжения опухоли, он приводит к иммуноредактированию лимфомы посредством селекции наименее иммуногенных клонов, которые через 60 дней убивают животных [7]. В данной экспериментальной системе установлено, что под действием рчЦфА происходит статистически значимое увеличение пула специфических цитотоксических Т-лимфоцитов на начальных этапах иммунного ответа на лимфому EL-4. Полученные данные позволяют предполагать, что рчЦфА способен модулировать противоопухолевый иммунный ответ как у мышей с нормальным репертуаром Т-лимфоцитов, так и в условиях ограниченного репертуара Т-клеток путем увеличения пула эффекторных Т-киллеров.

Таким образом, нами показано, что рчЦфА обладает иммуностимулирующим действием, способствуя ускоренному развитию противоопухолевого иммунного ответа за счет стимуляции врожденного и адаптивного звеньев иммунитета. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nigro P, Pompilio G., Capogrossi M.C. // Cell Death Disease. 2013. V. 4. P. e888. doi: 10.1038/cddis.2013.410.
- Khromykh L.M., Kulikova N.L., Anfalova T.V., Muranova T.A., Abramov V.M., Vasiliev A.M., Khlebnikov V.S., Kazansky D.B. // Cell Immunol. 2007. V. 249. № 1. P. 46–53.
- Dawar F.U., Xiong Y., Khattak M.N.K., Li J., Lin L., Mei J. // J. Leukoc. Biol. 2017. V. 102. № 4. P. 989–992.
- Bharadwaj U., Zhang R., Yang H., Doan D., Li M., Chen C., Yao Q. // J. Surgical Res. 2004. V. 121. № 2. P. 294.
- Силаева Ю.Ю., Калинина А.А., Вагида М.С., Хромых Л.М., Дейкин А.В., Ермолкевич Т.Г., Садчикова Е.Р., Гольдман И.Л., Казанский Д.Б. // Биохимия. 2013. Т. 78. № 5. P. 614–626.
- Хромых Л.М., Калинина А.А., Козырь А.В., Колесников А.В., Силаева Ю.Ю., Казанский Д.Б. Патент № 2603283. Российская Федерация. 2015.
- Silaeva Yu.Yu., Grinenko T.S., Vagida M.S., Kalinina A.A., Khromykh L.M., Kazansky D.B. // J. Immunotoxicol. 2014. V. 1. № 4. P. 393–399.
- Mantovani A., Cassatella M.A., Costantini C., Jaillon S. // Nat. Rev. Immunol. 2011. V. 11. № 8. P. 519–523.
- Takashima A., Yao Y. // J. Leukoc. Biol. 2015. V. 98. № 4. P. 489–496.
- Марюхнич Е.В., Звездова Е.С., Анфалова Т.В., Хромых Л.М., Казанский Д.Б. // Докл. Акад. наук. 2007. Т. 414. № 1. P. 126–129.
- Побезинский Л.А., Побезинская Е.Л., Звездова Е.С., Петрицев В.Н., Гриненко Т.С., Батурина И.А., Анфалова Т.В., Хромых Л.М., Васильева Т.В., Казанский Д.Б. // Докл. Акад. наук. 2005. Т. 402. № 3. P. 421–426.

УДК 612.017.1:616-008

Дифференциальный анти-ВИЧ-эффект нового препарата на основе гуминовых веществ в различных клетках-мишенях иммунной системы

Г. В. Корнилаева¹, А. Э. Синявин^{1,2*}, А. Schultz³, А. Germann³, С. Moog⁴, Н. von Briesen³, А. С. Тургиев^{1,5}, Э. В. Карамов¹

¹ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Минздрава России, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18

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

³Fraunhofer Institut fuer Biomedizinische Technik (IBMT), Joseph-von-Fraunhofer-Weg 1, 66280 Sulzbach, Germany

⁴INSERM U1109, Fédération Hospitalo-Universitaire (FHU) OMICARE, Fédération de Médecine Translationnelle de Strasbourg (FMTS), Université de Strasbourg, 4 Rue Blaise Pascal, Strasbourg 67000, France

⁵ООО «Иммуномика», 107078, Москва, ул. Новая Басманная 12, стр. 2, офис 103

*E-mail: andreysi93@yandex.ru

Поступила в редакцию 03.03.2019

Принята к печати 15.04.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-68-76

РЕФЕРАТ Исследована эффективность ингибирования ВИЧ-инфекции в индивидуальных пулах иммунных клеток – CD4⁺ Т-лимфоцитах, макрофагах, дендритных клетках – новым препаратом на основе гуминовых веществ. При воздействии нетоксичных концентраций препарата в каждой из этих популяций достигается почти полное (более 90%) ингибирование инфекции. Обнаруженный эффект показывает возможность защиты существенной части функционально значимых для иммунной системы клеток от истощения. Сравнительное изучение подавления инфекции в индивидуальных пулах позволило выявить различия в эффективности препарата в каждой из клеточных популяций. Наиболее чувствительной оказалась инфекция в макрофагах, зараженных вариантом R5 ВИЧ-1: 90 и 50% ингибирование инфекции наблюдалось в присутствии достаточно низких (1.4 и 0.35 мкг/мл) концентраций препарата. Для достижения такого же уровня ингибирования инфекции в дендритных клетках, зараженных тем же штаммом, требовались в 15–19 раз более высокие концентрации препарата. Эффективность препарата в CD4⁺ Т-лимфоцитах была достаточно близка к его эффективности в макрофагах. Препарат оказался универсально эффективным как в отношении Т-, так и М-тропных вариантов ВИЧ-1.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА гуминовые вещества, дендритные клетки, макрофаги, подавление ВИЧ-инфекции, CD4⁺ Т-лимфоциты, Т- и М-тропные варианты ВИЧ-1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; СБФГ – солибилизованная бутанольная фракция гуминовых веществ; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ЯМР – ядерный магнитный резонанс; Мф – макрофаги; ДК – дендритные клетки; МПК – мононуклеары периферической крови; AZT – азидотимидин; ЦТЛ – цитотоксические Т-лимфоциты.

ВВЕДЕНИЕ

Клетки врожденного иммунитета, такие, как моноциты, макрофаги и дендритные клетки, представляют собой первую линию защиты от патогенов [1–5], и они же являются клетками-мишенями для ВИЧ. Вирусной атаке подвергаются клетки, экспрессиру-

ющие мембранные молекулы CD4, CCR5 и CXCR4, находящиеся, в зависимости от пути проникновения инфекции, в слизистых оболочках, в крови или лимфоидных тканях. Эффективность инфицирования зависит как от уровня экспрессии поверхностных клеточных рецепторов, так и от штамма вируса [6,

7]. На высоком уровне вирус продуцируется главным образом в активированных во время острой инфекции CD4⁺ Т-лимфоцитах [8]. Но и в покоящихся CD4⁺ клетках памяти обнаруживается и репликация вируса, и провирусная ДНК в латентно интегрированном или преинтегрированном состоянии [9]. Клетки с интегрированным вирусным геномом представляют часть существующего длительное время резервуара инфекции в организме, где могут сохраняться до 4 лет [9]. Полагают, что покоящиеся CD4⁺ клетки памяти подвергаются инфицированию в первую очередь и преимущественно R5-фенотипом вируса [10–12], что может быть связано с экспрессией интегрин LFA-1 [13]. Повышенная способность варианта R5 вируса к репликации может также объяснить их преобладание во время острой или первичной инфекции [14].

В патогенетическом процессе ВИЧ-инфекции участвуют также антигенпрезентирующие клетки – макрофаги и дендритные клетки [15–18], обладающие ВИЧ-специфичными рецепторами, способные активно циркулировать в крови и проникать в различные лимфоидные и нелимфоидные ткани. Дендритные клетки – классические антигенпрезентирующие клетки с экстраординарной способностью распознавать и процессировать антиген [19]. Незрелые дендритные клетки обладают повышенной способностью к фагоцитозу, тогда как у зрелых клеток увеличена способность продуцировать цитокины. При созревании в дендритных клетках экспрессия рецепторов CCR5 уменьшается, а CXCR4 увеличивается, что может привести к инфицированию вирусами с обоими фенотипами [18]. Известно также, что клетки Лангерганса (дендритные клетки кожи) способны захватывать вирус с помощью лектина С-типа – лангерина, без продукции вируса. При созревании дендритных клеток продукция вируса в них снижается в 10–100 раз по сравнению с продукцией в незрелых клетках [17, 20]. Большинство исследователей считают, что дендритные клетки не являются активными продуцентами вируса, но благодаря высокой способности к миграции их основная роль заключается в доставке вируса от сайтов проникновения к CD4⁺ Т-клеткам в лимфоидных тканях, что способствует быстрой диссеминации вируса в организме. Макрофаги также проявляют чувствительность к ВИЧ-инфекции [21, 22]. R5-вирусы, обладающие тропизмом к макрофагам, так же хорошо реплицируются в макрофагах периферической крови, как и в CD4⁺ лимфоцитах [23]. Способность продуцировать вирус у макрофагов также различается. Часто при инфицировании макрофагов наблюдается низкая интенсивность продукции вируса, который обнаруживается в секвестрированной форме

во внутриклеточных вакуолях. Причина ограничения вирусной репликации может быть обусловлена внутриклеточными механизмами неспецифической защиты. Обычно R5-вирусы не проявляют цитопатогенных свойств, но некоторые изоляты, особенно обнаруживаемые на поздних стадиях заболевания, размножаются в макрофагах до высоких титров и могут проявлять цитопатический эффект [24, 25]. Инфицированные макрофаги погибают преимущественно путем некроза. Весьма важно, что эти клетки, участвующие в патогенетическом процессе, могут служить резервуаром для вируса, недоступного в виду отсутствия активной вирусной репродукции и синтеза вирусспецифических белков ни для антиретровирусной терапии, ни для распознавания цитотоксическими лимфоцитами иммунной системы.

В целом, опубликованные данные свидетельствуют о том, что перmissивность иммунных клеток по отношению к ВИЧ во многом зависит от стадии созревания/дифференцировки и функциональной поляризации. При этом может меняться и продукция цитокинов, и рецепторный репертуар. Индуцированное инфекцией истощение пула чувствительных к вирусу иммунных клеток приводит в конечном итоге к негативному влиянию на формирование дальнейшего иммунного ответа.

Современный подход к оценке антивирусной активности каждого нового препарата непременно включает исследования на основных клетках-мишенях, участниках патогенеза ВИЧ-инфекции, таких, как мононуклеары периферической крови, макрофаги, дендритные клетки. Это позволяет получить информацию об эффективности исследуемого вещества в каждой популяции клеток и иметь представление о его возможности влиять на течение патогенетического процесса, и, в конечном итоге, оптимизировать анти-ВИЧ-терапию.

В настоящей работе исследована анти-ВИЧ-активность нового препарата, представляющего собой солюбилизованную бутанольную фракцию гуминовых веществ (СБФГ). Согласно масс-спектрометрическим данным и элементному анализу, содержание углерода и кислорода (% по массе) в данной фракции составляет порядка 52.7 и 37.1% соответственно при невысоком содержании азота и серы (4.3 и 2.1% соответственно) [26, 27]. Следует отметить, что элементный анализ гуминовых веществ, полученных из одного источника и с использованием одних и тех же методов выделения и фракционирования, дает воспроизводимые значения. Данные ВЭЖХ показывают, что препарат характеризуется достаточно высоким содержанием гидрофобных ароматических фрагментов (74%), что также подтверждено с помощью ¹³C-ЯМР. Атомное отношение Н/С

составляет 0,8, О/С – 0,53 [28–30]. Известно, что гуминовые вещества образуются в результате распада отмерших организмов и составляют один из самых обширных резервуаров органического углерода. Препараты на основе гуминовых веществ, разработанные и изученные ранее, такие, как, например Олипифат, характеризуются как экологически чистые и безопасные продукты, обладающие многими полезными свойствами. Они стимулируют гемопоэз, проявляют ранозаживляющую, иммуномодулирующую, антиоксидантную, а также противоопухолевую, антибактериальную, противогрибковую и противовирусную активность [31–33].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение препарата

В качестве исходного сырья для получения гуминовых веществ использовали лигнинсодержащие материалы (твердые остатки переработки растительного сырья). Материалы подвергали окислительному щелочному гидролизу с последующим отделением жидкой фазы, ее подкислением, отделением полученного осадка, его промывкой и сушкой. Полученный полупродукт подвергали экстракции этилацетатом. Далее проводили экстракцию полученного осадка *n*-бутанолом. Для выделения и солюбилизации биологически активных фракций, обладающих противовирусной активностью, сухой остаток после испарения бутанола очищали многократным переосаждением из щелочного раствора добавлением концентрированной соляной кислоты. Стандартизацию фракций осуществляли по характерным полосам поглощения в инфракрасной области (наличие специфических полос поглощения в интервале от 2 до 10 мкм) и молекулярно-массовому распределению (максимум в области 7000 Да). Выход целевого продукта – солюбилизированной бутанольной фракции гуминовых веществ (СБФГ) – составлял ~40%.

Физико-химические методы исследования СБФГ

Элементный состав. Образцы исследуемого соединения доводили до полного растворения при нагревании до 80–100°C в 2 мл азотной кислоты с добавлением нескольких капель пероксида водорода в течение 3 ч. Полученный раствор анализировали методом атомно-эмиссионной спектроскопии с индуктивно-связанной аргонной плазмой на приборе ICP-AES-9000 (Thermo Jarrell Ash, США).

ГХ-МС-анализ. Навеску СБФГ доводили до полного воздушно-сухого веса и обрабатывали 5 мл толуола в ультразвуковой бане. Экстракты отфильтровыва-

ли, сушили безводным сульфатом натрия и упаривали в токе азота. Часть проб подвергали метилированию. Аликвотную часть образца анализировали с помощью ГХ-МС на комплексе, включающем газовый хроматограф HP5890А, масс-спектрометр HP5988А и систему обработки данных HP59970С (Hewlett-Packard, США). Компоненты пробы идентифицировали с помощью компьютерного поиска и библиотеки масс-спектров Wiley.

ЯМР-спектроскопию выполняли с использованием прибора Bruker Avance 400 MHz NMR.

Клеточные линии

СЕМ-SS – перевиваемая иммортализованная линия, клонированная из Т4-лимфобластоидной клеточной линии человека путем адгезии с помощью поли-*L*-лизина, обладающая повышенной способностью к вирус-индуцированному синцитиеобразованию и фузогенной активностью, широко используется для изучения ВИЧ и его ингибиторов (NIH AIDS Reagent Program № 776, США). Клетки культивировали в питательной среде RPMI-1640 (Sigma, США), дополненной 10% фетальной сыворотки (Sigma, США), 2 mM *L*-глутамин (Sigma, США).

Мононуклеары периферической крови (МПК) выделяли из обработанной антикоагулянтом (EDTA) цельной крови серонегативного донора путем седиментационного разделения при центрифугировании в растворе фиколла (GE Healthcare Worldwide, США). Для заражения вирусом использовали стимулированные митогеном МПК, полученные путем 3–4-дневного культивирования с 5 мкг/мл фитогемагглютина (ФГА, Sigma, США). Зараженные клетки культивировали в среде RPMI-1640 с 10% фетальной сыворотки, 100 мкг/мл гентамицина и 50 ЕД/мл рекомбинантного интерлейкина-2 (IL-2, Sigma, США).

Макрофаги (Мф) человека получали путем адгезии моноцитов из пула МПК (концентрация $1-2 \times 10^6$ клеток/мл) после 2 ч инкубации при 37°C с последующей дифференцировкой клеток в течение 7–8 дней в присутствии 0,2 мкг/мл GM-CSF (Invitrogen, США) в ростовой среде указанного состава.

Дендритные клетки (ДК) получали путем культивирования моноцитов человека в течение 7 дней в присутствии 20 нг/мл интерлейкина-4 (IL-4, Sigma, США) (фракция моноцитов выделена из МПК с помощью MACS (magnetic cell separation system CD14⁺; Miltenyi Biotec., ФРГ)). Антигенпрезентирующая функция ДК и моноцитов протестирована путем оценки способности стимулировать аллогенную пролиферацию Т-клеток.

TZM-bl – перевиваемая клеточная линия, полученная из клеток HeLa генно-инженерным путем, экспрессирующая CD4, CXCR4, CCR5 и содержащая Tat-зависимый репортерный ген люциферазы под контролем длинных концевых повторов (LTR) ВИЧ-1 (NIH AIDS Reagent Program № 8129, США).

293T/17 – эпителиальные клетки почки человека, полученные из клеточной линии 293T. Линия 293T/17 характеризуется высокой способностью к трансфекции и используется для получения высоких титров инфекционных ретровирусов (ATCC® CRL-11268).

Вирусы. Клетки заражали следующими штаммами ВИЧ-1:

ВИЧ-1/BRU – референсный штамм с фенотипом X4, активно реплицирующийся в Т-лимфобластоидных клеточных линиях, чувствительный к действию AZT (азидотимидин).

ВИЧ-1/AR216 – выделенный от ВИЧ-инфицированного пациента клинический изолят X4-фенотипа, адаптированный к Т-клеточным линиям, обладающий высокой устойчивостью к AZT.

ВИЧ-1/Ba-L – М-тропный штамм R5-фенотипа.

ВИЧ-1/SF-162 – М-тропный штамм R5-фенотипа.

ВИЧ-1/QH0 – М-тропный штамм R5-фенотипа, выделенный от пациента в Тринидад и Тобаго.

Биологическую активность вирусных стоков оценивали с помощью титрования по TCID₅₀.

Получение env-псевдовирусов ВИЧ-1

Псевдовирусы получали по описанной ранее методике [34]. Клетки 293T/17 высевали в концентрации 2×10^6 на флакон Т-75 в 20 мл среды DMEM. После инкубации в течение 24 ч клетки трансфицировали 4 мкг плазмиды, экспрессирующей ген *env*, кодирующий белок оболочки соответствующего подтипа ВИЧ-1, и 8 мкг плазмиды pSG3ΔEnv без гена *env*, несущей недостающие гены для сборки псевдовируса ВИЧ-1. Для трансфекции использовали реагент Fugene 6 (Promega, США). После 4 ч инкубации среду для трансфекции заменяли свежей ростовой средой. Содержащие псевдовиром супернатанты собирали через 48 ч и хранили при -80°C . Все плазмиды получены из международного репозитория по программе NIH AIDS Reagent Program.

Антиретровирусный TZM-bl-анализ

Анализ нейтрализации env-псевдовирусов проводили с использованием клеток TZM-bl по методу Montefiori [35] – модифицированной версии Wei и соавт. [36]. Свежие трипсинизированные клетки засеивали в 96-луночные планшеты в концентра-

ции 1×10^4 клеток/луночка в 100 мкл среды DMEM с 5 мкг/мл DEAE-декстрана. К клеткам добавляли различные разведения исследуемого соединения и инкубировали в течение 45–90 мин при 37°C . Далее клетки инокулировали 150000 RLU (относительные люминесцентные единицы) соответствующего псевдовируса. После 48 ч инкубации клетки промывали средой и лизировали, а затем с помощью люминометра Victor X3 (Perkin Elmer) определяли количество люциферазы в сравнении с контролем. Значения 50% ингибирующей концентрации рассчитывали с помощью GraphPad Prism 6 с использованием функции log (ингибитор) в сравнении с нормированным ответом.

Оценка жизнеспособности клеток

Жизнеспособность клеток определяли с помощью МТТ-теста, суть которого заключается в измерении способности живых клеток превращать хорошо растворимый желтый бромид 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия (МТТ) в нерастворимые внутриклеточные кристаллы МТТ-формаза. Эффективность такого превращения отражает общий уровень дегидрогеназной активности клеток и в известных пределах прямо пропорциональна концентрации живых клеток [37]. Согласно принятым критериям высокотоксичными считаются вещества, ТД₅₀ которых составляет от 1 до 10 мкг/мл, токсичными – от 11 до 20 мкг/мл, от 21 до 50 мкг/мл умеренно токсичными, от 51 до 100 мкг/мл – слаботоксичными. Вещества с ТД₅₀ более 100 мкг/мл относят к категории нетоксичных.

Определение анти-ВИЧ-активности

При исследовании антивирусной активности клетки в течение 2 ч инкубировали при 37°C в 96-луночных планшетах (Corning, США) с СВФГ в различных концентрациях (10, 1, 0.1 и 0.01 мкг/мл) и затем заражали вирусом с множественностью инфекции 100 TCID₅₀ (Tissue Culture Infection Dose 50). После инкубации в течение 24 ч несвязавшийся вирус удаляли путем низкоскоростного центрифугирования планшета, а осадок клеток ресуспендировали в свежей ростовой среде. За развитием инфекции наблюдали в течение 5 сут, оценивая цитопатический эффект (цитоллиз, образование синцития). Уровень ингибирования инфекции оценивали методом иммуноферментного анализа (ИФА) на основе моноклональных антител к коровому антигену p24 ВИЧ-1. Основной высококонсервативный коровый антиген p24 является признанным маркером ВИЧ-инфекции. В работе мы использовали сертифицированные коммерческие тест-системы Bio-Rad (США) и «Вектор-Бест» (Россия).

Статистическая обработка результатов

Экспериментальные данные получены в трех независимых повторностях, результаты рассчитывали как среднее значение \pm стандартная ошибка среднего (SEM). Значимость различий между выборками оценивали с использованием теста Колмагорова–Смирнова, одностороннего теста ANOVA и поправки Бонферрони (Origin Pro 2016G, OriginLab Corporation) для экспериментов более чем с 2 подгруппами. Показатели полумаксимальной ингибирующей концентрации (ID_{50}) и 50% цитотоксической концентрации (TD_{50}) рассчитывали, исходя из кривых доза-эффект с помощью программ Origin Pro 2016G Softwear и Sigma Plot 12.5 Softwear. Различия считали статистически значимыми при рассчитанной величине $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Характеристика химического состава СБФГ

Исследования элементного состава СБФГ выполняли в двух параллельных повторах. Оказалось, что СБФГ – это полиэлементное вещество с повышенным содержанием Р и Na (6000 и 10 029 мкг/мл соответственно). Важно отметить практически полное отсутствие тяжелых металлов в исследуемом веществе.

По данным ГХ-МС-анализа в составе СБФГ наиболее представлены жирные и смоляные кислоты. Среди жирных кислот преобладают гексадекановая, октадеценная и докозановая кислоты (по 1.2 мкг/г). В меньшей степени в СБФГ содержатся октадекановая, эйкозановая и тетракозановая кислоты (по 0.4 мкг/г). Среди смоляных кислот в анализируемом образце обнаружены три компонента, относящиеся к ряду $C_{20}H_{30}O_2$ (1.6 мкг/г), из которых один компонент можно точно отнести к абиетиновой кислоте (0.6 мкг/г). Остальные являются изомерными структурами в пределах данной брутто-формулы. Две другие смоляные кислоты имеют брутто-формулу: $C_{20}H_{28}O_2$. Наиболее характерный пик на масс-хроматограмме соответствовал дегидролевопимаровой кислоте (18 мкг/г).

С помощью ЯМР-спектроскопии фрагментный состав СБФГ был сопоставлен с составом гуминовых кислот угля (табл. 1). Содержания карбонильных, карбоксильных и сложнэфирных фрагментов в СБФГ сходны с содержанием в гуминовых кислотах угля. Содержание фенольных групп в СБФГ немного выше (11% против 7–9%). Традиционными являются высокие показатели величины соотношений C_{COO-H}/C_{COO-R} и C_{Ar-OH}/C_{Ar-OR} , которые отображают степень гидролизованности структуры. Особенностью СБФГ является высокое содержание ароматических

Таблица 1. Фрагментный состав СБФГ

Фрагмент	Содержание С, %
$C_{C=O}$	3
C_{COO-H}	10
C_{COO-R}	2
C_{Ar-OH}	11
C_{Ar-OR}	7
C_{Ar-R}	21
C_{Ar-H}	27
$C_{O-Alk-O}$	0
C_{-CH-OH}	3
C_{-CH_2-OH}	6
C_{CH_3O}	15

фрагментов, при этом ароматическая часть структуры содержит большое количество незамещенных и О-замещенных фрагментов.

Изучение цитотоксических свойств СБФГ

Цитотоксические свойства СБФГ оценивали, культивируя клетки в присутствии различных концентраций этого вещества в течение 3–4 дней, с последующим определением жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста.

Исследование цитотоксичности в трех независимых экспериментах показало, что СБФГ является нетоксичным препаратом, причем как в отношении перевиваемой Т-клеточной линии СЕМ-SS, так и в отношении первичных клеток (МПК) (табл. 2).

ID_{50} – 50% ингибирующая доза, при которой инфекция подавляется на 50%; TD_{50} – цитотоксическая доза, при которой 50% клеток утрачивают жизнеспособность; индекс селективности, рассчитывается

Таблица 2. Антивирусная активность, цитотоксичность и индекс селективности СБФГ в перевиваемых и первичных CD4⁺ Т-клетках

Клетки	Штамм ВИЧ	Ингибирование репродукции ВИЧ, мкг/мл			Цитотоксичность, TD_{50} , мкг/мл	Индекс селективности
		ID_{90}	$ID_{50} \pm SEM$	R^2		
СЕМ-SS	HIV-1 _{BRU}	5.4	0.8 \pm 0.3	0.87	708	865
	HIV-1 _{AR216}	26.0	4.6 \pm 0.55	0.79		
МПК	HIV-1 _{BRU}	5.3	0.9 \pm 0.2	0.91	631	701
	HIV-1 _{AR216}	11.5	1.04 \pm 0.38	0.85		

Таблица 3. Ингибирование вирусной репликации в клетках TZM-bl, МПК, макрофагах и дендритных клетках, инфицированных штаммами ВИЧ-1/SF-162, ВИЧ-1/QH0 и ВИЧ-1/Ba-L

Клетки	Вирусы	Ингибирующая концентрация, мкг/мл			
		ИД ₉₀	ИД ₈₀	ИД ₅₀	R ^{2*}
МПК	ВИЧ-1/SF-162	5.8	3.0	0.9 ± 0.25	0.89
	ВИЧ-1/QH0	60.0	20.0	9.8 ± 2.9	0.72
Макрофаги	ВИЧ-1/Ba-L	1.4	0.9	0.35 ± 0.1	0.78
Дендритные клетки	ВИЧ-1/Ba-L	21.0	12.0	6.8 ± 1.3	0.76
TZM-bl	Псевдовирус SF-162	24.0	-	5.0 ± 0.7	0.85
	Псевдовирус QH0	60.0	-	5.0 ± 1.2	0.87

*R² приведен для значений ИД₅₀.

как отношение ТД₅₀ к ИД₅₀. Значения R² приведены для ИД₅₀. Представлены средние данные, вычисленные по результатам изучения цитотоксических свойств и антивирусной активности СБФГ в трех независимых экспериментах.

Исследование антивирусной активности СБФГ на перевиваемых и первичных CD4⁺ Т-клетках, зараженных чувствительным и устойчивым штаммами ВИЧ-1

Результаты определения ингибирования экспериментальной ВИЧ-инфекции свидетельствуют о том, что СБФГ способен эффективно подавлять инфекцию как AZT-чувствительного (HIV-1/BRU), так и AZT-резистентного штаммов вируса (HIV-1/AR216) и в перевиваемых, и в первичных клетках (табл. 2). При этом для 50% подавления инфекции AZT-чувствительного штамма и в перевиваемых, и в первичных клетках требуется практически одинаковая концентрация препарата – менее 1 мкг/мл.

Ингибирование инфекции AZT-резистентного штамма несколько отличается в разных клеточных культурах: эффективность СБФГ в большей степени проявляется в МПК, тогда как для снижения инфекции на 50% в клетках СЕМ-SS концентрация должна быть более высокой. Следует также отметить достаточно высокие значения индекса селективности (600–800), характеризующего перспективность исследуемого препарата, при использовании донорских лимфоцитов (МПК). Эта клеточная модель более предпочтительна, чем перевиваемые клеточные культуры. Ограниченное применение МПК в экспериментальных исследованиях обусловлено рядом причин, основными из которых являются отсутствие стандартизации и вероятность индивидуальной устойчивости к ВИЧ-инфекции (во избежание последней мы использовали для заражения смесь МПК от трех серонегативных доноров).

Изучение антивирусных свойств СБФГ в МПК, макрофагах и дендритных клетках

Дальнейшее исследование антивирусной активности СБФГ проводили на клетках МПК, макрофагах (Мф) и дендритных клетках, которые заражали М-тропными штаммами ВИЧ-1: ВИЧ-1/SF-162, ВИЧ-1/Ba-L и ВИЧ-1/QH0 (табл. 3).

Проведенные исследования позволили оценить эффективность СБФГ в пулах разных иммунных клеток и получить данные, свидетельствующие о различной (дифференциальной) эффективности препарата в этих клетках.

Наиболее чувствительной к действию СБФГ оказалась инфекция в макрофагах, зараженных вариантом R5 ВИЧ-1/Ba-L: 90 и 50% ингибирование инфекции наблюдается при достаточно низких концентрациях препарата (табл. 3), тогда как для достижения того же уровня ингибирования инфекции в дендритных клетках, зараженных тем же самым штаммом, требуются в 15–19 раз более высокие концентрации препарата. Как показали наши исследования, подавление инфекции на 90% в МПК, зараженных штаммом SF-162 (фенотип R5), резистентным к нейтрализации антителами, происходит в присутствии 6.0 мкг/мл СБФГ. Следует отметить, что почти такая же концентрация препарата требовалась для 90% ингибирования штаммов ВИЧ-1 фенотипа X4 (табл. 2). Это наблюдение подчеркивает универсальность СБФГ как анти-ВИЧ-агента в отношении вирусов обоих фенотипов (R5 и X4). Однако наши исследования показывают, что встречаются штаммы ВИЧ-1, проявляющие большую устойчивость к действию СБФГ. Так, для ингибирования штамма ВИЧ-1/QH0 требуется в 10 раз более высокая концентрация СБФГ в клетках МПК. Наиболее вероятным объяснением этого факта может быть наличие геномных различий у разных штаммов и предсуществующих мутаций, обусловленных естественным полиморфизмом ВИЧ-1.

Несмотря на разницу в концентрациях, во всех вирус-клеточных системах при воздействии СБФГ достигается 90% подавление инфекции, что означает защиту существенной части клеток-мишеней, подвергающихся вирусной атаке. Обнаруженные различия в уровне ингибирования инфекции в разных пулах иммунных клеток, не зависящие от фенотипа вируса, говорят, вероятно, о различиях в биодоступности препарата. Неодинаковое проникновение лекарственных препаратов в различные клетки (ткани) – давно известный факт. Следствием этого может быть концентрация препарата, недостаточная (субоптимальная) для ингибирования вируса. Неполное подавление репликации вируса приводит к возникновению условий, благоприятных для селективного отбора резистентных форм. Это необходимо учитывать в доклинических исследованиях новых препаратов и более детально изучать ингибиторы репликации вируса с использованием пулов индивидуальных иммунных клеток, участвующих в патогенезе ВИЧ.

Известно, что при ВИЧ-инфекции наблюдается прогрессирующее уменьшение субпопуляций иммунных клеток, что неизбежно приводит к снижению функций иммунитета, среди которых можно выделить наиболее существенные: антигенпрезентирующую, стимулирующую Т-клеточные пролиферативные реакции, регулирующую выработку антител В-клетками. При этом снижается также скорость обновления клеточных популяций. Механизмы гибели иммунных клеток во время острой и хронической инфекции полностью не установлены, но известно, что они, скорее всего, включают прямое инфицирование, апоптоз и действие ЦТЛ. Наши исследования показали возможность почти полного подавления ВИЧ-инфекции (более 90%) с помощью СБФГ, что означает возможность сохранения функциональности иммунной системы. Очень важным результатом данного исследования является также особенно высокая эффективность СБФГ в ингибировании ВИЧ-инфекции в макрофагах. Макрофаги, как и Т-клетки памяти, служат резервуарами вируса, наличие которых составляет главную причину невозможности полной эрадикации вируса и необходимости пожизненной анти-ВИЧ-терапии.

Известно, что субпопуляция Т-хелперов фенотипа 17 (Th17), продуцирующих интерлейкин-17, наиболее чувствительна к заражению ВИЧ и, как следствие, подвержена быстрому истощению [38]. Интерлейкин-17 играет ключевую роль в поддержании непроницаемости слизистых кишечника [39]. Утрата IL-17 приводит к деструкции слизистого барьера и увеличению транслокации микробов, что, в свою очередь, приводит к ВИЧ-ассоциированной иммунной гиперактивации [40–43]. Новые знания

об участии фенотипически различных, значимых для патогенеза ВИЧ-инфекции субпопуляций иммунных клеток, открывают новые возможности для оценки анти-ВИЧ-потенциала новых соединений.

Исследование воспроизводимости анти-ВИЧ-эффекта препарата СБФГ

В исследовании эффективности СБФГ немаловажно было понять, не изменяется ли эффективность препарата в сериях, полученных в разное время. Было проверено шесть серий и показано, что разные препараты действуют практически одинаково, дозозависимо ингибируя ВИЧ-инфекцию в сходных концентрациях с высоким индексом селективности в различных вирус-клеточных системах оценки и с различными вариантами ВИЧ-1: ВИЧ-1/BRU и TZM-bl-псевдовирус (табл. 4, 5 и рисунок).

В трех независимых экспериментах по ингибированию одноциклового инфекции в клетках TZM-bl, зараженных псевдовиром, *env*-последовательности которых соответствуют различным стадиям инфекции/путям заражения и относятся к трем различным подтипам (A, B, C) и двум циркулирующим рекомбинантным формам ВИЧ-1, показано, что СБФГ активно ингибирует инфекцию. Экспрессионные векторы для получения псевдовиром выбраны из стандартной панели контрольных штаммов ВИЧ-1 (NIH AIDS Research and Reference Reagent Program; NIH ARRRP), которые используются в качестве эталонных для оценки нейтрализующих антител и исследования анти-ВИЧ-активности соединений. При этом значения 50% ингибирующей дозы (ID_{50}) составляют: для Q769.d22 – 0.62–0.75 мкг/мл; для WITO4160.33 – 0.49–0.55 мкг/мл; для CE1176_A3 – 0.95–1.13 мкг/мл; для 703357.c02 – 0.91–0.98 мкг/мл и для VJOX002000.03.2 – 0.99–1.19 мкг/мл (рисунок).

Таблица 4. Сравнительная оценка эффективности шести серий СБФГ в экспериментальной ВИЧ-инфекции – СЕМ-SS/ВИЧ-1-BRU

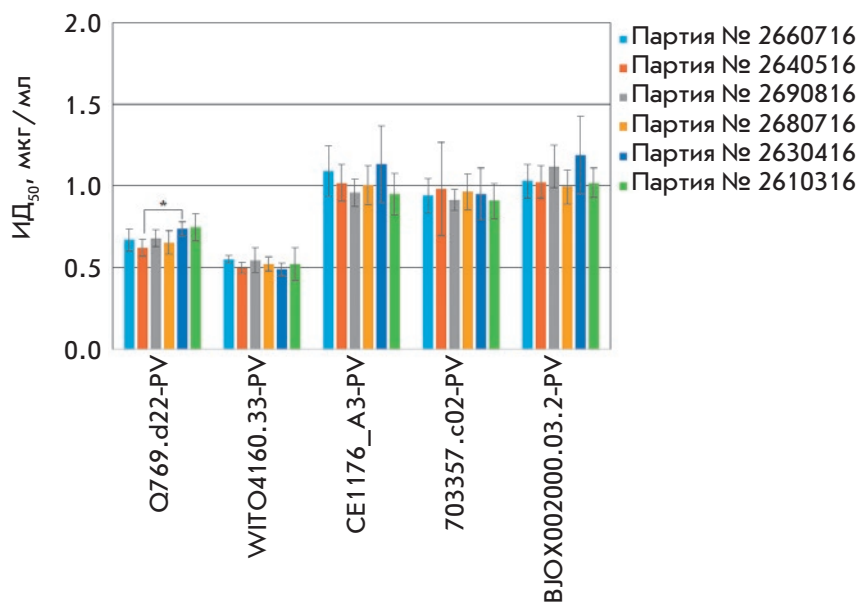
СБФГ, серия, №	Цитотоксичность $TD_{50} \pm SEM$, мкг/мл	Ингибирующая концентрация, мкг/мл		Индекс селективности
		ID_{90}	$ID_{50} \pm SEM$	
2660716	1100.0 ± 123	0.90	0.31 ± 0.012	3548
2640516	1251.0 ± 380	1.10	0.36 ± 0.001	3475
2690816	985.0 ± 210	0.95	0.34 ± 0.021	2897
2680716	1230.0 ± 138	1.00	0.38 ± 0.01	3242
2630416	1150.0 ± 226	0.95	0.35 ± 0.023	3285
2610316	1159.0 ± 195	0.94	0.31 ± 0.15	3738

Таблица 5. Панель псевдовирусов ВИЧ-1, использованных для инфицирования клеток TZM-bl (одноцикловая инфекция)

Изолят	Происхождение, страна	Подтип	Стадия инфекции	Способ заражения
Q769.d22-PV	Кения	А	Острая/начальная	Половой
WITO4160.33-PV	США	В	II	Половой
CE1176_A3-PV	Малави	С	I/II переданный «вирус-основатель»	Половой
703357.c02-PV	Тайланд	CRF01_AE	I/II	Половой
BJOX002000.03.2-PV	Китай/Пекин	CRF07_BC	I/II	ПИН*

*Потребители инъекционных наркотиков.

Рисунок. Оценка эффективности СБФГ в условиях одноцикловой инфекции с использованием клеток TZM-bl и пяти псевдовирусных вариантов ВИЧ. Не выявлено статистически значимых различий в ингибировании псевдовирусов протестированными партиями СБФГ, за исключением ингибирования псевдовируса Q769.d22-PV партиями № 2640516 и № 2630416 (*) при $p < 0.05$



ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обобщая полученные данные, можно сказать, что СБФГ эффективно ингибирует экспериментальную ВИЧ-инфекцию, обладает защитным эффектом против различных подтипов и циркулирующих рекомбинантных форм вируса. Надежность метода фракционирования, использованного для получения стандартизированных фракций гуминовых кислот, подтверждена экспериментами с шестью различными сериями препарата.

На Международном съезде по гуминовым веществам в 1988 году ряд ученых предсказывали большое будущее соединениям гуминовой природы в лечении разнообразных болезней [44]. К настоящему времени накоплено достаточно знаний об уникальных свойствах гуматов, обладающих противовос-

палительным и ранозаживляющим, противогрибковым и бактерицидным, и даже противоопухолевым действием. Несмотря на такие уникальные свойства, нельзя сказать, что в последующие годы проводились масштабные научно-исследовательские исследования гуматов. В итоге лишь две компании (американская и российская) создали лекарственные препараты на основе гуминовых веществ со всеми необходимыми доклиническими и клиническими испытаниями их безопасности и эффективности [30]. Данная работа дополняет имеющиеся знания терапевтических свойств таких уникальных природных соединений, как гуматы. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ ERA_Net RUS plus № 16-54-76005.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Geissmann F. // Nat. Immunol. 2007. № 8. P. 558–560.
2. Epelman S., Lavine K.J., Randolph G.J. // Immunity. 2014. № 41. P. 21–35.
3. Alvarez-Errico D., Vento-Tormo R., Sieweke M., Ballestar E. // Nat. Rev. Immunol. 2015. № 15. P. 7–17.
4. Wacleche V.S., Tremblay C., Routy J.-P., Ancuta P. // Viruses. 2018. V. 2. № 10. P. 65.

5. Stevenson M. // *J. Neurovirol.* 2015. № 21. P. 242–248.
6. Bagasra O., Hauptman S.P., Lischner H.W., Sachs M., Pomerantz R.J. // *N. Engl. J. Med.* 1992. № 326. P. 1385–1391.
7. Embretson J., Zupancic M., Ribas J., Burke A., Rack P., Tenner-Racz K., Haase A. // *Nature.* 1993. № 362. P. 359362.
8. Klatzmann D., Barre-Sinoussi F., Nugeyre T., Dauquet C., Vilmer E., Griscelli C., Brun-Vezinet F., Rouzioux C., Gluckman C., Chermann J.C. // *Science.* 1984. № 225. P. 59–62.
9. Siliciano J.D., Siliciano R.F. // *J. Clin. Investig.* 2000. № 106. P. 823–825.
10. Brenchley M., Hill B., Ambrozak D., Price A., Guenaga F., Casazza J., Kuruppu J., Yazdani J., Migueles S., Connors M., Roederer M., Couek D., Koup R.A. // *J. Virol.* 2004. № 78. P. 1160–1168.
11. Chun W., Chadwick K., Margolick J., Siliciano R.F. // *J. Virol.* 1997. № 71. P. 4436–4444.
12. Schnittman M., Lane H., Greenhouse J., Justement J., Baseler M., Fauci A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1990. № 87. P. 6058–6062.
13. Tardif M.R., Tremblay M.J. // *J. Virol.* 2005. № 79. P. 13714–13724.
14. Schweighardt B., Roy A.-M., Meiklejohn A., Grace J., Moretto J., Heymann F. // *J. Virol.* 2004. № 78. P. 9164–9173.
15. Blauvelt A., Asada H., Saville M., Klaus-Kovtun V., Altman D., Yarchoan R., Katz S. // *J. Clin. Investig.* 1997. № 100. P. 2043–2053.
16. Dittmar M.T., Simmons G., Hibbitts S., O'Hare M., Louisirothchanakul S., Beddows S., Weber J., Clapham P.R., Weiss R.A. // *J. Virol.* 1997. № 71. P. 8008–8013.
17. Granelli-Piperno A., Delgado E., Finkel V., Paxton W., Steinman R.M. // *J. Virol.* 1998. № 72. P. 2733–2737.
18. Zaitseva M., Blauvelt A., Lee S., Lapham C., Klaus-Kovtun V., Mostowski H., Manischewitz J., Golding H. // *Nat. Med.* 1997. № 3. P. 1369–1375.
19. Geissmann F., Manz M.G., Jung S., Sieweke M.H., Merad M., Ley K. // *Science.* 2010. № 327. P. 656–661.
20. Bakri Y., Schiffer C., Zennou V., Charneau P., Kahn E., Benjouad A., Gluckman J.C., Canque B. // *J. Immunol.* 2001. № 166. P. 3780–3788.
21. Grossman Z., Meier-Schellersheim M., Paul W.E., Picker L.J. // *Nat. Med.* 2006. № 12. P. 289–295.
22. Levy J.A. *HIV and the pathogenesis of AIDS.* Copiring. ASM Press, USA, 2010.
23. Gendelman H.E., Orenstein J.M., Baca L.M., Weiser B., Burger H., Kalter D.C., Meltzer M.S. // *AIDS.* 1989. № 3. P. 475–495.
24. Bergamini A., Dini L., Capozzi M., Ghibelli L., Placido R., Faggioli E., Salanitro A., Buonanno E., Cappannoli L., Ventura L., Cepparulo M., Falasca L., Rocchi G. // *J. Infect. Dis.* 1996. № 173. P. 1367–1378.
25. Kwa D., Vingerhoed J., Boeser B., Schuitemaker H. // *J. Infect. Dis.* 2003. № 187. P. 1397–1403.
26. Филов В.А., Резцова В.В., Беркович А.М. // *Рос. биотерапевт. журн.* 2002. Т. 1. № 2.
27. Zhernov Y.V., Kremb S., Helfer M., Schindler M., Harir M., Mueller C., Hertkorn N., Avvakumova N.P., Konstantinov A.I., Brack-Werner R., Schmitt-Kopplin Ph., Perminova I.V. // *N. J. Chem.* 2017. № 41. P. 212–224.
28. Rice J. A., MacCarthy P. A. // *Environ. Sci. Technol.* 1990. № 24. P. 1875–1877.
29. Driver S.J., Perdue E.M. // *Environ. Eng. Sci.* 2015. V. 32. № 1. P. 66–70.
30. Grimalt J.O., Hermosín B., Inmaculada Y.G., Saiz-Jiménez C. // *Sci. Total Environ.* 1989. № 81. P. 421–428
31. Бузлама В.С., Беркович А.М., Бузлама А.В. // *Материалы сателлитного симпозиума «Новый отечественный препарат ОЛИПИФАТ».* М.: РОНЦ им. Н.Н. Блохина, 2002.
32. Нежинская Г.И., Гавровская Л.К., Беркович А.М., Филов В.А. // *Вопросы онкологии.* 2005. Т. 51. № 5.
33. Kornilayeva G., Bercovich A., Pavlova T., Karamov E. // *XV International AIDS Conf.* 2004. 11–16 July, Bangkok, Thailand, abstract book. P. 167.
34. Scultz A., Koch S., Fuss M., Mazzotta A., Sarzotti-Kelsoe M., Ozaki D., Montefiori D., von Briesen H., Zimmermann H., Meyerhans A. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 12. P. 1–10.
35. Sarzotti-Kelsoe M., Bailer R.T., Turk E., Lin C.-L., Bilska M., Greene K.M., Gao H., Todd C.A., Ozaki D.A., Seaman M.S., et al. // *J. Immunol. Methods.* 2014. V. 409. P. 131–146.
36. Wei X., Decker J.M., Liu H., Zhang Z., Arani R.B., Kilby J.M., Saag M.S., Wu X., Shaw G.M., Kappes J.C. // *Antimicrob. Agents. Chemoter.* 2002. V. 46. № 6. P. 1896–1905.
37. Mossman T. // *J. Immunol. Methods.* 1993. № 65. P. 55–63.
38. Mitsuki Y.Y., Tuen M., Hioe C.E. // *J. Leukoc. Biol.* 2017. V. 101. № 1. P. 339–350.
39. Guglani L., Khader S.A. // *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2010. № 5. P. 120–127.
40. Brenchley J.M., Price D.A., Schacker T.W., Asher T.E., Silvestri G., Rao S., Kazzaz Z., Bornstein E., Lambotte O., Altmann D., et al. // *Nat. Med.* 2006. № 12. P. 1365–1371.
41. Dandekar S., George M., Bäuml A.J. // *Curr. Opin. HIV AIDS.* 2010. № 5. P. 173–178.
42. Gordon S.N., Cervasi B., Odorizzi P., Silverman R., Aberra F., Ginsberg G., Estes J.D., Paiardini M., Frank I., Silvestri G. // *J. Immunol.* 2010. № 185. P. 5169–5179.
43. Vyboh K., Jenabian M.A., Mehraj V., Routy J.P. // *J. Immunol. Res.* 2015. № 6. P. 1–9.
44. Visser S.A. // *Internat. Humic Substances Soc. Meet. Sevilla, Spain, 1988.*

УДК 577.151.45; 577.152.343

Изучение возможностей использования 2-галоген-замещенных ацетамидов в качестве ацильных доноров в реакциях, катализируемых пенициллинацилазами

Н. В. Панин¹, М. В. Никулин^{1,2}, Е. С. Тюрин², В. В. Дробот^{1,2}, И. А. Морозова^{1,2}, В. К. Швядас^{1*}¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 40²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

*E-mail: vytas@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 23.03.2018

Принята к печати 26.04.2018

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-77-81

РЕФЕРАТ Исследованы возможности использования амидов галоген-замещенных уксусных кислот в качестве ацильных доноров в реакциях, катализируемых пенициллинацилазами. Обнаружена способность соединений этой группы инактивировать ферменты в ходе каталитического превращения. Наиболее сильное инактивирующее действие проявляли йодацетамид и бромацетамид, однако негативное влияние этой побочной активности можно минимизировать при понижении температуры, когда каталитическая активность пенициллинацилаз по отношению к этим ацильным донорам остается достаточно высокой, а вклад инактивации фермента в ходе реакции становится менее значительным. Каталитическая активность пенициллинацилазы из *Alcaligenes faecalis* по отношению к 2-галогенацетамидам существенно (в 5–8 раз) превышала активность пенициллинацилазы из *Escherichia coli*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА 2-галогенацетамиды, инактивация в ходе реакции, пенициллинацилазы, субстратная специфичность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; NIPAB – *m*-карбоксит-нитроанилид фенилуксусной кислоты; ФУЖ – фенилуксусная кислота.

ВВЕДЕНИЕ

Бета-лактамы являются наиболее широко используемыми антибактериальными препаратами, к преимуществам которых можно отнести высокую клиническую эффективность и низкую токсичность. Важное значение имеет также доступность антибиотиков этого класса, что обусловлено, в частности, масштабным использованием биокаталитических технологий для их получения. Однако проблемы, связанные с развитием резистентности патогенов, ограничивают срок использования разработанных препаратов и делают необходимым поиск новых производных. Одно из ключевых направлений создания более эффективных, так называемых полусинтетических аналогов, – введение различных N-ацильных заместителей, ковалентно связанных с бета-лактамым ядром. Успешность этого процесса прямо связана с до-

ступностью, эффективностью и легкостью включения нового N-ацильного радикала в структуру целевого соединения. Важную роль в решении этого вопроса сыграла способность пенициллинацилаз катализировать эффективный перенос ацильных групп, в первую очередь, остатков D-фенилглицина и *n*-окси-D-фенилглицина, от их амидов и сложных эфиров на ядра пенициллинов и цефалоспоринов. Детальное исследование весьма сложной кинетики реакций ферментативного ацильного переноса в водной среде на добавленные нуклеофилы позволило выявить основные факторы, от которых зависит эффективность процесса [1–3], и разработать методы биокаталитического синтеза ампициллина, амоксициллина, цефалексина, цефаклора, цефоницида, цефпрозила в водной среде без применения экологически опасных органических растворителей [4–11]. Дальнейшее

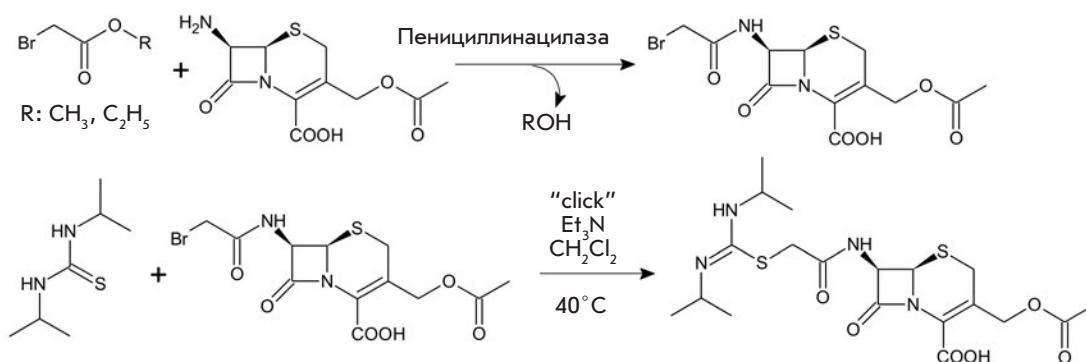


Рис. 1. Синтез антибиотика цефатиамидина через активированное N-бромацетильное производное 7-аминоцефалоспорованной кислоты

развитие биокаталитических методов в значительной степени зависит от субстратной специфичности ферментов, способных катализировать перенос других ацильных групп на ядра бета-лактамовых соединений. В этой связи представляет интерес сочетание возможностей биокатализа и методов клик-химии, когда на первой стадии при помощи фермента синтезируется бета-лактамовое соединение с N-ацильным радикалом, содержащим активированную группу, которая затем может служить основой для получения разнообразных новых производных. В качестве примера для иллюстрации подобного подхода можно привести синтез цефатиамидина – антибиотика, популярного на китайском фармацевтическом рынке. В данном случае активированная N-ацильная группа представляет собой остаток бромуксусной кислоты, после введения которой и последующего взаимодействия с N,N'-диизопропилтиомочевинной получается целевой антибиотик (рис. 1) [12, 13].

Варьируя структуру вводимого бокового радикала к ядру антибиотика, природу активированных групп и структуру химического соединения на завершающей стадии, можно разработать достаточно универсальный путь получения широкого спектра потенциальных антибактериальных препаратов. Весьма вероятной проблемой при разработке такого подхода могут быть следующие осложняющие факторы: модификация (инактивация) фермента при взаимодействии с активированными группами исходных субстратов и получаемых продуктов, спонтанное разрушение активированных групп в условиях проведения биокаталитической стадии, поиск подходящих ферментов, обладающих необходимой каталитической активностью в отношении синтетических неприродных субстратов.

Цель данной работы состояла в изучении возможностей использования производных галоген-замещенных уксусных кислот в качестве потенциальных ацильных доноров в реакциях, катализируемых пенициллинацилазами из *Escherichia coli* и *Alcaligenes faecalis*, характеристике их реакционной способности

как субстратов в зависимости от природы активирующей группы, так и при инактивации ферментов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Определение активности фермента по отношению к 2-галогенацетидам

Типичный эксперимент проводили следующим образом: 2-галогенацетамид (200 мкмоль) растворяли в 0.05 М фосфатном буфере, термостатировали при нужной температуре, доводили pH до 7.5 и начинали реакцию добавлением аликвоты исходного концентрированного раствора фермента, создавая концентрацию активных центров пенициллинацилазы в реакционной смеси 25 мкМ. Общий объем реакционной смеси составлял 800 мкл, концентрация субстрата 0.25 М. Реакцию проводили в термостатируемой ячейке, поддерживая постоянные значения температуры и pH. Через определенные промежутки времени отбирали пробы объемом 20 мкл и смешивали их с 980 мкл смеси ацетонитрила с дистиллированной водой (соотношение 2 : 1). Пробы центрифугировали в течение 5 мин при 13000 об/мин для удаления осадка белка и анализировали с помощью обращенно-фазовой ВЭЖХ. Условия анализа: скорость потока 0.7 мл/мин, элюент – ацетонитрил/вода (25 об.% ацетонитрила, 0.005 М фосфатный буфер pH 3), детектирование 210 нм, колонка Kromasil Eternity 5-C18 4.6×250 мм, объем наносимой пробы 20 мкл. Степень разделения R_s соответствующих амида и кислоты во всех случаях превышала 1.5. Времена удержания компонентов составляли: хлорацетамид 4.16 мин, хлоруксусная кислота 4.34 мин, бромацетамид 4.27 мин, бромуксусная кислота 4.73 мин, йодацетамид 4.31 мин, йодуксусная кислота 5.92 мин.

Исследование зависимости скорости превращения хромогенного субстрата от концентрации 2-хлорацетида

Ингибирующее влияние хлорацетида на каталитическую активность пенициллинацилазы изучали

с использованием высокопроизводительного микропланшетного ридера CLARIOstar (BMG LABTECH). Типичный эксперимент выглядел следующим образом: в 96-луночном планшете в ячейки по вертикальным столбцам добавляли аликвоты 1 мМ раствора хромогенного субстрата NIPAB (семь столбцов различных концентраций NIPAB в диапазоне от 0.01 до 0.3 мМ; концентрация в рядах идентична), в ячейки по горизонтальным рядам – аликвоты 700 мМ раствора ингибитора (восемь рядов различных концентраций хлорацетамида в диапазоне от 0 до 400 мМ; концентрация в столбцах идентична), объем реакционной смеси доводили до 216 мкл, добавляя необходимый объем 0.1 М калий-фосфатного буфера pH 7.5. В этом же буфере были приготовлены растворы всех реагентов. Реакцию начинали добавлением 20 мкл раствора фермента при помощи мультисканального дозатора, создавая концентрацию активных центров пенициллинацилазы в каждой ячейке 10 нМ. Значение температуры поддерживали на уровне 25 °С. Активность определяли по накоплению хромофора – *n*-нитро-*m*-карбоксиванилина ($\lambda_{\max} = 400$ нм) в режиме работы прибора Absorbance/PlateMode при повышенной точности (количество вспышек на ячейку 30, время цикла 6 с, количество циклов 74) с периодическим перемешиванием (500 об/мин). Во избежание случайных ошибок, вызванных образованием локальных пузырьков воздуха, измерение оптической плотности проводили в режиме статистического усреднения (функция well scan, усреднение по спирали). Поточковую регрессионную обработку данных проводили в программе MARS Data Analysis Software. Начальные скорости определяли по усредненному значению производной в пределах 10% конверсии NIPAB. Для определения константы ингибирования экспериментальные результаты анализировали в координатах Диксона.

Изучение инактивации пенициллинацилазы под действием 2-галогенацетамидов

Кинетику инактивации пенициллинацилазы изучали с использованием высокопроизводительного микропланшетного ридера CLARIOstar (BMG LABTECH). Типичный эксперимент выглядел следующим образом: в 96-луночном планшете в ячейки по горизонтальным рядам добавляли аликвоты 1 М раствора галогенацетамида (восемь рядов различных концентраций в диапазоне от 0 до 470 мМ; концентрация во всех 12 столбцах идентичная). Левую половину планшета использовали для изучения инактивации фермента под действием галогенацетамида, правую – для изучения влияния на процесс инактивации фенилуксусной кислоты (ФУК) – высокоспецифичного ингибитора пенициллинацилазы;

концентрация ФУК во всех ячейках правой половины планшета составляла 0.1 мМ. Объем реакционной смеси в каждой ячейке доводили до 196 мкл, добавляя необходимый объем 0.1 М калий-фосфатного буфера pH 7.5. При этом создавали по шесть идентичных по составу столбцов слева (без ФУК) и справа (с ФУК). Реакцию инактивации начинали одновременно в первом и седьмом столбцах добавлением 20 мкл исходного раствора фермента, чтобы концентрация активных центров пенициллинацилазы в каждой ячейке составляла 10 нМ. Порции исходного раствора фермента последовательно добавляли в каждый следующий столбец многоканальным дозатором через каждые 10 мин инкубирования. Значение температуры поддерживали на уровне 25 °С. Для определения остаточной активности фермента через 50 мин после начала первой инкубации во все ячейки одновременно добавляли 24 мкл 1 мМ раствора NIPAB, чтобы концентрация хромогенного субстрата в каждой ячейке составляла 0.1 мМ. Таким образом, время инкубации фермента с ингибитором в 1-м и 7-м столбцах составило 50 мин, в 6-м и 12-м столбцах – 1 мин. Остаточную активность сканировали как описано выше. Инактивация фермента протекала в соответствии с кинетикой реакции первого порядка, при анализе экспериментальных данных определяли константу инактивации фермента.

Кинетику инактивации пенициллинацилазы при взаимодействии с 2-галогенацетамидами изучали также с использованием другой методики при разных температурах (4, 15 и 25 °С) путем инкубирования раствора фермента (концентрация 3 нМ) в присутствии 100 мМ 2-галогенацетамида в 10 мМ калий-фосфатном буфере pH 7.5, содержащем 0.1 М KCl. Аликвоты реакционной смеси отбирали в определенные моменты времени и добавляли в термостатируемую кювету (25 °С) с раствором NIPAB (концентрация хромогенного субстрата 0.1 мМ в 10 мМ калий-фосфатном буфере pH 7.5, содержащем 0.1 М KCl). Остаточную активность измеряли на спектрофотометре Shimadzu UV 1800 при 400 нм.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Выбор производных галоген-замещенных уксусных кислот в качестве потенциальных субстратов для исследования

При выборе субстрата для ферментативной реакции следует учитывать такие его свойства, как стабильность, растворимость и удобство применения, что особенно важно при препаративном использовании ацильных доноров. Решающими факторами при выборе амидов галоген-замещенных уксусных кислот для исследования в качестве потенциальных

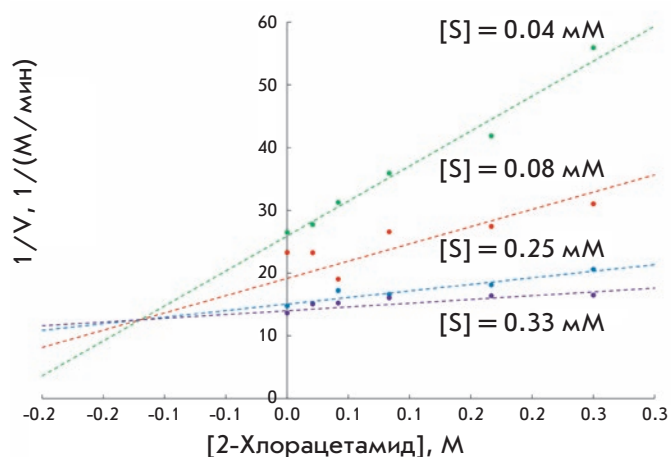


Рис. 2. Зависимость начальных скоростей гидролиза NIPAB под действием пенициллинацилазы из *E. coli* от концентрации хромогенного субстрата в присутствии различных концентраций 2-хлорацетамида. Данные представлены в координатах Диксона. Условия проведения эксперимента: 25°C, 0.1 М калий-фосфатный буфер pH 7.5

субстратов пенициллинацилаз были: более высокая растворимость и стабильность амидов по сравнению со сложными эфирами и, самое главное, лакриматорное действие сложных эфиров. Так, например, пары этилового эфира бромуксусной кислоты чрезвычайно раздражающе действуют на слизистую оболочку глаз; препарат необходимо хранить в герметично закрытых сосудах и применять в открытой посуде только в хорошем вытяжном шкафу [14].

Изучение способности амида 2-галогенуксусной кислоты связываться в активном центре пенициллинацилаз

Возможности потенциальных субстратов связываться в активном центре пенициллинацилазы изучали по их способности ингибировать активность фермента по отношению к удобному хромогенному субстрату. Типичный пример по влиянию 2-хлорацетамида на каталитическую активность пенициллинацилазы из *E. coli* показан на рис. 2. При исследовании зависимости скорости превращения хромогенного субстрата NIPAB от концентрации ингибитора (2-хлорацетамида) было обнаружено конкурентное ингибирование и определено значение константы ингибирования 0.12 ± 0.02 М (рис. 2). Показано, что амиды 2-галогензамещенных уксусных кислот обладают значительно более низким (примерно на 4 порядка) сродством к активному центру пенициллинацилаз по сравне-

нию со специфическими субстратами этого фермента. Тем не менее, благодаря хорошей растворимости этих субстратов можно использовать их высококонцентрированные растворы и рассчитывать на проведение реакции в условиях максимальной скорости ферментативной реакции.

Изучение реакционной способности потенциальных ацильных доноров

При исследовании взаимодействия амидов галоген-замещенных уксусных кислот с пенициллинацилазами было обнаружено, что гидролиз этих субстратов сопровождается инактивацией ферментов, наиболее ярко выраженной в случае йодацетамида и бромацетамида. Инактивация обоих ферментов была обусловлена связыванием галоген-замещенных ацетамидов в активном центре пенициллинацилаз и сопряжена с каталитической активностью, поскольку добавление фенилуксусной кислоты – известного конкурентного ингибитора пенициллинацилаз, связывающегося в активном центре, подавляло инактивацию. Подобную инактивацию пенициллинацилазы из *E. coli* в ходе реакции ранее наблюдали при препаративном ферментативном синтезе пептидов D-фенилглицина [15]. Потеря активности фермента в ходе превращения амидов галоген-замещенных уксусных кислот протекала согласно кинетике реакции первого порядка, значения соответствующих констант скоростей инактивации представлены в табл. 1.

Инактивация фермента под действием йодацетамида в условиях pH-оптимума действия пенициллинацилазы из *E. coli* при 25°C протекала настолько быстро, что гидролиз субстрата успевал пройти всего на несколько процентов. В случае бромацетамида инактивация была медленнее, однако также делала практически невозможным использование такого ацильного донора в препаративном синтезе в этих условиях. Снизить скорость инактивации фермента и негативное влияние этого процесса на катали-

Таблица 1. Значения констант скоростей инактивации пенициллинацилазы из *Escherichia coli* при взаимодействии с 2-галогенацетамидами

Субстрат	$k_{in} \cdot 10^4, \text{мин}^{-1}$
Хлорацетамид	1.1 ± 0.1
Бромацетамид	47 ± 2
Йодацетамид	364 ± 34

Примечание. Условия проведения эксперимента: 25°C, 0.1 М калий-фосфатный буфер pH 7.5, 0.1 М 2-галогенацетамида.

Таблица 2. Специфичность пенициллинацилаз в реакциях гидролиза 2-галогенацетамидов

Субстрат	Фермент	Пенициллин-ацилаза из <i>E. coli</i>	Пенициллин-ацилаза из <i>A. faecalis</i>
	V, мкМ/с		
Хлорацетамид (25°C)		7.5±1	63±5
Бромацетамид (4°C)		10.0±1.3	58±3
Йодацетамид (4°C)		9.3±1.3	45±2

Примечание. Условия проведения эксперимента: 0.05 М фосфатный буфер pH 7.5, с хлорацетамидом при 25°C, с бром- и йодацетамидом – при 4°C, концентрация пенициллинацилазы 25 мкМ.

тическое превращение ацильных доноров под действием пенициллинацилаз удалось при понижении температуры (рис. 3). Так, при 4°C потеря активности фермента при превращении бромацетамида снижается более чем на порядок, что позволяет использовать это соединение в качестве ацильного донора в реакциях, катализируемых пенициллинацилазами. При этом следует отметить, что каталитическая активность пенициллинацилазы из *A. faecalis* по отношению к этой группе субстратов была существенно выше, чем у пенициллинацилазы из *E. coli* (см. табл. 2).

ВЫВОДЫ

Изучение возможностей использования амидов 2-галоген-замещенных уксусных кислот в качестве ацильных доноров в реакциях, катализируемых пенициллинацилазами, выявило способность соединений этой группы инактивировать фермент в ходе каталитического превращения. Наиболее эффективное инактивирующее действие проявляли йодацетамид

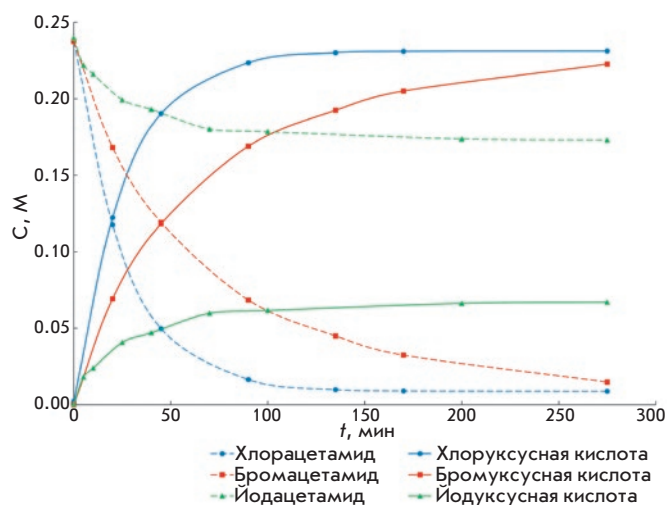


Рис. 3. Кинетика накопления продуктов реакции (сплошные кривые) и расходования исходных субстратов (пунктирные кривые) при гидролизе 2-галогенацетамидов под действием пенициллинацилазы из *Alcaligenes faecalis*. Реакцию с хлорацетамидом проводили при 25°C, с бром- и йодацетамидом – при 4°C. Условия проведения экспериментов указаны в подписи к табл. 2

и бромацетамид, однако негативное влияние побочной активности можно минимизировать при понижении температуры, когда каталитическая активность пенициллинацилаз к этим ацильным донорам остается достаточно высокой, а вклад инактивации фермента в ходе реакции становится незначительным. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке
Российского научного фонда
(грант № 17-74-10255).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Svedas V.K., Margolin A.L., Borisov I.L., Berezin I.V. // Enzyme. Microb. Technol. 1980. V. 2. P. 313–317.
- Gololobov M.Y., Borisov I.L., Svedas V.K. // J. Theor. Biol. 1989. V. 140. P. 193–104.
- Юшко М.И., Швядас В.К. // Биохимия. 2000. Т. 65. № 12. С. 1624–1633.
- Gonçalves L.R.B., Sousa R.Jr., Fernandez-Lafuente R., Guisan J.M., Giordano R.L.C., Giordano R.C. // Biotechnol. Bioeng. 2002. V. 80. № 6. P. 622–631.
- Youshko M.I., Švedas V.K. // Adv. Synth. Catal. 2002. V. 344. № 8. P. 894–898.
- Youshko M.I., van Langen L.M., De Vroom E., van Rantwijk F., Sheldon R.A., Svedas V.K. // Biotechnol. Bioeng. 2002. V. 78. № 5. P. 589–593.
- Youshko M.I., Moody H.M., Bukhanov A.L., Boosten W.H.J., Svedas V.K. // Biotechnol. Bioeng. 2004. V. 85. № 3. P. 323–329.
- Zhang Y.-W., Wei D.-Z. // Preparative Biochem. Biotechnol. 2008. V. 38. P. 129–138.
- Terreni M., Tchamkam J.G., Sarnataro U., Rocchietti S., Fernandez-Lafuente R., Joser M., Guisan J.M. // Adv. Synth. Catal. 2005. V. 347. P. 121–128.
- Feng S.-X., Liang S.-Z., Lou W.-Y. // Biocatal. Biotransform. 2008. V. 26. № 4. P. 321–332.
- Bernardino S.M., Fernandes P., Fonseca L.P. // Biotechnol. Bioeng. 2010. V. 107. № 5. P. 753–762.
- Wang H.L., Li L.W. // Chin. J. Mod. Appl. Pharm. 2010. V. 27. № 2. P. 126–127.
- Zhang X.-L., Zong M.-H., Li N. // Bioresour. Bioprocess. 2016. V. 3. № 49. P. 1–8.
- Справочник химика. Т. 2. Л.-М.: Химия, 1964. С. 1024–1025.
- Shcherbakova T.A., Korennykh A.V., van Langen L.M., Sheldon R.A., Švedas V.K. // J. Mol. Catal. B: Enzym. 2004. V. 31. P. 63–65.

УДК 577.2

Профиль посттрансляционных модификаций гистона H1 в хроматине эмбриональных стволовых клеток МЫШИ

Т. Ю. Старкова^{1*}, Т. О. Артамонова², В. В. Ермакова¹, Е. В. Чихиржина¹,
М. А. Ходорковский³, А. Н. Томилин^{1,3*}

¹Институт цитологии РАН, лаборатория молекулярной биологии стволовых клеток, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий пр., 4, Россия

²Санкт-Петербургский государственный политехнический университет имени Петра Великого, Аналитический центр нано- и биотехнологий СПбГПУ, 195251, Санкт-Петербург, ул. Политехническая, 29, Россия

³Санкт-Петербургский государственный университет, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7–9, Россия

*E-mail: t.starkova@incras.ru, a.tomilin@incras.ru

Поступила в редакцию 01.03.2019

Принята к печати 29.04.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-82-91

РЕФЕРАТ Линкерный гистон H1 – один из основных ядерных белков, принимающих участие в структурно-регуляторной организации хроматина. Ряд данных указывает на то, что посттрансляционные модификации H1 способны модулировать активность хроматина. С помощью масс-спектрометрии высокого разрешения (MALDI-FT-ICR-MS) мы обнаружили существенные различия в природе и положениях посттрансляционных модификаций в некоторых вариантах гистона H1 (H1.3–H1.5) из эмбриональных стволовых клеток и дифференцированных клеток – иммортализованных фибробластов линии NIH/3T3 и эмбриональных фибробластов (МЭФ). Так, метилирование K75 в вариантах H1.2–1.4, метилирование K108, K148, K151, K152, K154, K155, K160, K161, K179 и K185 в H1.1, а также K168 в H1.2, фосфорилирование S129, T146, T149, S159, S163 и S180 в H1.1, T180 в H1.2 и T155 в H1.3 идентифицированы исключительно в эмбриональных стволовых клетках. Большинство сайтов ацетилирования вариантов H1.0 и H1.2 в эмбриональных стволовых клетках расположены в С-концевых доменах, известных своим участием в стабилизации конденсированного хроматина. Полученные данные могут послужить основой для дальнейших исследований, направленных на анализ функциональной значимости посттрансляционной модификации гистона H1 для процессов самообновления и дифференцировки плюрипотентных стволовых клеток.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА двумерный электрофорез, линкерный гистон H1, масс-спектрометрия, посттрансляционные модификации, эмбриональные стволовые клетки мыши.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ MALDI-FT-ICR-MS – масс-спектрометрия ионно-циклотронного резонанса с Фурье-преобразованием; ПТМ – посттрансляционные модификации; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; МЭФ – эмбриональные фибробласты мыши; AU-PAGE – полиакриламидный гель, содержащий мочевины; SDS-PAGE – полиакриламидный гель, содержащий додецилсульфат натрия; meK – метилирование лизина; acK – ацетилирование лизина; pS/T – фосфорилирование серина/треонина; MetO – метионинсульфоксид.

ВВЕДЕНИЕ

Архитектурные белки хроматина, такие, как гистон H1, взаимодействуют с нуклеосомами без явной специфичности к последовательности ДНК, способствуя формированию локально и/или глобально измененной архитектуры хроматина [1–8]. Белки семейства гистонов H1 человека и мыши представлены

семью соматическими подтипами (от H1.0 до H1.5 и H1X) и четырьмя уникальными вариантами (H1t, H1T2m, H1LS1 и H1oo), характерными для половых клеток [9–13]. Несмотря на высокую структурную консервативность, подтипы H1 различаются эволюционной стабильностью, распределением в эухроматине/гетерохроматине и аффинностью связывания

хроматина, что может быть результатом посттрансляционных модификаций (ПТМ) [14–17].

Хроматин эмбриональных стволовых клеток (ЭСК) и индуцированных плюрипотентных клеток активно изучается в течение последних нескольких десятилетий в связи с огромным потенциалом использования ЭСК в биомедицине. За это время показано, что гетерохроматин ЭСК более «открыт», чем в дифференцированных клетках [18], и это свойство, приводящее к глобально повышенной транскрипции, может быть результатом снижения экспрессии белков H1 [19] и ПТМ ядерных белков [18–20].

В рамках нашего исследования с помощью сочетания физико-химических и биологических подходов выявлены новые ПТМ гистона H1, специфически присутствующие в хроматине ЭСК, но не в дифференцированных клетках мыши. Обсуждается возможная роль выявленных модификаций в структурно-регуляторной организации хроматина этих клеток.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Все процедуры на животных выполняли в соответствии с принципами гуманного использования лабораторных животных по стандартам, предписанным Американским физиологическим обществом. Работа с мышами выполнялась строго в соответствии с законодательными актами Российской Федерации о защите животных и была одобрена Советом по этике Института как гуманное использование лабораторных животных.

Эмбриональные фибробласты мыши (МЭФ) выделены из 13,5-дневных зародышей мыши после естественного спаривания животных. ЭСК мыши линии E14Tg2A приобретены в BayGenomics. Клеточная линия NIH/3T3 получена из Российской коллекции клеточных культур Института цитологии РАН (Санкт-Петербург, Россия).

Культивирование клеточных линий

Клетки NIH/3T3 и МЭФ культивировали в DMEM с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки, L-глутамина и 1% пенициллина/ стрептомицина [21, 22]. ЭСК культивировали в DMEM/F12 с добавлением 15% фетальной бычьей сыворотки, 1% пенициллина/стрептомицина, L-глутамина, незаменимых аминокислот и лейкоингибирующего фактора (LIF) на обработанных желатином культуральных чашках. Клетки промывали PBS (pH 7.5), обрабатывали 0.05% трипсином (10 мин при 37°C) и собирали центрифугированием при 2000 g в течение 5 мин. Клеточный осадок с 6–8 чашек (d = 10 см) замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C.

Экстракция и разделение вариантов гистона H1

Для сохранения интактных ПТМ белки H1 выделяли из клеток напрямую (минуя стадию выделения ядер) с помощью 5% хлорной кислоты с последующим осаждением подкисленным ацетоном [7]. Варианты H1 разделяли методом двухмерного гелеэлектрофореза в полиакриламидном геле [7, 8].

Ферментативный гидролиз и анализ MALDI-FT-ICR-MS

После проведения 2D-электрофореза фрагменты геля, содержащие ядерные белки, вырезали, измельчали и обрабатывали 40% ацетонитрилом в 0.1 M бикарбонате аммония при 37°C в течение 15 мин как описано ранее [7]. Биологические образцы анализировали в двух биологических и двух-

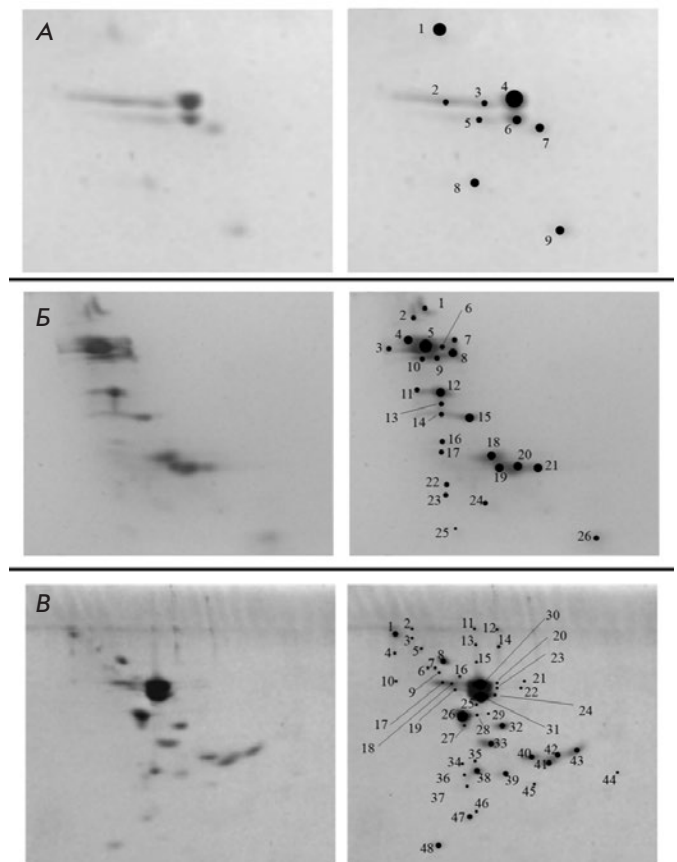


Рис. 1. 2D-электрофорез обогащенных H1 экстрактов клеток NIH/3T3 (A), МЭФ (Б) и ЭСК (В). Варианты H1 идентифицированы в пяти фракциях (обозначены 2–4, 6–7 в А), семи фракциях (4–10 в Б) и восьми фракциях (15–18, 20–21, 30–31 в В) клеток NIH/3T3, МЭФ и ЭСК соответственно. Остальные белковые фракции описаны в табл. S1 [25]

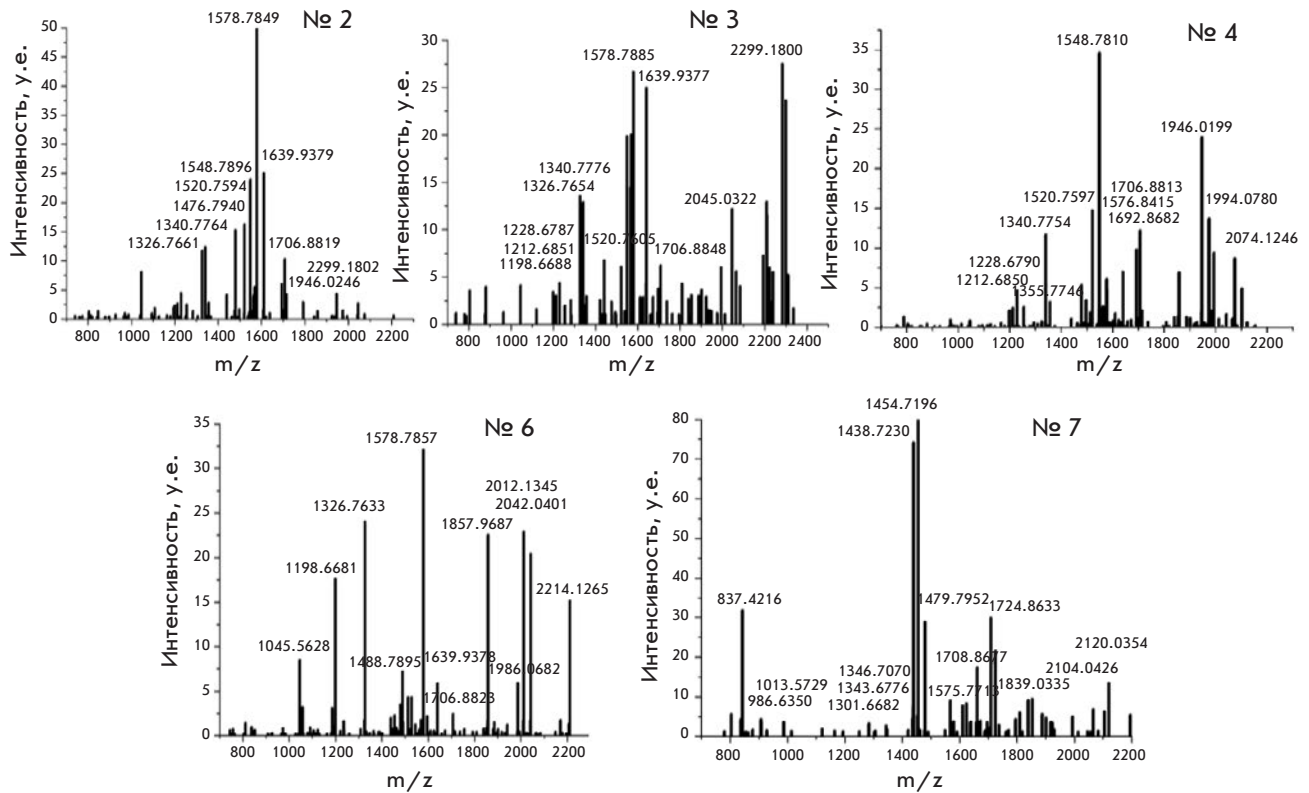


Рис. 2. Масс-спектры подтипов гистона Н1 хроматина клеток NIH/3T3. Номер спектров соответствует номеру пятна на 2D-электрофореграмме. Подробное описание содержания белков в каждом пятне приведено в табл. 1S [25]

трех аналитических повторностях. Масс-спектры регистрировали в режиме положительных ионов в диапазоне 500–3000 m/z с использованием масс-спектрометра MALDI-FT-ICR (Varian 902-MS), оснащенного сверхпроводящим магнитом 9.4 Тл и УФ-лазером (Nd: YAG) [7]. Спектры анализировали с использованием программных пакетов Mascot (www.matrixscience.com; Matrix Science, Лондон, Великобритания) и Protein Prospector MS-Fit (<http://prospector.ucsf.edu>) как описано ранее [7].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Целью нашей работы было сравнение ПТМ линкерных гистонов Н1 из дифференцированных и эмбриональных стволовых клеток мыши. Варианты гистона Н1 мы разделяли с использованием сочетания AU-PAGE с SDS-PAGE, что особенно оправдано в случае идентификации заряженных кислотно-растворимых белков, включая гистоны [7, 8, 23, 24]. На рис. 1 представлены результаты 2D-электрофоретического разделения вариантов Н1 хроматина из двух типов дифференцированных клеток, иммортализованных

фибробластов мыши линии NIH/3T3 и первичных эмбриональных фибробластов мыши (МЭФ), а также плюрипотентных клеток мыши (ЭСК линии E14Tg2A). В результате анализа электрофореграмм мы идентифицировали в клетках NIH/3T3 пять фракций, содержащих варианты Н1 (рис. 1А), семь фракций в МЭФ (рис. 1Б) и восемь в ЭСК (рис. 1В). Оставшиеся фракции включают белки семейства HMG (High Mobility Group) и другие ядерные белки (табл. S1 [25]). Результаты MS-анализа Н1 представлены в табл. S2 [25] и на рис. 2–4. Обнаружены и проанализированы шесть изоформ Н1 (Н1.0–Н1.5). Идентифицированные ПТМ подтипов Н1 из NIH/3T3, МЭФ и ЭСК представлены в таблице и на рис. 5. На рис. 5 дополнительно представлены ранее идентифицированные ПТМ гистона Н1 из тимуса мыши [7].

Метилирование

Гистоны Н1 – одна из основных групп ядерных белков хроматина, которые участвуют в продольном уплотнении реплицирующейся хромосомы [24]. В хроматине ЭСК на одну нуклеосому приходится

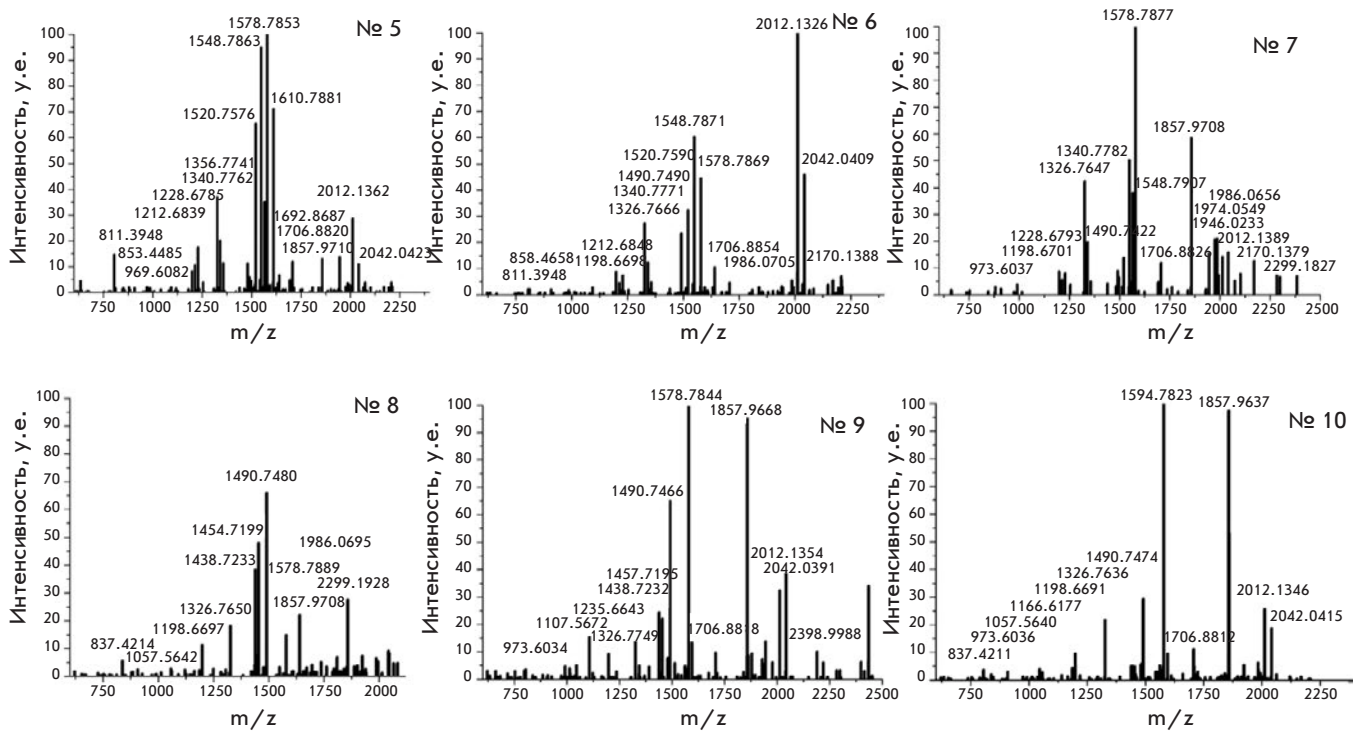


Рис. 3. Масс-спектры подтипов гистона Н1 хроматина клеток МЭФ. Номер спектров соответствует номеру пятна на 2D-электрофореграмме. Подробное описание содержания белков в каждом пятне приведено в табл. S1 [25]

0.5 молекулы Н1 (суммарно всех подтипов), что примерно в 2 раза ниже, чем в хроматине дифференцированных клеток [26]. Истощение линкерного гистона Н1 приводит к снижению степени компактизации хроматина, уменьшению глобального расстояния между нуклеосомами и снижению степени ПТМ некоторых гистонов, таких, как метилирование [26].

Сравнительный анализ ПТМ вариантов Н1 из клеток НИН/ЗТЗ, МЭФ и ЭСК выявил снижение степени метилирования вариантов Н1.4 и Н1.5 в ЭСК по сравнению с дифференцированными клетками (рис. 5). Идентифицированные сайты метилирования белков Н1 расположены, в основном, в области глобулярного домена в положениях К34/К35, К63/65 и К73/75 в зависимости от варианта Н1 (таблица).

Большинство выявленных нами таких ПТМ, как meK63/64, в вариантах Н1.2–Н1.4, meK47 в Н1.3, meK97 в Н1.2, meK117 в Н1.2 и meK27 в Н1.5 уже описаны ранее [7, 8, 10–12]. Считается, что метилирование в этих положениях защищает аминокислоты лизина, вызывая увеличение сродства гистона к ДНК и облегчение перехода хроматина в локально репрессированное состояние [7, 8]. Помимо описанных выше ПТМ, мы идентифицировали метилиро-

вание К75 вариантов Н1.2–1.4 исключительно в ЭСК (рис. 5, табл. S2 [25]), расположенное в глобулярном домене Н1, которое также может приводить к защите аминокислоты лизина в этих клетках.

Потенциальные сайты метилирования К108, К148, К151, К152, К154, К155, К160, К161, К179 и К185 в Н1.1, К168 в Н1.2 также идентифицированы исключительно в клетках ЭСК, тогда как метилирование К202 и К204 в Н1.4 – только в дифференцированных клетках НИН/ЗТЗ и МЭФ. Большинство из этих ПТМ расположены в мотивах (S/T)PXK или (S/T)PXZ (где X – любой аминокислотный остаток) вблизи фосфорилированных серинов и треонинов Н1. Потенциальная роль этих модификаций рассмотрена в разделе «Фосфорилирование».

Ацетилирование

Согласно нашим данным, общий уровень ацетилирования Н1 в ЭСК оказался выше, чем в дифференцированных клетках (рис. 5). Как и ожидалось, мы идентифицировали несколько сайтов ацетилирования в N-концевом и глобулярном доменах Н1 (таблица). В большинстве случаев точная биологическая роль этих модификаций не установ-

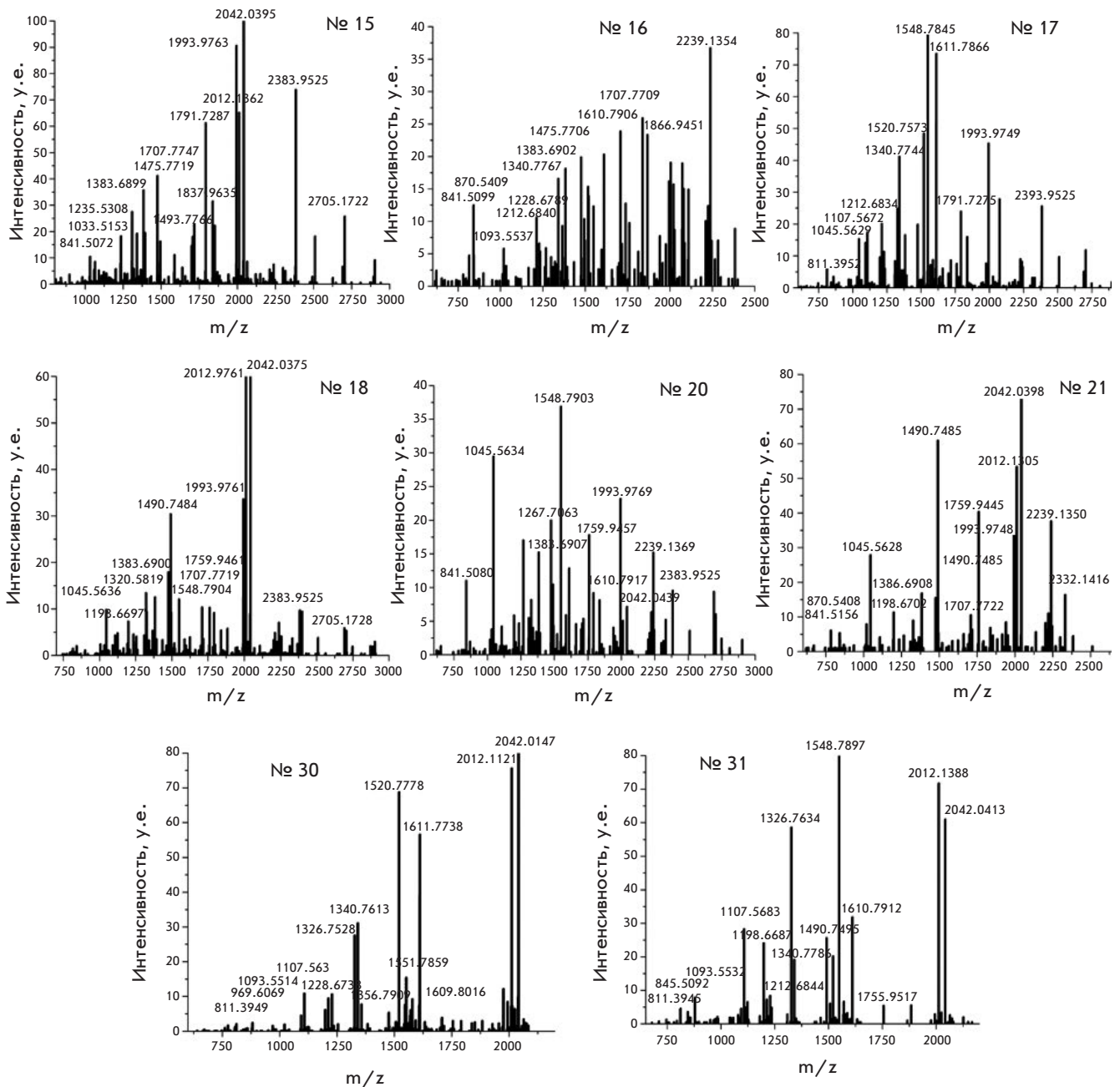


Рис. 4. Масс-спектры подтипов гистона Н1 хроматина ЭСК. Номер спектров соответствует номеру пятна на 2D-электрофореграмме. Подробное описание содержания белков в каждом пятне приведено в табл. S1 [25]

лена. Ацетилирование одного из наиболее изученных сайтов – асК34-Н1.4, является отличительным признаком промоторов транскрипционно активных генов и помогает привлекать к промоторам комплекс инициации транскрипции TFIID [27]. Однако мы не обнаружили асК34-Н1.4 ни в одном из исследованных типов клеток. В то же время мы наблюдали

дали метилирование в этой позиции варианта Н1.4 в НИН/ЗТЗ и МЭФ, но не в ЭСК. Мы предполагаем, что деметилирование К34-Н1.4 ЭСК может способствовать ацетилированию в этом сайте и облегчать рекрутирование транскрипционного фактора TFIID к промоторным областям. Кроме того, согласно нашим данным, Н1 ЭСК характеризуется наличием

Потенциальные ПТМ вариантов гистона H1 хроматина NH/3T3, МЭФ и ЭСК. Модификации, выделенные жирным шрифтом, описаны ранее [8]

Клетки	H1	Модификации	Положение сайта модификации
NH/3T3	H1.0	ацетилование	K12 , K132, K136, K137, K149
		метилование	K139, K155, K156
		фосфорилирование	S135, T153
	H1.1	ацетилование	K17
		метилование	K116, K121, K125
		фосфорилирование	S2 , S115 , T120
	H1.2	ацетилование	K17
		метилование	K46 , K63 , K90, K97 , K117 , K121
		фосфорилирование	S2 , S41, S89, T96, S113
	H1.3	ацетилование	K17
		метилование	K47 , K64
	H1.4	ацетилование	K17
		метилование	K34 , K46 , K63 , K195, K197, K200, K202 , K205
		фосфорилирование	T18, S36, S41, T45
	H1.5	ацетилование	K17 , K26, K12, K180
метилование		K27 , K31, K51, K62, K63 , K74	
фосфорилирование		S18 , T25, S40, S57, S111, T121, T132	
МЭФ	H1.0	ацетилование	K12 , K180, K182, K184, K188
		метилование	K14, K69, K73
		фосфорилирование	S66, T84, S185
	H1.1	ацетилование	K17 , K22 , K23, K29
		метилование	K35 , K116, K121, K125
		фосфорилирование	T24, S115 , T120, S123
	H1.2	ацетилование	K17 , K153, K156, K157, K159, K206, K210
		метилование	K21, K22, K46 , K106 , K117 , K121, K148
		фосфорилирование	S2 , S41, T154 , T173
	H1.3	ацетилование	K17
		метилование	K47 , K64
		фосфорилирование	T18
	H1.4	ацетилование	K17
		метилование	K34 , K46 , K63 , K195, K197, K200, K202 , K205
		фосфорилирование	S36 , S41 , T45, S204
H1.5	ацетилование	K17 , K26, K143	
	метилование	K27 , K31, K45 , K62, K74, K134, K144, K147, K191, K193	
	фосфорилирование	S111, T132, T149, S192	
ЭСК	H1.0	ацетилование	K12 , K17, K20, K121, K122, K125, K127, K136, K137, K147, K148, K149, K155, K184, K188
	H1.1	ацетилование	K17 , K83, K87 , K133, K134, K136, K137, K144, K167, K168, K183
		метилование	K108, K116, K148, K151, K152, K154, K155, K160, K161, K179, K185
		фосфорилирование	T24, S88, S115 , T120, S123, S129, T146, T149, S159, S163, S180
	H1.2	ацетилование	K17 , K81, K122 , K127 , K130, K149, K153, K156, K157, K172, K175, K176, K178
		метилование	K46 , K63 , K75, K121, K148 , K168
		фосфорилирование	T154 , S173 , T180
	H1.3	ацетилование	K17 , K154, K157, K158
		метилование	K47 , K64 , K75
		фосфорилирование	T155
	H1.4	ацетилование	K17
		метилование	K46 , K63 , K75
	H1.5	ацетилование	K17
		метилование	K45, K74

асK83 и асK87 в Н1.1 и асK81 в Н1.2. Снижение положительного заряда в этой области вследствие ацетилирования аминокислотных остатков лизина может привести к дестабилизации взаимодействий Н1 с ДНК и, в свою очередь, способствовать образованию локально релаксированного состояния хроматина.

Образование «открытого» хроматина также может облегчаться ацетилированием остатков лизина в С-концевых областях вариантов Н1.1–Н1.3. Более того, большинство из этих С-концевых ЭСК-специфичных сайтов ацетилирования и метилирования вариантов Н1.1–Н1.3 расположены в мотивах (S/T)PXK или (S/T)PXZ вблизи фосфорилированных остатков серина и треонина. Их потенциальная биологическая роль и механизм регуляции взаимодействия Н1–ДНК, опосредуемый ацетилированием/метилованием лизинов в мотивах (S/T)PXK или (S/T)PXZ, более подробно обсуждаются в разделе «Фосфорилирование».

Фосфорилирование

Нами идентифицирован ряд сайтов фосфорилирования гистонов Н1, таких, как Т24, S115, Т120 и S123 в Н1.1, S2, S41, Т154 и Т173 в Н1.2, характерных как для дифференцированных клеток, так и для ЭСК. В то же время несколько потенциальных сайтов фосфорилирования подтипов Н1 выявлено исключительно в ЭСК: S129, Т146, Т149, S159, S163 и S180 в Н1.1, Т180 в Н1.2 и Т155 в Н1.3 (рис. 5, табл. S2 [25]). Идентифицированные сайты фосфорилирования расположены в основном в С-концевых доменах Н1, в том числе в мотивах (S/T)PXK и (S/T)PXZ (рис. 5), которые фосфорилируются во время митоза и модулируют тем самым состояние хроматина [15, 28–34]. Вопрос о функциональной связи фосфорилирования и/или его отсутствия в ряде сайтов других подтипов Н1 с поддержанием плюрипотентности ЭСК и способностью дифференцировки этих клеток остается пока открытым.

Известно, что фосфорилирование S173 (Н1.2) и S187 (Н1.4), происходящее во время интерфазы, необходимо для релаксации хроматина и активации транскрипции [15, 30–32]. Принимая во внимание тот факт, что эти остатки серина лежат в пределах областей, структурно напоминающих так называемые участки с механизмом двоичного метилирования/фосфорилирования (methyl-phospho switch regions) коровых гистонов, метилирование K172 Н1.2 в ЭСК может способствовать фосфорилированию соседнего S173. В свою очередь, pS173 может стимулировать ацетилирование K172, приводящее к активации транскрипции.

Мы идентифицировали несколько спаренных ПТМ, таких, как meK148/pT149–Н1.1

и meK179/pS180 (Н1.1 в ЭСК), meK191/pS192 (Н1.5 в МЭФ), которые расположены в основном в С-концевых областях белков (рис. 5). Их структурная организация также напоминает области methyl-phospho switch regions основных гистонов. Один из примеров данного типа регуляции – сайт K9/S10 в гистоне H3 [35–38]. Регуляторное состояние сайта K9/S10 характеризуется стабильным meK и динамическим фосфорилированием остатка S/T, который находится вблизи К. Фосфорилирование S10 и S28 в H3 приводит к ацетилированию в K9 и K27 соответственно, что способствует активации транскрипции [39].

Кроме того, мы также идентифицировали ряд сайтов ацетилирования/фосфорилирования, включая асK17/pT18 (Н1.4 и Н1.5 в клетках NIH/3T3), асK17/pT18 (Н1.3 в МЭФ), асK23/pT24 (Н1.1 в МЭФ), асK184/pS185 (Н1.0 в МЭФ), асK153/pT154 (Н1.2 в МЭФ и ЭСК), асK154/pT155 (Н1.3 в ЭСК) и асK172/pS173 (Н1.2 в ЭСК). Эти области ацетилирования/фосфорилирования характерны как для ЭСК, так и для дифференцированных клеток. Их структурная организация также напоминает области methyl-phospho switch regions за исключением того, что метилирование изменяется на ацетилирование. Возможно, что и в данном случае мы имеем дело с участками methyl-acetyl-phospho switch-регуляции, рассмотренными выше [40, 41], и ацетилирование этих сайтов также может приводить к активации транскрипции. Однако эта гипотеза требует дальнейшей экспериментальной проверки.

Цитруллинг

Ранее было показано, что цитруллинг Н1.2–Н1.4 в R54 способствует приобретению и поддержанию состояния плюрипотентности клеток [42]. Фактически это проявляется в нарушении связывания Н1 с хроматином, что вызывает формирование «открытого» состояния хроматина. Цитруллинг – это процесс замены аргинина на цитруллин, которое приводит к смещению пика пептида ERSGVSLAALK на 0.9844 м/з в масс-спектрах. Мы наблюдали смещенный пик низкой интенсивности в области 1131.64 м/з, однако вероятность его правильного отнесения составляет 9.8 ppm. При анализе спектров мы не учитывали пики свыше 3.0 ppm. Таким образом, мы не можем точно показать, имеет ли место цитруллинг R54 в наших образцах Н1.2–Н1.4 из ЭСК.

Формилирование

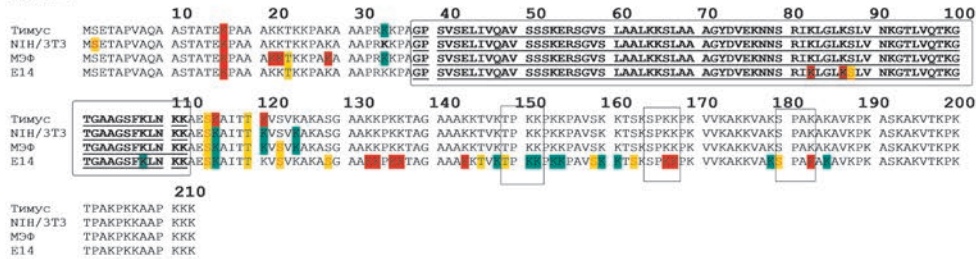
Известно, что Н1.2 в положениях K63–K85 и K97 в тканях мыши, но не в хроматине иммортализованных клеточных линий, может подвергаться фор-

Рис. 5. Потенциальные ПТМ вариантов Н1 из клеток NIH/3T3, МЭФ и E14

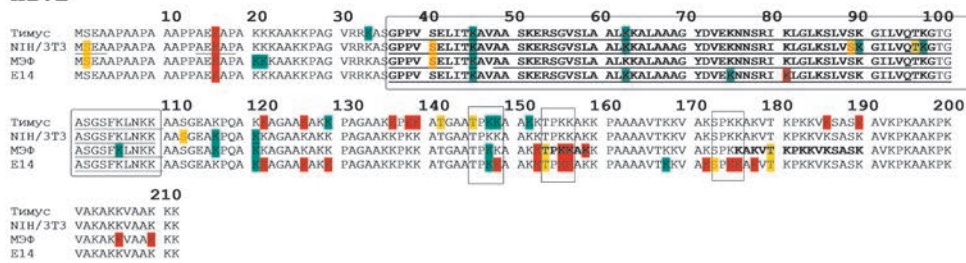
H1.0



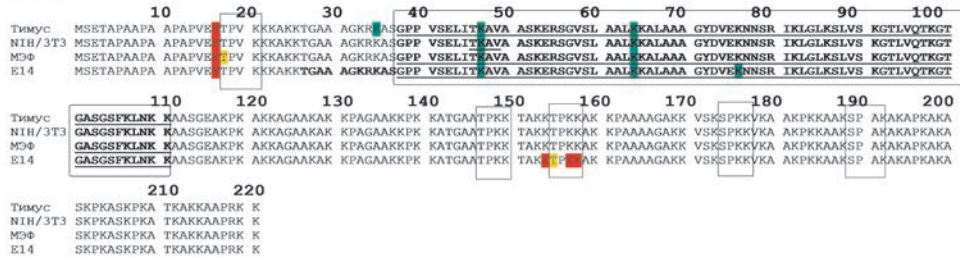
H1.1



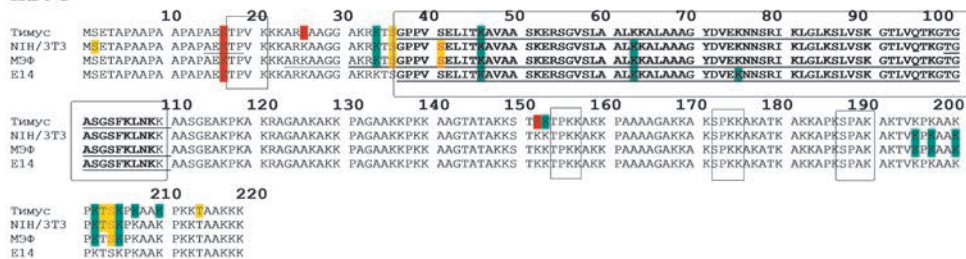
H1.2



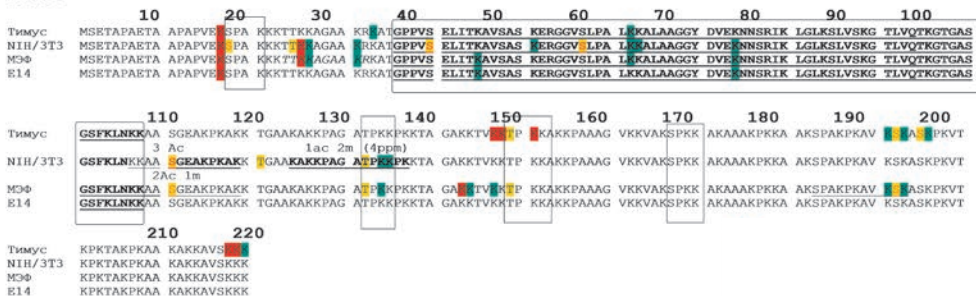
H1.3



H1.4



H1.5



- █ – ацетилирование лизина
- █ – метилирование лизина/аргинина
- █ – фосфорилирование треонина
- █ – фосфорилирование серина
- █ – окисление метионина
- Глобулярный домен белка
- S/PTXK-мотив

милированию [43]. Мы также не идентифицировали сайты формилирования H1 в изученных нами клеточных линиях. Роль данной ПТМ неизвестна, но предполагается, что формилирование может катализироваться неким специфическим ферментом во время деметилирования остатков лизина аминоксидазой LSD1 [44].

Окисление

Нами идентифицирован сайт окисления метионина до метионинсульфоксида MetO [45] в положении M31 гистона H1.0 дифференцированных клеток, но не в ЭСК (табл. 2S [25]). Положение остатков M в белках часто способствует образованию гидрофобных связей между их атомами серы и кольцами ароматических остатков триптофана, фенилаланина или тирозина [46]. Эти гидрофобные серно-кольцевые связи создают структурную стабильность белков, примерно равную стабильности ионного солевого мостика [46]. Взаимодействие с M устанавливает оптимальное положение, необходимое для обеспечения антиоксидантной защиты ароматических аминокислот. Окисление метионина до MetO разрушает эту гидрофобную связь и может влиять на формирование нормальной трехмерной структуры белка. Окисленные белки характеризуются повышенной гидрофобностью поверхности [47], что коррелирует с возрастным увеличением содержания MetO [45]. Отсутствие сайтов окисления H1 в ЭСК согласуется с неограниченным потенциалом самообновления этих клеток.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В представленном исследовании проведено сравнение потенциальных сайтов ПТМ гистона H1 в дифференцированных и эмбриональных стволовых клетках мыши. Выявлено сходство общих уровней метилирования/ацетилирования H1.3–H1.5, природы и положения посттрансляционных модификаций гистонов H1.3–H1.5 в ЭСК и дифференцированных клетках. При этом уровни ацетилирования H1.0 и H1.2 в ЭСК (в дополнение к ранее известным фактам о снижении уровня их экспрессии в хроматине ЭСК [20]) в целом выше, чем в гистонах дифференцированных

клеток (рис. 5). Большинство потенциальных сайтов ацетилирования H1.0 и H1.2 в ЭСК расположены в С-концевых доменах белков, а именно в областях 97–121 и 145–169. Эти области локализованы в двух известных субдоменах С-концевого фрагмента, участвующих в стабилизации конденсированного хроматина [20, 48]. Уменьшение положительного заряда N- и С-концевых областей белков H1 может ослабить взаимодействие H1–ДНК на входе/выходе ДНК из коровой частицы и предотвратить взаимодействие H1 с регуляторными белками хроматина, такими, как HMGN и HMGBl/2 [49, 50]. Известно, что белки HMGBl/2 способны вытеснять гистон H1 из ДНК-белкового комплекса и тем самым облегчать ремоделирование нуклеосомы, обеспечивая доступность ДНК для факторов транскрипции [51]. Смещение H1 из нуклеосомы должно привести к образованию «открытой» структуры хроматина, что свойственно стволовым клеткам.

Таким образом, открытая структура хроматина плюрипотентных стволовых клеток может формироваться как путем снижения общего уровня экспрессии H1, так и в результате посттрансляционных модификаций вариантов H1.0 и H1.2, приводящих к нарушению их связывания с ДНК и, как следствие, к образованию хроматина с более рыхлой структурой. Биологическая роль наиболее известных в настоящее время модификаций H1 пока не ясна. Необходимы дальнейшие исследования, чтобы определить индивидуальные и совокупные роли этих ПТМ. Эти знания помогут нам глубже понять молекулярные процессы, лежащие в основе функционирования хроматина плюрипотентных клеток. ●

Исследования поддержаны Российским фондом фундаментальных исследований (грант № 18-04-01199). MALDI-масс-спектрометрический анализ белков H1 проводили с использованием научного оборудования ЦКП «Аналитический центр нано- и биотехнологий СПбПУ» на базе ФГАОУ ВО «СПбПУ» при финансовой поддержке Министерства образования и науки Российской Федерации.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- White A.E., Hieb A.R., Luger K. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. № 19122. P. 1–14.
- Ausió J. // *Bioessays.* 2015. V. 37. P. 46–51.
- Crane-Robinson C. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2016. V. 1859. № 3. P. 431–435.
- Song F., Chen P., Sun D., Wang M., Dong L., Liang D., Xu R.M., Zhu P., Li G. // *Science.* 2014. V. 344. № 6182. P. 376–380.
- Zhou B.R., Jiang J., Feng H., Ghirlando R., Xiao T.S., Bai Y. // *Mol. Cell.* 2015. V. 59. № 4. P. 628–638.
- Chikhirzhina E., Starkova T., Polyanchko A. // *Biophysics.* 2018. V. 63. № 6. P. 858–865.
- Starkova T.Y., Polyanchko A.M., Artamonova T.O., Khodorkovskii M.A., Kostyleva E.I., Chikhirzhina E.V., Tomilin A.N. // *Phys. Biol.* 2017. V. 14. P. 016005.
- Kowalski A., Pałyga J. // *Gel Electrophoresis – Principles and Basics.* 2012. V. 8. P. 117–136.
- Parseghian M.H., Newcomb R.L., Hamkalo B.A. // *J. Cell.*

- Biochem. 2001. V. 83. P. 643–659.
10. Happel N., Doenecke D. // *Gene*. 2009. V. 431. P. 1–12.
 11. Izzo A., Kamieniarz K., Schneider R. // *Biol. Chem.* 2008. V. 389. P. 333–343.
 12. Fyodorov D.V., Zhou B.R., Skoultchi A.I., Bai Y. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2018. V. 19. P. 192–206.
 13. Millán-Arino L., Izquierdo-Bouldstridge A., Jordan A. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. V. 1859. P. 510–519.
 14. Khochbin S. // *Gene*. 2001. V. 271. P. 1–12.
 15. Talasz H., Sapojnikova N., Helliger W., Lindner H., Puschen-dorf B. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. P. 32236–32243.
 16. Ponte I., Vidal-Taboada J.M., Suau P. // *Mol. Biol. Evol.* 1998. V. 15. P. 702–708.
 17. Th'ng J.P., Sung R., Ye M., Hendzel M.J. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 27809–27814.
 18. Serrano L., Vazquez B.N., Tischfield J. // *Exp. Biol. Med.* 2013. V. 238. P. 259–270.
 19. Meshorer E., Yellajoshula D., George E., Scambler P.J., Brown D.T., Misteli T. // *Dev. Cell*. 2006. V. 10. № 1. P. 105–116.
 20. Terme J.M., Sesé B., Millán-Ariño L., Mayor R., Izpisúa Belmonte J.C., Barrero M.J., Jordan A. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 35347–35357.
 21. Liskovych M., Chuykin I., Ranjan A., Safina D., Popova E., Tolkunova E., Mosienko V., Minina J., Zhdanova N., Mullins J., et al. // *PLoS One*. 2011. V. 11. P. e27345.
 22. Liskovych M., Ponomartsev S., Popova E., Bader M., Kouprina N., Larionov V., Alenina N., Tomilin A. // *Cell Cycle*. 2015. V. 4. № 8. P. 1268–1273.
 23. Goldknopf I.L., Busch H. // *Physiol. Chem. Phys.* 1975. V. 7. P. 23–30.
 24. Maresca T.J., Heald R. // *Cell Cycle*. 2006. V. 5. P. 589–591.
 25. <https://drive.google.com/open?id=15hmp5ku-JHzy3PXW8vAtHk13jYt97Fty>
 26. Fan Y., Nikitina T., Zhao J., Fleury T.J., Bhattacharyya R., Bouhassira E.E., Stein A., Woodcock C.L., Skoultchi A.I. // *Cell*. 2005. V. 123. № 7. P. 1199–1212.
 27. Kamieniarz K., Izzo A., Dunder M., Tropberger P., Ozretic L., Kirfel J., Scheer E., Tropel P., Wisniewski J.R., Tora L., et al. // *Genes Dev*. 2012. V. 26. № 8. P. 797–802.
 28. Dou Y., Gorovsky M.A. // *Mol. Cell*. 2000. V. 6. P. 225–231.
 29. Chadee D.N., Taylor W.R., Hurta R.A., Allis D., Wright J., Davie J. // *J. Biol. Chem.* 1995. V. 270. P. 20098–20105.
 30. Sarg B., Helliger W., Talasz H., Forg B., Lindner H. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. P. 6573–6580.
 31. Harshman S.W., Young N.L., Parthun M.R., Freitas M.A. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 21. P. 9593–9609.
 32. Liao R., Mizzen C.A. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2016. V. 1859. P. 476–485.
 33. Alexandrow M.G., Hamlin J.L. // *J. Cell Biol.* 2005. V. 168. P. 875–886.
 34. Strunnikov A.V., Hogan E., Koshland D. // *Genes Dev*. 1995. V. 9. P. 587–599.
 35. Daujat S., Zeissler U., Waldmann T., Happel N., Schneider R. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 38090–38095.
 36. Lachner M., Jenuwein T. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2002. V. 14. P. 286–298.
 37. Li Y., Danzer J.R., Alvarez P., Belmont A.S., Wallrath L.L. // *Development*. 2003. V. 130. P. 1817–1824.
 38. Ayyanathan K., Lechner M.S., Bell P., Maul G.G., Schultz D.C., Yamada Y., Tanaka K., Torigoe K., Rauscher F.J. III // *Genes Dev*. 2003. V. 17. № 15. P. 1855–1869.
 39. Rossetto D., Avvakumov N., Cote J. // *Epigenetics*. 2012. V. 10. P. 1098–1108.
 40. Cheung P., Tanner K.G., Cheung W.L., Sassone-Corsi P., Denu J.M., Allis C.D. // *Mol. Cell*. 2000. V. 5. № 6. P. 905–915.
 41. Chadee D.N., Hendzel M.J., Tylopski C.P., Allis C.D., Bazett-Jones D.P., Wright J.A., Davie J.R. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. P. 24914–24920.
 42. Christophorou M.A., Castelo-Branco G., Halley-Stott R.P., Oliveira C.S., Loos R., Radzishewska A., Mowen K.A., Bertone P., Silva J.C., Zernicka-Goetz M., et al. // *Nature*. 2014. V. 507. № 7490. P. 104–108.
 43. Wisniewski J.R., Zougman A., Krüger S., Mann M. // *Mol. Cell. Proteomics*. 2007. V. 6. № 1. P. 72–87.
 44. Shi Y., Lan F., Matson C., Mulligan P., Whetstone J.R., Cole P.A., Casero R.A., Shi Y. // *Cell*. 2004. V. 119. P. 941–953.
 45. Kim G., Weiss S.J., Levine R.L. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1840. P. 901–905.
 46. Valley C.C., Cembran A., Perlmutter J.D., Lewis A.K., Labello N.P., Gao J., Sachs J.N. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 42. P. 34979–34991.
 47. Chao C.C., Ma Y.S., Stadtman E.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. P. 2969–2974.
 48. Lu X., Hansen J.C. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. P. 8701–8707.
 49. Roque A., Ponte I., Suau P. // *Chromosoma*. 2016. V. 1859. P. 510–519.
 50. Murphy K.J., Cutter A.R., Fang H., Postnikov Y.V., Bustin M., Hayes J.J. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. P. 9917–9930.
 51. Stros M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2010. V. 799. P. 101–113.

УДК 602.9:577.218

Новый кластер микроРНК, ответственный за репрограммирование к плюрипотентному состоянию

В. В. Шерстюк^{1,2,3,4#}, Г. И. Давлетшина^{1,2#}, Ю. В. Вяткин^{3,5,6}, Д. Н. Штокало^{5,6,7}, В. В. Власов⁴, С. М. Закиян^{1,2,3,4*}

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 10

²Национальный медицинский исследовательский центр им. академика Е.Н. Мешалкина Министерства здравоохранения РФ, 630055, Новосибирск, ул. Речкуновская, 15

³Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 2

⁴Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

⁵ООО «АкадемДжин», 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 6

⁶Институт Сен-Лорана, 01801, Вобурн, США

⁷Институт систем информатики им. А.П. Ершова СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 6

#Эти авторы внесли равный вклад в написание данной статьи.

*E-mail: zakian@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 31.10.2018

Принята к печати 10.04.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-92-97

РЕФЕРАТ Репрограммирование соматических клеток к плюрипотентному состоянию – сложный, многоэтапный процесс, в регуляции которого участвует множество факторов, в том числе активно изучаемые в последнее время некодирующие РНК, в частности микроРНК. МикроРНК играют важную роль во многих процессах, включая и репрограммирование клеток. Нами изучена возможность репрограммирования фибробластов крысы с делецией участка ДНК, кодирующего кластер из 14 микроРНК (начиная с miR-743a и до miR-465). Показано, что делеция этого участка значительно снижает эффективность репрограммирования клеток. Клетки, полученные в ходе репрограммирования, отличаются от эмбриональных и индуцированных плюрипотентных стволовых клеток крысы, что свидетельствует о незавершенности процесса репрограммирования. Таким образом, можно предположить, что данный кластер микроРНК либо отдельные его представители участвуют в регуляции процесса репрограммирования клеток крысы к плюрипотентному состоянию.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА микроРНК, плюрипотентные стволовые клетки, репрограммирование, CRISPR/Cas9.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; мкРНК – микроРНК; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; CRISPR – Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats; PAM – мотив, прилежащий к протоспейсеру (Protospacer Adjacent Motif); ОТ-ПЦР – обратная транскрипция с последующей полимеразной цепной реакцией; ЩФ – щелочная фосфатаза.

ВВЕДЕНИЕ

Плюрипотентные стволовые клетки – это клетки, способные дифференцироваться в производные всех трех зародышевых листков. Одним из способов получения плюрипотентных стволовых клеток является репрограммирование соматических клеток путем

сверхэкспрессии факторов плюрипотентности Oct4, Sox2, Klf4 и c-Myc [1]. В результате получают так называемые индуцированные плюрипотентные клетки (ИПСК), которые широко применяются для изучения процессов раннего развития и дифференцировки, моделирования наследственных заболеваний, а также

в качестве перспективного источника клеточных производных, используемых в регенеративной медицине. Механизмы, отвечающие за процесс репрограммирования, хорошо изучены, известны изменения в экспрессии генов, организации хроматина и метаболизме. Кроме того, в данном процессе участвуют микроРНК (мкРНК) – класс малых некодирующих РНК длиной от 18 до 23 нуклеотидов, осуществляющих посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов. мкРНК играют важную роль в регуляции множества процессов, включая развитие организма и дифференцировку клеток. В настоящее время обнаружено множество мкРНК, экспрессирующихся в плюрипотентных стволовых клетках человека, мыши и крысы. Наиболее изученные мкРНК, участвующие в процессе репрограммирования, относятся к кластерам miR-290-295, miR-302-367 и семейству miR-200 [2]. При этом участие многих других мкРНК в репрограммировании клеток, а также их функции остаются неизвестными. Ранее нами был проведен анализ экспрессии мкРНК в эмбриональных стволовых клетках (ЭСК), ИПСК и эмбриональных фибробластах крысы. В результате на X-хромосоме выявлен кластер мкРНК (начиная с miR-743a и до miR-465) с повышенным уровнем экспрессии в плюрипотентных клетках по сравнению с фибробластами [3]. Кроме того, экспрессия некоторых мкРНК данного кластера снижается в ходе спонтанной дифференцировки плюрипотентных клеток. Полученные данные позволили нам предположить, что эти мкРНК могут участвовать в процессах самообновления и поддержания плюрипотентного состояния стволовых клеток, а также в их репрограммировании. Для проверки участия данных мкРНК в процессе репрограммирования мы получили фибробласты крысы, несущие делецию участка генома, кодирующего изучаемые мкРНК. Делеция данного участка нарушает процесс репрограммирования к плюрипотентному состоянию, что свидетельствует в пользу участия этого кластера мкРНК либо некоторых его представителей в регуляции этого процесса.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Направляющие РНК, фланкирующие целевой участок с мкРНК, подбирали с использованием онлайн платформы Benchling (<https://benchling.com/crispr>). В итоге выбраны следующие прото-спейсеры: 5'-СТТАГТТАААСАГАТТАГГАС-3' (РАМ-TGG), 5'-ТТГСТАГАГТААТАССААСТ-3' (РАМ-TGG). Олигонуклеотиды встраивали в вектор рХ-458-2sgRNA по сайтам BbsI и BsaI. Вектор рХ-458-2sgRNA получен путем гидролиза эндонуклеазами рестрикции XbaI и KpnI вектора рХ333 (Addgene Plasmid #64073), выделения и очистки

фрагмента размером 444 п.н. и встройке данного фрагмента в вектор pSpCas9(BB)-2A-GFP (PX458) (Addgene Plasmid #48138), гидролизованый XbaI и KpnI.

Фибробласты крысы культивировали при 37°C и 5% CO₂ в смеси сред DMEM и F12 (1 : 1) (Lonza) с добавлением 10% эмбриональной бычьей сыворотки (Gibco, США), GlutaMAX (Gibco), смеси 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина (Gibco). Для получения делеции фибробласты (4×10^5) самцов крысы электропорировали плазмидой рХ-458-2sgRNA (5 мкг) с клонированными направляющими РНК с помощью прибора Neon Transfection System (Invitrogen, США). На следующий день клетки сортировали на приборе S3e Cell Sorter (Bio-Rad, США) и субклонировали в 96-луночные планшеты. Через 7–14 дней лунки просматривали под микроскопом и отбраковывали содержащие несколько островков роста, чтобы исключить поликлональные линии. Моноклональные линии размножали, выделяли ДНК и анализировали с помощью ПЦР и секвенирования по Сэнгеру. Последовательности праймеров приведены в табл. 1.

Для репрограммирования фибробласты (5×10^4) трансдуцировали двумя препаратами лентивирусов, кодирующих факторы плюрипотентности Oct4, Sox2, Klf4, с-Мус и тетрациклиновый транса-ктиватор. За 1 ч до трансдукции в среду добавляли 4 мкг/мл полибрена (Sigma-Aldrich, США). Препараты лентивирусов получали с использованием векторов TetO-FUW-OSKM (Addgene Plasmid #20321) и FUdeltaGW-rtTA (Addgene Plasmid #19780) и векторов, кодирующих белки, необходимые для упаковки вирусных частиц, psPAX2 (Addgene Plasmid #12260) и рMD2.G (Addgene Plasmid #12259), по протоколу, описанному ранее [4]. На следующие сутки после трансдукции в среду добавляли 2 мкг/мл доксицилина (Sigma-Aldrich), на четвертые сутки фибробласты пересаживали на слой митотически неактивных эмбриональных фибробластов мыши и культивировали в среде N2B27, состоящей из смеси N2 (DMEM/F12 с добавкой N2) (Gibco) и B27 (Neurobasal с добавкой B27) (Gibco),

Таблица 1. Последовательности праймеров для ПЦР-анализа линий клеток с делецией целевого локуса

Праймер	Последовательность, 5'–3'
FL1	САТАССТСАГАААСГСААААС
FL2	АГТТААТАТСГАААААГССАСС
IN1	САГААТАТАТГГСТТАТТГГА
IN2	ГТТТТТАТАСАТАСГСАААСС
IN3	ТАТААГААТГАААААГССААААС

а также GlutaMAX, смеси 100 ед./мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, 0.1 мМ 2-меркаптоэтанола (Sigma-Aldrich), 1000 ед./мл LIF мыши (StemRD), 1 мкМ PD0325901 (StemRD) и 3 мкМ CHIR99021 (StemRD). Репрограммирование проводили в трех повторностях. На 10–14 день репрограммирования некоторые колонии частично механически пересаживали на отдельные ячейки для размножения и дальнейшего анализа, на 20 день окрашивали на щелочную фосфатазу (ЩФ) по протоколу, описанному ранее [4].

Иммунофлуоресцентное окрашивание осуществляли как описано ранее [4]. Для анализа использовали следующие первичные антитела: SSEA1 (sc-21702, 1:25), Oct4 (sc-5279, 1:200) и Sox2 (sc-20088, 1:200) (Santa Cruz Biotechnology, США). Для визуализации использовали вторичные антитела к иммуноглобулинам кролика или мыши, конъюгированные с флуоресцентными красителями Alexa 488 и Alexa 568 (Life Technologies, США).

РНК выделяли с использованием реагента TRIzol (Invitrogen) по протоколу производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили с использованием 500 нг РНК, обратной транскриптазы M-MLV (Invitrogen) и Random Hexamer primers (Thermo Scientific, США). Полученную кДНК анализировали на приборе LightCycler480 (Roche, Швейцария) с использованием набора БиоМастер HS-qPCR SYBR Blue («Биолабмикс», Россия). Реакцию амплификации проводили при следующих условиях: 95 °С, 5 мин; 40 циклов – 95 °С, 15 с и 60 °С, 1 мин. Последовательности праймеров приведены в табл. 2.

Поиск потенциальных мишеней проводили с использованием программ TargetSpy v1.1 [5], miRanda v3.3a [6] и TargetScan v7.0 [7]. Выбирали только гены-мишени, предсказанные всеми тремя программами и имеющие пониженный уровень экспрессии в ЭСК и ИПСК крысы по сравнению с фибробластами. Данные об экспрессии мРНК получены ранее [8].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Исследованный нами кластер мкРНК локализуется в участке 37 длинного плеча X-хромосомы и состоит из 14 мкРНК: miR-743a, miR-743b, miR-742, miR-883, miR-471, miR-3551, miR-741, miR-463, miR-880, miR-878, miR-881, miR-871, miR-3580, miR-465 (рис. 1А). Гипотезу об участии данного кластера мкРНК в процессе репрограммирования к плюрипотентному состоянию мы проверяли с использованием нокаута этих мкРНК путем делеции участка генома, их кодирующего. Делецию получали с помощью системы CRISPR/Cas9 с двумя направляющими РНК, фланкирующими делетируемый участок. В результате получены 94 субклонированные линии фибробла-

Таблица 2. Последовательности праймеров для анализа экспрессии маркеров плюрипотентного состояния

Ген	Последовательность, 5'–3'
endo-Oct4	CACACTCTACTCGGTCCCTT TGCTTTCAATTCCCTCCCA
endo-Sox2	TATCGAGATAAACATGGCAA CAGAATCAAACCCAGCAA
endo-Klf4	TCCGATCTACATTTATGACC TTATTGCACATCTGAAACCAC
endo-c-Myc	TCAAAGCCTAACCTCACAA GCAGTTAACATTATGGCTGA
Nanog	TACCTCAGCCTCCAGCAGAT GCAATGGATGCTGGGATACT
Esrrb	GGCGTTCTTCAAGAGAACCA CCCACCTTGAGGCATTTTCAT
TdGF1	TTGGACTTGTGTGCTGGGATA CGGAAGGCACAAGCTGA
Tcl1a	CCGATTAATATCTCACTCAC TCTCTTATTTCTTGGCATCT
Utf1	TTGCTCCCCAGTCTCTGAAT GAGAAACGGTTTGGTTCGAAG
Dnmt3l	AAGACCCATGAAACCTTGAACC GTTGACTTCGTACCTGATGACC
Pecam1	TCCTAAGAGCAAAGAGCAAC TGGGCTTGTCTGTGAATGT
Dppa3	TGGGGAAATCTCTTCTAATTGCT CTTCTAAATCAAACCTACCAGGCTT

стов самцов крысы, из которых семь несли делецию целевого участка ДНК (рис. 1Б). Наличие делеции в субклонированных линиях проверяли методом ПЦР с использованием фланкирующих праймеров. Кроме того, проверяли присутствие транслокации делетируемого участка с использованием вложенных праймеров (рис. 1В). В некоторых линиях наличие делеции подтверждали секвенированием по Сэнгеру (рис. 1Г).

Экспрессию экзогенных факторов плюрипотентности активировали параллельно в линиях фибробластов с делецией кластера мкРНК и в контрольной линии клеток, которую, во-первых, использовали для получения линий с нокаутом, а, во-вторых, электропорировали плазмидой pX-458-2sgRNA, не кодирующей направляющие РНК. Эффективность репрограммирования фибробластов с нокаутом мкРНК оказалась значительно ниже по сравнению с контрольной линией (рис. 2А). В ходе репрограммирования некоторые колонии как из контрольных, так и из экспериментальных лунок механически частично пересаживали для дальнейшего анализа. Морфология клеток, полученных в контрольном эксперименте, соответствует морфологии ЭСК крысы. Данные ИПСК-подобные клетки успешно культивируются, сохраняют морфологию и положительно окрашива-

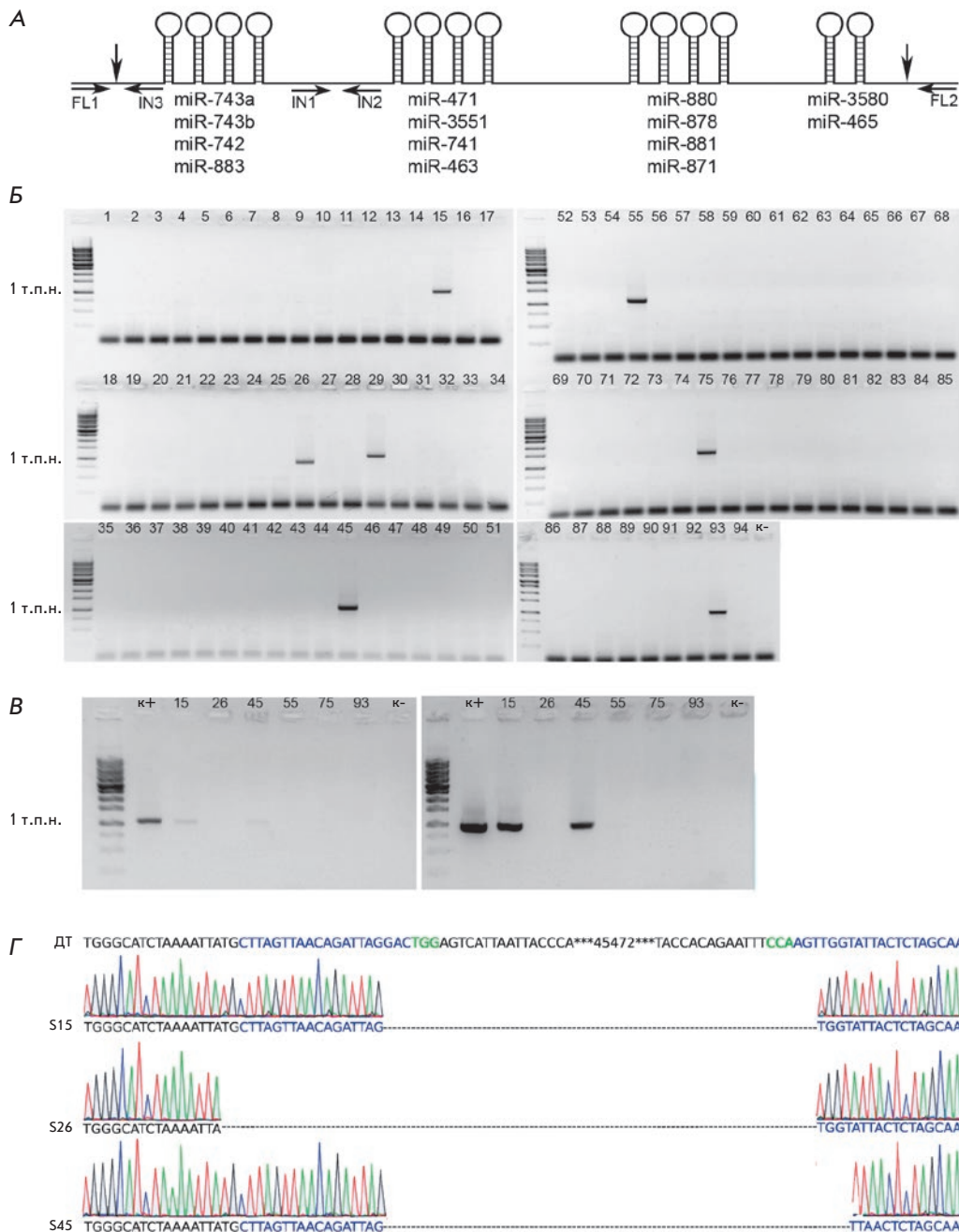


Рис. 1. А – схема исследуемого кластера мкРНК. Горизонтальными стрелками обозначены праймеры, вертикальными – сайты внесения двухцепочечных разрывов. Б – результаты выявления делеции в субклонированных линиях. Используются праймеры FL1 и FL2. В – анализ поликлональности субклонированных линий (слева) и наличия транслокации (справа) с использованием пар праймеров FL1–IN3 и IN1–IN2 соответственно. к+ и к- – положительный и отрицательный контроли ПЦР. Г – примеры секвенирования по Сэнгеру ПЦР-продуктов, полученных с праймеров FL1 и FL2, при наличии делеции целевого участка. ДТ – дикий тип

ются на ЩФ после отмены экспрессии экзогенных факторов плюрипотентности (рис. 2Б). Они экспрессируют маркеры плюрипотентного состояния, что подтверждается иммунофлуоресцентным окрашиванием и ОТ-ПЦР в реальном времени (рис. 2В,Г).

Клетки, полученные при репрограммировании фибробластов с нокаутом кластера мкРНК miR-743a–miR-465, имеют эпителиальную морфологию, что говорит о прохождении начального этапа репрограммирования – мезенхимально-эпителиального

перехода. Однако эти клетки в отличие от контрольной линии образуют неплотные колонии. Процесс репрограммирования происходит не полностью, клетки гибнут в отсутствие доксициклина, что свидетельствует о зависимости от экспрессии экзогенных факторов плюрипотентности. Стоит отметить, что клетки с нокаутом кластера miR-743a–miR-465 положительно окрашиваются на ЩФ и SSEA1, подтверждая прохождение начальных этапов репрограммирования плюрипотентности (рис. 2Б,В). В этих

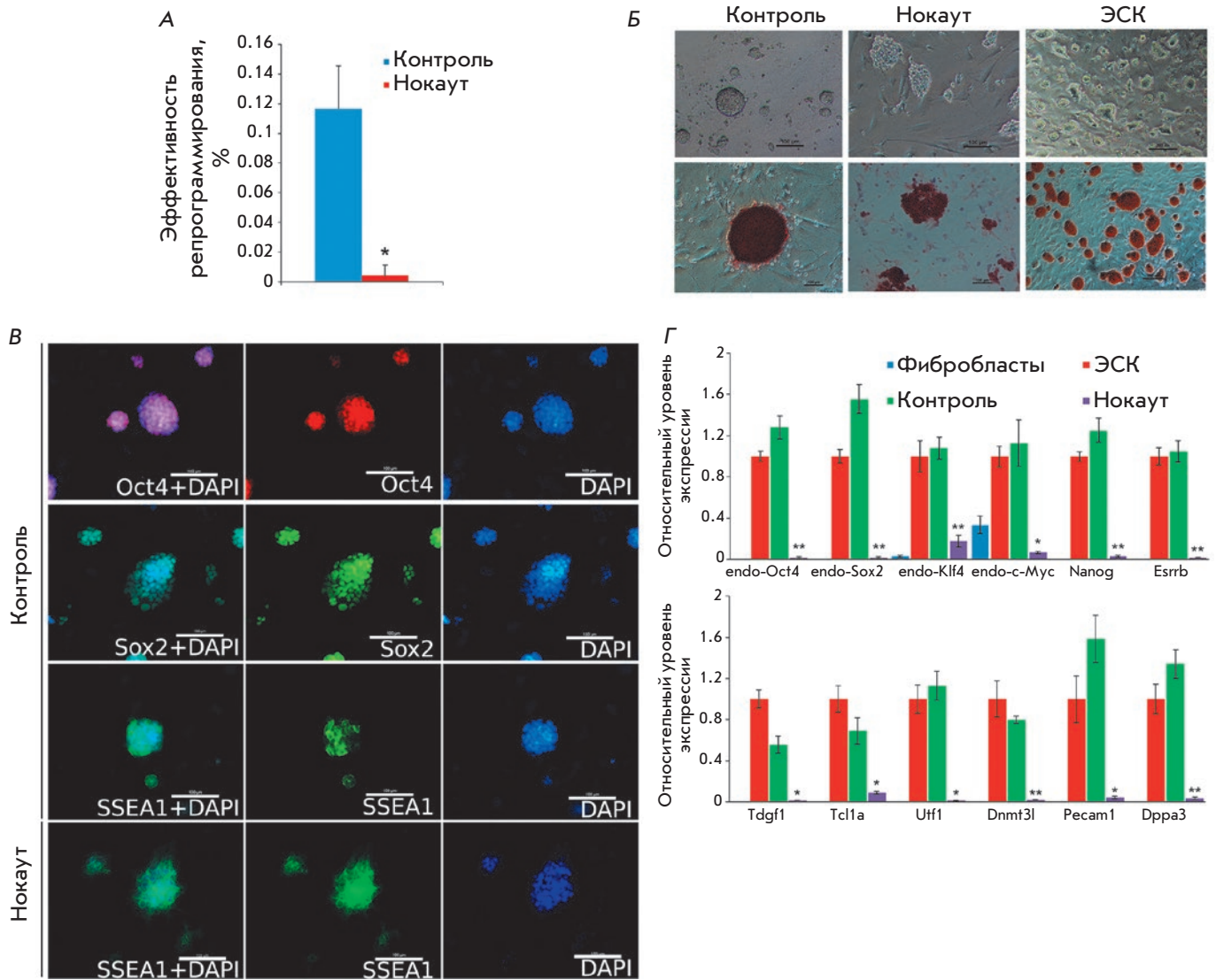


Рис. 2. А – эффективность репрограммирования линий фибробластов – контрольной и с нокаутом. Звездочкой обозначены статистически значимые отличия, $*p < 0.05$, критерий Манна–Уитни. Б – репрезентативные изображения колоний, полученных в результате репрограммирования, а также ЭСК крысы. Фазовый контраст сверху, окраска на ЩФ снизу. В – иммунофлуоресцентное окрашивание колоний, полученных в результате репрограммирования. Масштаб 100 мкм. Г – ОТ-ПЦР-анализ экспрессии маркеров плюрипотентного состояния. Звездочками обозначены статистически значимые отличия экспрессии генов в клетках с нокаутом по сравнению с контролем, $*p < 0.05$, $**p < 0.005$, *t*-критерий Стьюдента

клетках наблюдается также экспрессия маркеров плюрипотентности, но ее уровень значительно ниже, чем в контрольной группе клеток (рис. 2Г).

В число мишеней исследуемых мкРНК входят гены сигнального пути TGF- β , ингибирование которого способствует репрограммированию [9]. Значительную долю составляют гены сигнального пути Wnt, ингибирование которого на ранних стадиях необходимо для успешного репрограммирования клеток [10]. Присутствуют также известные ингиби-

торы процесса репрограммирования Cdkn1a и Zeb1 [11, 12].

мкРНК играют важную роль в регуляции множества процессов, в том числе и в репрограммировании клеток к плюрипотентному состоянию. В настоящее время изучена лишь малая часть мкРНК, экспрессирующихся в плюрипотентных клетках и вовлеченных в процесс репрограммирования. Появление систем редактирования генома значительно ускорило прогресс в изучении функций как белоккодирующих

генов, так и некодирующих РНК. В отличие от ингибиторов мкРНК, основанных, например, на LNA-олигонуклеотидах, система CRISPR/Cas9 позволяет добиться более специфичного и постоянного нокаута мкРНК. Кроме того, использование CRISPR/Cas9 делает возможным нокаут целого кластера мкРНК.

Исследованный кластер мкРНК расположен вблизи белоккодирующего гена *Slitrk2*. Схожие кластеры мкРНК обнаружены у других видов млекопитающих, в том числе у мыши и человека [13]. Предполагается, что у разных видов эти кластеры мкРНК имеют общего предка, но значительные различия в последовательностях пре-мкРНК и seed-регионов свидетельствуют о быстрой эволюции этих мкРНК [13, 14]. Высокий уровень экспрессии данных кластеров мкРНК выявлен в семенниках мыши и человека, а их участие в регуляции сперматогенеза у мышей показано путем делеции некоторых из них [13–15]. Функционально подтверждено существование общих генов-мишеней у данных мкРНК мыши и человека, несмотря на различия в их нуклеотидных последовательностях [14]. Стоит также отметить, что мкРНК данного кластера способны функционально компенсировать взаимное отсутствие [13]. В отличие от мыши, уровень экспрессии некоторых мкРНК у крысы, в частности *mir-741*, сравним в семенниках и плюрипотентных клетках, что может свидетельствовать о видоспецифичных особенностях плюрипотентных клеток крысы [3, 15]. Тем не менее, в огромном пуле потенциальных генов-мишеней могут быть

представлены общие гены, участвующие в процессе репрограммирования у разных видов. Таким образом, этот кластер мкРНК может принимать участие в репрограммировании не только клеток крысы, но это требует дальнейшего изучения.

Нарушение процесса репрограммирования при делеции участка ДНК, содержащего кластер из 14 мкРНК (с *miR-743a* по *miR-465*), позволяет предположить вовлеченность всех или некоторых из них в данный процесс. Стоит отметить, что делеция такого значительного по размеру района могла затронуть либо неизвестные регуляторные элементы, либо неаннотированные гены. Тем не менее, наше исследование можно рассматривать как первый шаг в изучении данного кластера мкРНК в процессе репрограммирования клеток к плюрипотентному состоянию. ●

Авторы признательны Е.В. Григорьевой за помощь в проведении экспериментов по репрограммированию клеток крысы, А.А. Малаховой за помощь в сортировке клеток. Также авторы благодарны Андреа Вентура (Andrea Ventura), Фенгу Жангу (Feng Zhang), Рудольфу Джанишу (Rudolf Jaenisch), Конраду Хочедлингеру (Konrad Hochedlinger) и Дидье Трону (Didier Trono) за плазмиды, размещенные в депозитарии Addgene.

Работа поддержана грантом РФФ № 16-14-10084.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Takahashi K., Yamanaka S. // *Cell*. 2006. V. 126. № 4. P. 663–676.
2. Greve T.S., Judson R.L., Blelloch R. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2013. V. 29. P. 213–239.
3. Sherstyuk V.V., Medvedev S.P., Elisaphenko E.A., Vaskova E.A., Ri M.T., Vyatkin Y.V., Saik O.V., Shtokalo D.N., Pokushalov E.A., Zakian S.M. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 2787.
4. Grigor'eva E.V., Shevchenko A.I., Medvedev S.P., Mazurok N.A., Zhelezova A.I., Zakian S.M. // *Acta Naturae*. 2015. V. 7. № 4. P. 56–69.
5. Sturm M., Hackenberg M., Langenberger D., Frishman D. // *BMC Bioinformatics*. 2010. V. 11. P. 292.
6. Betel D., Wilson M., Gabow A., Marks D.S., Sander C. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. Database issue. P. D149–153.
7. Agarwal V., Bell G.W., Nam J.W., Bartel D.P. // *Elife*. 2015. V. 4. e05005.
8. Vaskova E.A., Medvedev S.P., Sorokina A.E., Nemudryy A.A., Elisaphenko E.A., Zakharova I.S., Shevchenko A.I., Kizilova E.A., Zhelezova A.I., Evshin I.S., et al. // *Stem Cells Dev.* 2015. V. 24. № 24. P. 2912–2924.
9. Ichida J.K., Blanchard J., Lam K., Son E.Y., Chung J.E., Egli D., Loh K.M., Carter A.C., Di Giorgio F.P., Koszka K., et al. // *Cell Stem Cell*. 2009. V. 5. № 5. P. 491–503.
10. Aulicino F., Theka I., Ombrato L., Lluís F., Cosma M.P. // *Stem Cell Reports*. 2014. V. 2. № 5. P. 707–720.
11. Brosh R., Assia-Alroy Y., Molchadsky A., Bornstein C., Dekel E., Madar S., Shetzer Y., Rivlin N., Goldfinger N., Sarig R., et al. // *Cell Death Differ.* 2013. V. 20. № 2. P. 312–320.
12. Samavarchi-Tehrani P., Golipour A., David L., Sung H.K., Beyer T.A., Datti A., Woltjen K., Nagy A., Wrana J.L. // *Cell Stem Cell*. 2010. V. 7. № 1. P. 64–77.
13. Zhang F., Zhang Y., Lv X., Xu B., Zhang H., Yan J., Li H., Wu L. // *Mol. Biol. Evol.* 2019. V. 36. № 4. P. 663–678.
14. Ramaiah M., Tan K., Plank T.M., Song H.W., Dumdie J.N., Jones S., Shum E.Y., Sheridan S.D., Peterson K.J., Gromoll J., et al. // *EMBO Rep.* 2019. V. 20. № 2. P. e46566.
15. Ota H., Ito-Matsuoka Y., Matsui Y. // *PLoS One*. 2019. V. 14. № 2. P. e0211739.

УДК 615.277.3

Бактериофаг MS2 – средство доставки для таргетной химиотерапии солидных опухолей

Е. Ф. Колесанова^{1*}, М. В. Мельникова¹, Т. Н. Большакова², Е. Ю. Рыбалкина³, И. Г. Сивов⁴¹Научно-исследовательский институт биомедицинской химии им. В.Н. Ореховича, 119121, Москва, ул. Погодинская, 10, стр. 8²Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, 123098, Москва, ул. Гамалеи, 18³НИИ канцерогенеза Федерального государственного бюджетного учреждения «Национальный медицинский исследовательский центр онкологии имени Н.Н. Блохина» Министерства здравоохранения Российской Федерации, 115478, Москва, Каширское шоссе, 23⁴ООО «Биотехнология», 119048, Москва, ул. Ефремова, 20

*E-mail: ekaterina.kolesanova@ibmc.msk.ru

Поступило в редакцию 29.01.2019

Принято к печати 28.03.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-2-98-101

РЕФЕРАТ Бактериофаг MS2 был использован для таргетной доставки индуктора апоптоза, Tl⁺, в ткань опухоли. Таргетная доставка обеспечивалась iRGD-пептидом, лигандом интегринов, локализуемых преимущественно на поверхности эндотелиоцитов новообразованной сосудистой сети в опухолевой ткани и некоторых опухолевых клетках. Синтезированный пептид конъюгировали с капсидными белками MS2. Ионы Tl⁺ из TlNO₃ проникали внутрь частиц фага и прочно связывались с его РНК. Препараты MS2, модифицированного пептидом и наполненного Tl⁺, вызывали гибель культивируемых клеток двух типов рака молочной железы человека и некроз ксенографтов этих опухолей. Ни конъюгат бактериофага MS2 с пептидом без Tl⁺, ни заполненный Tl⁺ фаг без пептида, ни он же с неконъюгированным пептидом в растворе не вызывали таких эффектов. Препарат не проявлял острой токсичности в терапевтической дозе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА бактериофаг MS2, iRGD-пептид, ионы таллия (I), рак молочной железы, таргетная терапия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ED₅₀ – эффективная доза (effective dose), при которой эффект составляет 50% от максимально возможного; LD₅₀ – доза вещества, введение которой вызывает гибель 50% животных; SDS – sodium dodecyl sulphate (додецилсульфат натрия); БОЕ – бляшкообразующие единицы; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; ДМАИ – диметиладипимидат; РМЖ – рак молочной железы.

ВВЕДЕНИЕ

В последние годы усилия разработчиков противоопухолевых лекарств сконцентрированы на препаратах направленного действия на основе как новых, так и уже известных цитостатиков [1]. Наиболее эффективным способом доставки считается использование наноконтейнеров, модифицированных специфичными лигандами (липосом, мицелл, полимерных наночастиц, вирусоподобных частиц, вирусов), заполняемых лекарственными соединениями [2]. Однако применение инновационных средств доставки не решает проблему множественной лекар-

ственной устойчивости опухолей, способную свести на нет все усилия по повышению эффективности лекарственных соединений [3].

Показано, что ионы Tl⁺ обладают мощным цитотоксическим действием и подавляют функционирование белковых насосов лекарственной устойчивости опухолевых клеток [4]. Включение Tl⁺ в «не протекающий» наноразмерный контейнер, снабженный системой направленной доставки, позволит создать эффективное средство для разрушения опухолей при значительном снижении токсического воздействия Tl⁺ на организм в целом. В 1980-х гг. удалось

наполнить Tl^+ частицы вируса осповакцины [5]. Механизм наполнения заключался в образовании прочного соединения между Tl^+ и вирусной РНК [6]. В качестве наноконтейнера нами был выбран бактериофаг MS2, способный размножаться только в клетках *Escherichia coli*, несущих F-пили и не являющихся симбионтами либо патогенами человека [7]. Направленность доставки обеспечивали конъюгацией капсидных белков фага с пептидом $(Gly)_3$ -iRGD, содержащим фрагмент *cycloSS*-(CRGDKGPDC) (iRGD), ответственный за связывание с интегринами, локализованными преимущественно на внешних мембранах эндотелиоцитов вновь формируемой патологической сосудистой сети солидных опухолей и на ряде опухолевых клеток [8]. В нашей работе проведена экспериментальная проверка эффективности наполненного Tl^+ фага MS2 с адресным пептидом в качестве потенциального противоопухолевого препарата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение бактериофага MS2 описано в работе [9]. Количество бляшкообразующих единиц (БОЕ) в 1 мл препарата фага определяли методом титрования в агаровых слоях.

Пептид $(Gly)_3$ -iRGD получали методом автоматического твердофазного синтеза исходя из 9-флуоренил(метоксикарбонил)-аминокислот (ChemPerp, США) (синтезатор 433A, Applied Biosystems, метод FastMoc). Формирование S-S-мостика проводили путем окисления I_2 [10]. Пептид очищали ВЭЖХ на обращенной фазе (колонка C18 Triart, 21 × 250 мм, 10.0 мкм, УМС, Швейцария, рабочая станция Agilent 1100, Agilent, США) в градиенте концентрации CH_3CN (BioSolve, Израиль) в воде в присутствии 0.1% уксусной кислоты. По данным аналитической ВЭЖХ на обращенной фазе (колонка C18 Triart, 2.1 × 50 мм, 2.0 мкм (УМС), рабочая станция Agilent 1200) с УФ- и масс-спектрометрической детекцией чистота препарата пептида не ниже 95%.

Конъюгацию пептида $(Gly)_3$ -iRGD с капсидными белками фага MS2 проводили с использованием гомобифункционального реагента диметиладипимидата (ДМАИ, Sigma, США) в молярном соотношении белок фага : пептид: ДМАИ 1 : 20 : 80 по методике [11]. Бактериофаг отделяли от избытка реагентов осаждением 25% раствором полиэтиленгликоля 6000 («Диа-М», Россия) с 1 М NaCl. Осажденный бактериофаг суспендировали в деионизованной воде.

Заполнение бактериофага Tl^+ проводили с использованием $TlNO_3$ (Sigma-Aldrich, США). Бактериофаг MS2, конъюгированный с пептидом (iRGD-MS2), в количестве 10^{11} БОЕ инкубировали в 3 мл 0.5 мкМ раствора $TlNO_3$ (5 ч при 38°C) с последующим осаж-

дением, как указано выше, и диализом против фосфатно-солевого буфера (0.14 М NaCl, 0.01 М фосфат натрия, pH 7.4).

Количество включенных в вирионы и присутствующих в среде Tl^+ определяли согласно [12]. Суспензию наполненных Tl^+ частиц фага центрифугировали в течение 10 мин при 5000 об/мин для удаления осадка солей таллия, разводили 50 мМ буфером трис-HCl, pH 9.0 до концентрации (условно) 10^8 БОЕ/мл, денатурировали нагреванием в течение 30 мин при +70°C с РНКазой в 0.05% SDS, затем регистрировали тушение флуоресценции (длины волн возбуждения – 340 нм, эмиссии – 465 нм, спектрофлуориметр UV-1900, Shimadzu, Япония) натриевой соли 1,3,6,8-пирентетрасульфоновой кислоты (BOC Sciences APP, США) ионами Tl^+ . По калибровочной кривой зависимости степени тушения флуоресценции 1,3,6,8-пирентетрасульфоновой кислоты от $[Tl^+]$ рассчитывали количество Tl^+ в препарате фага. Количество Tl^+ в буферном растворе после диализа определяли без предварительной денатурации.

Цитотоксическое действие iRGD-MS2- Tl^+ на клетках в культуре исследовали на линиях MCF-7 (гормонзависимый рак молочной железы (РМЖ)) и MDA-MB-231 (гормоннезависимый РМЖ). Клетки культивировали в бессывороточной среде (MSC1 Pan BioTech) и в той же среде с 5% фетальной сыворотки телят. Препарат iRGD-MS2- Tl^+ вносили в 10-кратных разведениях, начиная с концентрации 10^8 БОЕ/мл. В качестве контроля использовали препарат iRGD-MS2 (фаг, конъюгированный с пептидом, без Tl^+). Погибшие клетки подсчитывали после окрашивания Эвансом синим.

Противоопухолевое действие препарата iRGD-MS2- Tl^+ тестировали на мышах nude с MCF-7- или MDA-MB-231-ксенографтами. Мышам внутривенно вводили 10^5 – 10^6 клеток MCF-7 или MDA-MB-231, а через 14 дней мышам опытных групп в течение 10 дней 1 раз в день вводили внутривенно по 200 мкл суспензии, содержащей iRGD-MS2- Tl^+ в количестве, соответствующем 10^8 БОЕ/кг, контрольным – iRGD-MS2, MS2- Tl^+ или MS2- Tl^+ + iRGD (в растворе, 2 мкг/кг) в таком же количестве и объеме раствора. В каждой опытной и контрольной группах было по 11 животных. Некротическую активность препарата определяли как отношение площади некротизированной ткани к общей площади опухоли через 12 дней после окончания введения препаратов фага по результатам анализа цифровых изображений гистологических срезов, сканированных на ScanScore CS2.

Предварительное исследование острой токсичности препарата iRGD-MS2- Tl^+ проводили на 10 крысах (самках) WKY (Wistar-Kyoto) весом 200–250 г. Крысы содержали в условиях 12-часового све-

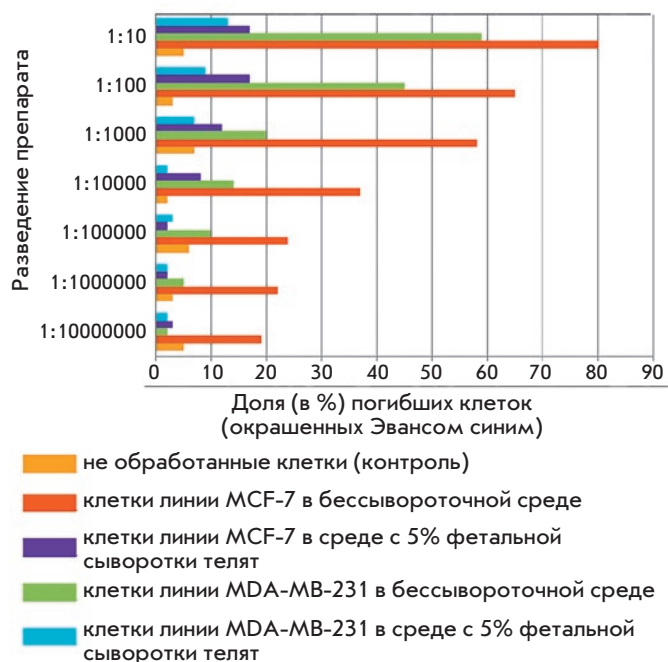


Рис. 1. Результаты токсического действия препарата iRGD-MS2-TI⁺ на культуры опухолевых клеток (% гибели клеток)

того дня на стандартном лабораторном корме и воде *ad libitum*. Однократно внутривенно вводили 10⁸ БОЕ/животное в объеме 500 мкл. Регистрировали состояние животных в течение 3 недель с момента введения препарата.

Эксперименты на животных проводили в соответствии с Международными рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых при экспериментальных исследованиях, и правилами надлежащей лабораторной практики (GLP) в РФ, утвержденных приказом Минздрава РФ № 267 от 19.06.2003.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В результате инкубации бактериофага MS2 (как модифицированного, так и не модифицированного пептидом iRGD) в среде с TI_{NO3} получены препараты MS2, содержавшие TI⁺ в количестве 2.0 × 10⁻⁹ г-экв таллия в расчете на 10⁸ БОЕ. Количество TI⁺ на 1 БОЕ составило 2.0 × 10⁻¹⁷ г-экв (≈4 фг на 1 БОЕ, т.е. 400 нг в 10⁸ БОЕ). В буферном растворе, против которого диализовали наполненный таллием бактериофаг, TI⁺ не обнаружен, что свидетельствует о его прочном связывании с РНК фага внутри частиц MS2.

Как видно из рис. 1, в бессывороточной среде препарат iRGD-MS2-TI⁺ проявлял цитотоксическое

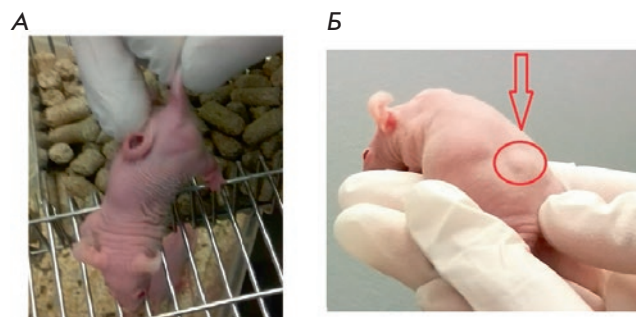


Рис. 2. Ксенографт опухоли MDA-MB-231 у мышей nude до (А) и после (Б) лечения препаратом iRGD-MS2-TI⁺

действие на клетки и гормонзависимого, и гормоннезависимого РМЖ. В случае гормонзависимого РМЖ (клетки MCF-7) ED₅₀ препарата iRGD-MS2-TI⁺ составляла чуть менее 10⁵ БОЕ/мл культуральной жидкости, а статистически значимое превышение цитотоксического эффекта препарата по сравнению с контролем наблюдалось вплоть до концентрации 10 БОЕ/мл. Клетки гормоннезависимого РМЖ MDA-MB-231 были более устойчивыми к действию препарата: ED₅₀ для этих клеток в бессывороточной среде составляла 10⁶-10⁷ БОЕ/мл, а статистически значимое превышение цитотоксического эффекта препарата над контролем наблюдалось до концентрации 10⁴ БОЕ/мл. В среде с сывороткой цитотоксическое действие iRGD-MS2-TI⁺ проявлялось намного слабее, что может свидетельствовать о конкуренции между компонентами сыворотки и частицами iRGD-MS2-TI⁺ за проникновение в клетки.

У мышей с ксенографтами MCF-7 и MDA-MB-231 через 12 дней после введения препарата iRGD-MS2-TI⁺ наблюдалось уменьшение объема опухоли по сравнению с контрольными группами животных (рис. 2). Гистохимически показано некротизирующее действие iRGD-MS2-TI⁺ на соответствующие опухоли. Из рис. 3 видно, что препарат iRGD-MS2-TI⁺ вызывал некроз ткани опухоли (*p* < 0.05) более эффективно, чем препараты фага с пептидом, но без TI⁺, фага с TI⁺, но без пептида, фага с TI⁺ и с неконъюгированным пептидом в растворе.

Исследование острой токсичности препарата iRGD-MS2-TI⁺ на крысах WKY (Wistar-Kyoto) показало, что однократное введение препарата iRGD-MS2-TI⁺ в дозе 10⁸ БОЕ/животное, т.е. 1.6-2.0 мкг TI/кг, не привело к гибели ни одного животного за 3 недели наблюдения. Не выявлено заметных изменений в поведении животных. Суммарная

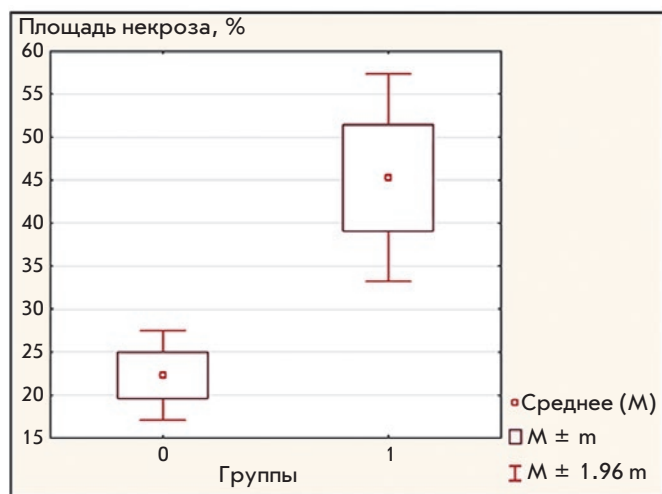


Рис. 3. Площадь некротизированной ткани опухолей у мышей с ксенографтами РМЖ. Группа «1» – опытные животные, получавшие препарат iRGD-MS2-TI⁺; группа «0» – контрольные животные, получавшие препараты iRGD-MS2, MS2-TI⁺ или MS2-TI⁺ с неконъюгированным (растворенным) iRGD-пептидом

доза TI⁺, обеспечивающая достижение терапевтического эффекта (4 мкг/кг), была меньше его LD₅₀ (20 мг/кг) в 5000 раз.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Направленная доставка токсичного иона металла с помощью фагового дисплея на основе частиц iRGD-

MS2-TI⁺ в сосудистую сеть опухолевой ткани вызывает эффективный распад всей массы опухоли при значительном снижении вероятности токсического воздействия на организм в целом. Это позволяет рекомендовать iRGD-MS2-TI⁺ к доклиническим исследованиям с целью создания лечебного препарата для терапии рака молочной железы. Поскольку пептидный лиганд iRGD взаимодействует с интегринами α_vβ₃ и α_vβ₅ на поверхности эндотелиоцитов патологической сосудистой сети [8], этот препарат может быть эффективен и в отношении других солидных опухолей, в которых идет интенсивный патологический неоваскуляризм. ●

Работа частично поддержана финансированием от ООО «Биотехнология». Разработка методик синтеза пептида (Gly)₃-iRGD и его конъюгации с бактериофагом MS2 выполнена в рамках Программы фундаментальных научных исследований государственных академий наук на 2013–2020 годы. Синтез пептида выполнен на оборудовании ЦКП «Протеом человека» (ИБМХ). Эксперименты на животных проводили в НМИЦ онкологии имени Н.Н. Петрова Минздрава РФ. Авторы благодарят А.А. Чистова (ИБМХ, ИБХ) за проведение анализа iRGD-пептида.

Материалы статьи отражены в Патенте РФ № 2599462 «Способ полисигнальной активации апоптоза клеток злокачественных солидных опухолей», заявка в Патентное ведомство США (№ 15/757,285 от 02.03.2018) и Европейское патентное ведомство (PCT – WO 2017052419).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Lee M.S., Dees E.C., Wang A.Z. // Oncology (Williston Park). 2017. V. 31. № 3. P. 198–208.
- Fan Y., Moon J.J. // Vaccines. 2015. V. 3. № 3. P. 662–685.
- Ставровская А.А., Стромская Т.П. // Биохимия. 2008. Т. 73. № 5. С. 735–750.
- Korotkov S.M., Brailovskaya I.V., Kormilitsyn B.N., Furaev V.V. // J. Biochem. Mol. Toxicol. 2014. V. 28. № 4. P. 149–156.
- Zasukhina G.D., Vasilyeva I.M., Sdirkova N.I., Krasovsky G.N., Vasyukovich L.Ya., Kenesariyev U.I., Butenko P.G. // Mutat. Res. 1983. V. 124. № 2. P. 163–173.
- Ke A., Ding F., Batchelor J.D., Doudna J.A. // Structure. 2007. V. 15. № 1. P. 281–287.
- Leclerc H., Edberg S., Pierzo V., Delattre J.M. // J. Appl. Microbiol. 2000. V. 88. № 1. P. 5–21.
- Ruoslahti E. // Adv. Drug Deliv. Rev. 2017. V. 110–111. P. 3–12.
- Княжев В.А., Сивов И.Г., Сергиенко В.И. // Молекулярная генетика, микробиология и вирусология. 2002. Т. 20. № 2. С. 23–26.
- Andreu D., Albericio F., Sole N.A., Munson M.C., Ferrer M., Barany G. // Methods Mol. Biol. 1994. V. 35. P. 91–169.
- Synthetic peptides as antigens. / Eds van Regenmortel M.H.V., Muller S. Elsevier, 1999.
- Donnelly D., Mihovilovic M., Gonzalez-Ros J.M., Ferragut J.A., Richman D., Martinez-Carrion M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1984. V. 81. № 24. P. 7999–8003.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

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

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

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

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

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

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

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

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

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

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

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

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

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

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

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

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

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

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

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

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

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

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

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

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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



II ОБЪЕДИНЕННЫЙ НАУЧНЫЙ ФОРУМ

VI СЪЕЗД БИОХИМИКОВ РОССИИ IX РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ» ПОСВЯЩЕННЫЙ 60-ЛЕТИЮ ИБХ РАН VI СЪЕЗД ФИЗИОЛОГОВ СНГ

Сочи, Дагомыс

1–6 октября 2019

НАУЧНАЯ ТЕМАТИКА

СИМПОЗИУМ «ХИМИЯ И БИОЛОГИЯ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ»

Руководители: Г.П. Георгиев, О.А. Донцова, А.Л. Коневега, М.П. Рубцова, П.В. Сергиев

IX РОССИЙСКИЙ СИМПОЗИУМ «БЕЛКИ И ПЕПТИДЫ»

Руководитель: В.Т. Иванов

- **Поиск, выделение и синтез новых природных пептидов и белков**
Руководители: В.И. Цетлин, А.А. Василевский
- **Биологические функции и механизмы действия пептидов и белков**
Руководители: С.М. Деев, А.А. Белогуров
- **Биоинженерия белков и пептидов**
Руководители: А.Н. Федоров, Д.А. Долгих
- **Физико-химические методы исследования структуры пептидов и белков. Взаимосвязь «структура – функция»**
Руководители: Р.Г. Ефремов, А.В. Финкельштейн
- **Химия и биология ферментов**
Руководители: О.И. Лаврик, С.Н. Кочетков, И.В. Смирнов
- **Инновационные лекарственные средства на основе пептидов и белков**
Руководители: Н.Ф. Мясоедов, Т.В. Овчинникова

СИМПОЗИУМ «ГЕНОМ. ПРОТЕОМ. МЕТАБОЛОМ»

Руководители: А.И. Арчаков, В.М. Говорун, А.В. Лисица, Е.Н. Ильина

СИМПОЗИУМ «ФУНКЦИОНАЛЬНАЯ ГЕНОМИКА»

Руководители: С.В. Разин, Е.С. Васецкий

СИМПОЗИУМ «БИОХИМИЧЕСКИЕ АСПЕКТЫ КЛЕТОЧНЫХ ТЕХНОЛОГИЙ»

Руководитель: М.А. Лагарькова, А.Н. Томилин

СИМПОЗИУМ «БИОИНЖЕНЕРИЯ: ФУНДАМЕНТАЛЬНЫЕ ОСНОВЫ И ПРИЛОЖЕНИЯ»

Руководители: В.О. Попов, А.С. Яненко

СИМПОЗИУМ «ОСНОВНЫЕ АСПЕКТЫ БИОХИМИИ»

- **Биология растений**
Руководители: А.Н. Гречкин, Д.А. Лось
- **Гликобиология**
Руководители: Н.В. Бовин, Т.А. Горшкова

СИМПОЗИУМ «БИОХИМИЯ И МОЛЕКУЛЯРНАЯ МЕДИЦИНА»

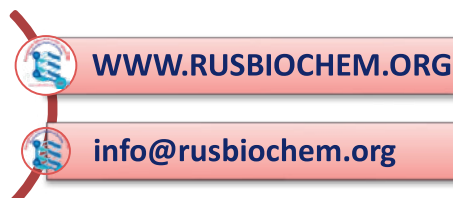
Руководители: А.М. Егоров, Н.Л. Клячко

СИМПОЗИУМ «МОЛЕКУЛЯРНЫЙ ИМИДЖИНГ»

Руководители: А.П. Савицкий, К.А. Лукьянов

ОРГАНИЗАТОРЫ ФОРУМА

- ◆ Российское биохимическое общество
- ◆ Союз физиологических обществ стран СНГ
- ◆ Союз аллергологов и иммунологов СНГ



WWW.RUSBIOCHEM.ORG

info@rusbiochem.org

Acta Naturae

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

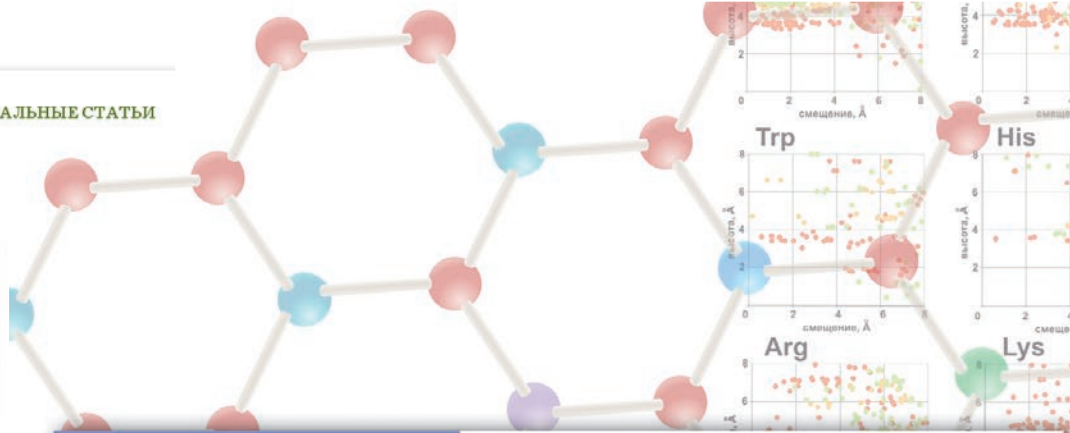
Флуоресценция клеток после окрашивания различными белками. Приведены средние значения трех экспериментов \pm ошибка среднего

Образец	Интенсивность флуоресценции в канале FL1	
	Клетки SK-BR-3	Клетки CHO
Неокрашенные клетки	3700 \pm 400	3700 \pm 900
+ β -LG-FITC	5700 \pm 600	3300 \pm 400
+ 4D5scFv-FITC	2.7 $\times 10^4 \pm 7 \times 10^3$	3200 \pm 500
+ 4D5scFv-miniSOG	2.3 $\times 10^4 \pm 3 \times 10^3$	4600 \pm 400
+ DARPin-miniSOG	1.71 $\times 10^4 \pm 1.6 \times 10^3$	3000 \pm 400

Наличие на поверхности клеток рецептора HER2/neu было подтверждено их окрашиванием 4D5scFv, конъюгированным с флуоресцеинизотиоцианатом (4D5scFv-FITC). В качестве отрицательного контроля использовали бета-лактоглобулин, конъюгированный с FITC (β -LG-FITC), не связывающийся с HER2 на поверхности клеток. Показано, что HER2-отрицательные клетки CHO не дают флуоресцентного сигнала после инкубации с белками 4D5scFv-FITC, β -LG-FITC и целевыми белками 4D5scFv-miniSOG, DARPin-miniSOG (таблица).

Таким образом, показано, что адресные рекомбинантные белки 4D5scFv-miniSOG и DARPin-miniSOG высокоспецифично связываются с поверхностным рецептором HER2/neu на поверхности клеток SK-BR-3 аденокарциномы молочной железы человека.

Обнаружено, что после связывания белков DARPin-miniSOG и 4D5scFv-miniSOG с рецептором на поверхности клеток SK-BR-3 при температуре +4°C рецептор-опосредованной интернализации белков не происходит. Однако при +37°C комплексе рецептор-белок подвергается интернализации, о чем свидетельствует снижение интенсивности флуоресценции Δ МFI (разность между средними значениями флуоресценции окрашенных и неокрашенных клеток) (рис. 1). При этом рекомбинантный белок DARPin-miniSOG интернализуется в комплексе с рецептором быстрее, чем 4D5scFv-miniSOG, так как Δ МFI для DARPin-miniSOG снижается вдвое по сравнению с начальной точкой в течение первых 10 мин, в то время как для 4D5scFv-miniSOG это занимает 40 мин. Полученные данные согласуются с опубликованными: 4D5scFv-miniSOG проявляет более высокую цитотоксичность по сравнению с DARPin-miniSOG [5, 6], так как дольше локализован на мембране. Поскольку преимущественным механизмом гибели клеток, облученных в присутствии данных фотоксисов, является некроз, по-

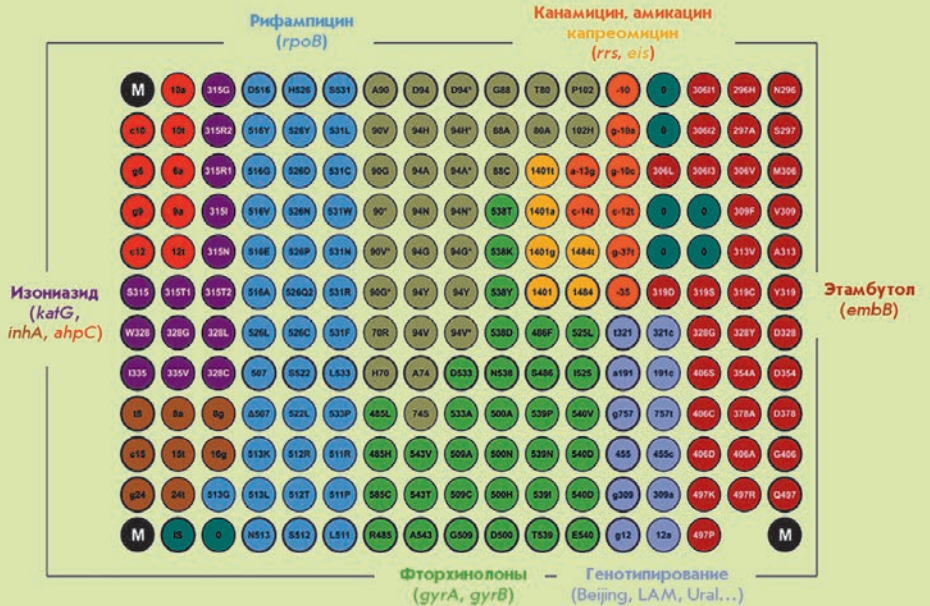


ОКТАБРЬ-ДЕКАБРЬ 2018 ТОМ 10 № 4 (39)

ISSN 2075-8243

Acta Naturae

Технология гидрогелевых биочипов ИМБ РАН: 30 лет спустя



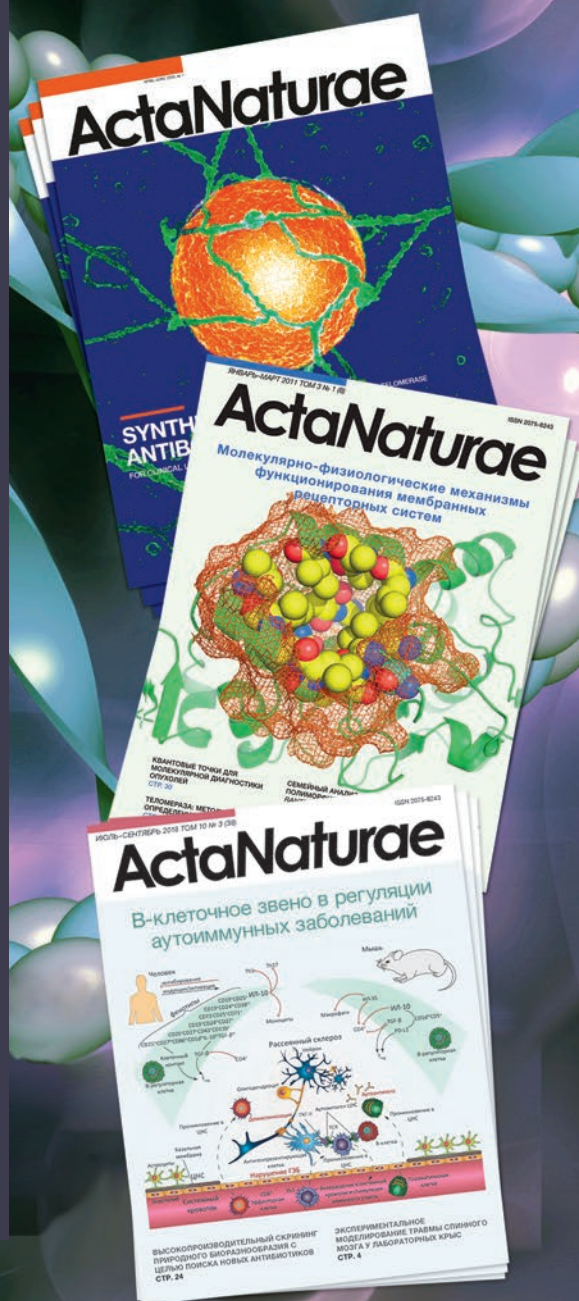
БЕЛОК CG9890 С ДОМЕНАМИ ЦИНКОВЫХ ПАЛЬЦЕВ – НОВЫЙ КОМПОНЕНТ ENY2-СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКСОВ ДРОЗОФИЛЫ
СТР. 110

ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С БЕЛКОМ AIF
СТР. 100

Acta Naturae

Журнал *Acta Naturae* уделяет особое внимание междисциплинарному характеру исследований и разработок, которые находятся на стыке различных сфер биологических специальностей – молекулярной биологии, биохимии, молекулярной генетики и биологической медицины.

Журнал *Acta Naturae* выпускается на русском и английском языках, входит в Перечень ведущих периодических изданий Высшей аттестационной комиссии Минобрнауки России, включен в базы данных РИНЦ, PubMed, Web of Science, Scopus.



ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ:

Если Вы хотите опубликовать свою работу в журнале *Acta Naturae*, пишите на actanaturae@gmail.com и звоните по телефону: 8 (495) 727-38-60

