

# Acta Naturae

## Хирургическое моделирование посттравматического глиального рубца



МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ  
НЕСОВМЕСТИМОСТИ ГАМЕТ  
БЕСПОЗВОНОЧНЫХ

**СТР. 4**

МЕХАНИЗМЫ ДЕЙСТВИЯ  
ПРОИЗВОДНЫХ ТРИИНДОЛИЛМЕТАНА  
НА ЛИПИДНЫЕ МЕМБРАНЫ

**СТР. 38**

# MERCK

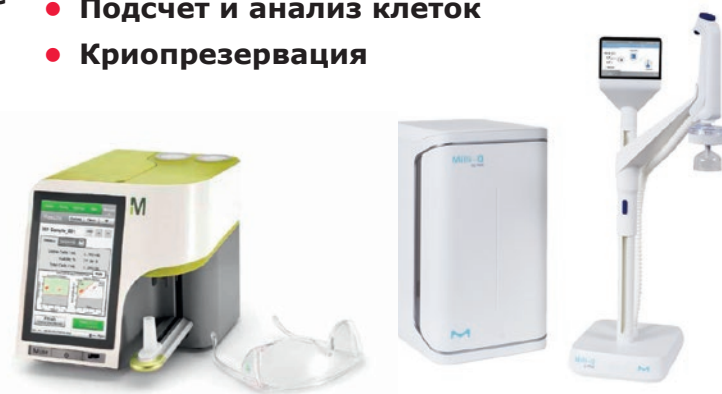
## КОМПЛЕКСНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ КЛЕТОЧНОГО АНАЛИЗА



- 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):

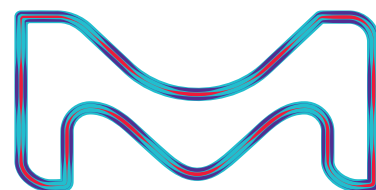
- 4000 клеточных линий животных и человека;
- Клетки 45 видов животных и 50 типов тканей;
- 370 эталонных В-лимфобластных клеточных линий с данными о типе лейкоцитарного антигена человека (HLA);
- 480 гибридных клеточных линий, секретирующих моноклональные антитела;
- ДНК, РНК, кДНК, экстрагированные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

[SIGMAaldrich.com/ECACC](http://SIGMAaldrich.com/ECACC)

### ООО «Мерк»

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

[SIGMAaldrich.com/cellculture](http://SIGMAaldrich.com/cellculture)  
[MERCKmillipore.com/cellculture](http://MERCKmillipore.com/cellculture)

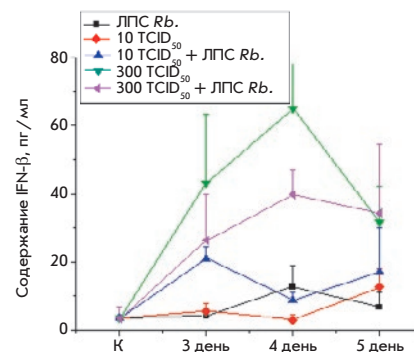


SIGMA-ALDRICH® is now MERCK

## Влияние липополисахарида из *Rhodobacter capsulatus* PG на развитие воспаления, вызванного различными штаммами вируса гриппа

С. В. Зубова, М. Ф. Ворович, А. С. Гамбарян, А. А. Ишмухаметов, С. В. Грачев, И. Р. Прохоренко

Исследованы особенности развития воспалительных процессов у мышей, инфицированных двумя разными штаммами вируса гриппа: A/chicken/Kurgan/5/2005 (H5N1) и A/Hamburg/2009 MA (H1N1). Оценено влияние нетоксичного липополисахарида *Rhodobacter capsulatus* PG на выживаемость и изменение массы тела мышей, продукцию антител IgG и индукцию про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови. Показано, что липополисахарид *R. capsulatus* PG индуцирует синтез интерферона- $\beta$  как при самостоятельном введении, так и на фоне заражения вирусом гриппа А, а также способствует образованию противовирусных антител в крови инфицированных гриппом животных.



Динамика содержания цитокина в ответ на введение ЛПС *Rb.*, вируса гриппа H1N1 и на их совместное действие

## Аномально высокий потенциал закрытия канала порина OmpF из *Yersinia ruckeri*: роль заряженных остатков и внутримолекулярных связей

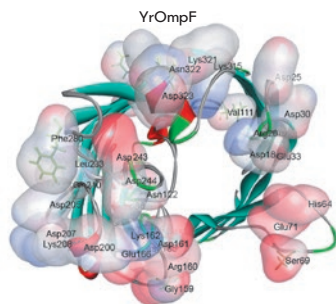


Диаграмма распределения основных и кислых АК-остатков в варибельных областях порина YrOmpF

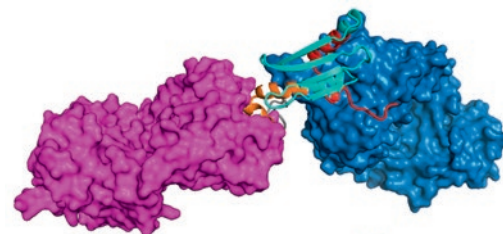
Д. К. Чистюлин, О. Д. Новикова, Е. А. Зелепуга, В. А. Хоменко, Г. Н. Лихацкая, О. Ю. Портнягина, Ю. Н. Антоненко

Изучены электрофизиологические свойства OmpF порина *Yersinia ruckeri* (YrOmpF) и классического порина OmpF *E. coli* (EcOmpF). YrOmpF образует типичные пориновые каналы со средней проводимостью 230 пСм, однако по сравнению с EcOmpF их отличают высокие значения критического потенциала закрытия ( $V_c$ ): при pH 7.0  $V_c = 232$  мВ, при pH 5.0  $V_c = 164$  мВ. Расчетные данные свидетельствуют о том, что петля L3 YrOmpF имеет более жесткую конформацию по сравнению с таковой EcOmpF, что, очевидно, обеспечивает стабильность открытого состояния канала YrOmpF и обуславливает его высокое значение  $V_c$ .

## Исследование структурных и иммунологических свойств химерных белков, содержащих участки MPER ВИЧ-1

А. П. Рудометов, Н. Б. Рудометова, Д. Н. Щербаков, А. А. Ломзов, О. Н. Каплина, Н. С. Щербакова, А. А. Ильичев, А. Ю. Бакулина, Л. И. Карпенко

В работе описано конструирование и исследование свойств двух иммуногенов, представляющих фрагменты района MPER белка gp41 ВИЧ-1 в составе белков-носителей: белка YkuJ *Bacillus subtilis* и искусственного полипептида ТВ1. Антигенные свойства иммуногенов MPER-ТВ1 и YkuJ-MPER охарактеризованы с помощью bNAbs, узнающих MPER ВИЧ-1. Иммуногенность полученных рекомбинантных белков показана на кроликах. Установлено, что полученные сыворотки кросс-реактивны в отношении иммуногенов, содержащих MPER.



Модель взаимодействия YkuJ-MPER с Fab-фрагментами МКА 2F5 и 4E10



# Acta Naturae

ТОМ 11, № 3 (42), ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ 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 30 сентября 2019 г.  
Тираж 100 экз. Цена свободная.  
Отпечатано в типографии: ООО «Вариант»,  
115054, Москва, ул. Дубининская, 40-59  
E-mail: a1605@mail.ru

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: 1.67

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОБЗОРЫ

А. А. Лобов, А. Л. Мальцева,  
Н. А. Михайлова, А. И. Гранович  
**Молекулярные механизмы несовместимости  
гамет беспозвоночных . . . . . 4**

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Е. А. Голубицкая, О. С. Троицкая, Е. В. Елак,  
П. П. Гугин, В. А. Рихтер, И. В. Швейгерт,  
Д. Э. Закревский, О. А. Коваль  
**Воздействие холодной плазменной струи  
снижает жизнеспособность клеток  
аденокарциномы легкого . . . . . 16**

Е. П. Гончарова, Я. А. Костыро, А. В. Иванов,  
М. А. Зенкова  
**Новое бисульфитное производное окисленно-  
го  $\beta$ -циклодекстрина эффективно ингибирует  
инфекцию, вызванную вирусом гриппа А  
*in vitro* и *in vivo*. . . . . 20**

Т. А. Гудашева, П. Ю. Поварнина,  
А. А. Волкова, С. В. Круглов, Т. А. Антипова,  
С. Б. Середенин  
**Дипептидный миметик фактора роста нервов  
стимулирует нейрогенез и синаптогенез  
в гиппокампе и стриатуме взрослых крыс  
с фокальной церебральной ишемией . . . . . 31**

С. С. Ефимова, Т. Е. Тертычная,  
С. Н. Лавренов, О. С. Остроумова  
**Механизмы действия производных трииндо-  
лилметана на липидные мембраны** ..... 38

С. В. Зубова, М. Ф. Ворович, А. С. Гамбарян,  
А. А. Ишмухаметов, С. В. Грачев,  
И. Р. Прохоренко

**Влияние липополисахарида из *Rhodobacter  
capsulatus* PG на развитие воспаления,  
вызванного различными штаммами вируса  
гриппа** ..... 46

А. П. Рудометов, Н. Б. Рудометова,  
Д. Н. Щербаков, А. А. Ломзов,  
О. Н. Каплина, Н. С. Щербакова,  
А. А. Ильичев, А. Ю. Бакулина,  
Л. И. Карпенко

**Исследование структурных  
и иммунологических свойств химерных  
белков, содержащих участки MPER ВИЧ-1** .. 56

О. В. Сергеева, С. А. Коринфская,  
И. И. Курочкин, Т. С. Зацепин

**Длинная некодирующая РНК LL35 /Falcor –  
регулятор экспрессии транскрипционного  
фактора Foxa2 в гепатоцитах нормальной  
ткани печени мыши и при фибротических  
изменениях** ..... 66

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

**Хирургическое моделирование  
посттравматического глиального  
рубца спинного мозга у крыс** ..... 75

Н. Г. Фалеев, М. А. Цветикова,  
О. И. Гоголева, С. В. Ревтович,  
В. В. Куликова, К. А. Кочетков

**Каталитический механизм воздействия  
триптофан-индол-лиазы на нестандартные  
субстраты. Роль ионного состояния  
каталитической группы, акцептирующей  
C<sub>α</sub>-протон субстрата** ..... 82

Д. К. Чистюлин, О. Д. Новикова,  
Е. А. Зелепуга, В. А. Хоменко,  
Г. Н. Лихацкая, О. Ю. Портнягина,  
Ю. Н. Антоненко

**Аномально высокий потенциал закрытия  
канала порина OmpF из *Yersinia ruckeri*:  
роль заряженных остатков  
и внутримолекулярных связей** ..... 89

## КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

Д. И. Юрков, С. В. Сыромуков,  
В. В. Татарский, Е. С. Иванова,  
А. И. Хамидуллина, М. А. Ястребова,  
В. И. Сысоев, Р. В. Добров, А. В. Белоусов,  
В. Н. Морозов, М. А. Кольванова,  
Г. А. Крусанов, В. И. Зверев, А. А. Штиль  
**Уникальный прототип радиотерапевтической  
установки: р53-независимый антипролифера-  
тивный эффект нейтронного облучения** .... 99

**Правила для авторов** ..... 103



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

575.825.2; 577.29; 591.16

# Молекулярные механизмы несовместимости гамет беспозвоночных

А. А. Лобов<sup>1,2\*</sup>, А. Л. Мальцева<sup>1</sup>, Н. А. Михайлова<sup>3</sup>, А. И. Гранович<sup>1</sup><sup>1</sup>Санкт-Петербургский государственный университет, кафедра зоологии беспозвоночных, 199034, Санкт-Петербург, Университетская наб., 7/9<sup>2</sup>Институт цитологии РАН, лаборатория регенеративной биомедицины, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4<sup>3</sup>Институт цитологии РАН, центр клеточных технологий, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4

E-mail: arsenylobov@gmail.com

Поступила в редакцию 03.06.2019

Принята к печати 09.09.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-4-15

**РЕФЕРАТ** Процесс оплодотворения (слияние гамет с образованием зиготы) регулируется при участии парных молекул, обеспечивающих распознавание гамет на ключевых этапах их взаимодействия, таких, как привлечение сперматозоида аттрактантами яйцеклетки, разрушение вителлиновой оболочки акросомными белками сперматозоида и др. Несовместимость гамет – это один из механизмов репродуктивной изоляции. Несовместимость гамет основана на видоспецифичности молекул взаимодействия гамет и проявляется в нарушении распознавания гетероспецифичных гамет при оплодотворении. Хотя несовместимость гамет может проявляться у любых организмов, размножающихся половым путем, известно сравнительно мало модельных систем для ее изучения. Взаимодействия гамет у представителей разных таксонов основаны на сходных процессах, однако в них могут участвовать негомологичные молекулы. Как и в случае белков иммунитета, при изучении белков распознавания гамет, практически во всех группах животных обнаруживали новые семейства белков, многие из которых вовлечены в молекулярные механизмы несовместимости гамет, что отражает многократные эволюционные пути ее становления/поддержания. Несовместимость гамет может реализовываться на любом этапе оплодотворения и проявляться на разных таксономических уровнях – от полной несовместимости у близких видов до частичной несовместимости у животных разных классов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** белки взаимодействия гамет, беспозвоночные, видообразование, несовместимость гамет, репродуктивная изоляция.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** GRM/P – молекулы/белки взаимодействия гамет (Gamete Recognition Molecules/Proteins); GI – несовместимость гамет (Gametic Isolation); AR – акросомная реакция (Acrosome Reaction); FCC – скрытый выбор самки (Female Cryptic Choice); SC – спермальная конкуренция (Sperm Competition); RI – репродуктивная изоляция (Reproductive Isolation); PCPZ – посткопулятивная презиготическая репродуктивная изоляция (Post-Copulatory PreZygotic reproductive barriers).

## ВВЕДЕНИЕ

В основе современных трактовок идентичности видов лежат представления о единстве генетического состава их популяций [1–3]. Гипотезы, описывающие механизмы видообразования (микроэволюции), обращаются к потенциальным способам подразделения вида на относительно или полностью репродуктивно обособленные группировки [3]. Репродуктивная изоляция (RI) – необходимый этап видообразования, но одновременно с этим и ключевой критерий вида [1–3].

RI поддерживается пре- и постзиготическими механизмами, действующими на стадиях до и после формирования зиготы [3]. Их биологическая роль различна: на ранних этапах видообразования формируются и функционируют презиготические репродуктивные барьеры, на более поздних – постзиготические [4–7]. Например, для формирования постзиготической RI между близкими видами птиц понадобилось не менее 22 миллионов лет дивергенции [3]. При этом презиготические репродуктивные барьеры между видами рода *Drosophila* могут

сформироваться менее чем за 10 поколений [8]. Один из таких потенциально быстро формирующихся презиготических барьеров – несовместимость гамет (GI) [3].

GI основана на взаимодействии высокоспециализированных молекул распознавания гамет (GRM). Белки взаимодействия гамет (GRP) экспрессируются в тканях репродуктивной системы и, как правило, не вовлечены в выполнение других функций [9, 10].

Даже единичные аминокислотные замены в GRP влияют на эффективность и/или видоспецифичность взаимодействия гамет [9, 10]. Например, считается, что в акросомном белке биндине морских ежей всего 10 аминокислотных замен достаточно для возникновения RI между двумя формирующимися видами [11]. В то же время структура GRP меняется под действием естественного отбора, делающего адаптивным высокий уровень полиморфизма GRP, и наравне с белками иммунитета они становятся одним из наиболее быстро эволюционирующих признаков [9–20].

Проблема изучения отдельных механизмов RI успешно решается на молекулярном уровне. В постгеномную эру появляются новые методические возможности изучения генома и протеома большого количества организмов, однако многие белки, вовлеченные в RI, представляют новые семейства, а биоинформатические возможности не позволяют адекватно предсказать их вторичные структуры и/или функции.

Среди модельных объектов, позволяющих изучать GI у видов с внешним оплодотворением, можно назвать морских ежей, а также морских моллюсков рода *Haliotis* [9, 10]. У других беспозвоночных, о которых речь пойдет ниже, исследованы отдельные этапы взаимодействия гамет. Не обнаружено ни одного молекулярного посредника взаимодействия гамет у представителей многих крупных таксонов беспозвоночных. Например, описанный нами параспермальный белок LOSP стал первым идентифицированным потенциальным GRP ценогастропод [21, 22].

### ВЗАИМОДЕЙСТВИЕ ГАМЕТ

В основе несовместимости гамет лежат изменения структуры молекул, обеспечивающих их специфичное взаимодействие. Распознавание гамет у различных организмов феноменологически протекает одинаково (за рядом исключений, например, нематод) и включает пять стадий (рис. 1, на примере морского ежа) [9, 23].

#### Стадия 1: привлечение сперматозоида (этапы 0–1)

На начальном этапе этой стадии происходит переход от спонтанного движения сперматозоида, как правило, по траектории широкой петли без прямолиней-

ных участков (рис. 1, 0) к «включению программы» привлечения сперматозоида (рис. 1, 1; [24]): действие аттрактанта яйцеклетки приводит к появлению прямолинейных участков в движении сперматозоида, чередующихся с резкими петлевидными разворотами [24]. Этот паттерн движения показан для сперматозоидов многих филогенетически удаленных групп, например, иглокожих, хитонов [25], книдарий [25, 26], полихеты *Arenicola marina* [27].

Общий паттерн движения объясняется сходными молекулярными механизмами, подробно изученными у морских ежей *Strongylocentrotus purpuratus* (рис. 2) [28].

Аттрактант яйцеклетки морских ежей (сперакт) активирует рецептор семейства гуанилатциклаза на мембране сперматозоида, что приводит к появлению cGMP, открывающему cGMP-зависимые калиевые каналы (Sp-tetraKCNG). Открытие этих каналов вызывает гиперполяризацию мембраны и активацию каскада, обеспечивающего колебания концентрации ионов кальция [28]. Колебательный характер сигнала формирует чередование отдельных фаз движения сперматозоида: при низких концентрациях  $Ca^{2+}$  сперматозоид движется прямолинейно, а при высоких совершает петлевой разворот [29].

Структура хемоаттрактантов яйцеклетки у всех изученных групп уникальна (таблица) [30–41].

Вероятно, разные системы привлечения сперматозоида сформировались независимо на основе базового механизма подвижности сперматозоида [42].

#### Стадия 2-3: акросомная реакция и разрушение оболочки яйцеклетки (этапы 2–4)

Ключевой этап оплодотворения – прохождение сперматозоидом оболочек яйцеклетки за счет действия акросомных белков. Эти специализированные белки находятся в акросоме – везикуле в апикальной части клетки [43]. Сперматозоиды большинства животных имеют относительно крупную акросому, однако, она может быть и небольшой, как, например, у филиформных сперматозоидов моллюсков рода *Littorina* или насекомых рода *Lepisma* [44, 45].

Акросомные белки высвобождаются при экзоцитозе акросомы в ходе акросомной реакции (AR; этап 2). AR запускается взаимодействием специфических рецепторов сперматозоида с оболочкой яйцеклетки. У многих животных, например морских ежей, происходят pH-зависимая полимеризация актина и образование актинового филамента (рис. 1, 3–4) [46, 47].

Молекулярные основы этих процессов изучены только у иглокожих, но, вероятно, они различаются у разных групп беспозвоночных. Например, у представителей вторичноротых – морских ежей и млекопитающих – эти процессы происходят по-разному.



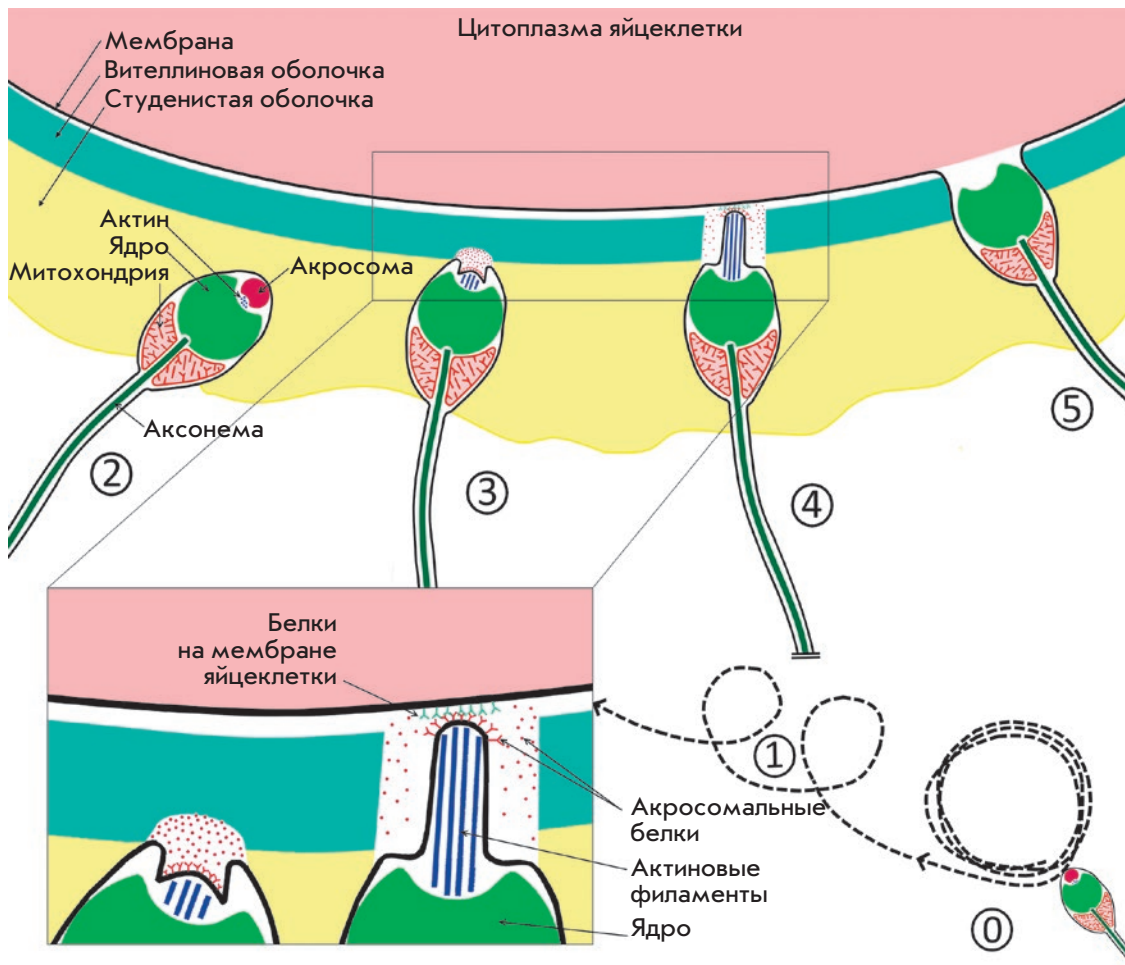


Рис. 1. Этапы взаимодействия гамет морских ежей. Цифрами обозначены последовательные этапы, расшифровка стадий приведена в тексте

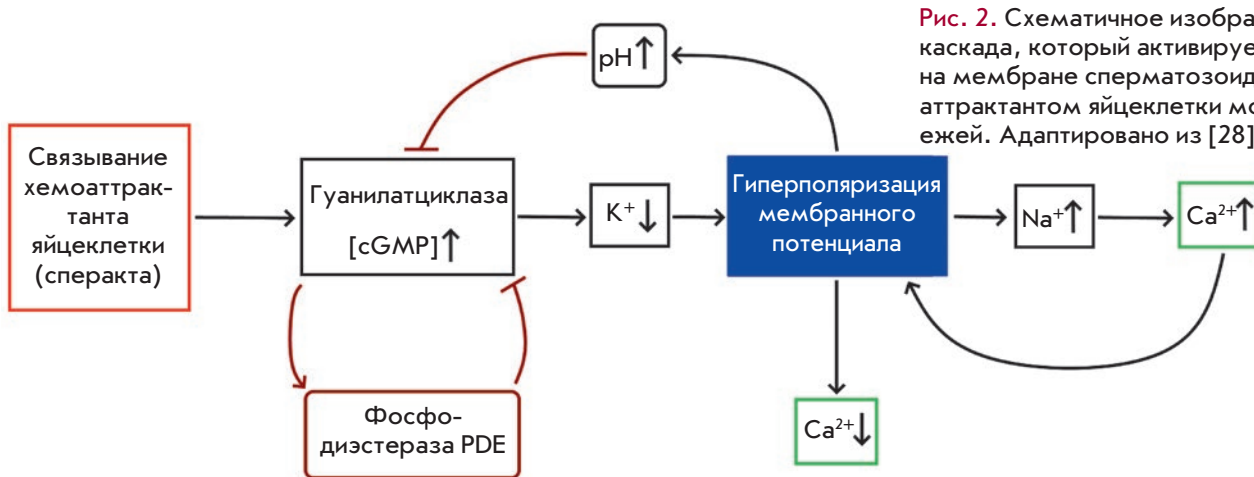


Рис. 2. Схематичное изображение каскада, который активируется на мембране сперматозоида хемоаттрактантом яйцеклетки морских ежей. Адаптировано из [28]

AR индуцируют различные классы молекул: сульфатированные полисахариды и ZP3-гликопротеины соответственно [46, 48]. Как следствие, за рецепцию этих соединений отвечают негомологичные белки: у морских ежей рецептором выступает мембран-

ный гликопротеин массой 210 кДа (REJ), а у мыши – PKDREJ и бета-галактозилтрансфераза [46, 48].

У человека акросомная реакция может индуцироваться не только гликопротеином ZP3, но также ZP1 и ZP4, и, по-видимому, включает дополнительные



Список хемоаттрактантов яйцеклетки, обнаруженных у беспозвоночных и протистов

Группа	Вид	Хемоаттрактант	Ссылка
Cnidaria	<i>Montipora digitata</i> ; <i>Lobophytum crassum</i>	Ненасыщенные жирные спирты; макроциклические дитерпеновые спирты	[30, 31]
Echinodermata		Пептиды	[32, 33]
Mollusca	<i>Octopus vulgaris</i> ; <i>Sepia officinalis</i>		[34, 35]
	<i>Haliotis</i>	L-триптофан	[36]
Ascidia	<i>Ciona intestinalis</i>	Сульфатированные стероиды	[37]
Nematoda	<i>Caenorhabditis elegans</i>	Полиненасыщенные жирные спирты (PUFAs)	[38]
Бурые водоросли	<i>Fucus vesiculosus</i>	Ненасыщенные углеводороды (фукосерратины)	[39, 40]
Инфузории	<i>Euplotes</i>	Белки	[41]

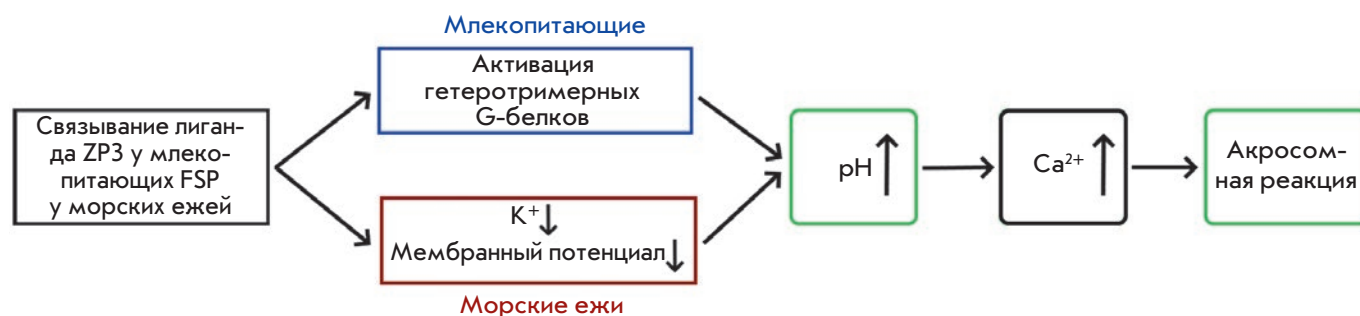


Рис. 3. Схематичное изображение каскадов, индуцирующих акросомную реакцию у сперматозоидов морских ежей и млекопитающих. Адаптировано из [48]

рецепторы [49]. В отличие от активации AR по пути ZP3, активация через ZP1 и ZP4 не задействует сигнальные каскады, связанные с G-белками, и активирует потенциал-зависимые кальциевые каналы не только T-, но и L-типа [49]. Таким образом, у млекопитающих существуют значительные различия в сигнальных каскадах, индуцирующих AR и, по-видимому, несколько независимых путей ее активации.

В то же время сигнальные каскады, приводящие к индукции AR, принципиально сходны (рис. 3) [48]. В обоих случаях разные классы рецепторов приводят к открытию кальциевых каналов и каналов, вызывающих локальное повышение pH. Эти факторы активируют фосфолипазу C. Появление IP3 приводит к высвобождению внутриклеточного кальция и открытию кальциевых каналов, регулируемых высвобождением Ca<sup>2+</sup> (SOC), и к индукции AR.

Дальнейший ход оплодотворения определяется активностью акросомных белков. В изученных группах организмов эти белки не гомологичны, но при этом они четко подразделяются на три функциональные группы.

(1) Компоненты, разрушающие оболочки яйцеклетки. Чаще всего они представлены протеазами или другими ферментами [9, 10, 50]. В то же время

нарушение целостности оболочек яйцеклетки возможно и без разрыва ковалентных связей.

У моллюсков рода *Haliotis* в акросоме содержится белок лизин с молекулярной массой 16 кДа, разрушающий оболочку яйцеклеток галиотид по неэнзиматическому механизму. Лизин содержит пять альфа-спиралей, образующих две поверхности: с одной стороны гидрофобную, с другой – катионную. Он существует в виде димеров, нековалентно связанных за счет гидрофобных поверхностей. Катионная поверхность выставлена наружу димера и отвечает за взаимодействие с VERL.

Вителлиновая оболочка галиотид состоит из плотных волокон, включающих от 6 до 10 молекул гликопротеинов VERL, ее структура стабилизируется водородными связями между VERL. Взаимодействие димера лизина со специализированными повторами VERL приводит к тому, что лизин мономеризуется и связывается с VERL. Это специфичное распознавание VERL и лизина приводит к замещению водородных связей между молекулами VERL и локальному разрушению оболочки яйцеклетки [51–53].

(2) Компоненты, обеспечивающие адгезию сперматозоида к оболочке яйцеклетки. Первым акросомным белком с такой функцией стал биндин, обнаруженный в гаметах морских ежей [13]. Размер зрелого

го биндина у разных видов ежей составляет от 193 до 418 аминокислот, и он состоит из консервативного коря из 55 аминокислот, вовлеченного в слияние гамет (стадия 4) и двух фланкирующих участков, ответственных за видоспецифичную адгезию к оболочкам яйцеклетки [13]. Аналогичные по функции, но не гомологичные белки обнаружены у эхиуриды *Urechis* sp. [54]. У устриц эту функцию выполняют пять высокоомологичных лектинов [55].

(3) Компоненты, влияющие на физиологию яйцеклетки. Например, акросомные белки М3, М6 и М7 двустворчатых моллюсков рода *Mytilus* индуцируют окончание мейоза яйцеклетки [56], а биндин эхиурид *Urechis* sp. активирует яйцеклетку [54].

#### Стадия 4: слияние мембран (этап 5)

После локального разрушения внешних оболочек яйцеклетки происходит сближение и слияние мембран взаимодействующих гамет. Сам по себе липидный состав мембран, особенно количество холестерина [57], может влиять на процесс их слияния [58]. Однако ключевую роль играют специализированные белки. Предполагается, что у эукариот в слиянии гамет участвует НАР2 – гомолог вирусного белка слияния II класса (class II fusion proteins) [59]. Экспериментально показано его участие в слиянии гамет у актинии *Nematostella vectensis* [60], цветковых растений рода *Arabidopsis* [61], протистов *Chlamydomonas*, *Tetrahymena* и *Plasmodium* [62, 63]; а ортологичный ген белка НАР2 обнаружен в геномах практически всех многоклеточных животных [64]. Существуют данные об участии и группоспецифичных белков, например, уже упомянутого биндина морских ежей [65–67].

Взаимодействия гамет основаны на консервативных процессах, контролируемых вторичными мессенджерами, в первую очередь, ионами кальция. Однако в ходе эволюции отдельных таксонов эти процессы многократно усложнились; у филогенетически удаленных групп в них вовлекается большое количество неомологичных белков.

#### Механизмы несовместимости гамет беспозвоночных с наружным оплодотворением

Детально GI изучена на модели близких видов морских ежей. У других же видов исследования проведены лишь на отдельных стадиях, однако ни в одной из моделей пока не удалось выявить причины реализации GI на конкретных этапах распознавания гамет.

**Пептидные хемоаттрактанты** (рис. 1, 0–1) морских ежей зачастую имеют видоспецифичные различия в аминокислотной последовательности [68]. Видоспецифичность привлечения сперматозоида

подтверждают и экспериментальные данные, полученные на 17 видах из нескольких родов морских ежей [69]. Например, хемоаттрактант *Arbacia punctulata* не оказывает действия на сперматозоиды *S. purpuratus* или *Lytechinu spictus* [70–72].

Аналогичный феномен наблюдали у нескольких видов голотурий рода *Bohadschia* и 22 видов офиур [73]. Однако существует и целый ряд примеров с не видоспецифичным действием хемоаттрактантов. У ряда голотурий (например, *Cucumaria piperata*) сперматозоиды реагируют не только на аттрактанты яйцеклеток близких видов, но даже на яйцеклетки морских звезд [74, 75]. У иглокожих специфичность привлечения сперматозоидов варьирует от видового уровня до отсутствия специфичности внутри класса и пока нам не известно, чем вызваны наблюдаемые различия.

Полные экстракты тканей репродуктивной системы двустворчатых моллюсков *Dreissena polymorpha* и *D. bugensis* могут привлекать как гомо-, так и гетероспецифичные сперматозоиды. Заметим, что для привлечения гетероспецифичных гамет концентрация аттрактанта должна быть в 100 раз выше [75]. Аналогичная ситуация характерна и для активной рода *Montipora*: эксперименты с тремя искусственно синтезированными аналогами хемоаттрактантов показали, что сперматозоиды разных видов по-разному реагируют на различные соотношения этих веществ [30]. Наконец, известны случаи, когда химическая структура аттрактанта яйцеклетки не различается между изучаемыми группами, так как участвует в основополагающих физиологических процессах. Таков, например, *L*-триптофан (хемоаттрактант галиотид), высвобождаемый в неизменном виде [36].

**Индукция AR** (рис. 1, 2–3) морских ежей, по всей видимости, видоспецифична. Это обеспечивается различиями в положении и количестве сульфатных группировок в полисахаридной цепи сульфатированных полисахаридов оболочки яйцеклетки [15].

У морских звезд видоспецифичность индукции AR проявляется лишь на уровне подсемейств, например, между видами родов *Asterias* и *Aphelasterias* (подсем. *Asteriinae*), *Distolasterias* (подсем. *Coscinasteriinae*) и *Asterina* (сем. *Asterinidae*) [76]. Кроме того, AR может активироваться множеством неспецифических воздействий, например, механическим контактом с предметным стеклом.

**Ферментативное разрушение оболочки яйцеклетки** (рис. 1, 4) морских ежей, по-видимому, носит не видоспецифичный характер [77]. В то же время считается, что в большинстве случаев при скрещивании





меры поддержания RI между близкородственными видами за счет несовместимости гамет получены только для комплексов близких видов моллюсков родов *Haliotis* и *Tegula*, а также морских ежей родов *Echinometra*, *Heliocidaris*, *Strongylocentrotus*. Зачастую гетероспецифичное оплодотворение возможно; оно, в частности показано в экспериментах *po choice*, хотя оказывается и не столь эффективным, как взаимодействия гомоспецифичных гамет [52, 75, 77, 89–91]. Вероятно, в ряде изученных групп GI между близкими видами достигается только при конкуренции между гомо- и гетероспецифичными гаметами. Определенный прорыв в данной области намечается в связи с применением широкопрофильного секвенирования и полногеномного описания многих из перечисленных в данном разделе видов наряду с прогрессом в биоинформатических методах предсказания вторичных структур искомым белков.

### Несовместимость гамет у видов с внутренним оплодотворением

У животных с внутренним оплодотворением процессы взаимодействия гамет во многом определяются состоянием самки, например, созревание ооцитов у насекомых запускается синтезом вителлогенина, выработка которого регулируется ювенильным гормоном, эдизостероидами и целым рядом различных пищевых сигналов [92]. Важную роль играет и иммунный статус самки: он влияет на хранение и выживание сперматозоидов. Чем активнее иммунная система самки, тем меньший период времени хранится сперма (см. обзор [93]). Это проявляется, прежде всего, у насекомых, копулирующих единожды в жизни. Высокий уровень активности иммунной системы царицы в колонии муравьев *Attacolombica* негативно влияет на выживаемость спермы, и для ее длительного хранения в организме самки включаются механизмы подавления активности иммунной системы [94]. Для сравнения активности иммунной системы измеряли эффективность реакции инкапсуляции: в полость тела насекомых вводили фрагменты нейлона через равные промежутки времени, измеряли количество меланизированных гемоцитов, инкапсулирующих это инородное тело [94]. Такой метод лишь косвенно отражает связь иммунной системы насекомых с хранением спермы, а выяснение конкретных молекулярных каскадов, вовлеченных в эти процессы, представляется крайне актуальной задачей.

GI у животных с внутренним оплодотворением правильнее заменить более удачным термином: посткопулятивная презиготическая репродуктивная изоляция (*post-copulatory prezygotic reproductive barriers*, PCPZ). Это понятие включает целый ряд

схожих по проявлению механизмов репродуктивной изоляции, но основанных на разных молекулярных каскадах.

Зачастую PCPZ основана на возможности самца влиять на физиологию самки. Например, у мух *Anastrepha suspensa* в присутствии самцов ускоряется развитие репродуктивной системы самок [95]. Еще пример – ритуал передачи самке «брачных подарков» (*Nuptial Gifts*), которые оказывают влияние на ее физиологию и плодовитость (см. обзор [96]). Существенную роль играют белки семенной жидкости, которые самец передает вместе со спермой при внутреннем оплодотворении. Так, компоненты семенной жидкости мотылька *Heliothis virescens* стимулируют самку к продукции ооцитов [97], а у сверчков рода *Allonemobius* известен и конкретный белок, индуцирующий продукцию ооцитов самками своего вида [98, 99]. Мы предполагаем, что, несмотря на функциональное сходство, эти белки не гомологичны.

Показано, что белки семенной жидкости разнообразны как по функциям, так и по структуре. Например, в семенной жидкости жука *Callosobruchus maculatus* обнаружено не менее 127 белков [100]. Эти белки влияют на продукцию яйцеклеток, изменение формы репродуктивных протоков, обеспечивают антимикробную активность и готовность самки к следующему оплодотворению. Они могут определять длительность хранения спермы, модулировать активность сперматозоидов и соответственно влиять на их потенциальную конкуренцию. Наконец, показана роль этих белков в блокировании семяприемника (формированием *mating plugs*; см. обзор [101]). Протеомный анализ компонентов семенной жидкости представляет актуальную задачу, поскольку многие белки семенной жидкости относятся к новым семействам, а их функции неизвестны. Накопленные к настоящему моменту данные не позволяют провести их сравнительный структурный анализ и в полной мере оценить степень участия в процессе размножения. Например, в 2009 году в результате протеомного анализа семенной жидкости дрозофилы – одного из ключевых модельных объектов, при помощи биоинформатического анализа полногеномных данных удалось обнаружить 19 ранее не аннотированных белков с неизвестной функцией [102]. Вероятно, эта проблема будет решена с развитием биоинформатических алгоритмов предсказания структуры и функции белков на основе первичной структуры.

Тем не менее, PCPZ реализуется по тем же принципам лиганд-рецепторных взаимодействий. Как и в случае несовместимости гамет, их видоспецифичность обусловлена коэволюцией отдельных пар молекул. Условно такие механизмы можно разделить

на две группы: скрытый выбор самки и спермальную конкуренцию.

### **Спермальная конкуренция (Sperm Competition; SC)**

При полиандрии (множественное отцовство) в репродуктивную систему самки попадают сперматозоиды нескольких партнеров своего, а иногда и другого вида. Семенная жидкость участвует в формировании/поддержании активного состояния сперматозоидов; ее компоненты могут определять вероятность оплодотворения яйцеклетки. При контакте спермы разных видов компоненты семенной жидкости могут определять исход конкуренции сперматозоидов (см. обзоры [103, 104]). В результате этой конкуренции может формироваться преимущество конспецифичной спермы (Conspecific sperm precedence). Например, между особями близких видов *Drosophila* возможна межвидовая гибридизация при одиночных спариваниях. Однако при спаривании с гетеро- и гомоспецифичными самцами большая часть потомства будет получена от гомоспецифичного самца [105]. Экспериментально показано, что этот эффект связан именно с белками семенной жидкости [105]. Детально подобные механизмы изучены у близких видов *Drosophila simulans* и *D. mauritiana*. PCPZ между ними основана на двух механизмах, зависящих от последовательности копуляции. (1) Если гомоспецифичная копуляция была первой, то компоненты семенной жидкости инактивируют поступающую следом гетероспецифичную сперму. (2) Если первым копулировал гетероспецифичный самец, то при последующем гомоспецифичном осеменении происходит замещение гетероспецифичной спермы в органах хранения спермы [106]. Аналогичный феномен показан и у мучных хрущаков [107], сверчков [108], жуков-зерновок [109], стрекоз [110] и божьих коровок [111].

### **Скрытый выбор самки (Female cryptic choice; FCC)**

FCC – это совокупность поведенческих, анатомических и физиологических особенностей, позволяющих самке контролировать эффективность передачи половых продуктов (прекопулятивный FCC) или оплодотворения (посткопулятивный FCC; см. обзор [112]). Например, при спаривании мух-навозниц *Scathophaga stercoraria* вероятность оплодотворения яйцеклетки определяется тем, в какой семяприемник попадает сперма. Самка контролирует распределение спермы, тем самым определяя неравный вклад самцов в потомство [113]. Кроме того, компоненты вспомогательных репродуктивных желез самки влияют на выживаемость спермы, которая отличается у самцов с разными генотипами [113].

Как и в случае SC, FCC обеспечивает преимущественное участие гомоспецифичной спермы в оплодотворении [112]. Так, при скрещиваниях сверчков двух видов – *Allonemobius fasciatus* и *A. socius* – гетероспецифичная сперма теряет подвижность в репродуктивной системе самки [108].

Очевидно, что SC и FCC феноменологически схожи, и на практике сложно определить конкретные механизмы, обеспечивающие репродуктивную изоляцию. Например, самка вида *L. saxatilis*, входящего в изучаемую нами группу промискуитетных криптических видов рода *Littorina*, хранит сперму и способна давать потомство от 20 и более самцов одновременно. Однако распределение генотипов эмбрионов значительно отклоняется от случайного – большая часть потомства происходит от одного или нескольких самцов [114]. Считается, что это результат SC [114]. Мы предполагаем, что наблюдаемый феномен связан с обнаруженным нами параспермальным (т.е. находящимся в «парасперматозоидах» – клетках спермального ряда, не способных к оплодотворению, но присутствующих в сперме) белком LOSP и белками семенной жидкости [21, 22]. Однако пока у нас нет прямых подтверждений этого.

### **Эволюционные трактовки несовместимости гамет**

Полиморфизм GRP ограничивает панмиксию (свободное скрещивание) в популяциях беспозвоночных с наружным и внутренним оплодотворением. Коэволюция отдельных пар белков напрямую влияет на видообразование. Особенное внимание привлекает феномен быстрой эволюции GRP, который широко обсуждался в обзорных статьях начиная с 2002 года [9, 10, 12]. Уровень полиморфизма GRP у ряда организмов, от протистов до многоклеточных животных, значительно превосходит ожидаемый. Несинонимичные замены в генах этих белков в популяции встречаются чаще синонимичных (коэффициент  $dN/dS > 1$ ), что отражает действие отбора на анализируемые локусы и, по-видимому, связано с высоким уровнем полиморфизма соответствующих белков [9, 10, 115]. Таковы, например, феромоны *Euplotes* и *Basidiomycetes*, акросомный белок лизин моллюсков *Tegula* и *Haliotida*, а также биндин морских ежей [9, 10, 12]. Эволюционные трактовки этого явления можно условно разделить на два направления: объяснение причин высокого уровня полиморфизма GRP и анализ роли полиморфизма GRP и GI в видообразовании.

### **Причины высокого уровня полиморфизма GRP**

Хотя изменения GRP потенциально снижают эффективность оплодотворения, вероятно, существуют факторы, которые поддерживают/формируют высокий уровень полиморфизма.

**Обитание в условиях симпатрии** (виды обитают совместно на полностью или частично перекрывающихся ареалах) тесно связано с высоким темпом эволюции GRP. Так GI и  $dN/dS$  GRP  $> 1$  наблюдаются только между симпатрическими видами морских ежей родов *Echinometra*, *Heliocidaris*, *Strongylocentrotus* [11, 13–15]. Аналогичная ситуация характерна и для большинства описанных выше групп, у которых GI показана на видовом уровне. GI наблюдается и у насекомых при соблюдении еще одного условия – полигамии – репродуктивной стратегии, при которой самка способна спариваться с несколькими (зачастую десятками) самцами.

**Отбор против гибридов (reinforcement):** особая форма отбора, направленная на формирование репродуктивной изоляции между экологически подразделенными субпопуляциями одного вида, адаптированными к различным микронишам. Нами обнаружено только одно опубликованное экспериментальное подтверждение, полученное на модели близких видов дрозофилы. При создании условий искусственной симпатрии у *D. yakuba* и *D. santomea* из аллопатических популяций (у этих видов известны и симпатрические популяции) этологическая изоляция и PCPZ достоверно усиливаются уже после четырех поколений [8]. Вероятно, дополнительным подтверждением указанных концепций может стать обнаруженный нами полиморфизм белка LOSP, потенциально вовлеченного в RI в группе видов-двойников рода *Littorina* [21, 22]. По предварительным данным, полиморфизм LOSP оказывается максимальным в популяциях *L. saxatilis* – вида, обладающего значительным потенциалом формирования рас, локальных экотипов [115–119], обитающего в симпатрии с популяциями генетически близких криптических видов *L. arcana* и *L. compressa* [120–122]. В то же время этот белок практически мономорфен в популяциях *L. obtusata*, обитающих в симпатрии с *L. fabalis*, но не формирующих экотипы в изученных популяциях.

Можно предположить, что высокая вероятность контакта гетероспецифичных гамет или гибридогенеза между близкими подвидовыми группами делает адаптивными высокий уровень полиморфизма GRP и формирование GI [8, 122–126].

**Половой конфликт** внутри вида также может приводить к повышению полиморфизма GRP в популяции [18, 19, 127–129]. Логическая основа этой модели – в простых стохастических принципах: вероятность оплодотворения пассивного партнера (яйцеклетки) каким-либо сперматозоидом всегда высока, а сперматозоид конкурирует за оплодотворение конкретной

яйцеклетки. Из-за этого наибольший риск для яйцеклетки – это полиспермия (снижение эффективности взаимодействия гамет адаптивно), а для сперматозоида – конкуренция с другими сперматозоидами (повышение эффективности взаимодействия гамет адаптивно). В этой разнонаправленности заключается предпосылка молекулярной «гонки вооружений» между сперматозоидом и яйцеклеткой, результатом которой и может быть высокий полиморфизм GRP в популяции [18, 19].

### **Связь полиморфизма GRP и видообразования**

Учитывая описанное влияние единичных аминокислотных замен в GRP на GI, высокий уровень полиморфизма GRP, поддерживаемый в популяции, неизбежно приведет к частичному ограничению свободного скрещивания (панмиксии).

**Видообразование первично.** Предположение, что отбор против гибридов непосредственно влияет на полиморфизм GRP, хорошо соотносится с одним из первых определений этой формы отбора Э. Майра (1970): формирование репродуктивной изоляции между двумя группам будет адаптивно, если приспособленность гибридов ниже приспособленности материнских организмов [124]. Гены GRP – это одни из немногих локусов, продукты которых преимущественно или исключительно связаны с оплодотворением – именно эта часть генома может быть наиболее «чувствительной» к отбору против гибридов [8, 125–127]. Такая точка зрения значительно дополняет классическую модель экологического видообразования. Феномен высокого полиморфизма GRP, как прямого следствия отбора против гибридов, объясняет механизмы формирования репродуктивно изолированных группировок и подтверждает саму возможность экологического видообразования в симпатрии.

**Ограничение панмиксии первично.** Данные о потенциальной связи полиморфизма GRP с видообразованием можно трактовать и противоположным образом. Подразделенность генных пулов в этом случае обусловлена «фоновыми» процессами, не вовлеченными непосредственно в видообразование. В качестве такого фактора может выступать половой конфликт. В этом случае внутривидовая конкуренция будет формировать первичную генетическую подразделенность. В пользу этой трактовки говорит, например, тот факт, что при формировании внутри- и межвидовой SC у дрозофилы происходят сходные изменения генома, затрагивающие одни и те же локусы [130].

Приведенные здесь точки зрения не противоположны, но во многом дополняют друг друга. С одной стороны, половой конфликт снижает стабильность видового генного пула за счет высокого уровня по-



лиморфизма GRP. С другой – отбор против гибридов может приводить к направленному формированию репродуктивно изолированных групп. Согласно концепции экологического видообразования, адаптивной будет любая форма RI, а формирование именно GI можно связывать с биологическими свойствами отдельных групп.

Верификация этих построений затруднительна и требует разработки новых модельных систем. Одной из таких моделей могут считаться группы видов-двойников морских моллюсков рода *Littorina* (Mollusca: Caenogastropoda) с внутренним оплодотворением. Эта модель многосторонне изучена в связи с проблемами экологического видообразования, локальной адаптации, репродуктивного поведения, взаимодействий паразит–хозяин и пр. [116–122, 131–133]. Активно проводится поиск потенциальных эффекторов взаимодействия гамет (параспермальный белок LOSP, вовлеченный в RI между близкими видами посредством одного из описанных выше механизмов, например SC [21, 22, 118]). Уже сейчас известно и в ближайшее время будет опубликовано по меньшей мере несколько десятков новых белков семенной жидкости, вероятно, вовлеченных в формирование межвидовых репродуктивных барьеров.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Взаимодействия гамет всех изученных видов включают одни и те же стадии, но у филогенетически удаленных групп в них вовлечены негомологичные белки. GI может возникать на любом этапе взаимодействия гамет в связи с изменениями в структуре соответствующих молекул и проявляться на различных таксономических уровнях: между представителями разных классов; на уровне родов; между близкими видами; и даже на внутривидовом уровне.

Несмотря на широкое внедрение полногеномного секвенирования, изучение новых, высоковариабельных семейств белков представляет нетривиальную задачу и данные о GRP все еще фрагментарны.

Ключевые направления в развитии этой тематики связаны с: (1) разработкой новых модельных систем, относящихся к различным таксономическим группам, и «ручной» аннотацией новых семейств белков; (2) усовершенствованием биоинформатических алгоритмов автоматической аннотации и предсказания структуры и функции белков. ●

*Работа поддержана грантом  
РФФИ № 18-34-00873 (ААЛ) и грантом  
РНФ № 19-14-00321 (АЛМ, НАМ, АИГ).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- De Queiroz K. // *Systematic Biol.* 2007. V. 56. № 6. P. 879–886.
- Mallet J. // *Biol. Philosophy.* 2010. V. 25. № 4. P. 497–527.
- Coyne J.A., Orr H.A. *Speciation.* Sunderland: Sinauer Associates, 2004. 545 с.
- Turissini D.A., McGirr J.A., Patel S.S., David J.R., Matute D.R. // *Mol. Biol. Evol.* 2017. V. 35. № 2. P. 312–334.
- Servedio M.R., Noor M.A. // *Annu. Rev. Ecol. Evol. Systemat.* 2003. V. 34. № 1. P. 339–364.
- Schluter D. // *Trends Ecol. Evol.* 2001. V. 16. № 7. P. 372–380.
- Coyne J.A., Orr H.A. // *Evolution.* 1997. V. 51. № 1. P. 295–303.
- Matute D.R. // *PLoS Biol.* 2010. V. 8. № 3. P. e1000341.
- Swanson W.J., Vacquier V.D. // *Nat. Rev. Genet.* 2002. V. 3. № 2. P. 137.
- Wilburn D.B., Swanson W.J. // *J. Proteomics.* 2016. V. 135. P. 12–25.
- Zigler K.S., McCartney M.A., Levitan D.R., Lessios H.A. // *Evolution.* 2005. V. 59. № 11. P. 2399–2404.
- Clark N.L., Aagaard J.E., Swanson W.J. // *Reproduction.* 2006. V. 131. № 1. P. 11–22.
- Zigler K.S. // *Internat. J. Dev. Biol.* 2004. V. 52. № 5–6. P. 791–796.
- Lessios H.A., Zigler K.S. *Rates of sea urchin bindin evolution.* Oxford: Oxford Univ. Press, 2012. P. 136–143.
- Pomin V.H. // *Glycoconjugate J.* 2015. V. 32. № 1–2. P. 9–15.
- Kvarnemo C., Simmons L.W. // *Philosoph. Transact. Royal Society B: Biol. Sci.* 2013. V. 368. № 1613. P. 20120042.
- Dorus S., Evans P.D., Wyckoff G.J., Choi S.S., Lahn B.T. // *Nat. Genet.* 2004. V. 36. № 12. P. 1326.
- Parker G.A. // *Biol. Rev.* 1970. V. 45. № 4. P. 525–567.
- Levitan D.R., Stapper A.P. // *Evol. Internat. J. Organic Evol.* 2010. V. 64. № 3. P. 785–797.
- Levitan D.R., Ferrell D.L. // *Science.* 2006. V. 312. № 5771. P. 267–269.
- Lobov A.A., Maltseva A.L., Starunov V.V., Babkina I.Y., Ivanov V.A., Mikhailova N.A., Granovitch A.I. // *J. Exp. Zool. Part B: Mol. Dev. Evol.* 2018. V. 330. № 4. P. 193–201.
- Lobov A.A., Maltseva A.L., Mikhailova N.A., Granovitch A.I. // *J. Molluscan Studies.* 2015. V. 81. № 4. P. 512–515.
- Vacquier V.D. // *Science.* 1998. V. 281. № 5385. P. 1995–1998.
- Wood C.D., Nishigaki T., Furuta T., Baba S.A., Darszon A. // *J. Cell Biol.* 2005. V. 169. № 5. P. 725–731.
- Miller R.L. // *J. Exp. Zool.* 1977. V. 202. № 2. P. 203–211.
- Miller R.L. // *Marine Biol.* 1979. V. 53. № 2. P. 99–113.
- Pacey A., Cosson J., Bentley M. // *J. Exp. Biol.* 1994. V. 195. № 1. P. 259–280.
- Espinal J., Aldana M., Guerrero A., Wood C., Darszon A., Martínez-Mekler G. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 8. P. e22619.
- Guerrero A., Nishigaki T., Carneiro J., Tatsu Y., Wood C.D., Darszon A. // *Dev. Biol.* 2010. V. 344. № 1. P. 52–65.
- Coll J.C., Bowden B.F., Meehan G.V., König G.M., Carroll A.R., Tapiolas D.M., Aliño P.M., Heaton A., De Nys R., Leone P.A., et al. // *Marine Biol.* 1994. V. 118. № 2. P. 177–182.
- Coll J.C., Leone P.A., Bowden B.F., Carroll A.R., König G.M., Heaton A., De Nys R., Maida M., Aliño P.M., Willis R.H., et al. // *Marine Biol.* 1995. V. 123. № 1. P. 137–143.
- Hansbrough J.R., Garbers D.L. // *J. Biol. Chem.* 1981. V. 256. № 3. P. 1447–1452.
- Suzuki N., Garbers D.L. // *Biol. Reprod.* 1984. V. 30. № 5. P. 1167–1174.
- Zatylny C., Marvin L., Gagnon J., Henry J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2002. V. 296. № 5. P. 1186–1193.
- De Lisa E., Salzano A.M., Moccia F., Scaloni A., Di Cosmo A. // *J. Exp. Biol.* 2013. V. 216. № 12. P. 2229–2237.

36. Riffell J.A., Krug P.J., Zimmer R.K. // *J. Exp. Biol.* 2002. V. 205. № 10. P. 1439–1450.
37. Yoshida M., Murata M., Inaba K., Morisawa M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 23. P. 14831–14836.
38. Kubagawa H.M., Watts J.L., Corrigan C., Edmonds J.W., Sztul E., Browse J., Miller M.A. // *Nat. Cell Biol.* 2006. V. 8. № 10. P. 1143.
39. Derenbach J.B., Gereck M.V. // *Marine Biol. Ecol.* 1980. V. 44. № 1. P. 61–65.
40. Hombeck M., Boland W. // *Tetrahedron.* 1998. V. 54. № 37. P. 11033–11042.
41. Vallesi A., Giuli G., Bradshaw R.A., Luporini P. // *Nature.* 1995. V. 376. № 6540. P. 522.
42. Kaupp U.B., Strünker T. // *Trends Cell Biol.* 2017. V. 27. № 2. P. 101–109.
43. Pitnick S., Hosken D.J., Birkhead T.R. *Sperm biology.* Cambridge: Acad. Press, 2009. P. 69–149.
44. Reid D.G. *Systematics and evolution of Littorina.* London: The Ray Society, 1996. 463 c.
45. Wingstrand K.G. // *Acta Zoologica.* 1973. V. 54. № 1. P. 31–52.
46. Moy G.W., Mendoza L.M., Schulz J.R., Swanson W.J., Glabe C.G., Vacquier V.D. // *J. Cell Biol.* 1996. V. 133. № 4. P. 809–817.
47. Dan J.C. // *Internat. Rev. Cytol.* Cambridge: Acad. Press, 1965. V. 5. P. 365–393.
48. Darszon A., Espinosa F., Galindo B., Sánchez D., Beltrán C. *Fertilization.* Cambridge: Acad. Press, 2002. P. 225–264.
49. Gupta S.K., Bhandari B. // *Asian J. Androl.* 2011. V. 13. № 1. P. 97.
50. Talbot P., Chanmanon P. // *J. Ultrastruct. Res.* 1980. V. 70. № 3. P. 287–297.
51. Vacquier V.D., Lee Y.H. // *Zygote.* 1993. V. 1. № 3. P. 181–196.
52. Galindo B.E., Moy G.W., Swanson W.J., Vacquier V.D. // *Gene.* 2002. V. 288. № 1–2. P. 111–117.
53. Kresge N., Vacquier V.D., Stout C.D. // *Bioessays.* 2001. V. 23. № 1. P. 95–103.
54. Gould M., Stephano J., Holland L.Z. // *Dev. Biol.* 1986. V. 117. № 1. P. 306–318.
55. Wu Q., Li L., Zhang G. // *Marine Biotechnol.* 2011. V. 13. № 2. P. 327–335.
56. Takagi T., Nakamura A., Deguchi R., Kyojuka K.I. // *J. Biochem.* 1994. V. 116. № 3. P. 598–605.
57. Yang S.T., Kreutzberger A.J., Lee J., Kiessling V., Tamm L.K. // *Chem. Phys. Lipids.* 2016. V. 199. P. 136–143.
58. Chernomordik L., Kozlov M.M., Zimmerberg J. // *J. Membrane Biol.* 1995. V. 146. № 1. P. 1–14.
59. Fedry J., Forcina J., Legrand P., Péhau-Arnaudet G., Haouz A., Johnson M., Rey F.A., Krey T. // *PLoS Biol.* 2018. V. 16. № 8. P. e2006357.
60. Ebchuqin E., Yokota N., Yamada L., Yasuoka Y., Akasaka M., Arakawa M., Deguchid R., Mori T., Sawada H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. V. 451. № 4. P. 522–528.
61. von Besser K., Frank A.C., Johnson M.A., Preuss D. // *Development.* 2006. V. 133. № 23. P. 4761–4769.
62. Liu Y., Tewari R., Ning J., Blagborough A.M., Garbom S., Pei J., Grishin N.V., Steele R.E., Sinden R.E., Snell W.J., Billker O. // *Genes Dev.* 2008. V. 22. № 8. P. 1051–1068.
63. Cole E.S., Cassidy-Hanley D., Pinello J.F., Zeng H., Hsueh M., Kolbin D., Ozzello C., Giddings T., Winey M.J., Clark T.G. // *Curr. Biol.* 2014. V. 24. № 18. P. 2168–2173.
64. Steele R.E., Dana C.E. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 11. P. e7680.
65. Moy G.W., Vacquier V.D. // *Curr. Topics Dev. Biol.* 1979. V. 13. P. 31–44.
66. Rufas O., Fisch B., Ziv S., Shalgi R. // *Mol. Hum. Reprod.* 2000. V. 6. № 2. P. 163–169.
67. Ulrich A.S., Otter M., Glabe C.G., Hoekstra D. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 27. P. 16748–16755.
68. Suzuki N., Yoshino K.I. // *Comp. Biochem. Physiol. Part B: Comp. Biochem.* 1992. V. 102. № 4. P. 679–690.
69. Suzuki N. // *Zool. Sci.* 1995. V. 12. № 1. P. 13–28.
70. Hathaway R.R. // *Biol. Bull.* 1963. V. 125. № 3. P. 486–498.
71. Suzuki N., Garbers D.L. // *Biol. Reprod.* 1984. V. 30. № 5. P. 1167–1174.
72. Ward G.E., Brokaw C.J., Garbers D.L., Vacquier V.D. // *J. Cell Biol.* 1985. V. 101. № 6. P. 2324–2329.
73. Miller R.L. // *J. Exp. Zool.* 1997. V. 279. № 2. P. 189–200.
74. Miller R.L. *Biology of fertilization.* London: Elsevier, 1985. 496 c.
75. Miller R.L., Mojares J.J., Ram J.L. // *Canad. J. Zool.* 1994. V. 72. № 10. P. 1764–1770.
76. Nakachi M., Moriyama H., Hoshi M., Matsumoto M. // *Dev. Biol.* 2006. V. 298. № 2. P. 597–604.
77. Yokota N., Sawada H. // *Dev. Biol.* 2007. V. 308. № 1. P. 222–231.
78. Metz E.C., Kane R.E., Yanagimachi H., Palumbi S.R. // *Biol. Bull.* 1994. V. 187. № 1. P. 23–34.
79. Glabe C.G., Vacquier V.D. // *Nature.* 1977. V. 267. № 5614. P. 836.
80. Summers R.G., Hylander B.L. // *Exp. Cell Res.* 1975. V. 96. № 1. P. 63–68.
81. Summers R.G., Hylander B.L. // *Exp. Cell Res.* 1976. V. 100. № 1. P. 190–194.
82. Palumbi S.R., Metz E.C. // *Mol. Biol. Evol.* 1991. V. 8. № 2. P. 227–239.
83. Zigler K.S., McCartney M.A., Levitan D.R., Lessios H.A. // *Evolution.* 2005. V. 59. № 11. P. 2399–2404.
84. Zigler K.S. // *Internat. J. Dev. Biol.* 2004. V. 52. № 5–6. P. 791–796.
85. Vacquier V.D., Swanson W.J., Hellberg M.E. // *Dev. Growth Differ.* 1995. V. 37. № 1. P. 1–10.
86. Vacquier V.D., Lee Y.H. // *Zygote.* 1993. V. 1. № 3. P. 181–196.
87. Moy G.W., Springer S.A., Adams S.L., Swanson W.J., Vacquier V.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 6. P. 1993–1998.
88. Riginos C., McDonald J.H. // *Mol. Biol. Evol.* 2003. V. 20. № 2. P. 200–207.
89. Geyer L.B., Palumbi S.R. // *Evolution.* 2005. V. 59. № 1. P. 97–105.
90. Levitan D.R. // *Evolution.* 2002. V. 56. № 8. P. 1599–1689.
91. Evans J.P., Garcia-Gonzalez F., Almbro M., Robinson O., Fitzpatrick J.L. // *Proc. Royal Soc. B: Biol. Sci.* 2012. V. 279. № 1739. P. 2855–2861.
92. Roy S., Saha T.T., Zou Z., Raikhel A.S. // *Annu. Rev. Entomol.* 2018. V. 63. P. 489–511.
93. Lawniczak M.K., Barnes A.I., Linklater J.R., Boone J.M., Wigby S., Chapman T. // *Trends Ecol. Evol.* 2007. V. 22. № 1. P. 48–55.
94. Baer B., Armitage S.A., Boomsma J.J. // *Nature.* 2006. V. 441. № 7095. P. 872.
95. Pereira R., Teal P.E., Sivinski J., Dueben B.D. // *J. Insect Behav.* 2006. V. 19. № 1. P. 31–43.
96. Gwynne D.T. // *Annu. Rev. Entomol.* 2008. V. 53. P. 83–101.
97. Park Y.I., Ramaswamy S.B., Srinivasan A. // *J. Insect Physiol.* 1998. V. 44. № 10. P. 903–908.
98. Marshall J.L., DiRienzo N. // *Internat. J. Evol. Biol.* 2012. V. 2012. P. 7.
99. Marshall J.L., Huestis D.L., Hiromasa Y., Wheeler S., Oppert C., Marshall S.A., Tomich J.M., Oppert B. // *PLoS One.* 2009. V. 4. № 10. P. e7537.
100. Goenaga J., Yamane T., Rönn J., Arnqvist G. // *BMC Evol. Biol.* 2015. V. 15. № 1. P. 266.
101. Avila F.W., Sirot L.K., LaFlamme B.A., Rubinstein C.D.,

- Wolfner M.F. // *Annu. Rev. Entomol.* 2011. V. 56. P. 21–40.
102. Findlay G.D., MacCoss M.J., Swanson W.J. // *Genome Res.* 2009. V. 19. № 5. P. 886–896.
103. Parker G.A. // *Biol. Rev.* 1970. V. 45. № 4. P. 525–567.
104. Smith R.L. *Sperm competition and the evolution of animal mating systems.* Cambridge: Acad. Press, 1984. 710 c.
105. Price C.S. // *Nature.* 1997. V. 388. № 6643. P. 663.
106. Price C.S., Kim C.H., Posluszny J., Coyne J.A. // *Evolution.* 2000. V. 54. № 6. P. 2028–2037.
107. Wade M.J., Patterson H., Chang N.W., Johnson N.A. // *Heredity.* 1994. V. 72. № 2. P. 163.
108. Gregory P.G., Howard D.J. // *Evolution.* 1994. V. 48. № 3. P. 705–710.
109. Rugman-Jones P.F., Eady P.E. // *Proc. Royal Soc. B: Biol. Sci.* 2007. V. 274. № 1612. P. 983–988.
110. Sánchez-Guillén R.A., Córdoba-Aguilar A., Cordero-Rivera A. // *Internat. J. Odonatol.* 2013. V. 16. № 3. P. 259–267.
111. Katakura H. // *Zool. Sci.* 1997. V. 14. № 6. P. 869–882.
112. Firman R.C., Gasparini C., Manier M.K., Pizzari T. // *Trends Ecol. Evol.* 2017. V. 32. № 5. P. 368–382.
113. Ward P.I. // *Adv. Study Behav.* 2007. V. 37. P. 343–369.
114. Johannesson K., Saltin S.H., Charrier G., Ring A.K., Kvarnemo C., André C., Panova M. // *Behav. Ecol. Sociobiol.* 2016. V. 70. № 8. P. 1357–1366.
115. Kryazhimskiy S., Plotkin J.B. // *PLoS Genet.* 2008. V. 4. № 12. P. e1000304.
116. Ravinet M., Westram A., Johannesson K., Butlin R., André C., Panova M. // *Mol. Ecol.* 2016. V. 25. № 1. P. 287–305.
117. Grahame J.W., Wilding C.S., Butlin R.K. // *Evolution.* 2006. V. 60. № 2. P. 268–278.
118. Johannesson K. // *J. Sea Res.* 2003. V. 49. № 2. P. 107–117.
119. Rolán-Alvarez E. // *J. Molluscan Studies.* 2007. V. 73. № 1. P. 1–10.
120. Mikhailova N.A., Gracheva Y.A., Backeljau T., Granovitch A.I. // *Genetica.* 2009. V. 137. № 3. P. 333.
121. Small M.P., Gosling E.M. // *Heredity.* 2000. V. 84. № 6. P. 692.
122. Granovitch A.I., Sokolova I.M. // *Sarsia.* 2001. V. 86. № 3. P. 241–243.
123. Лухтанов В.А. // *Журн. общей биологии.* 2010. Т. 71. № 5. С. 372–385.
124. Mayr E. *Populations, species, and evolution: an abridgment of animal species and evolution.* Cambridge: Harvard Univ. Press, 1970. 453 c.
125. Lorch P.D., Servodio M.R. // *J. Evol. Biol.* 2007. V. 20. № 3. P. 937–949.
126. Matute D.R. // *Am. Naturalist.* 2015. V. 185. № 2. P. 253–269.
127. Albrecht T., Opletalová K., Reif J., Janoušek V., Piálek L., Cramer E.R., Johnsen A., Reifová R. // *Evolution.* 2019. V. 73. № 2. P. 202–213.
128. Ting J.J., Woodruff G.C., Leung G., Shin N.R., Cutter A.D., Haag E.S. // *PLoS Biol.* 2014. V. 12. № 7. P. e1001915.
129. Levitan D.R., TerHorst C.P., Fogarty N.D. // *Evolution.* 2007. V. 61. № 8. P. 2007–2014.
130. Civetta A., Finn S. // *G3: Genes, Genomes, Genetics.* 2014. V. 4. № 9. P. 1701–1707.
131. Maltseva A.L., Varfolomeeva M.A., Lobov A.A., Mikhailova N.A., Renaud P.E., Grishankov A.V., Volovik K.Y., Granovitch A.I. // *Marine Ecol. Prog. Ser.* 2016. V. 552. P. 177–193.
132. Granovitch A., Johannesson K. // *Ophelia.* 2000. V. 53. № 1. P. 55–65.
133. Granovitch A.I., Sergievsky S.O., Sokolova I.M. // *Dis. Aquatic Organisms.* 2000. V. 41. № 1. P. 53–64.



УДК 577.33

# Воздействие холодной плазменной струи снижает жизнеспособность клеток аденокарциномы легкого

Е. А. Голубицкая<sup>1,2#</sup>, О. С. Троицкая<sup>1#</sup>, Е. В. Елак<sup>3</sup>, П. П. Гугин<sup>4</sup>, В. А. Рихтер<sup>1</sup>,  
И. В. Швейгер<sup>5</sup>, Д. Э. Закревский<sup>3,4</sup>, О. А. Коваль<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

<sup>2</sup>Новосибирский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1

<sup>3</sup>Новосибирский государственный технический университет, 630073, Новосибирск, просп. Маркса, 20

<sup>4</sup>Институт физики полупроводников им. А.В. Ржанова СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 13

<sup>5</sup>Институт теоретической и прикладной механики им. С.А. Христиановича СО РАН, 630090, Новосибирск, ул. Институтская, 4/1

E-mail: o.koval@niboch.nsc.ru

# Равный вклад.

Поступила в редакцию 17.06.2019

Принята к печати 13.09.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-16-19

**РЕФЕРАТ** Высокая смертность от онкологических заболеваний стимулирует поиск новых путей воздействия на злокачественные новообразования. Среди известных подходов воздействия на опухоли определенными преимуществами обладают электрофизические методы. Представлены результаты изучения влияния холодной плазменной струи (ХПС) на клетки аденокарциномы легкого человека A549 *in vitro*. В исследовании использовано газоразрядное устройство, генерирующее последовательность стримеров, распространяющихся по струе инертного газа в окружающем воздухе. В зоне контакта плазменной струи с объектом воздействия присутствуют значительные электрические поля и высокая концентрация плазмы, при том что температура газа меняется на доли градуса. Проведено сравнение цитотоксического эффекта ХПС в гелии и аргоне. Показано, что прямое облучение клеток ХПС в течение 30–120 с при напряжении 4.2 кВ статистически значимо снижает их жизнеспособность на 25% как при использовании в качестве рабочего инертного газа гелия, так и аргона. Варьирование амплитуды переменного напряжения в плазменном устройстве в диапазоне 3.8–5.6 кВ в аргоне не привело к существенному изменению уровня гибели клеток. Дальнейшая оптимизация режимов генерации ХПС в газоразрядных устройствах различной геометрии с целью воздействия на культуры опухолевых клеток и модельные опухоли на животных может быть основой для развития плазменной противоопухолевой терапии.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** аденокарцинома легкого, низкотемпературная атмосферная плазменная струя, противоопухолевая терапия, активные формы кислорода.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид; ХПС – холодная плазменная струя; FBS – эмбриональная сыворотка телят; RNS – активные формы азота; ROS – активные формы кислорода.

## ВВЕДЕНИЕ

Для борьбы со злокачественными новообразованиями, наряду с разработкой эффективных противоопухолевых химиопрепаратов, существенное внимание уделяют физическим методам – радиотерапии, в том числе фотонотерапии, протонотерапии и борнейтронзахватной терапии [1, 2]. Одним из новых многообещающих биофизических подходов к терапии

целого ряда злокачественных опухолей является применение холодной плазменной струи (ХПС) [3]. К факторам потенциального риска применения ХПС у человека относят возможность протекания через ткань электрического тока, термическое повреждение и воздействие УФ-излучения, однако все эти эффекты корректируются на этапе разработки композиции газов и выборе интенсивности и длительности

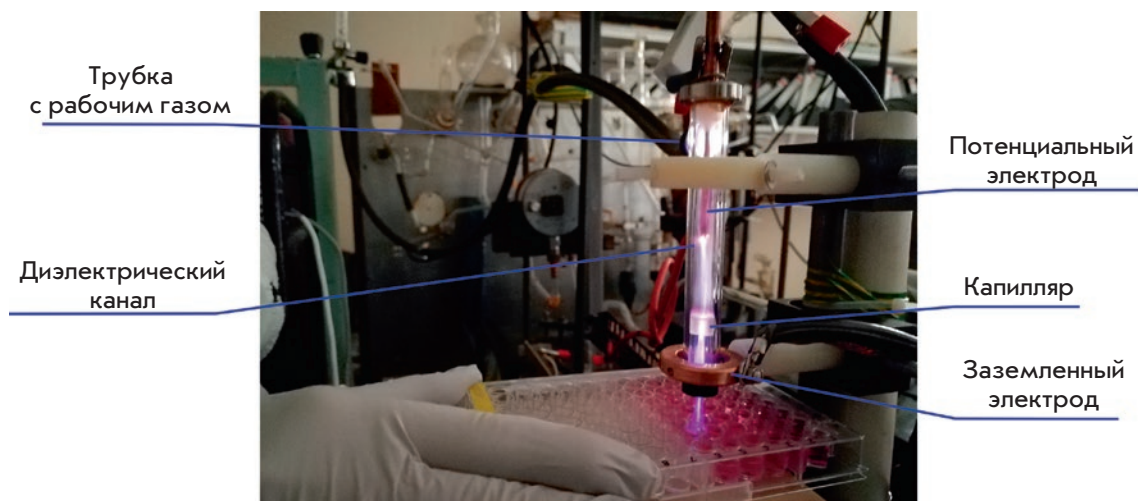


Рис. 1. Установка с газоразрядным устройством для облучения растущих клеток

облучения. Безопасность применения ХПС показана на пациентах с хроническими язвенными поражениями кожи [4, 5]. ХПС представляет собой последовательность стримеров, генерируемых в инертных газах в диэлектрическом канале плазменного устройства и распространяющихся по струе газа в окружающем воздухе при атмосферном давлении. Возбуждение и ионизация смеси газов, состоящей из инертного газа, азота, кислорода и паров воды, осуществляются за счет высокоэнергетичных электронов и большой концентрации плазмы в головке стримера, где электрические поля могут достигать 10–20 кВ/см. В плазменно-стимулированных химических реакциях образуются различные активные кислородсодержащие и азотсодержащие соединения, такие, как  $H_2O_2$ ,  $HNO_2$ ,  $HNO_3$ ,  $N_2O$ ,  $NO_2$ ,  $NO$ ,  $N_2O_3$ . В качестве рабочего газа в плазменном устройстве обычно используют инертные газы, так как напряжение пробоя воздуха значительно выше. Привлекательной особенностью плазменной струи для реализации противоопухолевых подходов является низкая температура в области контакта холодной плазмы с биологическим объектом [3]. Показано цитотоксическое действие холодной плазменной струи в отношении более 20 линий опухолевых клеток различного гистогенеза и в экспериментальных моделях *in vivo* на животных-опухоленосителях [6]. Обнаружено, что основными триггерными молекулами гибели клеток при воздействии ХПС являются активные формы кислорода (ROS) и азота (RNS). Ключевую роль среди ROS отводят молекулам  $H_2O_2$ , которые могут вызывать повреждения митохондрий и ДНК [7]. Экспериментально показано, что при обработке ХПС клетки подвергаются именно синергическому воздействию молекул  $H_2O_2$ ,  $NO_2$  и  $NO_3$ , но RNS гораздо менее цитотоксичны, чем ROS [8].

Обработка ХПС не только вызывает цитотоксические эффекты, но также может восстанавливать чувствительность устойчивых опухолевых клеток к цитостатическим средствам, например, глиобластомы к темозоломиду [9].

В данном исследовании использовано оригинальное устройство, генерирующее плазменную струю, которое позволяет в широких пределах изменять режимы стримерного пробоя в диэлектрическом канале и динамику распространения последовательности стримеров по струе инертных газов (рис. 1). Проведено сравнение воздействия ХПС в гелии и аргоне на опухолевые клетки человека. Использование двух рабочих газов было мотивировано тем, что аргон и гелий имеют разные физические свойства, а именно, масса атомов аргона в 10 раз больше массы атомов гелия, а пороговые энергии ионизации и возбуждения у аргона ниже, что сказывается на физических свойствах самой плазменной струи (концентрация электронов, величина электрического поля и т.д.) и на плазмохимии у поверхности.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Газоразрядное устройство представляло собою диэлектрический коаксиальный канал длиной 100 мм с внутренним диаметром 8 мм, в который соосно вставлены металлический (медный) электрод длиной 50 мм и диаметром 2 мм и капилляр длиной 6 мм с внутренним диаметром 2.6 мм, которые, в свою очередь, фиксировались кварцевой втулкой длиной 23 мм и внутренним диаметром 5 мм. Снаружи кварцевого канала располагался медный кольцевой электрод. Разрядная зона образована внутренним (потенциальным) и внешним (заземленным) электродами. Синусоидальное напряжение с частотой ~ 25 кГц и амплитудой до 6 кВ, формиру-

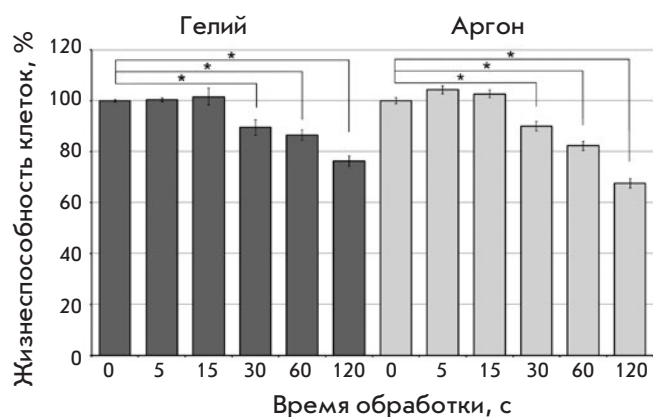


Рис. 2. Влияние холодной плазменной струи на жизнеспособность клеток аденокарциномы легкого A549. Напряжение 4.2 кВ. Жизнеспособность контрольных (необработанных) клеток принята за 100%. Данные МТТ-анализа представлены как среднее значение трех независимых экспериментов  $\pm$  стандартное отклонение, \* $p < 0.05$

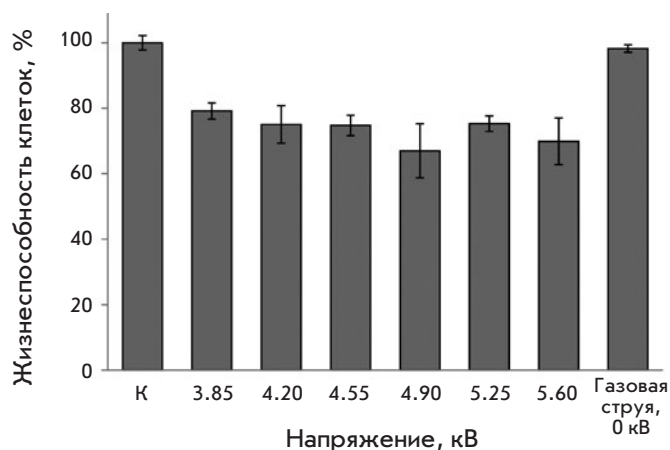


Рис. 3. Влияние напряжения холодной плазменной струи в аргоне на цитотоксическую активность в отношении клеток A549. Данные МТТ-анализа, проведенного через 48 ч после облучения. К – контрольные (необработанные клетки). Данные представлены как среднее значение трех независимых экспериментов  $\pm$  стандартное отклонение

емое генератором высоковольтных импульсов, прикладывалось к потенциальному электроду. Газовая система обеспечивала поступление рабочих газов с типичными скоростями потока до 15 л/мин при избыточном давлении в газовой магистрали 1 атм. Эксперименты проведены с рабочими газами гелием и аргоном.

При прокачке рабочего газа и подаче синусоидального напряжения  $U$  на положительной полуволне между потенциальным и заземленным электродами наблюдается пробой, и при дальнейшем увеличении  $U > 1-3$  кВ в зависимости от газа и скорости потока формировалась плазменная струя, которая «вываливается» из диэлектрического канала и распространяется в свободном пространстве. Типичная длина струи в зависимости от параметров возбуждения: в гелии 5–50 мм, в аргоне 5–20 мм.

В работе использовали клетки A549 аденокарциномы легкого человека (РККП Института цитологии РАН, Санкт-Петербург). Клетки культивировали в среде DMEM (GIBCO, США) в присутствии 2 мМ *L*-глутамин (Sigma-Aldrich, США), 10% FBS (GIBCO, США) и раствора антибиотика-антимикотика (100 ед./мл пенициллина, 100 мг/мл стрептомицина сульфата, 0.25 мкг/мл амфотерицина; GIBCO, США) при температуре  $37.0 \pm 1.0^\circ\text{C}$  в атмосфере  $5.0 \pm 0.5\%$   $\text{CO}_2$ .

Для обработки ХПС клетки культивировали в 96-луночных планшетах ( $4 \times 10^3$  клеток на лунку) в объеме 100 мкл. По достижении 70–80% моно-

слоя клетки обрабатывали холодной плазменной струей. После этого клетки растили в стандартных условиях в течение 24 ч, затем среду в лунках заменяли на среду RPMI без сыворотки, содержащую 0.25 мг/мл МТТ (3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид) (Sigma, США), и инкубировали в течение 4 ч при  $37^\circ\text{C}$ . Далее, из лунок удаляли среду и растворяли кристаллы формазана в ДМСО. Оптическую плотность раствора в лунках измеряли на многоканальном спектрофотометре (Berthold Technologies, Германия) при  $\lambda = 570$  нм.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние струи холодной плазмы на выживаемость опухолевых клеток изучали на линии клеток A549 аденокарциномы легкого человека. Методом МТТ показано, что жизнеспособность клеток снижается по мере увеличения времени обработки с 5 с до 2 мин. Кратковременная (до 30 с) обработка клеток струей холодной плазмы практически не влияла на выживаемость клеток (рис. 2). Максимальное снижение жизнеспособности клеток достигалось при обработке в течение 2 мин при использовании как гелия, так и аргона.

Гибель клеток визуализировали с использованием йодида пропидия (PI) – низкомолекулярного флуоресцентного красителя, который интеркалирует в ДНК гибнущих клеток с поврежденной мембраной, но не проникает в живые клетки. Обнаружено, что доля окрашенных клеток воз-

растала с увеличением времени обработки струей холодной плазмы (данные не приведены). Таким образом, показано, что обработка клеток ХПС индуцирует их гибель.

Величина напряжения на нагруженном электроде при использовании плазменной струи является одним из основных параметров, который определяет динамику плазменной струи и характер ее взаимодействия с поверхностью. От приложенного напряжения зависит энергия электронов в плазменной струе, скорость процессов ионизации, диссоциации и возбуждения молекул, вызванных электронным ударом, что может сильно влиять на индуцируемые плазмохимические процессы, и, как следствие, на биологический эффект плазменной струи. Для анализа влияния напряжения, подаваемого на нагруженный электрод в плазменном устройстве, генерирующем ХПС, на цитотоксическую активность в отношении клеток А549 применяли прямое облучение при различных амплитудах переменного напряжения. Экспериментально обнаружено, что изменение амплитуды напряжения в аргоне в диапазоне 3.8–5.6 кВ не повлияло на уровень гибели клеток (рис. 3). Дополнительные исследования воздействия на клетки потока инертного газа без плазменной струи и при нулевом напряжении показали, что поток аргона и гелия не влиял на жизнеспособность облученных клеток.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, на линии клеток А549 аденокарциномы легкого показано, что прямое воздействие холодной плазменной струи вызывает гибель опухолевых клеток. Возможность использования разнообразных режимов воздействия на инертные газы, в том числе и на их смеси с молекулярными газами, в применяемом газоразрядном устройстве позволяет генерировать холодную плазменную струю с широким набором энергетических параметров и компонентным составом, что является преимуществом представленной работы. Дальнейшая оптимизация устройств на основе диэлектрических каналов различной геометрии, а также применение опосредованного воздействия на клетки через предварительно облученную культуральную среду позволят подобрать оптимальные условия воздействия холодной плазменной струи на клетки злокачественных опухолей человека. Безопасность воздействия ХПС на ткани человека уже была показана ранее, поэтому возможность практического применения этого метода в отношении определенных опухолевых новообразований не вызывает сомнений. ●

*Исследование поддержано грантом РФ  
№ 19-19-00255 и частично проектом базового  
бюджетного финансирования Минобрнауки РФ  
(0245-2019-0001).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Hideghéty K., Brunner S., Cheesman A., Szabó E.R., Polanek R., Margarone D., Tókécs T., Mogyorósi K. // *Anticancer Res.* 2019. V. 39. № 5. P. 2265–2276.
- Laprie A., Hu Y., Alapetite C., Carrie C., Habrand J.-L., Bolle S., Bondiau P.-Y., Ducassou A., Huchet A., Bertozzi A.-I., et al. // *Cancer/Radiothérapie.* 2015. V. 19. № 8. P. 775–789.
- Utsumi F., Kajiyama H., Nakamura K., Tanaka H., Mizuno M., Ishikawa K., Kondo H., Kano H., Hori M., Kikkawa F. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 12. P. e81576.
- Isbary G., Heinlin J., Shimizu T., Zimmermann J., Morfill G., Schmidt H., Monetti R., Steffes B., Bunk W., Li Y., et al. // *Br. J. Dermatol.* 2012. V. 167. № 2. P. 404–410.
- Ulrich C., Kluschke F., Patzelt A., Vandersee S., Czaika V., Richter H., Bob A., Hutten Jv., Painsi C., Hüge R., Kramer A., Assadian O., Lademann J., Lange-Asschenfeldt B. // *J. Wound Care.* 2015. V. 24. № 5. P. 198–200.
- Keidar M. // *Plasma Sources Sci. Technol.* 2015. V. 24. № 3. P. 033001.
- Bekeschus S., Iseni S., Reuter S., Masur K., Weltmann K.D. // *IEEE Trans. Plasma Sci.* 2015. V. 43. № 3. P. 776–781.
- Wende K., Williams P., Dalluge J., van Gaens W., Aboubakr H., Bischof J., von Woedtke T., Goyal S.M., Weltmann K.-D., Bogaerts A., et al. // *Biointerphases.* 2015. V. 10. № 2. P. 029518.
- Köritzer J., Boxhammer V., Schäfer A., Shimizu T., Klämpfl T.G., Li Y.-F., Welz C., Schwenk-Zieger S., Morfill G.E., Zimmermann J.L., et al. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 5. P. e64498.



УДК 578.282

# Новое бисульфитное производное окисленного $\beta$ -циклодекстрина эффективно ингибирует инфекцию, вызванную вирусом гриппа A *in vitro* и *in vivo*

Е. П. Гончарова<sup>1</sup>, Я. А. Костыро<sup>2</sup>, А. В. Иванов<sup>2</sup>, М. А. Зенкова<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Россия, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8<sup>2</sup>Иркутский институт химии им. А.Е. Фаворского СО РАН, 664033, Россия, Иркутск, ул. Фаворского, 1

\*E-mail: egn@niboch.nsc.ru

Поступила в редакцию 25.04.2019

Принята к печати 15.07.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-20-30

**РЕФЕРАТ** Разработка противогриппозных препаратов представляет актуальную и важную задачу. Ранее проведенные исследования показали, что соединения на основе сульфопроизводных олиго- и полисахаридов обладают высокой противовирусной активностью. Нами изучены перспективы использования нового бисульфитного производного окисленного  $\beta$ -циклодекстрина (соединение KS-6469) для подавления репликации вируса гриппа A/WSN/33 (H1N1) *in vitro* и *in vivo*. Противовирусный потенциал KS-6469 *in vitro* оценивали в культуре клеток МДСК, инфицированных вирусом. Показано, что инкубация инфицированных клеток в присутствии соединения KS-6469 в течение 48 ч приводит к полному подавлению репродукции вируса. Терапевтическая эффективность KS-6469 проверена на модели гриппозной пневмонии у мышей линии BALB/c. Двукратное интраназальное введение KS-6469 обеспечивало полную защиту животных от заражения вирусом, что сопровождалось значительным снижением титров вируса гриппа в легких инфицированных животных. Таким образом, новое бисульфитное производное  $\beta$ -циклодекстрина KS-6469 обладает выраженной противовирусной активностью и эффективно подавляет развитие гриппозной инфекции.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** вирус гриппа, противовирусная активность, сульфированное производное  $\beta$ -циклодекстрина.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ВГ – вирус гриппа; ДМСО – диметилсульфоксид; ИМДМ – среда Искова МДМ; МВЦД – метил- $\beta$ -циклодекстрин; МТТ – 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолий бромид; МОИ – множественность заражения; МЭК – минимально эффективная концентрация; МПК – максимально переносимая концентрация; РГА – реакция гемагглютинации; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; ФОЕ – фокус-образующие единицы; ХТИ – химиотерапевтический индекс; НА – гемагглютинин; IC<sub>50</sub> – концентрация соединения, приводящая к гибели 50% клеток; СИ – клеточный индекс; НА – нейраминидаза.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус гриппа (ВГ) вызывает развитие респираторных заболеваний, в результате которых ежегодно умирает до 500 000 человек [1]. Возникновение новых лекарственно устойчивых штаммов вируса гриппа и недостаточная эффективность существующих вакцин делают необходимой разработку новых, более эффективных противовирусных соединений для борьбы с этим вирусом.

Одними из наиболее перспективных противовирусных соединений являются сульфопроизводные

углеводов. Эта группа соединений включает сульфопроизводные олиго- и полисахаридов, содержащих О-сульфатные и/или N-сульфонатные группы. Противовирусные свойства сульфопроизводных углеводов известны давно. Гинзберг и соавт. исследовали антивирусные свойства капсульного полисахарида *Klebsiella pneumoniae* и показали, что этот полисахарид эффективно подавляет репликацию вируса эпидемического паротита [2]. Сообщалось, что сульфатированные полисахариды, включая  $\beta$ -циклодекстрин, обладают противовирусной ак-

тивностью в отношении целого ряда вирусов [3–7]. Имеются данные о том, что сульфопроизводные олиго- и полисахаридов, содержащих О-сульфатные группы, обладают высокой противовирусной активностью [8–11]. Показано, что синтетические полимеры N-сульфонатных производных эффективно ингибируют вирус гриппа А *in vitro* и *ex vivo*, действуя главным образом на поздних стадиях развития инфекции [12]. Примечательно, что йота-каррагинан – сульфатированный полисахарид, протестирован клинически, разрешен к выпуску и продается в некоторых странах для интраназального применения при гриппозной инфекции [13]. Однако данные об антивирусной активности сульфопроизводных углеводов, содержащих сульфатные группировки (С-сульфаты), отсутствуют.

Нами изучены противовирусные свойства сульфонированного (С-сульфат) олигосахаридов – бисульфитного производного окисленного β-циклодекстрина KS-6469 в отношении вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1) (ВГ) *in vitro* и *in vivo*. Показано, что KS-6469 эффективно ингибирует репликацию ВГ в клетках МДСК, действуя на поздних стадиях инфекции, и обладает вирулицидными свойствами. Результаты лечения гриппозной пневмонии у мышей подтвердили высокий антивирусный потенциал этого соединения.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Синтез соединения KS-6469

Соединение KS-6469 было разработано и синтезировано в Иркутском институте химии им. А.Е. Фаворского СО РАН (патент РФ 2635765, 2017) на основе коммерчески доступного β-циклодекстрина (KLEPTOSE®, Бельгия). Подробное описание процедуры синтеза и физико-химических свойств KS-6469 будет опубликовано отдельно. Коммерчески доступный осельтамивир (Тамифлю®, Швейцария) готовили в виде раствора в фосфатно-солевом буфере (ФСБ) для перорального введения.

### Цитотоксическое действие KS-6469 в культуре клеток МДСК

**МТТ-анализ.** Цитотоксичность KS-6469 оценивали с использованием теста 3-(4,5-диметилтиазол-2-ил)-2,5-дифенилтетразолия бромид (МТТ-тест) как описано ранее [14]. Клетки МДСК получены из коллекции клеточных культур Института цитологии (Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали в среде Искова МДМ (ИМДМ) (Sigma, США) с добавлением 5% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Sigma, США), 100 Ед/мл пеницил-

лина, 100 мг/мл стрептомицина и 0.25 мг/мл амфотерицина (антибиотик-антимикотический раствор, Sigma, США) при 37°C в увлажненной атмосфере, содержащей 5% CO<sub>2</sub> (стандартные условия). Клетки МДСК высевали в 96-луночные планшеты и инкубировали в стандартных условиях до формирования полного монослоя. Затем питательную среду заменяли свежей средой, содержащей KS-6469 в различных концентрациях, и клетки инкубировали в течение 24 ч в стандартных условиях. Аликвоты раствора МТТ добавляли в каждую лунку, инкубировали в течение 3 ч, затем кристаллы формазана солибилизировали диметилсульфоксидом (ДМСО) и измеряли оптическую плотность при 570 нм с использованием ридера Multiskan™ FC (Thermo LabSystems, Финляндия). Концентрацию соединения, приводящую к гибели 50% клеток (IC<sub>50</sub>), определяли как концентрацию, необходимую для снижения значения оптической плотности до 50% от контроля (только ДМСО).

**Анализ цитотоксичности KS-6469 в реальном времени.** Цитотоксическое действие KS-6469 на клетки МДСК измеряли с помощью технологии микроэлектронного биосенсора на приборе xCELLigence Real-Time (ACEA Biosciences Inc., США). Клеточный индекс (CI) рассчитывается автоматически на основании изменения параметров сопротивления при взаимодействии обработанных и необработанных клеток с электродами на микроэлектронных планшетах (Е-планшеты). Клетки высевали в Е-планшеты (ACEA Bioscience Inc., США) в среде ИМДМ и инкубировали в течение ночи (20 ч) в стандартных условиях. Затем питательную среду удаляли, клетки промывали ФСБ и в каждую лунку добавляли 150 мкл среды ИМДМ, содержащей различные концентрации KS-6469 или среду (контроль). Клетки инкубировали в стандартных условиях в течение 65 ч, а жизнеспособность клеток контролировали каждые 15 мин с использованием анализатора xCELLigence Real-Time. Эксперименты повторяли 2 раза, а концентрацию соединения, приводящую к гибели 50% клеток (IC<sub>50</sub>), рассчитывали с использованием программного обеспечения xCELLigence Real-Time Cell Analyzer. Максимальную концентрацию соединения, при которой график изменения CI совпадал с графиком CI для необработанных клеток, т.е. не оказывающую на клетки токсичного действия, принимали за максимально переносимую концентрацию (МПК).

### Изучение противовирусной активности KS-6469 в культуре клеток МДСК

Штамм вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1) был получен в Институте вирусологии им. Д.И. Ивановского.

Клетки МДСК выращивали в стандартных условиях в 24-луночных планшетах до формирования полного монослоя. Затем клетки инфицировали ВГ при множественности заражения (МОИ) 0.1 в среде ИМДМ, содержащей KS-6469 (70–600 мкг/мл), и инкубировали при 37°C в течение 24 или 48 ч в стандартных условиях. Через 24 или 48 ч клетки подвергали одному циклу замораживания/оттаивания (-20/20°C), а затем определяли титр вируса с использованием метода оценки титра вируса по количеству фокус-образующих единиц (ФОЕ/мл), описанному ранее [15]. Основными критериями оценки эффективности препаратов *in vitro* были следующие показатели: коэффициент ингибирования (Ки, %) и химиотерапевтический индекс (ХТИ). Снижение уровня накопления вируса под влиянием соединения определяли по формуле:

$$K_{и} = (T_{к} - T_{о}) / T_{к} \times 100\%,$$

где  $T_{к}$  – уровень накопления вируса при культивировании без внесения в среду изучаемого соединения (ФОЕ/мл);  $T_{о}$  – уровень накопления вируса при культивировании с внесением в питательную среду изучаемого соединения (ФОЕ/мл) [16]. За величину ХТИ препарата принимали соотношение  $X_{ТИ} = M_{ПК} / M_{ЭК}$ , где  $M_{ЭК}$  – минимально эффективная концентрация соединения, снижающая титр вируса не менее чем на 2 lg ФОЕ/мл [17].

#### Метод Time-of-addition

Для более точной оценки влияния KS-6469 на различные стадии жизненного цикла ВГ клетки МДСК выращивали до формирования полного монослоя в 24-луночных планшетах в стандартных условиях и инфицировали ВГ (МОИ 0.1) в течение 1 ч. После каждого периода инкубации с ВГ клетки промывали ФСБ и добавляли соединение KS-6469 в концентрации 5 мг/мл в разные промежутки времени до или после инфицирования клеток ВГ. Через 48 ч клетки подвергали одному циклу замораживания/оттаивания и определяли титр вируса.

#### Анализ активности нейраминидазы ВГ

Активность нейраминидазы ВГ (НА) измеряли с использованием набора для анализа функциональной активности нейраминидазы гриппа NA-Fluor™ (Applied Biosystems, США) в соответствии с протоколом производителя. Анализ основан на измерении активности НА, расщепляющей субстрат 2'-(4-метилумбеллиферил)- $\alpha$ -D-N-ацетилнейраминовой кислоты (MUNANA) с высвобождением флуоресцентного продукта 4-метилумбеллиферона. Флуоресцентный сигнал

измеряли с использованием флуоресцентного ридера CLARIOstar® (BMG LABTECH, Германия). Эксперименты выполняли в трех повторах.

#### Анализ гемагглютинирующей активности вируса

Противовирусную активность соединения KS-6469 исследовали по ингибированию инфекционного титра вируса в реакции гемагглютинации (РГА). Результаты оценивали, сравнивая значения титра вируса после инкубации ВГ с KS-6469 в различных концентрациях. В РГА использовали 0.5% взвесь эритроцитов цыпленка. За титр вируса принимали величину, противоположную значению наибольшего разведения вируса, способного вызвать положительную РГА.

#### Анализ содержания холестерина

Концентрацию холестерина в вирусных оболочках определяли с использованием набора Amplex Red Cholesterol (Molecular Probes, США) в соответствии с инструкциями производителя. ВГ инкубировали с KS-6469 в различных концентрациях в течение 6 ч при 37°C, затем осаждали и ресуспендировали в реакционном буфере Amplex Red. Метил- $\beta$ -циклодекстрин (М $\beta$ ЦД) использовали в качестве положительного контроля. Затем уровень флуоресценции анализировали на ридере CLARIOstar®, используя длину волны возбуждения 550 нм и длину волны излучения 590 нм. Эксперименты были выполнены в трех повторах.

#### Изучение вирулицидной активности KS-6469

ВГ инкубировали с равным объемом среды, содержащей различные концентрации KS-6469, в течение 3 или 6 ч при 4, 20 или 37°C. В качестве контроля ВГ инкубировали с равным объемом среды, не содержащей KS-6469. Титр вируса оценивали методом ФОЕ. Эксперименты выполняли в трех повторах

#### Иммуноферментный анализ

Иммуноферментный анализ проводили с использованием коммерчески доступных моноклональных антител, связывающихся с гемагглютинином ВГ (H1N1) [IVC102], [1.B.408] и [B219M] (Abcam), как описано ранее [18].

#### Изучение эффективности применения KS-6469 на модели гриппозной пневмонии мышей

*Лабораторные животные.* Самки мышей BALB/c в возрасте от 4 до 6 недель приобретены в Государственном научно-исследовательском центре вирусологии и биотехнологии «Вектор» (Кольцово, Российская Федерация). Животных со-

держали в виварии Института химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН с режимом естественного освещения на стандартном рационе для лабораторных животных (ГОСТ Р 5025892) в соответствии с международными рекомендациями Европейской конвенции по защите позвоночных животных, используемых в экспериментальных и других научных целях [19], а также правилами лабораторной практики при проведении доклинических исследований в российских государственных стандартах (Р 51000.3-96 и 51000.4-96). Протоколы экспериментов утверждены Межведомственной комиссией по биоэтике СО РАН (22.11 от 30.05.2014 г.).

**Токсичность KS-6469 для мышей.** Токсичность KS-6469 для мышей оценивали при внутрибрюшинном и интраназальном введении соединения. Каждая из экспериментальных групп содержала шесть мышей BALB/c. Две группы мышей получали KS-6469 внутрибрюшинно однократно в дозе 250 или 500 мг/кг в 0.2 мл ФСБ. Две другие группы животных получали KS-6469 интраназально, однократно или двукратно с интервалом в 1 день, в дозе 250 мг/кг в объеме 40 мкл. Мыши контрольных групп получали ФСБ по аналогичной схеме. После инъекции или интраназального введения признаки интоксикации, такие, как общее состояние, вес и депрессия центральной нервной системы, оценивали ежедневно в течение 14 дней.

**Протективная активность соединения KS-6469.** Протективное действие соединения KS-6469 оценивали по динамике падения массы тела, выживаемости мышей после заражения и репродукции вируса в легких. Мыши BALB/c были разделены на группы по шесть животных. Мышей анестезировали путем внутрибрюшинной инъекции трибромэтанола (Avertin®). Мышей инфицировали интраназально вирусом в дозе  $3 \text{ ЛД}_{50}$ , эквивалентной  $1.2 \times 10^4 \pm 0.7 \times 10^4$  ФОЕ ( $p < 0.05$ ), в объеме 30 мкл сразу после интраназального введения KS-6469 в дозе 250 мг/кг в объеме 30 мкл. На следующий день мыши получали интраназально такую же дозу KS-6469. В качестве положительного контроля группа мышей получала перорально осельтамивир ежедневно (7.5 мг/кг) в течение 5 дней после заражения. Мыши из контрольной группы без лечения получали ФСБ по аналогичной схеме (отрицательный контроль). Животных осматривали и взвешивали ежедневно в течение 14 дней после заражения. Для оценки репродукции ВГ в легких мышам BALB/c ( $n = 6$ ) интраназально вводили KS-6469 в различных дозах и инфицировали дозой вируса  $3 \text{ ЛД}_{50}$ . На следующий день мыши получали такую же

дозу KS-6469 интраназально. Мыши из контрольной группы получали ФСБ по аналогичной схеме. Мышей в каждой группе подвергали эвтаназии через 72 ч после заражения и извлекали легкие. Легкие гомогенизировали с использованием ультразвукового гомогенизатора Sonopuls HD 2070 (Bandelin, Германия). Титр вируса в гомогенатах легких определяли методом ФОЕ.

### Статистический анализ

Данные выражали как среднее значение  $\pm$  стандартное отклонение. Статистический анализ проводили с использованием непарного  $t$ -критерия Стьюдента. Значения  $p$  менее 0.05 считали статистически значимыми.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Характеристика KS-6469

KS-6469 представляет собой бисульфитное производное окисленного олигосахариды ( $\beta$ -циклодекстрина), имеющее в своем составе сульфонатные группировки, связанные непосредственно с атомом углерода (С-сульфаты), общей формулой  $[(\text{Glu}_{\text{ox}})_7\text{-C}_x]\text{-(SO}_3\text{Na)}_x$ , где  $[(\text{Glu}_{\text{ox}})_7\text{-C}_x]$  – окисленный  $\beta$ -циклодекстрин,  $x$  – количество сульфированных атомов углерода,  $\text{SO}_3\text{R}$  – бисульфитная (сульфонатная) группировка. Структура и физико-химические свойства KS-6469 являются предметом дальнейших исследований и будут опубликованы позже.

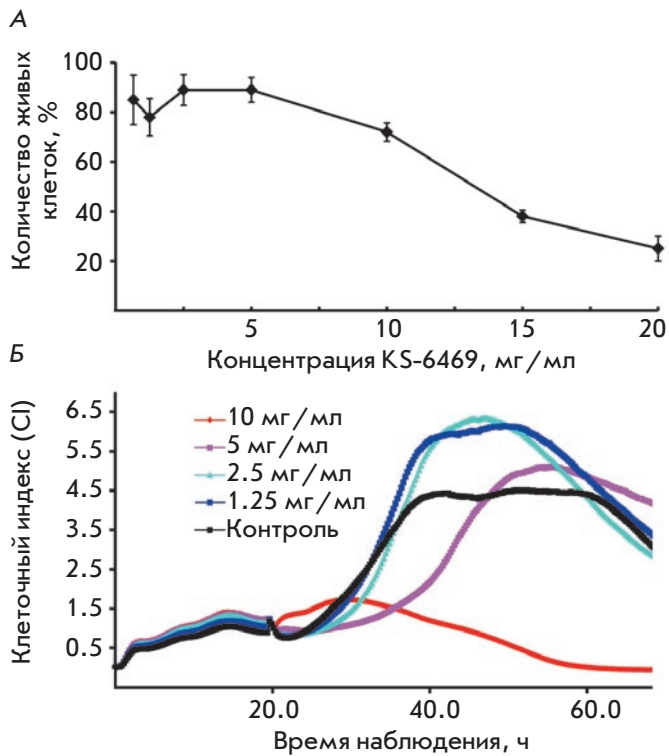
### Изучение цитотоксического действия KS-6469

Цитотоксические свойства KS-6469 в отношении клеток линии МДСК изучали с помощью МТТ-теста и анализа состояния клеток в реальном времени, позволяющего регистрировать токсическое действие соединений в динамике. По данным МТТ-теста концентрация KS-6469, при которой выживает 50% клеток в популяции, через 24 ч экспозиции =  $15 \pm 3.3$  мг/мл (рис. 1А). Исследование цитотоксического действия изучаемого соединения при более длительном его воздействии на клетки (в течение 65 ч) с использованием анализатора клеток xCELLigence показало, что в этом случае  $\text{IC}_{50}$  равно  $8.9 \pm 1.3$  мг/мл (рис. 1Б). Концентрация, не оказывающая на клетки токсического действия (МПК), составила 2.5 мг/мл. Другими словами, соединение KS-6469 обладает низкой токсичностью в отношении культуры клеток МДСК.

### Изучение противовирусной активности KS-6469 в культуре клеток

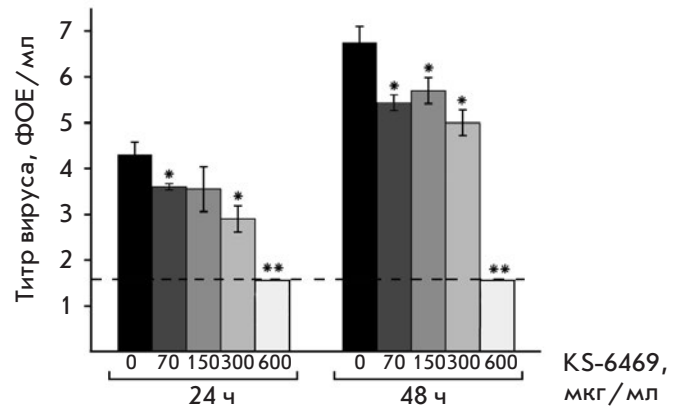
Противовирусную активность KS-6469 оценивали, используя модель вирус гриппа А/WSN/33/ –





**Рис. 1.** Цитотоксичность KS-6469 в культуре клеток МДСК. Клетки МДСК инкубировали с различными концентрациями KS-6469 при 37°C с последующим измерением жизнеспособности клеток с помощью МТТ-теста (А) и с помощью технологии микроэлектронного биосенсора на приборе xCELLigence Real-Time в реальном времени (Б). Контроль – клетки, инкубированные в ИМДМ без KS-6469

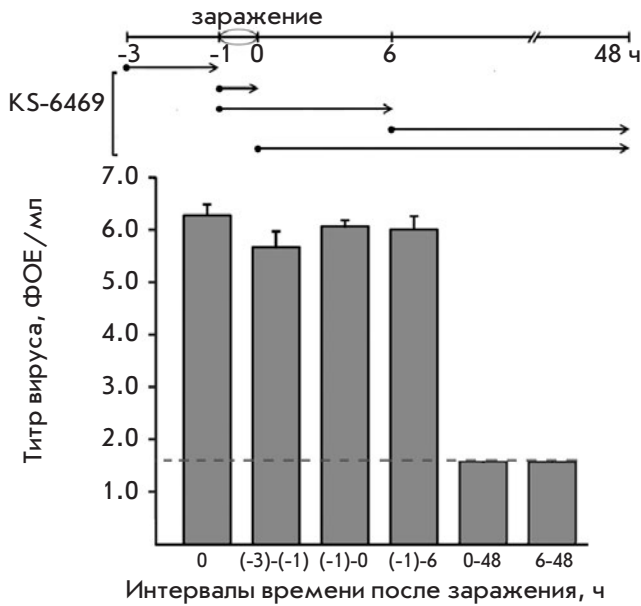
клетки МДСК. Клетки МДСК одновременно инкубировали в присутствии различных концентраций KS-6469 и инфицировали вирусом при MOI 0.1. Количественная оценка титра вируса после его инкубации с соединением (рис. 2) в течение 24 ч выявила зависимое от концентрации снижение репликации вируса в диапазоне концентраций KS-6469 70–600 мкг/мл. При концентрации KS-6469 600 мкг/мл через 24 ч после заражения титр вируса был ниже порога чувствительности метода. При инкубации инфицированных ВГ клеток с соединением KS-6469 в концентрации 70 мкг/мл наблюдалось значительное снижение титра вируса  $K_i = 75\%$  (60.0–80.2%) ( $p < 0.05$ ). Следует отметить, что при концентрации KS-6469 600 мкг/мл наблюдалось полное подавление вирусной инфекции, так как мы не выявили репродукции вируса через 48 ч после заражения клеток. Таким образом, KS-6469, бисульфитное производное окисленного  $\beta$ -циклодекстрина, в концентрации выше 70 мкг/мл значительно снижает титр вируса при экспозиции и полностью подавляет



**Рис. 2.** KS-6469 эффективно ингибирует репродукцию вируса гриппа А/WSN/33 (H1N1) в клетках МДСК. Инфицированные клетки МДСК инкубировали с различными концентрациями KS-6469. Продукцию инфекционных вирусных частиц определяли по методу ФОЕ через 24 и 48 ч. Предел чувствительности метода ФОЕ – 1.7 lg ФОЕ/мл, указан пунктирной линией. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$  в сравнении с репродукцией вируса в необработанных клетках (0)

развитие инфекционного процесса при концентрации 600 мкг/мл. Результаты, полученные на модели *in vitro*, продемонстрировали высокую ингибирующую активность соединения KS-6469 в отношении ВГ. Необходимо отметить, что высокий химиотерапевтический индекс KS-6469, равный 8.3, свидетельствует о целесообразности дальнейшего изучения противовирусной активности этого соединения *in vivo*.

Для определения механизма ингибирования репродукции ВГ при инкубации с KS-6469 необходимо было установить, на какой стадии жизненного цикла вируса происходит подавление его репродукции. С этой целью был проведен эксперимент Time-of-addition, когда KS-6469 добавляли к клеткам на разных этапах развития вирусной инфекции. Во-первых, мы оценили, может ли KS-6469 при добавлении к клеткам до инфицирования вирусом защитить их от последующей инфекции. Клетки МДСК обрабатывали KS-6469 за 2 ч до заражения ВГ (от (-3) до (-1) ч) (рис. 3). Мы не обнаружили снижения титра вируса после предварительной инкубации клеток с KS-6469. Также не обнаружено снижения титра вируса при использовании KS-6469 на начальных стадиях инфекционного процесса в клетке ((-1)–0 ч) и на ранних стадиях репродукции вируса ((-1)–6 ч). Таким образом, показано, что соединение KS-6469 не влияет на ранние стадии репликации вируса, такие, как прикрепление вириона к клетке, проникновение в клетки-мишени. Ингибирование репродук-



**Рис. 3.** Эксперимент Time-of-addition, показывающий механизм инактивации вируса гриппа под действием KS-6469. Клетки МДСК инфицировали ВГ при MOI 0.1 в течение 1 ч ((-1)–0 ч), затем в лунки добавляли 5 мг/мл KS-6469 в указанные моменты времени (·). После каждого периода инкубации (показано стрелками) среду, содержащую KS-6469, заменяли свежей средой, не содержащей соединения. Через 48 ч титр вируса оценивали по методу ФОЕ. Указаны средние значения ± S.D. (n = 3). Предел чувствительности метода ФОЕ – 1.7 lg ФОЕ/мл указан пунктирной линией

ции вируса наблюдалось только тогда, когда KS-6469 постоянно присутствовал в среде, начиная с момента заражения клеток (0–48 ч) или при добавлении соединения через 6 ч после заражения клеток (6–48 ч) (рис. 3).

**Влияние KS-6469 на функциональную активность поверхностных белков оболочки ВГ**

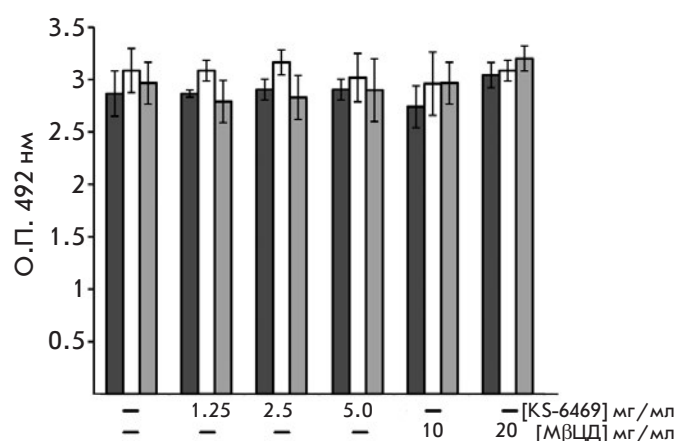
Проникновение вирусных частиц в клетку обеспечивается согласованной работой основных поверхностных белков оболочки вириона, гликопротеинов гемагглютинаина (НА) и нейраминидазы (НА). Изменения функциональной активности НА оценивали с использованием модельной системы связывания вирусных частиц с эритроцитами. Вирус гриппа инкубировали с KS-6469 (5 мг/мл) в течение 1 или 6 ч при 37 или 4°C, а затем титр вируса оценивали в РГА (табл. 1). Инкубация вируса с KS-6469 в течение 1 ч при 37°C приводила к снижению титра вируса в 4 раза, а после 6 ч инкубации титр вируса снижался

**Таблица 1.** Титр вируса гриппа в РГА после инкубации с KS-6469

Соединение	Титр вируса и условия инкубации			
	4°C		37°C	
	1 ч	6 ч	1 ч	6 ч
KS-6469, 5 мг/мл	64	32	16	4
ФСБ	64	64	64	64

в 16 раз (табл. 1). Интересно, что титр вируса снизился только в 2 раза после инкубации в течение 6 ч при 4°C в присутствии KS-6469 в той же концентрации. Снижение связывания гемагглютинаина вируса с эритроцитами предполагает возможное изменение конформации поверхностных эпитопов этого белка.

Способность KS-6469 влиять на структуру поверхностных эпитопов гемагглютинаина была проанализирована с использованием набора коммерчески доступных моноклональных антител к гемагглютину ВГ. Обработка вирионов ВГ KS-6469 (5 мг/мл) в течение 6 ч при 37°C, которая привела к 16-кратному снижению титра НА, не влияла на эффективность связывания НА с моноклональными антителами к НА вируса гриппа (рис. 4). Следует отметить, что процесс ингибирования функциональной активности НА вириона требует достаточно продолжительной инкубации с KS-6469 при температуре не менее 37°C, и мы наблюдали только частичную потерю функциональной активности НА после часовой экспозиции с KS-6469, что свидетельствует о сохранении инфекционных свойств вируса.



**Рис. 4.** Влияние KS-6469 на эффективность связывания вирусного НА с моноклональными антителами. Результаты представлены в О.П. ± S.D., где О.П. – оптическая плотность. Эксперимент проведен в трех повторах

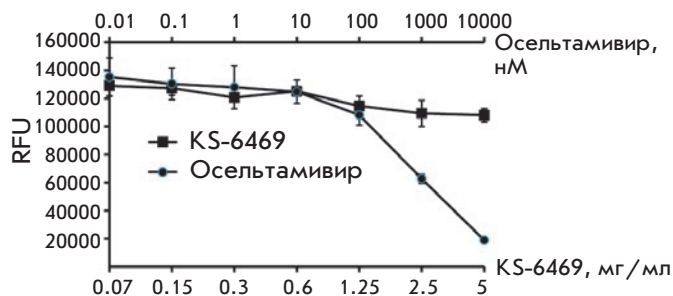


Рис. 5. Анализ активности NA. ВГ инкубировали с KS-6469 или осельтамивиром в течение 6 ч перед добавлением субстрата MUNANA, а затем инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Результаты представлены в RFU ± S.D., где RFU – relative fluorescence units. Эксперимент проведен в трех повторах

Далее мы изучили возможное ингибирование активности вирусной нейраминидазы при инкубации с KS-6469. Нейраминидаза препятствует агрегации вирусных частиц и обеспечивает их высвобождение из зараженной клетки. Полученные результаты (рис. 5) показали, что инкубация ВГ с KS-6469 (5 мг/мл) не меняет активность NA. Это свидетельствует о том, что NA не является мишенью для KS-6469. Учитывая, что механизм противовирусного действия другого производного β-циклодекстрина – метил-β-циклодекстрина (МВЦД), связан с удалением холестерина из липидной оболочки вирионов ВГ [20], мы проанализировали возможное изменение уровня холестерина в вирусной оболочке после обработки KS-6469. ВГ предварительно обрабатывали KS-6469 и МВЦД (положительный контроль) в различных концентрациях или оставляли без обработки (рис. 6). Снижение содержания холестерина в вирусной оболочке наблюдали только после инкубации ВГ с МВЦД, но не KS-6469. Следовательно, противовирусный эффект KS-6469 не связан с изменением содержания холестерина в вирусной оболочке. Таким образом, мы показали, что KS-6469 частично

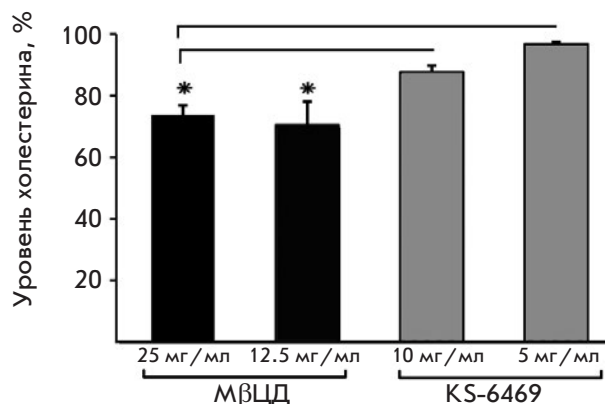


Рис. 6. Содержание холестерина в оболочке ВГ после обработки KS-6469 или МВЦД. ВГ инкубировали с различными концентрациями KS-6469 или МВЦД в течение 6 ч при 37°C, уровень холестерина определяли с использованием набора для анализа холестерина Amplex Red Cholesterol. Уровень холестерина в необработанном вирусе принимали за 100%. \*p < 0.05. Эксперимент проведен в трех повторах

снижает гемагглютинирующую активность вируса, но не влияет на функциональную активность вирусной NA и не уменьшает содержания холестерина в вирусной оболочке.

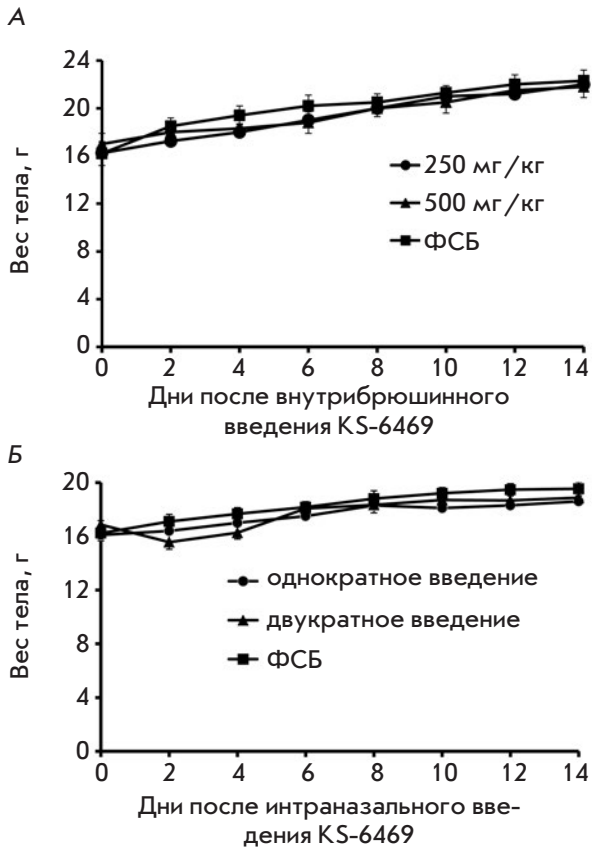
#### Вирулицидные свойства KS-6469

Ранее было показано, что сульфатированные полисахариды обладают вирулицидной активностью [21, 22]. Нами изучена способность KS-6469 непосредственно инактивировать вирус гриппа. Инкубация ВГ с KS-6469 в концентрации 2.5 или 5 мг/мл в течение 3 ч при 37°C привела к полной потере инфекционных свойств вирусных частиц. Снижение концентрации KS-6469 до 1.25 мг/мл с последующей инкубацией вируса в тех же условиях (3 ч, 37°C) привело к снижению титра вируса на 2 lg ФОЕ/мл, а после инкубации в течение 6 ч инфекционные вирионы не были обнаружены (табл. 2). Инкубация вируса в при-

Таблица 2. Титр вируса (lg ФОЕ/мл) после инкубации вируса гриппа с KS-6469

KS-6469, мг/мл	Условия инкубации					
	4°C		20°C		37°C	
	3 ч	6 ч	3 ч	6 ч	3 ч	6 ч
0.3	н.о.	5.4 ± 0.1	н.о.	4.9 ± 0.1	н.о.	4.8 ± 0.3
0.6	5.4 ± 0.1	4.9 ± 0.1	5.3 ± 0.1	4.9 ± 0.2	3.9 ± 0.1	1.9 ± 0.3
1.25	4.7 ± 0.3	5.1 ± 0.1	4.8 ± 0.2	4.6 ± 0.2	2.4 ± 0.2	< 1.7
2.5	5.0 ± 0.2	5.3 ± 0.3	4.5 ± 0.2	4.3 ± 0.2	< 1.7	< 1.7
5.0	н.о.	4.9 ± 0.4	н.о.	4.3 ± 0.4	< 1.7	< 1.7
ФСБ	5.1 ± 0.1	5.2 ± 0.2	5.1 ± 0.1	5.0 ± 0.3	4.4 ± 0.3	4.6 ± 0.1

Примечание. «н.о.» – не определяли.



**Рис. 7.** Токсичность соединения KS-6469 для мышей. Мыши BALB/c ( $n = 6$ ) получали KS-6469 в дозе 500 или 250 мг/кг однократно интравентриально в 0.2 мл ФСБ (А) или 1 или 2 раза интраназально в дозе 250 мг/кг в 40 мкл ФСБ (Б). Представлены средние значения массы тела животных  $\pm$  S.D. в указанные промежутки времени

сутствии 0.3 мг/мл KS-6469 при 37°C в течение 6 ч не влияла на его инфекционность. Снижение температуры инкубации привело к значительному снижению вирулицидных свойств KS-6469: при инкубации вируса с соединением при 4 или 20°C, снижения инфекционности вируса не наблюдалось. Мы предполагаем, что вирулицидный эффект KS-6469 может быть опосредован образованием агрегатов вирусных частиц и соединения, а снижение температуры инкубации может резко уменьшить эффективность образования таких агрегатов.

### Изучение противовирусной эффективности KS-6469 на модели гриппозной пневмонии мышей

**Токсичность соединения KS-6469 для мышей.** Мышам линии BALB/c однократно интравентриально вводили KS-6469 (250 или 500 мг/кг) в 0.2 мл ФСБ.

Физические параметры и вес животных контролировали ежедневно (рис. 7). Однократное введение соединения в максимальной дозе 500 мг/кг не приводило к снижению веса и изменению общего состояния животных, что указывает на низкую токсичность KS-6469. Мыши, которым двукратно с интервалом 24 ч интраназально вводили KS-6469 (250 мг/кг), теряли вес минимально в течение 2 дней после введения, далее токсических побочных эффектов не наблюдали в течение всего периода наблюдения (рис. 7А и 7Б).

**Протективное действие KS-6469.** Эффективность KS-6469 против летального заражения ВГ протестировали на модели гриппозной пневмонии мышей. Для оценки репродукции ВГ в легких мышам интраназально вводили KS-6469 в различных дозах и заражали вирусом в дозе, соответствующей 3 ЛД<sub>50</sub>. На следующий день мыши интраназально получали вторую дозу KS-6469. Мыши группы положительного контроля ежедневно перорально получали осельтамивир (7.5 мг/кг); мыши контрольной группы без лечения получали ФСБ по аналогичной схеме (отрицательный контроль). Через 3 сут в гомогенатах легких с помощью метода ФОЕ определяли титр вируса (рис. 8А). Из представленных данных видно, что в легких мышей, получавших KS-6469, титр вируса значительно ниже, чем в контрольной группе, что свидетельствует об эффективном подавлении репродукции вируса гриппа в легких мышей после интраназального введения KS-6469 (рис. 8А). На 3-й день в легких мышей, не получавших лечения, титры вируса были на ~ 2.5 lg выше, чем у мышей, получавших KS-6469 и осельтамивир ( $p < 0.05$ ). Необходимо отметить отсутствие дозозависимого снижения титра вируса в легких мышей, получавших разные дозы KS-6469, что, возможно, связано с механизмом действия этого соединения.

Для сравнения протективных свойств KS-6469 использовали две схемы введения препарата: 1) мышам первой группы однократно интраназально вводили KS-6469 в дозе 250 мг/кг с последующим заражением вирусом (3 ЛД<sub>50</sub>); 2) вторая группа мышей получала KS-6469 в тех же дозах 2 раза с интервалом в 1 день. В качестве положительного контроля мыши ежедневно перорально получали осельтамивир (7.5 мг/кг), мышам из группы без лечения по аналогичной схеме вводили ФСБ. В течение 14 дней после заражения ежедневно оценивали падение массы тела (количественный клинический признак гриппозной пневмонии) и выживаемость. Показано (рис. 8Б, 8В), что двукратное интраназальное введение KS-6469 приводило к минимальной потере массы тела и обеспечивало полную защиту мышей от заражения, как и введение осельтамивира (100% выживаемость). В группе мышей, получавших KS-6469 однократ-

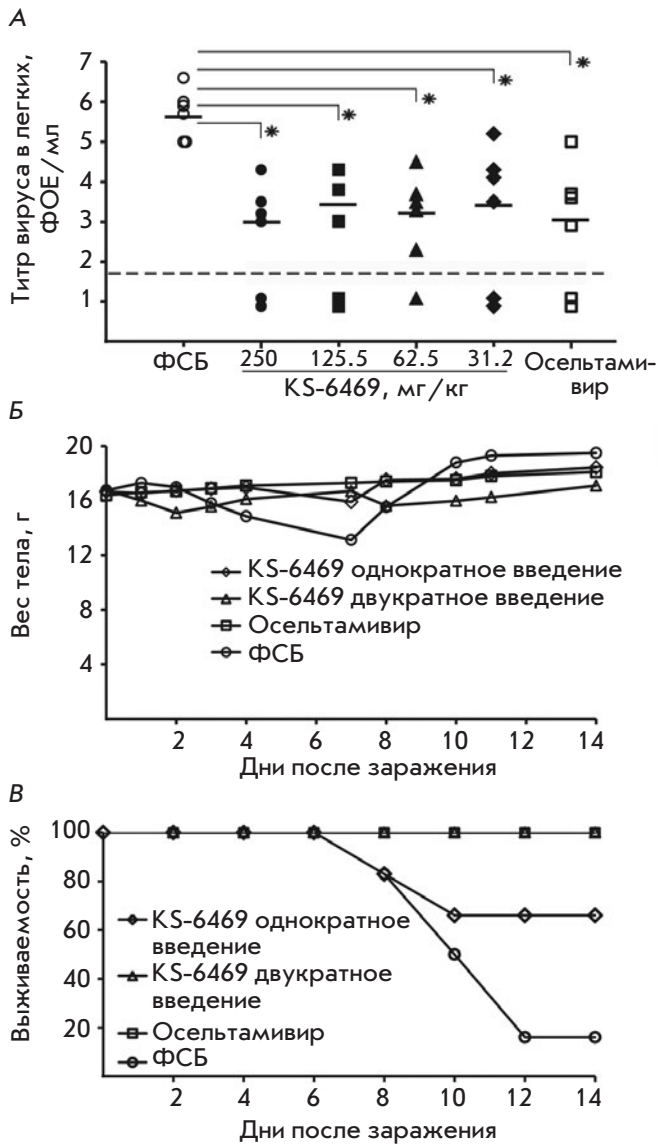


но, показатель выживаемости достигал 66%, и потеря массы тела была минимальной. Значительное падение массы тела у мышей без лечения (до 20%) свидетельствует о развитии тяжелой гриппозной

пневмонии, которая привела к гибели 84% мышей. Таким образом, полученные нами данные показывают, что лечебно-профилактическое применение соединения KS-6469 в модели гриппозной пневмонии эффективно защищает мышей от летальной гриппозной инфекции.

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Грипп остается одним из самых опасных вирусных заболеваний. На сегодняшний день одобрены только два класса препаратов для лечения гриппа – блокаторы ионных каналов белка M2 и ингибиторы NA [23, 24]. Вакцинация является надежным способом борьбы с гриппозной инфекцией [25], но вирусы гриппа постоянно меняются как в результате случайного накопления мутаций в генах поверхностных белков гемагглютинаина и нейраминидазы, так и в результате реассортации сегментов вирусного генома различных штаммов вируса гриппа, что приводит к снижению эффективности противогриппозных вакцин и терапевтических препаратов. Таким образом, существует острая необходимость в разработке новых подходов к борьбе с гриппом. Одно из возможных решений – разработка противовирусных соединений на основе сульфопроизводных олиго- и полисахаридов, полученных из синтетических или натуральных продуктов. Такие соединения эффективно инактивируют более восприимчивые к ним оболочечные вирусы [3–7]. Ранее было показано, что сульфатированные полисахариды из морских микроводорослей обладают активностью против вирусов без оболочки [26]. Считается, что сульфатированные полисахариды влияют на такие стадии цикла репликации гриппа, как связывание вирусных частиц с рецепторами клеточной поверхности [27], интернализация вирионов [28] и высвобождение вируса из клетки [12, 29]. Однако для выяснения механизмов их противовирусного действия требуются дополнительные исследования. Нами исследованы противовирусные свойства нового сульфированного производного β-циклодекстрина KS-6469. Обнаружено полное подавление репродукции вируса после инкубации инфицированных клеток в течение 24 ч с KS-6469 в концентрации 600 мкг/мл, что указывает на высокий противовирусный потенциал соединения. Для определения механизма противовирусной активности KS-6469 мы оценили эффективность ингибирования на разных стадиях жизненного цикла вируса (рис. 3). Оказалось, что KS-6469 не влияет на ранние стадии репликации вируса, однако значительное снижение титра вируса происходило при инкубации инфицированных клеток с KS-6469 в течение длительного времени. Таким образом, мы можем предположить, что KS-6469 влияет на поздние ста-



**Рис. 8.** Протективное действие соединения KS-6469 при летальном заражении мышей ВГ. А – мышам BALB/c ( $n = 6$ ) вводили интраназально KS-6469 в указанных дозах и инфицировали 3 ЛД<sub>50</sub> ВГ. На следующий день мыши получали вторую дозу KS-6469 интраназально. Через 72 ч определяли титр вируса в легких мышей по методу ФОЕ. Б – изменение массы тела мышей, инфицированных вирусом гриппа и получавших однократно или двукратно интраназально KS-6469 (250 мг/кг), осельтамивир или ФСБ. В – выживаемость мышей BALB/c ( $n = 6$ ), инфицированных 3 ЛД<sub>50</sub> ВГ и получавших однократно или двукратно интраназально KS-6469 (250 мг/кг). \* $p < 0.05$  по сравнению с контрольной группой без лечения

дии развития гриппозной инфекции. Ингибирующий эффект KS-6469 на поздних стадиях инфекции может быть связан с подавлением активности НА, однако мы не обнаружили каких-либо изменений в активности НА после инкубации с KS-6469 (рис. 5). Функциональная активность другого белка вирусной оболочки – гемагглютинина, после инкубации вирусных частиц с KS-6469 в течение 1 ч при 37°C была снижена в 4 раза по сравнению с гемагглютинином необработанного вируса (табл. 1), что не повлияло на эффективность связывания вирионов с рецепторами клеток и не привело к снижению эффективности репродукции вируса. Следует отметить, что инкубация ВГ с KS-6469 не снижала способность НА взаимодействовать с определенными моноклональными антителами к этому белку, что свидетельствует о сохранности антигенных детерминант, к которым направлены эти антитела (рис. 4). Нами показано, что KS-6469 обладает выраженной вирулицидной активностью, способной вызывать полную потерю инфекционности вируса после инкубации с KS-6469 (табл. 2). Вирулицидная активность соединения была максимальной при 37°C, но требовала длительной инкубации, что, в свою очередь, объясняет отсутствие эффекта ингибирования ранних этапов репликации вируса при инкубации клеток с KS-6469 (рис. 3). Экспозиция клеток с KS-6469 в течение первых часов развития инфекционного процесса привела лишь к частичному снижению инфекционности вируса, явно недостаточной для инактивации всего пула вирусных частиц и, как следствие, полной остановки репликации вируса. Детальный механизм действия KS-6469 находится в процессе изучения, тем не менее, полученные результаты позволяют предположить, что при взаимодействии KS-6469 с вирусными частицами *in vitro* образуются агрегаты, что приводит к значительному снижению инфек-

ционности вируса. Однако этот процесс требует достаточно длительного времени, более 6 ч. Ранее было высказано предположение [21], что именно вирулицидная активность противовирусных препаратов связана с их высокой терапевтической активностью в экспериментах *in vivo*. Наши данные полностью подтверждают это предположение. Мы показали, что KS-6469 обладает выраженной противовирусной активностью при гриппозной пневмонии у мышей (рис. 8). Интраназальное введение соединения одновременно с заражением мышей летальной дозой ВГ приводило к снижению смертности животных. При однократном введении соединения KS-6469 выжило 66% животных, тогда как его двукратное введение обеспечивало полную защиту от заражения вирусом гриппа. В контрольной группе выжило только 16% мышей, не получавших препарата. Интраназальное применение KS-6469 для лечения зараженных гриппом мышей заметно снижало титр вируса в легких даже при введении низкой дозы KS-6469 (62.5 мг/кг (рис. 8)).

#### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенные эксперименты показывают, что KS-6469 – это препарат с низкой токсичностью, который эффективно ингибирует развитие гриппозной пневмонии. Интраназальное применение KS-6469 оказывало противовирусное действие, сопоставимое с действием осельтамивиром. Таким образом, KS-6469 представляется перспективным кандидатом для разработки противовирусного препарата, эффективного для профилактики и лечения гриппозных инфекций. ●

Работа выполнена при частичной поддержке проекта базового бюджетного финансирования ПФНИ ГАН 2013-2020 № АААА-А17-117020210024-8.

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Iuliano D., Roguski K.M., Chang H.H., Muscatello D.J., Palekar R., Tempia S., Cohen C., Gran J.M., Schanzer D., Cowling B.J., et al. // *Lancet*. 2018. V. 391. P. 1285–1300.
- Ginsberg H.S., Goebel W.F., Horsfall F.J. // *J. Exp. Med.* 1948. V. 87. P. 385–410.
- Moriya T., Saito K., Kurita H., Matsumoto K., Otake T., Mori H., Morimoto M., Ueba N., Kunita N. // *J. Med. Chem.* 1993. V. 36. P. 1674–1677.
- Ying C., van Pelt J.F., van Lommel A., van Ranst M., Leyssen P., De Clercq E., Neyts J. // *Antivir. Chem. Chemother.* 2002. V. 13. P. 157–164.
- Cardozo F.T., Camellini C.M., Leal P.C., Kratz J.M., Nunes R.J., Mendonça M.M., Simões C.M. // *Intervirology*. 2014. V. 57. P. 375–383. doi: 10.1159/000365194.
- Hidari K.I., Takahashi N., Arihara M., Nagaoka M., Morita K., Suzuki T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2008. V. 376. P. 91–95. doi: 10.1016/j.bbrc.2008.08.100.
- Novetsky A.P., Keller M.J., Gradissimo A., Chen Z., Morgan S.L., Xue X., Strickler H.D., Fernández-Romero J.A., Burk R., Einstein M.H. // *Gynecol. Oncol.* 2016. V. 143. P. 313–318. doi: 10.1016/j.jygyno.2016.09.003.
- Ikeda S., Neyts J., Verma S., Wickramasinghe A., Mohan P., De Clercq E. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1994. V. 38. P. 256–259.
- Fitton J.H. // *Mar. Drugs*. 2011. V. 9. P. 1731–1760.
- Tang F., Chen F., Li F. // *J. Appl. Polym. Sci.* 2012. V. 127. P. 2110–2115.
- Kim M., Yim J.H., Kim S.Y., Kim H.S., Lee W.G., Kim S.J., Kang P.S., Lee C.K. // *Antiviral Res.* 2012. V. 93. P. 253–259. doi: 10.1016/j.antiviral.2011.12.006.
- Ciejka J., Milewska A., Wytrwal M., Wojarski J., Golda A., Ochman M., Nowakowska M., Szczubialka K., Pyrc K. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2016. V. 60. P. 1955–1966. doi: 10.1128/AAC.02183-15.
- Eccles R., Winther B., Johnston S.L., Robinson P., Trampisch

- M., Koelsch S. // *Respir. Res.* 2015. V. 16. P. 121. doi: 10.1186/s12931-015-0281-8.
14. Carmichael J., DeGraff W.G., Gazdar A.F., Minna J.D., Mitchell J.B. // *Cancer Res.* 1987. V. 47. P. 936–942.
15. Brien J.D., Lazear H.M., Diamond M.S. // *Curr. Protoc. Microbiol.* 2013. doi:10.1002/9780471729259.mc15d03s31.
16. Крылова Н.В., Леонова Г.Н. // *Проблемы вирусологии.* 2016. Т. 61. С. 139–144.
17. Хабриев Р.У. Руководство по экспериментальному (доклиническому) изучению новых фармакологических веществ. М.: Медицина, 2005. 832 с.
18. Goncharova E.P., Koroleva L.S., Silnikov V.N., Ternovoy V.A., Vlassov V.V., Zenkova M.A. // *J. Mol. Genet. Med.* 2011. V. 5. P. 266–272.
19. European Convention for the Protection of Vertebrate Animals used for Experimental and Other Scientific Purposes. European Treaty Series. 1986. No. 123.
20. Sun X., Whittaker G.R. // *J. Virol.* 2003. V. 77. P. 12543–12551.
21. Harden E.A., Falshaw R., Carnachan S.M., Kern E.R., Prichard M.N. // *Antiviral Res.* 2009. V. 83. № 3. P. 282–289. doi: 10.1016/j.antiviral.2009.06.007.
22. Leibbrandt A., Meier C., König-Schuster M., Weinmüller R., Kalthoff D., Pflugfelder B., Graf P., Frank-Gehrke B., Beer M., Fazekas T., et al. // *PLoS One.* 2010. V. 5. № 12. E. 14320. doi: 10.1371/journal.pone.0014320.
23. Yen H.L. // *Curr. Opin. Virol.* 2016. V. 18. P. 126–134.
24. Nakamura S., Miyazaki T., Izumikawa K., Takeya H., Saisho Y., Yanagihara K., Miyazaki Y., Mukae H., Kohno S. // *Open Forum Infect. Dis.* 2017. V. 4. ofx129. doi: 10.1093/ofid/ofx129.
25. Lewnard J.A., Cobey S. // *Vaccines (Basel).* 2018. doi: 10.3390/vaccines6020028.
26. Yim J.H., Kim S.J., Ahn S.H., Lee C.K., Rhie K.T., Lee H.K. // *Mar. Biotechnol (NY).* 2004. V. 6. P. 17–25.
27. Vives R.R., Imberty A., Sattentau Q.J., Lortat-Jacob H.J. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. P. 21353–21357.
28. Hashimoto K., Kodama E., Mori S., Watanabe J., Baba M., Okutani K., Matsuda M., Shigeta S. // *Antiviral Chem. Chemother.* 1996. V. 7. P. 189–196.
29. Wang W., Wu J., Zhang X., Hao C., Zhao X., Jiao G. Shan X., Tai W., Yu G. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 40760. doi: 10.1038/srep40760.

УДК 577.112.6:615.214.31

# Дипептидный миметик фактора роста нервов стимулирует нейрогенез и синаптогенез в гиппокампе и стриатуме взрослых крыс с фокальной церебральной ишемией

Т. А. Гудашева\*, П. Ю. Поварнина, А. А. Волкова, С. В. Круглов, Т. А. Антипова, С. Б. Серединин

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

\*E-mail: gudasheva@academpharm.ru

Поступила в редакцию 05.04.2019

Принята к печати 06.06.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-31-37

**РЕФЕРАТ** Фактор роста нервов (NGF, nerve growth factor) и его миметики, обладающие нейропротекторными и нейрорегенеративными свойствами, привлекают внимание как объекты для разработки новых средств терапии последствий поражений головного мозга. В НИИ фармакологии им. В.В. Закусова создан дипептидный миметик 4-й петли NGF – гексаметилендиамид бис-(моносукцинил-*L*-глутамил-*L*-лизина) (ГК-2), который, подобно полноразмерному NGF, активирует TrkA-рецепторы, но, в отличие от него, активирует преимущественно путь PI3K/АКТ, ассоциированный с нейропротекцией, и не стимулирует каскад MAPK, связанный с основным побочным эффектом нейротрофина – гиперальгезией. Нейропротекторная активность ГК-2 выявлена на различных моделях церебральной ишемии. В условиях экспериментального инсульта ГК-2 статистически значительно снижает объем инфаркта мозга даже при введении через 24 ч после повреждения, что свидетельствует в пользу нейрорегенеративных свойств ГК-2, которые могут быть связаны с активацией нейрогенеза и/или синаптогенеза. Нами изучено влияние ГК-2 на нейрогенез и синаптогенез в условиях экспериментального ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией среднечерепной артерии у крыс. ГК-2 начинали вводить через 6 и 24 ч после операции, а затем вводили 1 раз в сутки в течение 7 дней. Через сутки после последнего введения препарата оценивали пролиферативную активность в гиппокампе и стриатуме поврежденного полушария по уровню Ki67, синаптогенез по уровню синаптофизина и PSD-95 в стриатуме. Установлено, что иммунореактивность к Ki67 как в стриатуме, так и в гиппокампе ишемизированных крыс снижена примерно на 30% по сравнению с ложнооперированным контролем. Содержание синаптических маркеров синаптофизина и PSD-95 было также статистически значительно снижено – на 14 и 29% соответственно. ГК-2 при обоих режимах введения полностью восстанавливал уровень иммунореактивности к Ki67 в гиппокампе и вызывал тенденцию к ее увеличению в стриатуме. Кроме того, ГК-2 восстанавливал содержание постсинаптического маркера PSD-95 с терапевтическим эффектом 70% при начале его введения через 6 ч после инсульта, вызывал тенденцию к восстановлению уровня этого маркера при начале введения через 24 ч. Влияние ГК-2 на уровень синаптофизина не выявлено. Полученные данные позволяют сделать вывод о стимулирующем влиянии миметика нейротрофина ГК-2, активирующего преимущественно один из основных сигнальных путей Trk-рецепторов, PI3K/АКТ, на нейрогенез (и, возможно, глиогенез) и синаптогенез в условиях экспериментальной церебральной ишемии. Этой стимуляцией можно объяснить защитное действие дипептида при начале его введения через 24 ч после моделирования инсульта.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** NGF, дипептидный миметик ГК-2, инсульт, нейрогенез, синаптогенез, Ki67, PSD-95, синаптофизин.



**ВВЕДЕНИЕ**

Разработка методов патогенетической терапии ишемического инсульта после реперфузии остается актуальной задачей современной медицины.

В качестве нейропротектора внимание исследователей привлекает фактор роста нервов (nerve growth factor, NGF), способный влиять на основные механизмы ишемического повреждения нейронов: глутаматную токсичность, опосредующую избыточное поступление кальция в клетку [1], окислительный стресс [2]. NGF снижает экспрессию проапоптотических белков, активирует синтез антиапоптотических белков [3, 4]. Экспериментально доказана вовлеченность NGF в процессы нейрогенеза во взрослом мозге грызунов. NGF увеличивает пролиферацию нейрональных стволовых клеток, способствует выживаемости прогениторных клеток и стимулирует дифференцировку нейробластов в обеих основных нейрогенных зонах – субвентрикулярной зоне и в зубчатой извилине гиппокампа [5–9]. Эффективность NGF при внутримозговом и интраназальном введении показана на различных моделях церебральной ишемии у грызунов. Чрезвычайно важно, что нейротрофин сохранял активность при отставленном начале введения – через 24 ч после моделирования инсульта [6, 10]. Применение NGF в клинике ограничено не только его неудовлетворительными фармакокинетическими свойствами, но и серьезными, обусловленными плеiotропностью побочными эффектами, основные из которых – гипералгезия, катастрофическая потеря веса, избыточный нейритогенез и ангиогенез [11]. Не исключено, что недостатки полноразмерного белка NGF могут быть преодолены созданием его низкомолекулярных миметиков, обладающих селективным фармакологическим действием [12].

НИИ фармакологии им. В.В. Закусова разрабатывает гипотезу, в соответствии с которой распознавание рецептором и связывание определяются наиболее экспонированными участками петлеобразных структур нейротрофинов, чаще всего центральными участками их бета-изгибов, причем миметики бета-изгибов разных петель могут имитировать разные функции нейротрофина [13]. На основе этой гипотезы создан димерный дипептидный миметик 4-й петли NGF – гексаметилендиамид бис-(моносукцинил-L-глутамил-L-лизина), получивший лабораторный шифр ГК-2 [Патент РФ № 2410392, 2010; Патент США US 9,683,014 B2; Патент КНР CN 102365294 B, 2016]. Установлено, что ГК-2, подобно NGF, активирует TrkA-рецепторы, но, в отличие от полноразмерного белка, активирует преимущественно PI3K/АКТ-путь, ассоциированный с нейропротекцией, не вызывая стимуляции MAPK-каскада, опосредующего гипералгезию [14].

Исследования *in vitro* показали, что ГК-2, подобно NGF, обладает нейропротекторной активностью в микронанолярных концентрациях в условиях окислительного стресса и глутаматной токсичности на культурах как иммортализованных, так и первичных нейронов [15]. Нейропротекторную активность ГК-2 показал и *in vivo* при системном введении на моделях болезней Альцгеймера и Паркинсона, а также на различных моделях церебральной ишемии [16]. В подтверждение данных *in vitro* ГК-2, в отличие от полноразмерного белка, не вызывал гипералгезии и потери веса в экспериментах *in vivo* [14]. Изучение нейропротекторного эффекта ГК-2 на модели ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией среднемозговой артерии у крыс, показало, что дипептид статистически значимо снижает объем повреждения мозга при начале терапевтического введения от 4 до 24 ч с наибольшим эффектом (60%) при первом введении через 6 ч после операции [17]. Сохранение активности ГК-2 при начале его введения через 24 ч после моделирования ишемического инсульта не объясняется, вероятно, нейропротекторными свойствами соединения, поскольку зона инфаркта к этому времени уже полностью сформирована [18]. Поэтому логично полагать, что по прошествии 24 ч от возникновения ишемии протекторное действие ГК-2 может быть связано с его регенеративными свойствами.

С целью выяснения этого вопроса нами изучено влияние ГК-2 на нейрогенез и синаптогенез в условиях экспериментального ишемического инсульта с использованием антител к маркеру пролиферации Ki67 и маркерам синаптогенеза – синаптофизину и PSD-95. Показатели нейрогенеза и синаптогенеза определяли в гиппокампе и стриатуме. Выбор этих структур обусловлен тем, что в гиппокампе локализована одна из основных нейрогенных зон взрослого мозга (субгранулярная зона), а стриатум является структурой, наиболее подверженной повреждению при окклюзии среднемозговой артерии [6]. Эффекты ГК-2 изучали при начале его введения через 6 и 24 ч после моделирования инсульта.

**ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ****Животные**

В опытах использовали 34 крыс-самцов линии Вистар массой 220–250 г и возрастом 8–9 недель на момент начала эксперимента, полученных из Филиала «Андреевка» ФГБУН «НЦВМТ» ФМБА России массой 210–240 г. Животных содержали в условиях вивария при естественной смене светового режима со свободным доступом к стандартному гранулированному корму и воде. При работе со-

блюдали требования, сформулированные в Приказе Минздрава РФ № 199 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики» и в Решении Совета ЕЭК № 81 «Об утверждении Правил надлежащей лабораторной практики Евразийского экономического союза в сфере обращения лекарственных средств». Все манипуляции с животными одобрены биоэтической комиссией ФГБНУ НИИ фармакологии им. В.В. Закусова.

### Моделирование ишемического инсульта

Ишемический инсульт моделировали внутрисосудистым перекрытием среднемозговой артерии нитью [19]. Все хирургические манипуляции осуществляли с помощью титановых микрохирургических инструментов. Крыс вводили в наркоз 5% раствором хлоралгидрата (350 мг/кг, в/б). Выполняли срединный разрез в области шеи и выделяли с правой стороны шеи сонный треугольник, образованный сверху двубрюшной мышцей, латерально – грудно-ключично-сосцевидной мышцей и медиально – грудно-подъязычной мышцей. В сонном треугольнике выделяли сонный сосудисто-нервный пучок, образованный общей сонной артерией и блуждающим нервом. Осторожно отделяли блуждающий нерв и накладывали микрохирургическую сосудистую титановую клипсу на общую сонную артерию на 1.5 см ниже ее бифуркации. Аккуратно выделяли из спаек наружную и внутреннюю сонные артерии. На внешнюю сонную артерию накладывали хлопчатобумажную нить, плотно затягивали. На внутреннюю сонную артерию накладывали викриловую нить, затягивали не плотно, после чего перерезали внешнюю сонную артерию проксимальнее наложения нити. Гепаринизированную нейлоновую нить диаметром 0.25 мм вводили через культю внешней сонной артерии во внутреннюю сонную артерию на глубину 19–21 мм (до перекрытия среднемозговой артерии) и фиксировали микрососудистой клипсой. Перекрытие кровотока осуществляли в течение 60 мин, после чего нить извлекали из сосуда, восстанавливая кровоснабжение в бассейне среднемозговой артерии. После извлечения нити культю внешней сонной артерии закрывали коагуляцией электрокаутером до полной герметичности. Ложнооперированных животных подвергали тем же процедурам за исключением перерезания сосудов и введения нити. Срединный разрез шеи зашивали хлопчатобумажными нитями и обрабатывали стрептоцидом. Объем ишемического повреждения на 7-е сут после моделирования инсульта в наших экспериментах составлял 700–800 мм<sup>3</sup> (по результатам морфометрии срезов мозга, окрашенных хлоридом 2,3,5-трифенилтетразолия) [17].



Рис. 1. Схема эксперимента. МСАО – окклюзия среднемозговой артерии

### Дизайн исследования

Оперированных животных произвольным образом делили на три группы – группа «инсульт» (оперированные нелеченные животные;  $n = 9$ ) и две группы, получавшие ГК-2 (1 мг/кг, в/б), разведенный в воде для инъекций. ГК-2 вводили из расчета 2 мл на килограмм массы тела через 6 ( $n = 10$ ) или 24 ч ( $n = 7$ ) после операции, а затем 1 раз в сутки, окончание введения – на 6-е сут после операции. Животные из групп «инсульт» и «ложная операция» ( $n = 8$ ) получали в том же режиме воду для инъекций. На 7-е сут после операции крыс декапитировали, головной мозг извлекали при температуре 0–4°C и выделяли из поврежденного полушария стриатум и гиппокамп, которые затем замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C. Схема эксперимента представлена на рис. 1.

### Оценка пролиферативной активности и синаптогенеза

Влияние ГК-2 на пролиферативную активность и синаптогенез в стриатуме и гиппокампе оценивали с помощью Вестерн-блот-анализа [20]. После размораживания образцы тканей животных одной группы объединяли так, чтобы получилось не менее трех проб. После этого пробы гомогенизировали при температуре 4°C в стеклянном гомогенизаторе с лизирующим буфером (50 мМ Трис-НСl, 5 мМ EDTA, 1 мМ дитиотреитол, 1% тритона X-100, pH 7.5), содержащим коктейль ингибиторов протеаз (пепстатин, бестатин, лейпептин и апротинин Sigma-Aldrich, США), отношение ткань : буфер = 1 : 10 (вес/объем). Затем инкубировали в течение 20 мин при 4°C и центрифугировали (20 мин при 15000 об/мин, центрифуга Allegra® X-12R BeckmanCoulterInc., США) при той же температуре. Концентрацию белка в супернатанте определяли по методу Фолина–Лоури [21]. Белки супернатанта разделяли в 12% полиакриламидном геле и переносили на мембрану из поливинилиденфторида электроэлюцией. Затем мембраны инкубировали в Трис-НСl-буфере (200 мМ, pH 7.5),

содержащем 1% Твина-20 (TBST) и 5% (вес/объем) обезжиренного молока, в течение 1 ч при комнатной температуре. Затем мембраны в течение 1.5 ч инкубировали при комнатной температуре с первичными моноклональными антителами против синаптофизина (BD Biosciences, Великобритания) в разведении 1:5000, первичными моноклональными антителами против PSD-95 (Thermo Fisher Scientific, США) в разведении 1:1000, первичными поликлональными антителами против Ki67 (Thermo Fisher Scientific) в разведении 1:5000, избыток антител отмывали TBST с 0.5% (вес/объем) обезжиренным молоком, мембраны инкубировали в течение 1 ч при комнатной температуре со вторичными козьими антителами против IgG кролика (Santa Cruz Biotechnology, США, 1:2000), конъюгированными с пероксидазой хрена. Белки выявляли после отмывки от вторичных антител в TBST в реакции с реагентами-усилителями хемилюминесценции (ECL-реагенты, Santa Cruz Biotechnology) с использованием гелъдокументирующей системы Alliance Q9 (UVITEC, Великобритания). Изображения денситометрировали с помощью программы GIMP2.

### Статистическая обработка

Межгрупповые различия оценивали с помощью U-теста Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ . Данные представляли в форме средних и стандартных отклонений.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Через 7 дней после операции иммунореактивность к маркеру пролиферации Ki67 как в стриатуме, так и в гиппокампе ишемизированного головного мозга крыс, не получавших ГК-2, оказалась снижена примерно на 30% по сравнению с ложнооперированным контролем (рис. 2, 3). Семидневное введение ГК-2 ишемизированным животным привело не только к восстановлению уровня иммунореактивности к маркеру Ki67 в гиппокампе, но и к превышению ее исходных значений на 35 и 36% при 6- и 24-часовом интервале между операцией и первым введением пептида соответственно (рис. 2). Полученные данные свидетельствуют о способности миметика NGF стимулировать пролиферативную активность в гиппокампе ишемизированного мозга. Исходя из ранее полученных данных об улучшении неврологического статуса крыс при введении ГК-2 (начало введения через 6 и 24 ч после операции) в таких же условиях, как в нашем эксперименте [17], мы можем предположить, что стимуляция пролиферативной активности под действием дипептида приводит, по крайней мере преимущественно, к нейрогенезу. В пользу этого свидетельствуют также опубликованные данные о том,

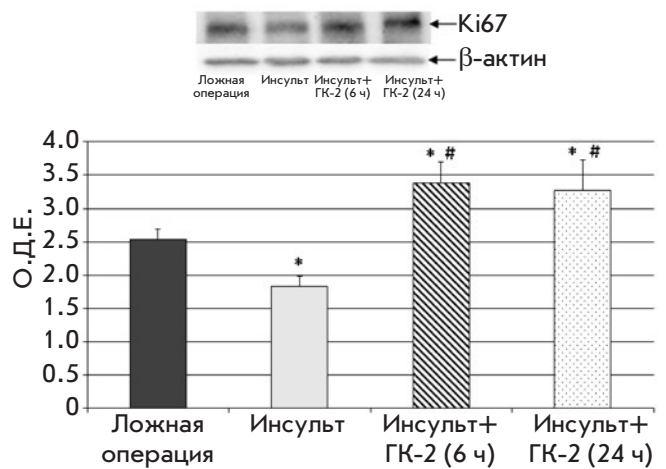


Рис. 2. Влияние ГК-2 на содержание маркера пролиферации Ki67 в гиппокампе при субхроническом (7 дней) введении (1 мг/кг, в/б) после моделирования ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс, в условиях терапевтического окна 6 и 24 ч (время между операцией и первым введением препарата). О.Д.Е. – относительные денситометрические единицы. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой «ложная операция», # –  $p < 0.05$  по сравнению с группой «инсульт» (U-тест Манна–Уитни)

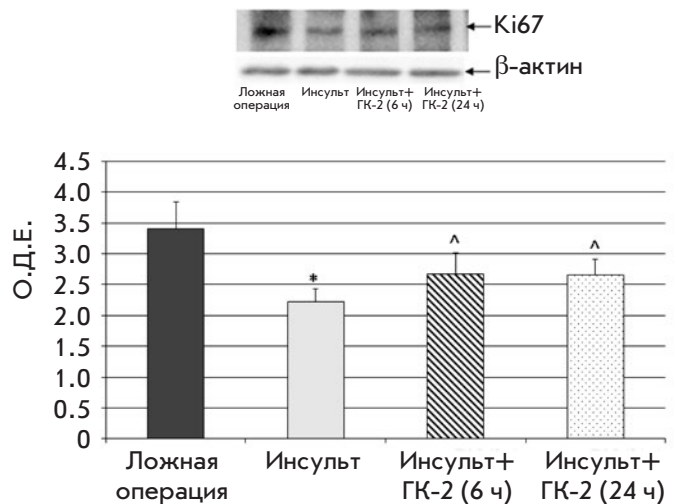


Рис. 3. Влияние ГК-2 на содержание маркера пролиферации Ki67 в стриатуме крыс при субхроническом (7 дней) введении (1 мг/кг, в/б) после моделирования ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии, в условиях терапевтического окна 6 и 24 ч (время между операцией и первым введением препарата). О.Д.Е. – относительные денситометрические единицы. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой «ложная операция», ^ –  $p < 0.1$  по сравнению с группой «инсульт» (U-тест Манна–Уитни)

что полноразмерный NGF стимулирует гиппокампальный нейрогенез, увеличивая пролиферативную активность и способствуя выживаемости нейробластов в зубчатой извилине гиппокампа [5, 9].

Таким образом, мы можем сделать предварительный вывод о том, что ГК-2 воспроизводит эффекты NGF, увеличивая гиппокампальный нейрогенез в условиях церебральной ишемии. В меньшей степени можно предположить влияние ГК-2 на глиогенез, поскольку даже полноразмерный нейротрофин стимулирует в основном образование нейробластов.

В стриатуме ГК-2 при обоих режимах введения вызывал тенденцию к повышению уровня иммунореактивности к Ki67 примерно в 1.2 раза по сравнению с нелечеными животными (что соответствует терапевтическому эффекту 36–37% ( $p = 0.08$ )) (рис. 3). Известно, что в условиях окклюзии средней мозговой артерии NGF стимулирует пролиферативную активность и увеличивает выживаемость нейробластов в субвентрикулярной зоне и в стриатуме крыс [6, 10]. На такой же модели ишемии мозга с помощью маркера пролиферации BrdU показано [6], что NGF при интраназальном введении способствует увеличению выживаемости прогениторных клеток в стриатуме через 4 недели примерно в 1.5 раза. С использованием другого маркера пролиферации, Ki67, установлено [10], что NGF, экспрессированный в мозге крыс с помощью лентивирусного вектора, также стимулирует нейрогенез в поврежденном стриатуме, увеличивая примерно в 2 раза число нейробластов по сравнению с нелечеными животными через 3 недели после моделирования инсульта.

Таким образом, ГК-2, введенный системно, по видимому, оказывает сходное с NGF, введенным внутрь мозга интраназально или с помощью генной терапии, действие на нейрогенез в стриатуме ишемизированных крыс.

В настоящее время накоплено большое количество экспериментальных данных, указывающих на компенсаторную роль нейрогенеза в субвентрикулярной и субгранулярной зонах в условиях церебральной ишемии [22]. Согласно опубликованным данным, в патологических условиях нейрогенез активируется, при этом вновь образовавшиеся нейробласты мигрируют в поврежденные области мозга, где замещают погибшие нейроны [23]. Поэтому можно предположить, что стимулирующее влияние ГК-2 на пролиферативную активность в гиппокампе приводит к активации нейрорегенеративных процессов в зоне ишемического повреждения за счет миграции в эту область большего числа выживших нейрональных клеток-предшественников и, в конечном итоге, к их интеграции. Вероятно, что тенденция к увеличению уровня маркера пролиферации Ki67 в стриатуме

под действием ГК-2 обусловлена миграцией в эту область нейробластов из нейрогенных зон.

Оценка уровня синаптических маркеров в стриатуме поврежденного полушария ишемизированных крыс показала, что содержание как белка постсинаптической плотности PSD-95, так и пресинаптического белка синаптофизина, было статистически значимо снижено по сравнению с ложнооперированными животными (соответственно на 29 и 14%) (рис. 4, 5). Эти результаты подтверждают наличие ишемического повреждения в данной области, связанного с потерей нейронов и синапсов. ГК-2 восстанавливал содержание PSD-95 с терапевтическим эффектом 70% при начале его введения через 6 ч после операции, вызывая, однако, при начале введения через 24 ч лишь тенденцию ( $p = 0.08$ ) к восстановлению уровня этого маркера (рис. 4).

При этом на содержание синаптофизина в стриатуме ГК-2 не оказывал статистически значимого влияния (рис. 5).

Возможным объяснением отсутствия изменений пресинаптического белка синаптофизина при введении ГК-2 является формирование пресинаптических терминалей на конечных этапах нейрогенеза, для за-

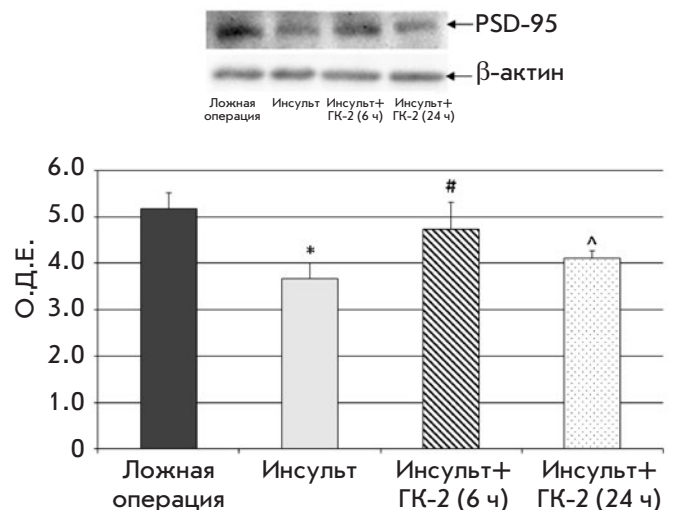
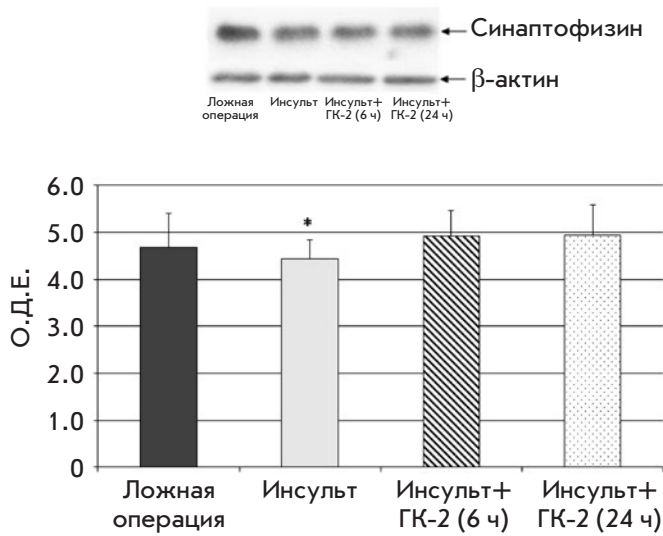


Рис. 4. Влияние ГК-2 на содержание белка постсинаптической плотности PSD-95 в стриатуме при субхроническом (7 дней) введении (1 мг/кг, в/б) после моделирования ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средней мозговой артерии у крыс. ГК-2 начинали вводить через 6 и 24 ч после операции. О.Д.Е. – относительные денситометрические единицы. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой «ложная операция», # –  $p < 0.1$  по сравнению с группой «инсульт»; ^ –  $p < 0.1$  по сравнению с группой «инсульт» (U-тест Манна–Уитни)





**Рис. 5.** Влияние ГК-2 на содержание пресинаптического маркера синаптофизина в стриатуме при субхроническом (7 дней) введении (1 мг/кг, в/б) после моделирования ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средне мозговой артерии у крыс. ГК-2 начинали вводить через 6 и 24 ч после операции. О.Д.Е. – относительные денситометрические единицы. \* –  $p < 0.05$  по сравнению с группой «ложная операция» (U-тест Манна–Уитни)

вершения которого требуется не менее 3 недель. С другой стороны, белок постсинаптической плотности PSD-95 входит в состав дендритных шипиков, которые формируются в более короткие сроки [24]. На основании полученных данных можно заключить, что через 7 дней после экспериментального инсульта ГК-2 стимулировал стриатальный синаптогенез на уровне образования дендритных шипиков.

Для оценки вклада нейрогенерации в защитные эффекты ГК-2 в условиях экспериментального инсульта мы сопоставили полученные нами биохимические

данные с результатами ранее выполненного морфологического изучения [17] влияния ГК-2 на снижение объема ишемического повреждения мозга. Все эффекты дипептида оценивали на 7-е сут после операции (см. таблицу).

Как видно из таблицы, ГК-2 снижал объем ишемического повреждения на 60 и 24% при начале введения через 6 и 24 ч после операции соответственно. Через 6 ч после инсульта согласно [18] сохраняется значительное количество нейронов пенумбры, которые могут выжить в результате нейропротекторного действия ГК-2. Вероятно, что восстановление мозга частично происходит и за счет нейрогенеза. Через 24 ч в отсутствие пенумбры восстановление поврежденной ткани мозга (на 24%) возможно только за счет регенеративных процессов. Полученные данные позволяют предположить, что регенерация за счет пролиферации и миграции новых клеток не зависит от объема пенумбры, на что указывают сходные показатели иммунореактивности Ki67 при начале введения ГК-2 через 6 и 24 ч после операции.

В то же время синаптогенез, судя по результатам определения постсинаптического маркера PSD-95, может зависеть от общего количества живых нейронов как выживших, так и вновь сформированных. Изменение плотности этого маркера в присутствии ГК-2 пропорционально восстановлению объема нейронов в зоне ишемического повреждения (72/60 и 30/24 соответственно).

Таким образом, полученные в настоящем исследовании результаты позволяют заключить, что эффект ГК-2 при начале терапевтического введения в короткие интервалы времени после моделирования инсульта связан как с нейропротективными, так и с репаративными процессами, в то время как при начале введения через 24 ч эффект реализуется за счет стимуляции репаративных процессов, включающих как нейрогенез (и возможно глиогенез), так и синаптогенез.

**Нейропротекторные и нейрогенеративные эффекты ГК-2 (1 мг/кг, 7 дней) на модели ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией средне мозговой артерии у крыс**

Начало введения после операции, ч	Снижение объема ишемического повреждения [17], %	Стимуляция нейрогенеза (по маркеру пролиферации Ki67), терапевтический эффект, %		Стимуляция синаптогенеза в стриатуме (по постсинаптическому маркеру PSD-95), терапевтический эффект, %
		гиппокамп	стриатум	
6	60*	220*	37^	72*
24	24*	205*	36^	30^

Примечание. Терапевтический эффект рассчитывали по формуле: [(содержание белка в группе «инсульт+ГК-2» – содержание белка в группе «инсульт»)/(содержание белка в группе «ложная операция» – содержание белка в группе «инсульт»)] × 100%. \* –  $p < 0.05$ ; ^ –  $p < 0.1$  по сравнению с группой «инсульт» (U-тест Манна–Уитни).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Димерный дипептидный миметик 4-й петли фактора роста нервов ГК-2 при его субхроническом введении в условиях экспериментального ишемического инсульта, вызванного транзиторной окклюзией среднемозговой артерии, и первом введении через 6 и 24 ч после операции статистически значимо восстанавливает сниженную пролиферацию нейрональных стволовых клеток в гиппокампе и вызывает тенденцию к увеличению пролиферативной активности в стриатуме по маркеру Ki67. Исходя из ранее полученных данных об улучшении неврологического статуса крыс при введении ГК-2 в условиях, аналогичных условиям настоящего эксперимента [17], мы можем предположить, что стимуляция про-

лиферативной активности под действием дипептида приводит, по крайней мере преимущественно, к нейрогенезу. Действие ГК-2 приводит к повышению количества синаптических контактов, снижению после операции, которое оценивали по постсинаптическому маркеру PSD-95, при первом введении через 6 ч после операции и вызывает тенденцию к увеличению этого параметра при первом введении через 24 ч. Полученные данные позволяют сделать вывод о стимулирующем влиянии ГК-2 на нейрогенез (и, возможно, глиогенез) и синаптогенез в условиях экспериментальной церебральной ишемии. ●

*Работа выполнена при поддержке РНФ (проект № 18-15-00381) и РФФИ (проект № 18-015-00228).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Jiang H., Tian S., Zeng Y., Shi J. // J. Huazhong Univ. Sci. Technol. - Med. Sci. 2008. V. 28. № 4. P. 379–382.
- Hassanzadeh P., Arbabi E., Atyabi F., Dinarvand R. // Life Sci. 2017. V. 179. P. 15–22.
- Park J.H., Kang S.S., Kim J.Y., Tchah H. // Investig. Ophthalmol. Vis. Sci. 2016. V. 57. № 15. P. 6767–6775.
- Yang J.P., Liu H.J., Yang H., Feng P.Y. // Neurol. Sci. 2011. V. 32. № 3. P. 433–441.
- Frielingsdorf H., Simpson D.R., Thal L.J., Pizzo D.P. // Neurobiol. Dis. 2007. V. 26. № 1. P. 47–55.
- Zhu W., Cheng S., Xu G., Ma M., Zhou Z., Liu D., Liu X. // Drug Deliv. 2011. V. 18. № 5. P. 338–343.
- Tirassa P., Maccarone M., Carito V., De Nicolò S., Fiore M. // Eur. J. Neurosci. 2015. V. 41. № 9. P. 1207–1218.
- Tirasa P. // Arch. Ital. Biol. 2011. V. 149. № 2. P. 205–213.
- Zhang H., Petit G.H., Gaughwin P.M., Hansen C., Ranganathan S., Zuo X., Smith R., Roybon L., Brundin P., Mobley W.C., et al. // J. Huntingtons. Dis. 2013. V. 2. № 1. P. 69–82.
- Cao J.-Y., Lin Y., Han Y.-F., Ding S.-H., Fan Y.-L., Pan Y.-H., Zhao B., Guo Q.-H., Sun W.-H., Wan J.-Q., et al. // CNS Neurosci. Ther. 2018. V. 24. № 6. P. 508–518.
- Aloe L., Rocco M.L., Bianchi P., Manni L. // J. Transl. Med. 2012. V. 10. № 1. P. 239.
- Price R.D., Milne S.A., Sharkey J., Matsuoka N. // Pharmacol. Ther. 2007. V. 115. № 2. P. 292–306.
- Gudasheva T.A., Antipova T.A., Seredenin S.B. // Dokl. Biochem. Biophys. 2010. V. 434. P. 262–265.
- Gudasheva T.A., Povarnina P.Y., Antipova T.A., Firsova Y.N., Konstantinopolsky M.A., Seredenin S.B. // J. Biomed. Sci. 2015. V. 22. P. 106.
- Антипова Т.А., Гудашева Т.А., Середин С.Б. // Бюл. эксп. биологии и медицины. 2010. Т. 150. № 11. С. 537–540.
- Середин С.Б., Гудашева Т.А. // Журн. неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. 2015. № 6. С. 63–70.
- Середин С.Б., Поварнина П.Ю., Гудашева Т.А. // Журн. неврологии и психиатрии имени С.С. Корсакова. 2018. № 7. С. 49–53.
- McCullough L.D., Liu F. // J. Biomed. Biotechnol. 2011. V. 2011. P. 464701–464701.
- Longa E.Z., Weinstein P.R., Carlson S., Cummins R. // Stroke. 1989. V. 20. № 1. P. 84–91.
- Towbin H., Staehelin T., Gordon J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 9. P. 4350–4354.
- Lowery O.H., Rosebrough N.J., Farr A.L., Randall R.J. // J. Biol. Chem. 1951. V. 193. № 1. P. 265–275.
- Lindvall O., Kokaia Z. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2015. V. 7. № 11. P. a019034.
- Christie K.J., Turnley A.M. // Front. Cell. Neurosci. 2013. V. 6. P. 70.
- Lippman J., Dunaevsky A. // J. Neurobiol. 2005. V. 64. № 1. P. 47–57.

УДК 577.352.26

# Механизмы действия производных трииндолилметана на липидные мембраны

С. С. Ефимова<sup>1\*</sup>, Т. Е. Тертычная<sup>1</sup>, С. Н. Лавренов<sup>2</sup>, О. С. Остроумова<sup>1</sup><sup>1</sup>Институт цитологии РАН, 194064, Санкт-Петербург, Тихорецкий просп., 4<sup>2</sup>Научно-исследовательский институт по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, 119435, Москва, Большая Пироговская ул., 11

\*E-mail: efimova@incras.ru

Поступила в редакцию 12.04.2019

Принята к печати 18.07.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-38-45

**РЕФЕРАТ** Исследовано действие новых синтетических антибактериальных агентов *трис*(1-пентил-1*H*-индол-3-ил)метилия хлорида (ЛХТА-1975) и (1-(4-(диметиламино)-2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-ил)-1*H*-индол-3-ил)бис(1-пропил-1*H*-индол-3-ил)метилия хлорида (ЛХТА-2701) на модельные липидные мембраны. Изучена способность тестируемых веществ формировать трансмембранные поры, влиять на электрическую стабильность липидных бислоев и плавление насыщенных фосфохолинов, а также вызывать деформацию, слияние или деление липидных везикул. Установлено, что оба соединения проявляют детергентные свойства в отношении модельных мембран. Результаты, полученные методом дифференциальной сканирующей микрокалориметрии и путем измерения трансмембранного напряжения, при котором в присутствии тестируемых соединений происходит разрушение липидных бислоев, указывают, что оба производных вызывают разупорядочивание мембранных липидов. Показан синергизм разобцающего действия тестируемых производных и алкалоида капсаицина на модельные липидные мембраны. Пороговая концентрация вещества, вызывающая увеличение ионной проницаемости липидного бислоя, зависит от липидного состава мембраны. В случае отрицательно заряженных липидных бислоев она на порядок ниже, чем у электрически нейтральных. Это может быть обусловлено положительным зарядом молекул тестируемых агентов. При этом ЛХТА-2701 характеризуется большей эффективностью по сравнению с ЛХТА-1975. ЛХТА-2701 не только обладает детергентным действием, но и способен индуцировать ион-проницаемые трансмембранные поры, функционирование которых выражается в появлении ступенеобразных флуктуаций трансмембранного тока. Различие механизмов действия определяется особенностями строения этих веществ: в молекуле ЛХТА-1975 все три заместителя при атомах азота индольных циклов одинаковы и представляют собой *n*-алкильные группы (пентильные), а ЛХТА-2701 содержит наряду с двумя алкильными заместителями (*n*-пропильными) малеинимидный цикл. Полученные результаты важны для понимания механизмов действия новых антибактериальных агентов, отличий в селективности их действия на микроорганизмы-мишени и токсичности в отношении клеток человека, а также показывают целесообразность использования модельных липидных мембран для дальнейшего изучения направлений модификации и совершенствования структуры новых антибактериальных средств.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** антимикробные агенты, антибиотики, ион-проницаемые поры, липидные бислои, липосомы, турбомицин А.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ЛХТА-1975 – *трис*(1-пентил-1*H*-индол-3-ил)метилия хлорид; ЛХТА-2701 – (1-(4-(диметиламино)-2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-ил)-1*H*-индол-3-ил)бис(1-пропил-1*H*-индол-3-ил)метилия хлорид; ДОФС – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин; ДОФЭ – 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин; ДФФХ – 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ПОФХ – 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин; ДПФХ – 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин.

## ВВЕДЕНИЕ

Основными проблемами современной антибиотикотерапии являются побочные эффекты от применения антибактериальных средств и растущая устойчивость болезнетворных бактерий к ним, что приводит к утрате клинической значимости ряда лекарственных средств. Одним из перспективных способов преодоления этих трудностей считается модификация природных антибиотических соединений с целью создания на их основе полусинтетических производных, проявляющих не только выраженную активность в отношении резистентных микроорганизмов, но и характеризующихся расширенным спектром действия по сравнению с исходными препаратами.

Антибиотик турбомицин А, впервые выделенный в качестве продукта метаболизма *Saccharomyces cerevisiae*, обладающий относительно невысокой активностью в отношении грамположительных бактерий [1], является солью *трис*(индол-3-ил)метилия [2]. Показано, что введение алкильных заместителей по атомам азота индольных циклов антибиотика приводит к резкому увеличению антибактериальной активности, расширению спектра действия и появлению противоопухолевых свойств [3, 4].

Большой интерес представляют новые гомологи турбомицина А, *трис*(1-пентил-1*H*-индол-3-ил)метилия хлорид (ЛХТА-1975) и (1-(4-(диметиламино)-2,5-диоксо-2,5-дигидро-1*H*-пиррол-3-ил)-1*H*-индол-3-ил)*бис*(1-пропил-1*H*-индол-3-ил)метилия хлорид (ЛХТА-2701), синтезированные в НИИ по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе. ЛХТА-1975, кроме высокой антибактериальной активности в отношении мультирезистентных штаммов грамположительных бактерий, индуцирует также апоптоз опухолевых клеток посредством влияния на сигнальный путь NF-κB [3, 5, 6]. ЛХТА-2701, обладающий примерно таким же уровнем антибактериальной активности, как и ЛХТА-1975, значительно менее токсичен в отношении клеток человека (донорские фибробласты) [7]. В нашей работе изучены механизмы взаимодействия ЛХТА-1975 и ЛХТА-2701 с липидными бислоями, в том числе имитирующими мембраны клеток-мишеней.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали: 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфосерин (ДОФС), 1,2-диолеил-*sn*-глицеро-3-фосфоэтаноламин (ДОФЭ), 1,2-дифитаноил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДФФХ), 1-пальмитоил-2-олеил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ПОФХ) и 1,2-дипальмитоил-*sn*-глицеро-3-фосфохолин (ДПФХ) (Avanti Polar Lipids, США); KCl, KOH, HEPES, пентан, этанол, гексадекан, диме-

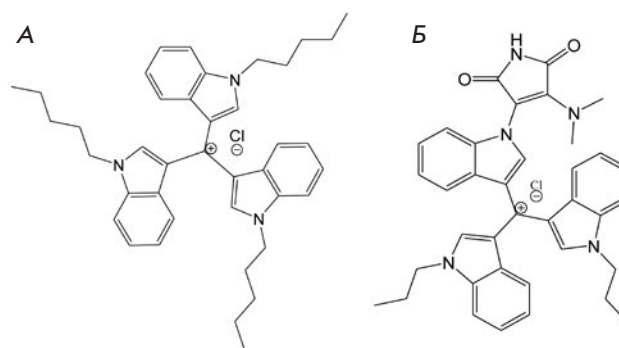


Рис. 1. Химические структуры производных трииндолилметана: ЛХТА-1975 (А) и ЛХТА-2701 (Б)

тилсульфоксид, капсаицин, кофеин (Sigma, США). Химические структуры производных трииндолилметана, ЛХТА-1975 и ЛХТА-2701, синтезированных в Научно-исследовательском институте по изысканию новых антибиотиков им. Г.Ф. Гаузе, представлены на рис. 1.

## Формирование плоских липидных бислоев и регистрация токов, протекающих через мембраны

Формирование бислоиных липидных мембран проводили по методу Монтала и Мюллера [8] путем сведения конденсированных липидных монослоев на отверстия в тефлоновой пленке, разделяющей экспериментальную камеру на два (*цис*- и *транс*-) отделения. Объем каждого отделения – 1.5 мл, толщина тефлоновой пленки – 10 мкм, диаметр отверстия – около 50 мкм. Перед началом формирования мембраны отверстие в тефлоновой пленке обрабатывали гексадеканом. Плоские липидные бислои формировали из ДФФХ или ПОФХ, а также из эквимолярной смеси ДОФС и ДОФЭ. Эксперименты проводили при одинаковом ионном составе разделяемых мембраной водных растворов электролита (0.1 М KCl, pH 7.4). Кислотность растворов (pH 7.4) поддерживали буферной смесью 5 мМ HEPES–KOH.

Тестируемые вещества, ЛХТА-1975 и ЛХТА-2701, добавляли из раствора 10 мг/мл в смеси диметилсульфоксид : H<sub>2</sub>O (1 : 1) в *цис*-отсек камеры до конечной концентрации, указанной в табл. 1. Для каждой системы «агент–липидный бислой» проведено не менее четырех независимых экспериментов (повторов).

Для подачи трансмембранного напряжения и измерения протекающего через мембрану тока были использованы хлорсеребряные электроды, которые соединяли с растворами камеры через мостики с 1.5% агарозой в растворе 2 М KCl. Положительным считали потенциал, вызывающий поток катионов из *цис*- в *транс*-отделение камеры.



Измерения и оцифровку трансмембранных токов проводили в режиме фиксации потенциала с помощью Axopatch 200B и Digidata 1440A (Axon Instruments, США). Для обработки данных использовали 8-полярный фильтр Бесселя (Model 9002, Frequency Devices) и частоту фильтрации 1 кГц.

Обработку записей трансмембранных токов осуществляли с использованием программного пакета Clampfit 9.0 (Axon Instruments). Статистический анализ полученных данных проводили при помощи программы Origin 8.0 (Origin Lab., США).

Проводимость пор вычисляли как отношение силы тока, проходящего через одиночную пору, к трансмембранному напряжению. Гистограммы флуктуаций тока строили для значений трансмембранных токов, определяемых по изменениям амплитуды тока при открывании (закрывании) одиночных каналов. Для определения времени жизни каналов (времени их нахождения в открытом состоянии) рассматривали записи флуктуаций тока через мембраны с одним встроенным каналом. Для каждой из экспериментальных систем величины проводимости и времени жизни пор представляли как средние арифметические значения и их ошибки (среднее  $\pm$  SE).

Пороговые значения трансмембранного напряжения, которое вызывает разрушение мембран из ДФФХ до и после добавки производных трииндолилметана в мембраноомывающие растворы,  $V_{bd}$ , измеряли путем приложения к мембране напряжения в диапазоне от 0 до  $\pm V_{bd}$ . Не выявлено различий между положительным и отрицательным трансмембранным напряжением.

#### Определение изменений электрического потенциала на границе мембрана/водный раствор при введении тестируемых производных

Ионофор нонактин добавляли в омывающие растворы с обеих сторон мембраны до конечной концентрации  $10^{-7}$ – $10^{-6}$  М. Липидные мембраны формировали из ДФФХ, как описано выше, в 0.1 М KCl, 5 мМ HEPES–KOH, pH 7.4.

Проводимость бислоя ( $G$ ) находили по отношению стационарного трансмембранного тока к трансмембранному потенциалу, равному 50 мВ. Изменения электрического потенциала на границе мембрана/водный раствор при введении тестируемых производных ( $\Delta\phi_d$ ) определяли как:

$$\frac{G_m}{G_m^0} = \exp\left(\frac{e\Delta\phi_d}{kT}\right),$$

где  $G_m^0$  и  $G_m$  – значения стационарной  $K^+$ -проводимости бислоя, индуцированной нонактином до и после введения тестируемого агента.

Тестируемые вещества ЛХТА-1975 и ЛХТА-2701 добавляли в *цис*-отсек экспериментальной камеры из смеси диметилсульфоксид :  $H_2O$  (1 : 1) до 300 и 150 мкМ соответственно.

#### Конфокальная флуоресцентная микроскопия липосом

Гигантские одноламеллярные липосомы формировали из ПОФХ в электрическом поле с использованием коммерческого прибора Nanion vesicle *prep pro* (Германия) на паре стекол, покрытых проводящей смесью оксида индия и оксида олова, со стандартным протоколом (переменное напряжение с амплитудой 3 В, частота 10 Гц, 1 ч, температура 25°C) согласно [9].

Полученную суспензию липосом разделяли на аликвоты. В экспериментальные образцы вводили производные трииндолилметана в соотношении липид : агент = 10 : 1. Аликвоты уравнивали в течение 30 мин при комнатной температуре, 10 мкл полученной суспензии липосом помещали между предметным и покровным стеклами. Липосомы наблюдали в проходящем свете с помощью конфокального микроскопа Olympus FV3000 (Германия). Проводили независимые эксперименты (от 3 до 5), определяли средний диаметр липосом в каждой из экспериментальных систем (среднее  $\pm$  SE).

#### Дифференциальная сканирующая микрокалориметрия липосом

Гигантские одноламеллярные липосомы формировали из ДПФХ в электрическом поле как описано выше. Полученную суспензию липосом доводили до 800 мкл буферным раствором (5 мМ HEPES, pH 7.4). Конечная концентрация липида составляла 5 мМ. В экспериментальные образцы вводили ЛХТА-2701 и ЛХТА-1975 в соотношении липида к агенту 10 : 1 или 5 : 1. Контрольные образцы не модифицировали. Термограммы суспензий липосом получали при помощи дифференциального сканирующего микрокалориметра  $\mu$ DSC7 (Setaram, Франция). Нужное количество суспензии помещали в одну ячейку и нагревали с постоянной скоростью 0.2 К/мин, во вторую ячейку помещали эквивалентный объем буферного раствора. Воспроизводимость температурной зависимости теплоемкости достигали путем повторного нагревания образца сразу после охлаждения. Пики на термограммах характеризовали температурами предперехода ( $T_p$ ) и основного перехода ( $T_m$ ), шириной основного пика на полувысоте ( $T_{1/2}$ ), отвечающей кооперативности перехода ДПФХ из гель-состояния в жидкую фазу, а также изменением энтальпии главного фазового перехода ( $\Delta H$ ).

Таблица 1. Зависимость вида мембранной активности производных трииндолилметана от их концентрации в омывающих растворах (С, мкМ)

Вид активности	ЛХТА-1975			ЛХТА-2701		
	ДОФС : ДОФЭ (50 : 50 мол%)	ДФФХ	ПОФХ	ДОФС : ДОФЭ (50 : 50 мол%)	ДФФХ	ПОФХ
Отсутствие активности	< 15	< 315	< 200	< 8	< 55	< 30
Ион-проницаемые поры	–	–	–	8 – 25	55 – 135	30 – 130
Детергентное действие	> 15	> 315	> 200	> 25	> 135	> 130

Примечание: погрешность в измерении концентрации составляет не более 10%.

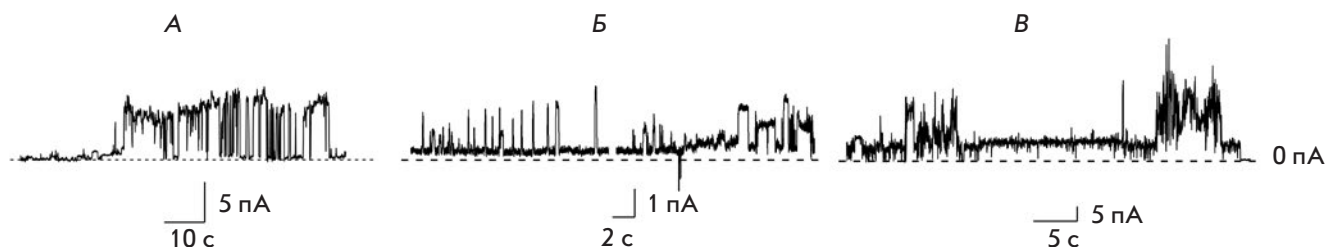


Рис. 2. Записи флуктуаций трансмембранных токов, соответствующие открыванию/закрыванию индуцированных ЛХТА-2701 одиночных пор, при концентрации вещества 10 (А), 70 (Б) и 100 (В) мкМ. Мембраны сформированы из ДОФС : ДОФЭ (50 : 50 мол%) (А), ДФФХ (Б) и ПОФХ (В) и омываются 0.1 М КСl, 5 мМ НЕРЕС, рН 7.4. Трансмембранное напряжение составляет 100 мВ

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В работе изучена мембранная активность синтетических гомологов турбомицина А, ЛХТА-1975 и ЛХТА-2701. В табл. 1 представлены характеристические параметры действия тестируемых агентов на липидные бислои. Добавка ЛХТА-1975 до концентрации 15 мкМ к мембранам из эквимольной смеси ДОФС и ДОФЭ не вызывает появления видимых флуктуаций трансмембранного тока. Повышение концентрации агента вызывает нарушение стабильности бислоя и последующее его разрушение. Добавка ЛХТА-2701 до концентрации 8 мкМ не влияет на ионную проницаемость отрицательно заряженных мембран. Введение ЛХТА-2701 до концентрации 8–25 мкМ в раствор *цис*-отделения камеры вызывает рост проводимости мембраны, обусловленной образованием ион-проницаемых пор. На рис. 2А приведены примеры записей ступенеобразных флуктуаций тока, протекающего через ДОФС : ДОФЭ (50 : 50 мол%)–мембраны в присутствии ЛХТА-2701. Из рис. 2А видно, что поры характеризуются различной проводимостью. Проводимость пор варьирует от 5 до 100 пСм, а их время жизни – от 0.1 до 5 с. Дальнейшее повышение концентрации ЛХТА-2701 приводит к дезинтеграции липидного бислоя.

В отличие от отрицательно заряженных мембран, включающих ДОФС, тестируемые вещества проявляют детергентное действие в отношении бис-

лоев из нейтральных липидов, ДФФХ или ПОФХ, при на порядок более высоких концентрациях (табл. 1). Повышение концентрации ЛХТА-1975 и ЛХТА-2701 до 200 и 130 мкМ соответственно приводит к нарушению стабильности незаряженных мембран и их разрушению. ЛХТА-2701 в концентрации 30–130 мкМ также характеризуется прообразующей способностью. Записи флуктуаций тока, соответствующих открыванию и закрыванию индуцированных этим веществом трансмембранных пор в ДФФХ- или ПОФХ-бислоях, представлены на рис. 2Б,В.

Полученные результаты позволяют заключить, что тестируемые вещества по-разному действуют на модельные липидные мембраны: оба агента обладают детергентной активностью, в то время как ЛХТА-2701 также способен индуцировать трансмембранные поры. Следует отметить, что тип мембранной активности этих веществ не зависит от состава мембраны. Пороговая концентрация, при которой проявляется разрушительное действие тестируемых агентов, определяется поверхностным зарядом бислоя. Возможной причиной этого может быть положительный заряд тестируемых соединений, что способствует их сорбции на отрицательно заряженных мембранах из ДОФС и ДОФЭ. Кроме того, мембранная активность тестируемых производных практически не зависит от формы мембра-

нообразующих липидов. Активность тестируемых веществ в отношении мембран из конусообразных молекул ДФФХ и цилиндрических молекул ПОФХ [10, 11] проявляется при близких концентрациях. Пороговая концентрация, вызывающая увеличение ионной проницаемости липидного бислоя, зависит также от вида агента. ЛХТА-2701 более эффективно, чем ЛХТА-1975, действует как на отрицательно заряженные, так и на нейтральные мембраны.

Наибольшей электростабильностью в отсутствие каких-либо модификаторов обладают плоские липидные бислои из ДФФХ. Пороговое значение трансмембранного напряжения ( $V_{bd}$ ), которое вызывает разрушение ДФФХ мембран, составляет  $450 \pm 30$  мВ. Введение ЛХТА-1975 или ЛХТА-2701 до концентрации 100 мкМ приводит к падению  $V_{bd}$  до  $310 \pm 30$  мВ и  $370 \pm 30$  мВ. Это свидетельствует о снижении электрической стабильности мембраны в присутствии этих веществ. Полученные результаты указывают на разупорядочивающее действие тестируемых агентов на липиды в бислое.

Выдвинутое предположение независимо подтверждают результаты изучения влияния алкалоидов на мембранную активность ЛХТА-1975 или ЛХТА-2701. Комплексные исследования с применением методов дифференциальной сканирующей микрокалориметрии, рентгеновской дифракции, флуоресцентной зондовой спектроскопии и ЯМР показали значительное влияние капсаицина – алкалоида перца чили, на фазовые превращения мембранных липидов [12, 13]. Капсаицин существенно снижает температуру и кооперативность плавления димиристоилфосфохолина [14] и дипальмитоилфосфохолина [12]. При относительно высоких концентрациях алкалоида на термограмме наблюдается выраженная деконволюция пика, соответствующего главному фазовому переходу, что говорит о существовании нескольких смешанных алкалоид-липидных фаз. Более того, капсаицин усиливает способность фосфоэтаноламина формировать неламеллярные инвертированные гексагональные фазы. Предполагается, что адсорбция капсаицина увеличивает отрицательную спонтанную кривизну липидных монослоев [12, 15]. В мембранах из пальмитоолеилфосфохолина капсаицин локализуется между липид-водной интерфазой и плоскостью, соответствующей положению двойной связи в ненасыщенной ацильной цепи липида [13]. Обнаружено, что снижение жесткости мембраны в присутствии капсаицина ответственно за модулирование ионных токов, индуцированных антибиотиком грамицидином А [16, 17]. На основании приведенных данных о разупорядочивающем действии капсаицина можно было ожидать увеличения детергентного действия тестируемых производных

в его присутствии. Действительно, введение 0.4 мМ капсаицина в растворы, омывающие ДОФС : ДОФЭ (50 : 50 мол%)–мембраны, модифицированные ЛХТА-1975 или ЛХТА-2701, приводит к 20–30% снижению концентрации веществ, вызывающей дестабилизацию бислоя.

Взаимодействие другого растительного алкалоида, кофеина, с молекулами воды, связанными с соседними липидами, приводит к локальному увеличению гидратации, росту толщины мембраны и уменьшению ее текучести [18]. Эти результаты согласуются с данными калориметрии и молекулярной динамики, согласно которым кофеин значительно компенсирует разобщающий эффект местного анестетика тетракаина [19]. Аналогичный эффект отсутствует в случае ЛХТА-1975 или ЛХТА-2701. Неспецифическое взаимодействие кофеина с ДОФС : ДОФЭ (50 : 50 мол%)–бислоями практически не влияет на мембранную активность тестируемых веществ. Невозможность компенсации кофеином разобщающего действия ЛХТА-1975 или ЛХТА-2701 может указывать на существенное различие в локализации этих веществ и кофеина в мембране. По данным [18, 20] молекулы ксантина располагаются на границе между областями, занимаемыми липидными «головками» и «хвостами». По всей вероятности, благодаря алкильным заместителям молекулы ЛХТА способны погружаться в гидрофобную область мембраны, что приводит к росту латерального давления в этом регионе и его экспансии. Близость расположения в мембране тестируемых антибактериальных агентов и капсаицина может объяснить синергизм их разупорядочивающего действия.

На *рис. 3* представлены термограммы липосом из ДПФХ в отсутствие (контроль, *черные линии*) и в присутствии ЛХТА-1975 или ЛХТА-2701 в суспензии при молярном соотношении липид : агент = 10 : 1 (*красные линии*) и 5 : 1 (*синие линии*). В отсутствие производных ЛХТА температура предперехода,  $T_p$ , составляет  $32.6^\circ\text{C}$ , температура главного фазового перехода,  $T_m$ , равна  $41.2^\circ\text{C}$ , ширина пика на полувысоте, характеризующая кооперативность перехода ДПФХ из геля в жидкое состояние,  $T_{1/2}$ , составляет не более  $0.6^\circ\text{C}$ . Оба тестируемых агента существенно влияют на процесс плавления ДПФХ. В обоих случаях элиминируется предпереход. В *табл. 2* приведены величины  $T_m$  и  $T_{1/2}$  при используемых соотношениях липид : агент. Следует отметить деконволюцию пика, соответствующего главному фазовому переходу ДПФХ, выраженность которой зависит от соотношения липид : агент (*рис. 3*). На *рис. 4* представлен результат разложения пика, соответствующего главному фазовому переходу ДПФХ в присутствии тестируемых агентов, на от-

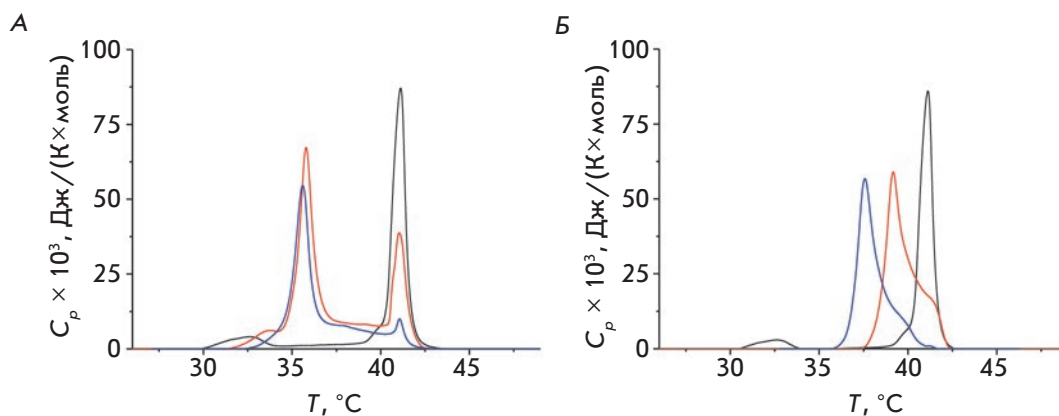


Рис. 3. Термограммы плавления ДПФХ в отсутствие (контроль, черная линия) и в присутствии ЛХТА-1975 (А) и ЛХТА-2701 (Б). Соотношение липид : вещество составляет 10 : 1 (красные линии) и 5 : 1 (синие линии)

дельные составляющие. Присутствие нескольких пиков свидетельствует о сосуществовании различных фаз. Пик под номером 1 на термограммах (рис. 4А–Г) может быть ассоциирован с плавлением чистого ДПФХ, а два других – с наличием различных фаз, включающих как ДПФХ, так и ЛХТА (пик 2 и(или) 3 на рис. 4А–Г). Падение температуры и кооперативности перехода ДПФХ в присутствии тестируемых веществ может быть связано с их погружением в гидрофобную область бислоя, что приводит к увеличению площади, приходящейся на одну липидную молекулу, а следовательно, к относительному росту подвижности ацильных хвостов липидов. Полученные результаты также показывают, что с увеличением концентрации ЛХТА-1975 и ЛХТА-2701 происходит уменьшение изменения энтальпии главного фазового перехода ( $\Delta H$ ): при увеличении концентрации в 2 раза  $\Delta H$  падает примерно на 10%. Уменьшение  $\Delta H$  может быть связано с переходом части липида в немеллярную фазу [21–23]. В частности, появление выраженного пика при 34°C после введения ЛХТА-1975 во всех используемых концентрациях может свидетельствовать о существенном изменении распределения латерального давления в мембране и формировании в присутствии этого агента небислойных липидных образований (пик 4 на рис. 4А,Б).

Изучено также действие антибактериальных веществ на граничный потенциал плоских липидных бислоев из ДОФС : ДОФЭ (50 : 50 мол%). ЛХТА-1975 или ЛХТА-2701 не влияют на стационарный трансмембранный ток, индуцированный комплексом ионофора нонактина с ионом калия ( $\Delta\varphi_d = 1 \pm 1$  мВ). Это указывает на неизменность распределения электрического потенциала на границе раздела мембрана / водный раствор при адсорбции тестируемых соединений.

С использованием конфокальной микроскопии изучены везикулы из ПОФХ до и после введения в суспензию производных ЛХТА. Добавка к ПОФХ-липосомам ЛХТА-1975 или ЛХТА-2701 в моляр-

Таблица 2. Характеристические параметры термограмм плавления ДПФХ в отсутствие и в присутствии производных трииндолилметана

Экспериментальная система	Соотношение липид:агент	№ пика	$T_m^*$ , °C	$T_{1/2}^*$ , °C	$\Delta H$ , ккал/мол
Контроль	–	1	41.2	0.6	13.3
ЛХТА-1975	10 : 1	1	41.0	0.9	12.3
		2	38.7		
		3	35.8		
		4	33.7		
	5 : 1	1	41.0	0.9	11.2
		2	37.8		
		3	35.5		
		4	34.4		
ЛХТА-2701	10 : 1	1	41.1	2.4	10.6
		2	39.1		
	5 : 1	1	41.2	1.8	9.6
		2	39.1		
		3	37.6		
		4	35.5		

Примечание.  $T_m$  – температура локального максимума удельной теплоемкости;  $T_{1/2}$  – полуширина основного пика;  $\Delta H$  – изменение энтальпии при фазовом переходе.

ном соотношении липид : агент = 10 : 1 не приводит к изменению сферической формы липидных везикул. Неизменность среднего диаметра липосом до ( $15 \pm 6$  мкм) и после введения ( $15 \pm 7$  мкм) показывает, что тестируемые агенты не вызывают заметно слияния или деления липидных везикул.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что механизмы действия тестируемых соединений на модельные липидные мембраны различны: ЛХТА-1975 обладает детергентными свойствами, а ЛХТА-2701 характеризуется



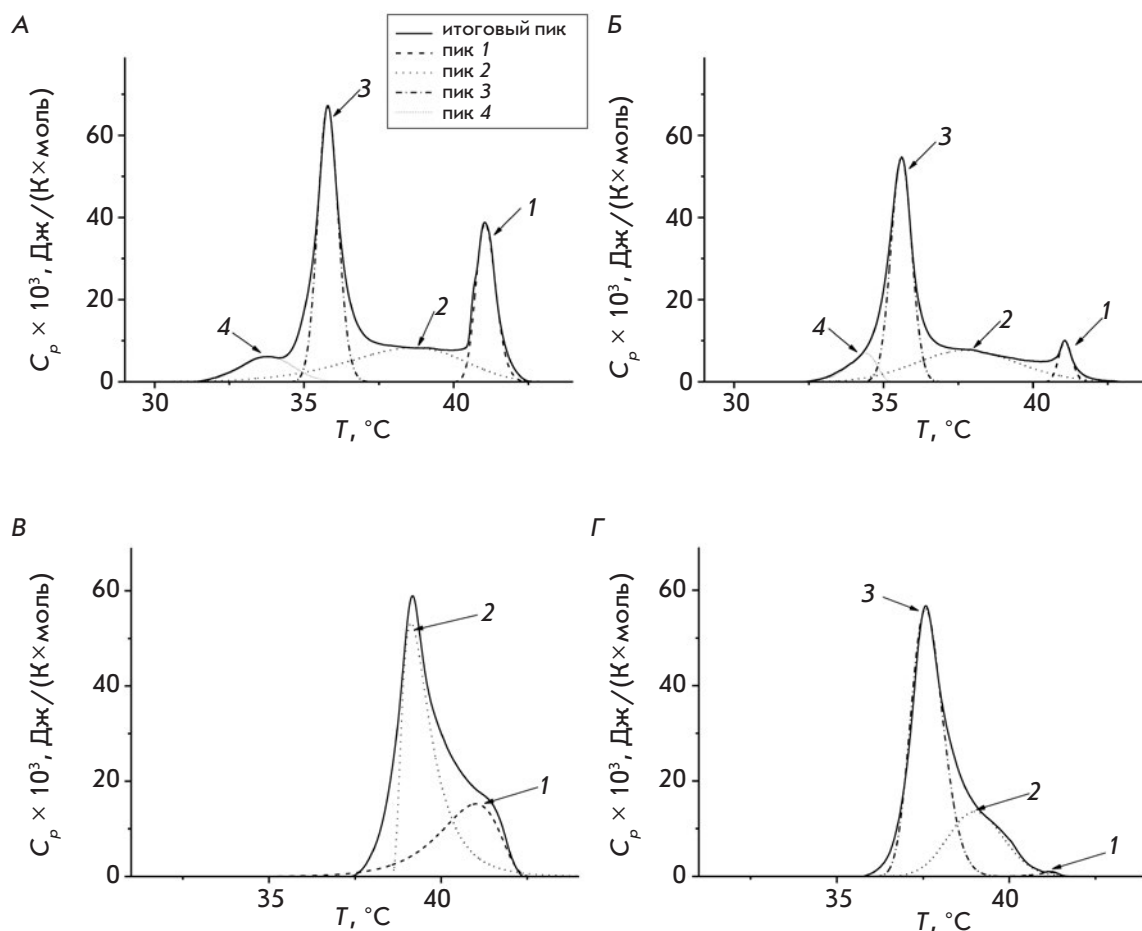


Рис. 4. Разложение пиков, соответствующих главному фазовому переходу ДПФХ, на отдельные составляющие в присутствии ЛХТА-1975 (А, Б) и ЛХТА-2701 (В, Г). Соотношение липид : вещество составляет 10 : 1 (А, В) и 5 : 1 (Б, Г). Параметры пиков представлены в табл. 2

не только также детергентной активностью, но способен индуцировать поры в фосфолипидных мембранах. Различие механизмов действия определяется особенностями их строения: в молекуле ЛХТА-1975 все три заместителя при атомах азота индольных циклов одинаковы и представляют собой *n*-алкильные группы (пентильные), а ЛХТА-2701 содержит наряду с двумя алкильными заместителями (*n*-пропильными) малеинимидный цикл. Полученные результаты помогают понять механизм действия новых антибактериальных агентов, проясняют различия в селективности действия веществ на микроорганизмы и цитотоксичности для клеток человека,

а также позволяют использовать модельные мембраны в дальнейшем изучении направлений модификации и совершенствовании структуры новых антибактериальных средств. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований № 18-34-20047 (исследование воздействия на мембраны) и Российского научного фонда № 16-15-10300 (дизайн и синтез тестируемых веществ). С.С. Ефимова отмечена именной стипендией Президента РФ (СП-484.2018.4).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Palchaudhuri R., Nesterenko V., Hergenrother P.J. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. № 31. P. 10274–10281.
2. Budzikiwicz H., Eckau H., Ehrenberg M. // *Tetrahedron Lett.* 1972. V. 36. P. 3807.
3. Lavrenov S.N., Luzikov Y.N., Bykov E.E., Reznikova M.I., Stepanova E.V., Glazunova V.A., Volodina Y.L., Tatarsky V.V., Shtil A.A., Preobrazhenskaya M.N. // *Bioorg. Med. Chem.* 2010. V. 18. № 18. P. 6905–6913.
4. Stepanova E.V., Shtil' A.A., Lavrenov S.N., Bukhman V.M., Inshakov A.N., Mirchink E.P., Trenin A.S., Preobrazhenskaya M.N. // *Russ. Chem. Bull.* 2010. V. 59. № 12. P. 2259–2267.
5. Исакова Е.Б., Трещалин И.Д., Бодягин Д.А., Лавренев С.Н., Преображенская М.Н., Переверзева Э.Р. // *Рос. биотерапевт. журн.* 2012. V. 11. № 2. P. 22.
6. Соломко Э.Ш., Лавренев С.Н., Иншаков А.Н., Абрамов М.Е., Преображенская М.Н., Степанова Е.В. // *Саркомы костей, мягких тканей и опухоли кожи.* 2012. № 3. P. 48–53.
7. Лавренев С.Н., Симонов А.Ю., Панов А.А., Лакатош С.А., Исакова Е.Б., Цвигун Е.А., Бычкова О.П., Татарский

- В.В., Иванова Е.С., Мирчинк Е.П., Королев А.М., Тренин А.С. // Антибиотики и химиотерапия. 2018. V. 63. № 7–8. P. 3–9.
8. Montal M., Mueller P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1972. V. 69. № 12. P. 3561–3566.
9. Efimova S.S., Ostroumova O.S. // Acta Naturae. 2017. V. 9. № 2. P. 67–74.
10. Bezrukov S.M. // Curr. Opin. Colloid. Interface Sci. 2000. V. 5. P. 237–243.
11. Sakuma Y., Taniguchi T., Imai M. // Biophys. J. 2010. V. 99. P. 472–479.
12. Aranda F.J., Villalaín J., Gómez-Fernández J.C. // Biochim. Biophys. Acta. 1995. V. 1234. № 2. P. 225–234.
13. Torrecillas A., Schneider M., Fernández-Martínez A.M., Ausili A., de Godos A.M., Corbalán-García S., Gómez-Fernández J.C. // ACS Chem. Neurosci. 2015. V. 6. № 10. P. 1741–1750.
14. Swain J., Kumar Mishra A. // J. Phys. Chem. B. 2015. V. 119. № 36. P. 12086–12093.
15. Ingólfsson H.I., Andersen O.S. // Assay Drug Dev. Technol. 2010. V. 8. № 4. P. 427–436.
16. Lundbaek J.A., Birn P., Tape S.E., Toombes G.E., Søgaard R., Koeppe R.E., Gruner S.M., Hansen A.J., Andersen O.S. // Mol. Pharmacol. 2005. V. 68. № 3. P. 680–689.
17. Søgaard R., Werge T.M., Bertelsen C., Lundbye C., Madsen K.L., Nielsen C.H., Lundbaek J.A. // Biochem. 2006. V. 45. № 43. P. 13118–13129.
18. Khondker A., Dhaliwal A., Alsop R.J., Tang J., Backholm M., Shi A.C., Rheinstädter M.C. // Phys. Chem. Chem. Phys. 2017. V. 19. № 10. P. 7101–7111.
19. Sierra-Valdez F.J., Forero-Quintero L.S., Zapata-Morin P.A., Costas M., Chavez-Reyes A., Ruiz-Suárez J.C. // PLoS One. 2013. V. 8. № 4. P. e59364.
20. Palonciová M., Berka K., Otyepka M. // J. Phys. Chem. B. 2013. V. 117. № 8. P. 2403–2410.
21. Maruyama S., Hata T., Matsuki H., Kneshina S. // Biochim. Biophys. Acta. 1997. V. 1325. P. 272–280.
22. Hata T., Matsuki H., Kaneshina S. // Biophys. Chem. 2000. V. 87. P. 25–36.
23. Takeda K., Okuno H., Hata T., Nishimoto M., Matsuki H., Kaneshina S. // Colloids Surf. B Biointerf. 2009. V. 72. P. 135–140.

УДК 571.27:578.245:578.74

# Влияние липополисахарида из *Rhodobacter capsulatus* PG на развитие воспаления, вызванного различными штаммами вируса гриппа

С. В. Зубова<sup>1\*</sup>, М. Ф. Ворович<sup>2,3</sup>, А. С. Гамбарян<sup>2</sup>, А. А. Ишмухаметов<sup>2,3</sup>, С. В. Грачев<sup>1,3</sup>, И. Р. Прохоренко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Институт фундаментальных проблем биологии РАН, ФИЦ ПНЦБИ РАН, 142290, Московская обл., Пущино, просп. Науки, 3

<sup>2</sup>Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, 142782, Московская обл., пос. Института полиомиелита, Киевское ш., 27-й км, домовладение 8, стр. 1

<sup>3</sup>Первый московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, 119811, Москва, ул. Трубецкая, 8

\*E-mail: zusvet@rambler.ru

Поступила в редакцию 05.12.2018

Принята к печати 15.05.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-46-55

**РЕФЕРАТ** Исследованы особенности развития воспалительных процессов у мышей, инфицированных двумя разными штаммами вируса гриппа: A/chicken/Kurgan/5/2005 (H5N1) и A/Hamburg/2009 MA (H1N1). Оценено влияние нетоксичного липополисахарида *Rhodobacter capsulatus* PG на выживаемость и изменение массы тела мышей, продукцию антител IgG и индукцию про- и противовоспалительных цитокинов в сыворотке крови. Показано, что липополисахарид *R. capsulatus* PG индуцирует синтез интерферона- $\beta$  как при самостоятельном введении, так и на фоне заражения вирусом гриппа А, а также способствует образованию противовирусных антител в крови инфицированных гриппом животных.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** вирус гриппа, H5N1, H1N1, липополисахарид *Rhodobacter capsulatus* PG, мыши, противовирусные антитела, цитокины.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** DAMP – молекулярные структуры, связанные с повреждением; HA – гемагглютинин; HMGB1 – белок амфотерин; IFN – интерферон; Ig – иммуноглобулин; IL – интерлейкин; MD-2 – белок миелоидной дифференцировки 2; MDCK – клетки почки собаки; MyD88 – белок миелоидной дифференцировки; NP – нуклеопротеин; PA, PB1 – белки полимеразного комплекса; TLR – Toll-подобный рецептор; TNF – фактор некроза опухоли; ИФА – иммуноферментный анализ; ЛПС – липополисахарид.

## ВВЕДЕНИЕ

Эпидемии гриппа продолжают охватывать миллионы людей в мире, несмотря на использование рекомендуемых вакцин, эффективность которых оказывается ниже прогнозируемой [1, 2]. Вирусы гриппа А обладают высокой степенью изменчивости генома и продуцируют резистентные штаммы, которые некоторое время контролируются вакцинами или антивирусными препаратами общеукрепляющего действия. Разработка безопасных и эффективных вакцин остается важной проблемой здравоохранения.

Взаимодействие вирусных компонентов с различными рецепторами активирует внутриклеточ-

ные пути, ответственные за секрецию IFN типа I, провоспалительных цитокинов и хемокинов. Ключевыми факторами, вовлеченными в распознавание вирусных лигандов, являются Toll-подобные рецепторы (TLR) клеток врожденного иммунитета. Локализованные на поверхности клеток TLR2 и TLR4 обнаруживают глико-/липопротеины оболочки вирусов, а внутриклеточные и эндосомальные TLR3, TLR7, TLR8 и TLR9 – нуклеиновые кислоты [3, 4]. Toll-подобные рецепторы могут взаимодействовать с другими рецепторами, стимулируя ответ клеток врожденного иммунитета на патогены, включая вирусы гриппа [4]. TLR4 может активироваться

DAMP (damage-associated molecular patterns), молекулярными структурами, высвобождаемыми из зараженных вирусом клеток [5]. Показано, что разные штаммы гриппа активируют клетки с использованием различных механизмов, что приводит к синтезу различных цитокинов и хемокинов [6, 7].

На мышах линии C57BL/6J показано, что соединение E5564 (Эриторан), синтетический аналог нетоксичного липида А из *Rhodobacter sphaeroides*, при определенной схеме введения защищает мышей от смерти, вызываемой вирусом гриппа H1N1, адаптированным к мышам [8]. Известно, что ядерный негистоновый белок HMGB1 (High Mobility Group Box1, или амфотерин), представляющий собой DAMP, высвобождается сравнительно поздно после начала инфекции и участвует в развитии как граммотрицательного сепсиса, так и осложнений при гриппе, взаимодействуя с MD-2 и активируя TLR4 [5, 9, 10]. Активация TLR4 приводит к цитокиновому шторму с огромным выбросом провоспалительных цитокинов, включая интерфероны, факторы некроза опухолей, интерлейкины и хемокины [11]. Фармакологическая блокада TLR4 Эритораном значительно снижает смертность мышей от птичьего гриппа [8]. Липополисахарид (ЛПС) из штамма фототрофной бактерии *R. capsulatus* PG (*Rb.*) [12], структура липида А которого аналогична структуре липида А *R. sphaeroides*, является антагонистом эндотоксинов и подавляет активацию синтеза широкого спектра провоспалительных цитокинов клетками крови человека [13], что указывает на его способность блокировать TLR4.

Мыши являются основным инструментом для изучения иммунной системы и иммунных ответов человека. Однако существуют значительные различия между врожденной и адаптивной иммунной системами мыши и человека, которые отличаются соотношением клеток крови, составом плазмы, поверхностными рецепторами, уровнем экспрессии различных цитокинов и хемокинов и т.д. [14, 15]. Это следует учитывать при использовании мышей в качестве моделей болезней человека.

В настоящей работе изучено влияние нетоксичного ЛПС *Rb.* на индукцию про- и противовоспалительных цитокинов, а также на выживаемость мышей при заражении животных различными штаммами вируса гриппа А. Данное исследование направлено на изучение особенностей развития воспалительных процессов, вызванных вирусами гриппа H1N1 и H5N1.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы наборы для ИФА: Mouse TNF alpha Platinum ELISA, Mouse IL-6 Platinum ELISA, Mouse IL-10 Platinum ELISA, Mouse INF gamma

Platinum ELISA (eBioscience, США), Mouse IFN beta ELISA Kit (PBL Assay Science, США).

ЛПС *Rb.* получен в лаборатории ИФПБ РАН согласно методике, описанной ранее [16].

### Вирусы

В работе использовали штаммы вируса гриппа А: chicken/Kurgan/5/2005 (H5N1) и Hamburg/2009 MA (H1N1), адаптированный к мышам. Вирусы культивировали в куриных эмбрионах. 50% инфекционную дозу вируса (TCID<sub>50</sub>) определяли титрованием в культуре клеток MDCK (Madin-Darby Canine Kidney). 50% летальную дозу (LD<sub>50</sub>) определяли путем титрования на мышах. Эксперименты с высокопатогенным вирусом A/chicken/Kurgan/5/2005 проводили в боксах с уровнем безопасности BSL-3.

### Мыши

В работе использовали мышей Balb/c массой 10–14 г возрастом 36–38 дней без различия пола. Животные получены из питомника ФГБУН Научный центр биомедицинских технологий ФМБА. Все манипуляции с животными проводили согласно Правилам лабораторной практики в Российской Федерации [17] с соблюдением биологической этики при проведении экспериментов на лабораторных животных.

### Экспериментальная гриппозная инфекция у мышей, зараженных штаммом H5N1 вируса гриппа

Мыши были разделены на шесть групп в зависимости от получаемых препаратов. Каждая группа включала не менее 12 животных. Животные пяти групп были заражены интраназально (по 50 мкл) под легким эфирным наркозом высокопатогенным вирусом гриппа птиц H5N1 в дозах от 10 до 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> на мышь, что составляло от 10<sup>-1</sup> до 10<sup>3</sup> LD<sub>50</sub>. Шестая контрольная группа оставалась незараженной. Через 24 ч все группы делили пополам. Одной половине животных ежедневно в течение последующих 4 сут вводили внутривенно физраствор по 500 мкл/мышь, другой – ЛПС *Rb.* по 400 мкг/500 мкл/мышь. Контролем служили мыши, которым не вводили никаких агентов. Схема эксперимента представлена на рис. 1. У выживших к концу эксперимента животных (14-й день) после эвтаназии в CO<sub>2</sub>-камере отбирали кровь, клетки крови осаждали, полученную сыворотку замораживали при -20°C до определения в ней титра антител к вирусу гриппа H5N1 методом ИФА.

### Экспериментальная гриппозная инфекция у мышей, зараженных адаптированным к мышам штаммом H1N1 вируса гриппа

Использованный в работе пандемический вирус H1N1, адаптированный к мышам, был проведен че-



рез 20 пассажей в легких мышей и отличался от родительского штамма A/Hamburg/2009 (H1N1) делецией в нейраминидазе (NA) и мутациями в белках HA, NP, PA и PB1 (таблица). Вирус гриппа H1N1 обладает в  $10^5$  раз большей патогенностью для мышей, чем исходный родительский штамм.

Мышей делили на три группы в зависимости от получаемых препаратов. Каждая группа включала не менее 12 животных. Две группы мышей были заражены интраназально (по 50 мкл) под легким эфирным наркозом вирусом гриппа H1N1, адаптированным к мышам, в дозах 10 и 300 TCID<sub>50</sub> на мышь. Контрольная группа включала незараженных мышей. Через 2 сут после заражения все группы делили пополам. Одной половине ежедневно в течение последующих 4 сут вводили внутривенно физраствор по 500 мкл/мышь, другой – ЛПС Rb. по 400 мкг/500 мкл/мышь. Контролем служили мыши, которым не вводили никаких агентов. Схема эксперимента представлена на рис. 2. Через 5 ч после введения ЛПС Rb. у трех мышей каждой группы на 3, 4 и 5 день проводили забор крови после эвтаназии в CO<sub>2</sub>-камере. Кровь центрифугировали, полученную сыворотку замораживали при -20°C до определения содержания цитокинов методом ИФА. У выживших к концу эксперимента (12-й день) животных после эвтаназии в CO<sub>2</sub>-камере отбирали кровь, клетки крови осаждали, сыворотку замораживали при -20°C до определения уровня IgG1 и IgG2a антител к вирусу гриппа H1N1 методом ИФА.

#### Определение содержания цитокинов

Содержание цитокинов TNF-α, IL-6, IL-10, IFN-γ и IFN-β в образцах сывороток крови мышей, зараженных вирусом гриппа H1N1, определяли с помощью наборов для ИФА по методике, рекомендованной производителем. Оптическую плотность образцов измеряли с помощью иммуноферментного анализатора STAT FAX 3200 (Awareness, США) при длине волны 450 нм.

#### Определение содержания антител к вирусу гриппа

Для определения уровня антител на гемагглютинин (HA) вирусов гриппа H5N1 и H1N1 в сыворотке мышей в планшет (Nunc, MaxiSorp, США), сенсibilизированный фетуином, добавляли аллантоисную жидкость, содержащую 64 единицы HA одного из вирусов, выдерживали в течение ночи при 40°C, отмывали фосфатно-солевым буфером (ФСБ) pH 7.4 с 0.1% Твин-20 и блокировали буфером А (0.1% Твин-20, 0.2% БСА в ФСБ) в течение 1 ч. Для определения антител IgG1 и IgG2a каждую сыворотку титровали на двух разных планшетах. Блокирующий раствор удаляли, в лунки вносили

по 100 мкл сыворотки мышей, инфицированных H5N1, в разведениях от 1 : 40 до 1 : 2560, или H1N1 в разведениях от 1 : 50 до 1 : 3200 в буфере А. Плашки инкубировали в течение 4 ч при 40°C, отмывали ФСБ и добавляли меченные пероксидазой хрена антитела кролика против иммуноглобулинов мыши (Sigma, США), либо против IgG1 или IgG2a мыши и инкубировали при 40°C в течение 2 ч. Затем плашки отмывали ФСБ и окрашивали ортофенилендиамином. Оптическую плотность образцов измеряли с помощью анализатора иммуноферментных реакций АИФР-01 Униплан («Пикон», Россия) при длине волны 492 нм. Для исключения неспецифического связывания использовали контрольные лунки без вирусной подложки. Содержание антител в образцах выражали как разведение сыворотки, обеспечивающее сигнал, превышающий в 2 раза значение фона.

#### Статистический анализ

Для статистического анализа и графического представления данных использовали Microsoft Office Excel 2010 (плагин AtteStat) и OriginPro 7.5. Статистически значимые различия результатов оценивали с помощью непараметрического U-критерия Манна-Уитни. Различия считали значимыми при уровне значимости  $p < 0.05$ .

#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Состояние экспериментальных животных оценивали по выживаемости и изменению массы тела. Введение ЛПС Rb. мышам контрольной группы, а также заражение минимальной дозой 10 TCID<sub>50</sub> вируса H5N1, независимо от введения ЛПС Rb., не влияло на выживаемость животных до конца эксперимента (14-й день) (рис. 3). Гибель животных в группах, инфицированных дозами 10<sup>2</sup> и 10<sup>3</sup> TCID<sub>50</sub> вируса H5N1, началась на 8-е сут после заражения, в дозе 10<sup>4</sup> и 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> – на 6-е. Все мыши, получившие 10<sup>3</sup>, 10<sup>4</sup> и 10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> вируса гриппа, погибли к 10 сут после заражения независимо от введения ЛПС Rb. Дополнительное введение ЛПС Rb. мышам, инфицированным вирусом гриппа в дозе 10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>, повысило их смертность (рис. 3). Кривые изменения веса показали, что введение ЛПС Rb. здоровым животным не влияло на их состояние и вес (рис. 4). Мыши, зараженные 10–10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub> вируса, продолжали набирать вес в течение всего времени эксперимента. Инфицирование дозами 10<sup>3</sup>–10<sup>5</sup> TCID<sub>50</sub> заметно влияло на состояние животных, вызывая значительное воспаление и стремительное снижение веса. Дополнительное введение ЛПС Rb. на фоне заражения вирусом приводило к еще большему снижению веса (рис. 4).

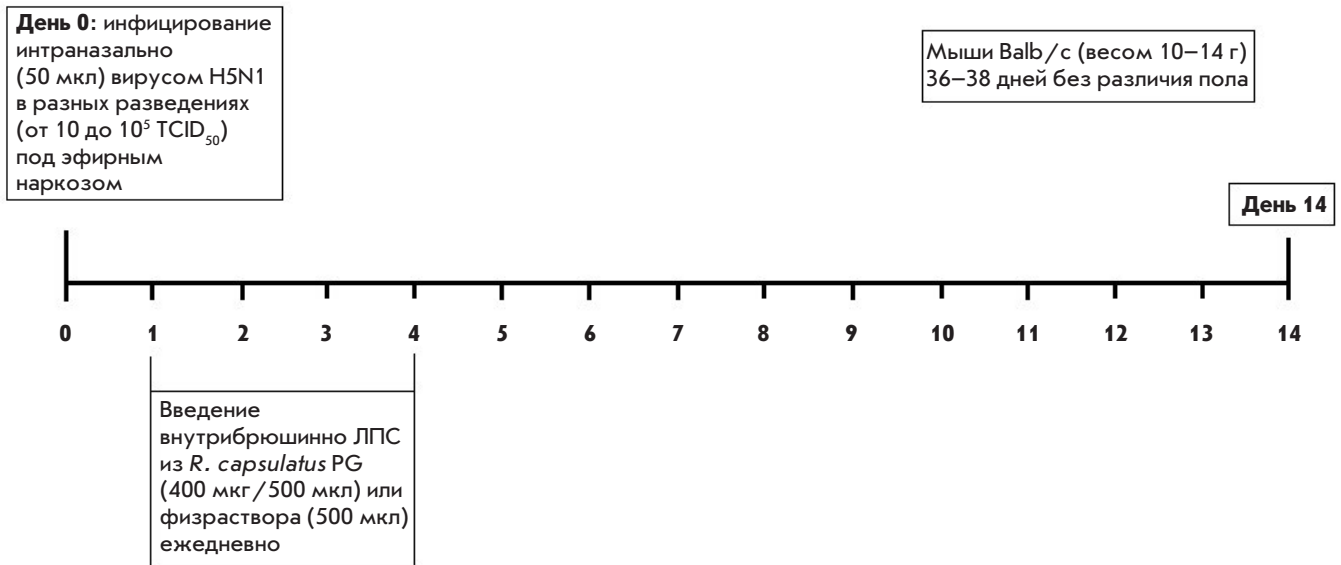


Рис. 1. Схема эксперимента по инфицированию мышей вирусом гриппа штамма A/chicken/Kurgan/5/2005 (H5N1)

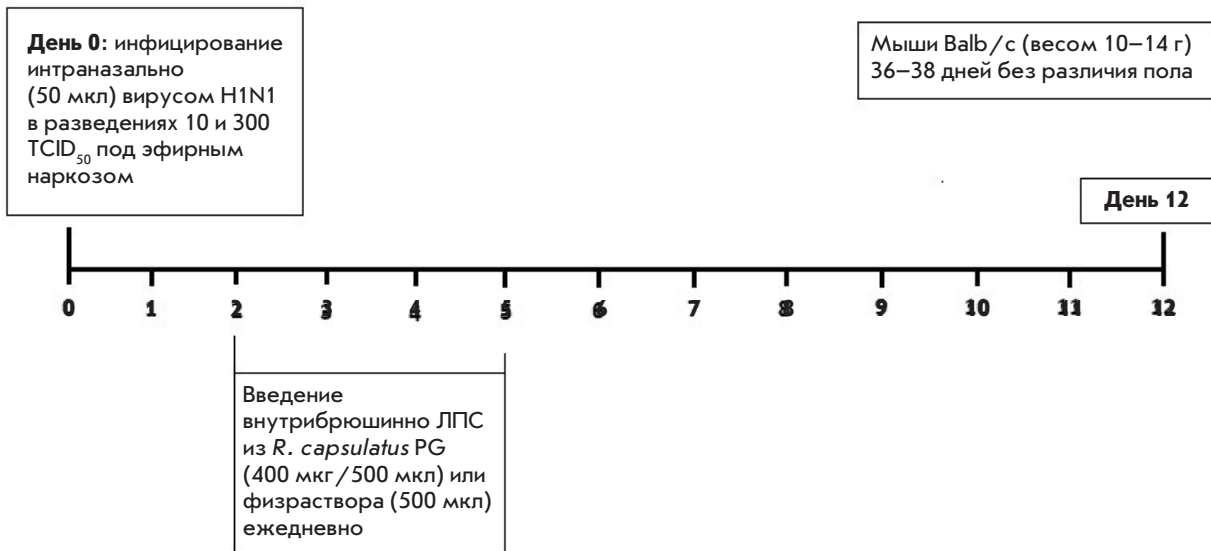


Рис. 2. Схема эксперимента по инфицированию мышей вирусом гриппа штамма A/Hamburg/2009 MA (H1N1)

Замены в вирусе A/Hamburg/2009 в процессе адаптации к мышам

Штамм вируса	Белок вируса, аминокислотная последовательность						
	NA	HA			NP	PA	PB1
	56–67	158	224	225	289	92	317
Hamburg/2009		G	R	D	H	N	M
Hamburg/2009 MA	Del 56–67	E	K	G	Y	S	V

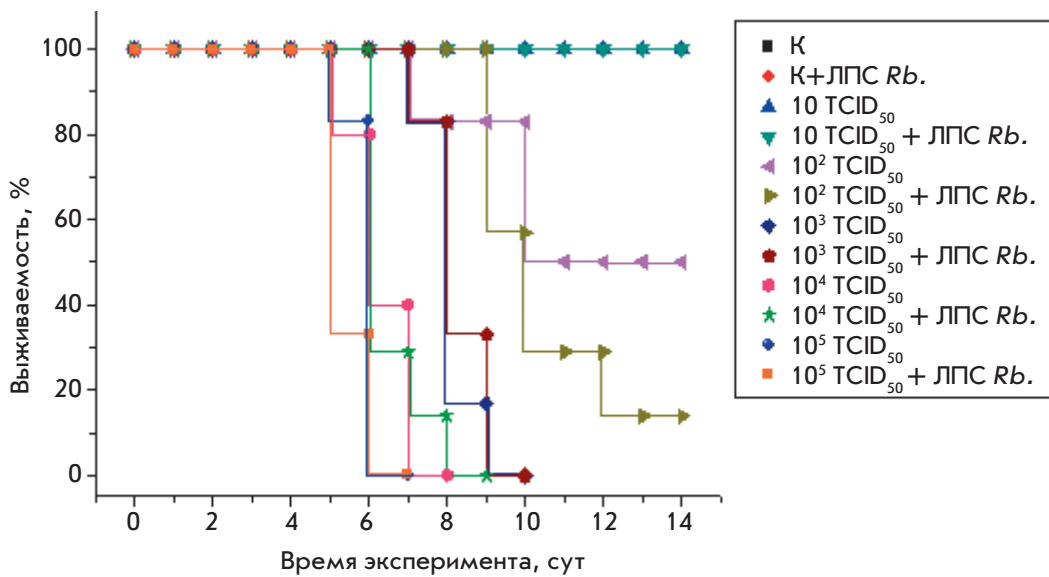


Рис. 3. Выживаемость мышей в ответ на введение ЛПС *Rb.*, вируса гриппа A/chicken/Kurgan/5/2005 (H5N1) и на их совместное действие

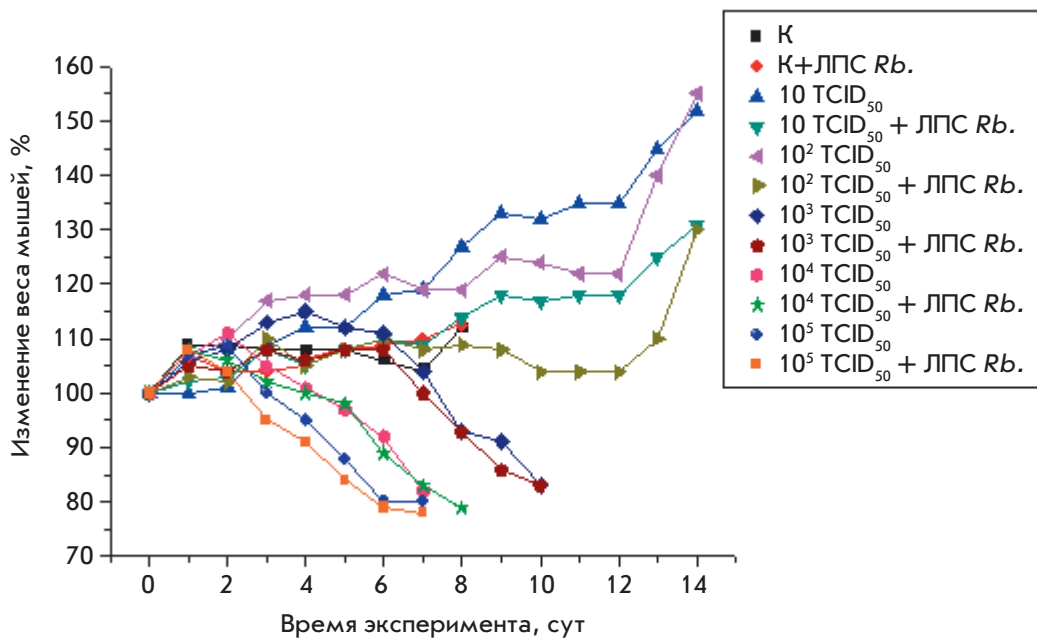


Рис. 4. Изменение веса мышей в ответ на введение ЛПС *Rb.*, вируса гриппа A/chicken/Kurgan/5/2005 (H5N1) и на их совместное действие

Введение ЛПС *Rb.* мышам контрольной группы и инфицирование дозой 10 TCID<sub>50</sub> вируса гриппа H1N1 с последующим введением ЛПС *Rb.* не влияло на выживаемость животных до конца эксперимента (12-й день). В группе мышей, зараженных вирусом гриппа в дозе 300 TCID<sub>50</sub>, к концу эксперимента выжило 14% мышей, дополнительное введение ЛПС *Rb.* увеличивало смертность мышей (рис. 5). Анализ кривых изменения веса показал, что введение ЛПС *Rb.* здоровым мышам не влияло на состояние и вес контрольных животных. Мыши, инфицированные 10 TCID<sub>50</sub> вируса H1N1, не проявляли признаков болезни и на 3-й день после инфицирования начинали быстро прибавлять в весе до окончания эксперимен-

та (12-й день). Дополнительное введение ЛПС *Rb.* животным, инфицированным вирусом в этой дозе, приводило к снижению их веса после 7-го дня эксперимента. Инфицирование вирусом (300 TCID<sub>50</sub>) заметно влияло на состояние мышей, вызывая значительное воспаление и снижение веса. Введение ЛПС *Rb.* на фоне заражения вирусом ухудшало состояние животных и приводило к дополнительному снижению веса (рис. 6).

Определение выживаемости и изменения массы животных, инфицированных вирусом гриппа H5N1 или H1N1, показало, что ЛПС *Rb.* не защищал мышей от летальной инфекции (рис. 3–6). Известно, что ежедневное (в течение 5-ти сут) внутривенное

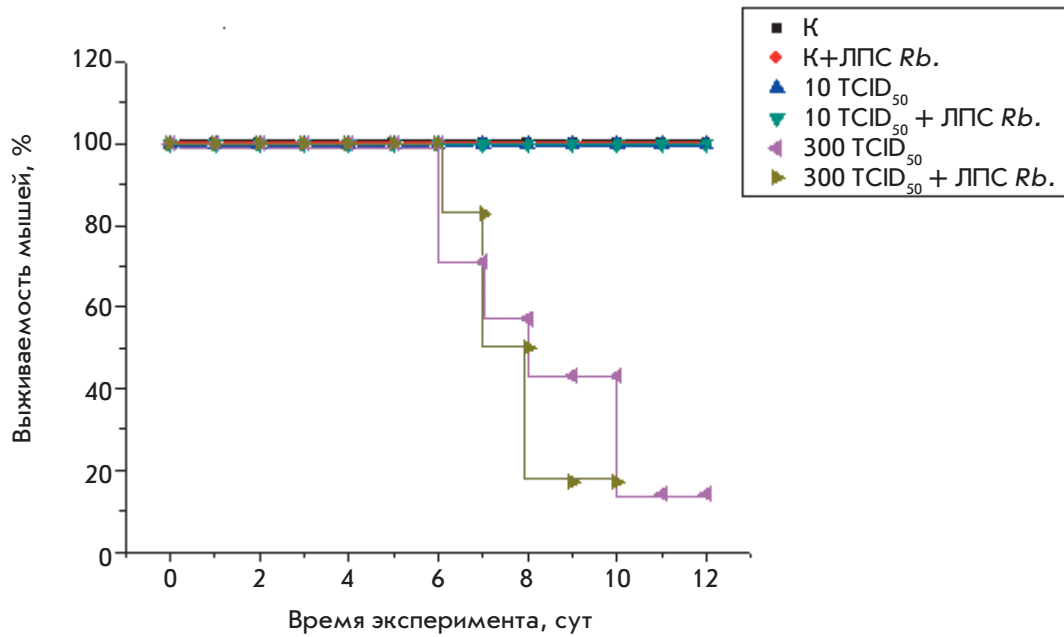


Рис. 5. Выживаемость мышей в ответ на введение ЛПС *Rb.*, вируса гриппа А/Hamburg/2009 МА (H1N1) и на их совместное действие

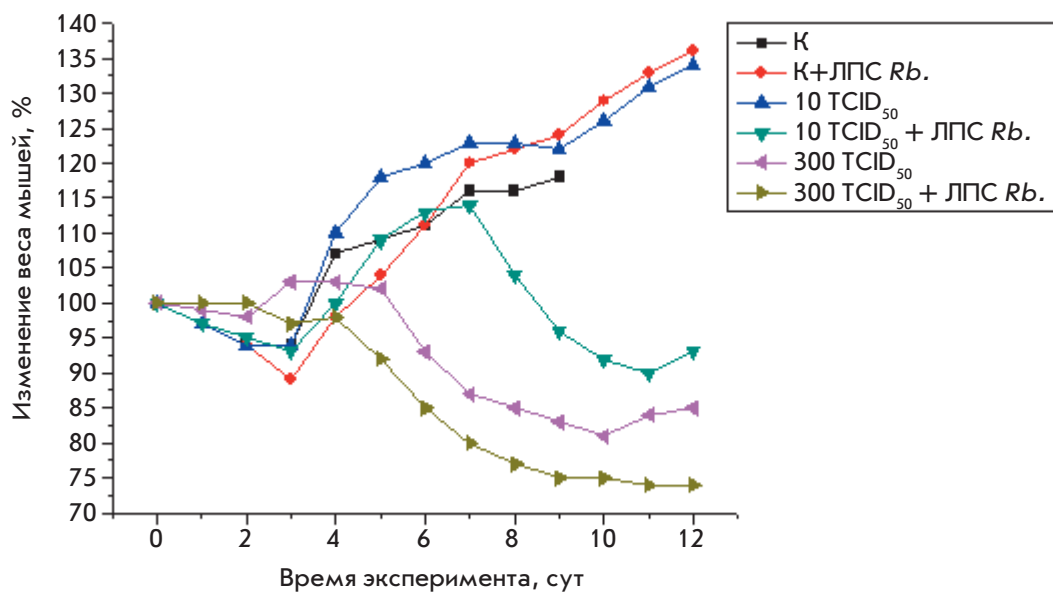


Рис. 6. Изменение веса мышей в ответ на введение ЛПС *Rb.*, вируса гриппа А/Hamburg/2009 МА (H1N1) и на их совместное действие

введение Эриторана через 2 сут после инфицирования защищало мышей от вируса гриппа А/PR/8/34 (H1N1). Показано, что защита от DAMP, высвобождаемых к этому времени из инфицированных и разрушенных вирусом гриппа клеток, происходит по TLR4-зависимому механизму [18]. Тип вируса определяет механизмы ответа врожденного иммунитета на инфекцию. Пути сигнализации при инфицировании разными штаммами вирусов H5N1 и H1N1 различаются и определяют выживание и патологию развития воспаления [7]. Очевидно, в наших экспериментах инфекция развивается по молекулярным механизмам, отличным от активации клеток по пути

TLR4. Возможно также, что использованная нами схема введения и концентрация ЛПС *Rb.* не эффективны для защиты от этих штаммов вируса.

К признакам вирусной инфекции относятся повышенная индукция провоспалительных цитокинов и хемокинов, таких, как TNF- $\alpha$ , IL-1, IL-6, IL-8 [19], а также IFN- $\beta$  и IFN- $\gamma$ , обладающих противовирусным действием [20, 21].

Введение мышам ЛПС *Rb.* вызывало к 3 дню возрастание содержания TNF- $\alpha$  в сыворотке крови в 1.5 раза по сравнению с контрольными мышами, которое сохранялось примерно на том же уровне до 5-го дня эксперимента. Следует отметить, что содержание



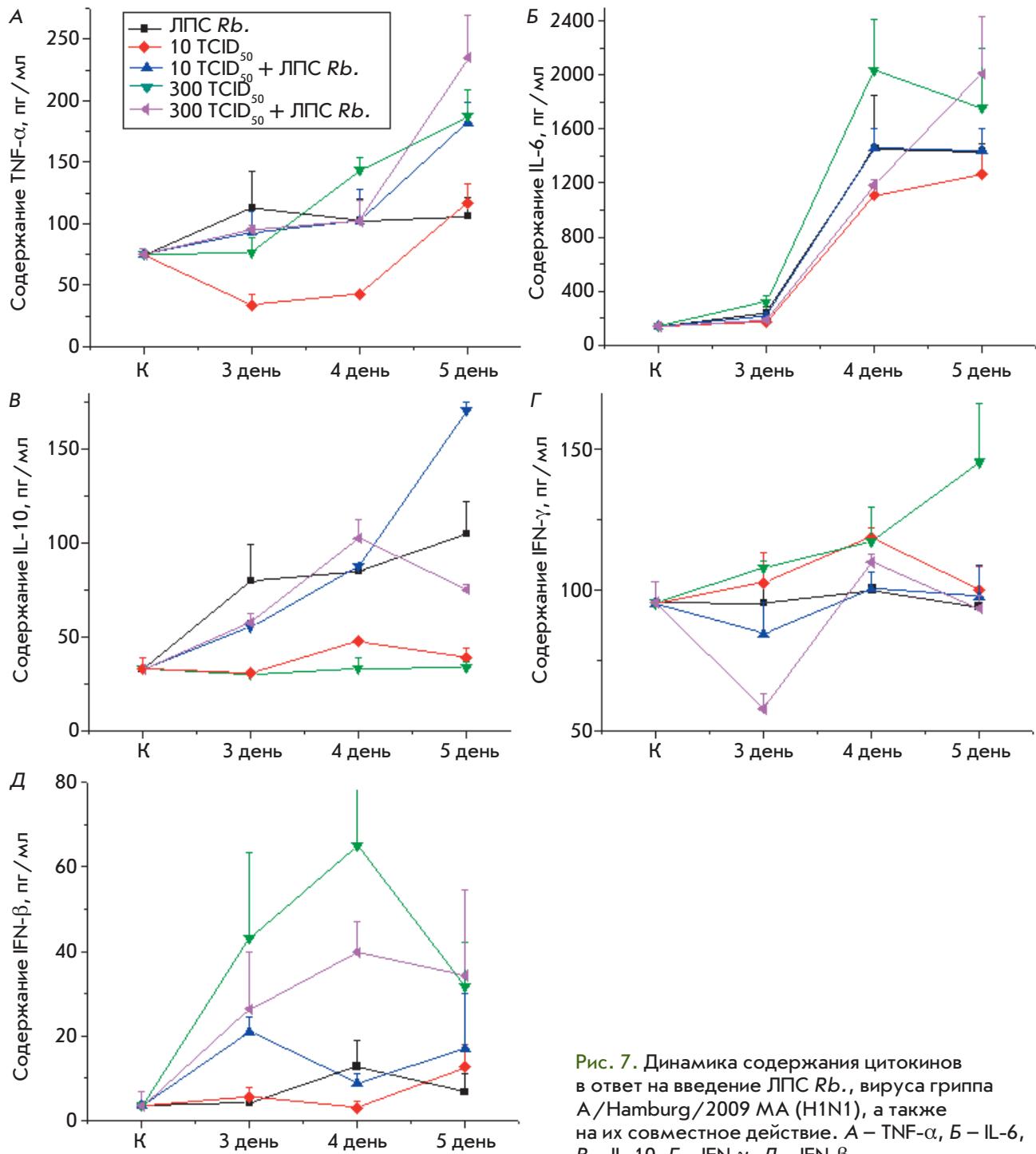


Рис. 7. Динамика содержания цитокинов в ответ на введение ЛПС *Rb.*, вируса гриппа А/Hamburg/2009 МА (H1N1), а также на их совместное действие. А – TNF-α, Б – IL-6, В – IL-10, Г – IFN-γ, Д – IFN-β

TNF-α в сыворотке контрольных мышей отличалось достаточно высоким значением ( $74.7 \pm 8.7$  пг/мл), указывающим на сенсibilизированное состояние животных. Образование TNF-α в крови мышей, инфицированных вирусом гриппа, зависело от дозы вируса и имело положительную динамику в ходе эксперимен-

та. Введение ЛПС *Rb.* инфицированным мышам усиливало продукцию TNF-α в их крови (рис. 7А).

Динамика синтеза IL-6 во всех вариантах опыта была сходной. Уровень IL-6 значительно возрастал (от 1000 до 2000 раз) к 4-му дню эксперимента. У инфицированных мышей продукция IL-6 зависела

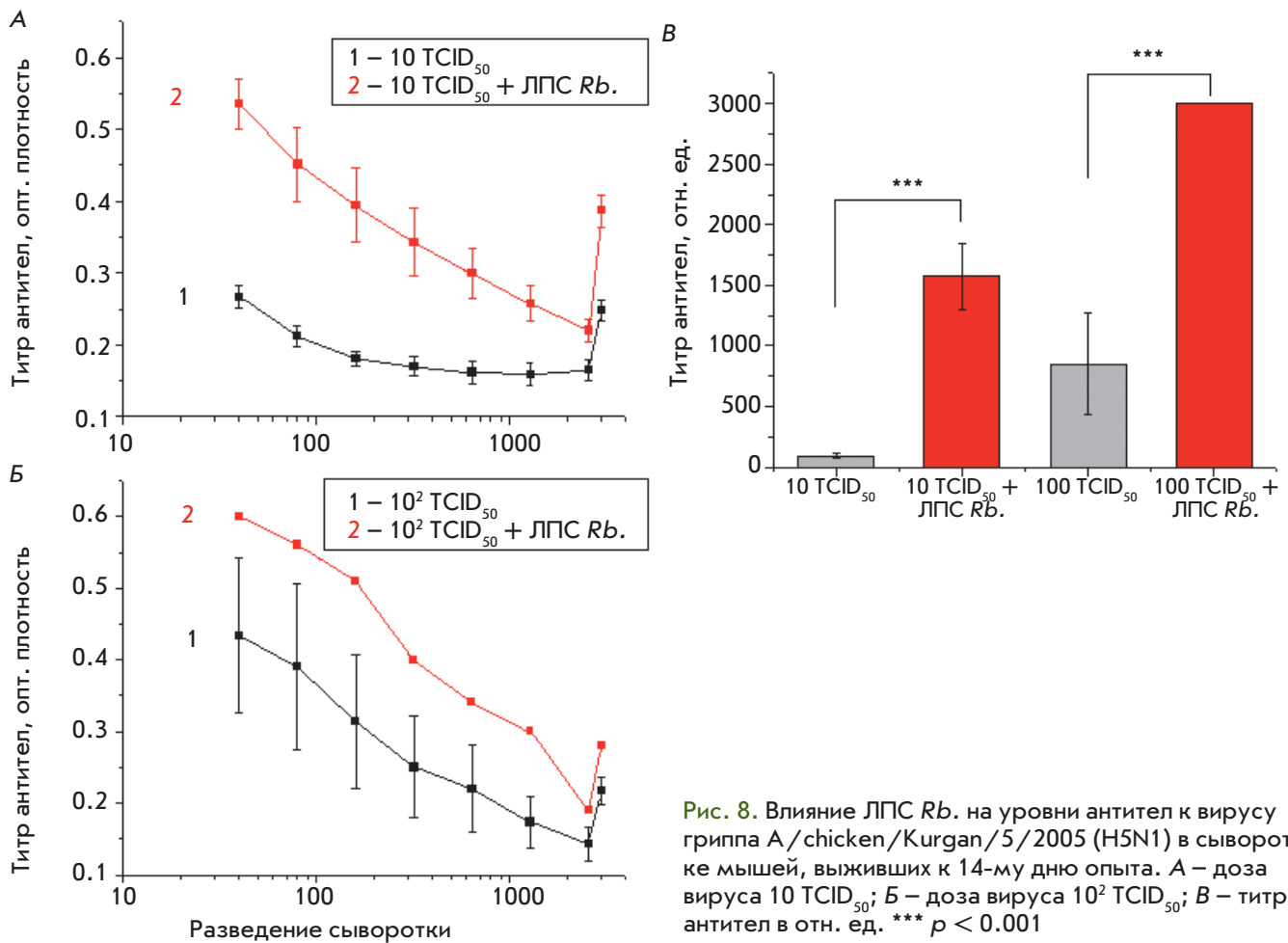


Рис. 8. Влияние ЛПС Rb. на уровни антител к вирусу гриппа A/chicken/Kurgan/5/2005 (H5N1) в сыворотке мышей, выживших к 14-му дню опыта. А – доза вируса 10 TCID<sub>50</sub>; Б – доза вируса 10<sup>2</sup> TCID<sub>50</sub>; В – титр антител в отн. ед. \*\*\*  $p < 0.001$

от дозы вируса. Содержание IL-6 в ответ на введение ЛПС Rb. было сравнимым с содержанием у мышей, инфицированных вирусом гриппа. Введение ЛПС Rb. инфицированным мышам незначительно усиливало выработку IL-6 к 5-му дню эксперимента (рис. 7Б).

Из полученных результатов видно, что вирусная инфекция вызывает дозозависимую индукцию синтеза провоспалительных цитокинов TNF- $\alpha$  и IL-6, возрастающую со временем. Эти цитокины вырабатываются, в основном, моноцитами и макрофагами в ответ как на бактерии, так и на вирусы, с использованием независимых путей передачи сигнала с привлечением разных поверхностных и внутриклеточных рецепторов, но одних и тех же адаптерных белков и транскрипционных факторов. Данные по индукции синтеза TNF- $\alpha$  и IL-6 показывают, что введение ЛПС Rb. мышам, инфицированным вирусом гриппа, усиливало провоспалительный ответ их иммунных клеток (рис. 7А, Б). Это усугубляло состояние животных, о чем свидетельствуют данные по выживаемости и изменению веса (рис. 5, 6).

Введение мышам ЛПС Rb. вызывало повышение уровня противовоспалительного цитокина IL-10, превышающего к 5-му дню исходный уровень в 3 раза. Вирус гриппа, независимо от дозы, не влиял на выработку противовоспалительного цитокина IL-10. Введение ЛПС Rb. инфицированным мышам независимо от дозы вируса практически не влияло на индукцию синтеза IL-10 по сравнению с введением только ЛПС Rb. (рис. 7В). Иммунорегуляторный цитокин IL-10 – ключевой компонент системы, регулирующей чрезмерные иммунные ответы подавлением экспрессии провоспалительных цитокинов, таких, как TNF- $\alpha$ , IL-6 и IL-1 [22, 23]. Уровни продукции IL-10 в ответ на ЛПС значительно выше, чем при вирусной инфекции [24, 25]. Полученные результаты указывают на повышение уровня IL-10 в ответ на введение ЛПС Rb. как здоровым, так и инфицированным вирусом гриппа мышам. Это может свидетельствовать о том, что ЛПС Rb. способствует усилению противовоспалительных ответов клеток (рис. 7В).

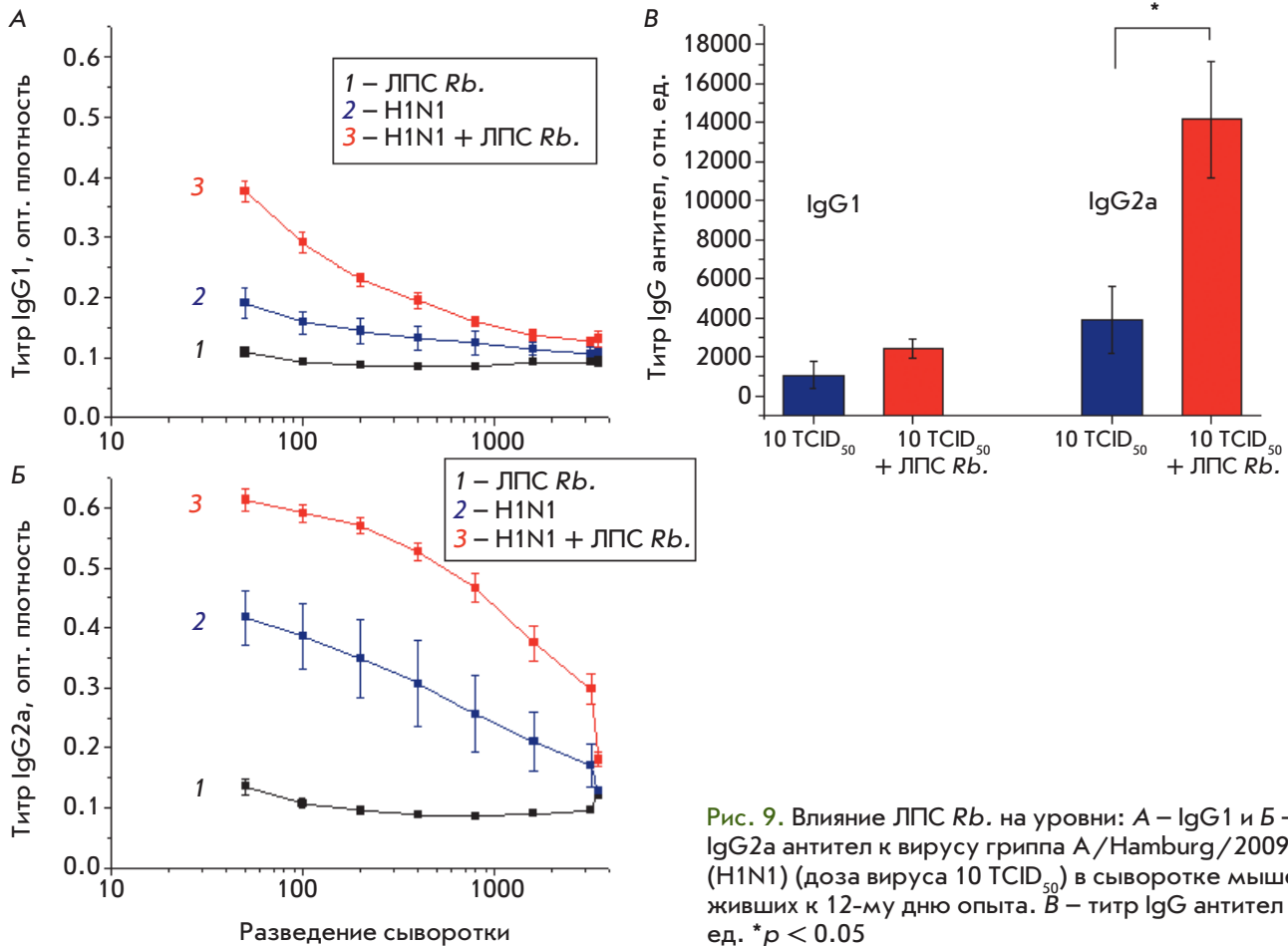


Рис. 9. Влияние ЛПС Rb. на уровни: А – IgG1 и Б – IgG2a антител к вирусу гриппа А/Hamburg/2009 МА (H1N1) (доза вируса 10 TCID<sub>50</sub>) в сыворотке мышей, выживших к 12-му дню опыта. В – титр IgG антител в отн. ед. \*p < 0.05

Полученные данные свидетельствуют об отсутствии продукции IFN-γ в ответ на введение мышам ЛПС Rb. Вирус гриппа дозозависимо увеличивает содержание IFN-γ в крови мышей. Более того, дополнительное введение ЛПС Rb. мышам, инфицированным вирусом гриппа H1N1, снижало выработку IFN-γ в их крови (рис. 7Г).

Не влияя на выработку IFN-γ, ЛПС Rb. вызывал к 4 дню эксперимента увеличение продукции IFN-β в 4 раза по сравнению с контрольным уровнем. На 5 день содержание IFN-β снижалось до исходного уровня. Содержание IFN-β в ответ на инфицирование вирусом H1N1 в дозе 10 TCID<sub>50</sub> возрастало к 5 дню эксперимента в 3 раза. Вирус гриппа в дозе 300 TCID<sub>50</sub> значительно усиливал индукцию IFN-β к 4 дню (в 16 раз) по сравнению с исходным значением. Введение ЛПС Rb. мышам, инфицированным 10 TCID<sub>50</sub> вируса гриппа, усиливало, а в дозе 300 TCID<sub>50</sub> снижало содержание цитокина по сравнению с мышами, инфицированными только вирусом гриппа (рис. 7Д).

Полученные результаты показали, что количества IFN-γ и IFN-β, синтезируемые при использованной

схеме введения ЛПС Rb., были недостаточны для эффективной противовирусной защиты против исследуемых штаммов вируса.

IFN-β, входящий в состав вакцины против гриппа, действует как мощный адъювант и способствует индукции синтеза IgG2a и IgA, обеспечивая защиту от заражения. Образование IgG2a антител, характерное для ответа на вирусную инфекцию, оказывает защитное и нейтрализующее действие против вирусов гриппа. В ходе вирусной инфекции экспрессия IFN типа I и генерация IgG2a антител являются взаимосвязанными событиями биологической значимости для последующего защитного иммунитета [26].

Действие существующих вакцин против инфекции вирусами гриппа основано, главным образом, на индукции синтеза нейтрализующих антител в ответ на вирусный НА [27]. Определение уровня антител на НА вируса гриппа H5N1 в сыворотке мышей, показало, что чем выше заражающая доза вируса, тем выше титр антител в сыворотке инфицированных животных. Дополнительное введение ЛПС Rb. мы-

шам, зараженным вирусом гриппа H5N1, приводило к достоверному росту титра антител ( $p < 0.001$ ) в сыворотке крови (рис. 8).

Определение уровней IgG1 и IgG2a антител в ответ на инфицирование вирусом гриппа H1N1 показало, что титры IgG2a значительно выше, чем IgG1 во всех группах животных. Введение ЛПС Rb. статистически значимо увеличивало уровень IgG2a в сыворотке по сравнению с мышами, инфицированными вирусом гриппа без дополнительного введения ЛПС Rb. ( $p < 0.05$ ) (рис. 9).

Врожденный иммунный ответ имеет решающее значение в борьбе с вирусами и играет ключевую роль в индукции и регуляции адаптивных иммунных ответов. По этой причине TLR-лиганды рассматриваются в качестве потенциальных адъювантов для включения в вакцинные препараты. Предполагается, что одновременная доставка TLR-лиганда и представляющего интерес антигена более эффективна, чем вакцинация смесью адъюванта и антигена [28, 29].

Из полученных результатов видно, что введение мышам ЛПС Rb. способствует продукции IFN- $\beta$  (рис. 7Д), а в крови мышей, инфицированных различными дозами вируса гриппа, контролирует его уровень. IFN- $\beta$  способствует выработке антител клетками приобретенного иммунитета [26]. Результаты данной работы также показывают, что дополнительное введение ЛПС Rb. приводит к выработке антител в крови животных, инфицированных вирусом гриппа А (рис. 8, 9).

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенной работы показано, что нетоксичный природный ЛПС Rb. способствует выработке иммуномодулирующего цитокина IFN- $\beta$  как при самостоятельном введении, так и на фоне заражения штаммами вируса гриппа A/chicken/Kurgan/5/2005 (H5N1) и A/Hamburg/2009 MA (H1N1), а также способствует образованию антител на HA этих штаммов в крови инфицированных животных. ●

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Pebody R., Warburton F., Ellis J., Andrews N., Potts A., Cottrell S., Johnston J., Reynolds A., Gunson R., Thompson C., et al. // *Euro Surveill.* 2016. V. 21. № 13. P. 30179.
2. McLean H.Q., Thompson M.G., Sundaram M.E., Kieke B.A., Gaglani M., Murthy K., Piedra P.A., Zimmerman R.K., Nowalk M.P., Raviotta J.M., et al. // *J. Infect. Dis.* 2015. V. 211. № 10. P. 1529–1540.
3. Finberg R.W., Wang J.P., Kurt-Jones E.A. // *Rev. Med. Virol.* 2007. V. 17. № 1. P. 35–43.
4. Kawai T., Akira S. // *Immunity.* 2011. V. 34. № 5. P. 637–650.
5. Yang H., Antoine D.J., Andersson U., Tracey K.J. // *J. Leukoc. Biol.* 2013. V. 93. № 6. P. 865–873.
6. Sakabe S., Iwatsuki-Horimoto K., Takano R., Nidom C.A., Le M.Q., Nagamura-Inoue T., Horimoto T., Yamashita N., Kawao-ka Y. // *J. Gen. Virol.* 2011. V. 92. № 6. P. 1428–1434.
7. Leung Y.H., Nicholls J.M., Ho C.K., Sia S.F., Mok C.K., Valkenburg S.A., Cheung P., Hui K.P., Chan R.W., Guan Y., et al. // *J. Gen. Virol.* 2014. V. 95. № 9. P. 1870–1879.
8. Shirey K.A., Lai W., Scott A.J., Lipsky M., Mistry P., Pletneva L.M., Karp C.L., McAlees J., Giannini T.L., Weiss J., et al. // *Nature.* 2013. V. 497. № 7450. P. 498–502.
9. Wang H., Bloom O., Zhang M., Vishnubhakat J.M., Ombrellino M., Che J., Frazier A., Yang H., Ivanova S., Borovikova L., et al. // *Science.* 1999. V. 285. № 5425. P. 248–251.
10. Alleva L.M., Budd A.C., Clark I.A. // *J. Immunol.* 2008. V. 181. № 2. P. 1454–1459.
11. Liu Q., Zhou Y., Yang Z. // *Cell Mol. Immunol.* 2016. V. 13. № 1. P. 3–10.
12. Прохоренко И.Р., Грачев С.В., Зубова С.В. Патент на изобретение RU № 2392309 от 20.06.2010 г.
13. Кабанов Д.С., Серов Д.А., Зубова С.В., Грачев С.В., Прохоренко И.Р. // *Биохимия.* 2016. Т. 81. № 3. С. 401–409.
14. Warren H.S., Fitting C., Hoff E., Adib-Conquy M., Beasley-Topliffe L., Tesini B., Liang X., Valentine C., Hellman J., Hayden D., Cavaillon J.M. // *J. Infect. Dis.* 2010. V. 201. № 2. P. 223–232.
15. Munford R.S. // *J. Infect. Dis.* 2010. V. 201. № 2. P. 175–177.
16. Махнева З.К., Вишневецкая Т.А., Прохоренко И.Р. // *Прикл. биохим. и микробиол.* 1996. Т. 32. № 4. С. 444–447.
17. Приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации № 267 от 19.06.2003 «Правила лабораторной практики в Российской Федерации».
18. Shirey K.A., Lai W., Patel M.C., Pletneva L.M., Pang C., Kurt-Jones E., Lipsky M., Roger T., Calandra T., Tracey K.J., et al. // *Mucosal Immunology.* 2016. V. 9. № 5. P. 1173–1182.
19. Mogensen T.H., Paludan S.R. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2001. V. 65. № 1. P. 131–150.
20. Lai C., Wang X., Yang P. // *Clin. Microbiol.* 2014. V. 3. № 3. P. 147–149.
21. Betakova T., Kostrobava A., Lachova V., Turianova L. // *Curr. Pharm. Des.* 2017. V. 23. № 18. P. 2616–2622.
22. Williams L., Bradley L., Smith A., Foxwell B. // *J. Immunol.* 2004. V. 172. № 1. P. 567–576.
23. Saraiva M., O'Garra A. // *Nat. Rev. Immunol.* 2010. V. 10. № 3. P. 170–181.
24. Yu X., Zhang X., Zhao B., Wang J., Zhu Z., Teng Z., Shao J., Shen J., Gao Y., Yuan Z., Wu F. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 12. P. e28680.
25. Blok D.C., van der Sluijs K.F., Florquin S., de Boer O.J., van't Veer C., de Vos A.F., van der Poll T. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 3. P. e58191.
26. Proietti E., Bracci L., Puzelli S., Di Pucchio T., Sestili P., De Vincenzi E., Venditti M., Capone I., Seif I., De Maeyer E., et al. // *J. Immunol.* 2002. V. 169. № 1. P. 375–383.
27. Cox R.J. // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2013. V. 9. № 2. P. 405–408.
28. Blander J.M., Medzhitov R. // *Science.* 2004. V. 304. P. 1014–1018.
29. Blander J.M. // *Trends Immunol.* 2007. V. 28. № 1. P. 19–25.



УДК 602.66:612.017.12

# Исследование структурных и иммунологических свойств химерных белков, содержащих участки MPER ВИЧ-1

А. П. Рудометов<sup>1</sup>, Н. Б. Рудометова<sup>1</sup>, Д. Н. Щербаков<sup>1,4</sup>, А. А. Ломзов<sup>2,3</sup>, О. Н. Каплина<sup>1</sup>, Н. С. Щербакова<sup>1</sup>, А. А. Ильичев<sup>1</sup>, А. Ю. Бакулина<sup>1,3</sup>, Л. И. Карпенко<sup>1</sup>

<sup>1</sup>ФБУН Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор» Роспотребнадзора, 630559, Кольцово Новосибирской обл.

<sup>2</sup>Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, 630090, Новосибирск, просп. Академика Лаврентьева, 8

<sup>3</sup>Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, 630090, Новосибирск, ул. Пирогова, 1

<sup>4</sup>Алтайский государственный университет, 656049, Барнаул, просп. Ленина, 61

E-mail: andrei692@mail.ru

Поступила в редакцию 28.05.2019

Принята к печати 07.08.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-56-65

**РЕФЕРАТ** Разработка безопасной и эффективной вакцины против вируса иммунодефицита человека (ВИЧ-1) могла бы способствовать прекращению пандемии ВИЧ/СПИДа, представляющей серьезную проблему здравоохранения во всем мире. Значительная часть исследований в области вакцинопрофилактики ВИЧ-1 направлена на разработку иммуногенов и стратегий иммунизации, способных вызывать формирование антител, обладающих нейтрализующей активностью в отношении широкого спектра изолятов ВИЧ-1 (bNAbs). Цель данной работы заключалась в создании иммуногенов, способных направить иммунный ответ на мембрано-проксимальную наружную область (MPER) ВИЧ-1, один из районов связывания bNAbs. Сконструированы два иммуногена, представляющие фрагменты MPER в составе двух белков-носителей: белка YkuJ *Bacillus subtilis* и искусственного полипептида ТВ1. С помощью метода кругового дихроизма показано, что вторичная структура иммуногенов согласуется с их теоретическими моделями. Антигенная структура белков MPER-ТВ1 и YkuJ-MPER охарактеризована с помощью bNAbs, узнающих MPER ВИЧ-1 (2F5, 4E10 и 10E8). Иммуногенность полученных рекомбинантных белков показана на кроликах. Установлено, что полученные сыворотки кросс-реактивны в отношении иммуногенов, содержащих MPER. Конструкции, созданные и охарактеризованные в данной работе, могут быть использованы для фокусирования гуморального иммунного ответа на MPER, который считается одним из регионов уязвимости ВИЧ-1.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ВИЧ-1, рекомбинантные иммуногены, эпитопы нейтрализующих антител, bNAbs, MPER.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ВИЧ-1 – вирус иммунодефицита человека первого типа; bNAbs – нейтрализующие антитела широкого спектра действия (broadly neutralizing antibodies); BSA – бычий сывороточный альбумин; MPER – мембрано-проксимальная наружная область (membrane-proximal external region); МКА – моноклональное антитело; PBS – фосфатно-солевой буфер.

## ВВЕДЕНИЕ

Для прекращения пандемии ВИЧ/СПИДа необходимо иметь безопасную и эффективную вакцину против ВИЧ-1 [1, 2]. Надежду на появление такой вакцины дало открытие антител, способных нейтрализовать широкий спектр изолятов ВИЧ-1 (broadly neutralizing antibodies, bNAbs) [3, 4]. Установлено, что пассивное введение отдельных bNAbs или их

комбинаций может обеспечить полную защиту животных моделей от ВИЧ-инфекции [5, 6]. Несмотря на появление bNAbs в организме при естественном течении ВИЧ-инфекции, вызвать формирование таких антител при вакцинации оказалось нетривиальной задачей, решить которую пока не удалось [7]. В настоящее время можно выделить ряд направлений, в рамках которых ведутся разработки имму-

ногенов, направленных на индукцию bNAbs [4, 8, 9]. Одно из таких направлений – включение в состав белков-носителей (скаффолдов) консервативных областей ВИЧ-1 (регионов уязвимости), с которыми взаимодействуют нейтрализующие антитела широкого спектра действия [10, 11].

Одним из регионов уязвимости ВИЧ-1 является мембрано-проксимальная наружная область (MPER) gp41, необходимая для слияния вирусной мембраны с клеточной [12]. Известен ряд bNAbs к этой области, таких, как 2F5, 4E10, Z13, Z13e1, m66.6, CH12, 10E8 и DH511.2 [13, 14].

Ранее был предпринят ряд попыток, направленных на разработку иммуногенов, способных вызвать наработку bNAbs, нацеленных на MPER [15], но лишь некоторые из них обеспечили индукцию нейтрализующих антител, при этом с низкой эффективностью и ограниченной шириной нейтрализации [16, 17]. Причины этого могут быть самыми разными, среди них аутореактивность анти-MPER-антител [18], изменение конформации района MPER в процессе проникновения вируса в клетку [14], участие липидной мембраны в формировании комплекса с анти-MPER-антителами [19]. Более того, высокая гидрофобность MPER [20] и стерические ограничения, накладываемые фрагментом gp120 [21], делают его слабо иммуногенным.

В данной работе мы провели исследование, направленное на разработку и характеристику рекомбинантных иммуногенов YkuJ-MPER и MPER-TBI, предназначенных для фокусирования иммунного ответа на регион уязвимости ВИЧ-1 – MPER.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Моноклональные антитела, штаммы бактерий, ферменты

МКА 4E10 (№ 10091), 10E8 (№ 12294), 2F5 (№ 1475) получены в рамках программы предоставления реактивов NIH AIDS Research and Reference Reagent Program (США). Штамм *Escherichia coli* BL21(DE3) pLysS (Invitrogen) предоставлен отделом «Коллекции микроорганизмов» ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (Кольцово, Россия). Эндонуклеазы рестрикции XbaI, FauNDI, Sfr274I, EcoRI, Zsp2I, KpnI и T4 ДНК-лигаза приобретены в компании «СибЭнзим» (Новосибирск, Россия).

### Получение гена химерного белка YkuJ-MPER

Для выбора белка-носителя YkuJ проведен поиск в классификаторе белковых структур SCOP. Для оценки вероятности аутоиммунных реакций проведен анализ гомологии аминокислотной последовательности YkuJ и белков человека с использо-

ванием базы данных UniProt и программы BLAST. При проектировании химерного белка YkuJ-MPER N- и C-концы выбранного белка-носителя были заменены на фрагменты последовательности MPER региона ВИЧ-1.

Ген химерного белка YkuJ-MPER синтезирован компанией «Евроген» (Москва, Россия), а затем клонирован в составе плазмидного вектора pET21a (Novagen) по сайтам рестрикции FauNDI и Sfr274I.

### Получение гена полипептида MPER-TBI

Иммуноген MPER-TBI получен путем замены C- и N-концевых участков полипептида TBI\_tag [22] на районы, соответствующие районам MPER в составе YkuJ-MPER. Образующие дуплексы олигонуклеотиды, кодирующие последовательности ELLELDKWASLANWFIITNLLWLIK и IALLLDAWASLWNWFDITNWLWYI и содержащие липкие концы, аналогичные тем, которые образуются при обработке плазмидного вектора эндонуклеазами рестрикции EcoRI и Zsp2I или KpnI и Sfr274I соответственно, синтезированы компанией «Евроген» (Москва, Россия). Олигонуклеотидные дуплексы клонировали по уникальным сайтам в составе рекомбинантной плазмиды pET-TBI\_tag, кодирующей полипептид TBI\_tag. Первый олигонуклеотидный дуплекс клонировали по сайтам EcoRI и Zsp2I, при этом был заменен участок env (255–266), входящий в состав TBI\_tag. Второй олигонуклеотидный дуплекс клонировали по сайтам KpnI и Sfr274I, при этом были заменены участки gag (351–361), gag (211–305) и gag (99–109) полипептида TBI\_tag. Таким образом получена рекомбинантная плазида pET-MPER-TBI. Структуры целевых плазмид pET-YkuJ-MPER и pET-MPER-TBI подтверждены секвенированием в ЦКП «Геномика» СО РАН (Новосибирск, Россия).

### Построение моделей взаимодействия YkuJ-MPER с Fab-фрагментами антител 10E8, 2F5 и 4E10

Для построения моделей использовали программы Modeller и PyMOL. С помощью программы PyMOL совмещали структуры YkuJ из PDB (2FFG) и структуры фрагментов MPER из комплексов MPER с Fab-фрагментами антител 2F5 (2PR4), 4E10 (2FX8) или 10E8 (4G6F). Результат такого совмещения использовали как шаблон при моделировании по гомологии в программе Modeller. Затем для проверки возможности соединения YkuJ-MPER с моноклональными антителами на полученные модели с помощью программы PyMOL накладывали соответствующие структуры комплексов MPER с Fab-фрагментами антител.

### Наработка и очистка рекомбинантных белков YkuJ-MPER и MPER-TBI

Бактериальные штаммы-продуценты белков YkuJ-MPER и MPER-TBI получали путем трансформации химически компетентных клеток *E. coli* BL21 плазмидами pET-YkuJ-MPER и pET-MPER-TBI и культивировали их как описано ранее [22]. Рекомбинантные белки очищали с помощью металл-хелатной хроматографии на колонке с Ni-NTA (Qiagen, Германия) согласно инструкции производителя. Рефолдинг очищенных белков проводили с помощью диализа против четырех смен PBS с понижающейся концентрацией мочевины (6, 4, 2, 1 М), последний этап диализа проводили против физиологического раствора. Степень очистки целевого белка оценивали с помощью электрофореза в 15% ПААГ с последующей фиксацией и окрашиванием Кумасси G250. Количественный анализ содержания белков проводили путем спектрофотометрического измерения концентрации при 280 нм (NanoDrop-2000, Thermo Fisher Scientific).

### Предсказание вторичной структуры MPER-TBI

Для предсказания вторичной структуры иммуногена MPER-TBI использовали алгоритм PSSfinder на сервере GeneSilico Metaserver [23].

### Круговой дихроизм

Спектры кругового дихроизма (КД) белков YkuJ-MPER и MPER-TBI зарегистрированы при 25°C в физиологическом растворе с использованием термостатируемой 1-мм кюветы на спектрополяриметре J-600 (JASCO, Япония). Все спектры были записаны в диапазоне 195–260 нм с шагом 1 нм и усреднены после трех измерений. Концентрации образцов в физиологическом растворе были приведены к одинаковой оптической плотности на длине волны 214 нм.

Для определения доли  $\alpha$ -спиралей,  $\beta$ -листов, поворотов и неупорядоченной формы минимизировали разницу между теоретическими и экспериментальными кривыми. Теоретические кривые представляли в виде линейной комбинации базовых спектров различных компонент вторичных структур, взятых из программы CCA+ [24].

### Дот-блот-анализ

Дот-блот-анализ проводили с использованием системы SNAP i.d. (Millipore, США) как описано ранее [22]. На нитроцеллюлозную мембрану (Amersham, Австрия) наносили по 2 мкл двукратных последовательных разведений белков YkuJ-MPER и MPER-TBI (стартовая концентрация 0.2 мг/мл). В качестве первичных использовали МКА 4E10, 10E8 и 2F5 (разбавленные 1 : 10000 в PBS, 1% BSA). В качестве вторичных использовали антитела кролика против IgG

человека (Sigma, США), конъюгированные со щелочной фосфатазой (разбавленные 1 : 5000 в PBS, 1% BSA). Иммунный комплекс визуализировали, добавляя NBT/BCIP-субстратный раствор (Sigma, США).

### Получение и анализ сывороток животных, иммунизированных белками YkuJ-MPER и MPER-TBI

В экспериментах использовали 4-месячных кроликов-самок (вес 1.6–2 кг) породной принадлежности шиншилла. Животных содержали в отдельных клетках (виварий ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора) в условиях содержания на стандартном рационе со свободным доступом к пище и воде. Эксперименты были одобрены на заседании Биоэтической комиссии ФБУН ГНЦ ВБ «Вектор» Роспотребнадзора (протокол № 3 от 25.04.2018 г.) и выполнены с соблюдением принципов гуманности, изложенных в директивах Европейского сообщества (86/609/ЕЕС) и Хельсинкской декларации.

Животные были случайным образом разделены на две группы (три кролика в каждой группе). Препараты белков вводили четырехкратно на 1-й, 14-й, 28-й и 42-й дни. При первой иммунизации кроликам подкожно вводили по 500 мкг YkuJ-MPER либо MPER-TBI с полным адъювантом Фрейнда. При второй – по 500 мкг образца в комплексе с неполным адъювантом Фрейнда, при последующих иммунизациях – по 800 мкг образца без адъюванта. Перед каждой иммунизацией и через 2 недели после последней иммунизации проводили забор образцов крови, из которых получали сыворотки.

### Иммуноферментный анализ

Специфическую активность сывороток кроликов, иммунизированных белками YkuJ-MPER и MPER-TBI, оценивали с помощью ИФА как описано ранее [22]. Белки YkuJ-MPER и MPER-TBI (5 мкг/мл) сорбировали в лунках 96-луночного планшета (Greiner bio one, Германия). Образцы сывороток вносили в пятикратном последовательном разведении. Затем добавляли антитела козы против IgG кролика (разбавленные в PBS 1 : 10000), конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США), планшет промывали и вносили раствор субстрата ТМВ (Amresco, США). Оптическую плотность измеряли при длине волны 450 нм на ИФА-ридере (Model 680 Micro plate reader, Bio-Rad, США). Все эксперименты проводили в трех повторах. При определении титра сывороток максимальным разведением считали разведение, значение оптической плотности (ОП) которого превышало в 2 раза ОП отрицательного контроля (при том же разведении). Графики построены с помощью программы GraphPad Prism 6.0.

### Анализ сывороток на наличие антител, специфических к белкам ВИЧ-1

Анализ проводили с использованием тест-системы New Lav Blot I (Bio-Rad, Франция) в соответствии с протоколом производителя. В качестве конъюгата для сывороток кроликов использовали антитела козы против IgG кролика (разбавленные 1 : 5000 в PBS), конъюгированные со щелочной фосфатазой (Sigma, США). Иммуные комплексы визуализировали, добавляя NBT/BCIP-субстратный раствор (Sigma, США).

### РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Проектирование белков-носителей области MPER ВИЧ-1

Для презентации MPER иммунной системе решено использовать два белковых носителя с разной пространственной организацией. При этом носители должны обеспечивать конформационную подвижность области MPER, а также быть нетоксичными, растворимыми, иметь небольшой размер и не вызывать аутоиммунных реакций.

С помощью поиска в классификаторе белковых структур SCOP мы выбрали белок-носитель YkuJ *Bacillus subtilis* (рис. 1А). Ядро данного белка состоит из антипараллельных β-тяжей, образующих жесткий каркас молекулы. Концевые участки являются спиральными, что соответствует конформации эпитопов МКА 4Е10 и 10Е8. Можно предполагать, что белок YkuJ безопасен, поскольку *B. subtilis* не патогенна для животных и человека. Чтобы по возможности исключить аутоиммунные реакции на YkuJ, с помощью программы BLAST проведен поиск его гомологов в базе данных белков человека. В результате анализа не обнаружено значимых совпадений аминокислотной последовательности этого белка с белками человека, поэтому индукция аутоиммунных реакций маловероятна.

При проектировании химерного белка YkuJ-MPER N- и C-концы белка-носителя были заменены на фрагменты консенсусной последовательности MPER региона ВИЧ-1 подтипа В, нумерация соответствует штамму HXB2: <sup>659</sup>ELLELDKWASLWNWFDITNWLWYIK<sub>683</sub>. При этом перекрывающиеся со встраиваемой последовательностью остатки YkuJ, важные для поддержания пространственной структуры белка-носителя, были оставлены без изменений. Ядро белка-носителя также не подвергали изменениям, чтобы максимально сохранить исходную структуру YkuJ. В конструкции YkuJ-MPER присутствуют все аминокислотные остатки MPER, критичные для связывания bNAbs 10Е8, 4Е10 и 2F5. Для возможности очистки рекомбинантного белка с помощью

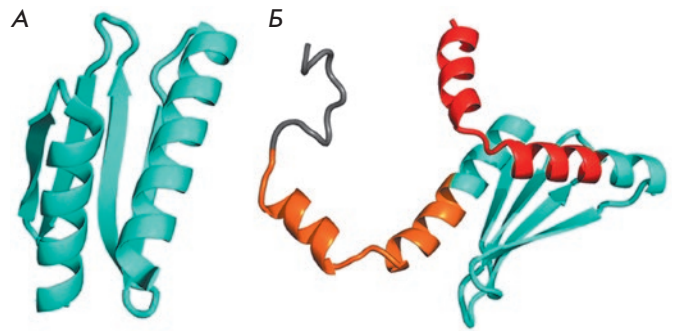


Рис. 1. А – структура белка YkuJ, идентификатор PDB 2FFG; Б – модель химерного белка YkuJ-MPER. Для наглядности каркас исходного белка выделен бирюзовым, встроенные в N-конец участки MPER – красным, в С-конец – коричневым, гистидиновая метка обозначена серым цветом

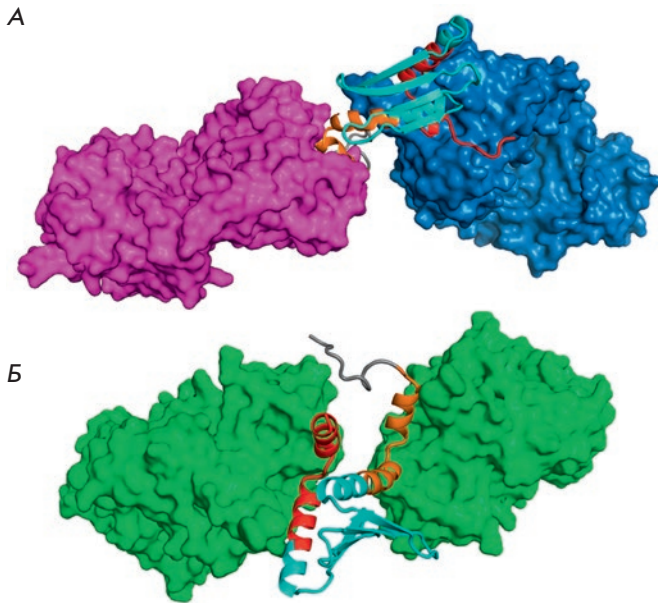
металл-хелатной хроматографии к С-концу добавлено шесть остатков гистидина. Итоговая конструкция YkuJ-MPER имеет размер 119 аминокислотных остатков и молекулярную массу 14,2 кДа (рис. 1Б). Аминокислотная последовательность YkuJ-MPER (фрагменты, принадлежащие MPER, выделены жирным шрифтом и подчеркнуты): **MELLELDKWASLANWFIITNLLWLIK**TAEAAANEPMQRYFEVNGEKICSVKYFEKNQTFELTVFQKGEKPNTYFPDNIDMVSIEIALLLLD**AWASLWNWFDITNWLWYI**NNNNNN.

Методами молекулярного моделирования установлено, что участки MPER, находясь на концах химерного белка YkuJ-MPER, могут принимать конформации, характерные для эпитопов известных моноклональных антител к данному региону: 2F5 и Z13 (конформация без регулярной вторичной структуры), 4Е10 и 10Е8 (α-спиральная конформация), при этом два антитела могут связаться одновременно с двумя районами молекулы (рис. 2). Также моделирование пространственной структуры химерного белка показало, что фрагмент, содержащий 6 а.о. гистидина, не препятствует связыванию антител с YkuJ-MPER (рис. 2).

При проектировании гена, кодирующего YkuJ-MPER, в состав нуклеотидной последовательности заложены уникальные сайты рестрикции (FauNDI, Bpu14I, Bsa29I, Sfr274I), фланкирующие участки MPER, с целью использования данного белка как платформы для получения иммуногенов, содержащих другие антигенные детерминанты ВИЧ-1 или других инфекционных агентов. Синтезированный ген YkuJ-MPER клонирован в составе плазмидного вектора pET21a.

В качестве второго носителя использовали оптимизированный вариант полипептида ТВ1 – ТВ1\_tag [22]. ТВ1 в составе кандидатной вакцины





**Рис. 2.** Модель взаимодействия YkuJ-MPER с Fab-фрагментами МКА 2F5 и 4E10 (А) и с 10E8 (Б). А – фиолетовым цветом обозначен Fab-фрагмент антитела 2F5; синим – Fab-фрагмент антитела 4E10. Б – зеленым цветом обозначены Fab-фрагменты антитела 10E8. Модели построены с помощью программы PyMOL

КомбиВИЧвак прошел первую фазу клинических испытаний и продемонстрировал иммуногенность и безопасность [25]. TBI\_tag отличается от TBI тем, что для эффективной экспрессии в *E. coli* проведена оптимизация состава кодонов его нуклеотидной последовательности, а также замена фрагмента, кодирующего 20 аминокислотных остатков белка ResA *Proteus mirabilis*, на последовательность, кодирующую фрагмент (7 аминокислот) белка-активатора транскрипции InfB *E. coli*. В данной работе концевые фрагменты TBI\_tag были заменены на участки MPER ВИЧ-1, аналогичные включенным в YkuJ-MPER. Спроектированный полипептид назван MPER-TBI (156 аминокислотных остатков, 17.8 кДа).

Блок-схемы белков TBI\_tag и MPER-TBI изображены на рис. 3.

Ген, кодирующий полипептид MPER-TBI, клонирован в составе плазмидного вектора pET21a в рамке считывания с последовательностью, кодирующей 6 остатков гистидина.

**Получение и анализ свойств рекомбинантных белков YkuJ-MPER и MPER-TBI**

Белки YkuJ-MPER и MPER-TBI наработаны и очищены с помощью металл-хелатной хроматографии. Степень очистки белков оценивали с помощью электрофореза в 15% ПААГ (рис. 4). Дополнительную очистку белков и их рефолдинг проводили с помощью диализа против буферов со снижающейся концентрацией мочевины. В финальных препаратах степень очистки белков была не менее 90%.

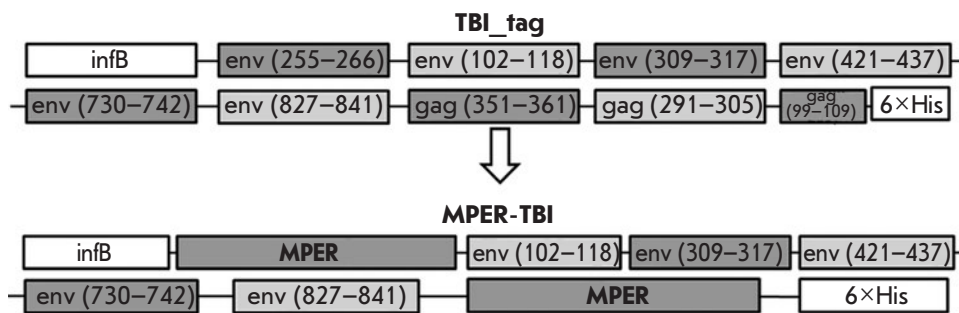
**Предсказание вторичной структуры MPER-TBI**

Вторичная структура белка MPER-TBI, предсказанная с помощью программы PSSfinder, и его аминокислотная последовательность представлены на рис. 5. Согласно предсказанию, структура MPER-TBI является преимущественно α-спиральной с содержанием α-спиралей 56%.

**Круговой дихроизм YkuJ-MPER и MPER-TBI**

Экспериментальное определение элементов вторичной структуры антигенов YkuJ-MPER и MPER-TBI проводили с помощью спектроскопии кругового дихроизма. Доля элементов вторичной структуры иммуногенов, согласно результатам измерения спектров КД в физиологическом растворе, приведена в таблице.

Согласно модели (рис. 1Б), YkuJ-MPER с концевыми районами, соответствующими эпитопам 10E8, имеет следующее соотношение элементов вторичной структуры: 45% α-спиралей, 24% β-тяжей. Результаты, полученные методом кругового дихроизма, согласуются с этой моделью по содержанию β-тяжей, тогда как экспериментально определенная доля α-спиралей оказалась меньше.



**Рис. 3.** Схематическое изображение структуры иммуногенов TBI\_tag и MPER-TBI. Темным фоном выделены В-клеточные эпитопы, светлым фоном – Th-эпитопы. InfB – фрагмент белка-активатора транскрипции *E. coli* InfB; 6×His – шесть аминокислотных остатков гистидина; MPER – участки мембрано-проксимальной наружной области ВИЧ-1

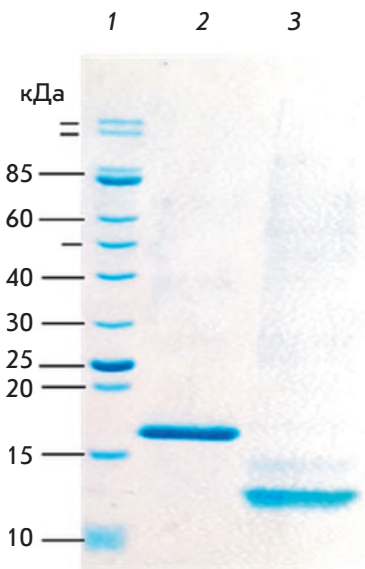


Рис. 4. Электрофореграмма белков MPER-TBI (2) и YkuJ-MPER (3), 1 – маркер молекулярной массы

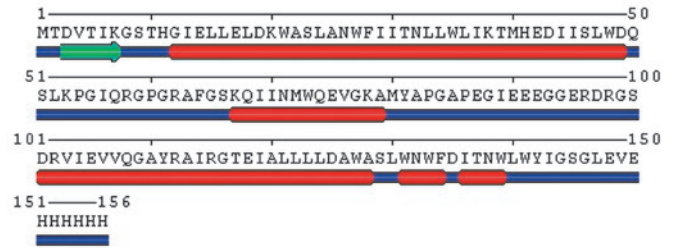


Рис. 5. Аминокислотная последовательность и вторичная структура белка MPER-TBI. Синим обозначены неупорядоченные области, красным –  $\alpha$ -спирали, зеленым обозначены  $\beta$ -тяжи. Метод предсказания – PSSfinder

Предсказанная модель вторичной структуры MPER-TBI (рис. 5), согласно которой доля  $\alpha$ -спиралей равна 56%, незначительно отличается от результатов КД, так как по полученным данным MPER-TBI содержит 68%  $\alpha$ -спиралей и не содержит  $\beta$ -тяжей.

**Дот-блот-анализ белков**

Для анализа антигенных свойств эпитопов bNAbs 4E10, 10E8 и 2F5, входящих в MPER в составе белков YkuJ-MPER и MPER-TBI, проведен дот-блот-анализ с использованием МКА 10E8, 4E10 и 2F5 (рис. 6). В качестве контроля использовали белок TBI\_tag, не содержащий эпитопы данных антител. Подтверждено, что МКА 10E8, 4E10 и 2F5 взаимодействуют с YkuJ-MPER и MPER-TBI и не взаимодействуют с контролем.

**Анализ иммуногенности белков**

Анализ иммуногенности проводили на кроликах. Две группы животных иммунизировали очищенными

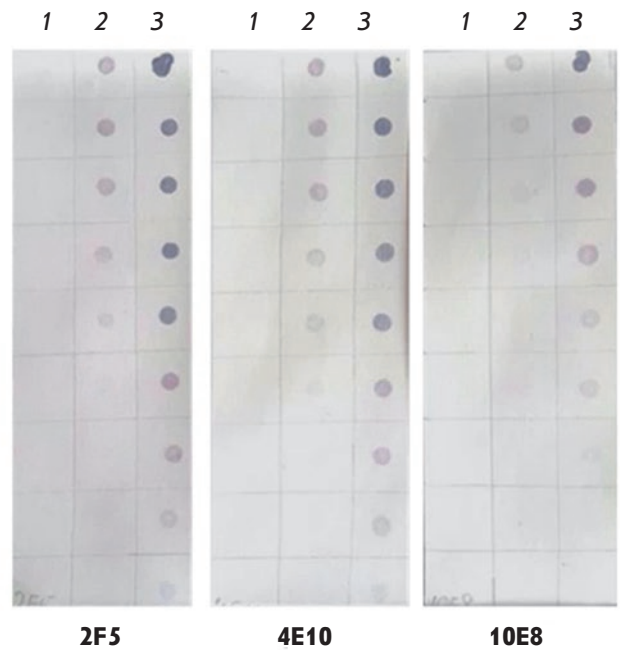
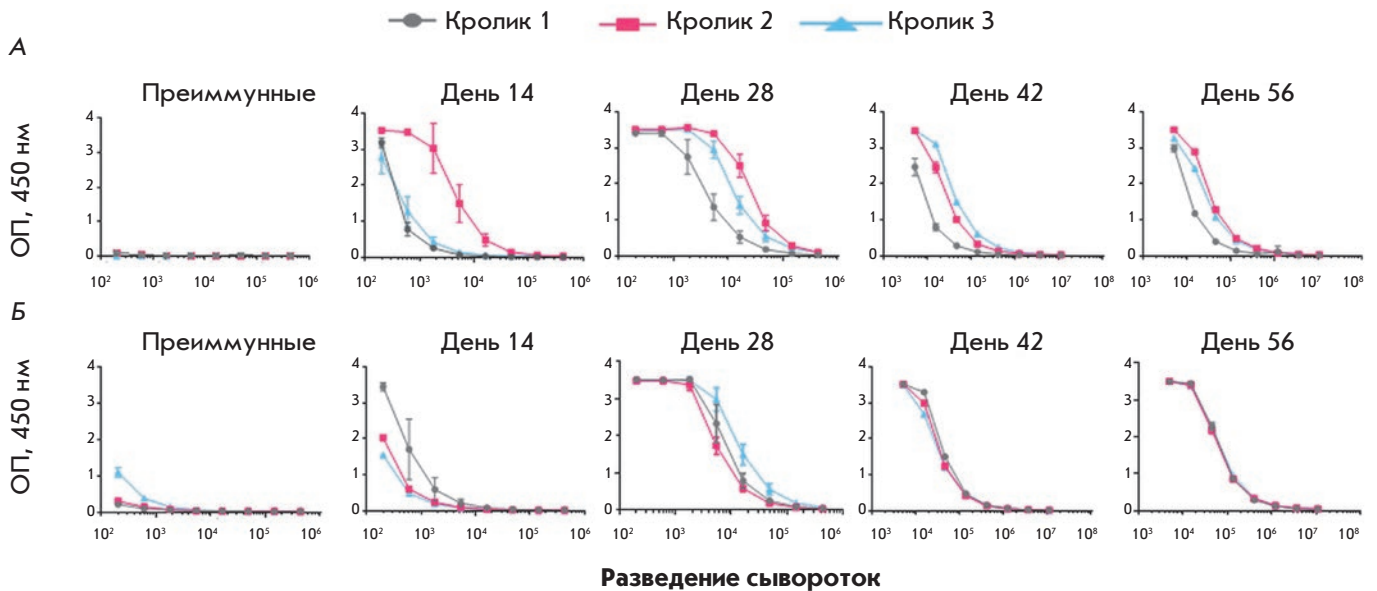


Рис. 6. Дот-блот-анализ: 1 – TBI\_tag (контроль); 2 – MPER-TBI; 3 – YkuJ-MPER; 2F5, 4E10 и 10E8 – МКА. Сверху вниз нанесены двукратные разведения соответствующих белков

**Элементы вторичной структуры белков YkuJ-MPER и MPER-TBI**

Структура	Образец			
	YkuJ-MPER		MPER-TBI	
	Теоретический расчет, %	КД в физиологическом растворе, %	Теоретический расчет, %	КД в физиологическом растворе, %
$\alpha$ -спирали	45	26	56	68
$\beta$ -тяжи	24	26	3	0
Поворот_I	-	5	-	5
Поворот_II	-	0	-	0
Неупорядоченные структуры	31	43	41	27



**Рис. 7.** Результаты ИФА сывороток кроликов, иммунизированных MPER-Tb1 или YkuJ-MPER. А – группа кроликов, иммунизированных MPER-Tb1: в качестве антигена сорбирован белок MPER-Tb1. Б – группа кроликов, иммунизированных YkuJ-MPER: в качестве антигена сорбирован белок YkuJ-MPER. По оси Y отложено значение ОП, 450 нм, по оси X – разведения сывороток. Данные на графиках представлены как среднее значение и стандартное отклонение

ми препаратами белков YkuJ-MPER или MPER-Tb1 (см. «Экспериментальную часть»). Специфическую активность сывороток исследовали в ИФА, сопоставляя с контролем – сыворотками, полученными от кроликов до иммунизации. Показано, что в сыворотках крови обеих групп иммунизированных животных содержатся антитела, специфичные к исследуемым иммуногенам. После четвертой иммунизации титры антител в сыворотках кроликов, иммунизированных MPER-Tb1, составляли 1 : 1 000 000, а в сыворотках кроликов, иммунизированных YkuJ-MPER, – 1 : 3 000 000 (рис. 7). В обеих группах титры возрастали от первой до третьей иммунизации. Сигнал преиммунных сывороток в ИФА был на уровне фона.

**Анализ перекрестной иммуногенности белков**

Для проверки способности сывороток связываться с «чужим» антигеном проведен перекрестный ИФА (анализировали способность сывороток животных, иммунизированных MPER-Tb1, взаимодействовать с белком YkuJ-MPER, а сывороток животных, иммунизированных YkuJ-MPER, – с MPER-Tb1) (рис. 8 и 9 соответственно). Показано, что сыворотки животных перекрестно взаимодействуют с соответствующими антигенами. При этом при иммунизации MPER-Tb1 значения титров антител сывороток крови всех животных данной группы на антиген YkuJ-MPER были равны 1 : 400 000 (рис. 8). Титры анти-

тел сывороток крови животных, иммунизированных YkuJ-MPER, когда в качестве антигена сорбирован MPER-Tb1, равны 1 : 1 000 000 (рис. 9).

**Анализ специфичности сывороток иммунизированных животных**

С помощью тест-системы New Lav Blot I исследовано наличие в сыворотках антител, специфичных к белкам ВИЧ-1. Установлено, что сыворотки, полученные от кроликов, иммунизированных как MPER-Tb1, так и YkuJ-MPER, содержат антитела к белкам gp160 и gp41 (рис. 10). Сыворотки группы животных, иммунизированных MPER-Tb1, дополнительно распознают gp120.

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Мембрано-проксимальная наружная область ВИЧ-1 считается одной из наиболее перспективных мишеней для разработки иммуногенов, индуцирующих bNAbs [14]. Тем не менее, до сих пор не удалось создать иммуноген, способный обеспечить надежное формирование bNAbs, специфичных к этой мишени [18, 19]. Для повышения эффективности презентации эпитопов MPER иммунной системе их можно включать в состав молекул-носителей, полученных при помощи рационального дизайна. Стратегия прайм-буст иммунизации с использованием таких конструкций может позволить повысить иммунный ответ на встроенные эпитопы [26–28].

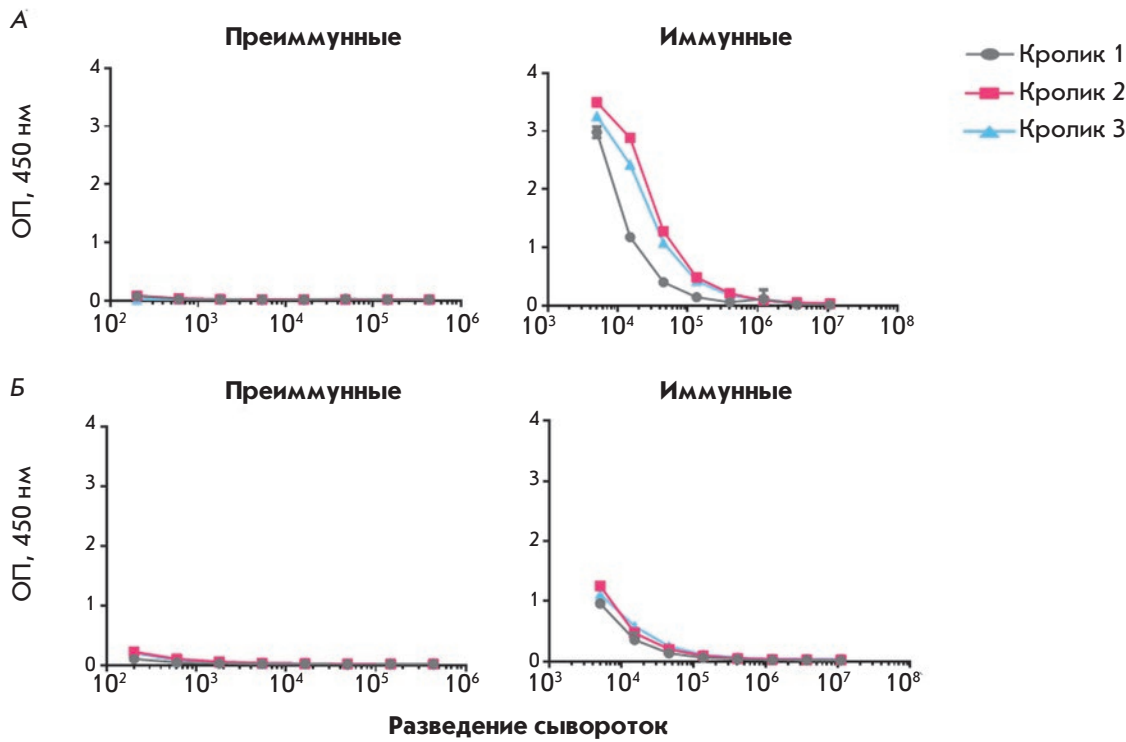


Рис. 8. Результаты ИФА сывороток группы кроликов, иммунизированных MPER-TBI. А – в качестве антигена сорбирован белок MPER-TBI; Б – в качестве антигена сорбирован белок YkuJ-MPER. Преиммунные – сыворотки интактных животных, иммунные – сыворотки животных после 4-й иммунизации

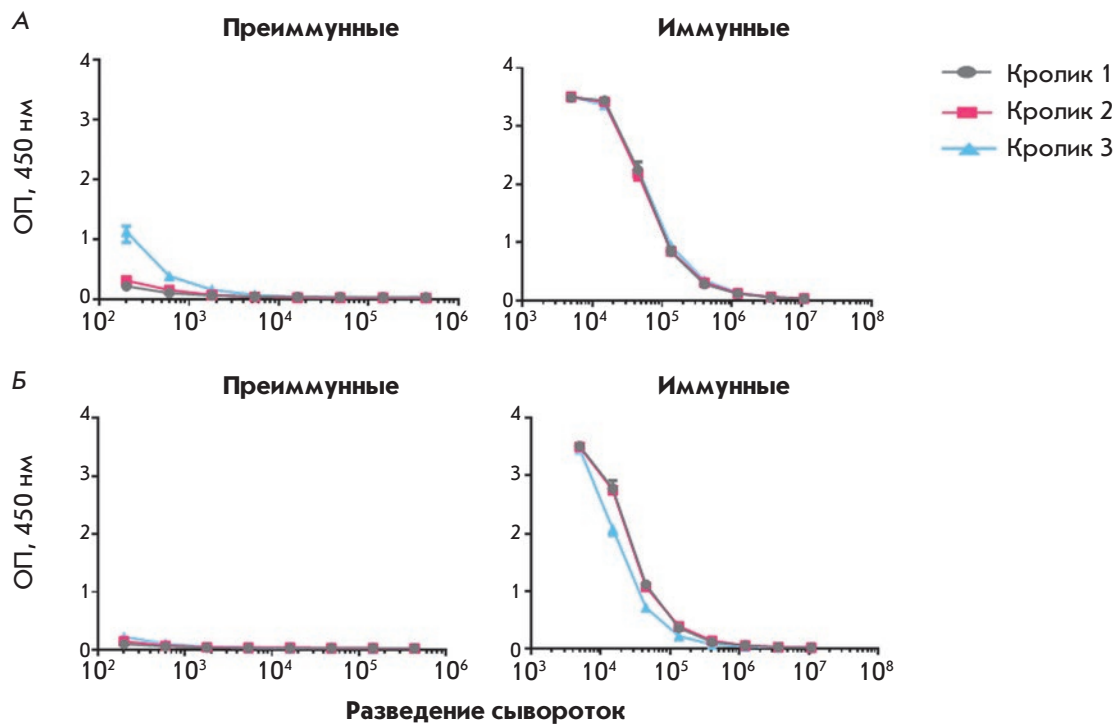


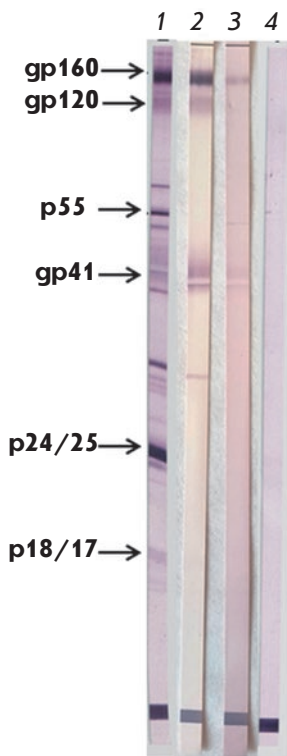
Рис. 9. Результаты ИФА сывороток группы кроликов, иммунизированных YkuJ-MPER. А – в качестве антигена сорбирован белок YkuJ-MPER; Б – в качестве антигена сорбирован белок MPER-TBI. Преиммунные – сыворотки интактных животных, иммунные – сыворотки животных после 4-й иммунизации

В данной работе сконструированы два иммуногена на основе белковых носителей с разной пространственной организацией. Их использование в стратегии прайм-буст иммунизации может позволить избежать нежелательного иммунного ответа на сам носитель. В качестве носителей мы выбрали: глобу-

лярный белок *B. subtilis* YkuJ с известной третичной структурой и охарактеризованный нами ранее искусственный полипептид TBI\_tag.

Экспериментальное определение вторичных структур иммуногенов в физиологическом растворе методом КД позволило получить результаты,





**Рис. 10.** Анализ сывороток крови животных, иммунизированных белками MPER-TbI и YkuJ-MPER, с использованием коммерческой тест-системы New Lav Blot I. 1 – положительный контроль из набора New Lav Blot I; 2 – сыворотки кроликов, иммунизированных MPER-TbI; 3 – сыворотки кроликов, иммунизированных YkuJ-MPER; 4 – преиммунные сыворотки кроликов

согласующиеся с теоретически предсказанными структурами. Структура MPER-TbI оказалась преимущественно  $\alpha$ -спиральной, что согласуется с предсказанной методом PSSfinder вторичной структурой. Количество  $\beta$ -тяжелых элементов в YkuJ-MPER согласуется с построенной моделью пространственной структуры, а доля  $\alpha$ -спиралей меньше по сравнению с моделью, в которой оба встроенных участка MPER имеют  $\alpha$ -спиральную конформацию, соответствующую эпитопу антитела 10E8. Это говорит в пользу того, что центральный  $\beta$ -лист YkuJ-MPER остается стабильным, а встроенные эпитопы являются гибкими, как и предполагалось.

Оба иммуногена оказались хорошо растворимыми в физиологических условиях. Одна из известных проблем MPER как иммуногена – его гидрофобность [20], и, как и ожидалось, наши конструкции позволили ее преодолеть.

Результаты дот-блот-анализа показали, что YkuJ-MPER и MPER-TbI могут специфически взаимодействовать с МКА 4E10 и 10E8, которые связываются с MPER в  $\alpha$ -спиральной конформации, а также с антителом 2F5, которое связывается с MPER в конформации без регулярной вторичной структуры [14]. Полученный результат косвенно указывает на конформационную подвижность встроенного участка MPER. Нами не была проведена экспериментальная проверка того, сколько молекул антител может

связаться с одной белковой молекулой YkuJ-MPER, но модели показывают, что существует принципиальная возможность связывания сразу двух антител. Также предполагается, что MPER-TbI может связывать одновременно два антитела, так как его структура достаточно подвижна, и это предположение тоже нуждается в экспериментальной проверке.

Иммунизация лабораторных животных очищенными препаратами белков показала, что в организме кроликов формируются специфические антитела, титры которых возрастают уже после первой иммунизации. Более того, установлено, что антитела, возникающие в результате иммунизации YkuJ-MPER, взаимодействуют с MPER-TbI, и наоборот. Поскольку, за исключением гистидиновой метки (6 а.о. His), у YkuJ-MPER и MPER-TbI нет общих фрагментов, кроме MPER-области, можно предположить, что эти конструкции вызывают индукцию анти-MPER-антител.

С помощью тест-системы New Lav Blot I показано, что антитела, полученные при иммунизации животных как YkuJ-MPER, так и MPER-TbI, взаимодействуют с сорбированными белками ВИЧ, а именно с gp41 и gp160 (рис. 10). Кроме того, MPER-TbI индуцирует образование антител, распознающих белок gp120, благодаря тому, что в состав белка-носителя TbI\_tag входят фрагменты gp120 ВИЧ-1 (env 102–118, env 309–317 и env 421–437).

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе разработаны два иммуногена, способные обеспечить индукцию анти-MPER-антител: один из них создан на основе белка YkuJ, который ранее не использовали в качестве носителя вирусных эпитопов, второй – на базе хорошо изученного нами ранее иммуногена TbI. Показано, что химерные белки взаимодействуют с bNAbs, мишенями которых служит MPER ВИЧ-1. Результаты перекрестных проверок иммуногенных свойств YkuJ-MPER и MPER-TbI и иммуноблота с белками ВИЧ-1 свидетельствуют, что обе конструкции способны обеспечить формирование анти-MPER-антител у иммунизированных животных. Проведено предварительное исследование структурных особенностей разработанных иммуногенов. Результаты исследования и химерные белки (YkuJ-MPER и MPER-TbI) могут служить основой для разработки иммуногенов, фокусирующих гуморальный иммунный ответ на регионах уязвимости ВИЧ-1. ●

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 18-34-00314.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Eisinger R.W., Fauci A.S. // *Emerg. Infect. Dis.* 2018. V. 24. № 3. P. 413–416.
2. Durova O.M., Vorobiev I.I., Smirnov I.V., Reshetnyak A.V., Telegin G.B., Shamborant O.G., Orlova N.A., Genkin D.D., Bacon A., Ponomarenko N.A., et al. // *Mol. Immunol.* 2009. V. 47. № 1. P. 87–95.
3. Huang J., Kang B.H., Pancera M., Lee J. H., Tong T., Feng Y., Imamichi H., Georgiev I.S., Chuang G., Druz A., et al. // *Nature.* 2014. V. 515. № 7525. P. 138–142.
4. Sok D., Burton D.R. // *Nat. Immunol.* 2018. V. 19. № 11. P. 1179–1188.
5. Hessel A.J., Rakasz E.G., Tehrani D.M., Huber M., Weisgrau K.L., Landucci G., Forthal D.N., Koff W.C., Poignard P., Watkins D.I., et al. // *J. Virol.* 2010. V. 84. № 3. P. 1302–1313.
6. Pegu A., Hessel A.J., Mascola J.R., Haigwood N.L. // *Immunol. Rev.* 2017. V. 275. № 1. P. 296–312.
7. Subbaraman H., Schanz M., Trkola A. // *Retrovirology.* 2018. V. 15. № 1. P. 1–14.
8. Vzorov A.N., Uryvaev L.V. // *Mol. Biol.* 2017. V. 51. № 6. P. 819–829.
9. Saunders K.O., Verkoczy L.K., Jiang C., Zhang J., Parks R., Chen H., Housman M., Bouton-Verville H., Shen X., Trama A.M., et al. // *Cell. Rep.* 2017. V. 21. № 13. P. 3681–3690.
10. Haynes B.F., Moody M.A., Alam M., Bonsignori M., Verkoczy L., Ferrari G., Gao F., Tomaras G.D., Liao H., Kelsie G. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2014. V. 134. № 1. P. 3–10.
11. Shcherbakov D.N., Bakulina A.Y., Karpenko L.I., Ilyichev A.A. // *Acta Naturae.* 2015. V. 7. № 4. P. 11–21.
12. Montero M., Houten N.E., Wang X., Scott J.K. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2008. V. 72. № 1. P. 54–84.
13. Williams L.D., Ofek G., Schätzle S., McDaniel J.R., Lu X., Nicely N.I., Wu L., Loughheed C.S., Bradley T., Louder M.K., et al. // *Sci. Immunol.* 2017. V. 2. № 7. P. eaal2200.
14. Liu H., Su X., Si L., Lu L., Jiang S. // *Protein Cell.* 2018. V. 9. № 7. P. 1–20.
15. Venditto V.J., Wiczorek L., Molnar S., Teque F., Landucci G., Watson D.S., Forthal D., Polonis V.R., Levy J.A., Szoka F.C. // *J. Clin. Vaccine Immunol.* 2014. V. 21. № 8. P. 1086–1093.
16. Ye L., Wen Z., Dong K., Wang X., Bu Z., Zhang H., Compans R.W., Yang C. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 5. P. 1–12.
17. Correia B.E., Ban Y.E., Holmes M.A., Xu H., Ellingson K., Kraft Z., Carrico C., Boni E., Sather D.N., Zenobia C., et al. // *Structure.* 2010. V. 18. № 9. P. 1116–1126.
18. Kelsie G., Haynes B.F. // *Immunol. Rev.* 2017. V. 275. № 1. P. 79–88.
19. Irimia A., Serra A.M., Sarkar A., Jacak R., Kalyuzhnyi O., Sok D., Saye-Francisco K.L., Schiffner T., Tingle R., Kubitz M., et al. // *PLoS Pathog.* 2017. V. 13. № 2. P. 1–20.
20. Scholz C., Schaarschmidt P., Engel A.M., Andres H., Schmitt U., Faatz E., Balbach J., Schmid F.X. // *J. Mol. Biol.* 2005. V. 345. № 5. P. 1229–1241.
21. Kim M., Song L., Moon J., Sun Z.Y., Bershteyn A., Hanson M., Cain D., Goka S., Kelsie G., Wagner G., et al. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 44. P. 31888–31901.
22. Рудометов А.П., Андреева Н.Б., Чикаев А.Н., Щербак Н.С., Каплина О.Н., Карпенко Л.И. // *Сиб. научный мед. журн.* 2018. Т. 8. № 4. С. 37–43.
23. Kozłowski L.P., Bujnicki J.M. // *BMC Bioinformatics.* 2012. V. 13. № 1. P. 1–11.
24. Perczel A., Hollósi M., Tusnády G., Fasman G.D. // *Protein Eng.* 1991. V. 4. № 6. P. 669–679.
25. Karpenko L.I., Bazhan S.I., Bogryantseva M.P., Ryndyuk N.N., Ginko Z.I., Kuzubov V.I., Lebedev L.R., Kaplina O.N., Reguzova A.Y., Ryzhikov A.B., et al. // *Russ. J. Bioorgan. Chem.* 2016. V. 42. № 2. P. 170–182.
26. Rathore U., Kesavardhana S., Mallajosyula V.V., Varadarajan R. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1844. № 11. P. 1891–1906.
27. Zolla-Pazner S., Kong X., Xunqing J., Cardozo T., Nádas A., Cohen S., Totrov M., Seaman M.S., Wang Sh., Lu Sh. // *J. Virol.* 2011. V. 85. № 19. P. 9887–9898.
28. Xu K., Acharya P., Kong R., Cheng C., Chuang G.Y., Liu K., Louder M.K., O'Dell S., Rawi R., Sastry M., et al. // *Nat. Med.* 2018. V. 4. № 6. P. 857–867.

УДК 577.21

# Длинная некодирующая РНК LL35/Falcor – регулятор экспрессии транскрипционного фактора Foxa2 в гепатоцитах нормальной ткани печени мыши и при фибротических изменениях

О. В. Сергеева<sup>1\*</sup>, С. А. Коринфская<sup>1</sup>, И. И. Курочкин<sup>1</sup>, Т. С. Зацепин<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Сколковский институт науки и технологий, Центр наук о жизни, 121205, Россия, Москва, территория Инновационного центра «Сколково», Большой бул., 30, стр. 1<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, 119991, Россия, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 3

\*E-mail: o.sergeeva@skoltech.ru

Поступила в редакцию 22.04.2019

Принята к печати 20.06.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-66-74

**РЕФЕРАТ** Длинные некодирующие РНК (днРНК) играют важную роль в регуляции транскрипции, сплайсинга, трансляции и других процессов в клетке. Ранее у человека и мыши были обнаружены днРНК (DEANR1 и LL35/Falcor соответственно), расположенные в геномном окружении в непосредственной близости от транскрипционного фактора Foxa2. В данной работе показана тканеспецифическая экспрессия днРНК LL35/Falcor в печени и легких мыши. Применение антисмысловых олигонуклеотидов позволило на 90% подавить экспрессию днРНК LL35/Falcor. При этом уменьшилось количество мРНК и белка Foxa2, что подтверждает участие днРНК LL35/Falcor в регуляции фактора транскрипции Foxa2. Нами показано снижение экспрессии днРНК LL35 при фиброзе печени, что коррелирует с выявленным ранее уменьшением количества мРНК фактора Foxa2. Таким образом, днРНК LL35 регулирует экспрессию Foxa2 в печени не только в норме, но и при фиброзе, что позволяет рассматривать эту днРНК в качестве биомаркера этого патологического процесса.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** некодирующие РНК, печень, транскрипционный фактор Foxa2.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** днРНК – длинная некодирующая РНК; миРНК – малая интерферирующая РНК; АСО – антисмысловый олигонуклеотид.

## ВВЕДЕНИЕ

Анализ транскриптома человека показал, что менее 2% генома кодирует белки, а среди остальных 98% преобладают гены некодирующих РНК. Среди множества некодирующих РНК можно выделить короткие (меньше 200 нуклеотидов) и длинные РНК (больше 200 нуклеотидов) [1]. Длинные некодирующие РНК (днРНК) выполняют регуляторные функции во всех основных клеточных процессах. Они участвуют в регуляции транскрипции локально (*in cis*) и дистанционно (*in trans*), воздействуя на такие регуляторные элементы, как промоторы и энхансеры, а также на структуру хроматина

и активность РНК-полимеразы [2]. днРНК могут участвовать в регуляции трансляции [3] и альтернативного сплайсинга за счет привлечения белковых факторов [4], а также служить «молекулярными ловушками» для миРНК и регулировать их количество в свободном виде в клетке [5]. днРНК не только выполняют регуляторную функцию в клетке, часто они экспрессируются тканеспецифически и/или транскрибируются только в определенных условиях. Увеличение транскрипции ряда днРНК, таких, как MALAT-1, HOTAIR, H19 и HULC, стимулирует развитие онкологических заболеваний [6].

С каждым годом растет количество известных функционально важных длинных некодирующих РНК, однако механизмы действия большинства из них остаются неизвестными. Несмотря на то что работа с клеточными культурами позволяет исследовать молекулярные механизмы действия днРНК, использование животных моделей обеспечивает более общий и корректный подход к изучению функций днРНК. Однако низкая гомология днРНК даже у близких видов затрудняет подобные исследования, а в ряде случаев гомология наблюдается только на уровне вторичной структуры. Поиск функциональных аналогов человеческих днРНК у мышей также позволяет расширить возможности изучения днРНК за счет использования различных мышиных моделей заболеваний.

Ранее было показано, что днРНК DEANR1 человека участвует в регуляции пролиферации, способствует апоптозу клеток хориокарциномы [7], влияет на сигнальный путь Notch [8] и служит потенциальным биомаркером ряда онкологических заболеваний, таких, как хориокарцинома [9], рак желудка [10], поджелудочной железы [11] и толстой кишки [12], нескольких типов рака легких [13]. Ген днРНК DEANR1 расположен в непосредственной близости от гена транскрипционного фактора Foxa2 в геноме человека. днРНК DEANR1 участвует в регуляции Foxa2 в процессе дифференцировки клеток энтодермы поджелудочной железы человека [14]. Предложен механизм активации транскрипции гена *Foxa2* путем привлечения белков Smad2/3 к его промотору. Foxa2 необходим для развития печени из энтодермы [15] и является транскрипционным активатором печеньеспецифических генов – альбумина и трансферрина, а также играет важную роль в гомеостазе глюкозы в печени [16]. При анализе геномного окружения *Foxa2* в геноме мыши был обнаружен потенциальный функциональный аналог днРНК DEANR1 – днРНК LL35/Falcor (далее LL35) [17]. Делеция гена, кодирующего днРНК LL35, приводит к снижению уровня мРНК транскрипционного фактора Foxa2 на 25–30% в эпителии легких мыши и не приводит к явному фенотипу при развитии легких эмбриона. Однако LL35 играет важную роль в регулировании Foxa2 в ответ на дополнительные воздействия, такие, как повреждение легких [18]. В рамках данной работы нами охарактеризована днРНК LL35: определена тканеспецифическая экспрессия в органах мыши, показана внутриклеточная локализация, проведено сравнение различных подходов к ингибированию днРНК, впервые получен нокдаун днРНК LL35, показано участие в регуляции транскрипционного фактора Foxa2 в клетках печени мыши. Также впервые выявлено уменьшение количества днРНК при фиброзе печени.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Клеточные линии

Гепатоциты мыши AML12 (ATCC, США) культивировали в среде DMEM/F12, содержащей 10% фетальной бычьей сыворотки, при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>.

### Выделение ядерных и цитоплазматических клеточных экстрактов

Клетки AML12 ( $\sim 1 \times 10^6$ ), выращенные в стандартных условиях, снимали с подложки 0.25% раствором трипсина в 0.5 мМ EDTA, промывали фосфатным буфером (10 мМ фосфата натрия, 100 мМ хлорида натрия, pH 7.4) и осаждали центрифугированием в течение 5 мин при 500 g. Осадок ресуспендировали в буфере CE (20 мМ HEPES (pH 7.4), 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10% глицерин, 0.05% NP-40), содержащем ингибиторы протеаз. После чего суспензию инкубировали на льду в течение 10 мин и центрифугировали при 1700 g в течение 5 мин при 4°C. Фракция супернатанта является цитоплазматическим клеточным экстрактом. Осадок ресуспендировали в буфере NE (20 мМ HEPES (pH 7.4), 1.5 мМ MgCl<sub>2</sub>, 10% глицерин, 0.05% NP-40, 500 мМ NaCl), содержащем ингибиторы протеаз. После чего суспензию инкубировали на льду в течение 10 мин и центрифугировали в течение 5 мин при 1700 g при охлаждении до 4°C. Фракция супернатанта является ядерным клеточным экстрактом. Суммарную РНК из разделенных экстрактов выделяли с помощью реагента Trizol (Invitrogen, США) по методике производителя.

### Анализ транскрипции генов

Суммарную РНК из органов мыши или клеток AML12 выделяли с помощью реагента Trizol (Invitrogen, США) по методике производителя. Далее  $\sim 1$  мкг суммарной РНК обрабатывали ДНКазой I (Thermo Scientific, США) по методике производителя для удаления остатков геномной ДНК и проводили реакцию обратной транскрипции с использованием набора реагентов Maxima First Strand cDNA synthesis kit (Thermo Scientific, США). Реакционную смесь разбавляли в 3 раза водой и проводили реакцию амплификации в режиме реального времени (ОТ-ПЦР) с использованием набора реагентов PowerUp SYBR Green Master Mix (Applied Biosystems, США) по методике производителя (0.3 мкМ смеси праймеров, 0.2 мкг кДНК). Для амплификации днРНК LL35 были выбраны два набора праймеров, которые в дальнейшем использовали во всех экспериментах (таблица). Продукты реакции анализировали методом гелеэлектрофореза в 1% агарозном геле в ТАЕ-буфере



Нуклеотидные последовательности праймеров для ОТ-ПЦР, миРНК и АСО

Праймер	Нуклеотидная последовательность, 5'→3'
LL35-1-F	<i>TTTGGCCAAGGGAGAAAGCTCAGA</i>
LL35-1-R	<i>ACGGTGCCCTGTAACTTACCTGAAG</i>
LL35-2-F	<i>GCTCGGTTTGAGCTCAAATAAATG</i>
LL35-2-R	<i>CAGAGGCTCTAGCCACGATGGAG</i>
Gapdh-F	<i>TGCACCACCAACTGCTTAGC</i>
Gapdh-R	<i>GGATGCAGGGATGATG</i>
U2-F	<i>GAAGTAGGAGTTGGAATAGGA</i>
U2-R	<i>ACCGTTCCTGGAGGTA</i>
Фоха2-F	<i>TATGCTGGGAGCCGTGAAGATGG</i>
Фоха2-R	<i>GCGTTCATGTTGCTCACGGAAGAG</i>
миРНК 1	<i>cucAAAGuuuAGAGuucAuTsT AUGAACUCuAAACUUUGAGTsT</i>
миРНК 2	<i>uAAcuuAccuGAAGAGGAATsT UUCUCUUCAGGuAAGUuATsT</i>
миРНК 3	<i>cuGAAuuAGAGAAAcAAcuTsT AGUUGUUUCUCuAAUUCAGTsT</i>
миРНК 4	<i>GucAGuAAAuAAcGAAAAATsT UUUUCGGUUGUuACUGACTsT</i>
миРНК 5	<i>GuGGAuAAuGuuAAGcuuTsT AAGCUuAAcAUuAUUCcACTsT</i>
миРНК 6	<i>cAAcAuGAuGGcAAGGuAuTsT AuACCUUGCcAUcAUGUUGTsT</i>
миРНК 7	<i>uGGuGuGGAuAAuGuuAATsT UuAAcAUuAUUCcAcAcATsT</i>
миРНК 8	<i>GGuccuAAAuGGuuGAAGATsT UCUUCAAcAUUuAGGACCTsT</i>
миРНК 9	<i>AuGGcAAGGuAuGAAccAATsT UUGGUUCuAUcACCUUGCcAUTsT</i>
миРНК 10	<i>cuAAAuGGuuGAAGAAcAcTsT GUGUUCUUCAAcAUUuAGTsT</i>
Контрольная миРНК	<i>cuUaCgCuGaGuAcUuCgATCGAAGTATsT UCgAaGuAcUcAgCgUaAgTsT</i>
АСО 1	<i>gsgsgsasusCsCsTsGsGsAsAsAsAsAsAsAsAsasgsasasu</i>
АСО 2	<i>gsasgsususGsGsAsAsAsGsUsGsAsAscscscsasu</i>
АСО 3	<i>ususgscscsAsTsCsAsTsGsTsTsGsTsascsuscsg</i>
АСО 4	<i>csescscsusCsTsCsAsGsTsGsCsTsGsgsasascsc</i>
АСО 5	<i>csasgsctasTsAsTsCsAsGsCsCsAsAsGscsususcsg</i>
АСО 6	<i>gsasusasgsGsTsCsAsGsGsCsAsGsGsAsususcscsu</i>
АСО 7	<i>ususasgsgsTsGsGsCsAsGsTsTsCsAsgsgsasgsa</i>
АСО 8	<i>gsuscsgsgsTsAsTsCsAsGsTsTsGsCsasgsasgsa</i>
АСО 9	<i>asasgsasAsAsGsAsTsCsTsTsCsAstsgsgsgsu</i>
АСО 10	<i>gsgststsgsTsTsTsAsCsTsGsAsCsTsTstsgstststa</i>
АСО 11	<i>csasasgsTsAsTsCsGsAsTsCsAsGsCsGsususasusa</i>
АСО 12	<i>asasusususGsCsTsGsAsAsGsTsGsTsgsasuscsgu</i>
АСО 13	<i>usgsasgsgscsCsCsAsGsTsCsAsGsTsCsCsCusgscsusasc</i>
АСО 14	<i>usgsusususAsCsCsTsGsGsCsCsAsGsTscsasgscsusgsc</i>
Контрольный АСО	<i>tscsgsasasgsTsAsCsTsCsAsGscgstsasasg</i>

Примечание. Заглавными буквами обозначены рибонуклеотиды, заглавными курсивом – 2'-дезоксинуклеотиды, строчными – 2'-О-метилрибонуклеотиды, s – тифосфатные группы.

(40 мМ Трис-ацетат, 1 мМ EDTA, pH 7.6). При проведении ОТ-ПЦР разделенных клеточных фракций количество целевой РНК в ядерной фракции нормировали по количеству U2 мяРНК, а количество целевой РНК в цитоплазматической фракции – по мРНК Gapdh.

### Трансфекция клеток AML12 миРНК и антисмысловыми олигонуклеотидами

миРНК и антисмысловые олигонуклеотиды (АСО) (таблица) были синтезированы по амидофосфитной схеме, очищены методом ион-обменной хроматографии, а их чистоту подтверждали методом ВЭЖХ-МС. Клетки AML12 ( $\sim 1 \times 10^5$ ) трансфицировали миРНК или АСО в концентрации 10 и 5 нМ соответственно, используя реагент Lipofectamine-RNAiMAX (Invitrogen) по протоколу производителя. В качестве контроля использовали миРНК и АСО к гену люциферазы (таблица). Для получения смесей миРНК и АСО проводили эквимольное смешивание. миРНК: № 1 1+2+3+6; № 2 1+3+2; № 3 1+3+6; № 4 1+3+6; № 5 2+3+6. АСО: № 1 3+4+7+8+14; № 2 3+7+14; № 3 3+4+14; № 4 3+14. Суммарную РНК выделяли через 24 ч после трансфекции с использованием реагента Trizol (Invitrogen, США) по методике производителя, эффективности ингибирования анализировали методом ОТ-ПЦР.

### Вестерн-блоттинг

Клетки AML12 ( $\sim 1 \times 10^6$ ) лизировали в буфере RIPA (Thermo Scientific, США), содержащем 1 мМ ДТТ, 0.05% Тритон X-100, 0.2 мМ фенилметилсульфонилфторида, ингибиторы протеаз и фосфатаз. Концентрацию белков в лизатах определяли методом спектрофотометрии с использованием реактива Брэдфорда (Thermo Scientific, США). Для дальнейшего анализа использовали лизат, содержащий 40 мкг белка, который предварительно денатурировали при 95°C в течение 5 мин. Белки разделяли методом гель-электрофореза в 10% ПААГ в присутствии трис-глицинового буфера (pH 8.3), после чего переносили на мембрану PVDF (Millipore) при напряжении 70 В в течение 1 ч. Далее мембрану инкубировали в течение 1 ч с 5% раствором БСА, а затем с раствором специфических антител. Использовали антитела против белков Фоха2 (ab108422 Abcam, США), актина (ab179467 Abcam, США), конъюгаты пероксидазы хрена с антителами к иммуноглобулинам кролика и мыши (ab6721 и ab6728 Abcam, США). Вторичные антитела визуализировали на мембранах методом хемилюминесценции с использованием набора Pierce ECL (Thermo Scientific, США) по методике производителя.

### Статистический анализ экспериментальных данных

Для построения диаграмм в работе были использованы результаты шести независимых экспериментов. Статистическую обработку данных проводили при помощи программного обеспечения GraphPad Prism (версия 6.0) с использованием двухвыборочного *t*-критерия, а также двухфакторного дисперсионного анализа ANOVA или дисперсионного анализа ANOVA с повторными измерениями и *t*-теста Сидака. Данные считали статистически значимыми при  $P < 0.05$ .

### Предсказание вторичной структуры днРНК LL35

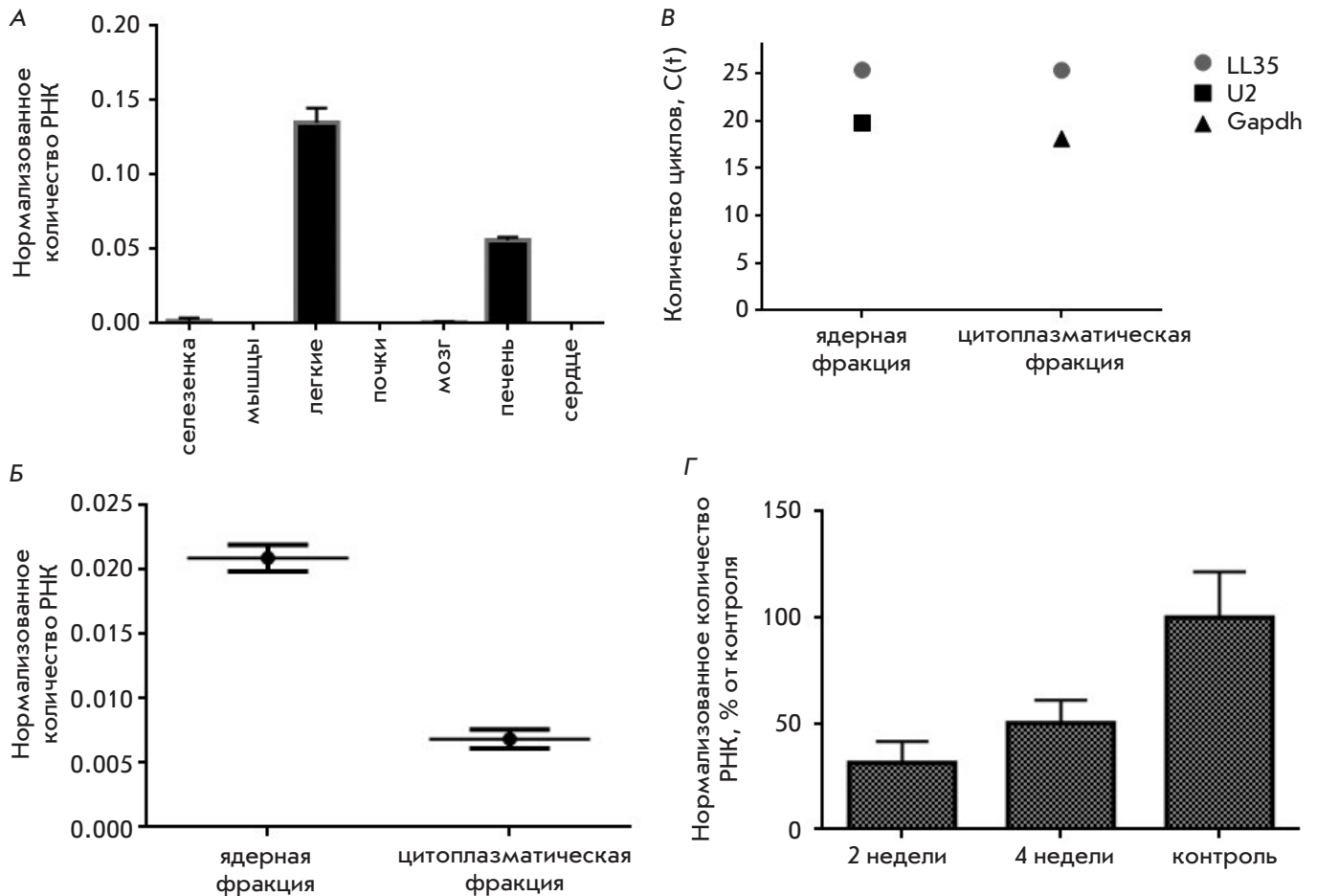
Для определения возможной вторичной структуры днРНК LL35 использовали программу ViennaRNA (<http://rna.tbi.univie.ac.at/>), позволяющую предсказывать вторичные структуры РНК, обладающие минимальной свободной энергией и учитывающей вероятность образования пар оснований для РНК.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Определение уровня экспрессии днРНК LL35 в органах мыши и в клетках печени AML12

Согласно данным базы NCBI, ген днРНК LL35 (9020622O22Rik) располагается на расстоянии 2500 нуклеотидов от гена транскрипционного фактора Фоха2 и кодирует 38 аннотированных транскриптов, большая часть которых имеет общие экзоны (первый и два последних) (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/?term=9030622O22Rik>). Анализ уровня экспрессии экзонов, общих для всех транскриптов, использован для определения количества днРНК LL35 в органах мыши. Показана тканевая специфичность экспрессии и наибольшая представленность днРНК LL35 в легких и печени (рис. 1А). Для определения локализации днРНК LL35 в клетках AML12 нормальной печени были выделены ядерные и цитоплазматические экстракты с дальнейшим их анализом методом ОТ-ПЦР. Установлено, что днРНК LL35 находится преимущественно в ядре клетки – только ~20% общего количества РНК локализовано в цитоплазме (рис. 1Б). При этом количество РНК LL35 в ядре всего в 1.3 раза меньше количества мяРНК U2, что свидетельствует об уровне транскрипции, высоком для днРНК (рис. 1В).

Ранее было показано, что уровень мРНК транскрипционного фактора Фоха2 снижается при фиброзе печени, а делеция этого фактора предрасполагает к развитию фиброза [19]. Нами выявлено снижение количества днРНК LL35 до 30% от исходного уровня в образцах печени мыши с фиброзом, индуцированным тетрахлоридом углерода, через 2 недели после индукции фиброза, а затем уровень днРНК частично восстанавливается – до 60% к 4 неделям после ин-



**Рис. 1.** А – определение количества днРНК LL35 в органах мыши (контроль – мРНК Gapdh); Б – определение локализации днРНК LL35 в гепатоцитах AML12 (контроль – РНК U2 для ядерной клеточной фракции, мРНК Gapdh – для цитоплазматической); В – сравнение уровня экспрессии днРНК LL35 в ядерной и цитоплазматической фракциях гепатоцитов мыши AML12 с контрольными РНК U2 и Gapdh соответственно; Г – количество днРНК LL35 в образцах печени мыши с индуцированным фиброзом, полученных на второй и четвертой неделе после окончания воздействия тетрахлорида углерода (контроль – мРНК Gapdh)

дукции (рис. 1Г).

### Подбор условий ингибирования днРНК LL35 в клетках AML12

На первом этапе работы для ингибирования РНК LL35 *in vitro* мы использовали метод РНК-интерференции. Была проанализирована последовательность РНК LL35 и исключены возможные участки связывания миРНК, а также последовательности, встречающиеся в других РНК транскриптома мыши. После чего был проведен дизайн и синтез 10 миРНК, специфичных к РНК LL35, содержащих 2'-O-метильные пиримидиновые нуклеотиды и тиофосфатные группы для увеличения стабильности к действию внутриклеточных нуклеаз. Эффективность ингибирования LL35 отдельными

миРНК не превышала 40% (рис. 2А). С целью улучшения эффективности ингибирования были проверены наборы смесей миРНК (три-четыре миРНК в смеси). В данном случае ингибирование составило примерно 60% от исходного уровня РНК LL35 (рис. 2Б). Одним из объяснений такой невысокой эффективности миРНК может служить преимущественно ядерная локализация днРНК LL35 и отсутствие активного транспорта ядро ↔ цитоплазма.

С учетом локализации днРНК LL35 в ядре в качестве альтернативного подхода к ингибированию днРНК LL35 были выбраны антисмысловые олигонуклеотиды (АСО). С использованием программного обеспечения ViennaRNA для дизайна АСО получена модель вторичной структуры днРНК LL35 (рис. 2В) [20]. Подобраны 14 антисмысловых оли-

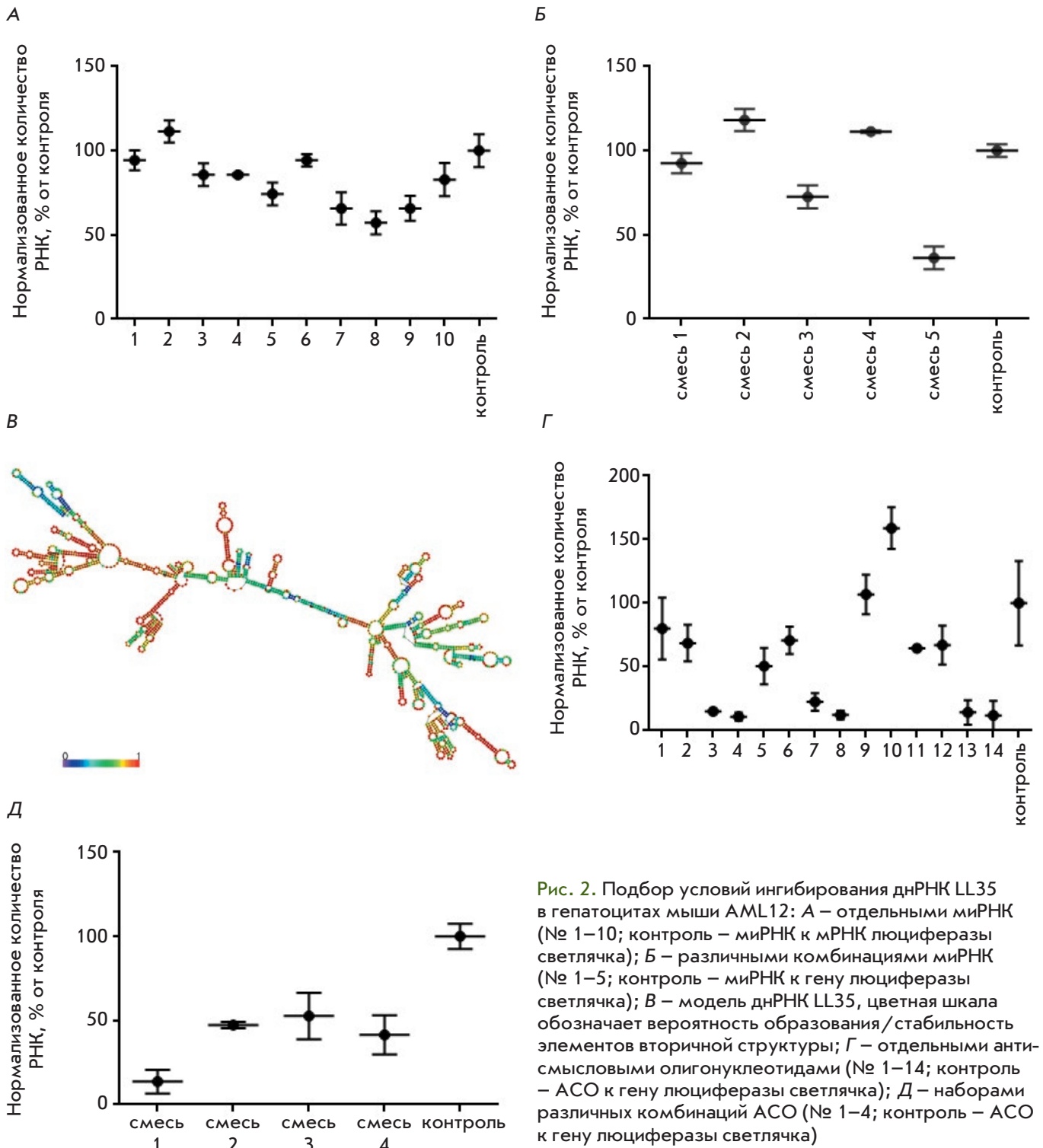


Рис. 2. Подбор условий ингибирования днРНК LL35 в гепатоцитах мыши AML12: А – отдельными миРНК (№ 1–10; контроль – миРНК к мРНК люциферазы светлячка); Б – различными комбинациями миРНК (№ 1–5; контроль – миРНК к гену люциферазы светлячка); В – модель днРНК LL35, цветная шкала обозначает вероятность образования/стабильность элементов вторичной структуры; Г – отдельными антисмысловыми олигонуклеотидами (№ 1–14; контроль – АСО к гену люциферазы светлячка); Д – наборами различных комбинаций АСО (№ 1–4; контроль – АСО к гену люциферазы светлячка)

гонуклеотидов, комплементарных выступающим петлям в предсказанной структуре РНК. АСО 3, 4, 7, 8, 13 и 14 показали более высокую эффективность ингибирования днРНК LL35 (рис. 2Г), чем отдельные миРНК и их смесь. Использование смеси

АСО № 1 позволило добиться снижения уровня экспрессии днРНК LL35 на 90% от исходного, поэтому эту смесь отобрали для дальнейшей работы (рис. 2Д).



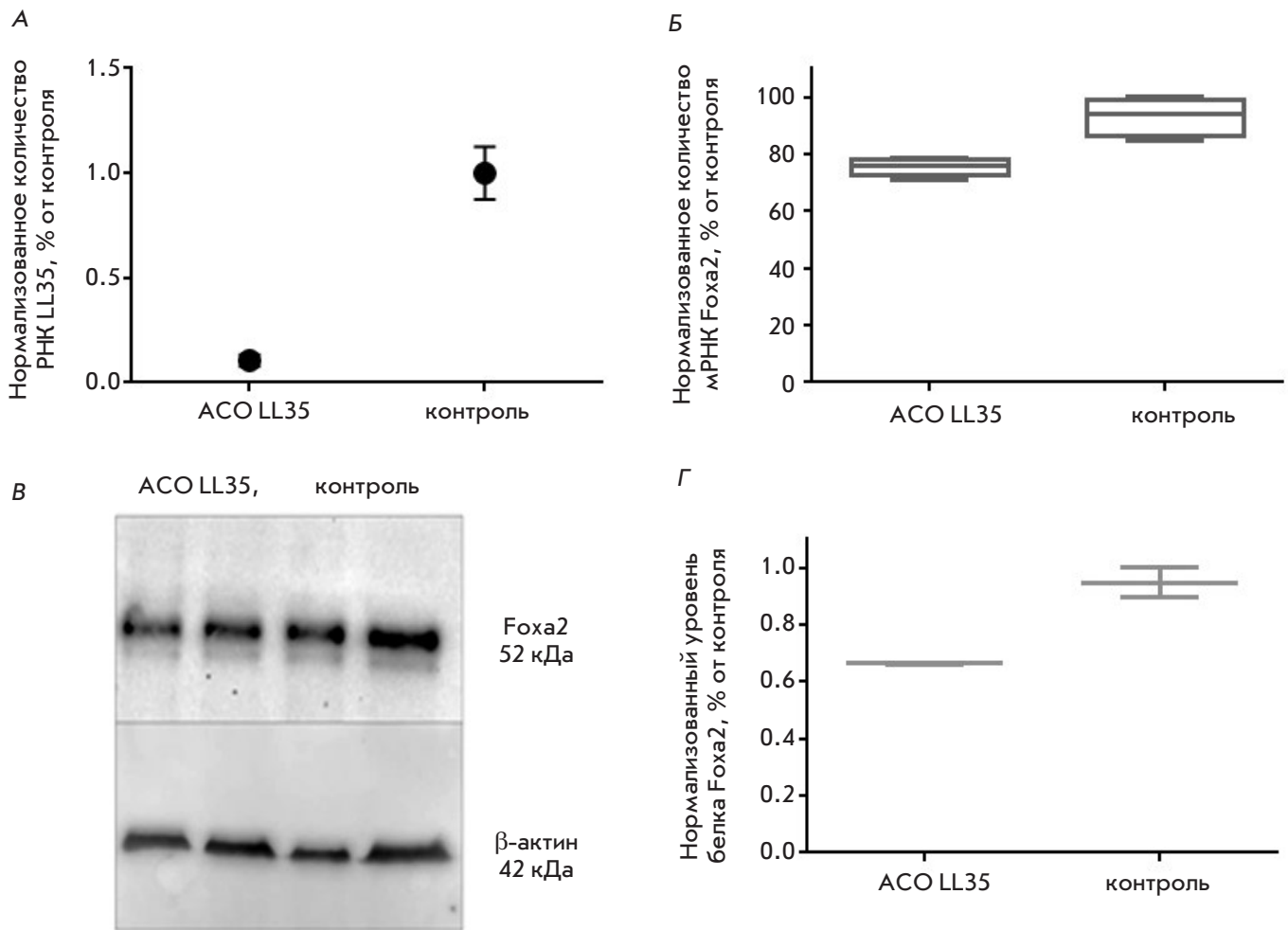


Рис. 3. А – эффективность ингибирования днРНК LL35 в гепатоцитах мыши AML12 смесью ACO № 1; Б – анализ количества мРНК транскрипционного фактора Foxa2 в условиях ингибирования днРНК LL35 методом ОТ-ПЦР-РВ (контроль – РНК Gapdh); В, Г – анализ количества белка транскрипционного фактора Foxa2 в условиях ингибирования днРНК LL35 методом Вестерн-блотинга (контроль –  $\beta$ -актин)

**днРНК LL35 участвует в регуляции транскрипционного фактора Foxa2 в гепатоцитах мыши AML12**

Ранее анализ транскриптома эмбриональных стволовых клеток человека на стадии дифференцировки выявил корреляцию изменений экспрессии днРНК DEANR1 и мРНК транскрипционного фактора Foxa2. Предложен возможный механизм активации транскрипции мРНК фактора Foxa2 за счет привлечения модуляторов транскрипции Smad2/3, которые прямо взаимодействуют с DEANR1 [14]. При ингибировании функционального аналога DEANR1 – днРНК LL35 (рис. 3А) в гепатоцитах мыши уровень экспрессии мРНК фактора Foxa2 снижается на 20% от исходного уровня мРНК (рис. 3Б). Количество белка транскрипционного фактора Foxa2 снижается на 30% (рис. 3В, Г).

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Фактор Foxa2 – важный регулятор дифференцировки энтодермы в различные типы тканей. Во взрослой печени Foxa2 действует как один из основных регуляторов транскрипции печень-специфичных генов, кодирующих ключевые участники липидного метаболизма и кетогенеза, он необходим для нормального функционирования органа [16]. Стоит также отметить важную роль Foxa2 в контроле процесса органогенеза печени [21]. В геноме днРНК DEANR1 человека и LL35 мыши расположены в непосредственной близости от гена транскрипционного фактора Foxa2. Был предложен механизм, посредством которого днРНК DEANR1 человека регулирует транскрипционный фактор Foxa2 в эмбриональных стволовых клетках [14]. Геномная локализация гена днРНК LL35 позво-

лила предположить, что сходные функции выполняет и днРНК LL35, которая может участвовать в регуляции транскрипционного фактора Foxa2.

Согласно данным, представленным в базе NCBI, самое большое количество днРНК DEANR1 человека содержится в печени, на втором месте стоит желудок, потом легкие, поджелудочная железа, кишечник (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene/140828>). Анализ количества потенциального функционального аналога DEANR1 – РНК LL35 в органах мыши выявил ее тканеспецифичную экспрессию в легких и печени, что несколько отличается от экспрессии РНК DEANR1 человека. Возможно, что существуют различия в функциях DEANR1 и LL35 в ряде органов, поэтому мы выбрали печень в качестве объекта дальнейшей работы, так как обе эти днРНК высоко представлены в печени.

Нами показано, что в гепатоцитах мыши днРНК LL35, как и днРНК DEANR1 человека, находится, в основном, в ядре. Оптимальным подходом к ингибированию и изучению функции днРНК, мишени которых локализованы в ядре, считается использование антисмысловых олигонуклеотидов, однако при активном транспорте ядро ↔ цитоплазма могут использоваться и мРНК. мРНК обладают преимуществом при работе *in vivo*, так как они эффективны в меньших дозах и обеспечивают большую продолжительность подавления экспрессии мишеней, что позволяет минимизировать гепатотоксичность. После сравнения двух подходов мы остановились на АСО, которые с большей эффективностью подавляют экспрессию днРНК LL35. Однако использование одиночных АСО для подавления днРНК LL35 может приводить к сохранению функционально активной части днРНК. Для повышения вероятности инактивации функционального центра днРНК LL35 проверена эффективность ингибирования LL35 разными комбинациями АСО. С использованием данного подхода нам удалось добиться 90% ингибирования днРНК LL35 в гепатоцитах мыши. В условиях ингибирования днРНК в линии гепатоцитов мыши AML12 снижение мРНК Foxa2 составило 20%, а белка – 30%. Полученные данные хорошо согласуются с опубликованными данными об изменениях Foxa2 в клетках легких мыши в условиях эмбрионального нокаута гена днРНК LL35. Мы предполагаем аналогичный механизм регуляции транскрипционного фактора Foxa2 за счет привлечения белков Smad2/3 к промоторной области Foxa2, что приводит к активации транскрипции [14]. Также можно предположить, что во взрослой здоровой печени днРНК LL35 участвует в поддержании нормальной

функции печени за счет регулирования активации Foxa2 и его мишеней в зависимости от внешних сигналов.

Функции днРНК и молекулярные механизмы изучают преимущественно *in vitro*, что не позволяет определить их роль в развитии различных заболеваний. Оптимальным подходом к решению этой проблемы является изучение функций днРНК *in vivo*. Ранее показали, что при фиброзе печени происходит подавление транскрипционного фактора Foxa2 с последующим стрессом эндоплазматического ретикулума, приводящего к гибели гепатоцитов [19, 22]. Количество Foxa2 снижается также при травмах печени различной этиологии [22]. Обнаруженное нами снижение количества днРНК LL35 в образцах печени с индуцированным фиброзом согласуется с опубликованными ранее данными о снижении количества мРНК транскрипционного фактора Foxa2, что также подтверждает существование регуляции. Более того, уровень экспрессии днРНК LL35 на второй и четвертой неделе после индукции фиброза согласуется с пролиферативной активностью гепатоцитов при регенерации печени при фибротических повреждениях [23].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании полученных нами и опубликованных ранее данных можно заключить, что днРНК LL35 в мыши является функциональным аналогом днРНК человека DEANR1. В представленной работе показана тканеспецифическая экспрессия днРНК LL35 в печени и легких. Определена их ядерная локализация в клетках печени и впервые показано эффективное ингибирование экспрессии днРНК LL35 с использованием АСО. Снижение уровня РНК LL35 приводит к уменьшению количества мРНК и белка фактора Foxa2 в клетках печени. Впервые установлено снижение количества днРНК LL35 в процессе фиброза печени, что свидетельствует о перспективности дальнейшего изучения днРНК *in vivo*. Исходя из полученных результатов можно предположить, что днРНК LL35 вовлечена в молекулярные механизмы развития стресса эндоплазматического ретикулума гепатоцитов, возникающего при развитии фиброза печени. С другой стороны, днРНК LL35 может также участвовать в развитии фиброза за счет взаимодействия с модуляторами транскрипции Smad2/3 [14] в звездчатых клетках. Например, днРНК LFAR1 регулирует количество и степень фосфорилирования белков Smad2/3, что, в свою очередь, приводит к их транслокации в ядро и активации экспрессии ряда генов, в том числе участвующих в синтезе коллагена типа I [24]. Все эти гипотезы нуждаются в дальнейшей проверке, а возможность адресной доставки

предложенных антисмысловых олигонуклеотидов в клетки печени *in vivo* позволяет изучать днРНК LL35 в различных мышинных моделях заболеваний печени [25]. ●

Авторы благодарят Ю.В. Котелевцева (Сколковский институт науки и технологий) за предоставленные образцы печени мыши

с индуцированным фиброзом; А.Н. Малявко и О.А. Донцову (Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова) за ценные советы на начальном этапе работы.

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФ (грант № 17-74-10140).

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Al-Tobasei R., Paneru B., Salem M. // PLoS One. 2016. V. 11. № 2. P. e0148940.
- Long Y., Wang X., Youmans D.T., Cech T.R. // Sci. Adv. 2017. V. 3. № 9. P. eaao2110.
- Dykes I.M., Emanuelli C. // Genom. Proteom. Bioinf. 2017. V. 15. № 3. P. 177–186.
- Tripathi V., Ellis J.D., Shen Z., Song D.Y., Pan Q., Watt A.T., Freier S.M., Bennett C.F., Sharma A., Bubulya P.A., et al. // Mol. Cell. 2010. V. 39. № 6. P. 925–938.
- Militello G., Weirick T., John D., Döring C., Dimmeler S., Uchida S. // Brief. Bioinform. 2017. V. 18. № 5. P. 780–788.
- Smekalova E.M., Kotelevtsev Y.V., Leboeuf D., Shcherbinina E.Y., Fefilova A.S., Zatsepin T.S., Koteliansky V. // Biochimie. 2016. V. 131. P. 159–172.
- Wang Y., Xue K., Guan Y., Jin Y., Liu S., Wang Y., Liu S., Wang L., Han L. // Oncol. Res. 2017. V. 25. № 5. P. 733–742.
- Zhang H.-F., Li W., Han Y.-D. // Cancer Biomark. Sect. Dis. Markers. 2018. V. 21. № 3. P. 575–582.
- Wang Y., Xue K., Guan Y., Jin Y., Liu S., Wang Y., Liu S., Wang L., Han L. // Oncol. Res. 2017. V. 25. № 5. P. 733–742.
- Fan Y., Wang Y.-F., Su H.-F., Fang N., Zou C., Li W.-F., Fei Z.-H. // J. Hematol. Oncol. 2016. V. 9. № 1. P. 57–72.
- Müller S., Raulefs S., Bruns P., Afonso-Grunz F., Plötner A., Thermann R., Jäger C., Schlitter A.M., Kong B., Regel I., et al. // Mol. Cancer. 2015. V. 14. P. 94–112.
- Wang Z.K., Yang L., Wu L.L., Mao H., Zhou Y.H., Zhang P.F., Dai G.H. // Braz. J. Med. Biol. Res. 2017. V. 51. № 2. P. e6793.
- Liu Y., Xiao N., Xu S.-F. // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2017. V. 21. № 24. P. 5691–5695.
- Jiang W., Liu Y., Liu R., Zhang K., Zhang Y. // Cell Rep. 2015. V. 11. № 1. P. 137–148.
- Lee C.S., Friedman J.R., Fulmer J.T., Kaestner K.H. // Nature. 2005. V. 435. № 7044. P. 944–947.
- Wolfrum C., Asilmaz E., Luca E., Friedman J.M., Stoffel M. // Nature. 2004. V. 432. № 7020. P. 1027–1032.
- Herriges M.J., Swarr D.T., Morley M.P., Rathi K.S., Peng T., Stewart K.M., Morrisey E.E. // Genes Dev. 2014. V. 28. № 12. P. 1363–1379.
- Swarr D.T., Herriges M., Li S., Morley M., Fernandes S., Sridharan A., Zhou S., Garcia B.A., Stewart K., Morrisey E.E. // Genes. Dev. 2019. V. 33. № 11–12. P. 656–668.
- Wang W., Yao L.-J., Shen W., Ding K., Shi P.-M., Chen F., He J., Ding J., Zhang X., Xie W.-F. // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 15532–15547.
- Lorenz R., Bernhart S.H., Höner zu Siederdisen C., Tafer H., Flamm C., Stadler P.F., Hofacker I.L. // Algorithms Mol. Biol. 2011. V. 6. P. 26–40.
- Lee C.S., Friedman J.R., Fulmer J.T., Kaestner K.H. // Nature. 2005. V. 435. № 7044. P. 944–947.
- Wang K. // Cell. Signal. 2015. V. 27. № 4. P. 729–738.
- Koyama Y., Brenner D.A. // J. Clin. Invest. 2017. V. 127. № 1. P. 55–64.
- Peng H., Wan L.-Y., Liang J., Zhang Y.-Q., Ai W.-B., Wu J.-F. // Cell Biosci. 2018. V. 8. P. 63–71.
- Crooke S.T., Witztum J.L., Bennett C.F., Baker B.F. // Cell Metab. 2018. V. 27. № 4. P. 714–739.

УДК 616.8-091.931: 57.089.62: 57.084.1

# Хирургическое моделирование посттравматического глиального рубца спинного мозга у крыс

Г. Б. Телегин<sup>1\*</sup>, А. Н. Минаков<sup>1</sup>, А. С. Чернов<sup>1</sup>, В. Н. Манских<sup>3</sup>, Д. С. Асютин<sup>2</sup>,  
Н. А. Коновалов<sup>2</sup>, А. Г. Габибов<sup>4</sup>

<sup>1</sup>Филиал Института биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 142290, Пущино, просп. Науки, 6

<sup>2</sup>Национальный научно-практический медицинский исследовательский центр нейрохирургии имени академика Н.Н. Бурденко Министерства здравоохранения Российской Федерации, 125047, Москва, 4-я Тверская-Ямская ул., 16

<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1

<sup>4</sup>Институт биоорганической химии имени академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, 117997, Москва, ул. Миклухо-Маклая, 16/10

\*E-mail: telegin@bibch.ru

Поступила в редакцию 24.06.2019

Принята к печати 02.08.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-75-81

**РЕФЕРАТ** Разработан и верифицирован оригинальный минимально инвазивный метод хирургического моделирования посттравматического глиального рубца спинного мозга у крыс. Модель предназначена для использования в качестве биологической платформы при тестировании методов стимулирования регенеративных процессов центральной нервной системы. Унифицированность модели делает ее универсальной как для имплантационных методик, так и для разработки подходов системного действия. Имея в распоряжении стандартный структурный дефект спинного мозга, исследователи получают уникальную возможность апробации *in vivo* перспективных методик восстановления спинальных функций в посттравматическом периоде. Разработаны анестезиологическое пособие, хирургическая тактика и комплекс реабилитационных мероприятий в хроническом постоперационном периоде. Предварительную оценку степени тяжести последствий экспериментального воздействия осуществляли прижизненно с использованием стандартной методики регистрации двигательной активности крыс в послеоперационном периоде спинальной травмы. Окончательные выводы делались на основании изучения гистологических срезов глиального рубца спинного мозга крыс в трех взаимно перпендикулярных пространственных плоскостях.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** глиальный рубец, криоапликация, лабораторная крыса, регенерация аксонов, травма спинного мозга, унилатеральная гемилеминэктомия, хирургическое биомоделирование.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** СМ – спинной мозг; ТСМ – травма спинного мозга; 3Rs – принципы биоэтики использования лабораторных животных в эксперименте: уменьшение (Reduce), ограничение (Refine), замена альтернативными методами (Replace); BBB-шкала – балльная шкала Basso, Beattie, Bresnahan для оценки локомоторной активности крыс в экспериментах по изучению нарушений проводимости нервных импульсов.

## ВВЕДЕНИЕ

Травма спинного мозга (ТСМ) – одна из основных причин инвалидности [1], сопряжена с неизбежным формированием в посттравматическом периоде глиального рубца, препятствующего регенеративному росту аксонов и проведению нервных импульсов. В клинической практике повреждения СМ сопровождаются серьезным функциональным дефицитом, имеющим перспективы развития необратимого па-

ралича областей тела, расположенных дистально от области травмы. Спустя несколько недель после травмы у 30% пациентов развивается посттравматическая сирингомиелия, которая приводит к ослаблению их неврологического статуса [2].

Перспективы лечения пациентов с повреждением спинного мозга будут зависеть от успеха экспериментальных исследований, основанных на использовании животных моделей надлежащего качества.



В соответствии с принципами 3R для использования в биомоделировании предпочтение отдается животным как можно меньшего размера. Однако в отношении биомоделирования на спинном мозге, сопряженного с высокой степенью хирургической интервенции, минимизация размеров животного имеет очевидные ограничения ввиду необходимости достаточного объема моделируемого посттравматического рубца, позволяющего использовать его в разработках методик восстановления спинальных функций. Использование мелких грызунов считается самым удачным для моделирования ТСМ из-за общности патофизиологии травмы с клинической практикой [3, 4]. Исходя из всех описанных условий, видовое предпочтение использования в качестве животной модели было отдано лабораторной крысе.

Из большинства моделей ТСМ у крыс наибольшее распространение получили модели повреждений СМ закрытого типа: компрессионная, имитирующая сдавливание, и контузионная, имитирующая ушиб. Однако эти модели труднопроизводимы и не могут использоваться для изучения регенерации спинного мозга при структурных повреждениях [3].

Нашей исследовательской группой разработан подход к моделированию ТСМ с использованием криоапликатора оригинальной конструкции. В основу предложенного инновационного способа моделирования стандартного глиального рубца посредством криоапликации легли работы Васильева С.А. и соавт. по изучению криодеструкции спинного мозга [5, 6], а также методы криоанальгезии нервного волокна [7].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В целях оптимальной визуализации и идентификации анатомических структур, а также в виду необходимости обеспечения оперативному приему достаточного пространства использовали крупных, массой 320–358 г, самцов крыс стока SD, SPF-статуса. Животных содержали в стандартных условиях НПП «Питомник лабораторных животных» ФИБХ РАН. Все манипуляции с животными одобрены Институтской комиссией по контролю за содержанием и использованием лабораторных животных ФИБХ РАН.

Всего в экспериментах по апробации использования криотехнологий при моделировании структурного дефекта спинного мозга крыс использовано 26 животных: 14 – на этапах отработки методологии эксперимента, включая разработку конструкции криопроводника, выбор экспозиции охлаждения спинного мозга и контроль доступа, и 12 – на стадии верификации избранной методики низкотемпературного воздействия (локальной криоапликации).

### Предоперационная подготовка и анестезиологическое пособие

За 24 ч до операции животных пересаживали в клетки с чистой подстилкой и водой. Оперативное вмешательство проводили под общим ингаляционным наркозом изофлюраном, премедикацию не использовали.

### Хирургический доступ

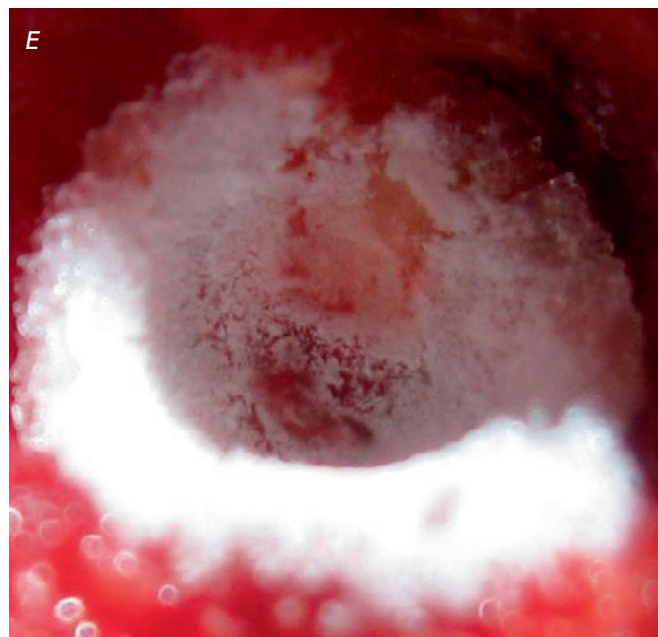
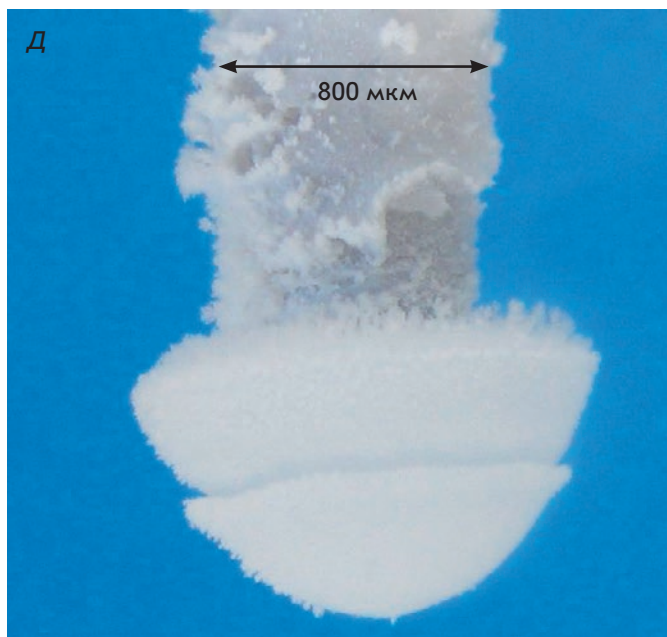
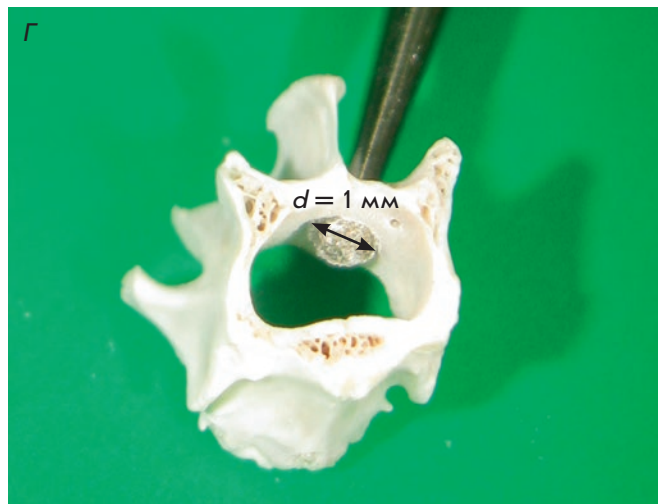
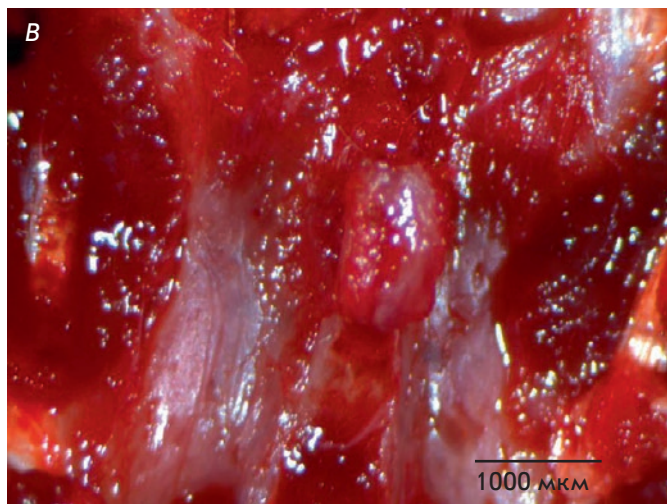
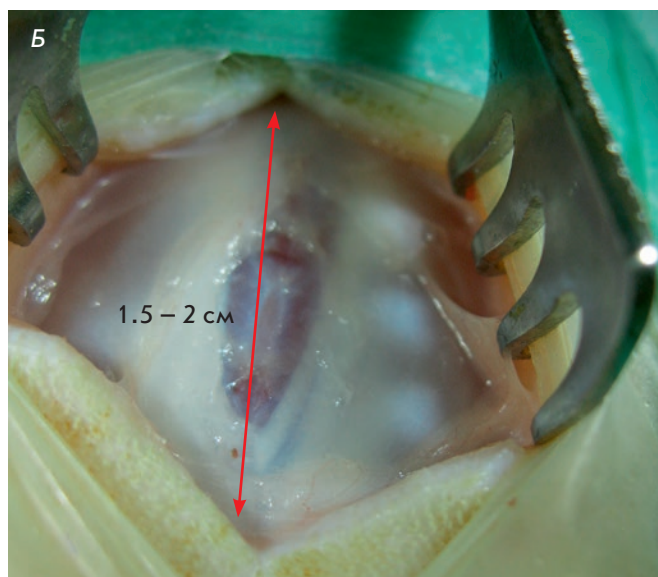
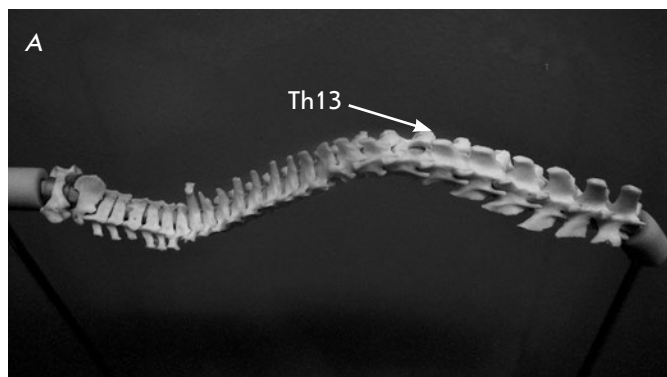
Используя стандартный микрохирургический набор инструментов, в проекции пересечения позвоночного столба с реберной дугой животного производили медианное рассечение кожи, подкожной фасции и жировой клетчатки протяженностью около 2 см (рис. 1Б). Краниальнее схождения апоневрозов дорсальной группы мышц позвоночного столба (*musculus erector spinae*) к остистым отросткам позвонков поясничного отдела определяли остистый отросток последнего грудного позвонка Th13 (рис. 1А). Под визуальным контролем при помощи операционного бинокулярного микроскопа (Optika, Италия) скелетировали остистый отросток и дорсальную дужку позвонка доступа (рис. 1В). Гемостаз обеспечивали посредством использования термокаутера (FTS, Англия). В целях обеспечения достаточного пространства оперативному приему остистый отросток резецировали. Унилатеральную гемиламинэктомию осуществляли оригинальным способом – посредством портативного стоматологического микромотора. Использовали метод торцевой парамедианной перфорации бором с алмазным напылением, диаметром 1.0 мм при 30 тыс. об/мин (рис. 1Г). Твердую мозговую оболочку при этом не затрагивали, в чем убеждались по факту отсутствия ликвореи. После завершения ламинэктомии область доступа промывали физиологическим раствором, избытки которого синхронно аспирировали вакуумным отсосом (Millipore, Германия).

### Оперативный прием

Спинной мозг всех животных опытной группы подвергали локальному охлаждению посредством апплицирования криопроводника через твердую мозговую оболочку (рис. 1Д,Е). Диаметр проводника в зоне контакта с тканью биологического субстрата – 0.8 мм, материал – медь, удаленность от источника холода (жидкого азота) в приборе оригинального конструктивного исполнения – 9 см, экспозиция апплицирования – 1 мин, собственная температура проводника в зоне контакта – 20°C.

Животным контрольной группы (четыре особи) оперативный доступ к спинному мозгу организован, как у опытных, но без локального охлаждения.

Рис. 1. Этапы разработки оперативного доступа: А – анатомическая 3D-реконструкция; Б – топографические ориентиры; В – скелетирование; Г – односторонняя гемиламинэктомия; Д – криозонд; Е – охлаждение спинного мозга



**Закрытие операционной раны**

Ушивание тканей производили послойно, используя атравматический нерассасывающийся монофиламентный материал Prolene 6/0 (Ethicon, США).

Для защиты поверхности операционной раны применяли однократное нанесение суспензии микропористого алюминия (Vetoquinol, Франция).

**Температурный режим**

В целях компенсации гипотермии, возникающей во время наркоза, в течение операции животных фиксировали на операционном столике с температурой 38°C. Сразу после операции и до полного выхода из наркоза животных помещали в клетку, установленную на электрическом подогреваемом столике, и организовывали принудительное обогащение воздуха кислородом.

**Послеоперационный мониторинг**

Период клинического наблюдения в опыте составил 30 дней. Отработанный протокол хирургической интервенции и схема клинического мониторинга обеспечивали 100% выживаемость крыс.

Для профилактики раневой инфекции, ввиду значительного объема хирургической травмы и хронического периода постоперационного наблюдения, проводили превентивную антибиотикотерапию посредством внутримышечного введения препарата «Байтрил» (энрофлоксацин, 25 мг/мл) в дозе 10 мг/кг 1 раз в день курсом 10 дней.

Для послеоперационной анальгезии крысам назначали препарат «Норокарп» (карпрофен) в дозировке 10 мг/кг живого веса 1 раз в день курсом 4–6 дней.

В целях регидратации, сразу после операции, животным вводили предварительно нагретый до 38°C физиологический раствор натрия хлорида в объеме 5 мл, подкожно.

На всем протяжении хронического опыта оценивали внешний вид прооперированных животных, неспровоцированное поведение, частоту дыхания, потребление корма и воды, наличие естественных отпавлений, строительство гнезда, реакцию на руки, цвет слизистых оболочек, тургор кожи, состояние операционной раны, динамику изменений массы тела, температуру тела (ректально), а также выраженность моторной и чувствительной функций тазовых конечностей и хвоста.

**Оценка локомоторной активности**

Степень влияния экспериментального воздействия на локомоторную активность крыс тестировали «в открытом поле», согласно традиционно используемой при моделировании спинальной травмы 21-балльной шкале BBB [8].

**Морфологическое исследование**

Спинальный мозг из позвоночного канала (в пределах позвонков T12–L1) выделяли пересечением боковых стенок дорсальных дужек позвонков фрезой, что гарантировало максимальную сохранность дорсальной поверхности спинного мозга в месте воздействия. Ориентировочно место холодового воздействия макроскопически определяли по светло-коричневому окрашиванию тканей, сопоставимым по размеру с 3/4 диаметра спинного мозга. Образцы фиксировали в течение 24 ч в 10% растворе формалина на фосфатном буфере (pH 7.4). После фиксации материал дегидратировали в изопропиловом спирте (Isoprep, Биовитрум), заливали в парафин, готовили срезы (толщиной 5 мкм) на ротационном микротоме (RM2245, Leica) и окрашивали гематоксилином и эозином по рутинным протоколам [9].

С целью всесторонней оценки морфологических характеристик поражения были изготовлены серийные срезы в трех взаимно перпендикулярных плоскостях – саггитальной (оценивали глубину и продольную протяженность дефекта), фронтальной (площадь в плоскости пятна контакта) и сегментарной (поперечный размер дефекта относительно диаметра сечения спинного мозга). Для морфологических измерений в каждой плоскости отбирали срез с максимальной площадью дефекта. Топографию пораженных структур спинного мозга определяли согласно данным [10].

Фотографирование препаратов и морфометрические процедуры выполняли с помощью микроскопа Axioscope A1 и камеры MRc5 с использованием программы AxioVision 3.0 (Carl Zeiss, Германия). Полученные данные обрабатывали с помощью пакета статистических программ SigmaPlot statistic (v. 13.0).

**РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ****Разработка оперативного доступа**

Изучение возможностей восстановления спинальных функций требует моделирования посттравматического глиального рубца – стандартного и минимального по объему. В отличие от преимущественно механических контузионных воздействий на спинной мозг, применявшихся при моделировании спинальной травмы, мы моделировали глиальный рубец с использованием оригинальной методики локального низкотемпературного воздействия на спинной мозг. Пробразом идеи послужил опыт применения криотехнологий в целях криоанальгезии периферических нервов и криодеструкции участков ткани центральной нервной системы [5–7].

В целях обеспечения максимально корректной интерпретации результатов, полученных на моде-



ли посттравматического глиального рубца спинного мозга, при разработке методик восстановления спинных функций было решено прибегнуть к унилатеральному воздействию на спинной мозг, предоставляющему возможность использования в качестве контроля клинических и патоморфологических изменений в интактную сторону.

В связи с необходимостью стандартизации уровня доступа к спинному мозгу предложены такие оригинальные подходы, как использование топографии схождения апоневрозов дорсальной группы мышц позвоночного столба в качестве интраоперационного ориентира последнего грудного позвонка со стороны вектора операционного действия (рис. 1Б) и использование твердой мозговой оболочки в качестве своеобразного демпфера прямому холодовому воздействию на спинной мозг. Необходимо отметить, что у более молодых животных, имеющих соответственно меньший размер, а также у крыс с темной пигментацией (например, линия Dark Agouti), интраоперационная навигация может быть существенно затруднена – идущие к остистым отросткам поясничных позвонков апоневрозы дорсальной группы мышц позвоночного столба выглядят гораздо менее контрастно, чем у крупных крыс-альбиносов.

Таким образом, методика апплицирования криопроводника на спинной мозг позволяет максимально локализовать зону низкотемпературного воздействия и минимизировать неспецифические контузионные повреждения органа в процессе проведения оперативного приема. Индикатором структурной сохранности спинного мозга во время унилатеральной гемилияминэктомии, выполняемой методом торцевой перфорации, было отсутствие ликвореи. Животных с ятрогенным дуроцентезом из использования в эксперименте исключали. В целях организации чрескостного доступа к спинному мозгу предложено использование стоматологического бора (рис. 2).

#### Показатели клинического мониторинга

У большинства крыс с моделируемым посттравматическим рубцом спинного мозга в соответствии со шкалой ВВВ [9] наблюдалась моноплегия со стороны воздействия, сохраняющаяся в течение 21 дня. Животные опытной группы показывали средний уровень нарушения локомоторных функций, соответствующий 2.3 балла по шкале ВВВ, в то время как в контрольной группе, без холодового воздействия, полное восстановление двигательной активности наблюдали через 5 дней после оперативного вмешательства.

Используемые в настоящее время модели ТСМ приводят к существенному нарушению функций мочевыделительной системы у крыс, что является

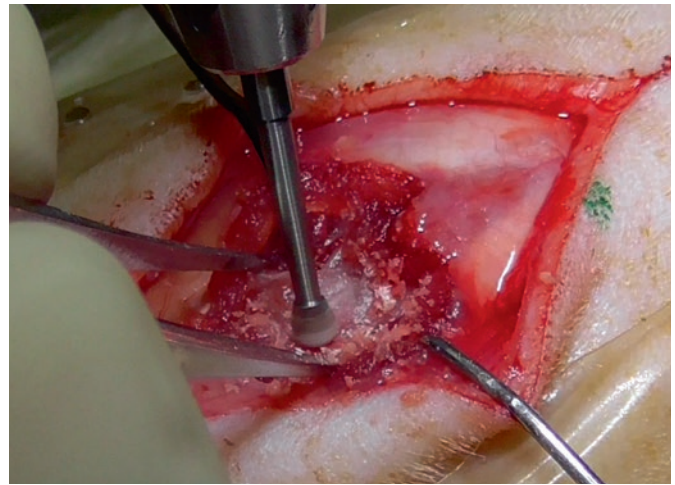


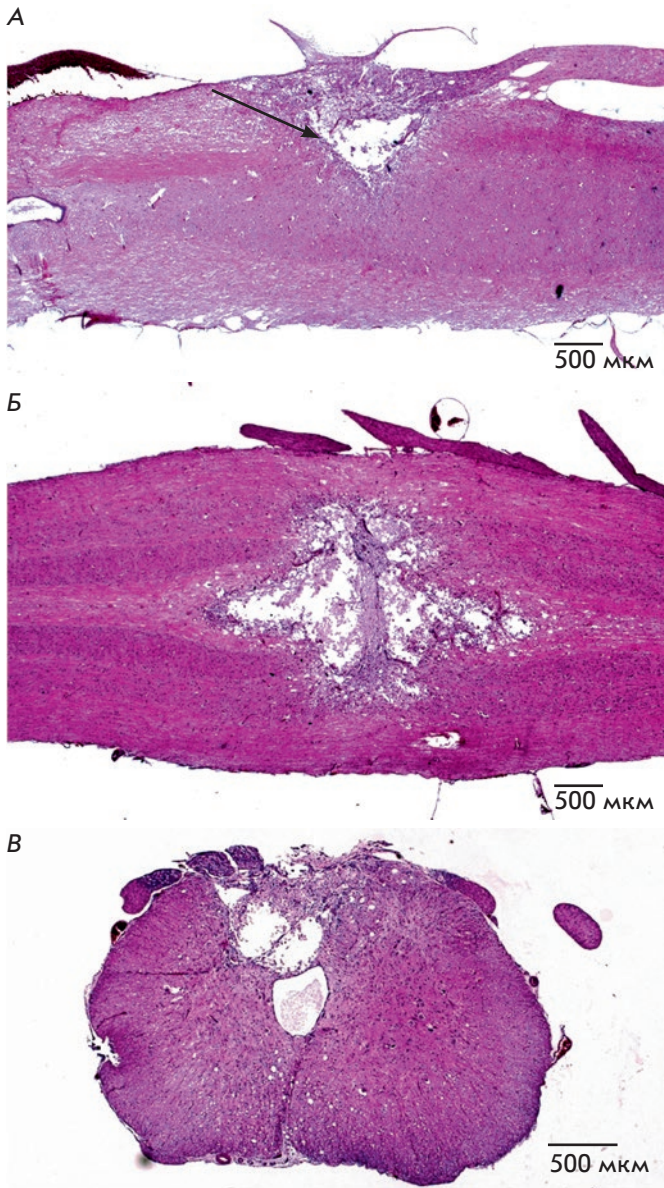
Рис. 2. Гемилияминэктомия дорсальной дужки Th13-позвонка крысы стоматологическим бором

серьезным недостатком [11]. Приходится несколько раз в день вручную опорожнять мочевой пузырь у животных после нанесения травмы во избежание разрыва мочевого пузыря и развития инфекционного воспаления [12, 13]. Разработанная нами модель не имеет подобного недостатка благодаря минимизации хирургической травмы. После нанесения травмы у животных на протяжении всего времени наблюдения сохранялась способность к естественному опорожнению мочевого пузыря и кишечника на фоне стабильно сохраняющейся моноплегии. Способность к самостоятельному мочеиспусканию и дефекации является залогом жизнеобеспечения в хроническом постоперационном периоде, профилактирует развитие у крыс дистресса и неспецифическое травмирование спинного мозга при стимулировании естественных отпавлений методом пальпаторного воздействия на стенки кишечника и мочевого пузыря через брюшную стенку животного.

#### Результаты гистологического исследования

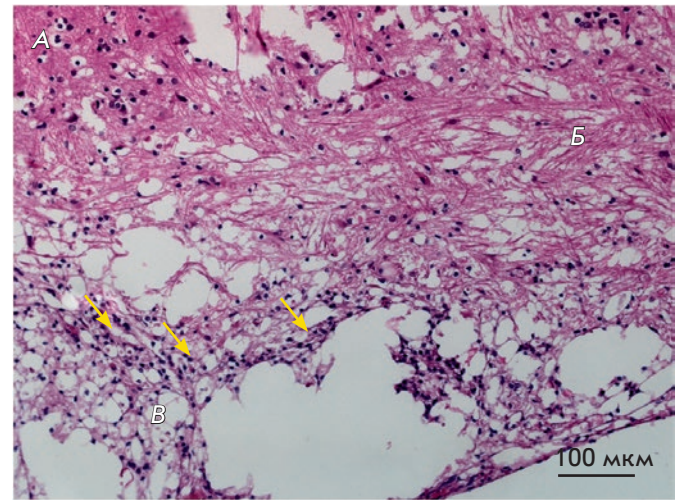
Согласно данным гистологического исследования спинного мозга у всех животных на 30-й день после криодеструкции наблюдалась в целом одинаковая гистологическая картина (рис. 3). В центре зоны дефекта образовывалась полость, в той или иной степени заполненная клеточным дебрисом и макрофагоподобными клетками. Часть полости выполнена элементами созревающего глиомезодермального рубца, более выраженными со стороны мозговых оболочек и образующими тяжи и шварты. Большая часть стенки, в том числе и участки, прилегающие к рубцовой ткани, представлены разволокненным и вакуолизированным нейропилем, без резких гра-





**Рис. 3.** Типичная гистологическая картина криодеструкции спинного мозга на 30-й день после операции по предложенному методу. А – сагиттальное сечение (стрелкой показаны стенки кратерообразного дефекта). Б – фронтальное сечение (отчетливо видна полость структурного дефекта). В – сегментарное сечение (отчетливо видна полость структурного дефекта). Окраска гематоксилином и эозином (увеличение  $\times 25$ )

ниц переходящим в интактную нервную ткань. В зоне вакуоляризации нейроны полностью отсутствовали, зато имелись клетки неопределенной морфологии с признаками апоптоза (кариорексис и кариопикноз ядер). Острое экссудативное воспаление в зоне дефекта отсутствовало, хотя имела место



**Рис. 4.** Морфология пораженного участка спинного мозга при проведении гемилеминэктомии (увеличение  $\times 200$ ). А – интактная ткань; Б – зона реактивных изменений (рарификация нейропиля); В – зона некроза, стрелки – клетки воспалительного инфильтрата (лимфоциты или микроглиальные элементы)

умеренно выраженная инфильтрация лимфоцитами и микроглиальными элементами. Площадь общей зоны повреждения в сагиттальной плоскости составила  $3.6 \pm 0.25 \text{ мм}^2$  ( $n = 6$ ) (рис. 3А), на фронтальном срезе  $3.2 \pm 0.36 \text{ мм}^2$  ( $n = 4$ ) (рис. 3Б), а в поперечном сечении  $1.1 \pm 0.1 \text{ мм}^2$  ( $n = 4$ ) (рис. 3В). Во всех случаях экспериментального воздействия структурным изменениям подвергались дорсальные рога серого вещества и прилежащие части боковых канатиков спинного мозга в области *tractus pyramidalis et tractus dorsolateralis*.

Стоит отметить, что в группе контроля, где осуществлялась только гемилеминэктомия без какого-либо воздействия на спинной мозг, зарегистрировано образование в зоне доступа структуры типа глиомезодермального рубца (рис. 4). Этот факт можно отнести к техническим погрешностям методики выполнения доступа, однако он же свидетельствует и о том, насколько чувствителен спинной мозг к любого рода воздействиям.

Дальнейшая оптимизация технологии локального охлаждения спинного мозга будет заключаться в усовершенствованиях оригинальной конструкции криопроводника и оптимизации условий низкотемпературного воздействия. Проведение детальных исследований на животных моделях, связанных с совершенствованием хирургических техник, использованием инновационных оптико-лазерных технологий и других методик, приблизит практических хирургов к решению проблемы функционального

восстановления спинного мозга в посттравматическом периоде [14–16].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В исследовании обоснован, разработан и верифицирован метод моделирования посттравматического глиального рубца спинного мозга у крыс. Точное следование установленным анатомическим ориентирам, использование оригинального инструментального обеспечения и методик локального холодового воз-

действия на спинной мозг позволили унифицировать моделируемый объект. Согласно данным клинических наблюдений и гистологических исследований, предлагаемая методика позволяет говорить о создании адекватной животной модели посттравматического рубца спинного мозга. ●

*Результаты работы получены с использованием животных из УНУ «Био-модель» ИБХ РАН.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Nas K., Yazmalar L., Şah V., Aydın A., Öneş K. // World J. Orthop. 2015. V. 18. № 6 (1). P. 8–16.
- Falci S.P., Indeck C., Lammertse D.P. // J. Neurosurg. Spine. 2009. V. 11. P. 445–446.
- Minakov A.N., Chernov A.S., Asutin D.S., Konovalov N.A., Telegin G.B. // Acta Naturae. 2018. V. 10. № 3 (38). P. 4–10.
- Minakov A., Chernov A., Sirotkin A., Asutin D., Konovalov N., Telegin G. // Lab. Animals. 2019. V. 53(1S). P. 130.
- Vasiliev S.A., Krylov V.V., Pesnya-Prasolov S.B., Zuev A.A., Levin R.S., Pavlov V.N., Zhidkov I.L., Khovrin V.V., Fedorov D.N., Vetsheva N.N. // Neurosurgery. 2010. № 4. P. 58–64.
- Vasiliev S.A., Pesnya-Prasolov S.B., Kungurtsev S.V., Pavlov V.N. // Clin. Exp. Surg. Petrovsky J. 2015. № 1. P. 15–21.
- Ilfeld B.M., Gabriel R.A., Trescot A.M. // Br. J. Anaesth. 2017. V. 119. № 4. P. 703–706.
- Bispo dos Santos G., Cristante A.F., Marcon R.M., Inácio de Souza F., Pessoa de Barros Filho T.E., Damasceno M.L. // Acta Ortop. Bras. 2011. V. 19. № 2. P. 87–91.
- Trofimenko A.I., Chitanava T.V., Dzhopua M.A., Kade A.Kh., Egiev I.K., Chechelyan V.N., Sergeeva Y.A. // Modern Problems Sci. Edu. 2017. № 3. P. 22–31.
- Ноздрачев А.Д., Поляков Е.Л. Анатомия крысы. СПб.: Издательство «Лань», 2001. 464 с.
- Krishna V., Andrews H., Jin X., Yu J., Varma A., Wen X., Kindy M.A. // J. Vis. Exp. 2013. V. 78. e50111, doi: 10.3791/50111.
- David B.T., Steward O. // Exp Neurol. 2010. V. 226. № 1. P. 128–135. doi: 10.1016/j.expneurol.2010.08.014.
- Wada N., Shimizu T., Takai S., Shimizu N., Kanai A.J., Tyagi P., Kakizaki H., Yoshimura N. // NeuroUrol. Urodyn. 2017. V. 36. № 5. P. 1301–1305. doi: 10.1002/nau.23120.
- Marcol W., Slusarczyk W., Gzik M., Larysz-Brysz M., Bobrowski M., Gryniewicz-Bylina B., Rosicka P., Kalita K., Węglarz W., Barski J.J. // J. Reconstr. Microsurg. 2012. V. 28. № 8. P. 561–568.
- Kuzmina A.G., Baranov K.K., Gorbatova N.E., Kurilov V.P., Kuzmin G.P., Sirotkin A.A., Tikhonovich O.V., Zolotov S.A. // J. Appl. Spectroscopy. 2016. V. 83. № 6–16. P. 708.
- Bogachouk A.P., Storzheva Z.I., Telegin G.B., Chernov A.S., Proshin A.T., Sherstnev V.V., Zolotarev Yu.A., Lipkin V.M. // Acta Naturae. 2017. V. 9. № 3(34). P. 64–70.

УДК 577.152.4

# Каталитический механизм воздействия триптофан-индол-лиазы на нестандартные субстраты. Роль ионного состояния каталитической группы, акцептирующей $C_{\alpha}$ -протон субстрата

Н. Г. Фалеев<sup>1\*</sup>, М. А. Цветикова<sup>1</sup>, О. И. Гоголева<sup>1</sup>, С. В. Ревтович<sup>2</sup>, В. В. Куликова<sup>2</sup>,  
К. А. Кочетков<sup>1,3</sup>

<sup>1</sup>Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, 119991, Москва,  
ул. Вавилова, 28

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

<sup>3</sup>Химико-технологический университет им. Д.И. Менделеева, 125047, Москва, Миусская пл., 9  
\*E-mail: ngfal@ineos.ac.ru

Поступила в редакцию 23.04.2019

Принята к печати 23.07.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-82-88

**РЕФЕРАТ** В реакции триптофан-индол-лиазы (ТИЛ) с субстратом, содержащим плохую уходящую группу (*L*-серин), необходим общекислотный катализ на стадии ее отщепления. В ходе этой стадии происходит формальный перенос протона из  $\alpha$ -положения субстрата к уходящей группе, при этом отщепляется вода. В результате группа, первоначально акцептировавшая  $C_{\alpha}$ -протон, в последующей каталитической стадии должна выступать в виде соответствующего сопряженного основания. Когда субстрат содержит хорошую уходящую группу ( $\beta$ -хлор-*L*-аланин), общекислотный катализ на стадии элиминирования не является необходимым и не может быть реализован, поскольку в ферментах отсутствуют сильные кислотные группы, которые могли бы отдать свой протон столь слабому основанию, как отщепляющийся анион хлора. Таким образом каталитическая группа, первоначально принявшая  $C_{\alpha}$ -протон от субстрата, должна вступить в последующую стадию в кислотной, а не основной форме. Для выяснения механизмических последствий изменений ионного состояния этой группы для реакций ТИЛ с нестандартными субстратами – *L*-серином и  $\beta$ -хлор-*L*-аланином, рассмотрены рН-зависимости основных кинетических параметров процесса и кинетические изотопные эффекты, обусловленные заменой обычной воды в качестве растворителя на  $^2H_2O$ . Установлено, что в реакции ТИЛ с  $\beta$ -хлор-*L*-аланином стадия гидролиза аминокрилатного интермедиата чувствительна к изотопному эффекту растворителя, а в случае реакции с *L*-серином – нет. Показано, что в ходе первой реакции функциональная группа, содержащая «дополнительный» протон, выполняет конкретную каталитическую функцию, тогда как в реакции с *L*-серином, когда отсутствует этот протон, механизм гидролиза аминокрилата должен быть принципиально иным. На основании полученных результатов предложены возможные механизмы гидролиза аминокрилата в реакциях ТИЛ с *L*-серином и  $\beta$ -хлор-*L*-аланином.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** кинетика, триптофан-индол-лиаза, *L*-серин,  $\beta$ -хлор-*L*-аланин.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИЭР** – изотопный эффект растворителя; ЛДГ – лактатдегидрогеназа; ПДФ – пиридоксаль-5'-фосфат; ТИЛ – триптофан-индол-лиаза; SOPC – S-(*o*-нитрофенил)-*L*-цистеин.

## ВВЕДЕНИЕ

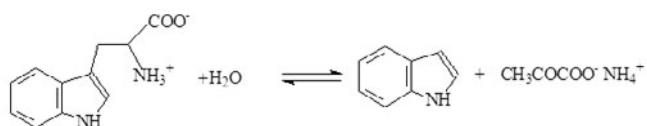
При установлении каталитических механизмов ферментативных реакций основополагающей концепцией является представление о том, что при за-

вершении каждой из стадий процесса создаются максимально благоприятные химические и конформационные предпосылки для последующих стадий [1]. В этой связи значительный интерес вызывает из-



учение механизмов ферментов, характеризующихся широкой субстратной специфичностью, поскольку в зависимости от химической природы субстрата в активном центре могут возникать ситуации, приводящие к нарушению указанного выше принципа.

Триптофан-индол-лиаза (ТИЛ), широко известная как триптофаназа [КФ 4.1.99.1] – пиридоксаль-5'-фосфат (ПЛФ)-зависимый фермент, который катализирует обратимое  $\alpha,\beta$ -элиминирование *L*-триптофана с образованием индола и пирувата аммония:

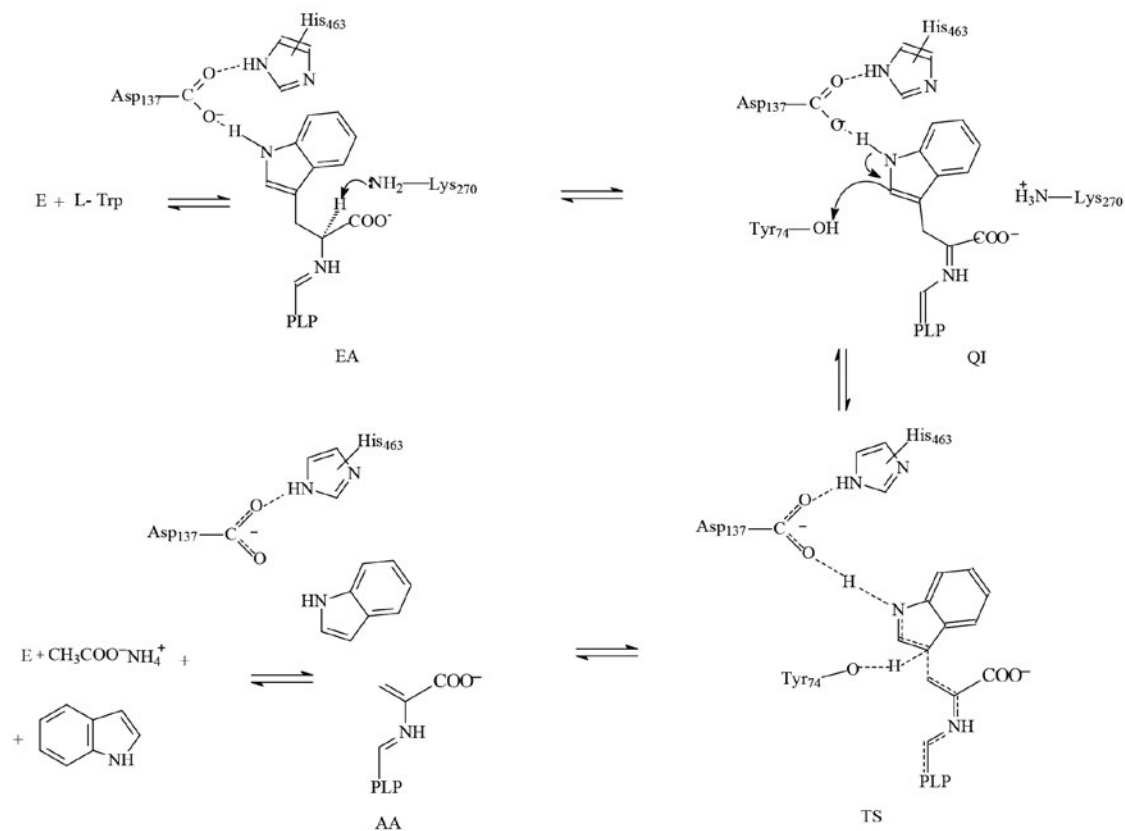


Субстратами ТИЛ являются также остатки триптофана, замещенные по различным положениям индольного кольца [2, 3], бензимидазольные аналоги триптофана [4], а также аминокислоты, содержащие подходящие уходящие группы у  $\beta$ -углеродного атома, включая *S*-(*o*-нитрофенил)-*L*-цистеин (SOPC) [5], *S*-алкил-*L*-цистеины [6],  $\beta$ -хлор-*L*-аланин [5], *L*-серин [6] и *O*-ацил-*L*-серины [7].

Методом рентгеноструктурного анализа установлена трехмерная структура ТИЛ из *Escherichia coli* [8–10] и фермента из клеток *Proteus vulgaris* [11].

Каталитический механизм детально исследован в работах [12–16], а роль конкретных остатков в механизме ТИЛ подробно освещена в обзоре [17] и в работах [18–20].

На *схеме* представлен каталитический механизм реакции ТИЛ с природным субстратом *L*-триптофаном, который согласуется с имеющимися на текущий момент рентгеноструктурными и кинетическими данными. Ключевые стадии этого механизма – отрыв  $\alpha$ -протона внешнего альдимины под действием боковой аминогруппы Lys270 и последующее элиминирование боковой группы, предполагающее перенос протона от фенольного гидроксила Tyr74 в третье положение уходящей индольной группы. При этом перенос протона и расщепление углерод-углеродной связи происходят почти одновременно [16]. Установлено [21], что при ферментативном разложении *L*-триптофана происходит значительный внутримолекулярный перенос  $S_{\alpha}$ -протона субстрата в третье положение образующегося индола. Поскольку остатки Lys270 и Tyr74 находятся достаточно далеко друг от друга и расположены по разные стороны плоскости кофактора, прямая передача протона от одного остатка к другому представляется маловероятной. Поэтому наблюдаемый внутримолекулярный перенос может быть следствием



**Схема.** Принципиальный механизм реакции ТИЛ с *L*-триптофаном, согласующийся с [12–18]. Е – внутренний альдимин; ЕА – внешний альдимин; QI – хиноидный интермедиат; TS – переходное состояние; АА – аминокрилат



существования цепочки водородных связей между несколькими остатками, делающей возможным наблюдаемый перенос. Получено убедительное рентгеноструктурное свидетельство существования такой цепочки [20]. В реакциях  $\alpha,\beta$ -элиминирования с субстратами, содержащими плохую уходящую группу, например, *L*-серин, необходим общекилотный катализ на стадии отщепления уходящей группы. В ходе этой стадии происходит формальный перенос протона (напрямую или по цепочке водородных связей) из  $\alpha$ -положения субстрата к уходящей группе субстрата, которая при этом подвергается отщеплению в виде соответствующей сопряженной кислоты. В результате группа, первоначально акцептировавшая  $C_\alpha$ -протон, после элиминирования уходящей группы должна выступать в виде соответствующего сопряженного основания. Известно, что хорошим субстратом  $\alpha,\beta$ - и  $\alpha,\gamma$ -элиминирующих лиаз служит  $\beta$ -хлор-*L*-аланин. В реакциях с этим субстратом уходящей группой является анион хлора. При этом общекилотный катализ на стадии элиминирования не требуется и не может быть в данном случае реализован, поскольку в ферментах отсутствуют сильные кислотные группы, способные отдать свой протон столь слабому основанию, как анион хлора. Таким образом, каталитическая группа, первоначально принявшая  $\alpha$ -протон от субстрата, должна вступить в последующую стадию в кислотной, а не в основной форме. Вопрос о том, какие механистические последствия должно иметь изменение ионного состояния этой группы, представляет, на наш взгляд, принципиальный интерес. Реальными представляются следующие две возможности. 1). Появление в рН-профиле кинетических параметров новой кислотной группы, связанное с необходимостью перехода группы, акцептировавшей  $\alpha$ -протон, в основное состояние. 2). Изменение механизма последующих стадий, обусловленное изменением ионного состояния указанной каталитической группы. В настоящей работе мы предприняли попытку прояснить данный вопрос, изучив рН-зависимости параметров стационарной кинетики реакций ТИЛ *E. coli* с *L*-серином и  $\beta$ -хлор-*L*-аланином и рассмотрев кинетические изотопные эффекты, обусловленные заменой обычной воды в качестве растворителя на  $^2H_2O$ .

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали реагенты фирмы Sigma-Aldrich. Использована  $^2H_2O$  с изотопной чистотой 96%.

### Фермент

ТИЛ была выделена из клеток *E. coli* JM101, содержащих плазмиду рMD6 с геном *tnaA E. coli*, как опи-

сано в работе [22]. Концентрацию фермента определяли по поглощению ПЛФ холофермента при 278 нм ( $A_{1\%} = 9.19$ ) [23], используя значение молярной массы субъединицы 52 кДа [24].

### Определение активности ТИЛ

В качестве субстрата использовали *S*-о-нитрофенил-*L*-цистеин (SOPC). Реакционная смесь для измерения активности содержала 0.6 ммоль SOPC, фермент, 0.12 М калий-фосфатный буфер, рН 7.8, 3 мМ дитиотреитол, 0.06 мМ ПЛФ и 10% глицерин. Активность измеряли при 30°C по снижению поглощения SOPC при 370 нм ( $\epsilon = -1860 M^{-1} \text{ мин}^{-1}$ ). За единицу активности принимали количество фермента, катализирующего разложение 1 мкмоль SOPC в минуту в стандартных условиях. SOPC синтезировали согласно [25].

### Кинетические измерения

При исследовании кинетики ферментативного разложения *L*-серина и  $\beta$ -хлор-*L*-аланина определяли количество пирувата, образующегося в ходе реакции с катализируемой лактатдегидрогеназой (ЛДГ) с участием NADH. Реакционные смеси содержали 0.2 мМ NADH, 8 ед. ЛДГ и 0.2 мкМ ТИЛ в 0.1 М калий-фосфатных или боратных буферных растворах в присутствии 0.1 мМ ПЛФ при различных рН и переменных концентрациях субстратов. Скорость определяли при 30°C по снижению поглощения NADH при 340 нм ( $\epsilon = -6220$ ).

### Исследование изотопного эффекта растворителя (ИЭР)

Калий-фосфатный буферный раствор (рН 8.2, 20 мл) упаривали при пониженном давлении досуха. Остаток высушивали в вакууме над  $CaCl_2$  и растворяли в 20 мл  $^2H_2O$ . В полученном буферном растворе исследовали кинетику разложения субстратов в условиях, аналогичных описанным для водных растворов.

В результате сопоставления кинетических параметров, определенных в буферных растворах, в воде и в  $^2H_2O$ , получены данные, представленные в таблице.

Изотопный эффект растворителя на кинетические параметры реакций ТИЛ с *L*-серином и  $\beta$ -хлор-*L*-аланином

Субстрат	Параметр	ИЭР
<i>L</i> -серин	V/K	$3.5 \pm 0.5$
<i>L</i> -серин	V	$0.8 \pm 0.2$
$\beta$ -хлор- <i>L</i> -аланин	V/K	$2.2 \pm 0.5$
$\beta$ -хлор- <i>L</i> -аланин	V	$3.6 \pm 1.2$

Данные стационарной кинетики анализировали с использованием FORTRAN программ Келланда [26].

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящей работе мы определяли pH-зависимость основных кинетических параметров реакций ТИЛ с *L*-серином и β-хлор-*L*-аланином и сопоставляли полученные данные с данными для реакции ТИЛ с природным субстратом, *L*-триптофаном [13]. В этой реакции pH-зависимость параметра  $V/K$  описывается уравнением (1) с двумя  $pK$ , равными 7.6 и 6.0 [13].

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{C}{1 + \frac{H}{K_a} + \frac{H^2}{K_a^1 K_a^2}}, \quad (1)$$

где  $pK_a^1 = 7.6 \pm 0.09$ ,  $K_a^2 = 6.0 \pm 0.2$ .

При этом значение 7.6 может быть приписано группе Lys270, ответственной за отрыв  $C_\alpha$ -протона во внешнем альдимине, а значение 6.0 – боковой группе Asp137, взаимодействующей с азотом индольного кольца на стадии связывания субстрата [15, 17], что приводит к активации индольного фрагмента в качестве уходящей группы.

Мы установили, что в реакции с *L*-серином pH-зависимость  $V/K$  (рис. 1) описывается уравнением (2) с одним  $pK$ , равным 7.6.

$$\frac{k_{cat}}{K_m} = \frac{C}{\left(1 + \frac{H}{K_a}\right)}, \quad (2)$$

где  $pK_a = 7.6 \pm 0.1$ .

Таким образом, ионизация кислотной группы Asp137, участвующей в активации уходящей группы в реакции с природным субстратом, не находит отражения в pH-зависимости в случае ре-

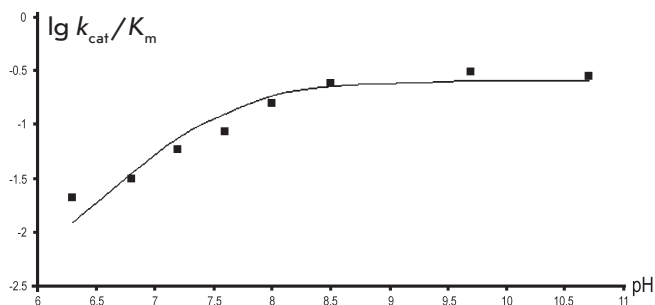


Рис. 1. pH-зависимость  $V/K$  в реакции ТИЛ с *L*-серином. Точки – экспериментальные значения, полученные в результате обработки данных с использованием уравнения Михаэлиса–Ментен. Кривая – теоретические значения, описываемые уравнением (2), где  $pK_a = 7.6$

акции с *L*-серином. Можно предполагать, что конформация серина в активном центре аналогична конформации триптофана в том смысле, что положение гидроксильного кислорода серина строго соответствует положению  $C_\gamma$ -атома индольного кольца. В этом случае, согласно рентгеноструктурным данным [20], близким соседом гидроксильного кислорода должна быть фенольная группа Tyr74, которая цепочкой водородных связей [20] связана с Lys270. В ходе α,β-элиминирования протон от аммониевой группы Lys270 по цепочке водородных связей переходит к остатку Tyr74, который отдает свой протон гидроксилу серина, отщепляющемуся в виде воды. При этом ионогенное состояние всех участников процесса, за исключением Lys270, остается неизменным. По всей вероятности, в используемом интервале pH фенольная группа остатка Tyr74 остается в необходимой для осуществления реакции кислотной форме, чем и объясняется отсутствие соответствующего  $pK$  в pH-зависимости.

На рис. 2 представлена pH-зависимость параметра  $k_{cat}$  в реакции ТИЛ с *L*-серином. Эта зависимость описывается уравнением с двумя близкими значениями  $pK$  (уравнение (1)), где  $pK_a^1 = pK_a^2 = 6.3 \pm 0.1$ . В то же время в реакции с *L*-триптофаном установлено [13], что параметр  $k_{cat}$  не зависит от pH. Это свидетельствует о том, что субстрат связывается только с формой фермента, находящейся в правильном ионогенном состоянии. Образующийся при этом фермент-субстратный комплекс недоступен для проникновения протонов из окружающей среды. По-видимому, в реакции с *L*-серином боковая группа занимает меньший объем в активном центре фермента, так что катионы гидроксония из окружа-

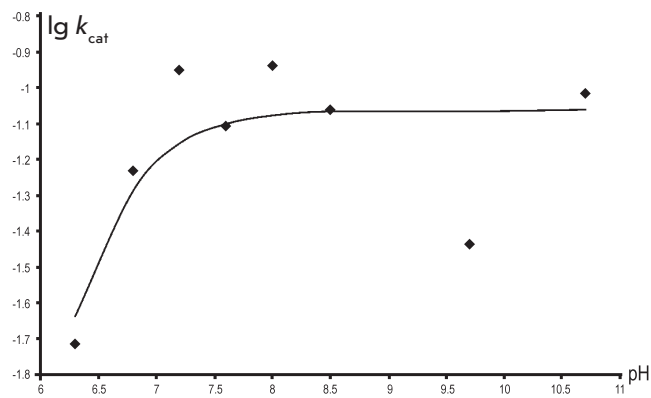


Рис. 2. pH-зависимость  $V$  в реакции ТИЛ с *L*-серином. Точки – экспериментальные значения, полученные в результате обработки данных с использованием уравнения Михаэлиса–Ментен. Кривая – теоретические значения, описываемые уравнением (1), где  $pK_a = pK_b = 6.3$

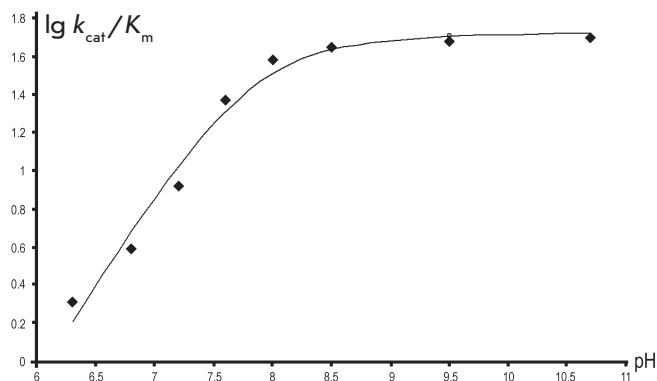


Рис. 3. pH-зависимость  $V/K$  в реакции ТИЛ с  $\beta$ -хлор- $L$ -аланином. Точки – экспериментальные значения, полученные в результате обработки данных с использованием уравнения Михаэлиса–Ментен. Кривая – теоретические значения, описываемые уравнением (2), где  $pK_a = 7.6$

ющего раствора способны проникать в него, протонируя определенные функциональные группы внутри активного центра, что исключает возможность каталитической реакции.

Мы показали, что в реакции ТИЛ с  $\beta$ -хлор- $L$ -аланином pH-зависимость параметра  $V/K$  практически идентична аналогичной зависимости в реакции с  $L$ -серином (рис. 3). Зависимость описывается уравнением с одним  $pK_a$  (уравнение (2)), равным  $7.6 \pm 0.1$ . В то же время pH-зависимость  $V$  (рис. 4) имеет принципиально иной, колоколообразный, характер и описывается уравнением (3):

$$k_{\text{cat}} = \frac{C}{\left(1 + \frac{H}{K_a} + \frac{K_b}{H}\right)}, \quad (3)$$

где  $pK_a = 6.7 \pm 0.2$ ;  $pK_b = 10.3 \pm 0.2$ .

Как отмечалось ранее, реакция с  $\beta$ -хлор- $L$ -аланином, по всей вероятности, протекает без активации уходящей группы, которая элиминируется, как анион хлора. Поэтому ситуация в активном центре сразу после отщепления  $Cl^-$  должна быть существенно иной, чем в реакции с  $L$ -серином, поскольку протон, первоначально связанный с  $C_\alpha$ -атомом субстрата, в случае  $\beta$ -хлор- $L$ -аланина остается в активном центре, а в случае  $L$ -серина удаляется из активного центра вместе с уходящей группой. Можно предполагать, что значение  $pK_b = 10.3$ , наблюдаемое в реакции с  $\beta$ -хлор- $L$ -аланином, в pH-зависимости  $V$  отражает диссоциацию именно этого дополнительного протона в фермент-субстратном комплексе. При этом снижение  $V$  очевидно отражает определенную каталитическую функцию, которую соответствующая кислотная группа выполняет в ходе

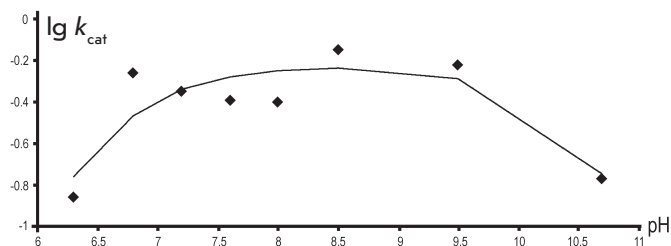
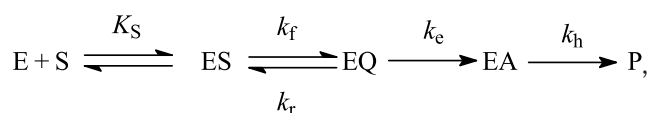


Рис. 4. pH-зависимость  $V$  в реакции ТИЛ с  $\beta$ -хлор- $L$ -аланином. Точки – экспериментальные значения, полученные в результате обработки данных с использованием уравнения Михаэлиса–Ментен. Кривая – теоретические значения, описываемые уравнением (3), где  $pK_a = 6.7$ ,  $pK_b = 10.3$

каталитических трансформаций, имеющих место после элиминирования аниона хлора.

С целью более детального изучения роли различных элементарных стадий в механизмах реакций с разными субстратами мы рассмотрели кинетику этих реакций в  $^2H_2O$  в области pH-оптимума и определили влияние изотопных эффектов, обусловленных сменой растворителя, на основные кинетические параметры. Эти результаты представлены в таблице.

В отличие от реакции ТИЛ с природным субстратом, реакции с  $L$ -серином и  $\beta$ -хлор- $L$ -аланином проходят только в направлении распада субстратов, но не их синтеза. Таким образом, в данном случае  $\alpha, \beta$ -элиминирование, приводящее к образованию аминокрилатного интермедиата в активном центре, необратимо. С учетом этого мы рассматривали механизм обеих реакций в рамках следующей кинетической схемы:



где  $E$  – внутренний альдимин;  $ES$  – внешний альдимин;  $EQ$  – хиноидный интермедиат;  $EA$  – аминокрилатный комплекс;  $P$  – продукт реакции (пируват).

В представленной кинетической схеме основные кинетические параметры описываются уравнениями (4) и (5):

$$\frac{k_{\text{cat}}}{K_m} = \frac{k_e k_f}{K_s (k_e + k_r)}, \quad (4)$$

$$k_{\text{cat}} = \frac{k_h k_e k_f}{k_h (k_f + k_e + k_r) + k_e k_f}. \quad (5)$$

Можно видеть, что в реакции ТИЛ с  $L$ -серином изотопный эффект растворителя на параметр составляет 3.5 (таблица). Среди констант, входящих

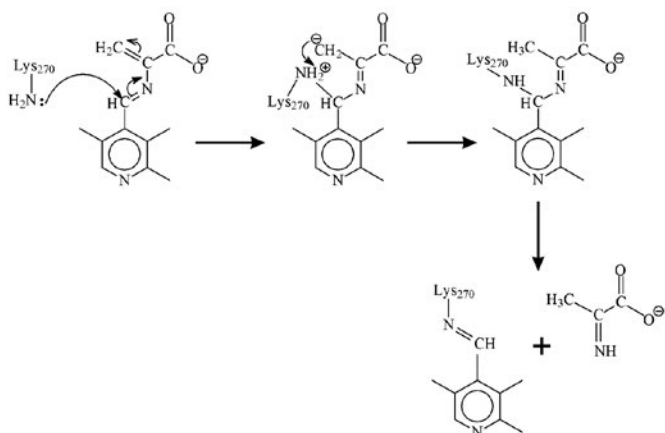


Рис. 5. Вероятная схема гидролиза аминокрилата в реакции ТИЛ с *L*-серином

в уравнение (4), величина  $k_e$  не является изотоп-чувствительной, если происходит прямой отрыв  $S_\alpha$ -протона под действием аминогруппы Lys270. Величина  $k_t$  должна быть изотоп-чувствительной, поскольку эта константа отражает репротонирование  $S_\alpha$ -атома хиноидного интермедиата под действием аммониевой группы Lys270, содержащей в  $^2\text{H}_2\text{O}$  не менее двух дейтериев, и трех – в случае достаточно быстрого изотопного обмена с растворителем. Однако, как следует из уравнения (4), этот эффект должен приводить к ускорению реакции в  $^2\text{H}_2\text{O}$ , тогда как в действительности наблюдается ее замедление. Можно заключить, что единственная стадия, определяющая наблюдаемый изотопный эффект растворителя, – элиминирование уходящей гидроксильной группы, поскольку эта стадия предполагает перенос протона от Lys270 через цепочку водородных связей к Tyr74, а затем к гидроксильному кислороду. При замене обычной воды на  $^2\text{H}_2\text{O}$  все протоны, участвующие в этом переносе, обмениваются на дейтероны, и процесс, естественно, должен замедляться. Как видно из таблицы, изотопный эффект растворителя на параметр  $V$  в пределах ошибки опыта не отличается от единицы. Это, по всей вероятности, связано с появлением в уравнении (5), описывающем величину параметра  $k_{\text{cat}}$ , новой константы  $k_h$ , определяющей скорость гидролиза аминокрилата и отсутствующей в (4). Как видно из таблицы, изотопный эффект растворителя на параметр  $k_{\text{cat}}$  не отличается от единицы в пределах ошибки опыта. Легко видеть, что при условии  $k_h(k_t + k_r) \ll k_e k_t$  значение  $k_{\text{cat}}$  можно считать равным  $k_h$  ( $k_{\text{cat}} \sim k_h$ ). По-видимому, величина  $k_h$  является, с одной стороны, скоростью лимитирующей, а с другой, нечувствительной к изотопному эффекту растворителя.

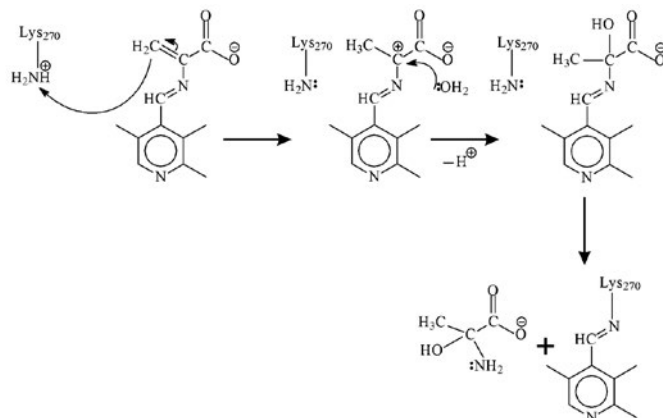


Рис. 6. Возможная схема гидролиза аминокрилата в реакции ТИЛ с  $\beta$ -хлор-*L*-аланином

В реакции ТИЛ с  $\beta$ -хлор-*L*-аланином отщепление уходящей группы должно происходить без перемещения протона к отщепляющемуся аниону хлора, поэтому стадия, описываемая константой  $k_e$ , не должна быть изотоп-чувствительной. Все, что говорилось выше о константах  $k_t$  и  $k_r$  в реакции с *L*-серином, должно быть справедливо и в реакции с  $\beta$ -хлор-*L*-аланином. Таким образом, следовало бы ожидать отсутствия изотопного эффекта растворителя на параметр  $V/K$ . На самом деле здесь также наблюдается изотопный эффект, равный 2.2. Возможное объяснение этого связано с тем, что стадия отрыва  $S_\alpha$ -протона ( $k_t$ ) может проходить не напрямую, а через молекулу (или молекулы) воды, что при замене обычной воды на  $^2\text{H}_2\text{O}$  должно приводить к снижению скорости стадии с  $k_t$ . Вообще говоря, аналогичная ситуация может наблюдаться и в реакции с *L*-серином. В таком случае изотопный эффект растворителя на параметр  $V/K$  может быть связан не только со стадией образования аминокрилата.

В реакции ТИЛ с  $\beta$ -хлор-*L*-аланином изотопный эффект растворителя на параметр  $V$  составляет 3.6 (см. таблицу). Таким образом, появление в уравнении (5) константы скорости гидролиза аминокрилата ( $k_h$ ) приводит к заметному увеличению изотопного эффекта, а не к его исчезновению, как в случае *L*-серина. Можно, следовательно, заключить, что в реакции с  $\beta$ -хлор-*L*-аланином гидролиз аминокрилата является изотоп-чувствительной стадией, и механизм гидролиза существенно иной, чем в реакции с *L*-серином.

В реакции с *L*-серином на стадии гидролиза аминокрилата Lys270 находится в нейтральной форме, и гидролиз может проходить в соответствии со схемой, где лимитирующей стадией является ата-



ка аминокислоты лизина по альдиминной двойной связи аминокрилатного интермедиата (см. рис. 5). Поскольку в ходе лимитирующей стадии не происходит передачи протонов, способных обмениваться на дейтероны, стадия гидролиза не должна быть чувствительной к изучаемой смене растворителя. С другой стороны, в реакции с  $\beta$ -хлор-*L*-аланином стадией, лимитирующей гидролиз аминокрилата, является формальное протонирование метиленовой группы аминокрилата аммониевой группой Lys270, содержащей дополнительный протон (см. рис. 6). По всей вероятности, перенос протона осуществляется по цепочке водородных связей. Поскольку протоны аммониевой группы, как и протоны в цепочке водородных связей, способны к изотопному обмену с растворителем, гидролиз должен быть изотоп-чувствительной стадией, что, по-видимому, и наблюдается в действительности.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные нами результаты показывают, что изменение нуклеофильного характера уходящей группы в субстратах ТИЛ приводит к изменению механизмов не только непосредственно элиминирования данной группы, но и последующей стадии гидролиза аминокрилата. ●

*Работа выполнена при поддержке РФФИ (грант № 16-04-00947). Спектральные исследования и элементный анализ проведены при поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации с использованием научного оборудования Центра исследования строения молекул ИНЭОС РАН.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ivanov V.I., Karpeisky M.Ya. // Adv. Enzymol. Relat. Areas Mol. Biol. 1969. V. 32. P. 21–53.
- Lee M., Phillips R.S. // Bio. Med. Chem. 1995. V. 3. № 2. P. 195–205.
- Faleev N.G., Gogoleva O.I., Dementieva I.S., Zakomirdina L.N., Belikov V.M. // Biochem. Mol. Biol. Int. 1994. V. 34. № 1. P. 209–216.
- Harris A.P., Phillips R.S. // FEBS J. 2013. V. 280. № 8. P. 1807–1817.
- Suelter C.H., Wang J., Snell E.E. // FEBS Lett. 1976. V. 66. № 2. P. 230–232.
- Watanabe T., Snell E.E. // J. Biochem. (Tokyo) 1977. V. 82. № 3. P. 733–745.
- Phillips R.S. // Arch. Biochem. Biophys. 1987. V. 256. № 1. P. 302–310.
- Dementieva I.S., Zakomirdina L.N., Sinitzina N.I., Antson A.A., Wilson K.S., Isupov M.N., Lebedev A.A., Harutyunyan E.H. // J. Mol. Biol. 1994. V. 235. № 2. P. 783–785.
- Kogan A., Gdalevsky G.Y., Kohen-Luria R., Parola A.H., Golggur Y. // Acta Cryst. 2004. D60. Pt 11. P. 2073–2075.
- Tsesin N., Kogan A., Gdalevsky G., Himanen J.-P., Cohen-Luria R., Parola A., Goldgur Y., Almog O. // Acta Cryst. D. Biol. Cryst. 2007. V. 63. Pt. 9. P. 969–974.
- Isupov M.N., Antson A.A., Dodson E.J., Dodson G.G., Dementieva I.S., Zakomirdina L.N., Wilson K.S., Dauter Z., Lebedev A.A., Harutyunyan E.H. // J. Mol. Biol. 1998. V. 276. № 3. P. 603–623.
- Phillips R.S., Miles E.W., Cohen L.A. // Biochemistry. 1984. V. 23. № 25. P. 6228–6234.
- Kiik D.M., Phillips R.S. // Biochemistry. 1988. V. 27. № 19. P. 7339–7344.
- Phillips R.S. // J. Am. Chem. Soc. 1989. V. 111. № 2. P. 727–730.
- Phillips R.S. // Biochemistry. 1991. V. 30. № 24. P. 5927–5934.
- Phillips R.S., Sundararaju B., Faleev N.G. // J. Amer. Chem. Soc. 2000. V. 122. № 6. P. 1008–1014.
- Demidkina T.V., Antson A.A., Faleev N.G., Phillips R.S., Zakomirdina L.N. // Mol. Biol. 2009. V. 43. № 2. P. 269–283.
- Demidkina T.V., Zakomirdina L.N., Kulikova V.V., Dementieva I.S., Faleev N.G., Ronda L., Mozzarelli A., Gollnick P.D., Phillips R.S. // Biochemistry. 2003. V. 42. № 38. P. 11161–11169.
- Kulikova V.V., Zakomirdina L.N., Bazhuina N.P., Dementieva I.S., Faleev N.G., Gollnick P.D., Demidkina T.V. // Biochemistry (Moscow). 2003. V. 68. № 11. P. 1181–1188.
- Phillips R.S., Buisman A.A., Choi S., Hussaini A., Wood Z.A. // Acta Crystallogr. D Struct. Biol. 2018. V. 74(Pt 8). P. 748–759. doi: 10.1107/S2059798318003352.
- Vederas J.C., Schleicher E., Tsai M.D., Floss H.G. // J. Biol. Chem. 1978. V. 253. № 15. P. 5330–5334.
- Phillips R.S., Gollnick P.D. // J. Biol. Chem. 1989. V. 264. № 18. P. 10627–10632.
- Dua R.K., Taylor E.W., Phillips R.S. // J. Amer. Chem. Soc. 1993. V. 115. № 4. P. 1264–1270.
- Kagamiyama H., Wada H., Matsubara H., Snell E.E. // J. Biol. Chem. 1972. V. 247. № 5. P. 1571–1575.
- Phillips R.S., Ravichandran K., von Tersch R.L. // Enz. Microb. Technol. 1989. V. 11. № 2. P. 80–83.
- Cleland W.W. // Methods Enzymol. 1979. V. 63. P. 103–138.

УДК 577.322.7'352.42

# Аномально высокий потенциал закрытия канала порина OmpF из *Yersinia ruckeri*: роль заряженных остатков и внутримолекулярных связей

Д. К. Чистюлин<sup>1\*\*</sup>, О. Д. Новикова<sup>1</sup>, Е. А. Зелепуга<sup>1\*\*</sup>, В. А. Хоменко<sup>1</sup>, Г. Н. Лихацкая<sup>1</sup>,  
О. Ю. Портнягина<sup>1</sup>, Ю. Н. Антоненко<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Тихоокеанский институт биоорганической химии им. Г.Б. Елякова ДВО РАН, 690022, Владивосток, просп. 100 лет Владивостоку, 159

<sup>2</sup>Институт физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, 119991, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 73

\*E-mail: cdk27@mail.ru; zel@piboc.dvo.ru

#Авторы внесли равный вклад в работу.

Поступила в редакцию 11.04.2019

Принята к печати 17.05.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-89-98

**РЕФЕРАТ** Электрофизиологические эксперименты на бислойных липидных мембранах показали, что изолированный основной порин наружной мембраны бактерии *Yersinia ruckeri* (YrOmpF) обладает типичной для поринов грамотрицательных бактерий активностью, образуя каналы со средней проводимостью 230 пСм (в 0.1 М КСl) и небольшой асимметрией по отношению к приложенному потенциалу. Не выявлено существенного уменьшения суммарной проводимости встроенного в бислой канала YrOmpF при закислении среды (вплоть до pH 3.0). От поринов других бактерий исследуемый канал существенно отличают высокие значения критического потенциала закрытия ( $V_c$ ): при pH 7.0  $V_c = 232$  мВ, при pH 5.0  $V_c = 164$  мВ. Для объяснения этих свойств с помощью теоретической модели пространственной структуры YrOmpF проанализировано распределение зарядов в устье и внутри канала, а также дана количественная оценка связей между аминокислотными остатками, локализованными в петле L3 и на внутренней стенке барреля. Проведено сравнение характеристик YrOmpF и классического порина OmpF *Escherichia coli*. Результаты электрофизиологических экспериментов и теоретического анализа обсуждаются с точки зрения механизма потенциал-зависимого закрытия пориновых каналов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** *Yersinia ruckeri*, бислойные липидные мембраны, критический потенциал закрытия, по-рообразующие белки.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** YrOmpF – порин OmpF *Yersinia ruckeri*; EcOmpF – порин OmpF *Escherichia coli*;  $V_c$  – критический потенциал закрытия; НМ – наружная мембрана; АК – аминокислотный; МД – молекулярная динамика; БЛМ – бислойные липидные мембраны; РОЕ – *n*-октилполиоксиэтилен; DPhPC – дифитаноил-фосфатидилхолин; YrOmpF – порин OmpF *Yersinia pseudotuberculosis*.

## ВВЕДЕНИЕ

*Yersinia ruckeri* – грамотрицательная бактерия, вызывающая иерсиниоз у рыб, преимущественно лососевых. Подобно другим иерсиниям, этот патоген обладает способностью выживать и сохранять вирулентность в различных условиях окружающей среды и в достаточно широком диапазоне температур. У рыб, культивируемых в условиях аквакультуры, *Y. ruckeri* вызывает вспышки заболевания, ежегодно приводящие к большим экономическим потерям [1–4].

Известно, что порины, наряду с липополисахаридом, представляют собой количественно доминантный компонент наружной мембраны (НМ) грамотрицательных бактерий и играют большую роль в адаптации микроорганизмов к изменению условий окружающей среды. Как трансмембранные белки, они образуют систему каналов для пассивного транспорта низкомолекулярных гидрофильных соединений через НМ бактерий. Основной функциональной единицей порина является гомотример [5, 6]. Мономер белка представляет собой эллипсообраз-

ный бета-складчатый цилиндр (баррель), состоящий из антипараллельных бета-тяжей, соединенных участками (наружными петлями) с альфа-спиральной или неупорядоченной структурой. Внутренняя часть канала мономера порина образована гидрофильной поверхностью бета-барреля, а внешняя – прилегающими участками петель (зона устья и вестибюля поры). Непосредственно к вестибюлю поры примыкает также участок петли L2 соседнего барреля, поскольку она направлена в сторону от «своего» мономера. В центре канала находится самая длинная петля L3, которая, в отличие от остальных, выходящих за пределы барреля, погружена в полость поры до середины, ограничивая тем самым ее размер и образуя сужение, так называемую зону констрикции, или «глазок поры». Стенка барреля сформирована преимущественно положительно заряженными аминокислотными (АК) остатками, а петля L3, напротив, содержит большое количество кислых АК-остатков. Пространственная конфигурация заряженных АК-остатков такова, что внутри канала формируется электростатическое поле, которое обуславливает селективность канала по отношению к зарядам проникающих ионов и гидрофильных соединений [7].

Электрофизиологические эксперименты, выполненные на неспецифических поринах *Escherichia coli*, показали, что большую часть времени канал белка OmpF пребывает в открытом состоянии, обеспечивая поступление ионов и гидрофильных молекул в клетку. Однако большинство поринов обладает способностью переходить в стабильное закрытое состояние, например, при увеличении кислотности среды и/или под действием приложенного внешнего потенциала (потенциал-зависимое закрытие) [8–14].

Существуют различные гипотезы в отношении биологической функции, связанной со свойствами каналов. В частности, это может быть следствием закрытия каналов неправильно встроенных белков, а также быть защитной (при понижении pH среды) или даже регуляторной транспортной функцией поринов (например, у белков с очень низким критическим потенциалом закрытия канала,  $V_c$ ) [15, 16]. Однако все выдвигаемые объяснения недостаточно убедительны и, возможно, это свойство может рассматриваться лишь как необычный артефакт [17].

Разные предположения высказываются и о механизме потенциал-зависимого закрытия пориновых каналов (механизма стробирования). На основании данных молекулярной динамики (МД) в качестве возможного стробирующего механизма предложена модель «подвижной» петли L3, изменение положения которой приводит к блокированию канала [18]. Однако, поскольку это петля имеет много взаимодействий со стенкой барреля (солевые мостики, сеть во-

дородных связей), эта идея кажется маловероятной. Кроме того, показано, что процесс закрытия канала не сопровождается существенными изменениями в положении петли: не обнаружено заметных отличий в этом свойстве у OmpF *E. coli* с модифицированной с помощью дисульфидных мостиков петель L3 [19, 20]. Данный факт говорит в пользу того, что возможной причиной перекрытия канала становятся локальные изменения в третичной структуре некоторых участков петли L3. Исследование пертурбаций с помощью МД позволило предположить, что по крайней мере часть петли L3 порина из *R. capsulatus* является гибкой [21]. Эта часть вполне может соответствовать области сразу за консервативным мотивом последовательности PEEGG, обнаруженным в OmpF кишечной палочки. Действительно, замена двух остатков глицина в PEEGG привела к изменению функциональной характеристики канала [22]. Стоит отметить, что гипотезы, объясняющие явление потенциал-зависимого закрытия каналов порообразующих белков, достаточно противоречивы, как и факты, на которых они основаны. Известно, например, что сильное влияние на величину  $V_c$  оказывают заряженные АК-остатки, находящиеся внутри барреля и формирующие электростатическое поле. При этом замена отрицательных и положительно заряженных остатков оказывает различное действие на порины разных типов. Так, PhoE *E. coli*, селективный по отношению к отрицательным ионам, реагирует на замену в петле L3 кислых остатков на нейтральные – понижением  $V_c$ , в то время как катион-селективный OmpF *E. coli* – его повышением. Напротив, замена основных остатков в барреле приводит к повышению  $V_c$  у PhoE и понижению  $V_c$  у OmpF [23].

Тем не менее, исходя из гипотезы о «гибкой» петле L3, противоречивость экспериментальных фактов можно объяснить двойкой ролью заряженных АК-остатков. С одной стороны, эти остатки через водородные и ионные связи с соседними АК-остатками принимают участие в формировании третичной структуры канала и соответственно в стабилизации его открытого состояния. С другой стороны, они являются сенсорами электрического поля и способствуют переходу канала в закрытое состояние. В этом случае их чувствительность по отношению к изменению потенциала на мембране в сочетании с локализацией в длинной и достаточно подвижной петле L3 может вызвать изменение конформации петли L3. Это объясняется тем, что движение молекул через пору сопровождается перераспределением молекул воды (или противоионов) внутри канала и связанной с ним переориентацией боковых цепей АК-остатков в канале. В результате внутри петли L3 могут осущест-

вляться локальные перемещения, приводящие к закрытию поры [13, 24].

В настоящей работе, используя искусственные бислоиные липидные мембраны (БЛМ), мы охарактеризовали электрофизиологические свойства каналов порина OmpF из *Y. ruckeri* (YrOmpF) и OmpF из *E. coli* (EcOmpF), а именно, определили величины проводимостей одиночных каналов этих белков и значения критических потенциалов закрытия в нейтральной и слабокислой средах. Исследовано также изменение суммарной проводимости каналов при ступенчатом изменении pH среды до значения pH 3.0. С помощью пространственных моделей YrOmpF и EcOmpF мы провели сравнительный анализ распределения заряженных АК-остатков в устье, вестибуле и внутри канала обоих белков, количественно оценили внутримолекулярные связи петли L3. Учитывая определяющее значение этих данных для характеристики функциональных свойств пориновых каналов, такое сравнение представляло особый интерес, поскольку порин OmpF *Y. ruckeri* отличается по содержанию кислых АК-остатков в петле L3 от классического OmpF *E. coli*. Применение расчетных данных позволило обнаружить более жесткую конформацию петли L3 в YrOmpF, что, очевидно, влияет на стабильность открытого состояния его канала и обуславливает более высокое значение  $V_c$ .

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Микроорганизмы

В работе использован штамм КММ 821 *Y. ruckeri*. Микроорганизмы культивировали в среде  $2 \times \text{YT}$  при  $6^\circ\text{C}$ , как описано в работе [25], и отбирали на логарифмической фазе роста. Затем суспензию клеток центрифугировали при  $5000 g$ , полученный осадок дважды промывали физиологическим раствором.

### Получение фракции пептидогликан-ассоциированных белков, выделение и очистка порина YrOmpF

Бактерии *Y. ruckeri* разрушали ультразвуком с помощью дезинтегратора (УЗДН-2Т, Россия) при  $44 \text{ МГц}$  на ледяной бане (10 раз по 1 мин с перерывом на 1–2 мин для охлаждения смеси). Неразрушенные клетки удаляли центрифугированием при  $5000 g$  в течение 10 мин, супернатант центрифугировали при  $20000 g$  в течение 1 ч. Полученную в виде осадка фракцию «сырых» мембран обрабатывали 0.5% неионным детергентом октилполиоксиэтиленом (РОЕ) в 10 мМ фосфатном буфере pH 8.5 (буфер А) по методу Гаравито [26]. Наличие целевого белка в экстрактах определяли по данным денатуриру-

ющего электрофореза в полиакриламидном геле (SDS-ПААГ-электрофореза) [27]. Фракции, содержащие максимальное количество YrOmpF в олигомерной форме, объединяли и очищали с помощью ионообменной хроматографии на DEAE-сефарозе CL6B, белок элюировали в буфере А, содержащем 0.1% Zwittergent 3-14, используя градиент NaCl 0.137–0.5 М. Гомогенный электрофоретически чистый YrOmpF элюировался при 0.4 М NaCl, что подтверждено с помощью SDS-ПААГ-электрофореза. Данный образец использовали в электрофизиологических экспериментах.

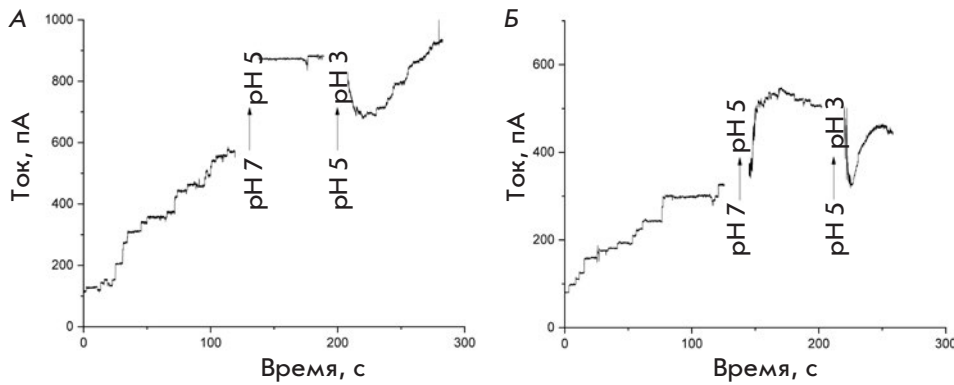
### Электрофизиологические эксперименты

БЛМ формировали по методу Мюллера–Рудина [28] из раствора дифитаноилфосфатидилхолина (DPhPC) в *n*-гептане (5 мг/мл) в тefлоновых ячейках, разделенных перегородкой с отверстиями диаметром 1 мм для суммарного тока и 0.25 мм для одиночных каналов. Водная фаза содержала 0.1 или 1 М KCl в буфере следующего состава: 10 мМ Трис-HCl, 10 мМ MES, 10 мМ бета-аланина (pH 7.0, 5.0 и 2.8). Для детекции ионного тока использовали пару электродов Ag/AgCl в режиме фиксации напряжения. Электрод на цис-стороне от мембраны был заземлен, на транс-стороне – подключен к усилителю BC-525C (Warner Instruments, США). Измерения проводили при комнатной температуре. Раствор белка добавляли с цис-стороны ячейки и, поднимая напряжение до 200 мВ, добивались встраивания каналов. Суммарный ток через БЛМ фиксировали при концентрации YrOmpF 50–500 нг/мл, одиночные каналы белка получали при концентрации 5–20 нг/мл. Изменение тока через БЛМ фиксировали в присутствии белка, растворенного в буфере с нейтральным или кислым значением pH и при различных значениях потенциала на мембране (от 50 до 150 мВ).

### Теоретический анализ внутримолекулярных связей

Для построения теоретической модели пространственной структуры OmpF *Y. ruckeri* использовали АК-последовательность порина E2FHC9 из базы данных Uniprot [29], а координаты атомов порина OmpF *E. coli* (2OMF PDB ID) использовали в качестве прототипа. Гомологичные модели генерировали с помощью программы МОЕ как описано ранее [30]. Для оптимизации моделей использовали программу МОЕ 2018.0101 и силовое поле Amber10:ЕНТ [31]. Согласно карте Рамачандрана в построенных моделях каналов YrOmpF и EcOmpF порядка 96.4% остатков локализованы в благоприятной конформации, а 3.6% в допустимой. Это указывает на возможность использования данных моделей для дальнейшего исследования.





**Рис. 1.** Проводимость пориновых каналов YrOmpF и EcOmpF, титруемых от pH 7.0 до pH 3.0. Водная фаза: 0.1 М KCl, 10 мМ Трис-HCl, 10 мМ MES, 10 мМ бета-аланин, 100 нг/мл белка. Мембранный потенциал 50 мВ. А – OmpF *E. coli*, Б – OmpF *Y. ruckeri*

Энергетический вклад внутримолекулярных нековалентных взаимодействий в формирование структуры порина анализировали и оценивали также с использованием программы MOE 2018.0101 [31]. Оценку геометрических и физико-химических характеристик интерьера поры выполняли с использованием удаленного ресурса MOLE online [32].

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Электрофизиологические свойства YrOmpF в нейтральных и кислых средах

На рис. 1 приведены записи изменения суммарной электрической проводимости плоской бислоидной мембраны из DPhPC, находящейся под действием потенциала  $\pm 50$  мВ, в присутствии YrOmpF или EcOmpF при различных значениях pH среды. Запись флуктуаций тока (первый отрезок кривых) иллюстрирует активное ступенчатое увеличение проводимости мембраны при введении поринов в концентрации 100 нг/мл в водную фазу (буфер с pH 7.0). Данный эффект, характерный для поринов грамотрицательных бактерий, отображает встраивание функционально активных белковых тримеров.

Для того чтобы оценить возможное влияние кислотности среды на функциональную активность встроенного в липидный бислой YrOmpF, водную фазу, находящуюся в обеих частях ячейки, в ходе эксперимента последовательно подкисляли до значений pH 5.0 и 3.0. Кривые записи тока, представленные на рис. 1Б (второй и третий отрезки), говорят о том, что при уменьшении значения pH среды проводимость мембраны увеличивается. При этом показано, что проводимость одиночного канала не изменяется, значит, данный эффект иллюстрирует резкую активацию встраивания белка в мембрану.

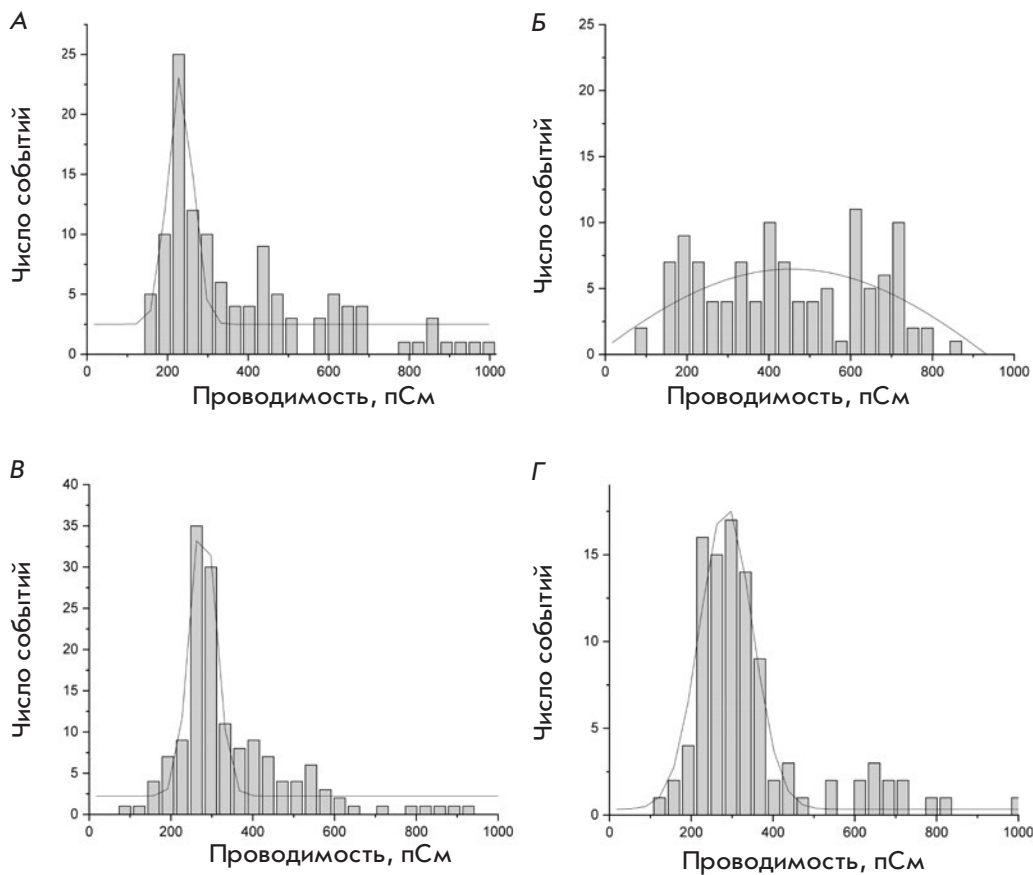
При pH среды 3.0 (третий отрезок на кривой) величина общей проводимости канала YrOmpF резко уменьшалась, постепенно восстанавливаясь в дальнейшем. Запись тока в этих условиях характеризовалась повышенным шумом, что типично для кана-

лов поринов в экстремально кислых условиях среды и связано с быстрым открытием-закрытием каналов.

Следует отметить, что при кратковременной инкубации (в течение мин) белка при низких значениях pH мы не наблюдали снижения суммарной проводимости канала. Однако длительное выдерживание белка в буфере с pH 3.0 перед реконструкцией в БЛМ приводило к потере функциональной активности YrOmpF, которая не восстанавливалась даже после нейтрализации среды (данные не приведены). Вероятно, молекулы исследуемого порина при экстремально кислых значениях pH среды претерпевают значительные конформационные изменения, лишаящие их способности образовывать в мембране проводящие каналы. Очевидно, липидное окружение предохраняет белок от подобных изменений в пространственной структуре, способствует стабилизации их функционально активной конформации, что в результате приводит к сохранению функциональной активности большинства уже встроенных каналов.

Чтобы проследить влияние pH на проводимость одиночного канала YrOmpF и его асимметрию, белок (10 нг/мл) встраивали в мембрану в буфере при pH 7.0 в 0.1 М KCl, затем одновременно подкисляли буфер в обеих ячейках. В ходе этого эксперимента обнаружено, что канал порина обладает небольшой асимметрией проводимости (12%), которая сохранялась и при закислении среды до pH 5.0. Величина проводимости каналов при закислении увеличивалась в среднем на 12% ( $n = 4$ ). Следует сказать, что аналогичная асимметрия канала наблюдалась и в случае порина OmpF *E. coli* [14].

Гистограммы проводимости одиночных каналов YrOmpF и EcOmpF в нейтральной и кислой среде (рис. 2) получали в 0.1 М KCl. Заранее проинкубированные в буферных растворах с различными значениями pH (7.0 и 5.0) образцы белка добавляли с цис-стороны ячейки до конечной концентрации (100 нг/мл) и прикладывали потенциал от 50 до 150 мВ. В ходе эксперимента проанализиро-



**Рис. 2.** Распределение уровней проводимости одиночных каналов YrOmpF (А, Б) и EsOmpF (В, Г), образованных в БЛМ из DPhPC при реконструкции белка в нейтральной pH 7.0 (А, В) и кислой pH 5.0 (Б, Г) среде. Водная фаза: 0.1 М KCl, 10 мМ Трис-НСl, 10 мМ MES, 10 мМ бета-аланин, 100 нг/мл белка. Мембранный потенциал 50–150 мВ

ваны данные сотни событий ступенчатого встраивания исследуемых белков.

Показано, что, встраиваясь в модельную мембрану из DPhPC как в нейтральной, так и в кислой среде, YrOmpF образует гетерогенную по проводимости популяцию пор. При pH 7.0 в 0.1 М KCl наибольшее число каналов имеет проводимость в области 230 пСм (рис. 2А), при этом на гистограмме видны минорные пики с кратной проводимостью, соответствующие, очевидно, агрегатам тримеров белка (460 и 690 пСм). С уменьшением значения pH среды до 5.0 (рис. 2Б) гетерогенность каналов YrOmpF по уровню проводимости еще более увеличивалась. На гистограмме появлялись дополнительные пики, а также возрастала доля каналов с проводимостью, кратной основной.

По сравнению с YrOmpF канал EsOmpF обладает меньшей гетерогенностью популяции пор с пиком 276 пСм при pH 7.0 и 285 пСм при pH 5.0. Однако в кислой среде наблюдается более широкое распределение уровней проводимости каналов белка EsOmpF.

Как показано нами ранее, порины иерсиний, особенно непатогенных [33], характеризовались широким разбросом уровней проводимости каналов по сравнению с OmpF *E. coli*. В случае YrOmpF это

может быть связано с тем, что данный порин является белком дикого типа, полученным из мембраны с помощью неионного детергента POE, более мягко действующего на конформацию порина при выделении, нежели ионный детергент SDS. Вследствие этого в образце YrOmpF могут сохраняться ассоциаты тримеров белка с более высоким уровнем проводимости. Описанные выше изменения функциональных свойств YrOmpF под влиянием pH среды обнаруживали и каналы OmpF *Y. pseudotuberculosis* (YrOmpF). Нами показано, что в водном растворе при pH 7.0 этот белок находится преимущественно в виде тримеров, тогда как при pH 3.0 – в мономерной форме [34]. Основные нарушения пространственной организации YrOmpF в кислой среде связаны с уменьшением плотности упаковки бета-барреля и изменением микроокружения ароматических хромофоров в молекуле белка. При низких значениях pH изменения в электростатическом потенциале поверхности белковой молекулы сопровождаются значительными структурными перестройками, что приводит к диссоциации тримеров порина на мономеры [34]. Кроме того, как показано нами ранее, обе молекулярные формы белка (тример и мономер) имели высокое сродство к мембране, но только связывание

тримеров приводило к формированию поринового канала в липидном бислое [35].

Таким образом, на основании экспериментальных данных, полученных на YrOmpF и EcOmpF, а также с учетом результатов более ранних исследований, проведенных на близкородственном порине псевдотуберкулезного микроба, можно сделать следующий вывод. Экстремально низкие значения pH среды приводят к необратимому изменению способности исследуемых поринов встраиваться в модельную мембрану с образованием каналов. Тем не менее, подобные условия не снижают проводимость уже встроенных каналов. Поэтому тенденция пориновых каналов к закрыванию при понижении pH вряд ли способна играть значимую роль в регуляции ионного потока через бактериальную мембрану.

### Потенциал-зависимое закрытие каналов YrOmpF

Одно из свойств каналов порообразующих белков грамотрицательных бактерий – их способность переходить в закрытое состояние при увеличении прикладываемого к мембране потенциала. Такое закрытие происходит ступенчато и отражает поочередное закрывание каналов мономеров в тримере белка.

Поскольку каналы YrOmpF проявляли слабую тенденцию к закрыванию, а высокие значения потенциала на мембране (более 220 мВ) часто приводили к значительной активации их встраивания, снятие классических вольт-амперных характеристик представляло определенные экспериментальные сложности. Поэтому способность каналов YrOmpF закрываться под действием потенциала была изучена на уровне одиночных каналов. С этой целью образец YrOmpF в концентрации 5 нг/мл добавляли в ячейку с цис-стороны и повышали потенциал на мембране до 250 мВ, ожидая события встраивания одиночного канала. Затем напряжение сбрасывали до 100 мВ и повышали ступенчато со скоростью 10 мВ/мин. Значение потенциала, которое приводило к стабильному закрытию хотя бы одного мономера, считали критическим потенциалом закрытия ( $V_c$ ). Подобным образом проанализированы 10 каналов YrOmpF при pH 7.0 и 15 – при pH 5.0, что позволило определить значение  $V_c$  в этих условиях. Данную методику определения значения  $V_c$  мы использовали и в случае каналов EcOmpF. Полученные значения приведены в таблице.

Характерные записи тока, иллюстрирующие разницу в потенциалах закрытия каналов двух белков, приведены на рис. 3 (не все каналы на приведенных записях являются одиночными).

В ходе эксперимента обнаружено, что каналы YrOmpF имеют необычно высокие значения критического потенциала закрытия по сравнению с кана-

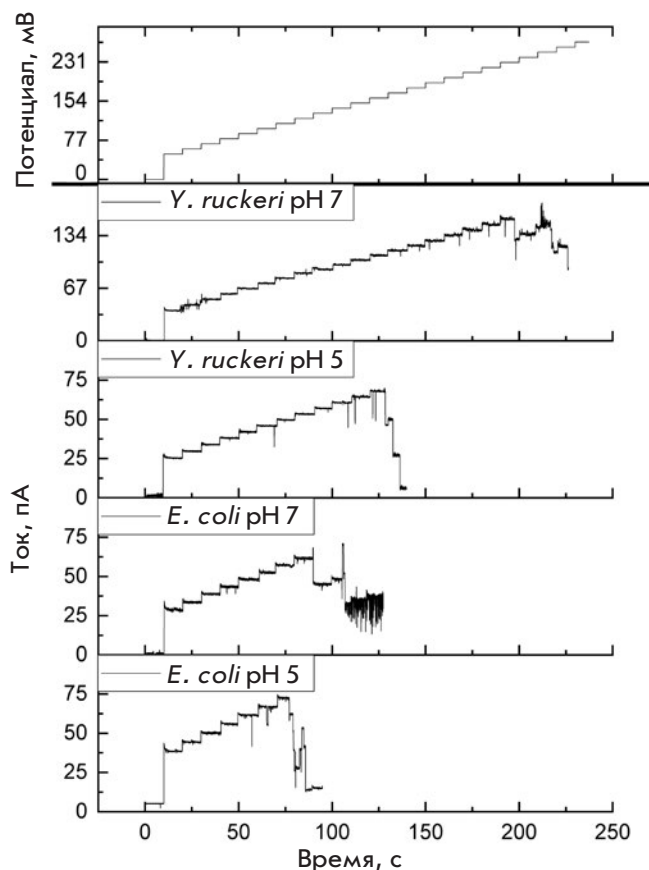


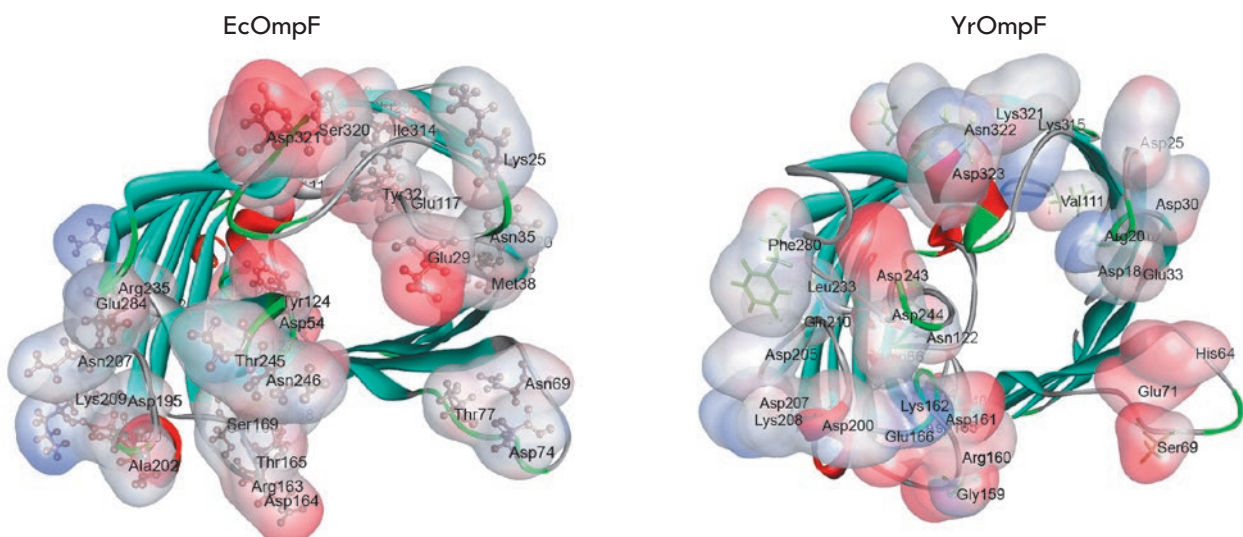
Рис. 3. Проводимость пориновых каналов YrOmpF и EcOmpF при ступенчатом повышении мембранного потенциала. Водная фаза: 0.1 М KCl, 10 мМ Трис-НCl, 10 мМ MES, 10 мМ бета-аланин, 10 нг/мл белка. Мембранный потенциал 0, 50–250 мВ

Значения критических потенциалов закрытия исследуемых поринов

Порин	$V_c$ , мВ	
	pH 7.0	pH 5.0
<i>E. coli</i> OmpF	124 ± 6 (n = 10)	103 ± 10 (n = 15)
<i>Y. ruckeri</i> OmpF	232 ± 7 (n = 10)	164 ± 8 (n = 15)

лами EcOmpF (таблица). Кроме того, установлена зависимость этой характеристики канала YrOmpF от кислотности среды, поскольку понижение pH электролита до значения 5.0 приводило к уменьшению  $V_c$ . Таким образом, pH-зависимость проводимости каналов исследуемого белка подобна таковой каналов OmpF *E. coli* [36]. Значения  $V_c$ , полученные нами для образца EcOmpF, используемого нами, также соответствуют данным [36].

Как известно, функциональные характеристики пориновых каналов определяются, в основном,



**Рис. 4.** Диаграмма распределения основных и кислых АК-остатков в переменных областях молекул поринов. Структура белков представлена в виде ленточной диаграммы мономера. Переменные АК-остатки представлены в виде полупрозрачных поверхностей и окрашены согласно заряду: основные – синим, кислые – красным. Боковые цепи АК-остатков EcOmpF и YrOmpF приведены в шаро-стержневом и стержневом представлении соответственно

структурой его зоны сужения, где диаметр бета-барреля существенно уменьшается [7]. Необычная организация зоны констрикции поры с двумя полукольцами противоположного заряда, расположенными друг напротив друга в ограниченном пространстве, генерирует интенсивное электростатическое поле в поре, которое управляет потоком растворенного вещества через канал и соответственно определяет поровую активность конкретного белка.

Катионный кластер на внутренней стенке барреля OmpF *E. coli* сформирован тремя остатками аргинина (Arg42, Arg82 и Arg132), которые фланкированы остатком лизина (Lys16). Во внутренней части барреля OmpF поринов иерсиний, как показано нами ранее [37], как и у OmpF *E. coli*, присутствует положительно заряженный кластер. В YrOmpF этот аргининовый кластер представлен тремя остатками (Arg37, Arg76 и Arg127). Однако в высококонсервативном у поринов участке PEEFGG петли L3 [38] кислый остаток Glu117 (присутствующий в OmpF *E. coli*), как и у остальных иерсиний, заменен на нейтральный Val111. Помимо этого, в данной петле в случае YrOmpF отсутствует еще один заряженный остаток: вместо Asp127 (в OmpF *E. coli*) находится Asn122. В итоге вместо шести кислых остатков, локализованных в петле L3 OmpF *E. coli*, YrOmpF содержит только четыре остатка, заряд которых может изменяться в кислой среде.

Известно, что замена заряженных остатков в петле L3 и на противоположных участках бета-барреля в АК-последовательности OmpF *E. coli* приводила к значительным вариациям в величинах  $V_c$ . Так, более высокие значения  $V_c$  получены для мутантов OmpF *E. coli* с заменами кислых остатков в петле L3 на нейтральные [23]. Таким образом, структурные различия в функционально важных участках петли L3, обнаруженные при сравнительном анализе АК-последовательностей YrOmpF и OmpF *E. coli*, могут быть причиной различий в значениях  $V_c$  этих двух белков.

#### **Анализ внутримолекулярных взаимодействий, исходя из теоретических моделей поринов**

Чтобы объяснить более высокое значение  $V_c$  порина OmpF *Y. ruckeri*, полученное экспериментально, чем у классического OmpF *E. coli*, мы использовали сравнительный анализ распределения зарядов в устье, вестибуле и внутри поры в теоретической модели пространственной структуры этих двух белков, построенной методом гомологичного моделирования.

При выравнивании АК-последовательностей исследуемых белков обнаружено, что первичная структура баррельной части их молекул имеет высокую степень гомологии, однако внешние петли отличаются длиной и АК-составом. Здесь наблюдаются как включения дополнительных остатков, так и делеции. Так, в YrOmpF петля L1 короче на два остатка,



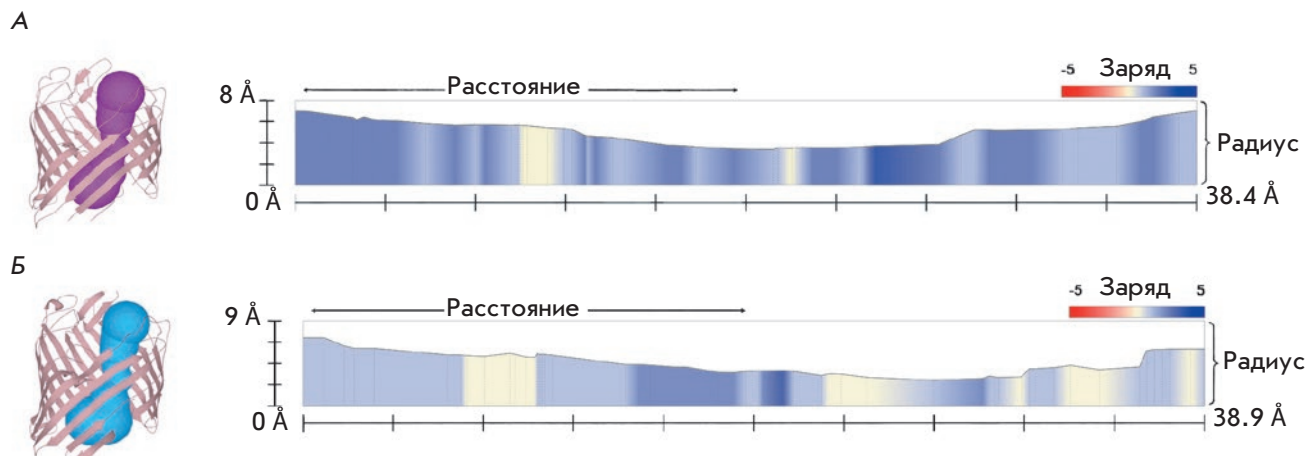


Рис. 5. Геометрические характеристики поры (длина, радиус) и распределение зарядов в интерьере поры. А – EcOmpF; Б – YrOmpF. Слева приведены модели пространственных структур мономеров соответствующих поринов

а петли L4 и L8 содержат соответственно два и четыре дополнительных остатка по сравнению с соответствующими петлями в EcOmpF. Помимо различий в количестве АК-остатков в петлях, формирующих вход в канал, оказалось, что число основных остатков в этой области молекулы EcOmpF заметно меньше, чем у YrOmpF (данные не приведены).

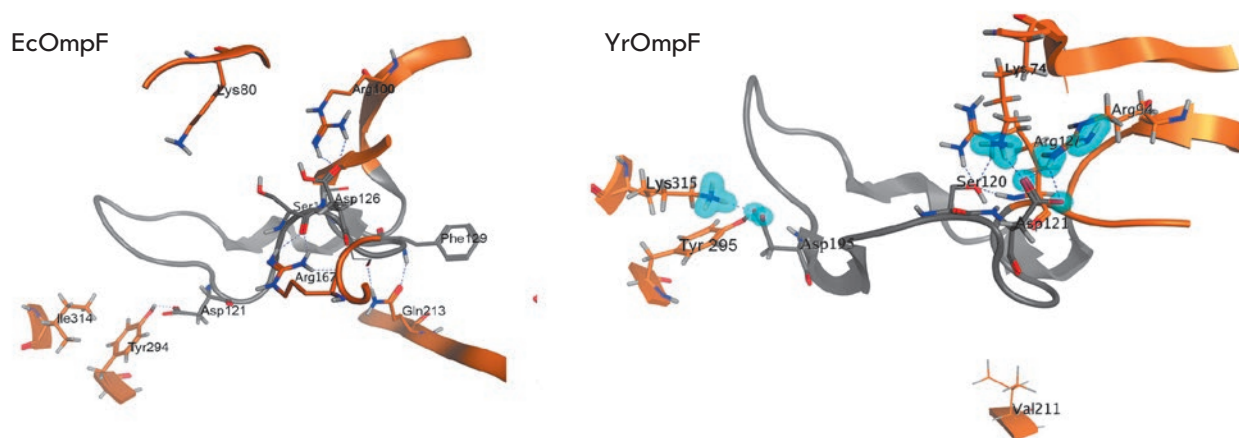
Детальный анализ распределения зарядов, выполненный методом MOLE, выявил существенные различия в количестве и локализации основных и кислых АК-остатков как в области наружных петель, так и внутри поры исследуемых белков (рис. 4 и 5). Так, у EcOmpF в области входа в канал сосредоточено большее количество кислых АК-остатков (рис. 4) и соответственно эта область заряжена более отрицательно по сравнению с YrOmpF. В то же время участки, составляющие внешний вестибуль и зону сужения канала EcOmpF, содержат больше основных АК-остатков и, следовательно, несут более сильный положительный заряд по сравнению с YrOmpF (рис. 5).

Кроме того, несмотря на соизмеримую длину пор (38.9 Å у YrOmpF и 38.4 Å у EcOmpF) исследуемые порины существенно различаются распределением зарядов во внутренней части их каналов. Так, интерьер EcOmpF характеризуется более тонкой структурной организацией с точки зрения чередования положительно и отрицательно заряженных остатков вдоль поры, в то время как на внутренней поверхности канала YrOmpF выявляются более протяженные заряженные участки (рис. 5).

Эти факты вполне могут служить одной из причин различий в величинах потенциалов закрытия рассматриваемых белков. Известны примеры, когда по-

рины Omp-Pst1 и Omp-Pst2 *Providencia stuartii*, имеющие близкое структурное сходство, из-за сильных различий в картине распределения зарядов вдоль стенки их каналов и соответственно силы электростатического взаимодействия внутри поры обладали не только противоположной ион-селективностью, но и существенно различались величиной потенциала закрытия [16].

С другой стороны, известно, что степень конформационной подвижности петли L3 определяется сетью водородных связей и солевых мостиков, существующих между вершиной и основанием L3 и соседней стенкой барреля [39]. Именно сила этих связей влияет на чувствительность поринового канала к напряжению на мембране [16]. Таким образом, особенности внутримолекулярных взаимодействий, связанных с L3, могут играть существенную роль не только в проводимости поры, но и в процессе включения-выключения канала под действием напряжения. Как сказано выше, среди существующих объяснений закрытия пориновых каналов под действием потенциала одной из наиболее обоснованных выглядит гипотеза «гибкой» петли L3. Благодаря способности к значительным флуктуациям, эта петля может изменять пространственную ориентацию под действием приложенного к мембране напряжения, что приводит к перекрытию потока ионов. Если эта гипотеза верна, то различие в величине потенциала закрытия у поринов YrOmpF и EcOmpF должно зависеть от степени стабильности конформации петли L3. А это у обоих белков определяется контактами и связями, которые существуют между конкретными АК-остатками в петле L3 и остатками в составе других петель и стенке барреля.



**Рис. 6.** Внутримолекулярные нековалентные взаимодействия функционально важных остатков петли L3 поринов EcOmpF и YrOmpF. Элементы вторичной структуры представлены в виде ленточной диаграммы, функционально важные АК-остатки приведены в стержневом представлении. Элементы петли L3 окрашены серым,  $\beta$ -тяжей и других петель – коричневым. Водородные связи представлены синей пунктирной линией, ионные взаимодействия – голубыми контурами

В ходе анализа внутримолекулярных взаимодействий между остатками петель L3 у рассматриваемых поринов установлено, что общее их число значительно различается. Так, в EcOmpF положение этой петли стабилизируют 23 нековалентных взаимодействия с общим энергетическим вкладом -63.8 ккал/моль, в то время как конформацию петли L3 YrOmpF определяют 35 взаимодействий, энергия которых имеет величину порядка -131.6 ккал/моль.

Согласно расчетным данным, в порине *E. coli* между вариabельными остатками Arg167 (Val163 в YrOmpF) и Gln213 (Ala215 в YrOmpF), локализованными соответственно в петле L4 и тяже  $\beta$ 10, и консервативными остатками Ser125 (Ser120 в YrOmpF) и Phe129 (Phe123 в YrOmpF) в петле L3 существуют водородные связи (рис. 6). Их наличие приводит к такой конформации боковой цепи консервативного остатка Asp126 в EcOmpF, которая препятствует образованию как солевых мостиков (с боковыми цепями Lys80), так и возникновению дополнительных водородных связей с Arg100 (образуются только две водородные связи). В то же время консервативный остаток Asp121 в петле L3 YrOmpF, соответствующий Asp126 в EcOmpF, образует пять солевых мостиков и четыре водородные связи с Arg94 в тяже  $\beta$ 5 (соответствует Arg100 в EcOmpF) с общим вкладом порядка -17.563 ккал/моль. Кроме того, между Asp121 и Lys74 в тяже  $\beta$ 4 порина *Y. ruckeri* (Lys80 в EcOmpF) образуется еще одна водородная связь с вкладом -13.8 ккал/моль (рис. 6).

На другом участке петли L3 замена Ile314 (в EcOmpF) на Lys315 (в YrOmpF) приводит к изме-

нению паттерна взаимодействий консервативного остатка Asp115 (соответствует Asp121 в EcOmpF) в петле L3 порина YrOmpF. В результате, помимо консервативных для данных поринов взаимодействий связи Asp115 с Tyr295 (-38.27 ккал/моль), Asp115 в YrOmpF образует сеть очень энергоемких водородных связей и ионных взаимодействий (-10, -6.355 и -2.652 ккал/моль) с боковой цепью Lys315 в тяже  $\beta$ 15, отсутствующих в EcOmpF (рис. 6).

Таким образом, расчетные данные свидетельствуют о том, что петля L3 YrOmpF имеет более стабильную конформацию.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На основании результатов электрофизиологических экспериментов обнаружено аномально высокое значение критического потенциала закрытия канала OmpF *Y. ruckeri* по сравнению с порином *E. coli*. Теоретический анализ распределения зарядов в участках пространственной структуры поринов, важных для канальной проводимости, а также количественная оценка внутримолекулярных связей внутри пор YrOmpF и EcOmpF позволили выявить существенные различия в полярных взаимодействиях между АК-остатками петли L3 и барреля. В случае YrOmpF конформационная подвижность петли L3 значительно более ограничена, что может быть причиной необходимости приложения дополнительного (по сравнению с порином *E. coli*) потенциала для перехода канала YrOmpF в закрытое состояние.

Полученные результаты вносят вклад в изучение молекулярных механизмов проводимости каналов

неспецифических поринов грамотрицательных бактерий. В качестве биологических нанопор эти белки представляют интерес для применения в нанотехнологии и наномедицине. Основой этого служит их способность изменять проводимость в ответ на любое внешнее воздействие и/или присутствие аналита. В связи с этим детальное изучение структурных основ функционирования порообразующих белков

позволит более осмысленно подходить к конструированию биологических сенсоров с заданными свойствами. ●

*Работа выполнена при частичной финансовой поддержке гранта Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 19-03-00318).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ross A.J., Rucker R.R., Ewing W.H. // *Can. J. Microbiol.* 1966. V. 12. № 4. P. 763–770.
- Rucker R.R. // *Bull. Off Int. Epizoot.* 1966. V. 65. № 5. P. 825–830.
- Hunter V.A., Knittel M.D., Fryer J.L. // *J. Fish Dis.* 1980. V. 3. № 6. P. 467–472.
- Coquet L., Cosette P., Junter G.A., Beucher E., Saiter J.M., Jouenne T. // *Colloids and Surfaces B.* 2002. V. 26. P. 373–378.
- Nikaido H. // *J. Biol. Chem.* 1994. V. 269. № 6. P. 3905–3908.
- Koebnik R., Locher K.P., van Gelder P. // *Mol. Microbiol.* 2000. V. 37. № 2. P. 239–253.
- Cowan S.W., Schirmer T., Rummel G., Steiert M., Ghosh R., Paupit R.A., Jansonius J.N., Rosenbusch J.P. // *Nature.* 1992. V. 358. № 6389. P. 727–733.
- Xu G., Shi B., McGroarty E.J., Ti Tien H. // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes.* 1986. V. 862. № 1. P. 57–64.
- Laakey J.H., Pattus F. // *Eur. J. Biochem.* 1989. V. 186. № 1–2. P. 303–308.
- Morgan H., Lonsdale J.T., Alder G. // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes.* 1990. V. 1021. P. 175–181.
- Todt J.C., McGroarty E.J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. V. 189. № 3. P. 1498–1502.
- Jones C.M., Taylor D.M. // *Thin Solid Films.* 1996. V. 284–285. P. 748–751.
- Delcour A.H. // *FEMS Microbiol. Lett.* 1997. V. 151. № 2. P. 115–123.
- Nestorovich E.M., Rostovtseva T.K., Bezrukov S.M. // *Biophys. J.* 2003. V. 85. № 6. P. 3718–3729.
- Nikaido H. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2003. V. 67. № 4. P. 593–656.
- Song W., Bajaj H., Nasrallah C., Jiang H., Winterhalter M., Colletier J.-P., Xu Y. // *PLoS Comput. Biol.* 2015. V. 11. № 5. P. e1004255.
- Sen K., Hellman J., Nikaido H. // *J. Biol. Chem.* 1988. V. 263. № 3. P. 1182–1187.
- Watanabe M., Rosenbusch J.P., Schirmer T., Karplus M. // *Biophys. J.* 1997. V. 72. № 5. P. 2094–2102.
- Phale P.S., Schirmer T., Prilipov A., Lou K.L., Hardmeyer A., Rosenbusch J.P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1997. V. 94. № 13. P. 6741–6745.
- Bainbridge G., Mobasher H., Armstrong G.A., Lea E.J., Lakey J.H. // *J. Mol. Biol.* 1998. V. 275. № 2. P. 171–176.
- Soares C.M., Björkstén J., Tapia O. // *Protein Eng.* 1995. V. 8. № 1. P. 5–12.
- van Gelder P., Saint N., Boxtel R., Rosenbusch J.P., Tommassen J. // *Protein Eng.* 1997. V. 10. № 6. P. 699–706.
- van Gelder P., Saint N., Phale P., Eppens E.F., Prilipov A., van Boxtel R., Rosenbusch J.P., Tommassen J. // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 269. № 4. P. 468–472.
- Eppens E.F., Saint N., van Gelder P., van Boxtel R., Tommassen J. // *FEBS Lett.* 1997. V. 415. № 3. P. 317–320.
- Чистюлин Д.К., Новикова О.Д., Портнягина О.Ю., Хоменко В.А., Вакорина Т.И., Ким Н.Ю., Исаева М.П., Лихацкая Г.Н., Соловьева Т.Ф. // *Биол. мембраны.* 2012. Т. 29. № 3. С. 156–164.
- Garavito R.M., Rosenbusch J.P. // *Methods Enzymol.* 1986. V. 125. P. 309–328.
- Laemmli U.K. // *Nature.* 1970. V. 227. № 5259. P. 680–685.
- Mueller P., Rudin D.O., Ti Tien H., Wescott W.O. // *Nature.* 1962. V. 194. P. 979–980.
- Stenkova A.M., Isaeva M.P., Shubin F.N., Rasskazov V.A., Rakin A.V. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 5. P. e20546.
- Лихацкая Г.Н., Чистюлин Д.К., Ким Н.Ю., Хоменко В.А., Портнягина О.Ю., Соловьева Т.Ф., Новикова О.Д. // *Биофизика.* 2016. Т. 61. № 6. С. 1088–1097.
- Chemical Computing Group (CCG) <http://www.chemcomp.com> [Molecular Operating Environment (MOE)], 2013.08; Chemical Computing Group ULC, 1010 Sherbooke St. West, Suite #910, Montreal, QC, Canada, H3A 2R7, 2018.
- Pravda L., Sehnal D., Toušek D., Navrátilová V., Bazgier V., Berka K., Svobodová Vařeková R., Koča J., Otyepka M. // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. № W1. P. W368–W373.
- Вострикова О.П., Ким Н.Ю., Лихацкая Г.Н., Гузев К.В., Вакорина Т.И., Хоменко В.А., Новикова О.Д., Соловьева Т.Ф. // *Биоорганическая химия.* 2006. Т. 32. № 4. С. 371–383.
- Новикова О.Д., Ким Н.Ю., Лукьянов П.А., Лихацкая Г.Н., Емельяненко В.И., Соловьева Т.Ф. // *Биол. мембраны.* 2007. Т. 24. № 2. С. 159–168.
- Rokitskaya T.I., Kotova E.A., Naberezhnykh G.A., Khomenko V.A., Gorbach V.I., Firsov A.M., Zelepuga E.A., Antonenko Yu.N., Novikova O.D. // *Biochim. Biophys. Acta – Biomembranes.* 2016. V. 1858. № 4. P. 883–891.
- Saint N., Lou K.L., Widmer C., Luckey M., Schirmer T., Rosenbusch J.P. // *J. Biol. Chem.* 1996. V. 271. № 34. P. 20676–20680.
- Likhatskaya G.N., Solov'eva T.F., Novikova O.D., Issaeva M.P., Gusev K.V., Kryzhko I.B., Trifonov E.V., Nurminski E.A. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2005. V. 23. № 2. P. 163–174.
- Jeanteur D., Lakey J.H., Pattus F. // *Mol. Microbiol.* 1991. V. 5. № 9. P. 2153–2164.
- Karshikoff A., Spassov V., Cowan S.W., Ladenstein R., Schirmer T. // *J. Mol. Biol.* 1994. V. 240. № 4. P. 372–384.

УДК 615.849.114

# Уникальный прототип радиотерапевтической установки: р53-независимый антипролиферативный эффект нейтронного облучения

Д. И. Юрков<sup>1</sup>, С. В. Сыромуков<sup>1</sup>, В. В. Татарский<sup>2,3</sup>, Е. С. Иванова<sup>2</sup>, А. И. Хамидуллина<sup>3</sup>, М. А. Ястребова<sup>3</sup>, В. И. Сысоев<sup>1</sup>, Р. В. Добров<sup>1</sup>, А. В. Белоусов<sup>4,5</sup>, В. Н. Морозов<sup>1,4</sup>, М. А. Колыванова<sup>4</sup>, Г. А. Крусанов<sup>4,6</sup>, В. И. Зверев<sup>1,5</sup>, А. А. Штиль<sup>2,3\*</sup>

<sup>1</sup>Всероссийский научно-исследовательский институт автоматики им. Н.Л. Духова, 127055, Москва, Суцевская ул., 22

<sup>2</sup>Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, 115478, Москва, Каширское ш., 24

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

<sup>4</sup>Федеральный медицинский биофизический центр им. А.И. Бурназяна ФМБА России, 123098, Москва, ул. Маршала Новикова, 23

<sup>5</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, физический факультет, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2

<sup>6</sup>НИИ ядерной физики им. Д.В. Скобельцина при Московском государственном университете им. М.В. Ломоносова, 119234, Москва, Ленинские горы, 1, стр. 2

\*E-mail: shtilaa@yahoo.com

Поступило в редакцию 09.04.2019

Принято к печати 18.06.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-3-99-102

**РЕФЕРАТ** Лучевая терапия с использованием тяжелых частиц (в частности, нейтронов) предусматривает создание нового оборудования. Для замены применяемых в настоящее время ядерных реакторов, циклотронов и линейных ускорителей сконструирован компактный, переносной и мощный генератор нейтронов НГ-24 (вес 140 кг, размеры 42 × 110 см, мощность потока частиц  $10^{11}$  н/с, энергия ~ 14 МэВ). Облучение нейтронами, генерируемыми НГ-24, вызывало выраженный антипролиферативный эффект на культурах опухолевых клеток человека независимо от статуса проапоптотического белка р53. Фосфорилирование гистона 2А и увеличение количества белков р21, циклина D и фосфорилированного р53 выявлены в клетках линии НСТ116 рака толстой кишки (интактный р53), облученных в дозе 4 Гр. Облучение приводило к задержке клеточного цикла в фазе G2/M. Способность клеток к колониеобразованию существенно снижалась. В сублинии НСТ116р53КО (нокаут р53) задержка в G2/M оказалась не связанной с указанными молекулярными событиями. Таким образом, НГ-24 – прототип клинически приемлемого источника высокоэнергетических нейтронов, вызывающих противоопухолевые эффекты в терапевтических дозах.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** быстрые нейтроны, генераторы нейтронов, опухолевые клетки, повреждения ДНК, гибель клеток.

## ВВЕДЕНИЕ

В традиционной лучевой терапии опухолей используются источники фотонов с энергией 30 кэВ–25 МэВ. Однако по эффективности фотоны уступают тяжелым частицам, в частности, нейтронам с энергией > 1 МэВ («быстрые» нейтроны). Благодаря высоким значениям линейной передачи энергии и относительной биологической эффективности (ОБЭ) быстрые нейтроны имеют преимущество перед

фотонами в терапии радиорезистентных опухолей [1]. Несмотря на терапевтическую перспективность, клиническое применение нейтронов ограничено, в том числе из-за особенностей приборного обеспечения. Используемые в международной практике циклотроны, ядерные реакторы и линейные ускорители [1, 2] представляют собой громоздкие, сложные в управлении и обслуживании стационарные устройства.



Альтернативным подходом может быть использование малогабаритных источников быстрых нейтронов. Генератор НГ-24, разработанный во ВНИИА им. Н.Л. Духова – компактное, переносное и безопасное устройство с достаточной терапевтической мощностью [3]. Технические параметры НГ-24 представлены в *таблице*. Небольшие габариты НГ-24 позволяют поместить его как на гантри, так и на роботизированном манипуляторе. Источником нейтронов в НГ-24 является насыщенная тритием мишень, на которую направляется пучок ионов дейтерия, ускоренных в электрическом поле. В результате ядерной реакции  ${}^3\text{H}(d,n){}^4\text{He}$  генерируются нейтроны с энергиями 14–15 МэВ. При широком сечении реакции (5 барн при 107 кэВ) может быть получен поток  $> 10^{11}$  нейтронов/с. [4, 5]. Теоретические расчеты и эксперименты показали близкую к линейной зависимость энергии нейтронов (14.71–14.87 МэВ) от ускоряющего напряжения [6, 7].

#### Параметры НГ-24

Поток, нейтронов/с	$\sim 1 \times 10^{11}$
Энергия нейтронов, МэВ	$> 14$
Ресурсное время, ч	500
Размеры, мм	420 × 1100
Масса, кг	140
Электрическое питание, мощность	50/60 Гц, 220 В, 1200 Вт

В настоящей работе исследована способность нейтронного пучка, генерируемого НГ-24, вызывать терапевтически важные эффекты на моделях культивируемых опухолевых клеток человека.

#### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Поглощенную дозу в монослое клеток оценивали по потоку частиц методом компьютерного моделирования в программном коде Geant4 [8] (Physicslist QGSP\_BIC\_HP для нейтронов с энергией  $< 20$  МэВ). Рассчитанный коэффициент конверсии потока частиц в дозу, поглощенную слоем опухолевых клеток, равен  $5.7 \times 10^{-13}$  Гр/нейтрон. Негомогенность потока нейтронов в монослое клеток не превышала  $\pm 15\%$ .

Реактивы получены в компании «ПанЭко» (Россия), кроме особо оговоренных случаев. Линии клеток рака толстой кишки НСТ116 (интактный p53) и молочной железы MCF7 (делеция каспазы 3) человека получены из Американской коллекции тканевых культур. Сублиния НСТ116p53КО с нефункционирующим белком p53 получена в лаборатории Б. Фогелстайна [9]. Клетки (50% монослоя) в 25 см<sup>2</sup> флаконах облучали 14 МэВ нейтронами. Для колониеобразования 1000 облученных и необлученных (контроль) клеток рассевали на 100-мм чашку Петри в 20 мл модифицированной Дульбекко сре-

ды Игла с добавлением 10% эмбриональной сыворотки теленка (HyClone, США), 2 мМ L-глутамина, 100 ЕД/мл пенициллина и 100 мкг/мл стрептомицина, инкубировали в течение 14 сут при 37°C, 5% CO<sub>2</sub>. Колонии фиксировали метанолом и окрашивали метиловым фиолетовым. Для проточной цитофлуориметрии и иммуноблотинга облученные клетки инкубировали в указанной среде в течение 1–4 сут. Протоколы исследования клеточного цикла и белков опубликованы нами ранее [10–12]. Антитела приобретены в компании Cell Signaling (США).

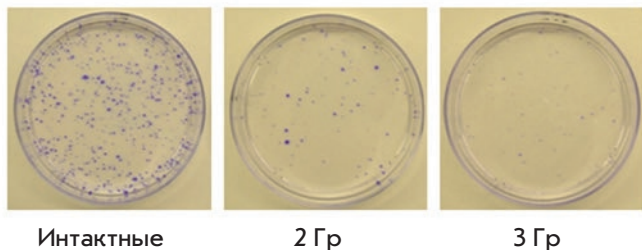
#### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Однократное облучение линии НСТ116 в дозе 2 Гр значительно снижало способность клеток к пролиферации; после подведения дозы 3 Гр насчитывали лишь единичные мелкие ( $\leq 6$  клеток) колонии (*рисунок А*). Через 2 сут после облучения клетки накапливались в фазе G2/M. Эта задержка сохранялась не менее 4 сут (*рисунок Б*; отметим увеличение доли полиплоидных клеток – признак нарушения митоза). Полученные результаты указывают на повреждение целостности ДНК как основной механизм ответа клеток на облучение нейтронами, генерируемыми НГ-24. Действительно, через 4 ч доля клеток с фосфорилированным гистоном H2A – маркером разрывов ДНК – возрастала с 10% в интактных клетках до  $> 70\%$  в клетках, получивших дозу 4 Гр. Этот эффект сохранялся не менее 24 ч после воздействия нейтронов.

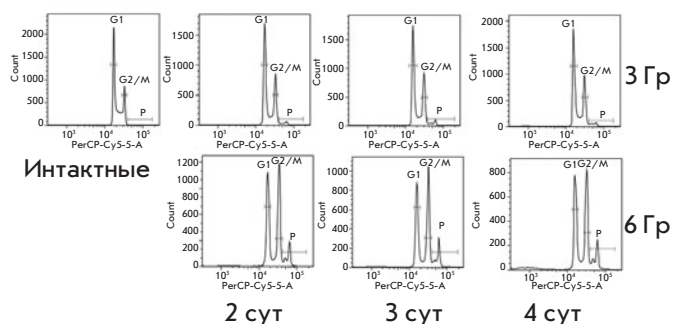
Важно, что эффекты нейтронного облучения, выявленные на линии НСТ116, воспроизводятся на изогенной сублинии НСТ116p53КО. Эта сублиния с инактивированным проапоптотическим белком p53 устойчива к ряду ДНК-повреждающих противоопухолевых препаратов [10]. Следовательно, p53 не обязателен для антипролиферативного действия нейтронов. Описанные эффекты наблюдали и для линии рака молочной железы MCF7 (делеция каспазы 3). Таким образом, противоопухолевые эффекты нейтронного облучения выявляются в клетках разного тканевого происхождения; отдельные нефункционирующие механизмы гибели, в других ситуациях ограничивающие терапевтическую эффективность, не препятствуют реализации противоопухолевого действия нейтронов.

Несмотря на схожесть ответа на облучение нейтронами, молекулярные события в клетках с интактным и нефункционирующим p53 не одинаковы. Так, накопление белка p21, тормозящего смену фаз клеточного цикла в ответ на повреждение ДНК, а также активация циклина D1 – драйвера перехода G1-S – выявлены только в клетках НСТ116, но не в сублинии НСТ116p53КО (4 Гр; *рисунок В*). Поэтому увели-

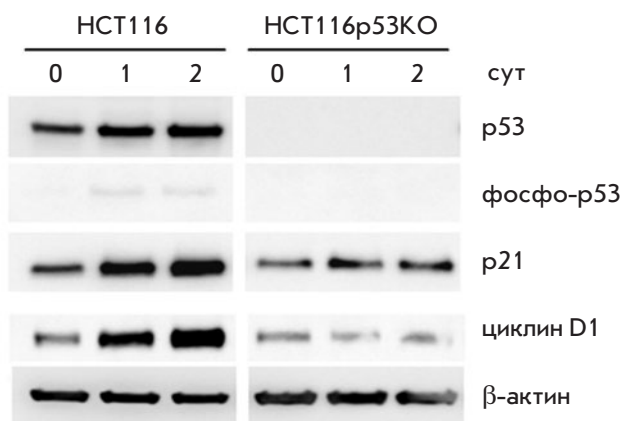
А



Б



В



Молекулярные механизмы ответа клеток НСТ116 и НСТ116р53КО на облучение быстрыми нейтронами. А – колониобразование; Б – распределение фаз клеточного цикла (проточная цитофлуориметрия, Р – полиплоидные ядра); В – иммуноблоттинг. Показаны репрезентативные результаты (не менее трех повторностей)

чение p53, p21 и циклина D1 приводило к задержке клеток НСТ116 в фазе G2/M, тогда как при нефункционирующем p53 такое же нарушение клеточного цикла обусловлено другими механизмами. Предстоит установить эти механизмы, а также выявить окончательный результат нейтронного облучения – апоптоз, митотическая катастрофа, старение и др.

Таким образом, генератор НГ-24 создает поток нейтронов, достаточный для индукции молекуляр-

ных и фенотипических нарушений в дозах и интервалах времени, соответствующих принятым в лучевой терапии, что позволяет предполагать пригодность установки для терапевтических задач. В то же время нейтронное излучение требует особых подходов к обеспечению безопасности пациента.

Важнейшим является вопрос о повреждении нейтронами неопухолевых клеток. Учитывая зависимость противоопухолевой эффективности от параметров облучения, недостаточность информации о биологических закономерностях действия нейтронов, а также сложность точного определения поглощенной дозы нейтронного излучения, построение корреляций на основании сравнения ответа линий опухолевых и неопухолевых клеток представляется малопродуктивным. Экспериментальное исследование осложняется невозможностью образования колоний нетрансформированными клетками и трудностями длительного культивирования, что требует систематического исследования.

Конформность нейтронного облучения обеспечивается техническими решениями. Современные аппараты для лучевой терапии позволяют существенно снизить или избежать повреждения окружающих тканей благодаря широким возможностям планирования облучения – расчетам дозовой нагрузки на опухоль и перифокальные ткани. Поскольку доза на поверхности выше, чем в опухоли (поглощенная доза уменьшается вдвое на глубине 5–6 см), в лучевой терапии используется многопольное облучение; накопление дозы в опухоли происходит при облучении под различными углами к телу пациента. Удастся снизить удельную дозу на поверхности при сохранении терапевтически эффективной дозы в опухоли. Используются мультилепестковые коллиматоры, точно повторяющие форму опухоли. Во время вращения источника вокруг тела пациента лепестки коллиматора перемещаются и формируют поле для каждого угла облучения; таких позиций во время сеанса лучевой терапии может быть много. Кроме того, значения ОБЭ нейтронов увеличиваются по мере уменьшения их энергии. В толще тканей, где нейтроны замедляются, ОБЭ ожидается выше, чем на коже. Однако, учитывая сложность определения ОБЭ, этот вопрос представляется недостаточно определенным. Для его решения требуются испытания *in vivo*.

В настоящем сообщении показано, что физико-технические параметры экспериментальной установки НГ-24 обеспечивают поток нейтронов с биологическими характеристиками, приемлемыми для противоопухолевой радиотерапии. Следующая приоритетная задача – создание терапевтического прототипа, сочетающего высокую противоопухоле-

вую эффективность нейтронов, конформность облучения и выполнение требований безопасности пациентов и персонала.

## ВЫВОДЫ

Безопасное компактное устройство НГ-24 генерирует поток быстрых нейтронов, что позволяет подвести дозу облучения, достаточную для индукции выраженного антипролиферативного ответа в культуре опухолевых клеток.

Повреждение целостности ДНК и задержка смены фаз клеточного цикла в ответ на нейтронное облучение

выражены независимо от статуса проапоптотического белка p53. Этот результат предполагает эффективность быстрых нейтронов для элиминации опухолевых клеток, в которых не функционируют отдельные молекулярные механизмы контроля баланса выживания и гибели. ●

*Работа поддержана грантом  
Минобрнауки Российской Федерации  
(соглашение № 14.W03.31.002 с Институтом  
биологии гена РАН).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Specht H.M., Neff T., Reuschel W., Wagner F.M., Kampf S., Wilkens J.J., Petry W., Combs S.E. // *Front. Oncol.* 2015. V. 5. P. 262.
2. Valcović V. 14 MeV neutrons: Physics and applications. Boca Raton: CRC Press, Taylor and Francis Group, 2015. 516 p.
3. Сыромуков С.В., Степнов В.В. Генератор нейтронов. – Полезная модель к патенту РФ № 166092 от 03.06.2016.
4. Syromukov S.V., Stepnov V.V., Dobrov R.V., Sysoev V.I., Mel'nik A.V., Bogatkov K.V., Starostin A.N., Letichevskii R.D. // *Atomic Energy.* 2015. V. 119. P. 68–71.
5. Sevast'yanov V.D., Kovalenko O.I., Orlov A.V., Shibaev R.M., Obudovskii S.Yu., Portnov B.D., Batyunin A.V., Kashchuk Yu.A. // *Measur. Tech.* 2016. V. 59. P. 994–1001.
6. Syromukov S.V. // *Atomic Energy.* 2018. V. 123. P. 267–274.
7. Литяев В.М., Ульяненко С.Е., Корякин С.Н., Бровин А.И., Сыромуков С.В., Боголюбов Е.П., Рыжков В.И., Горбушин Н.Г. Аппарат для дистанционной нейтронной терапии. Патент РФ № 2526244 от 28.08.2013.
8. Agostinelli S., Allison J., Amako K., Apostolakis J., Araujo H., Arce P., Asai M., Axen D., Banerjee S., Barrand G., et al. // *Nucl. Instrum. Meth. Phys. Res. Section A.* 2003. V. 506. P. 250–303.
9. Bunz F., Dutriaux A., Lengauer C., Waldman T., Zhou S., Brown J.P., Sedivy J.M., Kinzler K.W., Vogelstein B. // *Science.* 1998. V. 282. P. 1497–1501.
10. Tikhomirov A.S., Lin C.Y., Volodina Y.L., Dezhenkova L.G., Tatarskiy V.V., Schols D., Shtil A.A., Kaur P., Chueh P.J., Shchekotikhin A.E. // *Eur. J. Med. Chem.* 2018. V. 148. P. 128–139.
11. Nadysev G.Y., Tikhomirov A.S., Lin M.-H., Yang Y.-T., Dezhenkova L.G., Chen H.-Y., Kaluzhny D.N., Schols D., Shtil A.A., Shchekotikhin A.E., et al. // *Eur. J. Med. Chem.* 2018. V. 143. P. 1553–1562.
12. Volodina Y.L., Dezhenkova L.G., Tikhomirov A.S., Tatarskiy V.V., Kaluzhny D.N., Moisenovich A.M., Moisenovich M.M., Isagulieva A.K., Shtil A.A., Tsvetkov V.B., et al. // *Eur. J. Med. Chem.* 2019. V. 165. P. 31–45.

## 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](http://www.actanaturae.ru)).

## ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

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

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

## РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

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



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

## ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

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

## РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

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

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

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

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

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

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

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

## ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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

# Acta Naturae

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

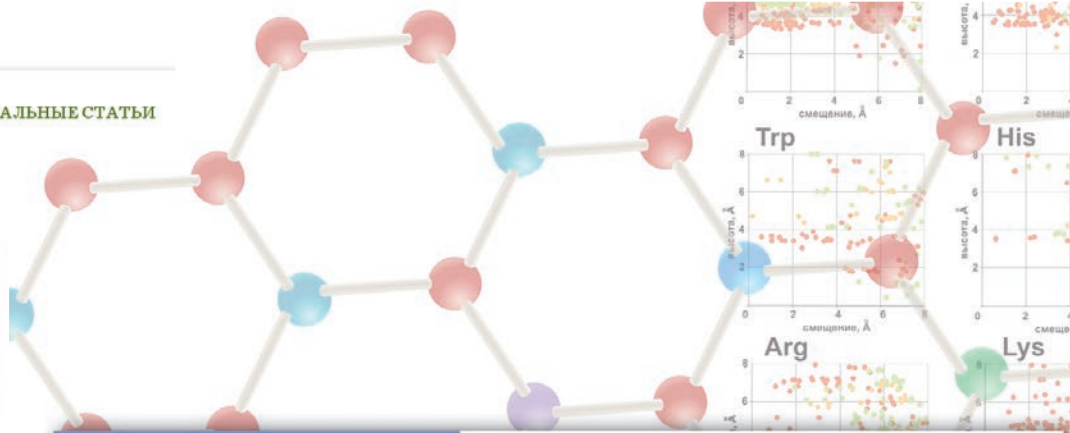
Флуоресценция клеток после окрашивания различными белками. Приведены средние значения трех экспериментов  $\pm$  ошибка среднего

Образец	Интенсивность флуоресценции в канале FL1	
	Клетки SK-BR-3	Клетки CHO
Неокрашенные клетки	3700 $\pm$ 400	3700 $\pm$ 900
+ $\beta$ -LG-FITC	5700 $\pm$ 600	3300 $\pm$ 400
+ 4D5scFv-FITC	2.7 $\times 10^4 \pm 7 \times 10^2$	3200 $\pm$ 500
+ 4D5scFv-miniSOG	2.3 $\times 10^4 \pm 3 \times 10^2$	4600 $\pm$ 400
+ DARPin-miniSOG	1.71 $\times 10^4 \pm 1.6 \times 10^2$	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 ( $\beta$ -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,  $\beta$ -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  $\Delta$ 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  $\Delta$ 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-

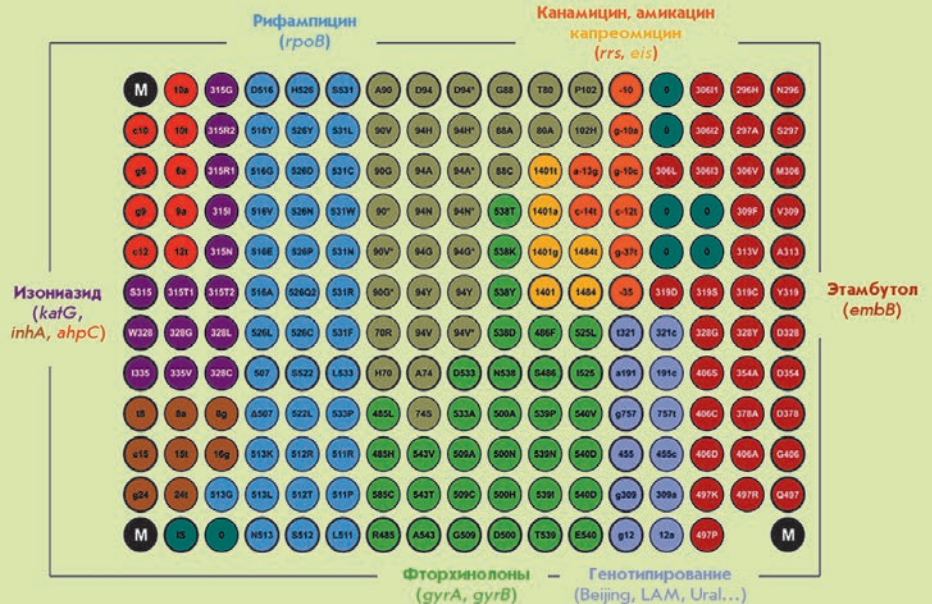


ОКТАБРЬ-ДЕКАБРЬ 2018 ТОМ 10 № 4 (39)

ISSN 2075-8243

# Acta Naturae

## Технология гидрогелевых биочипов ИМБ РАН: 30 лет спустя



БЕЛОК CG9890 С ДОМЕНАМИ ЦИНКОВЫХ ПАЛЬЦЕВ – НОВЫЙ КОМПОНЕНТ ENU2-СОДЕРЖАЩИХ КОМПЛЕКСОВ ДРОЗОФИЛЫ  
СТР. 110

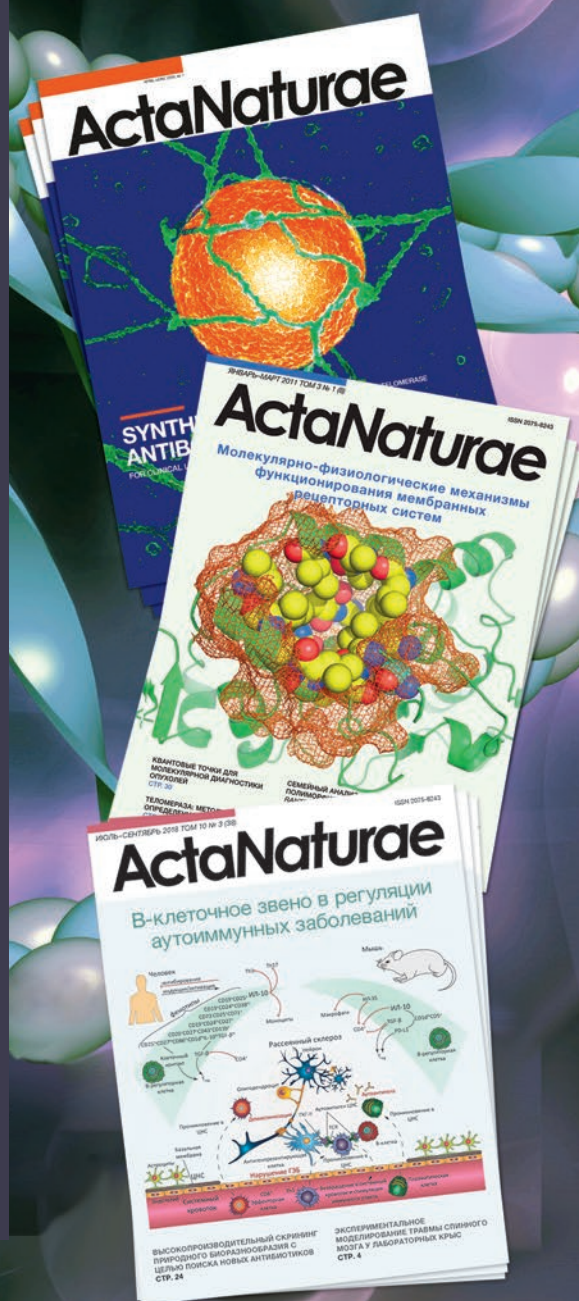
ОПРЕДЕЛЕНИЕ БЕЛКОВ НАРУЖНОЙ МЕМБРАНЫ МИТОХОНДРИЙ, ВЗАИМОДЕЙСТВУЮЩИХ С БЕЛКОМ AIF  
СТР. 100



# ActaNaturae

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](mailto:actanaturae@gmail.com) и звоните по телефону: 8 (495) 727-38-60

