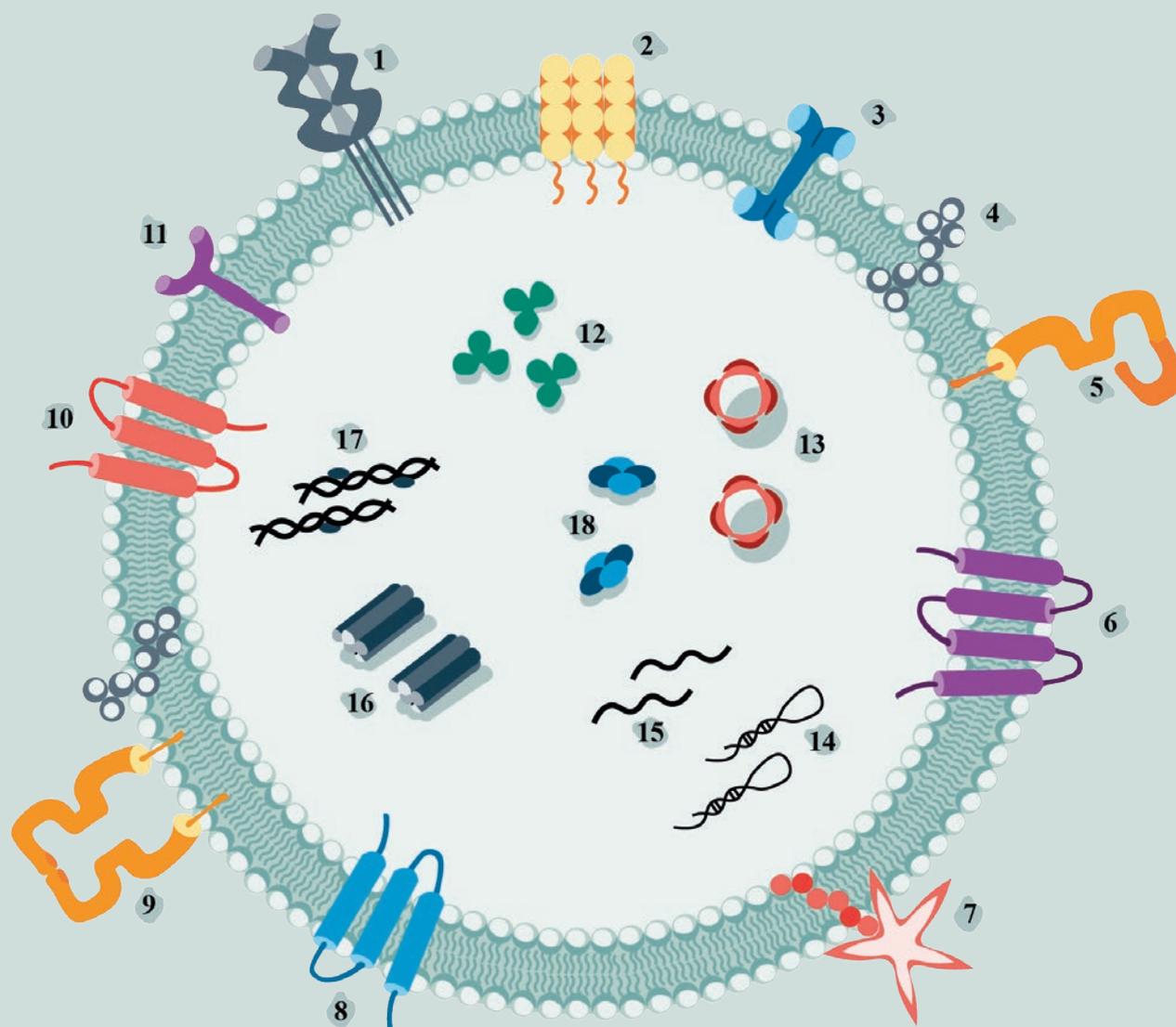


Acta Naturae

Везикулы, секретируемые опухолевыми клетками, и их роль в регуляции противоопухолевого иммунитета



ДВУСПИРАЛЬНЫЕ РНК КАК СРЕДСТВО ЗАЩИТЫ РАСТЕНИЙ ОТ ПАТОГЕННЫХ ОРГАНИЗМОВ И ВИРУСОВ КУЛЬТИВИРУЕМЫХ РАСТЕНИЙ
СТР. 13

ДАРПИНЫ – ПЕРСПЕКТИВНЫЕ АДРЕСНЫЕ БЕЛКИ ДЛЯ ТЕРАНОСТИКИ
СТР. 42

MERCK

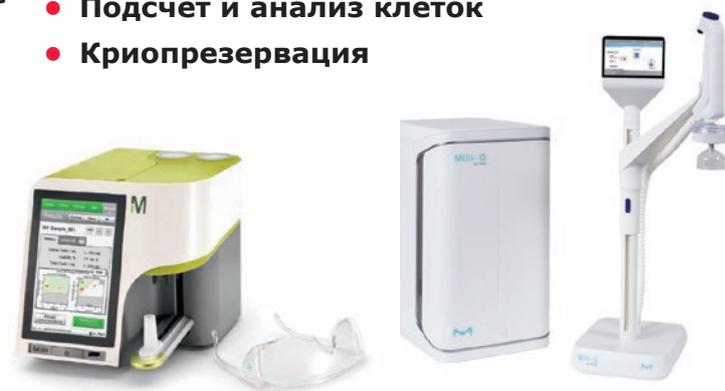
КОМПЛЕКСНЫЕ РЕШЕНИЯ ДЛЯ КЛЕТОЧНОГО АНАЛИЗА



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



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



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

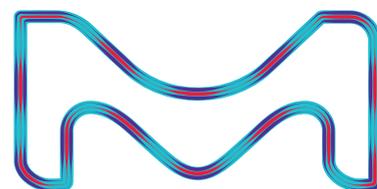
- 4000 клеточных линий животных и человека;
- Клетки 45 видов животных и 50 типов тканей;
- 370 эталонных В-лимфобластных клеточных линий с данными о типе лейкоцитарного антигена человека (HLA);
- 480 гибридомных клеточных линий, секретирующих моноклональные антитела;
- ДНК, РНК, кДНК, экстрагированные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

SIGMAaldrich.com/ECACC

ООО «Мерк»

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

SIGMAaldrich.com/cellculture
MERCKmillipore.com/cellculture

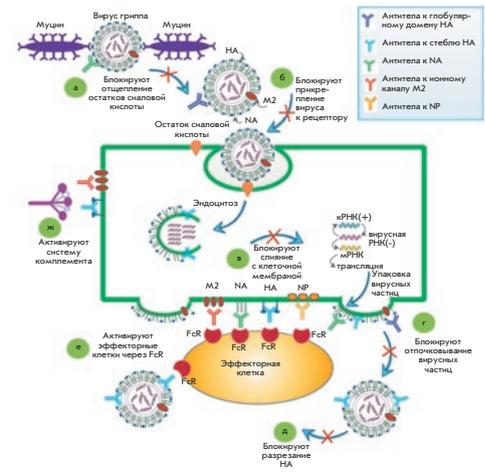


SIGMA-ALDRICH is now **MERCK**

Ненейтрализующие антитела к консервативным антигенам вируса гриппа

Е. С. Седова, Д. Н. Щербинин, А. А. Лысенко, С. В. Алексеева, Э. А. Артемова, М. М. Шмаров

В обзоре рассмотрены такие механизмы противогриппозного действия, реализуемые ненейтрализующими антителами, как антителозависимая клеточная цитотоксичность, антителозависимый фагоцитоз и опосредованная антителом комплементзависимая цитотоксичность. Антигенами вируса гриппа, запускающими эти реакции, являются как гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (НА), так и высококонсервативные антигены – ионный канал М2, матриксный белок М1 и нуклеопротеин NP. Рассмотрены механизмы действия и способы обнаружения антител к стволу части НА и НА вируса гриппа.



Механизмы действия противогриппозных антител

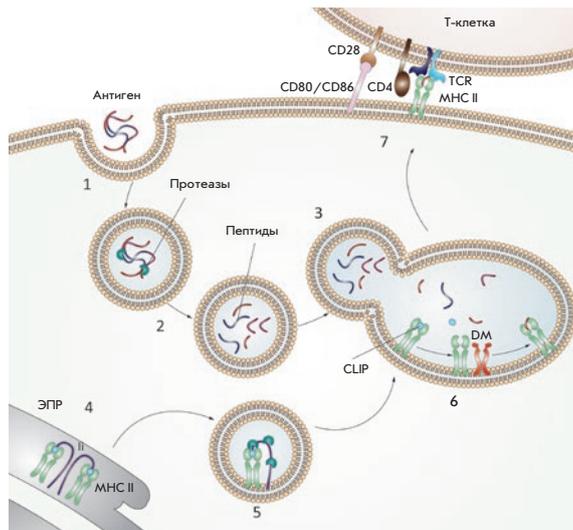


Схема процесса презентации антигена молекулами MHC II

Вклад генов главного комплекса гистосовместимости класса II в предрасположенности к аутоиммунным заболеваниям

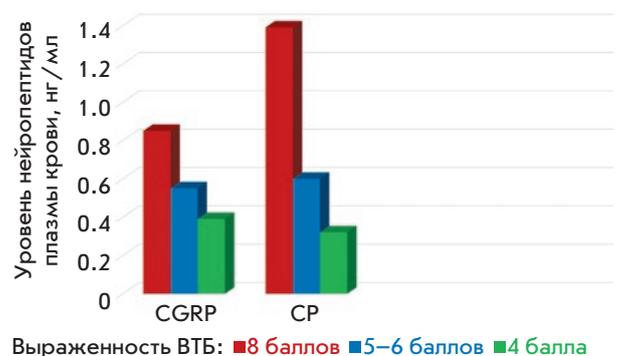
М. Ю. Захарова, Т. А. Белянина, А. В. Соколов, И. С. Киселев, А. Э. Мамедов

В обзоре рассмотрены наиболее значимые современные представления о взаимосвязи носительства определенных аллелей MHC II с повышенной (положительно ассоциированные аллели) и пониженной (отрицательно ассоциированные аллели) вероятностью развития наиболее распространенных аутоиммунных заболеваний, таких, как сахарный диабет типа 1, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, системная красная волчанка, аутоиммунный тиреоидит и др. Наиболее универсальные гаплотипы DR3-DQ2 и DR4-DQ8 положительно ассоциированы со многими заболеваниями, тогда как универсальный аллель HLA-DRB1*0701 является протективным.

Пептид CGRP и субстанция P как предикторы венозной тазовой боли

С. Г. Гаврилов, Г. Ю. Васильева, И. М. Васильев, О. И. Ефремова

Определено содержание в плазме крови пептида, относящегося к гену кальцитонина (calcitonin gene related peptide, CGRP), и субстанции P (CP) у пациентов с расширением внутритазовых вен. Уровни CGRP и CP в плазме крови высоко коррелируют с наличием венозной тазовой боли. Вероятно, CGRP и CP играют существенную роль в формировании болевого синдрома у пациентов с СТВП.



Содержание CGRP, CP и выраженность венозной тазовой боли у больных с клиническими признаками синдрома тазового венозного полнокровия

Acta Naturae

ТОМ 11, № 4 (43), ОКТЯБРЬ—ДЕКАБРЬ 2019
издается с апреля 2009 года

Учредители:

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

Редакционный совет:

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

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

Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре

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

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

Адрес редакции: 101000, Москва, ул. Мясницкая, 13, стр. 4
Телефон/факс: +7 (495) 727 38 60
E-mail: actanaturae@gmail.com

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

© ACTA NATURAE, 2019

Номер подписан в печать 29 декабря 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

- М. Ю. Захарова, Т. А. Белянина,
А. В. Соколов, И. С. Киселев, А. Э. Мамедов
**Вклад генов главного комплекса
гистосовместимости класса II
в предрасположенность к аутоиммунным
заболеваниям** 4
- С. Ю. Морозов, А. Г. Соловьев,
Н. О. Калинина, М. Э. Тальянский
**Двуспиральные РНК как средство защиты
растений от патогенных организмов
и вирусов культивируемых растений** 13
- Е. С. Седова, Д. Н. Щербинин,
А. А. Лысенко, С. В. Алексеева,
Э. А. Артемова, М. М. Шмаров
**Ненейтрализующие антитела
к консервативным антигенам
вируса гриппа** 22
- В. М. Украинская, Ю. П. Рубцов,
В. Д. Кнорре, М. А. Масчан, А. Г. Габиров,
А. В. Степанов
**Везикулы, секретируемые опухолевыми
клетками, и их роль в регуляции
противоопухолевого иммунитета** 33

О. Н. Шилова, С. М. Деев
Дарпины – перспективные адресные белки для тераностики 42

И. П. Шиловский, М. Е. Дынева, О. М. Курбачева, Д. А. Кудлай, М. Р. Хаитов
Роль интерлейкина-37 в патогенезе аллергических заболеваний 54

А. Р. Kozlov
The Role of Heritable Tumors in Evolution of Development: a New Theory of *Carcino-evo-devo* 65

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

М. В. Архипенко, Н. А. Никитин, О. А. Баранов, Е. А. Евтушенко, И. Г. Атабеков, О. В. Карпова
Картирование заряда на поверхности вирионов и вирусоподобных частиц вирусов растений со спиральной структурой..... 73

И. П. Балмасова, Я. А. Ломакин, Э. А. Бабаев, В. Н. Царев, А. Г. Габибов, И. В. Смирнов, В. Д. Кнорре, Л. А. Овчинникова, Н. В. Гнучев, Е. Н. Хурс, М. С. Деев, Н. Н. Костин, С. Д. Арутюнов
Феномен «экранирования» индукции цитокинов микробиомом пародонта при сочетании пародонтита с сахарным диабетом типа 2 79

С. Г. Гаврилов, Г. Ю. Васильева, И. М. Васильев, О. И. Ефремова
Пептид CGRP и субстанция P как предикторы венозной тазовой боли 88

П. А. Назаров, Е. А. Котова, В. П. Скулачев, Ю. Н. Антоненко
Генетическая вариабельность основной помпы множественной лекарственной устойчивости *AcrAB-TolC* определяет резистентность грамотрицательных бактерий к *SkQ1* 93

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

А. Р. Ким, М. Р. Нодель, Т. А. Павленко, Н. Б. Чеснокова, Н. Н. Яхно, М. В. Угрюмов
Катехоламины в слезной жидкости как маркеры болезни Паркинсона: клиническое и экспериментальное исследование 99

Правила для авторов 104

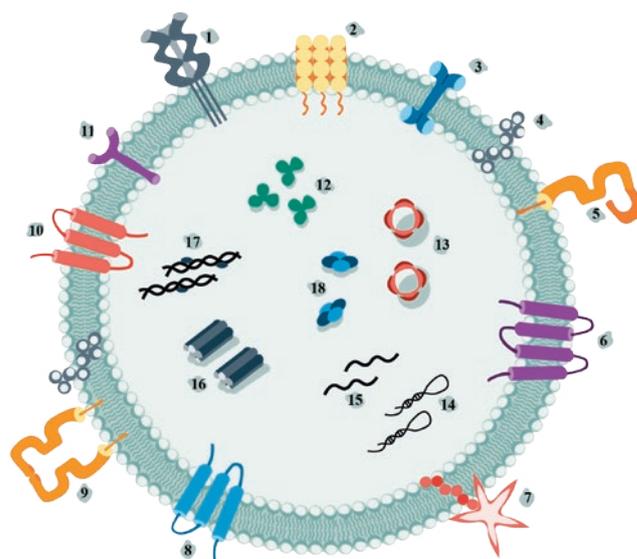


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью Украинской и др.)

УДК 612.017.1:57.03

Вклад генов главного комплекса гистосовместимости класса II в предрасположенность к аутоиммунным заболеваниям

М. Ю. Захарова^{1,2*}, Т. А. Белянина¹, А. В. Соколов³, И. С. Киселев², А. Э. Мамедов¹

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова МЗ РФ, Москва, 119049, Россия

³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова, Москва, 119991 Россия

*E-mail: marusya3@mail.ru

Поступила в редакцию 10.12.2018

Принята к печати 08.11.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-4-12

РЕФЕРАТ С использованием молекулярно-генетических методов показано, что одну из важнейших ролей в предрасположенности к аутоиммунным заболеваниям играет кластер генов главного комплекса гистосовместимости (МНС, major histocompatibility complex). Изучение вклада конкретных аллелей МНС, в большей степени МНС класса II, в предрасположенность к аутоиммунным нарушениям крайне важно для понимания патогенеза этих заболеваний. В обзоре рассмотрены наиболее значимые современные представления о взаимосвязи носительства определенных аллелей МНС II с повышенной (положительно ассоциированные аллели) и пониженной (отрицательно ассоциированные аллели) вероятностью развития наиболее распространенных аутоиммунных заболеваний, таких, как сахарный диабет типа 1, ревматоидный артрит, рассеянный склероз, системная красная волчанка, аутоиммунный тиреоидит и др. Наиболее универсальные гаплотипы DR3-DQ2 и DR4-DQ8 положительно ассоциированы со многими заболеваниями, тогда как универсальный аллель HLA-DRB1*0701 является протективным.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аутоиммунные заболевания, главный комплекс гистосовместимости, лейкоцитарный антиген человека, презентация антигена, рассеянный склероз, ревматоидный артрит, сахарный диабет типа 1.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АЗ – аутоиммунные заболевания; АПК – антигенпрезентирующие клетки; АТ – аутоиммунный тиреоидит; БГ – болезнь Грейвса; Д1Т – сахарный диабет типа 1; ИЦ – инвариантная цепь (invariant chain); МНС – главный комплекс гистосовместимости (major histocompatibility complex); Н – нарколепсия; НС – неравновесное сцепление генов (linkage disequilibrium); HLA – человеческий лейкоцитарный антиген (human leukocyte antigen); РА – ревматоидный артрит; РС – рассеянный склероз; СКВ – системная красная волчанка.

ВВЕДЕНИЕ

Главный комплекс гистосовместимости (МНС), или лейкоцитарный антиген человека (HLA, human leukocyte antigen), представляет собой несколько групп генов, кодирующих поверхностные гетеродимерные белки, заякоренные в клеточной мембране и отвечающие за презентацию антигенов Т-клеткам с последующим развитием адаптивного иммунного ответа. Белки МНС делятся на класс I, класс II и класс III (система комплемента) [1]. МНС класса I присутствуют практически на всех типах клеток и отвечают за презентацию фрагментов собственных

антигенов, которые экспонируются на поверхности клетки и могут вызывать развитие иммунного ответа, опосредованного CD8⁺ Т-лимфоцитами. МНС класса II обнаруживаются на поверхности профессиональных антигенпрезентирующих клеток (АПК) и презентуют, в основном, фрагменты чужеродных антигенов (бактериальных, вирусных и т.д.), захватываемых АПК. Комплекс «МНС II–пептид» далее взаимодействует с CD4⁺ Т-клетками (рис. 1).

Белки МНС являются гетеродимерами, состоящими из двух цепей: длинной α-цепи с трансмембранным доменом и короткой универсальной β2-

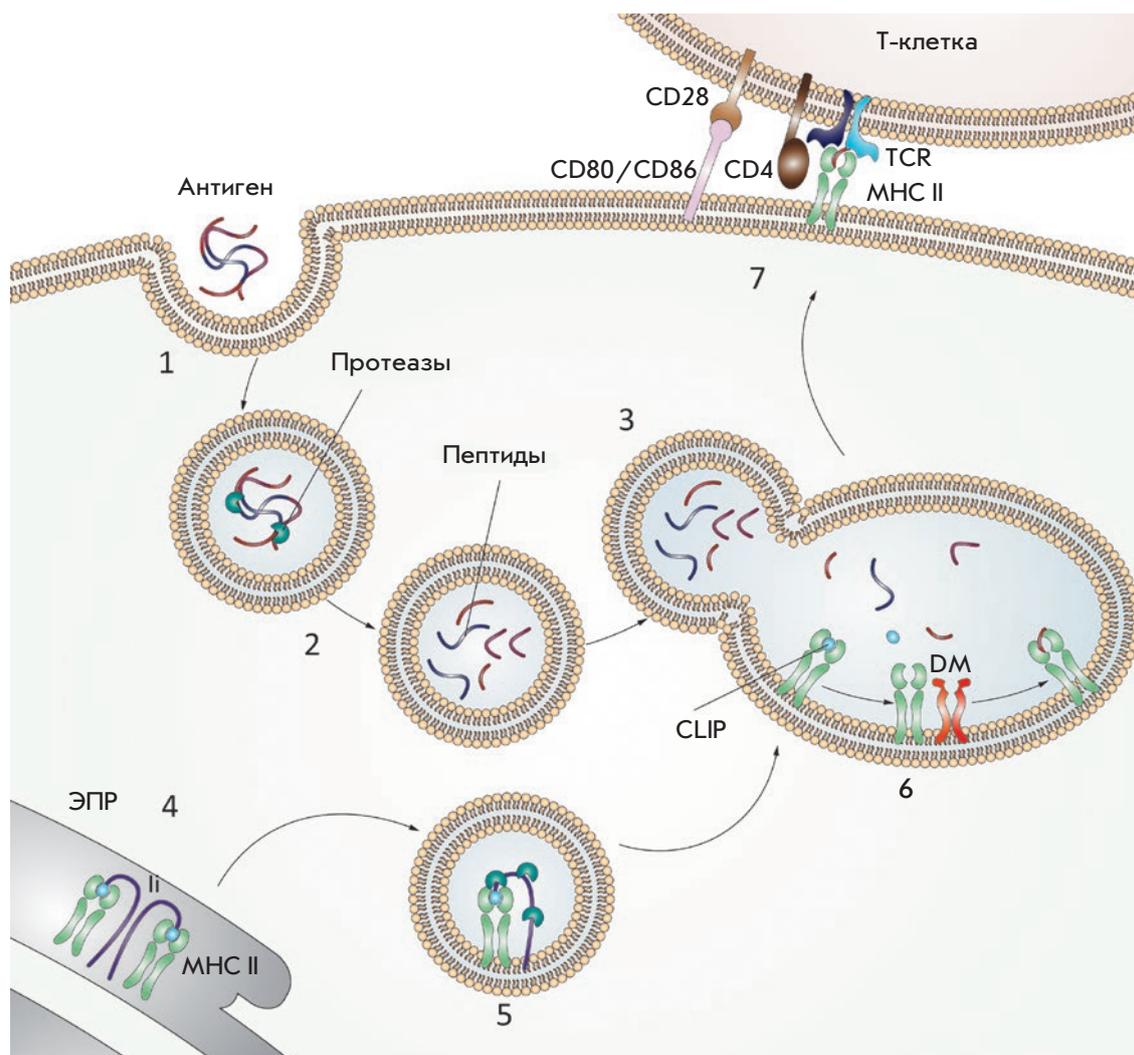


Рис. 1. Схема процесса презентации антигена молекулами МНС II. (1) Антиген попадает во внутриклеточные везикулы. (2) Подкисление везикул активирует протеазы, которые гидролизуют антиген на пептидные фрагменты. (3) Везикулы, содержащие пептидные фрагменты, сливаются с везикулами, содержащими молекулы МНС II (зеленый). (4) Инвариантная цепь (Ii) (фиолетовый) связывается с вновь синтезированными молекулами МНС II, частично занимая пептидсвязывающую борозду. (5) Инвариантная цепь протеолитически деградирует, в результате чего в борозде остается связанным пептид CLIP (голубой). (6) DM (оранжевый) связывается с молекулами МНС II и катализирует пептидный обмен. (7) Молекулы МНС II, загруженные антигенным пептидом (красный), транспортируются на поверхность клетки, где они могут узнаваться рецептором CD4⁺ Т-клеток TCR (голубой-синий). Молекула корецептора CD4 (коричневый), присутствующая на Т-клетках, также связывается с молекулами МНС II. Чтобы происходила активация Т-клеток, костимулирующие молекулы CD80 или CD86 (розовый), экспрессируемые на антигенпрезентирующей клетке, должны связываться с костимулирующей молекулой CD28 (бежевый), экспрессируемой на Т-клетках

микроглобулиновой цепи (МНС I); или же из длинных α- и β-цепей, несущих внеклеточные, трансмембранные и короткие цитоплазматические домены (МНС II). Важный структурный элемент МНС – борозда, связывающая презентуемый пептид (peptide binding groove), так как именно ее структура определяет характер связывания пептида и дальнейший иммунный ответ на данный антиген. Молекулы HLA

должны обладать высокой степенью полиморфизма, в связи с необходимостью презентации огромного множества пептидов.

Гены молекул МНС локализованы на хромосоме 6 (за исключением гена легкой цепи МНС I – β2-микроглобулина, который расположен на хромосоме 15) и составляют обширные кластеры (рис. 2). К генам класса I относятся *HLA-A*, *HLA-B* и *HLA-C*, кодиру-

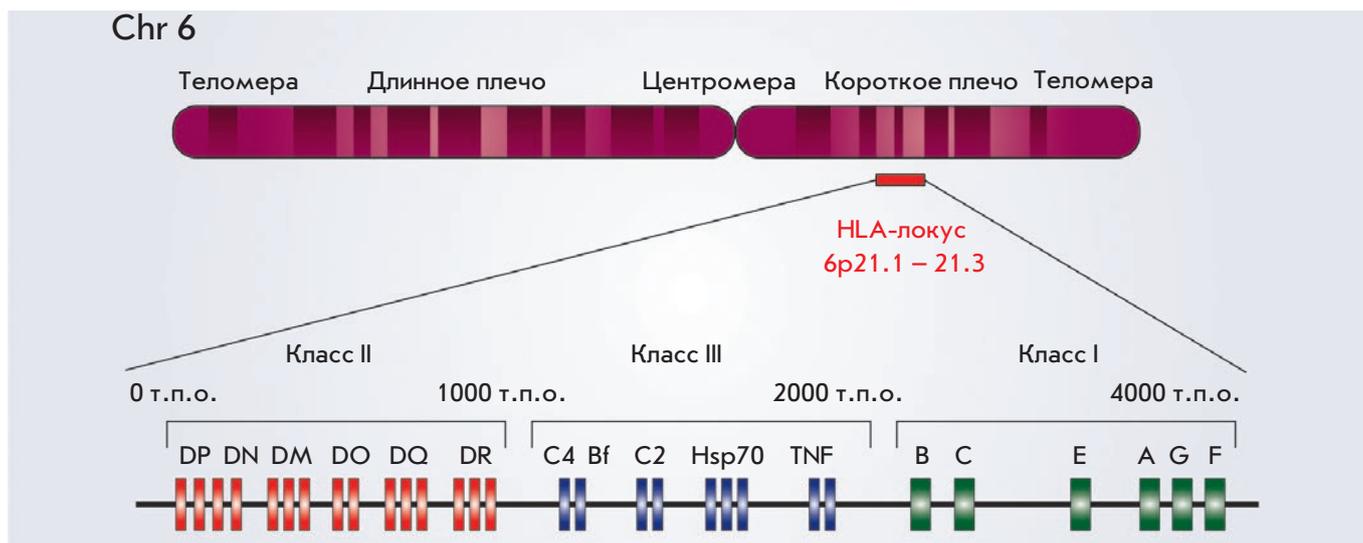


Рис. 2. Схематическое изображение локуса HLA на шестой хромосоме человека. Область HLA расположена на коротком плече шестой хромосомы от 6p21.1 до p21.3 и обозначена красной полосой. Показана протяженность генов класса II (красный), класса III (синий) и класса I (зеленый), которая простирается от центромерного до теломерного конца. Область класса II включает гены α - и β -цепей молекул МНС класса II HLA-DR, -DP и -DQ. Кроме того, гены, кодирующие цепи $DM\alpha$ и $DM\beta$, и гены, кодирующие α - и β -цепи молекулы DO ($DO\alpha$ и $DO\beta$ соответственно), также расположены в области МНС класса II

ющие α -цепи гетеродимера. Молекулы МНС класса II в основном кодируются генами локусов HLA-DR, HLA-DQ и HLA-DP, каждый из которых включает гены α - и β -цепей (например, в локусе HLA-DR – это ген α -цепи *DRA1* и гены β -цепей *DRB1*, *DRB3*, *DRB4* и *DRB5*). Такая номенклатура возникла вследствие исторической очередности открытия антигенов HLA – их называли римскими цифрами и буквами алфавита по мере открытия.

Локус МНС является самым полиморфным в геноме человека [2], что приводит к существованию огромного разнообразия белковых форм МНС. Для классификации продуктов экспрессии этих генов молекулы МНС начали разделять на группы в соответствии с их серологической специфичностью (например, серогруппа HLA-DR1). Развитие молекулярно-генетических методов позволило уточнить номенклатуру и определять группы аллелей генов *HLA*, соответствующие серогруппам их белковых продуктов (*DRA*01 + DRB1*01* соответственно), а впоследствии и конкретные аллели генов (*DRA*01 + DRB1*0101*, **0102* или **0103* соответственно) [3]. Ген *HLA-B* является самым полиморфным среди МНС класса I (описано 1077 аллелей), а ген *HLA-DRB1*, насчитывающий 669 аллелей, среди МНС класса II [4, 5]. В области расположения генов *HLA* также можно наблюдать протяженные участки (до 500 т.п.н.) так называемого «неравновесного сцепления генов» при передаче потомству (НС, linkage

disequilibrium) [6]. Наличие таких протяженных наследуемых кластеров генов затрудняет идентификацию конкретных аллелей этих генов, ассоциированных с заболеваниями, так как часто их невозможно выделить из состава наследуемого гаплотипа.

На сегодняшний день множество биомедицинских исследований сфокусированы на роли молекул МНС II в развитии аутоиммунных реакций, так как в патологических условиях они могут презентировать не только экзогенные, но и эндогенные пептиды для $CD4^+$ Т-клеток. Описано множество примеров ассоциации носительства определенных аллелей МНС II с риском возникновения аутоиммунных заболеваний (АЗ) (таблица). Этот факт является одной из серьезных причин развития аутоиммунного процесса и объясняет свойство «аутоиммунитета» на молекулярном уровне.

При развитии аутоиммунных болезней, таких, как рассеянный склероз (РС), системная красная волчанка (СКВ), сахарный диабет первого типа (Д1Т), ревматоидный артрит (РА), болезнь Грейвса (БГ) и других, синтезируются аутоиммунные антитела против собственных антигенов, а также часто происходит проникновение лимфоцитов в орган-мишень с его последующим воспалением и частичным разрушением. Эти болезни почти всегда хронические, и, хотя на сегодняшний день при некоторых из них удается поддерживать состояние больного на стабильном уровне, для разработки эффективных методов

Ассоциация аллелей HLA-DRB1, HLA-DQA1 и HLA-DQB1 с аутоиммунными заболеваниями

HLA-DRB1*	РС	Д1Т	РА	БГ	Н	СКВ	АТ	Отношение шансов	
								Положительная ассоциация	Отрицательная ассоциация
0101								1.5 – 3.0	0.5 – 1.0
0102								3.0 – 5.0	0.1 – 0.5
0103								5.0 +	0 – 0.1
0301									
0401	Сардиния/Япония					Япония			
0402									
0403									
0404									
0405									
0701									
0801	15/08								
0901	Япония								
1001									
1101									
1102									
1103									
1201									
1301	Сардиния/Израиль								
1302						Япония			
1401									
1403						Япония			
1501									
1601									
HLA-DQA1* HLA-DQB1*								DQ	
0102 0601								DQ6.1	
0102 0602								DQ6.2	
0201 0303								DQ9.2	
0301 0302								DQ8.1	
0501 0201								DQ2.5	

Примечание. РС – рассеянный склероз, Д1Т – диабет типа 1, РА – ревматоидный артрит, БГ – болезнь Грейвса, Н – нарколепсия, СКВ – системная красная волчанка, АТ – аутоиммунный тиреозит.

лечения по-прежнему остро необходимо детальное понимание механизмов заболевания. Презентация антигенов и дальнейшая активация Т-клеток считаются ключевым звеном аутоиммунного ответа при многих заболеваниях [7], на который может быть направлена терапия, поэтому крайне важным представляется изучение основ процесса презентации антигенов, в частности структуры белков семейства МНС I и II и их особенностей.

Интересно, что аутоиммунные болезни, при которых вырабатываются аутоантитела, обычно ассоциированы с МНС II, тогда как заболевания, при которых аутоантитела не обнаруживаются, чаще ассоциированы с определенными аллелями МНС I [8]. При многих болезнях также наблюдается ассоциация с гаплотипами, включающими целые кластеры генов, что, по всей видимости, обусловлено НС этих генов при наследовании. Например, для АТ и Д1Т харак-

терна ассоциация с гаплотипом МНС II DR3-DQ2, а также с аллелями МНС I HLA-B8 и HLA-A1, которые входят в состав длинного и консервативного гаплотипа [8].

ВОЗМОЖНЫЕ МЕХАНИЗМЫ АССОЦИИИ АЛЛЕЛЕЙ МНС II С РИСКОМ ВОЗНИКНОВЕНИЯ ОПРЕДЕЛЕННЫХ БОЛЕЗНЕЙ

Молекулы МНС II принимают участие в процессе презентации антигенов, в том числе аутоантигенов (рис. 1). Иммуный ответ развивается после того, как антигенный пептид длиной 13–18 аминокислотных остатков презентуется АПК с помощью определенной молекулы МНС II и узнается соответствующим Т-клеточным рецептором на поверхности CD4⁺ Т-клетки. В роли АПК могут выступать дендритные клетки, В-лимфоциты и макрофаги [9].

МНС II синтезируется в эндоплазматическом ретикулуме и покидает данный компартмент в комплексе с инвариантной цепью (ИЦ) [10]. ИЦ ускоряет процесс выведения МНС II из эндоплазматического ретикулума и препятствует его агрегации. В поздних эндосомах ИЦ подвергается протеолизу, и связанным с МНС II остается небольшой фрагмент ИЦ – CLIP. По всей видимости, CLIP затрудняет взаимодействие МНС II с неспецифическими пептидами, блокируя их доступ к карманам связывания [9].

В поздних эндосомах происходит обмен пептида CLIP на антигенный пептид [11]. Важную роль здесь играет HLA-DM – «неклассическая» молекула МНС класса II [12], не полиморфная и не способная взаимодействовать с антигенными пептидами, однако сходная по структуре с остальными молекулами МНС II. HLA-DM катализирует процесс связывания антигенного пептида с HLA-DR, значительно повышая скорость этой реакции [13, 14]. Таким образом, HLA-DM способствует специфическому связыванию МНС II с высокоаффинными пептидами. Далее комплексы «МНС II–пептид» транспортируются к плазматической мембране для презентации пептидов CD4⁺ Т-клеткам, взаимодействие с которыми определяет, будет ли развиваться иммунный ответ. В случае инициации иммунного ответа CD4⁺ Т-лимфоциты активируют наивные В-клетки для последующей продукции специфических антител / аутоантител (в случае презентации собственных антигенов), а также способствуют вовлечению макрофагов в процесс иммунного ответа. Найдены аутореактивные CD4⁺ Т-клетки к целому ряду собственных антигенов при АТ, БГ и РС [15].

Существует несколько гипотез возникновения аутоиммунных процессов с участием определенных аллелей МНС II. Так, разнонаправленная (положительная и отрицательная) ассоциация АЗ с различными

аллелями HLA может определяться особенностями строения антигенсвязывающей борозды молекулы МНС, кодируемой конкретным аллелем гена и ответственной за связывание пептида, а именно, локализацией конкретных аминокислот в определенных позициях в структуре этой борозды: например, в положениях 11, 71 и 74 в β-цепи МНС [8, 16]. Такие МНС с точечными заменами могут с различной степенью эффективности связывать и презентировать собственные пептиды [17, 18]. Структурные элементы МНС, косвенно связанные с запуском аутоиммунного ответа, могут располагаться не только в пептидсвязывающей борозде, но и рядом, в области непосредственного контакта с Т-клеточным рецептором. Полиморфизм МНС в этой области может приводить к потенциальному связыванию аутореактивных эффекторных Т-клеток либо к слабому отбору регуляторных Т-клеток [6].

Запуск аутоиммунного ответа также возможен из-за молекулярной мимикрии экзогенных вирусных или бактериальных пептидов с собственными эндогенными пептидами. Определенные аллели МНС (например, аллель риска *DRB1.15* при РС) могут презентировать как определенные экзогенные пептиды, так и структурно очень похожие на них эндогенные пептиды с последующей инициацией аутоиммунного ответа [19].

Описаны примеры, когда в пептидсвязывающей борозде определенного аллеля МНС могут эффективно связываться лекарственные препараты, например абакавир, при терапии ВИЧ [8, 20] или даже низкомолекулярные соединения, например Be^{2+} [21], тем самым изменяя специфичность презентации пептидов и давая шанс презентации собственных пептидов.

Известны случаи, например, при целиакии [22] или РА [23], когда презентуемые пептиды подвергаются посттрансляционной модификации и получают преимущество при презентации на аллелях риска.

Данные о положительной и отрицательной ассоциации определенных аллелей МНС с риском развития АЗ исключительно важны для успешной таргетной иммуно-терапии с помощью препаратов, направленных на стадию презентации антигенов на МНС II.

МНОГООБРАЗИЕ АЛЛЕЛЕЙ МНС II, АССОЦИИРОВАННЫХ С РИСКОМ ВОЗНИКНОВЕНИЯ НАИБОЛЕЕ РАСПРОСТРАНЕННЫХ АУТОИММУННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Рассеянный склероз

Рассеянный склероз – хроническое воспалительное нейродегенеративное заболевание центральной нервной системы (ЦНС), которое диагностируется у 0.1% европейской и североамериканской популя-

ций [24]. Развитию РС способствуют генетическая предрасположенность с полигенным типом наследования и ряд внешних факторов, таких, как некоторые инфекционные заболевания, особенности питания, различные социальные и климатические факторы [25].

Показана четкая связь данного заболевания с носительством различных генетических вариантов МНС II. У европеоидов выявлена наиболее значимая ассоциация с РС протяженного гаплотипа DR15-DQ6 (HLA-DRB1*1501/HLA-DRB5*0101/HLA-DQA1*0102/HLA-DQB1*0602) [26]. Поскольку все эти аллели обладают существенным НС, долгое время оставалось неясным, какой именно из аллелей в наибольшей степени отвечает за предрасположенность к РС. Продвинувшись в разрешении этой задачи позволило исследование связи генов МНС II с РС в популяции американцев африканского происхождения. У них в меньшей степени проявляется неравновесие по сцеплению и преимущественная ассоциация аллеля HLA-DRB1*1501 с РС, что говорит о его главенствующей роли среди трех входящих в гаплотип аллелей [27]. К настоящему моменту аллель HLA-DRB1*1501 признан основным аллелем риска РС у европеоидов, его связь с заболеванием показана в большинстве изученных популяций [28].

Расеянный склероз традиционно считается скорее «женским» заболеванием, так как соотношение женщин и мужчин, больных основной ремиттирующей (или вторично-прогрессирующей) формой заболевания, составляет 2,5 : 1. Интересно, что согласно данным [29], носителями HLA-DRB1*15 также чаще являются женщины.

Кроме DRB1*1501 – универсального аллеля риска РС, описаны и другие варианты гена HLA-DRB1, положительно ассоциированные с РС в различных популяциях (таблица). Ассоциацию DRB1*03 с РС наблюдали во многих европейских популяциях, причем у носителей гомозиготного генотипа риск развития заболевания существенно повышался [30]. У больных из Сардинии и Японии, кроме HLA-DRB1*03, с РС положительно ассоциирована группа аллелей HLA-DRB1*04 [31, 32]. Аллель HLA-DRB1*13, также выявляемый у больных РС из Сардинии в составе гаплотипа HLA-DRB1*1303/HLA-DQB1*0301, признан ассоциированным с заболеванием и у населения Израиля [33]. В ряде работ выявлена высокая положительная связь носительства варианта HLA-DRB1*08 с риском развития РС у европеоидов с генотипом HLA-DRB1*15/08 [34, 30].

Основным протективным аллелем (т.е. аллелем, имеющим отрицательную ассоциацию с заболеванием и снижающим риск его возникновения по сравнению со средним по популяции) в северноевропей-

ской популяции признан вариант HLA-DRB1*14 [34]. К протективным, в меньшей степени у европеоидов, также относят группы аллелей HLA-DRB1*01, *07 и *11 [30, 35, 36]. Вариант HLA-DRB1*11 обладает выраженным протективным эффектом также в популяции афроамериканцев [37] и на Сардинии [32]. Аллель DRB1*0901 можно считать протективным при РС в японской популяции, причем его частота встречаемости в норме в азиатских странах выше, чем в других [31].

Исследования последних лет показали, что эффект протективных и предрасполагающих аллелей при гетерозиготном носительстве может компенсироваться. Так, снижение эффекта аллелей риска HLA-DRB1*15 и *03 наблюдали в присутствии протективных вариантов HLA-DRB1*14 или *11 [30, 34].

Следует отметить, что носительство определенных аллелей HLA ассоциировано с возрастом начала заболевания при РС. Так, носительство главного аллеля риска РС HLA-DRB1*1501 ассоциировано с более ранним началом заболевания у европеоидов [38], а в японской популяции заболевание начиналось в более раннем возрасте у носителей аллеля DRB1*0405 [31]. Известно, что при РС происходит аутоиммунная атака на компоненты миелиновой оболочки олигодендроцитов [39], описан ряд аутоантигенов при РС: основной белок миелина (MBP, myelin binding protein), протеолипидный белок (PLP, proteolipid protein), миелин-олигодендроцитарный гликопротеин (MOG, myelin oligodendrocyte glycoprotein) и миелин-ассоциированный гликопротеин (MAG, myelin-associated glycoprotein). На сегодняшний день MBP рассматривается как важнейший из них. MBP-специфичные CD4⁺ Т-лимфоциты обнаружены в тканях мозга больных РС [40], а непосредственно в очагах демиелинизации выявлены АПК, которые презентруют основной энцефалитогенный пептид MBP (фрагмент, содержащий аминокислотные остатки 85–99) [41, 42]. В презентации этого пептида на поверхности АПК существенную роль играют молекулы МНС II, кодируемые универсальным аллелем риска РС HLA-DRB1*1501, который связывается с фрагментом MBP₈₅₋₉₉, описан аутоиммунный ответ на данный комплекс у гуманизированных мышей [43], что можно рассматривать как один из механизмов, объясняющих наблюдаемую ассоциацию.

Сахарный диабет типа 1

Сахарный диабет первого типа (Д1Т), обнаруживаемый у 0,06–0,15% популяции, возникает в результате аутоиммунного воспаления тканей поджелудочной железы и, как следствие, нарушения синтеза инсулина [41, 44]. Показано, что именно презентация фрагментов инсулина на молекулах

МНС II при Д1Т и приводит к возникновению аутореактивных Т-клеток. Ранее всего была описана ассоциация Д1Т с группами аллелей *DRB1*03* и *DRB1*04* [6, 45]. Позже обнаружили ассоциацию с вариантами гена *DQB1*, причем его аллели (например, *HLA-DQB1*0302* (DQ8) или *HLA-DQB1*0201* (DQ2)) ассоциированы с высоким риском Д1Т лишь в том случае, когда они кодируют нейтральную аминокислоту в положении 57, например аланин. Если же в этом положении находится отрицательно заряженная аспарагиновая кислота, как у аллелей *DQB1*0602* (DQ6.2) и *DQB1*0303* (DQ9) [46], то соответствующий аллель обладает протективной активностью [6, 47]. Показано, что аминокислотный остаток 57 расположен в положении р9 пептидсвязывающей борозды и отвечает за образование гетеродимера DQA1-DQB1 [47]. По всей видимости, если в данном положении происходит замена аспарагиновой кислоты на нейтральную аминокислоту, то молекула МНС меняет свою специфичность и приобретает способность презентировать фрагменты инсулина. Интересно, что аллели *HLA-DRB1*0301*, *HLA-DRB1*0405* и *HLA-DRB1*0401* положительно ассоциированы с Д1Т, тогда как очень близкий аллель *HLA-DRB1*0403* ассоциирован отрицательно [46, 48]. Вероятно, для данного заболевания характерно структурное сходство антигенсвязывающих борозд положительно и отрицательно ассоциированных молекул МНС II, имеющих лишь точечные отличия, которые влияют на специфичность связывания пептида. Кроме того, высокие протективные показатели показывают аллели *HLA-DRB1*0701*, *HLA-DRB1*1401* и *HLA-DRB1*1501* [46].

Ревматоидный артрит

Ревматоидный артрит является хроническим воспалительным заболеванием, влияющим на суставы. Практически все больные РА являются носителями аллелей *HLA-DRB1*0401*, *HLA-DRB1*0404*, *HLA-DRB1*0405* или *HLA-DRB1*0101* [49–51]. Интересно, что β-цепи МНС II, являющиеся продуктами данных вариантов, имеют общий аминокислотный мотив внутри пептидсвязывающей борозды в позициях 67–74, который формирует так называемый «вырожденный эпитоп» [41, 18]. Показано, что точечные замены внутри выроденного эпитопа меняют заряд и влияют на ассоциацию с РА и часто являются единственными отличиями между аллелями риска и протективными аллелями *DRB1*0103*, *DRB1*0402*, *DRB1*0701*, *DRB1*1102* и *DRB1*1301* [6, 7, 49, 52]. Для РА показана также положительная ассоциация с вариантами гена *DQB1* [53], хотя, по всей видимости, это является следствием неравновесного сцепления с аллелями *DRB1* [54].

Болезнь Грейвса

Болезнь Грейвса (БГ), или диффузный токсический зоб, или Базедова болезнь, – это аутоиммунное заболевание, обусловленное избыточной секрецией тиреоидных гормонов диффузной тканью щитовидной железы, которое приводит к отравлению этими гормонами – тиреотоксикозу. У женщин заболевание встречается в 8 раз чаще, чем у мужчин. Чаще всего оно развивается в среднем возрасте (обычно между 30 и 50 годами). Наблюдается значительная семейная предрасположенность к БГ, что указывает на важный вклад генетической компоненты в развитие данного заболевания. На сегодняшний день показано, что предрасположенность к БГ, как и к РА, связана с вырожденным мотивом в продукте гена *DRB1*, а конкретно, с аминокислотой в положении 74 β-цепи комплекса МНС II. Так, молекула МНС, кодируемая ассоциированным с БГ вариантом *DRB1*03*, и продукт протективного варианта *DRB1*07* несут в положении 74 аргинин и глутамин соответственно [55, 56]. Интересно отметить, что различие между протективными аллелями МНС II и аллелями риска по положению 74 характерно также для Д1Т и РА [6]. Вероятно, положение 74 β-цепи МНС исключительно важно, так как этот аминокислотный остаток лежит в области кармана для остатка р4 в пептиде, где перекрывается пептидсвязывающий мотив МНС с областью докинга Т-клеточного рецептора [57].

Нарколепсия

Нарколепсия – это хроническое нейродегенеративное заболевание, характеризующееся повышенной сонливостью днем и нарушением ночного сна [41, 58]. Это комплексное заболевание с не до конца понятной этиологией, предположительно аутоиммунную природу которого ранее объясняли четкой ассоциацией с аллелем МНС II *DQB1*0602*, носителями которого являются почти 100% пациентов с данным диагнозом [59]. На сегодняшний день получены также данные по аутоиммунному Т-клеточному ответу при этом заболевании [60]. Так как структурно очень близкий аллель *HLA-DQB1*06011* (отличается от *HLA-DQB1*0602* всего 9 кодонами в гене β-цепи) является протективным при этом заболевании [61], по-видимому, в данном случае механизм ассоциации/протекции также связан с варьированием силы связывания презентруемого пептида и докинга Т-клеточного рецептора. Антиген, фрагменты которого может презентировать продукт *HLA-DQ6.2* (*DQA1*0102/DQB1*0602*), на сегодняшний день точно не определен, однако предполагается, что это может быть нейромедиатор орексин (гипокретин), регулирующий сон и синтезирующийся в гипоталамусе [51]. Определена кристаллическая структура

молекулы HLA-DQ6.2 с пептидом – производным гипокретина [62].

Интересно, что накопление данных о связи МНС II с аутоиммунной патологией позволило обнаружить ассоциацию одних и тех же вариантов с несколькими заболеваниями. Часто эти варианты входят в состав протяженных гаплотипов, включающих гены *DRB1*, *DQA1* и *DQB1*, наследуемых совместно, благодаря сильному HС. Аллели, входящие в так называемые удлинённые гаплотипы DR3-DQ2 (*DRB1*03/DQA1*0501/DQB1*0201*) и DR4-DQ8 (*DRB1*04/DQA1*0301/DQB1*0302*), ассоциированы с Д1Т [41, 63]. При этом DR3 ассоциирован еще и с РС, БГ, СКВ и АТ, поэтому он получил название «аутоиммунный гаплотип» [6]. DR4 также ассоциирован с рядом заболеваний, включая РА и АТ. С другой стороны, можно отметить, что аллель HLA-*DRB1*0701* обладает протективным действием при многих заболеваниях, как например, при РС, Д1Т, РА, БГ и АТ (таблица).

Недавние исследования показали, что степень ассоциации определенного аллеля МНС с АЗ зависит также и от регулируемого уровня экспрессии этого аллеля. Выявлено также, что увеличение уровня экспрессии конкретного МНС II может изменять репертуар Т-клеточных рецепторов в процессе созревания Т-клеток в тимусе и влиять на выживание и экспансию зрелых Т-клеточных клонов. Показано, что регуляция уровня экспрессии МНС может происходить как на транскрипционном, так и на посттранскрипционном уровне [64].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Развитие множества аутоиммунных болезней обусловлено воздействием целого ряда факторов,

включая генетические, социальные, климатические, зависит от возраста и пола пациента, от курения, инфекций в анамнезе и т.д., однако, при наличии генетической предрасположенности, очень часто определяющей носителем определенных генов МНС, вероятность заболевания статистически значимо увеличивается. На сегодняшний день охарактеризованы варианты МНС II, носительство которых у конкретного индивида может с высокой вероятностью привести к развитию определенного аутоиммунного заболевания. Описан ряд аллелей генов МНС II, обладающих протективным свойством по отношению к конкретным болезням. Набор генов МНС II с положительной и отрицательной ассоциацией с болезнями может варьировать в зависимости от принадлежности человека к определенной этнической группе. С каждым годом расширяется спектр структурных данных об особенностях презентации фрагментов аутоантигенов молекулами МНС II, получена информация о структурах нескольких тримолекулярных комплексов «МНС II–пептид–Т-клеточный рецептор». Для дальнейшего полного понимания механизмов индукции АЗ и разработок новейших терапевтических методов необходим комплексный подход с всесторонним исследованием механизмов презентации аутоантигенов на молекулах МНС II профессиональными АПК, механизмов протективности разных аллелей МНС II, кинетических характеристик процесса загрузки аутоантигенов на молекулы МНС II и возникновения последующего аутоиммунного ответа с участием CD4⁺ активированных Т-лимфоцитов. ●

Работа поддержана грантом РФФ № 17-74-30019 и грантом НИИ-РФФИ № 17-54-30025.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Campbell R.D., Trowsdale J. // *Immunol. Today*. 1993. V. 14. № 7. P. 349–352.
- Mungall A.J., Palmer S.A., Sims S.K., Edwards C.A., Ashurst J.L., Wilming L., Jones M.C., Horton R., Hunt S.E., Scott C.E., et al. // *Nature*. 2003. V. 425. № 6960. P. 805–811.
- McCluskey J., Kanaan C., Diviney M. // *Curr. Protoc. Immunol.* 2017. V. 118. P. A1S1–A1S6.
- Aliseychik M.P., Andreeva T.V., Rogaev E.I. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2018. V. 83. № 9. P. 1104–1116.
- Shiina T., Hosomichi K., Inoko H., Kulski J.K. // *J. Hum. Genet.* 2009. V. 54. № 1. P. 15–39.
- Gough S.C., Simmonds M.J. // *Curr. Genomics*. 2007. V. 8. № 7. P. 453–465.
- Simmonds M.J., Gough S.C. // *Br. Med. Bull.* 2004. V. 71. P. 93–113.
- Sollid L.M., Pos W., Wucherpfennig K.W. // *Curr. Opin. Immunol.* 2014. V. 31. P. 24–30.
- Neefjes J., Jongsma M.L., Paul P., Bakke O. // *Nat. Rev. Immunol.* 2011. V. 11. № 12. P. 823–836.
- Busch R., Doebele R.C., Patil N.S., Pashine A., Mellins E.D. // *Curr. Opin. Immunol.* 2000. V. 12. № 1. P. 99–106.
- Villadangos J.A. // *Mol. Immunol.* 2001. V. 38. № 5. P. 329–346.
- Kropshofer H., Vogt A.B., Moldenhauer G., Hammer J., Blum J.S., Hammerling G.J. // *EMBO J.* 1996. V. 15. № 22. P. 6144–6154.
- Pos W., Sethi D.K., Wucherpfennig K.W. // *Trends Immunol.* 2013. V. 34. № 10. P. 495–501.
- Schulze M.S., Wucherpfennig K.W. // *Curr. Opin. Immunol.* 2012. V. 24. № 1. P. 105–111.
- Nielsen C.H., Moeller A.C., Hegedus L., Bendtzen K., Leslie R.G. // *J. Clin. Immunol.* 2006. V. 26. № 2. P. 126–137.
- Gregersen P.K., Silver J., Winchester R.J. // *Arthritis Rheum.* 1987. V. 30. № 11. P. 1205–1213.
- Gromme M., Neefjes J. // *Mol. Immunol.* 2002. V. 39. № 3–4. P. 181–202.
- Parham P. // *Immunol. Rev.* 1996. V. 154. P. 137–154.
- Lang H.L., Jacobsen H., Ikemizu S., Andersson C., Harlos K., Madsen L., Hjorth P., Sondergaard L., Svejgaard A.,

- Wucherpfennig K., et al. // *Nat. Immunol.* 2002. V. 3. № 10. P. 940–943.
20. Mallal S., Phillips E., Carosi G., Molina J.M., Workman C., Tomazic J., Jagel-Guedes E., Rugina S., Kozyrev O., Cid J.F., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2008. V. 358. № 6. P. 568–579.
21. Clayton G.M., Wang Y., Crawford F., Novikov A., Wimberly B.T., Kieft J.S., Falta M.T., Bowerman N.A., Marrack P., Fontenot A.P., et al. // *Cell.* 2014. V. 158. № 1. P. 132–142.
22. Molberg O., McAdam S.N., Korner R., Quarsten H., Kristiansen C., Madsen L., Fugger L., Scott H., Noren O., Roepstorff P., et al. // *Nat. Med.* 1998. V. 4. № 6. P. 713–717.
23. Girbal-Neuhauser E., Durieux J.J., Arnaud M., Dalbon P., Sebbag M., Vincent C., Simon M., Senshu T., Masson-Bessiere C., Jolivet-Reynaud C., et al. // *J. Immunol.* 1999. V. 162. № 1. P. 585–594.
24. Keegan B.M., Noseworthy J.H. // *Annu. Rev. Med.* 2002. V. 53. P. 285–302.
25. Ebers G.C. // *Lancet Neurol.* 2008. V. 7. № 3. P. 268–277.
26. Fogdell A., Hillert J., Sachs C., Olerup O. // *Tissue Antigens.* 1995. V. 46. № 4. P. 333–336.
27. Oksenberg J.R., Barcellos L.F., Cree B.A., Baranzini S.E., Bugawan T.L., Khan O., Lincoln R.R., Swerdlin A., Mignot E., Lin L., et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 2004. V. 74. № 1. P. 160–167.
28. Hollenbach J.A., Oksenberg J.R. // *J. Autoimmun.* 2015. V. 64. P. 13–25.
29. Hensiek A.E., Sawcer S.J., Feakes R., Deans J., Mander A., Akesson E., Roxburgh R., Coraddu F., Smith S., Compston D.A. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry.* 2002. V. 72. № 2. P. 184–187.
30. Ramagopalan S.V., Morris A.P., Dyment D.A., Herrera B.M., DeLuca G.C., Lincoln M.R., Orton S.M., Chao M.J., Sadovnick A.D., Ebers G.C. // *PLoS Genet.* 2007. V. 3. № 9. P. 1607–1613.
31. Yoshimura S., Isobe N., Yonekawa T., Matsushita T., Masaki K., Sato S., Kawano Y., Yamamoto K., Kira J., South Japan Multiple Sclerosis Genetics C. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 11. P. e48592.
32. Cocco E., Murru R., Costa G., Kumar A., Pieroni E., Melis C., Barberini L., Sardu C., Loreface L., Fenu G., et al. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 4. P. e59790.
33. Karni A., Kohn Y., Safirman C., Abramsky O., Barcellos L., Oksenberg J.R., Kahana E., Karussis D., Chapman J., Brautbar C. // *Mult. Scler.* 1999. V. 5. № 6. P. 410–415.
34. Barcellos L.F., Sawcer S., Ramsay P.P., Baranzini S.E., Thomson G., Briggs F., Cree B.C., Begovich A.B., Villoslada P., Montalban X., et al. // *Hum. Mol. Genet.* 2006. V. 15. № 18. P. 2813–2824.
35. Zhang Q., Lin C.Y., Dong Q., Wang J., Wang W. // *Autoimmun. Rev.* 2011. V. 10. № 8. P. 474–481.
36. Dyment D.A., Herrera B.M., Cader M.Z., Willer C.J., Lincoln M.R., Sadovnick A.D., Risch N., Ebers G.C. // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. № 14. P. 2019–2026.
37. Isobe N., Gourraud P.A., Harbo H.F., Caillier S.J., Santaniello A., Khankhanian P., Maiers M., Spellman S., Cereb N., Yang S., et al. // *Neurology.* 2013. V. 81. № 3. P. 219–227.
38. Ramagopalan S.V., Byrnes J.K., Dyment D.A., Guimond C., Handunnetthi L., Disanto G., Yee I.M., Ebers G.C., Sadovnick A.D. // *J. Hum. Genet.* 2009. V. 54. № 9. P. 547–579.
39. Sospedra M., Martin R. // *Annu. Rev. Immunol.* 2005. V. 23. P. 683–747.
40. Oksenberg J.R., Panzara M.A., Begovich A.B., Mitchell D., Erlich H.A., Murray R.S., Shimonkevitz R., Sherritt M., Rothbard J., Bernard C.C., et al. // *Nature.* 1993. V. 362. № 6415. P. 68–70.
41. Jones E.Y., Fugger L., Strominger J.L., Siebold C. // *Nat. Rev. Immunol.* 2006. V. 6. № 4. P. 271–282.
42. Krogsgaard M., Wucherpfennig K.W., Cannella B., Hansen B.E., Svejgaard A., Pyrdol J., Ditzel H., Raine C., Engberg J., Fugger L. // *J. Exp. Med.* 2000. V. 191. № 8. P. 1395–1412.
43. Madsen L.S., Andersson E.C., Jansson L., Krogsgaard M., Andersen C.B., Engberg J., Strominger J.L., Svejgaard A., Hjorth J.P., Holmdahl R., et al. // *Nat. Genet.* 1999. V. 23. № 3. P. 343–347.
44. Atkinson M.A., Eisenbarth G.S. // *Lancet.* 2001. V. 358. № 9277. P. 221–229.
45. Nerup J., Platz P., Andersen O.O., Christy M., Lyngsoe J., Poulsen J.E., Ryder L.P., Nielsen L.S., Thomsen M., Svejgaard A. // *Lancet.* 1974. V. 2. № 7885. P. 864–866.
46. Erlich H., Valdes A.M., Noble J., Carlson J.A., Varney M., Concannon P., Mychaleckyj J.C., Todd J.A., Bonella P., Fear A.L., et al. // *Diabetes.* 2008. V. 57. № 4. P. 1084–1092.
47. Todd J.A., Bell J.I., McDevitt H.O. // *Nature.* 1987. V. 329. № 6140. P. 599–604.
48. Cucca F., Lampis R., Congia M., Angius E., Nutland S., Bain S.C., Barnett A.H., Todd J.A. // *Hum. Mol. Genet.* 2001. V. 10. № 19. P. 2025–2037.
49. Gibert M., Balandraud N., Touinssi M., Mercier P., Roudier J., Reviron D. // *Hum. Immunol.* 2003. V. 64. № 10. P. 930–935.
50. Stastny P. // *N. Engl. J. Med.* 1978. V. 298. № 16. P. 869–871.
51. Wordsworth B.P., Lanchbury J.S., Sakkas L.I., Welsh K.I., Panayi G.S., Bell J.I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1989. V. 86. № 24. P. 10049–10053.
52. de Vries N., Tijssen H., van Riel P.L., van de Putte L.B. // *Arthritis Rheum.* 2002. V. 46. № 4. P. 921–928.
53. van der Horst-Bruinsma I.E., Visser H., Hazes J.M., Breedveld F.C., Verduyn W., Schreuder G.M., de Vries R.R., Zanelli E. // *Hum. Immunol.* 1999. V. 60. № 2. P. 152–158.
54. de Vries N., van Elderen C., Tijssen H., van Riel P.L., van de Putte L.B. // *Arthritis Rheum.* 1999. V. 42. № 8. P. 1621–1627.
55. Chen Q.Y., Huang W., She J.X., Baxter F., Volpe R., Maclaren N.K. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 1999. V. 84. № 9. P. 3182–3186.
56. Tomer Y., Davies T.F. // *Endocr. Rev.* 2003. V. 24. № 5. P. 694–717.
57. Chelvanayagam G. // *Hum. Immunol.* 1997. V. 58. № 2. P. 61–69.
58. Okun M.L., Lin L., Pelin Z., Hong S., Mignot E. // *Sleep.* 2002. V. 25. № 1. P. 27–35.
59. Matsuki K., Grumet F.C., Lin X., Gelb M., Guilleminault C., Dement W.C., Mignot E. // *Lancet.* 1992. V. 339. № 8800. P. 1052.
60. Reading P.J. // *J. Neurol.* 2019. V. 266. № 7. P. 1809–1815.
61. Mignot E., Lin L., Rogers W., Honda Y., Qiu X., Lin X., Okun M., Hohjoh H., Miki T., Hsu S., et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 2001. V. 68. № 3. P. 686–699.
62. Siebold C., Hansen B.E., Wyer J.R., Harlos K., Esnouf R.E., Svejgaard A., Bell J.I., Strominger J.L., Jones E.Y., Fugger L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 7. P. 1999–2004.
63. Stern L.J., Brown J.H., Jardetzky T.S., Gorga J.C., Urban R.G., Strominger J.L., Wiley D.C. // *Nature.* 1994. V. 368. № 6468. P. 215–221.
64. Gianfrani C., Pisapia L., Picascia S., Strazzullo M., Del Pozzo G. // *J. Autoimmun.* 2018. V. 89. P. 1–10.

УДК 577.152.3

Двуспиральные РНК как средство защиты растений от патогенных организмов и вирусов культивируемых растений

С. Ю. Морозов^{1,2*}, А. Г. Соловьев^{1,2}, Н. О. Калинина^{1,2}, М. Э. Тальянский^{1,3}¹Международная лаборатория «Резистом», Инновационный центр Сколково, Москва, 143026 Россия**²НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия³Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

*E-mail: morozov@genebee.msu.su

Поступила в редакцию 14.10.2019

Принята к печати 29.11.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-13-21

РЕФЕРАТ Недавние исследования показали, что растения способны успешно экспрессировать искусственные гены, ответственные за синтез двуспиральных РНК (дсРНК) и шпилечных двуспиральных РНК (hpРНК), а также поглощать и процессировать экзогенные дсРНК и hpРНК, чтобы подавить экспрессию генов жизнеобеспечения и вирулентности патогенных вирусов растений, грибов или насекомых. Как эндогенные, так и экзогенные дсРНК процессируются в малые интерферирующие РНК, которые распространяются по растению локально и системно, попадают в патогенные микроорганизмы и индуцируют устойчивость растений к патогенам, опосредованную РНК-интерференцией. Описаны многочисленные примеры разработки новых биотехнологических подходов к защите растений с использованием трансгенных растений и экзогенных дсРНК. В обзоре обобщены результаты применения трансгенов и экзогенных дсРНК для подавления генов вирулентности грибов и насекомых, а также вирусов, и повышения резистентности растений к этим патогенам. Проанализированы современные представления о механизмах процессинга дсРНК и их транспорта в растениях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА двуспиральные РНК, РНК-интерференция, регуляция генов патогенов, трансгенные растения, устойчивость растений, шпилечные РНК, экзогенные дсРНК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ RISC – РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RNA Induced Silencing Complex); siРНК – малые интерферирующие РНК (small interfering RNA); дсРНК – двуспиральные РНК; hpРНК – шпилечная РНК; HIGS – сайленсинг гена, индуцированный хозяином (Host-Induced Gene Silencing); SIGS – сайленсинг гена, индуцируемый опрыскиванием (Spray-Induced Gene Silencing).

ВВЕДЕНИЕ

РНК-интерференция – эволюционно консервативный внутриклеточный процесс, обеспечивающий особую стратегию регулирования экспрессии генов. Важнейшим аспектом механизма РНК-интерференции является то, что он не изменяет хромосомную первичную структуру целевых генов, но способен значительно ослаблять экспрессию генов и приводить к определенным изменениям фенотипа

клеток и целых организмов [1, 2]. Впервые идея использования участков РНК, комплементарных определенной области мРНК целевого гена, для угнетения экспрессии этого гена была описана в 1984 году [3] как альтернатива классическому генетическому анализу, т.е. получению мутантов, изменяющих первичную структуру генетического локуса. Однако первые опыты по применению антисмысловой РНК для подавления активности генов не приводили к на-

**ООО «Международная лаборатория «Резистом» (ООО «МЛ «Резистом») является участником проекта создания и обеспечения функционирования Инновационного центра Сколково.

дежным позитивным результатам, и механизмы такого подавления не были понятными [4–6]. Термин РНК-интерференция впервые ввели в 1998 году, когда Табага и соавт. показали, что процесс может быть инициирован инкубацией нематод в растворе ген-специфичных двуспиральных фрагментов РНК [7–9]. Однако к тому времени на трансгенных растениях и грибах уже были получены явные указания на роль комплементарных РНК в регуляции экспрессии эндогенных эукариотических генов [10–12].

Принципиально важный результат представлен в работе, опубликованной в 1993 году и посвященной устойчивости трансгенного табака к потивирусу гравировки табака [13]. Была доказана связь выявленной устойчивости с РНК-интерференцией, так как имела место косупрессия трансгена, кодирующего участок вирусного генома, и самого вируса, имеющего РНК-геном. Следовательно, этот процесс должен функционировать именно на уровне РНК. В течение 1990-х годов появилось множество работ о РНК-интерференции во многих организмах, включая грибы, животные и растения [14, 15]. Эти исследования показали, что процесс РНК-интерференции начинается с фермента Dicer-Like (DCL), который разрезает длинные молекулы вирусной или клеточной двуспиральной РНК на короткие фрагменты порядка 21–25 нуклеотидов, называемые siРНК. Одну из двух цепочек каждого фрагмента называют «направляющей», так как она далее включается в состав комплекса RISC. В результате активности этого комплекса короткий одноцепочечный фрагмент РНК образует водородные связи с комплементарной последовательностью протяженной молекулы РНК и вызывает разрезание последней белком комплекса RISC, который был назван Argonaute (AGO). Таким образом обеспечивается высокая специфичность разрезания. Эти события приводят к подавлению (сайленсингу) функционирования клеточного гена или репликации вируса [1, 16].

Передвижение siРНК по растению подразделяют на межклеточный (ближний) и системный (дальний) транспорт [17]. Это движение происходит по симпласту, т.е. от места инициации в соседние клетки через межклеточные каналы, называемые плазмодесмами, а также распространяется системно на большие расстояния через проводящую ткань флоэмы. Системное движение сигнала сайленсинга происходит в течение нескольких дней после инициации и, как правило, направлено от фотосинтетических источников (т.е. листьев) к корням и точкам роста [18, 19]. Системный сигнал сайленсинга идентифицирован в растениях путем прямого отбора проб сока флоэмы [20, 21] и обнаружения его в привитых частях растения [22–24]. Мобильные сигналы сайленсинга включают двуспи-

ральные молекулы siРНК (21–24 остатка) [20, 21, 24, 25]. При этом Dunoyer и соавт. [26] прямо показали, что химически синтезированные экзогенные флуоресцентно меченные siРНК действительно перемещаются от клетки к клетке и на большие расстояния.

Начиная с тех работ, в которых доказано, что искусственные двуспиральные РНК вызывают РНК-интерференцию [9], удалось убедительно показать эффективность использования этой стратегии для защиты растений от патогенных организмов и вирусов [27, 28]. В данном обзоре мы рассмотрим примеры возможного практического применения РНК-интерференции для защиты растений от патогенов.

ЭКСПРЕССИЯ ДВУСПИРАЛЬНЫХ РНК В ТРАНСГЕННЫХ РАСТЕНИЯХ ДЛЯ ПОДАВЛЕНИЯ ПАТОГЕНОВ

Сейчас очевидно, что РНК-интерференция может использоваться для достижения желаемой резистентности сельскохозяйственных культур к патогенам путем манипулирования экспрессией генов вирусов, бактерий, грибов, нематод и насекомых [29, 30]. Способ доставки двуспиральных РНК, ранее получивший широкое применение для защиты растений, основан на использовании трансгенных культур, продуцирующих dsРНК, специфичные для вредителей. Опосредованный трансгеном метод подавления патогенов в целом включает идентификацию целевого ингибируемого гена(ов) патогена с последующим созданием конструкции, где dsРНК продуцируется в виде шпильки с помощью генно-инженерной кассеты, содержащей целевой ген (или его часть) в смысловой и антисмысловой ориентациях, а также относительно короткий спейсер, разделяющий комплементарные сегменты, трансформацию растений и, наконец, скрининг и оценку признаков трансформантов [31, 32] (рис. 1). Экспрессия таких dsРНК, основанная на трансгенных конструкциях, в соответствующем растении-хозяине часто приводит к защите от инфекции. Этот биотехнологический способ, названный сайленсингом генов, индуцированным хозяином (host-induced gene silencing, HIGS), появился как перспективная альтернатива другим способам защиты растений, поскольку имеет высокую селективность для генов организма цели. Кроме того, этот метод обладает минимальными побочными эффектами по сравнению, например, с трансгенами, продуцирующими белки, или с химической протективной обработкой [29, 33].

За последние 10 лет опубликован целый ряд исследований, посвященных использованию HIGS для борьбы с грибковыми заболеваниями [29, 33, 34]. В 2010 году была опубликована важная работа, доказывающая эффективность стратегии

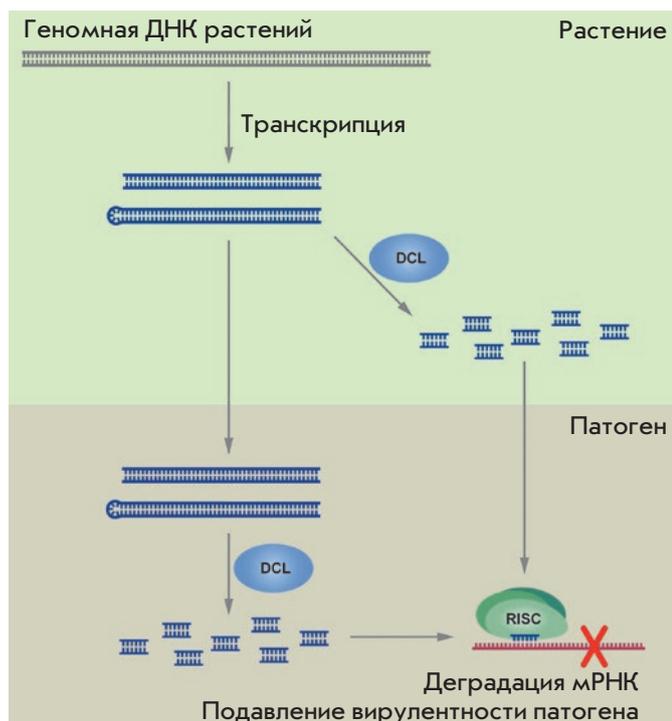


Рис. 1. Схема использования трансгенной дсРНК для РНК-интерференции в растениях. Искусственная дсРНК производится с трансгенных конструкций. Эндогенные длинные дсРНК либо транспортируются прямо в цитоплазму патогена по не вполне яскому механизму, либо молекулы дсРНК или hrРНК распознаются в растении рибонуклеазой DICER (DCL), которая расщепляет длинные дсРНК на короткие интерферирующие РНК. Последние затем переносятся в клетки патогена, где включаются в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), который направляет специфическую деградацию или трансляционную репрессию мРНК патогена. Интерферирующие РНК и комплекс RISC могут быть образованы непосредственно в клетках патогена. Стрелки показывают различные шаги процесса индукции коротких интерферирующих РНК и движения РНК между клетками растений и фитопатогенов

HIGS в борьбе с фитопатогенными грибами [35]. Показано, что экспрессия интерферирующей каскады для маркерного гена *GUS*, кодирующего бета-глюкуронидазу (шпилька (hp)GUS), в растениях табака приводила к подавлению экспрессии этого гена в клетках гриба *Fusarium verticillioides*. Однако эффективность HIGS, направленного на возбудитель ржавчины, варьировала при использовании разных генов. Так, например, в трансгенных растениях пшеницы, продуцирующих дуспиральные РНК к генам *MITOGEN-ACTIVATED PROTEIN KINASE 1* (*PtMAPK1*), *CYCLOPHILIN* (*PtCYC1*)

или *CALCINEURIN B* (*PtCNB*) ржавчинного гриба *Puccinia triticina* [36], симптомы заболевания уменьшились на 51–68%, а биомасса гриба снизилась на 59–69% по сравнению с контрольными векторными конструкциями. В листьях пшеницы, экспрессирующих эти конструкции, симптомы инфекции *Puccinia graminis* также уменьшились незначительно. Таким образом, очевидно, что специальный подбор генов-мишеней может привести к большей эффективности HIGS и обеспечить более широкий спектр устойчивости к ржавчинным грибам.

Очевидный эффект HIGS показан также у злаковых, зараженных возбудителем мучнистой росы *Blumeria graminis* [37]. Обнаружено снижение симптомов мучнистой росы у растений ячменя или пшеницы при HIGS-опосредованном подавлении гена белка-эффектора *Avra10* и уменьшение количества функциональных гаусторий внутри клеток эпидермиса. Подавление генов метаболизма жирных кислот с помощью стратегии HIGS выявило эффективность этого метода для создания толерантности к болезням и у ряда других культурных растений. HIGS-опосредованное подавление гена *OsSSI2* риса привело к повышению устойчивости к грибу *Magnaporthe grisea* и бактерии листовой гнили *Xanthomonas oryzae* [38]. Повышенная устойчивость растений риса к *M. grisea* была достигнута путем подавления двух генов, а именно *OsFAD7* и *OsFAD8*, которые кодируют белки Ω -3-десатуразы жирных кислот [39]. Более того, подавление генов, контролирующих производство лигнина, привело к повышению устойчивости растений сои к фитопатогену *Sclerotinia sclerotiorum* [40].

В отличие от приведенных данных, HIGS-опосредованный сайленсинг генов оомицета *Phytophthora parasitica* не инициировал развитие столь явной защитной реакции у трансгенных растений арабидопсиса, экспрессирующих дсРНК на основе последовательности гена *PnPMA1* [41]. Однако другие примеры указывают на возможность успешного применения HIGS и в случае оомицетов. Так, в одной из работ показано, что в трансгенных растениях табака, экспрессирующих дсРНК гена глутатион-S-трансферазы, развивается заметная устойчивость к табачному штамму фитопфторы [42].

Проблемы применения трансгенных растений, экспрессирующих дсРНК к генам паразитических нематод, обобщены Lilley и соавт. [43]. Отмечено, что не полностью понятыми остаются сложные взаимодействия между растением и паразитом. В частности, невозможность трансформации паразитических нематод и генерации их мутантных линий не позволяет понять функции генов, что, в свою очередь, затрудняет идентификацию генов, которые могут служить эффективными мишенями

ми для РНК-интерференции. Однако с этой целью можно использовать данные для других клеточных патогенов, в частности соевой нематоды *Heterodera glycines* и грибов. Так, Youssef и соавт. [44] использовали стратегию HIGS для подавления гена *HgALD* (фруктозо-1,6-дифосфат-альдолаза), что приводило к уменьшению численности потомства самок на 58%.

Сайленсинг генов домашнего хозяйства корневой нематоды с помощью экспрессии дсРНК в растении-хозяине также повысил устойчивость к нематоду [45]. Ibrahim и соавт. [46] смогли успешно снизить образование скоплений *Meloidogyne incognita* в корнях сои путем подавления генов, кодирующих тирозинфосфатазу и фруктозо-1,6-дифосфат-альдолазу, ключевой фермент глюкогенеза.

Альтернативная стратегия HIGS, направленная на борьбу с нематодами, включает гены, необходимые для паразитизма [47, 48]. Гены *flp-14* и *flp-18* галловой нематоды *M. incognita* кодируют нейропептиды, которые вовлечены в миграцию нематод и инвазию корней хозяина [47]. HIGS-опосредованный сайленсинг любого из двух генов в трансгенных растениях табака снижает заражение большинства линий этой нематодой. Плодовитость самок уменьшается на ~50–80%. Паразитизм также может быть нарушен HIGS-опосредованным сайленсингом генов, кодирующих эффекторные белки нематоды, играющие важную роль в установлении успешных паразитарных отношений с хозяином. В трансгенных растениях *Arabidopsis thaliana*, экспрессирующих дсРНК к участкам консервативного эффекторного гена *16D10* корневой нематоды, кодирующего небольшой секреторный пептид, который помогает выбрать места кормления, возникает устойчивость широкого спектра к *M. incognita* [48]. Снижение восприимчивости к *M. incognita* выявлено также в корнях трансгенных растений винограда, экспрессирующих конструкции на основе шпильки фрагмента последовательности гена *16D10* [49]. Sindhu и соавт. [50] использовали подавление четырех разных генов, участвующих в паразитизме нематоды сахарной свеклы (*Heterodera schachtii*) на хозяине *A. thaliana*, который экспрессирует дсРНК. Хотя полная резистентность не была достигнута, но количество зрелых самок нематод в разных линиях трансгенных растений снизилось до 23–64%.

РНК-интерференция применяется также для борьбы с насекомыми-вредителями, которые приводят к значительным потерям урожая [51–53]. Мао и соавт. [54] разработали стратегию, которая контролирует чувствительность насекомого к фитотоксинам растения. После нападения насекомого растения синтезируют разнообразные вторичные метаболиты, направленные на снижение жизне-

способности вредителей. В ответ некоторые насекомые выработали способность к детоксикации этих соединений, что часто обусловлено активностью цитохром-Р450-монооксигеназы. Согласно данным генетического и биохимического анализа, экспрессия цитохрома Р450 (*CYP6AE14*) в личинках хлопкового червя (*Helicoverpa armigera*) необходима для устойчивости к госсиполу – фитотоксину хлопка [54]. При этом у личинок, выращенных на трансгенных растениях арабидопсиса, табака или хлопка, экспрессия дсРНК *CYP6AE14* приводит к снижению синтеза соответствующего белка и повышению чувствительности к госсиполу [54, 55]. Позже эти же авторы показали, что уровень защиты можно повысить путем совместной экспрессии дсРНК *CYP6AE14* и цистеиновой протеазы [56]. Индуцированный растением-хозяином ген дсРНК, вызывающей сайленсинг цитохрома Р450, использовали также для увеличения чувствительности к пиретроиду дельтаметрину, который применяется для борьбы с вредителями хлопка [57]. Эти результаты позволяют предположить, что ориентированные на цитохром Р450 ферментные системы являются эффективной системой для снижения резистентности к пиретроидам.

Сельскохозяйственные культуры, кодирующие гетерологичные белки или сверхэкспрессирующие такие белки, принципиально отличаются от культур, которые кодируют кассеты для синтеза интерферирующих дсРНК. Известно, что РНК не токсичны для людей, тогда как производимые трансгенными растениями чужеродные белки в некоторых случаях могут быть токсичными или аллергенными [58]. Таким образом, трансгенные культуры с генами устойчивости на основе РНК гораздо безопаснее для здоровья человека, чем культуры с избыточной экспрессией белков, и не требуют определения острой пероральной токсичности и оценки переваримости введенного компонента РНК. Некоторые проблемы биобезопасности возникают при использовании трансгенных растений, экспрессирующих дсРНК, поскольку транскрипционный сайленсинг генов путем модификации хроматина может привести к наследственным изменениям, имеющим неблагоприятный эффект. Это вызывает у общественности озабоченность, связанную с безопасностью генетически модифицированных организмов [59]. Более того, во многих странах существуют законодательные ограничения на выращивание трансгенных растений (Law Library of Congress (U.S.). Global Legal Research Directorate. Restrictions on Genetically Modified Organisms; Global Legal Research Center: Washington, DC, USA, 2014, p. 242). Таким образом, разработка новых, экологически безопасных подходов, направленных на повы-

шение устойчивости к вредителям без значительных модификаций генома растений, является важной задачей. Один из таких подходов – редактирование генома с помощью системы CRISPR/Cas. Во-первых, системы CRISPR/Cas могут использоваться для введения точечных мутаций или малых делеций в конкретные гены растений-хозяев, чтобы блокировать механизмы, способствующие распространению патогена в растении. Во-вторых, могут быть разработаны системы CRISPR/Cas для осуществления мутагеназа геномов патогенов. Например, системы CRISPR/Cas9 могут быть нацелены непосредственно на ДНК-или РНК-содержащие вирусы [60].

МЕТОДЫ ДОСТАВКИ ИСКУССТВЕННЫХ ДВУСПИРАЛЬНЫХ РНК В РАСТЕНИЯХ: ПРЯМАЯ ОБРАБОТКА РАСТЕНИЙ дсРНК

Доказано, что методы, основанные на РНК-интерференции, являются эффективной стратегией защиты растений от болезней, вызванных вирусными и клеточными патогенами. Однако возможность широкого применения HIGS остается весьма сомнительной, поскольку получение генно-модифицированных сельскохозяйственных культур занимает достаточно много времени и все еще с недоверием воспринимается общественностью во многих европейских странах.

Поиск альтернативных стратегий был облегчен результатами более ранних исследований, которые показали, что растворы дсРНК могут быть использованы для РНК-интерференции нематоды *Caenorhabditis elegans* [7]. Более того, успешные опыты по подавлению роста и размножения паразитических нематод растений *in planta* доказали, что РНК-интерференция в данном случае может быть перспективным методом снижения жизнеспособности вредителей [43]. В настоящее время такие исследования носят новаторский характер и могут привести к значительному прогрессу в создании основанного на РНК-интерференции подхода к защите растений путем прямого введения экзогенной дсРНК, комплементарной геномам патогенов. Такие исследования позволят прояснить такие важные вопросы, как (i) способы и механистические основы введения дсРНК в растения; (ii) решение проблем транспорта, процессинга и стабильности дсРНК во внешней среде и в клетках; (iii) реализация крупномасштабного производства и очистки экзогенной дсРНК, чтобы сделать такой подход экономически обоснованным. Предложено несколько альтернативных способов доставки дсРНК, которые не предполагают трансформации растений. В частности, дсРНК может быть транслоцирована в сосудистую систему растения (ксилема и флоэма) через корни или путем прямой

инъекции молекул РНК в ствол древесных пород [28, 61–66].

Однако наиболее перспективным в настоящее время считается опрыскивание растений (в основном листьев). Этот метод получил название спрей-индуцированного сайленсинга генов (spray-induced gene silencing (SIGS)). Экзогенные интерферирующие дсРНК могут либо непосредственно поглощаться клетками вредителя, либо сначала переноситься в растительные клетки, а затем переходить в клетки патогена (рис. 2) [64, 67, 68]. В этой связи важно отметить, что локально распыленные РНК также ингибируют вирулентность патогена в дистальных, не обработанных листьях [68, 69]. Очевидно, что эти дсРНК либо более короткие продукты их процессинга способны системно распространяться внутри растений.

Показано, что исходные препараты «голых» дсРНК могут защищать растения от микробных патогенов в течение 10 дней после опрыскивания [64, 67, 68]. Однако недавно показали, что продолжительность защиты от инфекции увеличилась более чем на 20 дней, когда дсРНК включали в нанослой гидроксида, называемые BioClay [69]. Нанослой BioClay предотвращали деградацию дсРНК под действием РНКаз или солнечного света. Поскольку эти наночастицы и РНК в них нетоксичны и легко разлагаются, этот метод считается экологически безопасным, он повышает эффективность применения SIGS для борьбы с болезнями растений в полевых условиях [70]. Так, достижения в области технологии наночастиц заметно улучшили потенциальную эффективность применения SIGS для защиты растений. Кроме того, для инкапсуляции дсРНК и достижения РНК-интерференции использовали также полимеры хитозана. Наночастицы хитозана получали путем самосборки полимера с дсРНК, используя электростатические взаимодействия между положительными и отрицательными зарядами аминокислотных групп в хитозане и фосфатных групп в нуклеиновой кислоте соответственно. Этот метод хорошо подходит для длинных дсРНК. Наночастицы хитозана, которыми обработаны растения, могут попасть в организм вредителей вместе с пищей. Эта система весьма недорогая и высокоэффективная. Кроме того, полимеры хитозана нетоксичны и легко подвергаются биоразложению [63, 69, 71, 72].

Длина экзогенной дсРНК весьма важна для эффективного подавления генов патогенов растений. Длина дсРНК, необходимая для достижения выраженного эффекта, варьирует в зависимости от вида и таксона патогена. Исследования на насекомых показали, что длина дсРНК, необходимая для успешной РНК-интерференции, в большинстве случаев может колебаться от 140 до 500 нуклеотидов. Для вирусов

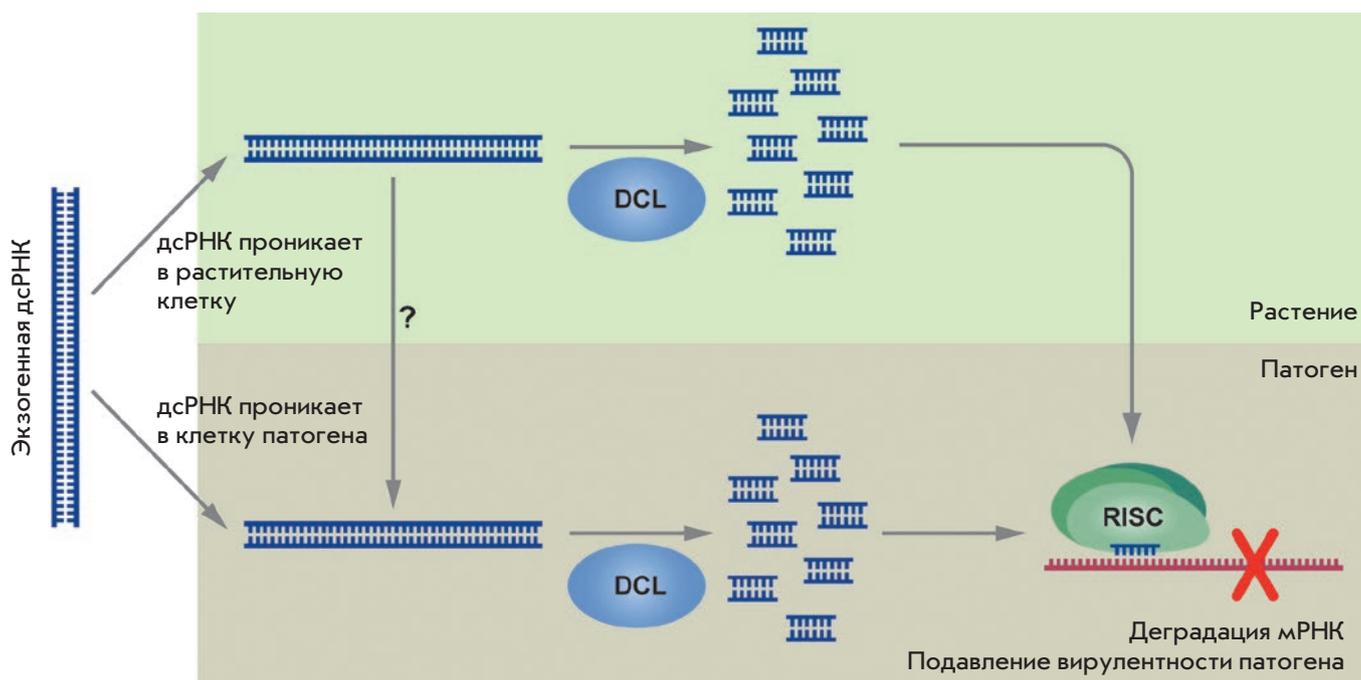


Рис. 2. Схема использования экзогенной дсРНК для индукции РНК-интерференции в растениях. Экзогенная искусственная дсРНК вводится в раствор и наносится на листья растений, цветочные почки, корни или семена. Экзогенные дсРНК захватываются и транспортируются в цитоплазму растений и патогенов с помощью не до конца понятного механизма. Молекулы дсРНК или hpРНК распознаются рибонуклеазой DICER (DCL), которая расщепляет длинные дсРНК на короткие интерферирующие РНК. Последние затем включаются в РНК-индуцированный комплекс сайленсинга (RISC), который направляет специфическую деградацию или трансляционную репрессию мРНК патогена. Стрелки показывают различные шаги процесса индукции коротких интерферирующих РНК и движения РНК между клетками растений и фитопатогенов

этот размер составляет более 200–300 нуклеотидов [28]. В целом, считается, что существует необходимость в скрининге нескольких видов дсРНК разной длины и локализации для каждого конкретного гена. Кроме того, дсРНК может быть как очень специфичной для гена-мишени конкретного вида патогена, так и рассчитанной на более широкий спектр близкородственных видов [69, 71, 72].

Эффективность индукции РНК-интерференции экзогенными дсРНК зависит также от их оптимальной (достаточно высокой) концентрации, что в условиях практического применения требует получения больших количеств дсРНК [73–75]. В экспериментах по РНК-интерференции дсРНК получали *in vitro* с использованием метода двунаправленной транскрипции с помощью T7-полимеразы [76, 77]. Однако очевидно, что такая система не подходит для крупномасштабного производства по экономическим соображениям. Поэтому предложено использовать индуцибельную кассету с промотором РНК-полимеразы фага T7, экспрессирующую дсРНК в штаммах *Escherichia coli* HT115, M-JM109 или M-JM109lacY, дефектные по РНКазе III [78–81]. Кроме того, не-

давно были разработаны стабильные и эффективные системы производства дсРНК в бактериях *Pseudomonas syringae* [82] и дрожжах *Saccharomyces cerevisiae* [83]. Очевидно, что перечисленные микробиологические системы экспрессии потенциально могут использоваться для масштабного и недорогого получения дсРНК для практического применения SIGS в сельском хозяйстве.

За последние годы показано, что система SIGS может эффективно использоваться для борьбы с фитопатогенными грибами растений. Обнаружено, что нанесение на поверхность листьев дсРНК, синтезированных *in vitro* и направленных против целого ряда генов грибов, ослабляет распространение инфекции путем блокирования роста, изменения морфологии и уменьшения патогенности и приводит к менее выраженным проявлениям болезни [67, 68, 84, 85]. Применение экзогенной дсРНК на поверхности растений, SIGS, в настоящее время рассматривается как инновационная стратегия защиты растений от грибной инфекции [28, 63, 64, 67]. Предполагается, что могут существовать два пути попадания в клетки гриба дсРНК, нанесенных на поверхность расте-

ния: (1) дсРНК после опрыскивания растений сразу проникают в клетки гриба и здесь подвергаются процессингу в siРНК; и (2) РНК попадают в клетки растений, где образуются короткие siРНК, которые транслоцируются в клетки гриба (рис. 2) [67, 68, 86]. Установлено, что эффект сайленсинга гена *Myo5* в *Fusarium asiaticum* сохраняется только в том случае, если дсРНК непрерывно поступает в клетки гриба, так как *F. asiaticum* не способен поддерживать амплификацию вторичных siРНК. Результаты Song и соавт. [86] указывают, что попавшие в растения дсРНК процессируются с образованием siРНК, которые затем амплифицируются растительной РНК-зависимой РНК-полимеразой (RdRP), приводя к образованию вторичных siРНК. Интересно, что согласно [86], дсРНК более эффективно поглощаются через раневую поверхность кончика среза колеоптилей пшеницы, чем через неповрежденную поверхность. Кроме того, проникновение дсРНК усиливалось с помощью неионного поверхностно-активного вещества Silwet L-77 [84].

Многочисленные исследования, проведенные за последние несколько лет, показали, что дсРНК, комплементарные ряду важных генов насекомых-вредителей, могут стать эффективным индуктором SIGS и привести к снижению численности насекомых, скорости их роста и плодовитости, а также к снижению чувствительности к инсектицидам [87]. Обработка листьев искусственно синтезированными дсРНК, нацеленными на гены, связанные с развитием насекомых, ухудшает рост насекомых и значительно снижает их численность [88–92]. Такой эффект может быть достигнут путем орошения корней растений дсРНК, что приводит к эффективному подавлению гена-мишени и аномальному развитию насекомых-вредителей [74, 76, 93]. РНК-интерференция с помощью экзогенных дсРНК может применяться для весьма широкого спектра генов насекомых. Например, подавление экспрессии генов двух АТФ-аз у *Diabrotica undecimpunctata* и *Leptinotarsa decemlineata* приводило к снижению выживаемости насекомых на 40–50% [76]. Смертность капустной моли (*Plutella xylostella*) на листьях, опрысканных дсРНК к генам ацетилхолинэстеразы *Pl. xylostella*, – *AChE1* и *AChE2* – достигала 74 и 89% соответственно [94]. Кроме того, SIGS к генам кислой О-метилтрансферазы ювенильного гормона (juvenile hormone acid O-methyltransferase, JHAMT) и вителлогенина существенно снижал уровень этих белков (до 85–90%) у ряда таксономически далеких насекомых [95].

Тонкие механизмы проникновения дсРНК из растений в клетки вредителей в настоящее время

не до конца ясны. Очевидно, что дсРНК прямо проникает в гифы грибов из растительных клеток и межклетников. Менее понятны механизмы действия дсРНК на нематод и насекомых. Естественным является путь первичного проникновения РНК из поглощаемого сока растений в клетки пищеварительного тракта. При этом важную роль играет, возможно, эндоцитоз. Так, у нематод найдены два гена, требуемых для эффективного проникновения дсРНК при питании. Их назвали *Systemic RNAi-deficient (SID)* [64, 67]. Ген *SID-2* кодирует трансмембранный белок, участвующий в достаточно медленном поглощении дсРНК путем эндоцитоза, тогда как продукт гена *SID-1* необходим для быстрого транспорта, не требующего эндоцитоза, и формирует каналы в плазматической мембране [64, 67].

Влияние экзогенного применения дсРНК на сопротивляемость различных видов, включая растения табака, томата и кукурузы, а также папайи и орхидеи, к вирусам проанализировано в ряде экспериментальных исследований. При этом растения обрабатывали либо РНК, синтезированной *in vitro*, либо препаратами нуклеиновых кислот, очищенными из штаммов бактерий, экспрессирующих дсРНК или hrРНК [79, 80, 96, 97]. Оказалось, что дсРНК, нацеленная на гены репликазы вируса или белка оболочки, задерживает развитие заболевания, уменьшает симптомы инфекции и количество зараженных растений, снижает титр вируса [28, 65]. Кроме того, подтверждено, что защитные эффекты, индуцированные дсРНК или hrРНК, сохраняются не менее 20–70 дней после инокуляции вируса [72, 98].

В заключение следует отметить, что SIGS – это весьма целенаправленная и экологически чистая стратегия защиты растений как после, так и до сбора урожая и, очевидно, наименее вредная для здоровья потребителей. Кроме того, поскольку для SIGS часто выбирают консервативные гены патогена, необходимые для его роста или вирулентности, то патогены не в состоянии генерировать достаточное число мутаций в этих важных генах, чтобы избежать воздействия SIGS, сохраняя при этом свои жизненно важные функции. Наконец, необходимо еще раз подчеркнуть, что технология SIGS будет гораздо более приемлема для общественного мнения, чем, например, химические обработки, а ее разработка потребует существенно меньше времени, чем создание стабильных трансгенных культур. ●

Настоящий обзор подготовлен в рамках проекта ООО «МЛ «Резистом», финансируемого в соответствии с Соглашением о предоставлении гранта Фонда «Сколково» № Г18/19 от 26.04.19.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Baulcombe D. // *Nature*. 2004. V. 431. P. 356–363.
2. Baulcombe D. // *Plant Cell*. 2019. V. 3. P. 1395–1396.
3. Izant J.G., Weintraub H. // *Cell*. 1984. V. 36. P. 1007–1015.
4. Graessmann M., Michaels G., Berg B., Graessmann A. // *Nucl. Acids Res.* 1991. V. 19. P. 53–58.
5. Pepin M.C., Barden N. // *Mol. Cell. Biol.* 1991. V. 11. P. 1647–1653.
6. Guo S., Kempthues K.J. // *Cell*. 1995. V. 81. P. 611–620.
7. Tabara H., Grishok A., Mello C.C. // *Science*. 1998. V. 282. № 5388. P. 430–431.
8. Fire A., Xu S., Montgomery M.K., Kostas S.A., Driver S.E., Mello C.C. // *Nature*. 1998. V. 391. № 6669. P. 806–811.
9. Timmons L., Fire A. // *Nature*. 1998. V. 395. № 6705. P. 854.
10. Jorgensen R. // *Trends Biotechnol.* 1990. V. 8. P. 340–344.
11. Grierson D., Fray R.G., Hamilton A.J., Smith C.J.S., Watson C.F. // *Trends Biotechnol.* 1991. V. 9. P. 122–123.
12. Romano N., Macino G. // *Mol. Microbiol.* 1992. V. 6. P. 3343–3353.
13. Lindbo J.A., Silva-Rosales L., Proebsting W.M., Dougherty W.G. // *Plant Cell*. 1993. V. 5. P. 1749–1759.
14. Baulcombe D. // *Science*. 2000. V. 290. № 5494. P. 1108–1109.
15. Matzke M.A., Matzke A.J., Pruss G.J., Vance V.B. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2001. V. 11. P. 221–227.
16. Axtell M.J. // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2013. V. 64. P. 137–159.
17. Melnyk C.W., Molnar A., Baulcombe D.C. // *EMBO J.* 2011. V. 30. P. 3553–3563.
18. Lough T.J., Lucas W.J. // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2006. V. 57. P. 203–232.
19. Voinnet O., Vain P., Angell S., Baulcombe D.C. // *Cell*. 1998. V. 95. P. 177–187.
20. Yoo B.C., Kragler F., Varkonyi-Gasic E., Haywood V., Archer-Evans S., Lee Y.M., Lough T.J., Lucas W.J. // *Plant Cell*. 2004. V. 16. P. 1979–2000.
21. Buhtz A., Springer F., Chappell L., Baulcombe D.C., Kehr J. // *Plant J.* 2008. V. 53. P. 739–749.
22. Palauqui J.C., Elmayan T., Pollien J.M., Vaucheret H. // *EMBO J.* 1997. V. 16. P. 4738–4745.
23. Schwach F., Vaistij F.E., Jones L., Baulcombe D.C. // *Plant Physiol.* 2005. V. 138. P. 1842–1852.
24. Molnar A., Melnyk C.W., Bassett A., Hardcastle T.J., Dunn R., Baulcombe D.C. // *Science*. 2010. V. 328. № 5980. P. 872–875.
25. Hamilton A., Voinnet O., Chappell L., Baulcombe D. // *EMBO J.* 2002. V. 21. P. 4671–4679.
26. Dunoyer P., Schott G., Himber C., Meyer D., Takeda A., Carrington J.C., Voinnet O. // *Science*. 2010. V. 328. № 5980. P. 912–916.
27. Mat Jalaluddin N.S., Othman R.Y., Harikrishna J.A. // *Crit. Rev. Biotechnol.* 2019. V. 39. P. 67–78.
28. Dubrovina A.S., Kiselev K.V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 9. E2282.
29. Koch A., Kogel K.H. // *Plant Biotechnol. J.* 2014. V. 12. P. 821–831.
30. Kamthan A., Chaudhuri A., Kamthan M., Datta A. // *Front. Plant Sci.* 2015. V. 6. P. 208. doi: 10.3389/fpls.2015.00208.
31. Smith E.J., Marié I., Prakash A., García-Sastre A., Levy D.E. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. P. 8951–8957.
32. Wesley S.V., Helliwell C.A., Smith N.A., Wang M.B., Rouse D.T., Liu Q., Gooding P.S., Singh S.P., Abbott D., Stoutjesdijk P.A., et al. // *Plant J.* 2001. V. 27. P. 581–590.
33. Zeng J., Gupta V.K., Jiang Y., Yang B., Gong L., Zhu H. // *Cells*. 2019. V. 8. № 4. E371. doi: 10.3390/cells8040371.
34. Nunes C.C., Dean R.A. // *Mol. Plant Pathol.* 2012. V. 13. P. 519–529.
35. Tinoco M.L., Dias B.B., Dall'Asta R.C., Pamphile J.A., Aragão F.J. // *BMC Biol.* 2010. V. 8. P. 27. doi: 10.1186/1741-7007-8-27.
36. Panwar V., McCallum B., Bakkeren G. // *Plant J.* 2013. V. 73. P. 521–532.
37. Nowara D., Gay A., Lacomme C., Shaw J., Ridout C., Douchkov D., Hensel G., Kumlehn J., Schweizer P. // *Plant Cell*. 2010. V. 22. P. 3130–3141.
38. Jiang C.J., Shimono M., Maeda S., Inoue H., Mori M., Hasegawa M., Sugano S., Takatsuji H. // *Mol. Plant Microbe Interact.* 2009. V. 22. P. 820–829.
39. Yara A., Yaeno T., Hasegawa M., Seto H., Montillet J.L., Kusumi K., Seo S., Iba K. // *Plant Cell Physiol.* 2007. V. 48. P. 1263–1274.
40. Peltier A.J., Hatfield R.D., Grau C.R. // *Plant Dis.* 2009. V. 93. P. 149–154.
41. Zhang M., Wang Q., Xu K., Meng Y., Quan J., Shan W. // *PLoS One*. 2011. V. 6. e28114. doi: 10.1371/journal.pone.0028114.
42. Hernández I., Chacón O., Rodríguez R., Portieles R., López Y., Pujol M., Borrás-Hidalgo O. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2009. V. 387. P. 300–304.
43. Lilley C.J., Davies L.J., Urwin P.E. // *Parasitology*. 2012. V. 139. P. 630–640.
44. Youssef R.M., Kim K.H., Haroon S.A., Matthews B.F. // *Exp. Parasitol.* 2013. V. 134. P. 266–274.
45. Gheysen G., Vanholme B. // *Trends Biotechnol.* 2007. V. 25. P. 89–92.
46. Ibrahim H.M., Hosseini P., Alkharouf N.W., Hussein E.H., Gamal El-Din Ael K., Aly M.A., Matthews B.F. // *BMC Genomics*. 2011. V. 12. P. 220. doi: 10.1186/1471-2164-12-220.
47. Papolu P.K., Gantasala N.P., Kamaraju D., Banakar P., Sreevathsa R., Rao U. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 11. e80603. doi: 10.1371/journal.pone.0080603.
48. Huang G., Allen R., Davis E.L., Baum T.J., Hussey R.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 39. P. 14302–14306.
49. Dutta T.K., Banakar P., Rao U. // *Front. Microbiol.* 2015. V. 5. P. 760. doi: 10.3389/fmicb.2014.00760.
50. Sindhu A.S., Maier T.R., Mitchum M.G., Hussey R.S., Davis E.L., Baum T.J. // *J. Exp. Bot.* 2009. V. 60. P. 315–324.
51. Price D.R., Gatehouse J.A. // *Trends Biotechnol.* 2008. V. 26. P. 393–400.
52. Zhang H., Li H.C., Miao X.X. // *Insect Sci.* 2013. V. 20. P. 15–30.
53. Huvenne H., Smagghe G. // *J. Insect Physiol.* 2010. V. 56. P. 227–235.
54. Mao Y.B., Cai W.J., Wang J.W., Hong G.J., Tao X.Y., Wang L.J., Huang Y.P., Chen X.Y. // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. P. 1307–1313.
55. Mao Y.B., Tao X.Y., Xue X.Y., Wang L.J., Chen X.Y. // *Transgenic Res.* 2011. V. 20. P. 665–673.
56. Mao Y.B., Xue X.Y., Tao X.Y., Yang C.Q., Wang L.J., Chen X.Y. // *Plant Mol. Biol.* 2013. V. 83. P. 119–129.
57. Tao S., Zhu L., Lee P., Lee W.M., Knox K., Chen J., Di Y.P., Chen Y. // *Am. J. Respir. Cell Mol. Biol.* 2012. V. 46. P. 660–667.
58. Astwood J.D., Fuchs R.L. // *Monogr. Allergy*. 1996. V. 32. P. 105–120.
59. Bawa A.S., Anilakumar K.R. // *J. Food Sci. Technol.* 2013. V. 50. P. 1035–1046.
60. Kalinina N.O., Khromov A., Love A.J., Taliansky M. // *Phytopathology*. V. 110. № 1. P. 18–28. <https://doi.org/10.1094/PHYTO-07-19-0267-IA>.
61. Timmons L., Court D.L., Fire A. // *Gene*. 2001. V. 263. P. 103–112.
62. Ghosh S.K., Hunter W.B., Park A.L., Gundersen-Rindal D.E. // *PLoS One*. 2017. V. 12. e0171861. doi: 10.1371/journal.pone.0171861.

63. Wang M., Jin H. // *Trends Microbiol.* 2017. V. 25. P. 4–6.
64. Wang M., Yu F., Wu W., Zhang Y., Chang W., Ponnusamy M., Wang K., Li P. // *Int. J. Biol. Sci.* 2017. V. 13. P. 1497–1506.
65. Gaffar F.Y., Koch A. // *Viruses.* 2019. V. 11. E673. doi: 10.3390/v11070673.
66. Cai Q., Qiao L., Wang M., He B., Lin F.M., Palmquist J., Huang S.D., Jin H. // *Science.* 2018. V. 360. № 6393. P. 1126–1129.
67. Wang C., Wu J., Zhu X., Chen J. // *Virus Genes.* 2016. V. 52. P. 823–827.
68. Koch A., Biedenkopf D., Furch A., Weber L., Rossbach O., Abdellatef E., Linicus L., Johannsmeier J., Jelonek L., Goesmann A., et al. // *PLoS Pathog.* 2016. V. 12. e1005901. doi: 10.1371/journal.ppat.1005901.
69. Mitter N., Worrall E.A., Robinson K.E., Li P., Jain R.G., Taochy C., Fletcher S.J., Carroll B.J., Lu G.Q., Xu Z.P. // *Nat. Plants.* 2017. V. 3. 16207. doi: 10.1038/nplants.2016.207.
70. Kanasty R., Dorkin J.R., Vegas A., Anderson D. // *Nat. Mater.* 2013. V. 12. P. 967–977.
71. Zotti M., Dos Santos E.A., Cagliari D., Christiaens O., Taning C.N.T., Smaghe G. // *Pest Manag. Sci.* 2018. V. 74. P. 1239–1250.
72. Mitter N., Worrall E.A., Robinson K.E., Xu Z.P., Carroll B.J. // *Curr. Opin. Virol.* 2017. V. 26. P. 49–55.
73. Bolognesi R., Ramaseshadri P., Anderson J., Bachman P., Clinton W., Flannagan R., Ilagan O., Lawrence C., Levine S., Moar W., et al. // *PLoS One.* 2012. V. 7. e47534. doi: 10.1371/journal.pone.0047534.
74. Li K.L., Wan P.J., Wang W.X., Lai F.X., Fu Q. // *PLoS One.* 2015. V. 10. e0142142. doi: 10.1371/journal.pone.0142142.
75. Zhang X., Mysore K., Flannery E., Michel K., Severson D.W., Zhu K.Y., Duman-Scheel M. // *J. Vis. Exp.* 2015. V. 97. doi: 10.3791/52523.
76. Baum J., Bogaert T., Clinton W., Heck G.R., Feldmann P., Ilagan O., Johnson S., Plaetinck G., Munyikwa T., Pleau M., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2007. V. 25. P. 1322–1326.
77. Konakalla N.C., Kaldis A., Berbati M., Masarapu H., Voloudakis A.E. // *Planta.* 2016. V. 244. P. 961–969.
78. Tian H., Peng H., Yao Q., Chen H., Xie Q., Tang B., Zhang W. // *PLoS One.* 2009. V. 4. e6225. doi: 10.1371/journal.pone.0006225.
79. Gan D., Zhang J., Jiang H., Jiang T., Zhu S., Cheng B. // *Plant Cell Rep.* 2010. V. 29. P. 1261–1268.
80. Yin G., Sun Z., Liu N., Zhang L., Song Y., Zhu C., Wen F. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2009. V. 84. P. 323–333.
81. Yin G.H., Sun Z.N., Song Y.Z., An H.L., Zhu C.X., Wen F.J. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2010. V. 162. P. 1901–1914.
82. Niehl A., Soininen M., Poranen M.M., Heinlein M. // *Plant Biotechnol. J.* 2018. doi: 10.1111/pbi.12904.
83. Zhong C., Smith N.A., Zhang D., Goodfellow S., Zhang R., Shan W., Wang M.B. // *Genes (Basel).* 2019. V. 10. E458. doi: 10.3390/genes10060458.
84. McLoughlin A.G., Wytinck N., Walker P.L., Girard I.J., Rashid K.Y., de Kievit T., Fernando W.G.D., Whyard S., Belmonte M.F. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. 7320. doi: 10.1038/s41598-018-25434-4.
85. Gu K.X., Song X.S., Xiao X.M., Duan X.X., Wang J.X., Duan Y.B., Hou Y.P., Zhou M.G. // *Pestic. Biochem. Physiol.* 2019. V. 153. P. 36–46.
86. Song X.S., Gu K.X., Duan X.X., Xiao X.M., Hou Y.P., Duan Y.B., Wang J.X., Zhou M.G. // *Pestic. Biochem. Physiol.* 2018. V. 150. P. 1–9.
87. Mamta B., Rajam M.V. // *Physiol. Mol. Biol. Plants.* 2017. V. 23. P. 487–501.
88. Dubelman S., Fischer J., Zapata F., Huizinga K., Jiang C., Uffman J., Levine S., Carson D. // *PLoS One.* 2014. V. 9. e93155. doi: 10.1371/journal.pone.0093155.
89. San Miguel K., Scott J.G. // *Pest. Manag. Sci.* 2016. V. 72. P. 801–809.
90. Gogoi A., Sarmah N., Kaldis A., Perdakis D., Voloudakis A. // *Planta.* 2017. V. 246. P. 1233–1241.
91. Parker K.M., Barragán Borrero V., van Leeuwen D.M., Lever M.A., Mateescu B., Sander M. // *Environ. Sci. Technol.* 2019. V. 53. P. 3027–3036.
92. Fischer J.R., Zapata F., Dubelman S., Mueller G.M., Uffman J.P., Jiang C., Jensen P.D., Levine S.L. // *Environ. Toxicol. Chem.* 2017. V. 36. P. 727–734.
93. Faustinelli P.C., Power I.L., Arias R.S. // *Plant Biol. (Stuttg.)* 2018. V. 20. P. 444–449.
94. Gong L., Chen Y., Hu Z., Hu M. // *PLoS One.* 2013. V. 8. e62990. doi: 10.1371/journal.pone.0062990.
95. Ghosh S.K.B., Hunter W.B., Park A.L., Gundersen-Rindal D.E. // *J. Vis. Exp.* 2018. V. 4. doi: 10.3791/57390.
96. Tenllado F., Martínez-García B., Vargas M., Díaz-Ruiz J.R. // *BMC Biotechnol.* 2003. V. 3. P. 3–10.
97. Jiang L., Ding L., He B., Shen J., Xu Z., Yin M., Zhang X. // *Nanoscale.* 2014. V. 6. P. 9965–9969.
98. Dubrovina A.S., Aleynova O.A., Kalachev A.V., Suprun A.R., Ogneva Z.V., Kiselev K.V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. E1585. doi: 10.3390/ijms20071585.

УДК 571.27

Ненейтрализующие антитела к консервативным антигенам вируса гриппа

Е. С. Седова*, Д. Н. Щербинин, А. А. Лысенко, С. В. Алексеева, Э. А. Артемова, М. М. Шмаров

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

*E-mail: sedova-es@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.07.2019

Принята к печати 21.09.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-22-32

РЕФЕРАТ На сегодняшний день актуальной остается разработка новых противогриппозных вакцин широкого спектра действия, которые позволят избежать ежегодного изменения штаммового состава вакцины. Создание новых вакцин на основе высококонсервативных белков вируса гриппа позволит подготовиться к возможным пандемиям и существенно снизить наносимый ими ущерб. Ключевым моментом в определении эффективности противогриппозных вакцин является оценка уровня гуморального ответа на вакцину. Для создания новых противогриппозных вакцин важно знать механизмы действия различных, в том числе ненейтрализующих, антител, а также иметь методы определения уровня таких антител после иммунизации. В данном обзоре рассмотрены такие механизмы противогриппозного действия, реализуемые ненейтрализующими антителами, как антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый фагоцитоз (АЗФ) и опосредованная антителом комплементзависимая цитотоксичность (АОКЗЦ). Запускают эти реакции такие антигены вируса гриппа, как гемагглютинин (НА) и нейраминидаза (NA), так и высококонсервативные антигены – ионный канал М2, матриксный белок М1 и нуклеопротеин NP. Кроме того, рассмотрены механизмы действия и способы обнаружения антител к стволовой части НА и NA вируса гриппа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА антителозависимая клеточная цитотоксичность, антителозависимый фагоцитоз, вакцины широкого спектра действия, вирус гриппа, опосредованная антителами комплементзависимая цитотоксичность.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АЗКЦ – антителозависимая клеточная цитотоксичность; АЗФ – антителозависимый фагоцитоз; АОКЗЦ – опосредованная антителом комплементзависимая цитотоксичность; НА – гемагглютинин; NA – нейраминидаза; NP – нуклеопротеин; NK – натуральные киллерные клетки; ITAM – тирозинсодержащий активационный мотив; ИФА – иммуноферментный анализ; IFN γ – интерферон-гамма; TNF α – фактор некроза опухоли альфа; ELLA – лектин-ферментный анализ.

ВВЕДЕНИЕ

Грипп – высококонтагиозная инфекция, вызывающая ежегодные эпидемии и через неравные промежутки времени – пандемии. По данным ВОЗ, ежегодно во всем мире гриппом заболевают 20–30% детей и от 5 до 10% взрослых, а от тяжелых осложнений, вызванных гриппозной инфекцией, умирают от 250 до 500 тыс. человек. При пандемиях масштабы ущерба и смертность значительно возрастают. Например, от пандемии гриппа в 1918–1919 годах умерли, по разным данным, от 50 до 100 млн человек [1].

Важнейшей мерой защиты от гриппозной инфекции и ограничения ее распространения является вакцинопрофилактика. Современные гриппозные вакцины, как правило, индуцируют образование антител к поверхностным антигенам НА и NA вируса гриппа. Поверхностные белки вируса гриппа подвергаются постоянному антигенному дрейфу, поэтому необходимо ежегодное обновление штаммового состава вакцин [2].

На сегодняшний день актуальна разработка новых противогриппозных вакцин широкого спектра дей-

ствия, которые позволят избежать ежегодного изменения штаммового состава вакцины. Кроме того, создание новых вакцин на основе высококонсервативных белков вируса гриппа позволит подготовиться к возможным пандемиям и существенно снизить наносимый ими ущерб.

Ключевым моментом оценки эффективности противогриппозных вакцин является определение уровня гуморального ответа на вакцину. Нейтрализующие антитела к глобулярному домену гемагглютинаина вырабатываются при вирусной инфекции, а также служат основой защитных механизмов всех применяемых на сегодняшний день противогриппозных вакцин [3]. Большинство вируснейтрализующих антител связываются с глобулярной частью НА, блокируют связывание НА с остатком сиаловой кислоты и предотвращают проникновение вируса в клетки (рис. 1, б). Именно эти антитела определяют в классических реакциях торможения гемагглютинации и нейтрализации [4–6]. Кроме того, многие антитела к глобулярной части НА также способны блокировать выход вируса из клетки (рис. 1, г). Этот механизм защиты невозможно оценить в классических реакциях торможения гемагглютинации и нейтрализации, он обнаруживается при добавлении антител к клеткам, предварительно зараженным вирусом гриппа [7].

Антитела к различным консервативным антигенам вируса гриппа (таким, как NP, M1, M2) обычно не являются нейтрализующими и не могут предотвратить развитие вирусной инфекции, однако за счет различных иммунных механизмов они способны выполнять защитную функцию. Таким образом, при создании новых противогриппозных вакцин широкого спектра действия актуальными становятся изучение механизмов действия различных, в том числе ненейтрализующих, антител, а также разработка методов оценки уровня таких антител после иммунизации новыми противогриппозными вакцинами.

АНТИТЕЛА К КОНСЕРВАТИВНЫМ АНТИГЕНАМ ВИРУСА ГРИППА, УЧАСТВУЮЩИЕ В РЕАКЦИЯХ АНТИТЕЛОЗАВИСИМОЙ КЛЕТОЧНОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ, АНТИТЕЛОЗАВИСИМОГО ФАГОЦИТОЗА И КОМПЛЕМЕНТЗАВИСИМОЙ ЦИТОТОКСИЧНОСТИ, ОПОСРЕДОВАННОЙ АНТИТЕЛАМИ

Способность антител нейтрализовать вирус гриппа традиционно считалась важнейшим механизмом противогриппозной защиты. Однако исследования последних лет показали важность и других опосредованных антителами эффектов, которые также вносят свой вклад в защиту от вируса [3]. Существуют следующие механизмы противогриппозного дей-

ствия, реализуемые ненейтрализующими антителами: антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ), антителозависимый фагоцитоз (АЗФ) и комплементзависимая цитотоксичность, опосредованная антителами (АОКЗЦ) [8]. Антигенами вируса гриппа, запускающими эти реакции, являются как НА и NA, так и такие высококонсервативные антигены, как ионный канал M2, матриксный белок M1 и нуклеопротеин NP.

В отличие от нейтрализующих антител, функции которых осуществляются с помощью переменных участков, эффект ненейтрализующих антител зависит от консервативного Fc-региона. Fc-регион способен взаимодействовать с различными компонентами иммунной системы, в то время как переменная часть антитела связана с антигеном. Для осуществления эффекторных функций ненейтрализующих антител наиболее значимы изотипы антител IgG и IgM, при этом наиболее высоким функциональным потенциалом обладает IgG3 [9].

Ненейтрализующие антитела могут связываться своим Fc-регионом со специфическими Fc-рецепторами, экспонированными на поверхности большинства типов иммунных клеток, включая NK-клетки, макрофаги и нейтрофилы (рис. 1, е). После связывания с антителами эти иммунные клетки активируются и включаются в борьбу с патогеном. Описаны шесть различных рецепторов, вовлеченных в активацию (FcγRI, IIA, IIC, IIIA и IIIV) или ингибирование (FcγRIIB1/B2) иммунных клеток человека. Нейтрализующие антитела могут также активировать систему комплемента (рис. 1, ж) [9].

Антителозависимая клеточная цитотоксичность (АЗКЦ)

Клетки, инфицированные вирусом гриппа, несут на своей поверхности вирусные белки, в основном НА и NA, так как новые вирионы образуются путем отпочковывания от клеточной мембраны. Противогриппозные IgG могут связывать вирусные белки на поверхности клеток, опсонизируя таким образом инфицированные клетки. Рецептор IIIa Fc-гамма (FcγRIIIa), экспонированный на поверхности многих клеток врожденного иммунного ответа, таких, как NK-клетки, моноциты и макрофаги, связывается с Fc-регионом IgG. В результате взаимодействия FcγRIIIa с IgG, связанным с инфицированной клеткой, происходят фосфорилирование тирозинсодержащего активационного мотива (ITAM) и активация Ca²⁺-зависимого сигнального пути. В результате NK-клетки начинают вырабатывать цитотоксические факторы (перфорины и гранзимы), приводящие к смерти инфицированной клетки, и противовирусные цитокины (IFNγ, TNFα) и хемокины (рис. 2) [10].

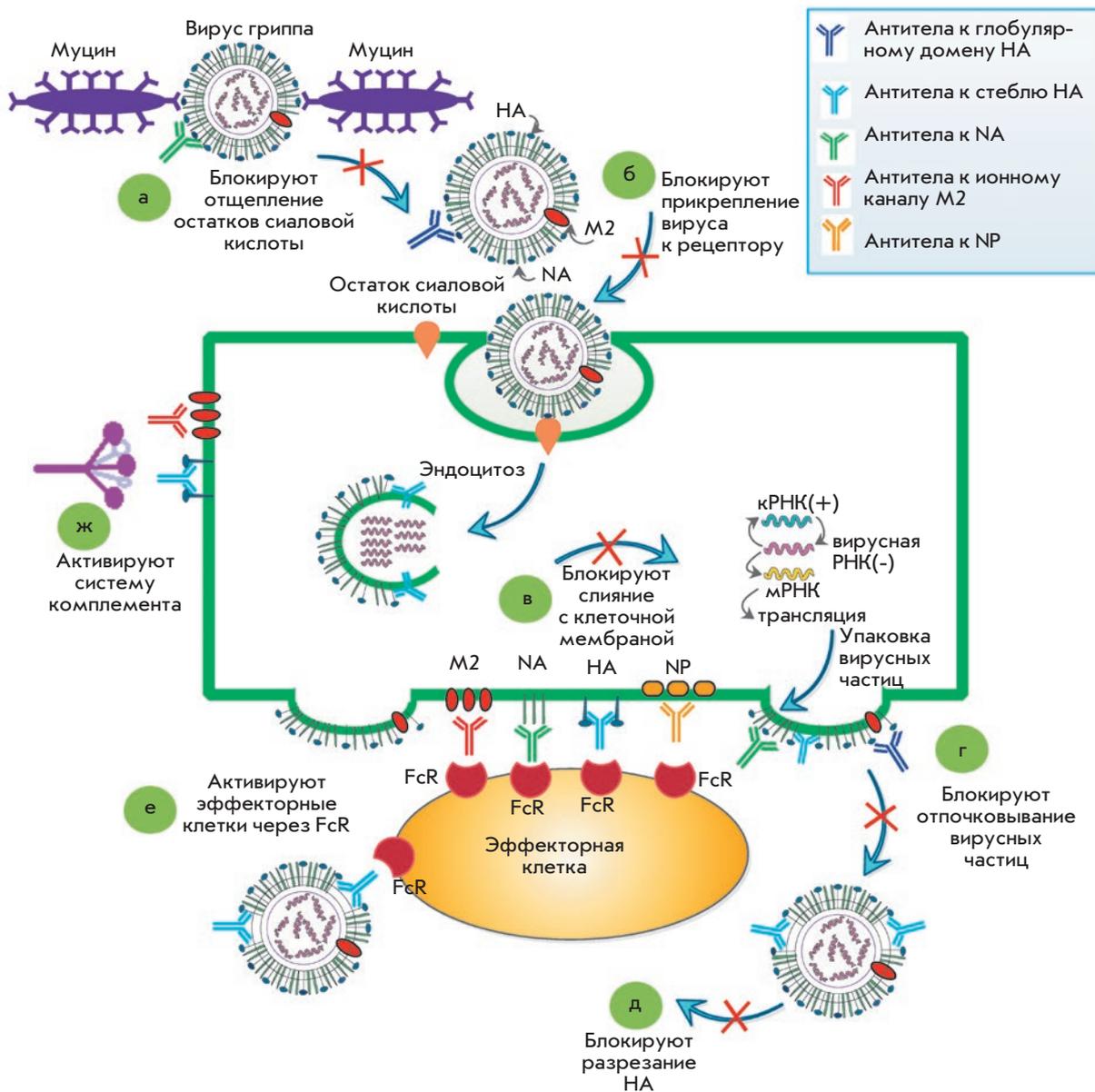


Рис. 1. Механизмы действия противогриппозных антител. Вироз гриппа попадает в организм через слизистые оболочки дыхательных путей, где он с помощью HA связывается с концевыми остатками сиаловых кислот муцина. NA высвобождает вирус, отщепляя концевые остатки сиаловой кислоты. Антитела к NA не позволяют вирусу преодолеть слизистый слой (а). После проникновения через слизистую вирус гриппа связывается с сиаловыми кислотами на поверхности клеток-мишеней и проникает в клетку путем эндоцитоза. Вируснейтрализующие антитела к HA вируса гриппа блокируют этот процесс (б). Эндосомы клеток-мишеней закисляются, запуская слияние эндосомальной и вирусной мембраны с помощью HA и высвобождение вирусного генома. Антитела к стволу HA могут блокировать этот процесс (в). После синтеза вирусных белков происходит упаковка внутренних белков в вирусные частицы с HA, NA и ионным каналом M2 вируса на поверхности. На клеточной поверхности HA, NA и M2 могут связываться с антителами, блокирующими отпочковывание вирусных частиц. Созревающие вирусные частицы одеваются в мембрану клетки-хозяина в результате взаимодействия HA и сиаловых кислот. При этом NA отрезает вирус от концевых сиаловых кислот, а антитела к NA блокируют этот процесс (г). В конце концов в созревших вирусных частицах HA разрезается на субъединицы HA1 и HA2 хозяйскими протеазами, которые присутствуют в дыхательных путях. Антитела к стволу HA могут блокировать этот процесс (д). Кроме того, представленные на поверхности инфицированной клетки вирусные антигены (в число которых входит внутренний белок NP, который детектируется на поверхности инфицированной клетки) служат мишенью для антител, активирующих эффекторные клетки через Fc-FcR-взаимодействие (е). Антитела к представленным на поверхности клетки вирусным антигенам могут также активировать систему комплемента (ж)

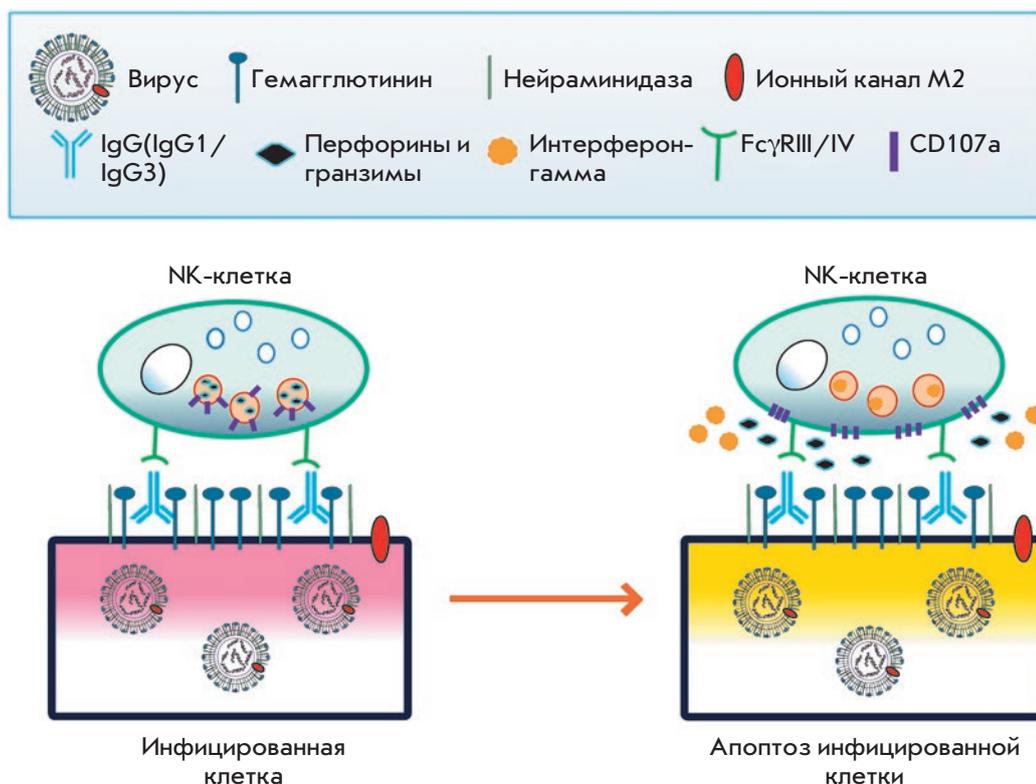


Рис. 2. Механизм АЗКЦ в клетке, зараженной вирусом гриппа. IgG взаимодействует с вирусными антигенами на поверхности инфицированной клетки. NK-клетки связываются с инфицированными клетками за счет Fc-FcR-взаимодействия, высвобождают цитотоксические гранулы и экспрессируют противовирусные цитокины

Одной из основных мишеней для антител, участвующих в АЗКЦ, является консервативный стебель НА, одного из наиболее представленных поверхностных белков вируса гриппа. Так, показано, что антитела широкого спектра действия к консервативному стеблю НА защищают мышей от летальной гриппозной инфекции через механизм, который включает взаимодействие Fc-FcγR. Напротив, протективность антител к вариабельному глобулярному домену НА проявлялась как в присутствии, так и в отсутствие взаимодействия с FcγR [11].

Так, повторное заражение макак вирусом гриппа приводило к быстрому появлению АЗКЦ-реакций. В бронхоальвеолярных лаважах животных были найдены антитела, способные индуцировать активацию NK-клеток, что коррелировало со сниженным выделением вируса и уменьшением длительности заболевания [12]. У людей высокие титры антител, способных участвовать в АЗКЦ, также коррелировали со снижением заболеваемости при экспериментальном инфицировании [13]. Кроме того, пожилые люди, перенесшие ранее грипп, вызванный вирусами, близкими к штамму, вызвавшему в 2009 году пандемию «свиного гриппа», и сохранившие значимые титры антител, способных участвовать в АЗКЦ, но не имеющие вируснейтрализующих антител, были защищены от пандемического вируса гриппа. Таким образом,

ненейтрализующие антитела к стеблю НА, способные индуцировать АЗКЦ, напрямую связаны с уровнем защиты от вируса гриппа [14]. При этом, согласно опубликованным данным, вакцины от сезонных вирусов гриппа слабо индуцируют появление антител, способных участвовать в АЗКЦ. А присутствие активирующих NK-клетки антител широкого спектра действия у пожилых людей позволяет предположить, что эти антитела накапливаются в течение жизни в результате многократного заражения различными вирусами гриппа [15].

С использованием панели из 13 антител к НА вируса гриппа (как нейтрализующих, так и ненейтрализующих как к стволовой, так и к глобулярной части НА) DiLillo и соавт. [16] показали, что для обеспечения защиты *in vivo* всем антителам широкого спектра действия требуются Fc-FcγR-взаимодействия. Аналогичный результат был получен при сравнении двух антител к НА, одно из которых обладало широким спектром действия, а другое было штаммоспецифичным. Это позволило предположить, что от Fc-FcγR-взаимодействия зависит широта спектра действия не только некоторых антител, специфичных к НА, но также антител к другим антигенам вируса гриппа, представленным на поверхности инфицированной клетки. Кроме того, зависимость от Fc-FcγR-взаимодействия некоторых

антител можно обойти путем значительного (в 8–10 раз) повышения количества антитела, участвующего во взаимодействии с вирусом гриппа. Стоит отметить, что при вирусной инфекции антитела широкого спектра действия генерируются в гораздо меньших количествах, чем штаммоспецифические. Таким образом, Fc-FcγR-взаимодействие, по-видимому, может увеличивать эффективность малочисленных антител широкого спектра, компенсируя тем самым их маленькое количество [16].

Антитела к консервативным вирусным белкам, например к нуклеопротеину NP, также вносят свой вклад в реакции АЗКЦ. Так, гриппозная инфекция и вакцинация индуцируют образование антител к NP, белкам M1 и M2, участвующим в АЗКЦ [17, 18]. Показано, что NP вируса гриппа некоторое время экспрессируется на поверхности инфицированных клеток и, следовательно, может служить целью для АЗКЦ [19–21]. Carragher и соавт. показали, что вакцинация лабораторных мышей рекомбинантным растворимым NP вируса гриппа А индуцирует высокие титры антител к NP и крайне слабый Т-клеточный ответ. При этом вакцинация снижала проявление симптомов заболевания и уменьшала титры вируса гриппа в легких животных после заражения гриппозной инфекцией. Пассивный перенос сывороток иммунизированных мышей наивным животным также обеспечивал защиту от заражения вирусом гриппа [22]. Последующие исследования показали, что протективные свойства сыворотки мышей, иммунизированных рекомбинантным NP вируса гриппа А, при пассивном переносе как животным с дефицитом В-клеток, так и мышам с нормальным количеством В-клеток проявляются через механизм, включающий FcγR [23]. Исследования на макаках показали, что анти-NP-антитела обладают способностью активировать NK-клетки *in vitro* [18, 24].

Сыворотки крови здоровых детей и взрослых (но не младенцев) содержат антитела к различным белкам вируса гриппа А H7N9, участвующие в реакциях АЗКЦ, причем уровень антител к NP был значительно выше, чем к HA и NA. Уровни участвующих в АЗКЦ антител к NP сезонных вирусов гриппа А коррелировали с уровнем антител к NP вируса гриппа А H7N9, поэтому предполагается, что образование этих перекрестно реагирующих с H7N9 антител происходило в результате вакцинации и заболевания сезонными вирусами гриппа А [25]. Антитела к NP вируса гриппа А, участвующие в АЗКЦ, обнаружены у детей, вакцинированных сезонной инактивированной противогриппозной вакциной. У здоровых и инфицированных гриппом добровольцев выявлены антитела к NP, которые могут взаимодействовать с FcγRIIIa и активировать NK-клетки.

Сыворотки здоровых доноров, содержащие антитела против NP, индуцировали активацию NK-клеток, направленную против экспрессирующих NP вирус-инфицированных клеток [13, 26].

Другой консервативный белок вируса гриппа, обнаруживаемый на поверхности инфицированных клеток, это ионный канал M2. Антитела к этому белку способны в лабораторных экспериментах защищать мышей от вируса гриппа, причем при иммунизации животных эктодоменом ионного канала M2 как в растворимом виде, так и конъюгированных с различными носителями, протективность зависит главным образом от антител. Критически важным для защиты было присутствие NK-клеток [27]. Эксперименты по пассивной иммунизации мышей как дикого типа, так и с фенотипом FcRγ^{-/-}, FcγRI^{-/-}, FcγRIII^{-/-} и (FcγRI, FcγRIII)^{-/-} показали, что FcR (а именно FcγRIII) необходим для протективной активности анти-M2e-антител [28, 29]. Моноклональное антитело человека к белку M2 вируса гриппа (Ab1-10) было способно активировать NK-клетки и запускать АЗКЦ *in vitro*, причем АЗКЦ, направленную как на клетки-мишени, экспрессирующие M2, так и на клетки, зараженные вирусом гриппа [30].

Для детального определения уровня противогриппозных антител, участвующих в АЗКЦ, требуется постановка реакции с участием целевого антигена и эффекторных клеток (как правило, NK-клеток). В качестве антигена может выступать как рекомбинантный целевой белок, так и клетки, инфицированные вирусом гриппа, или клетки-мишени, экспрессирующие нужные антигены. Если в качестве антигена был выбран рекомбинантный белок, то его обрабатывают исследуемой сывороткой, а затем к полученному комплексу антиген-антитело добавляют эффекторные клетки. При таком способе постановки реакции судить о АЗКЦ можно по активации эффекторных клеток и экспрессии ими поверхностных и секретлируемых маркерных белков (как правило, это поверхностный маркер активации CD107a и интерферон-гамма) (рис. 3А) [31]. В случае использования в качестве антигенов инфицированных клеток или клеток-мишеней изучать АЗКЦ можно также путем оценки гибели обработанных антителами клеток-мишеней после взаимодействия с эффекторными клетками (рис. 3Б) [32].

Антителозависимый фагоцитоз (АЗФ)

Фагоцитоз – это важнейший иммунологический процесс, при котором фагоциты поглощают микробные и инфицированные клетки. Первым шагом АЗФ является опсонизация микробной или инфицированной клетки антителами. После опсонизации фагоциты узнают связанные с чужеродными антигенами анти-

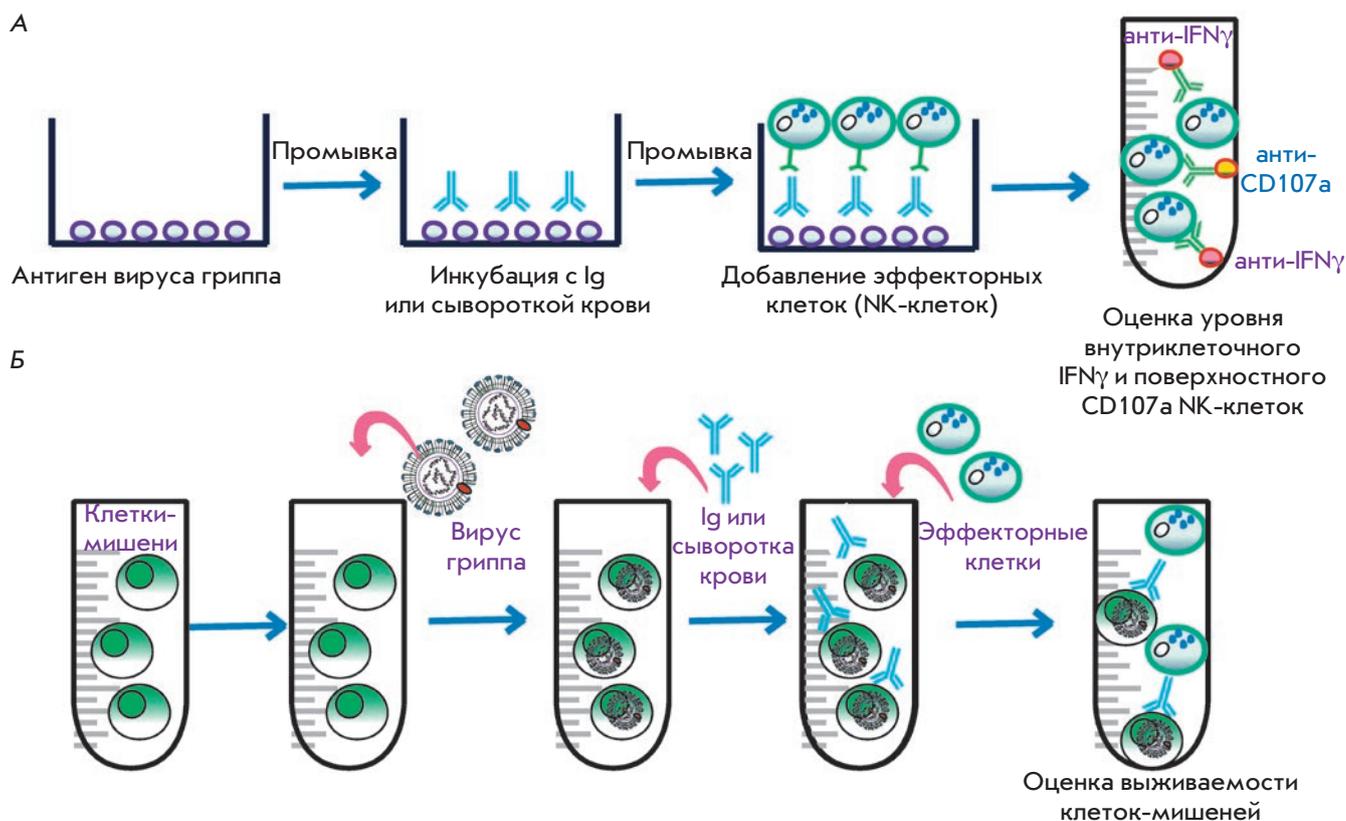


Рис. 3. Оценка АЗКЦ в лабораторных условиях. А – оценка АЗКЦ с помощью сорбированных на планшете антигенов вируса гриппа. Антигены сорбируются на планшете и после промывки инкубируются с сывороткой крови или с IgG, очищенными из крови. Несвязавшиеся IgG отмывают и к комплексу антиген–антитело добавляют эффекторные клетки (моноциты периферической крови или очищенные NK-клетки). АЗКЦ оценивают после отмывки по активации эффекторных клеток. Активацию определяют, добавляя меченые антитела к поверхностным и секретируемым маркерным белкам (как правило, это поверхностный маркер активации CD107a и интерферон-гамма). Б – оценка АЗКЦ с помощью инфицированных вирусом гриппа клеток или клеток-мишеней, экспрессирующих целевые антигены вируса. Клетки, экспрессирующие целевые антигены, инкубируют с сывороткой крови или с IgG. Затем к обработанным антителами клеткам добавляют эффекторные клетки и изучают АЗКЦ путем оценки гибели обработанных антителами клеток-мишеней

тела, главным образом с помощью Fcγ-рецепторов CD32 (FcγRIIA) и CD64 (FcγRIA), и Fcα-рецептора CD89 [33]. Фагоциты, участвующие в АЗФ, включают в себя моноциты, макрофаги, нейтрофилы и дендритные клетки [17, 34] (рис. 4). АЗФ – один из важнейших индуцированных антителом эффекторных механизмов защиты от вируса гриппа. Показано, что мыши FcγR^{-/-} высокочувствительны к гриппу даже в присутствии противогриппозных антител, полученных от мышей FcγR^{+/+}. Причем отсутствие NK-клеток не было критичным для защиты. Показано также, что макрофаги мышей FcγR^{+/+} активно поглощали опсонизированные вирусные частицы [35]. Dunand и соавт. показали, что некоторые

нейтрализующие моноклональные антитела человека широкого спектра действия защищают мышей от гриппозной инфекции через Fc-опосредованное привлечение эффекторных клеток, при этом защита связана исключительно с АЗФ, а не с АЗКЦ или активацией системы комплемента [36].

Согласно He и соавт., альвеолярные макрофаги критичны для индукции АЗФ моноклональными антителами человека и мыши как *in vitro*, так и в экспериментах по защите животных от заражения гомологичными и гетерологичными вирусами гриппа А [37]. Интересно, что у «пожилых» мышей снижена способность альвеолярных макрофагов защищать легкие от повреждения при гриппозной инфекции [38].

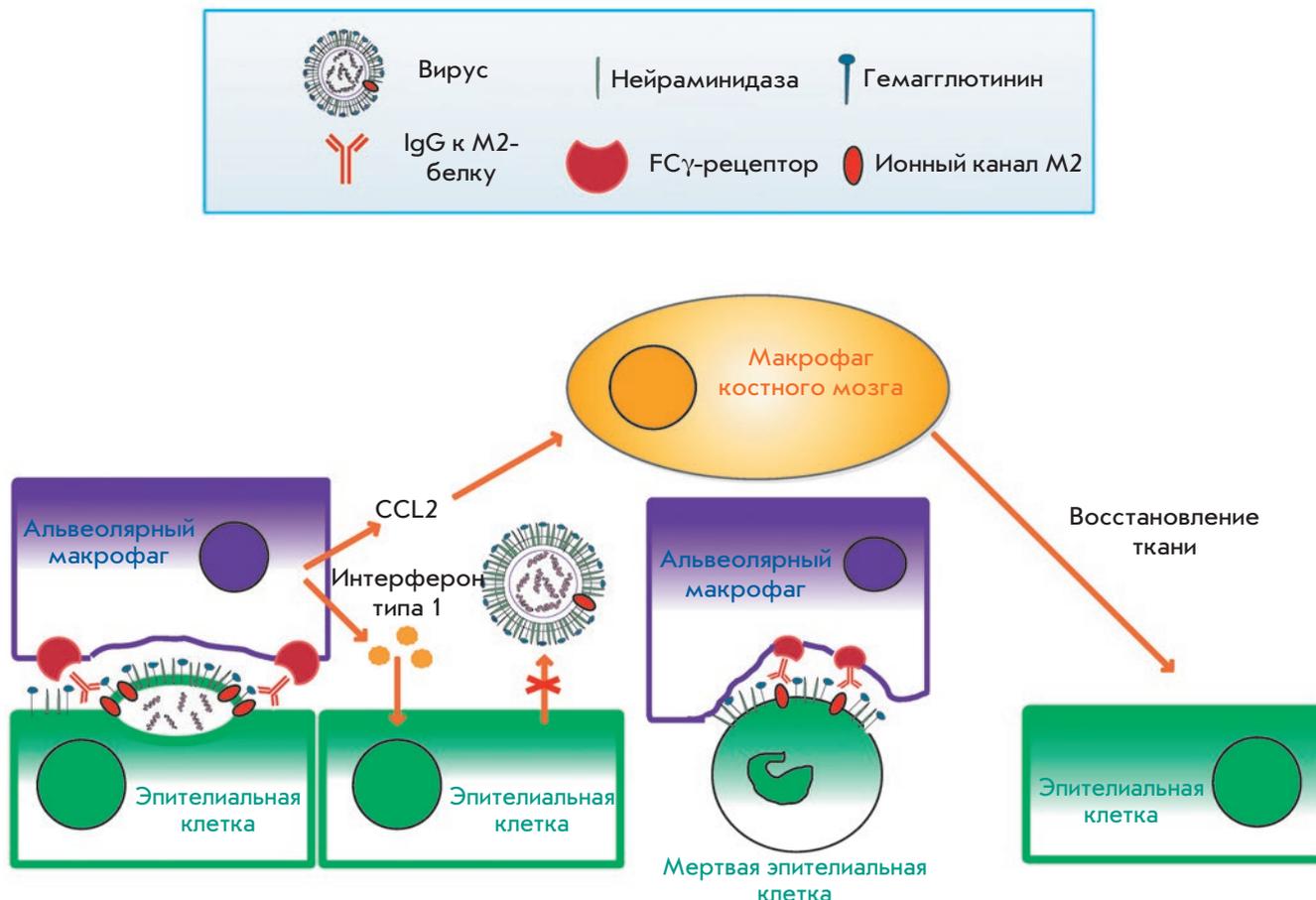


Рис. 4. Механизм протективного действия антител к эктодомену ионного канала M2 вируса гриппа. Эпителиальные клетки дыхательных путей, инфицированные вирусом гриппа А, представляют HA, NA и M2-белок вируса гриппа на своей поверхности. От зараженных клеток отпочковываются новые вирусные частицы. M2 на поверхности отпочковывающегося вириона опсонизируется антителами к эктодомену M2, которые активируют альвеолярные макрофаги через Fcγ-рецепторы. Активированные макрофаги способны поглощать отпочковывающиеся вирионы и участки клеточной мембраны, содержащие белок M2. Гибнущие инфицированные клетки могут опсонизироваться антителами к эктодомену белка M2 и фагоцитироваться альвеолярными макрофагами через FcγR-зависимый путь. Активированные макрофаги продуцируют интерфероны типа I, обладающие антивирусной активностью и способные регулировать экспрессию хемокина CCL2, привлекающего макрофаги костного мозга, способствующие восстановлению тканей

В АЗФ-опосредованную защиту против вируса гриппа помимо альвеолярных макрофагов могут включаться другие популяции эффекторных клеток. Так нейтрофилы, которые являются самыми многочисленными лейкоцитами крови, после активации экспрессируют на своей поверхности высокие уровни FcγRIa/b/c, FcγRIIa и FcγRIIIb. Кроме того, нейтрофилы конститутивно экспрессируют FcαRI, который связывает IgA и активирует цитотоксические и фагоцитарные ответы [15]. Анализ Fc-FcγR-взаимодействий между различными IgG, специфичными к стеблю HA, и эффекторными нейтрофилами показал, что моноклональные антитела человека

и мыши к стеблю HA способны индуцировать продукцию нейтрофилами активных форм кислорода (reactive oxygen species, ROS), которые клетка выбрасывает в фаголизосому. При этом подобный эффект не удалось обнаружить в случае антител к глобулярному домену HA [39]. Истощение нейтрофилов приводило к снижению выживаемости мышей при гриппозной инфекции [40, 41].

Изучение механизма АЗФ во время гриппозной инфекции показало, что как макрофаги, так и нейтрофилы быстро привлекаются в легкие и присутствуют в бронхоальвеолярном лаваже, дыхательных путях и альвеолах, где способствуют быстрой

очистке от инфицированных и мертвых клеток. Хотя супернатант инфицированных вирусом гриппа клеток может стимулировать фагоцитоз моноцитами независимо от вовлечения антител [40], антитела способствуют ускоренному выведению вирусных частиц и инфицированных клеток благодаря взаимодействию с FcγRIa и FcγRIIa на иммунных клетках. Опосредованный антителами вирусный фагоцитоз приводит к уменьшению распространения и тяжести инфекции, уменьшению симптомов и снижению выделения вируса [42]. Предполагается, что каждая последующая гриппозная инфекция, а также противогриппозные вакцинации приводят к индукции небольших уровней перекрестных антител, участвующих в АЗФ, и их уровни возрастают с каждой последующей гриппозной инфекцией [17].

Способностью индуцировать АЗФ обладают различные противогриппозные антитела, в том числе антитела к стеблю гемагглютинаина [36, 37, 39] и антитела к ионному каналу М2 [28, 43].

Для изучения активности антител, отвечающих за АЗФ, обычно оценивают поглощение фагоцитирующими клетками клеток-мишеней, экспрессирующих гриппозные антигены и меченных каким-либо красителем, после обработки последних целевыми антителами [35].

Опосредованная антителом комплементзависимая цитотоксичность (АОКЗЦ)

Система комплемента состоит из растворимых и мембраносвязанных белков, которые встречаются в крови и тканях млекопитающих. Эти белки взаимодействуют друг с другом и с другими компонентами иммунной системы, в результате чего образуется ряд эффекторных белков, способствующих элиминации различных патогенов [27].

Еще в 1978 году было показано, что система комплемента необходима для защиты мышей от летальной гриппозной инфекции [44]. В 1983 году установлено, что сыворотка крови человека содержит антитела, способные нейтрализовать вирус гриппа путем активации классического пути комплемента [45]. В настоящее время известно, что вирионы вируса гриппа активируют как классический, так и альтернативный пути комплемента, при этом для эффективного лизиса вирионов требуется опсонизация антителами [46].

В 2018 году была проведена работа по изучению эффективности иммунизации мышей с нокаутом С3-компонента комплемента вирусоподобными частицами, несущими белки М2е вирусов гриппа А человека, свиней и птиц, а также вирусоподобными частицами, несущими НА вируса гриппа А подтипа Н5. Оказалось, что иммунизация М2е-вакциной не за-

щищала мышей с нокаутом С3 от вирусов гриппа А, хотя даже низкие уровни антител к белку М2е обеспечивали защиту животных дикого типа от заражения вирусами гриппа А при пассивном переносе. Напротив, мыши с нокаутом С3, иммунизированные НА-вакциной, индуцирующей образование штаммоспецифичных нейтрализующих антител, были защищены от заражения гомологичным вирусом гриппа, несмотря на низкий уровень антительного ответа [47]. Таким образом, можно говорить о способности антител к ионному каналу М2 вируса гриппа защищать от вируса гриппа А путем активации системы комплемента.

Система комплемента способна не только нейтрализовать вирусные частицы, но также участвует в лизисе инфицированных клеток. Так, вакцинация сезонной трехвалентной инактивированной противогриппозной вакциной приводила к увеличению уровня антител, способных активировать комплементзависимый лизис инфицированных гриппом клеток *in vitro*, хотя эффект и не был ярко выраженным [48]. Индуцирующие АОКЗЦ антитела обнаружены как среди антител к глобулярному домену НА вируса гриппа, так и среди антител к стволочному домену. Но при этом антитела к стволочному домену показали широту спектра действия и были способны индуцировать АОКЗЦ против различных штаммов вируса гриппа А [49].

Показано, что в активации системы комплемента участвуют антитела классов IgG1 и IgM [46]. Уровни антител, участвующих в АОКЗЦ, коррелировали с защитой от сезонного вируса гриппа у детей [32].

Активность антител в АОКЗЦ оценивают на клетках-мишенях, экспрессирующих целевой антиген или зараженных вирусом гриппа с помощью растворов, содержащих комплемент. Гибель клеток оценивают с помощью различных метаболических красителей [50].

АНТИТЕЛА К ГЕМАГГЛЮТИНИНУ И НЕЙРАМИНИДАЗЕ ВИРУСА ГРИППА

НА и NA вируса гриппа являются высоковариабельными белками. Однако разрабатываемые на сегодняшний момент вакцины широкого спектра действия могут включать также НА и/или NA и их эпитопы. Так стебель НА является достаточно консервативной частью молекулы. Существуют различные стратегии перенаправления иммунного ответа при вакцинации именно на этот антиген [51]. Большинство НА-специфических моноклональных антител, полученных из сывороток людей, перенесших инфекцию, связываются с различными штаммами вирусов гриппа, что позволяет надеяться на создание вакцин широкого спектра действия на основе этого антигена [52].

Антитела к стеблю HA вируса гриппа

Стебель HA более консервативен, чем глобулярный домен, однако при этом он менее иммуногенен, возможно из-за того, что громоздкая глобулярная часть белка стерически препятствует доступу антител к стеблю HA. Однако, кроме ненейтрализующих антител, участвующих в реакциях АЗКЦ, АЗФ и АОКЗЦ, у людей после гриппозной инфекции или вакцинации выявляется некоторое количество нейтрализующих антител к стеблю HA, причем инфекция более эффективно, чем вакцинация, индуцирует образование антител этого типа.

Антитела против стебля HA могут препятствовать слиянию вируса с эндосомальной мембраной. Для эффективного слияния необходимо присутствие 3–5 соседних HA со связавшимися с эндосомальной мембраной пептидами слияния (рис. 1, в). Нейтрализующие антитела к стеблю HA способны предотвратить рН-индуцированное экспонирование пептида слияния и предотвратить формирование сети HA, взаимодействующих с эндосомальной мембраной. Кроме того, некоторые антитела к стеблю HA способны ингибировать разрезание незрелого предшественника HA0 на субъединицы HA1 и HA2 (рис. 1, д), которые необходимы для успешного инфицирования клеток новой вирусной частицей [4]. Также антитела к стволочному домену HA способны подавлять выход вирусных частиц из клетки (рис. 1, г) [53], в том числе за счет стерического ингибирования активности нейраминидазы [54].

Нейтрализующие антитела к стеблю HA невозможно определить с помощью реакции гемагглютинации. Основными способами оценки подобных антител являются реакции нейтрализации [5], микронейтрализации [6] и нейтрализации на основе псевдотипированных вирусных векторов [55]. Последние представляют собой химерные вирусы, несущие поверхностные антигены вирусов гриппа, которые не содержат генетический материал и не обладают инфекционностью. Такие псевдовirusы, как правило, получают на основе лентивирусных векторов и вируса везикулярного стоматита. Они позволяют при постановке реакции нейтрализации отказать от работы с высокопатогенными вирусами гриппа (что особенно важно при изучении антител широкого спектра действия). По некоторым данным такой способ оценки более чувствителен и больше подходит для выявления нейтрализующих антител к стеблю HA, чем классическая реакция нейтрализации [55].

Антитела к нейраминидазе вируса гриппа

Нейраминидаза вируса гриппа участвует в различных стадиях инфекционного процесса. Она отреза-

ет вирусную частицу от сиаловых кислот муцинов дыхательных путей, позволяя вирусу проникнуть в клетку. NA позволяет отпочковываться новым вирионам, не давая им оставаться связанными с сиаловыми кислотами на поверхности клетки. Кроме того, NA предотвращает агрегацию вирионов, связанную с взаимодействием HA одного вириона с сиалированными гликанами другого [56]. Антитела к NA вируса гриппа могут препятствовать любому из этих процессов (рис. 1, а,г).

Показано, что в отсутствие антител к NA, антитела к NA способны обеспечить защиту лабораторных животных от заражения вирусом гриппа [57]. Более того, присутствие антител к NA также коррелирует с защитой людей от гриппозной инфекции. Показано, что титры анти-NA-антител увеличиваются в крови человека с возрастом [56].

Появление антител к нейраминидазе индуцируется гриппозной инфекцией, хотя обычно их уровень ниже, чем антител к HA. Важно, что большинство NA-специфических моноклональных антител, полученных из сывороток индивидов, перенесших инфекцию, связываются с широким спектром современных и исторических штаммов вирусов гриппа, ингибируют NA-активность и обеспечивают защиту лабораторных мышей в экспериментах с пассивным переносом [52]. Возможны несколько стратегий создания вакцин широкого спектра действия, индуцирующих образование антител к NA вируса гриппа. Одна из них – создание пандемичной вакцины на основе коктейля из NA нескольких подтипов (N1, N2, N6, N7, N8, N9 и др.), ассоциированных с человеческими и зоонозными штаммами вируса гриппа. Возможно также включение NA как дополнительного антигена в вакцины на основе консервативных антигенов вируса гриппа – M2, NP и др. [58].

ИФА – это один из наиболее простых способов оценить иммунный ответ на NA. Для достоверной оценки уровня антител к NA в качестве антигена нужно использовать рекомбинантную, тетрамерную, гликозилированную и ферментативно активную NA. При этом ИФА не дает никакой информации о функциональности измеренного уровня антител. Тесты на ингибирование ферментативной активности NA основаны на разрезании нейраминидазой маленьких молекул, что приводит к появлению измеряемого сигнала. Однако, в отличие от концевых сиаловых кислот, которые прикреплены к гликанам на крупных белках, эти малые молекулы более легко поступают в активный центр NA [59]. Анализ, который позволяет получить наиболее реалистичные оценки анти-NA-активности антител, – ELLA (enzyme-linked lectin assay) – лектин-ферментный анализ, где в качестве субстрата используют высоко-

сиалированный гликопротеин фетуин. Метод основан на измерении количества галактозы, предпоследнего остатка сахара в составе фетуина, связанного с подложкой. NA отщепляет концевые сиаловые кислоты, после чего галактоза становится доступной для анализа с помощью конъюгированного с пероксидазой хрена лектина арахиса. ELLA был оптимизирован для рутинной серологии, он используется в современных исследованиях для измерения титров антител, ингибирующих нейраминидазу [58].

Ключевым компонентом ELLA является ферментативно активная NA, ингибирование которой и будет оцениваться. NA может находиться в форме очищенного белка или в составе вирусной частицы. При этом при использовании вирусной частицы необходимо помнить, что антитела, связывающиеся с NA, могут снижать активность NA из-за стерических помех. Поэтому в этом анализе обычно используют реассортантные вирусы подтипов H6NX или H7NX. Несмотря на то что использование реассортантных вирусов не может полностью исключить влияния антител к NA на активность NA, такой анализ признан золотым стандартом для измерения ингибирующей NA-активности антител [59].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В этом обзоре рассмотрены основные механизмы работы противогриппозных антител и способы их обнаружения. Антитела могут обеспечивать защиту от гриппа через Fc-независимый или Fc-зависимый механизмы. Fc-независимые антитела непосредственно нейтрализуют вирус, препятствуя его про-

никновению в клетку, слиянию или отпочковыванию от нее. В прямой нейтрализации вируса гриппа в основном участвуют антитела к глобулярному домену гемагглютинина [5], которые, как правило, штаммоспецифичны. Fc-зависимые антитела обычно не являются нейтрализующими, но способны активировать антителозависимую клеточную цитотоксичность, антителозависимый клеточный фагоцитоз или систему комплемента [18, 34, 49]. Такие антитела могут быть направлены к стволочному домену NA, белкам NA, M2 или NP вируса гриппа, и большинство из них это антитела широкого спектра действия [11, 21, 28, 58].

Разрабатываемые в настоящее время противогриппозные вакцины призваны формировать иммунный ответ не столько на «классические» антигены вируса гриппа NA и NA, сколько на различные консервативные вирусные антигены. При создании вакцин широкого спектра действия необходимо знать, какие критерии эффективности нужно учитывать при проведении доклинических и клинических испытаний. Привычные способы оценки гуморального иммунного ответа на противогриппозные вакцины с помощью реакций гемагглютинации и нейтрализации уже не будут актуальными для многих новых вакцин. Разработка методов оценки ненейтрализующих противогриппозных антител и изучение механизмов их действия необходимы для создания эффективных вакцин широкого спектра действия, способных обеспечить защиту как от сезонных, так и от потенциально пандемических штаммов вируса гриппа. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Paules C., Subbarao K. // *Lancet*. 2017. V. 390. P. 697–708.
2. Седова Е.С., Щербинин Д.Н., Мигунов А.И., Смирнов Ю.А., Логунов Д.Ю., Шмаров М.М., Цыбалова Л.М., Народицкий Б.С., Киселев О.И., Гинцбург А.Л. // *Acta Naturae*. 2012. Т. 4. № 4(15). С. 17–27.
3. Krammer F. // *Nat. Rev. Immunol.* 2019. V. 19. № 6. P. 383–397.
4. Щербинин Д.Н., Алексеева С.В., Шмаров М.М., Смирнов Ю.А., Народицкий Б.С., Гинцбург А.Л. // *Acta Naturae*. 2016. V. 8. № 1(28). С. 14–22.
5. Truelove S., Zhu H., Lessler J., Riley S., Read J.M., Wang S., Kwok K.O., Guan Y., Jiang C.Q., Cummings D.A. // *Influenza Other Respi. Viruses*. 2016. V. 10. P. 518–524.
6. Kitikoon P., Vincent A.L. // *Meth. Mol. Biol.* 2014. V. 1161. P. 325–335.
7. Brandenburg B., Koudstaal W., Goudsmit J., Klaren V., Tang Ch., Bujny M.V., Korse H.J., Kwaks T., Otterstrom J.J., Juraszek J. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 12. P. e80034.
8. Lu L.L., Suscovich T.J., Fortune S.M., Alter G. // *Nat. Rev. Immunol.* 2018. Т. 18. P. 46–61.
9. Bruhns P., Jönsson F. // *Immunol. Rev.* 2015. V. 268. № 1. P. 25–51.
10. Vandervan H.A., Jegaskanda S., Wheatley A.K., Kent S.J. // *Curr. Opin. Virol.* 2017. V. 22. P. 89–96.
11. DiLillo D.J., Tan G.S., Palese P., Ravetch J.V. // *Nat. Med.* 2014. V. 20. P. 143–151.
12. Jegaskanda S., Weinfurter J.T., Friedrich T.C., Kent S.J. // *J. Virol.* 2013. V. 87. P. 5512–5522.
13. Jegaskanda S., Luke C., Hickman H.D., Sangster M.Y., Wieland-Alter W.F., McBride J.M., Yewdell J.W., Wright P.F., Treanor J., Rosenberger C.M., et al. // *J. Infect. Dis.* 2016. V. 214. P. 945–952.
14. Jegaskanda S., Laurie K.L., Amarasena T.H., Winnall W.R., Kramski M., De Rose R., Barr I.G., Brooks A.G., Reading P.C., Kent S.J. // *J. Infect. Dis.* 2013. V. 208. P. 1051–1061.
15. Boudreau C.M., Alter G. // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. P. 440.
16. DiLillo D.J., Palese P., Wilson P.C., Ravetch J.V. // *J. Clin. Invest.* 2016. V. 126. P. 605–610.
17. Sicca F., Neppelenbroek S., Huckriede A. // *Expert. Rev. Vaccines*. 2018. V. 17. № 9. P. 785–795.
18. Jegaskanda S., Reading P.C., Kent S.J. // *J. Immunol.* 2014. V. 193. № 2. P. 469–475.
19. Virelizier J.L., Allison A.C., Oxford J.S., Schild G.C. // *Nature*. 1977. V. 266. P. 52–54.
20. Yewdell J.W., Frank E., Gerhard W. // *J. Immunol.* 1981. V. 126. P. 1814–1819.
21. Bodewes R., Geelhoed-Mieras M.M., Wrammert J., Ahmed R., Wilson P.C., Fouchier R.A., Osterhaus A.D., Rimmelzwaan

- G.F. // *Clin. Vaccine Immunol.* 2013. V. 20. P. 1333–1337.
22. Carragher D.M., Kaminski D.A., Moquin A., Hartson L., Randall T.D. // *J. Immunol.* 2008. V. 181. P. 4168–4176.
23. LaMere M.W., Lam H.T., Moquin A., Haynes L., Lund F.E., Randall T.D., Kaminski D.A. // *J. Immunol.* 2011. V. 186. № 7. P. 4331–4339.
24. Jegaskanda S., Amarasena T.H., Laurie K.L., Tan H.X., Butler J., Parsons M.S., Alcantara S., Petravic J., Davenport M.P., Hurt A.C., et al. // *J. Virol.* 2013. V. 87. P. 13706–13718.
25. Jegaskanda S., Co M.D.T., Cruz J., Subbarao K., Ennis F.A., Terajima M. // *J. Infect. Dis.* 2017. V. 215. № 5. P. 818–823.
26. Vanderven H.A., Ana-Sosa-Batiz F., Jegaskanda S., Rockman S., Laurie K., Barr I., Chen W., Wines B., Hogarth P.M., Lambe T., et al. // *EBioMedicine.* 2016. V. 8. P. 277–290.
27. Jegerlehner A., Schmitz N., Storni T., Bachmann M.F. // *J. Immunol.* 2004. V. 172. № 9. P. 5598–5605.
28. El Bakkouri K., Descamps F., De Filette M., Smet A., Festjens E., Birkett A., van Rooijen N., Verbeek S., Fiers W., Saelens X., et al. // *J. Immunol.* 2011. V. 186. № 2. P. 1022–1031.
29. Lee Y.N., Lee Y.T., Kim M.C., Hwang H.S., Lee J.S., Kim K.H., Kang S.M. // *Immunology.* 2014. V. 143. № 2. P. 300–309.
30. Simhadri V.R., Dimitrova M., Mariano J.L., Zenarruzabeitia O., Zhong W., Ozawa T., Muraguchi A., Kishi H., Eichelberger M.C., Borrego F. // *PLoS One.* 2015. V. 10. P. 1–13.
31. Jegaskanda S., Job E.R., Kramski M., Laurie K., Isitman G., de Rose R., Winnall W.R., Stratov I., Brooks A.G., Reading P.C., et al. // *J. Immunol.* 2013. V. 190. № 4. P. 1837–1848.
32. Co M.D., Terajima M., Thomas S.J., Jarman R.G., Rungrojancharoenkit K., Fernandez S., Yoon I.K., Buddhari D., Cruz J., Ennis F.A. // *Viral Immunol.* 2014. V. 8. P. 375–382.
33. García-García E., Rosales C. // *J. Leukoc. Biol.* 2002. V. 72. P. 1092–1108.
34. Freeman S.A., Grinstein S. // *Immunol. Rev.* 2014. V. 262. P. 193–215.
35. Huber V.C., Lynch J.M., Bucher D.J., Le J., Metzger D.W. // *J. Immunol.* 2001. V. 166. P. 7381–7388.
36. Henry Dunand C.J., Leon P.E., Huang M., Choi A., Chromikova V., Ho I.Y., Tan G.S., Cruz J., Hirsh A., Zheng N.Y., et al. // *Cell Host Microbe.* 2016. V. 19. № 6. P. 800–813.
37. He W., Chen C., Mullarkey C., Hamilton J.R., Wong C.K., Leon P.E., Uccellini M.B., Chromikova V., Henry C., Hoffman K.W., et al. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. № 1. P. 846.
38. Wong C.K., Smith C.A., Sakamoto K., Kaminski N., Koff J.L., Goldstein D.R. // *J. Immunol.* 2017. V. 199. № 3. P. 1060–1068.
39. Mullarkey C.E., Bailey M.J., Golubeva D.A., Tan G.S., Nachbagauer R., He W., Novakowski K.E., Bowdish D.M., Miller M.S., Palese P. // *MBio.* 2016. V. 7. № 5. P. e01624–1616.
40. Hashimoto Y., Moki T., Takizawa T., Shiratsuchi A., Nakaniishi Y. // *J. Immunol.* 2007. V. 178. № 4. P. 2448–2457.
41. Fujisawa H. // *J. Virol.* 2008. V. 82. № 6. P. 2772–2783.
42. Ana-Sosa-Batiz F., Vanderven H., Jegaskanda S., Johnston A., Rockman S., Laurie K., Barr I., Reading P., Lichtfuss M., Kent S.J. // *PLoS One.* 2016. V. 11. P. 1–18.
43. Saelens X. // *J. Infect. Dis.* 2019. V. 219. (Supplement_1). P. S68–S74.
44. Hicks J.T., Ennis F.A., Kim E., Verbonitz M. // *J. Immunol.* 1978. V. 121. № 4. P. 1437–1445.
45. Beebe D.P., Schreiber R.D., Cooper N.R. // *J. Immunol.* 1983. V. 130. № 3. P. 1317–1322.
46. Rattan A., Pawar S.D., Nawadkar R., Kulkarni N., Lal G., Mullick J., Sahu A. // *PLoS Pathog.* 2017. V. 13. № 3. P. e1006248.
47. Kim Y.J., Kim K.H., Ko E.J., Kim M.C., Lee Y.N., Jung Y.J., Lee Y.T., Kwon Y.M., Song J.M., Kang S.M. // *J. Virol.* 2018. V. 92. № 20. P. e00969–18.
48. Co M.D., Cruz J., Takeda A., Ennis F.A., Terajima M. // *Hum. Vaccin. Immunother.* 2012. V. 8. № 9. P. 1218–1222.
49. Terajima M., Cruz J., Co M.D., Lee J.H., Kaur K., Wrammert J., Wilson P.C. // *J. Virol.* 2011. V. 85. № 24. P. 13463–13467.
50. Тутер Е.А., Порошин Г.Н., Драницына М.А., Васильев А.Н., Ниязов Р.Р. // *Ремедиум. Журнал о российском рынке лекарств и медицинской техники.* 2016. Т. 6. С. 37–42.
51. Krammer F. // *Expert Rev. Vaccines.* 2017. V. 16. № 5. P. 503–513.
52. Chen Y.Q., Wohlbold T.J., Zheng N.Y., Huang M., Huang Y., Neu K.E., Lee J., Wan H., Rojas K.T., Kirkpatrick E., et al. // *Cells.* 2018. V. 173. № 2. P. 417–429.
53. Tan G.S., Lee P.S., Hoffman R.M.B., Mazel-Sanchez B., Krammer F., Leon P.E., Ward A.B., Wilson I.A., Palese P. // *J. Virol.* 2014. V. 88. P. 13580–13592.
54. Kosik I., Angeletti D., Gibbs J.S., Angel M., Takeda K., Kosikova M., Nair V., Hickman H.D., Xie H., Brooke C.B., et al. // *J. Exp. Med.* 2019. V. 216. № 2. P. 304–316.
55. Carnell G.W., Ferrara F., Grehan K., Thompson C.P., Temperton N.J. // *Front. Immunol.* 2015. V. 6. № 161.
56. Rajendran M., Nachbagauer R., Ermler M.E., Bunduc P., Amanat F., Izikson R., Cox M., Palese P., Eichelberger M., Krammer F. // *MBio.* 2017. V. 8. P. 1–12.
57. Marcelin G., Sandbulte M.R., Webby R.J. // *Rev. Med. Virol.* 2012. V. 22. № 4. P. 267–279.
58. Eichelberger M.C., Monto A.S. // *J. Infect. Dis.* 2019. V. 219. (Supplement_1). P. S75–S80.
59. Krammer F., Fouchier R.A.M., Eichelberger M.C., Webby R.J., Shaw-Saliba K., Wan H., Compans R.W., Skountzou I., Monto A.S. // *MBio.* 2018. V. 9. № 2. P. e02332–17.

УДК 571.27

Везикулы, секретируемые опухолевыми клетками, и их роль в регуляции противоопухолевого иммунитета

В. М. Украинская^{1#}, Ю. П. Рубцов^{1#}, В. Д. Кнорре¹, М. А. Масчан², А. Г. Габитов¹,
А. В. Степанов^{1*}

¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

²НИИЦ ДГОИ им. Дмитрия Рогачева Минздрава России, Москва, 117997 Россия

Авторы внесли равнозначный вклад в написание статьи.

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

Поступила в редакцию 08.09.2019

Принята к печати 05.11.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-33-41

РЕФЕРАТ В обзоре рассмотрены современные представления о внеклеточных везикулах, выделяемых опухолевыми клетками, и их влиянии на противоопухолевый иммунитет. Приведена подробная характеристика строения, состава, биогенеза и функций опухолевых везикул. Охарактеризованы механизмы взаимодействия опухолевых везикул с клетками-акцепторами. Проведен критический обзор результатов современных исследований в области опухолевого микроокружения, наиболее детально рассмотрены пути подавления или активации лимфоцитов (CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток) опухолевыми везикулами.

Опухолевые везикулы играют важную роль в супрессии противоопухолевого иммунного ответа. Несмотря на то что уже изучено множество различных путей влияния везикул на иммунные клетки, открытыми остаются вопросы гетерогенности везикул и их содержимого, путей слияния/поглощения везикул клетками иммунной системы, роли мРНК в трансформации Т-клеток и других аспектах везикулярной коммуникации между клетками. Потенциальное использование везикул для направленного воздействия на противоопухолевый иммунитет, а также подавление негативного влияния этих мембранных частиц на иммунитет можно рассматривать как новые подходы терапии онкологических заболеваний.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА везикулы, иммунный ответ, CD4⁺/CD8⁺ Т-лимфоциты, опухолевое окружение, экзосомы.
СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ CD – кластер дифференцировки; EVs – внеклеточные везикулы; Hsp – белки-шапероны; TUBB4B, TUBA1C – тубулины-бета; МНС – комплекс гистосовместимости; АПК – антигенпрезентирующие клетки; N-SMase – нейтральная сфингомиелиназа; ARF6 – фактор ADP-рибозилирования 6; ESCRT – эндосомальный комплекс сортировки; MVVs – мультивезикулярные тельца; PLD2 – фосфолипаза D2; Th – Т-хелпер; Treg – регуляторная Т-клетка; NK – натуральный киллер; TRAIL – лиганд рецептора фактора некроза опухоли 10; IL – интерлейкин; NKG2D – рецептор группы натуральных киллеров 2 тип D; PD-1 – рецептор программируемой смерти клеток; A_{2A}R – рецептор аденозина; STAT – сигнальный белок и активатор транскрипции; TGFβ – трансформирующий ростовой фактор бета; IFN-γ – интерферон-гамма; JAK – янус-киназа; MAPK – митоген-активируемая протеинкиназа; LFA – гетеродимерный интегрин подсемейства β2-интегринов; ICAM – молекула клеточной адгезии; TCR – Т-клеточный рецептор.

ВВЕДЕНИЕ

Новые данные о происхождении, составе и действии внеклеточных везикул (extracellular vesicles, EVs) на клетки сильно изменили представления об их функциях и значении – из разряда клеточного «мусора» они превратились в новый способ межклеточного взаимодействия. Оказалось, что эти структуры внутриклеточного (как правило) происхождения

активно участвуют в регуляции иммунного ответа, а также в других процессах, требующих обмена информацией между клетками [1, 2]. Чрезвычайно важным этапом в «биографии» везикул стало обнаружение новой функции – переноса генетического материала (обычно в форме различных типов РНК), который попадает в клетки-мишени, модулирует их фенотип и функцию на генетическом и эпигенетиче-

ском уровнях [1]. Секреция внеклеточных везикул характерна не только для нормальных, но и для опухолевых клеток, что делает их важной составляющей опухолевого окружения. Стоит подчеркнуть, что опухолевые клетки выделяют значительно больше везикул по сравнению с нормальными клетками окружающей ткани, что можно связать с ускоренной пролиферацией в условиях стресса [3–5]. Многие факторы могут влиять на продукцию везикул клетками, так, к примеру, известно, что условия низкого рН в опухолевом микроокружении важны для поддержания стабильности липидно-холестеринового состава везикул [6]. Изменение количества везикул, а также их состава, хорошо коррелирует с прогнозом и тяжестью течения многих заболеваний, что позволяет использовать их для неинвазивной диагностики [7].

Везикулы, как часть клеточного окружения, участвуют, по-видимому, в дифференцировке, делении и поддержании/изменении фенотипа клеток как в норме, так и при различных патологиях, в том числе в различных видах онкологических заболеваний [2]. Несмотря на то что опухолевые везикулы в основном подавляют иммунную систему и способствуют развитию опухоли, одновременно они содержат опухолевые антигены. Это свойство везикул потенциально может быть использовано в иммунотерапии для стимуляции противоопухолевого ответа [8].

В данном обзоре рассмотрено, каким образом опухолевые везикулы участвуют в регуляции иммунного ответа и как они влияют на функции CD4⁺/CD8⁺ Т-клеток в контексте опухолевого окружения.

1. ХАРАКТЕРИСТИКА ВЕЗИКУЛ

Термин «внеклеточные везикулы» объединяет сферические структуры клеточного происхождения размером от 30 до 1000 нм, окруженные билипидным слоем. Везикулы относят к разным типам по их усредненным размерам и биохимическому профилю (наборам входящих в их состав компонентов). Точную классификацию типов везикул затрудняет сложность их получения в чистом виде и физического разделения отдельных типов везикул [9]. Теоретически, внеклеточные везикулы можно классифицировать по размеру или происхождению [9, 10].

1) Экзосомы – структуры диаметром 30–150 нм эндосомального происхождения, несущие характерные маркеры семейства тетраспанинов (CD9, CD63, CD81) и шаперонов (Hsp70, Hsp90).

2) Микровезикулы – частицы цитоплазматического происхождения, являющиеся отделившимися частями цитоплазматической мембраны клетки размером от 100 до 1000 нм.

3) Апоптотические тельца – большие (1000–5000 нм) части клеток, формирующиеся в процессе апоптоза.

Нами подробно рассмотрены экзосомы и микровезикулы, которые далее представлены под общим названием везикулы, или EVs.

1.1. Состав везикул

Везикулы содержат набор белков – характерных маркеров определенной клеточной линии, из которой они были выделены [11]. К примеру, белки тубулины (TUBB4B и TUBA1C) присутствуют на везикулах, выделенных из клеток рака легкого [12], а CD20 на везикулах В-клеточной лимфомы [13]. В попытках понять весь спектр влияния опухолевых EVs на иммунные клетки изучен белковый и липидный состав везикул, который более подробно представлен на *рис. 1* [14–16]. Для любых опухолевых EVs характерно присутствие тетраспанинов – CD63, CD81, CD9, количество которых может варьировать в зависимости от типа опухоли и стадии прогрессии [17]. На мембране везикул также можно обнаружить молекулы главного комплекса гистосовместимости МНС классов I и II (*рис. 1*), что особенно важно для везикул, выделяемых антигенпрезентирующими клетками (АПК) [18, 19]. Кроме белков и липидов, в везикулы попадает и генетический материал: ДНК [16, 20, 21], рибосомные РНК, матричные РНК, а также микроРНК и другие некодирующие РНК. Не до конца изучен механизм, благодаря которому нуклеиновые кислоты загружаются в EVs, но обнаружено присутствие определенных «баркодов» – коротких последовательностей микроРНК и РНК – характерных именно для РНК, выделяемых из везикул [20–22]. Базы данных по молекулярному составу везикул, такие, как EVpedia [23], Vesiclepedia [24], Exocarta [25], дают подробное описание белковых и липидных компонентов, представленных в различных видах EVs.

1.2. Биогенез везикул и взаимодействие с таргетными клетками

Экзосомы и микровезикулы образуются в клетке различными путями (*рис. 2*) [26]. Микровезикулы отделяются от цитоплазматической мембраны клетки при участии белков цитоскелета (актин, миозин и др.), нейтральной сфингомиелиназы N-SMase, участвующей в образовании церамида, а также ARF6 (фактор ADP-рибозилирования 6) и фосфолипазы PLD2 [27, 28]. В формировании как микровезикул, так и экзосом принимает участие эндосомальный комплекс сортировки (ESCRT), который направляет убиквитинированные белки в мультивезикулярные тельца (Multivesicular Bodies, MVBs) [26, 29].

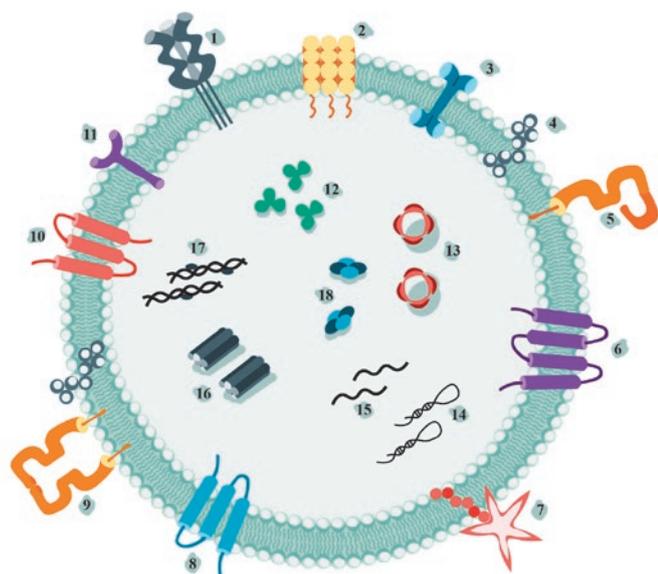


Рис. 1. Схематическое представление белкового состава типичной внеклеточной везикулы (на рисунке представлены самые распространенные компоненты опухолевой везикулы): молекулы адгезии (интегрины (11), тетраспанины (6, 7, 8, 10)), сигнальные молекулы (синтетины, аннексин V(3)), молекулы комплекса гистосовместимости (MHC I класса (5), MHC II класса (9)), белки цитоскелета (актин, миозин (16)), белки теплового шока (12), липидные структуры (церамид (4)), белки, связанные с формированием везикул (AUX/Alix (13)), белки метаболизма (GAPDH (18)) и др. 1 – FasL; 2 – ICAM-1; 3 – аннексин V; 4 – церамид; 5 – MHC I класса; 6 – тетраспанин CD81; 7 – CD80; 8 – тетраспанин CD9; 9 – MHC II класса; 10 – тетраспанин CD63; 11 – интегрины; 12 – белки шапероны, белки теплового шока (HSP); 13 – AUX/Alix; 14 – микроРНК; 15 – мРНК; 16 – актин, миозин; 17 – ДНК с белками гистонами; 18 – GAPDH (Glyceraldehyde-3-Phosphate Dehydrogenase)

ESCRT состоит из четырех белковых компонентов (ESCRT-0, -I, -II и -III), которые последовательно связывают белки для формирования внутриклеточных везикул [7]. Вспомогательные белки синдекан-синтегин-ALIX (ALG-2-interacting protein X), в свою очередь, инициируют отщепление экзосомы от мембраны MVBs [30]. По существующим данным альтернативным путем биогенеза EVs является образование гликолипопротеиновых доменов (липидных рафтов), в состав которых входит сфингомиелиназа N-SMase. Синтез церамида сфингомиелиназой и его накопление в мембране приводят к слиянию рафтов и образованию экзосомы в полости MVBs

[31]. Экзосомы, находящиеся в полости MVBs, выделяются во внеклеточное пространство посредством слияния мембран клетки и MVBs, и этот процесс регулируется GTP-азами семейства Rab и Ras, а также белком SNAPE (soluble N-ethylmaleimide-sensitive factor attachment protein receptor) [21, 32].

Существование нескольких путей образования EVs подтверждается многими исследованиями [33]. Так в клетках, лишенных ESCRT-белков, наблюдалось образование MVBs, хотя выделенные везикулы обладали нестандартным составом и морфологией [31]. Ингибирование или нокаут сфингомиелиназы N-SMase уменьшает продукцию везикул клетками, а также снижает уровень метастазирования и ангиогенеза в опухоли [34]. Однако самостоятельное образование EVs в результате ESCRT-независимого пути с участием сфингомиелиназы вызывает сомнение, так как подтверждено, что липидные рафты не требуются для формирования экзосом [35]. Несмотря на то что пути биогенеза EVs теоретически разделяют на ESCRT-зависимый и ESCRT-независимый, образование определенной популяции EVs может зависеть в разной степени от каждого из путей [9, 36].

Функции EVs в опухолевом окружении могут быть различными, но практически все они так или иначе реализуются при контакте везикулы с целевой клеткой [2]. Везикулы могут переносить к поверхности/доставлять внутрь клеток белковые молекулы, по меньшей мере, четырьмя разными способами (рис. 2):

- контакт между специфическими экспонированными на внешней стороне мембраны белками везикул с рецепторами клеток-реципиентов с возможностью активации внутриклеточных сигнальных каскадов [2, 19];
- отщепление поверхностных везикулярных белков под действием внеклеточных протеаз и их дальнейшее взаимодействие с мембранными рецепторами клеток [29];
- слияние везикулярной и клеточной мембран с последующим высвобождением внутривезикулярного содержимого в цитоплазму клетки либо с образованием эндосомы [26];
- фагоцитоз и интернализация целой везикулы клеткой-реципиентом [5, 21, 37].

Взаимодействие везикулярных тетраспанинов, протеогликанов, лектинов и интегринов с мембранными рецепторами клетки-реципиента запускает процесс проникновения везикулы в клетку, который возможно заблокировать специфическим антителом к определенному везикулярному белку. К примеру, обработка везикул антителами к CD81 или CD9 или блокирование протеогликанов сульфатом гепарина снижают уровень адгезии везикул

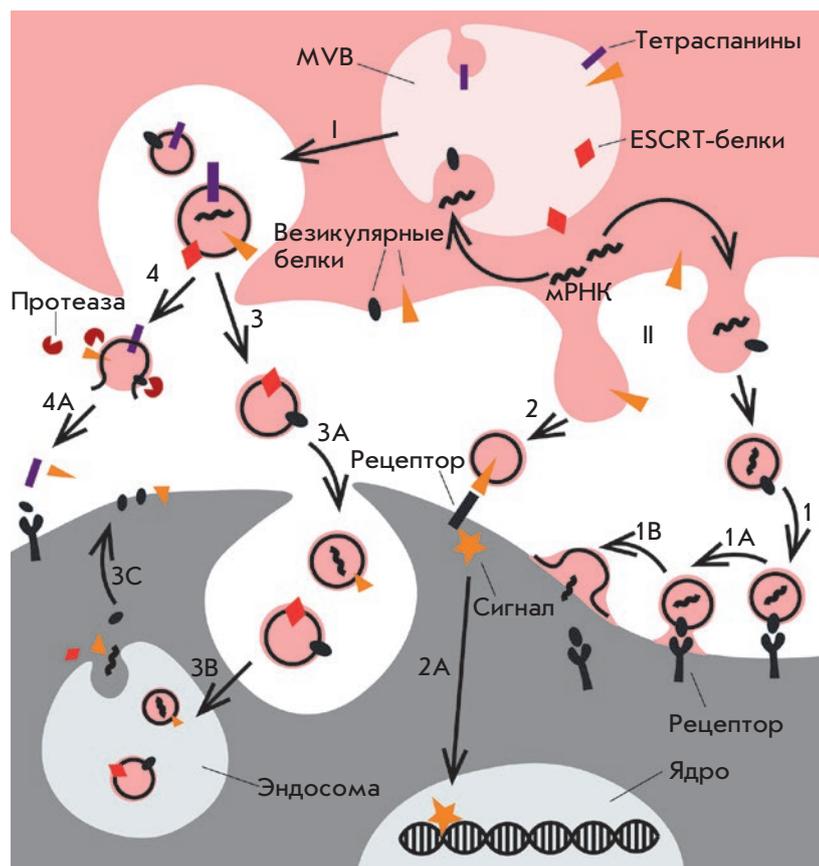


Рис. 2. Биогенез внеклеточных везикул и их поглощение таргетными клетками. Пути биогенеза внеклеточных везикул (I, II). I – образование экзосом в мультивезикулярном тельце (MVBs) при участии ESCRT-зависимого / ESCRT-независимого путей биогенеза – слияние MVBs с цитоплазматической мембраной клетки; II – образование микровезикул путем отделения от цитоплазматической мембраны клетки. Пути поглощения внеклеточных везикул таргетной клеткой (1, 2, 3, 4). 1 – взаимодействие лиганда на поверхности EVs с клеточным рецептором с дальнейшим эндоцитозом везикулярного содержимого; 1A – слияние везикулярной и клеточной мембран; 1B – высвобождение везикулярного содержимого в цитоплазму клетки; 2 – взаимодействие везикул с клеточными рецепторами; 2A – запуск внутриклеточных сигнальных каскадов; 3 – выделение внеклеточной везикулы; 3A – фагоцитоз везикулы; 3B – образование эндосомы с везикулярным содержимым; 3C – интернализация везикулярных компонентов клеткой-реципиентом; 4 – отщепление под действием протеаз мембранных везикулярных белков; 4A – взаимодействие везикулярных белков с клеточными рецепторами

к клетке-реципиенту. Процесс эндоцитоза везикулы клеткой также можно заблокировать цитохалазином В или латранкулином А, которые ингибируют компоненты цитоскелета (актин, фибронектин) [2]. Секретия везикул и их проникновение в клетку – это процессы, которые до настоящего времени исследованы и охарактеризованы по большей части *in vitro*, поэтому необходимо их изучение *in vivo*, что позволит определить физиологическую роль влияния везикул на окружающие клетки.

Таким образом, можно сделать вывод, что разнообразие EVs и их белкового состава, множественные варианты взаимодействия EVs с таргетными клетками характеризуют EVs как многофункциональную составляющую любого физиологического и патофизиологического процесса. Везикулы могут выполнять различные функции в зависимости от их клеточного происхождения – начиная с регуляции иммунных реакций, подавления опухолевой инвазии, заканчивая ролью межклеточных коммуникаторов. Изучение того, как подобные нанобразования в составе клеточного окружения могут оказывать диаметрально противоположные эффекты, позволит использовать везикулы в качестве мишеней для противоопухолевой терапии или «жидкой биопсии» для диагностики развития опухоли [38].

2. ОПУХОЛЕВОЕ МИКРООКРУЖЕНИЕ: ИММУННЫЙ ОТВЕТ И РОЛЬ ОПУХОЛЕВЫХ ВЕЗИКУЛ

В опухолевом окружении присутствуют разные популяции клеток, формирующие строму (фибробласты) и иммунологическое окружение (опухолевые лимфоциты, макрофаги, миелоидные супрессорные клетки и др.). Комплекс реакций иммунного ответа осуществляют Т-лимфоциты, которые не только инициируют, стимулируют ($CD4^+$ Т-лимфоциты, Т-хелперные клетки (Th)) или регулируют (регуляторные Т-клетки, Treg) иммунный ответ, но и разрушают инфицированные или опухолевые клетки ($CD8^+$ Т-киллерные клетки, цитотоксические Т-лимфоциты). Логичным завершением Т-клеточного иммунного ответа являются уничтожение опухолевых клеток и образование клеток памяти [8]. В свою очередь, опухолевые клетки пользуются различными способами «ускользания» от иммунного ответа, одним из которых, по существующим данным, является выделение опухолевых везикул.

Идентифицированы следующие механизмы, посредством которых опухолевые везикулы могут способствовать избеганию иммунного ответа опухолью (рис. 3):

(1) активация апоптоза у $CD8^+$ цитотоксических лимфоцитов [39];

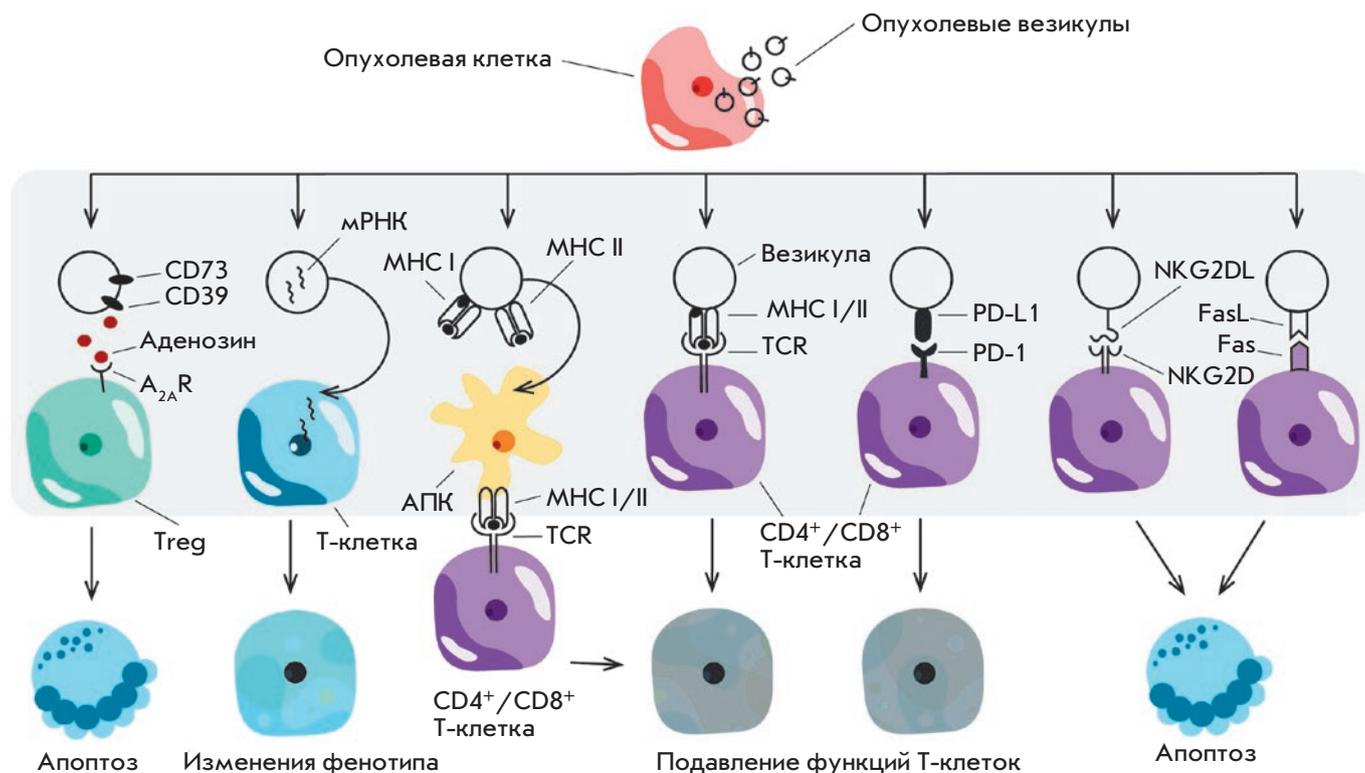


Рис. 3. Влияние опухолевых везикул на различные популяции Т-лимфоцитов. На рисунке представлены эффекты, которые секретируемые опухолевые везикулы могут оказывать на Т-клетки

(2) смещение фенотипа CD4⁺ клеток в сторону Treg-лимфоцитов [40, 41];

(3) передача везикулами и презентация опухолевого антигена клетками, не относящимися к профессиональным АПК или незрелым АПК, вызывающим анергию Т-лимфоцитов в отсутствие костимулирующих сигналов [42–44];

(4) регулируемое подавление Т-клеточного иммунного ответа, который зависит от разных механизмов [45];

(5) перепрограммирование макрофагов в M2-фенотип (поддерживает опухоли) [39, 46, 47];

(6) снижение скорости пролиферации NK-клеток [40].

Далее подробно рассмотрены пути, показанные на рис. 3, через которые опухолевые везикулы могут воздействовать на CD4⁺/CD8⁺ Т-лимфоциты.

3. НЕГАТИВНЫЕ ЭФФЕКТЫ, ВЫЗВАННЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЕМ ВЕЗИКУЛ С ПОВЕРХНОСТНЫМИ РЕЦЕПТОРАМИ КЛЕТОК-МИШЕНЕЙ

3.1. Везикулы индуцируют апоптоз CD8⁺ цитотоксических лимфоцитов

Выделение опухолевыми клетками EVs, несущих на себе факторы активации апоптоза, рассматрива-

ется как один из механизмов иммуносупрессии [48, 49]. При инкубации с Fas⁺ Т-клетками EVs, несущие на себе высокоактивный мембранный белок FasL, способствуют выделению в цитозоль цитохрома с, потере мембранного потенциала митохондриями, активации каспаз и фрагментации ДНК хроматина в Т-клетках [48, 50, 51]. Коэкспрессия FasL и TRAIL на поверхности секретируемых опухолевых EVs также приводит к индукции апоптоза в CD8⁺ Т-клетках [52]. Везикулы, выделяемые опухолевыми клетками, вызывают апоптоз Th1-клеток через взаимодействие галектин-9/Tim-3 [53]. В свою очередь, везикулы, полученные из нормальных клеток (фибробластов или дендритных клеток), не вызывают апоптоз активированных CD8⁺ цитотоксических Т-лимфоцитов [54].

Экспериментально доказано, что в Т-клетках, находящихся в опухолевом окружении, также может наблюдаться снижение экспрессии молекулы CD3ζ, что приводит к анергии Т-клеток и коррелирует с уменьшением выброса таких цитокинов, как IL-2, IL-7 и IL-15. Этот эффект могут оказывать содержащие FasL⁺ везикулы, которые, взаимодействуя с Fas⁺-лимфоцитами, снижают количество молекул CD3ζ и JAK3 (Janus kinase 3, тирозин-специфичная протеинкиназа 3) в первично активированных

Т-клетках и способствуют переходу клеток в апоптотическое состояние [55].

Система NKG2D/NKG2DL также играет немаловажную роль в выживании иммунных клеток [56, 57]. Рецептор NKG2D (The Natural Killer Group 2D, рецептор группы естественных киллерных клеток) присутствует на мембране НК-клеток и CD8⁺ Т-лимфоцитов [58]. Лигандом (NKG2DL) данного рецептора служат МНС I-подобные молекулы и UL-16-связывающие белки, слабо представленные на поверхности нормальных нестрессированных клеток. Появление этих молекул на мембране активируется клеточным стрессом – вирусной инфекцией или опухолевой трансформацией [59]. Опухолевые EVs, экспрессирующие различные NKG2DL, связывают NKG2D на поверхности НК-клеток и CD8⁺ Т-клеток, что приводит к ослаблению цитотоксических функций Т-клеток [60–62].

3.2. Подавление активации Т-клеток через взаимодействие PD-L1/PD-1

Физиологической ролью рецептора PD-1 (Programmed death-1) иммунных клеток является регулирование чрезмерной активации лимфоцитов. При взаимодействии с лигандом (PD-L1) рецептор PD-1 передает внутрь Т-клетки негативный сигнал, ингибирующий пролиферацию Т-клеток и усиливающий их апоптоз. Недавние исследования показали, что на опухолевых везикулах присутствует PD-L1, с помощью которого они могут подавлять активацию Т-клеток [47, 63, 64]. В частности, клетки меланомы выделяют PD-L1⁺ везикулы, количество PD-L1 в которых прямо пропорционально уровню IFN- γ , секретируемого лимфоцитами [65]. В исследованиях *in vivo* и *in vitro* показано, что клетки гепатоцеллюлярной карциномы также выделяют PD-L1⁺ везикулы, которые ингибируют CD4⁺ и CD8⁺ лимфоциты посредством взаимодействия PD-L1/PD-1 [66, 67]. При взаимодействии PD-L1 позитивных везикул с Т-клетками эффект супрессии пропадает при предварительной инкубации с anti-PD-L1-антителом, которое блокировало PD-L1 на везикулах [67].

3.3. Выделение иммуносупрессорного аденозина

Аденозин известен как один из иммуносупрессорных факторов [40]. Взаимодействуя с одной из изоформ рецептора аденозина A_{2A}R, экспрессируемого на поверхности Т-клеток, он повышает уровень сАМФ в CD4⁺ Т-клетках, тем самым подавляя их активацию [40]. Гидролиз АТФ в аденозин осуществляет CD39 (АТФ-гидролаза), которая конвертирует АТФ в 5'-АМФ, и CD73 (5'-нуклеаза), превращающая 5'-АМФ в аденозин [68].

Опухолевые везикулы нередко несут оба этих фермента (то есть являются CD73⁺CD39⁺), что негативно сказывается на Т-клетках в опухолевом окружении [69]. CD73⁺CD39⁺ везикулы индуцируют продукцию аденозина, а при более длительном контакте везикул с клетками также активируют синтез инозина [70]. Инозин поддерживает длительную активацию A_{2A}R-рецептора на Treg-клетках, которые в свою очередь оказывают сильный супрессорный эффект на CD4⁺ Т-клетки [71]. Оказалось, что такой непрямой сигнал от опухолевых везикул намного сильнее, чем от самих клеток, что подтверждает большой вклад EVs в межклеточное взаимодействие [72].

4. ИЗМЕНЕНИЕ КЛЕТОЧНОГО ПОВЕДЕНИЯ ПРИ ПОПАДАНИИ ВЕЗИКУЛЯРНЫХ КОМПОНЕНТОВ ВНУТРЬ КЛЕТКИ

4.1. Везикулярная РНК модулирует функции Т-клеток

Везикулы содержат различные типы РНК, самыми многочисленными и разнообразными видами являются мРНК и микроРНК. В меньших количествах были найдены 18S и 28S рибосомные РНК и ДНК. База данных EchoCarta, основанная на 286 исследованиях, насчитывает около 6 тысяч охарактеризованных микроРНК и мРНК, выделенных из EVs [73]. Горизонтальный перенос мРНК от везикулы к клетке-мишени может влиять на уровень транскрипции некоторых генов, которые, к примеру, участвуют в подавлении/усилении функций Т-клеток, в частности, ответственных за продукцию и секрецию провоспалительных цитокинов и других биологически активных молекул.

Опухоль и ее микроокружение активно участвуют в индукции активных Treg, способствуя превращению CD4⁺CD25⁻ наивных Т-клеток в CD4⁺CD25⁺ Treg. EVs также могут индуцировать CD4⁺CD25⁻ Т-клетки к переходу в фенотип CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-клеток. Эта конверсия наивных Т-клеток в Treg-клетки требует фосфорилирования и сопутствующей активации факторов транскрипции Smad2/3 (Similar to Mothers Against Decapentaplegic 2/3) и STAT3 (Signal transducer and activator of transcription 3) [74, 75]. Повышенная интенсивность образования Treg приводит к дисбалансу в составе иммунных клеток в опухолевом микроокружении, что индуцирует TGF β -зависимый механизм апоптоза популяций эффекторных Т-клеток. В свою очередь, CD4⁺CD25⁺Foxp3⁺ Treg-клетки также могут выделять EVs, которые вызывают подавление пролиферации Т-хелперов 1 типа (Th1) и CD8⁺ Т-клеток и снижение секреции ими IFN- γ [74–76].

При доказанном увеличении количества Treg-клеток в опухоли количество дифференцированных

Th1- и Th17-лимфоцитов в то же время уменьшается, что приводит к развитию Treg/Th-дисбаланса [77, 78]. Такой дисбаланс сопровождается обнаружением в таргетных клетках специфических микроРНК miR-29a-3p и miR-21-5p, имеющих везикулярное происхождение [79]. Накапливаясь в клетках, данные микроРНК могут влиять на различные сигнальные пути, связанные с подавлением активации Т-клеток. Активация MAPK1-пути (митоген-активированной протеинкиназы), STAT3/JAK1 и других путей в CD4⁺ Т-клетках посредством везикулярной микроРНК приводит к нарушению цитокинового профиля Th- и Th17-клеток, а в случае Treg способствует смене лимфоцитарного фенотипа [80, 81].

Влияние везикулярной мРНК на функции Т-лимфоцитов напрямую зависит от того, являются ли Т-клетки наивными или активированными. Обнаружено, что опухолевые везикулы значительно увеличивали уровень экспрессии генов с доказанной функцией регуляции иммунитета у активированных CD4⁺ Т-клеток, в то время как у нестимулированных клеток экспрессия генов незначительно возрастала только для FAS1, IL-10, PTGS2 и, наоборот, снижалась для DPP4, CD40LG и NT5E [82].

4.2. Активация/подавление Т-клеток везикулами, несущими на поверхности антигенпрезентирующие комплексы

Антигенпрезентирующие клетки (АПК) также могут выделять везикулы. Более того, данные везикулы несут МНС II (главный комплекс гистосовместимости II типа) и могут опосредованно стимулировать активированные, но не наивные CD4⁺ Т-клетки. МНС I⁺ везикулы, полученные из АПК, также могут активировать наивные CD8⁺ Т-клетки [51]. Этот процесс определяется взаимодействием TCR (Т-клеточного рецептора) на мембране Т-лимфоцитов с комплексом МНС-пептид при наличии дополнительного ко-стимулирующего сигнала от молекул CD28/V7 либо молекул адгезии LFA-1/ICAM-1, представленных на поверхности везикул. Известно, что взаимодействие TCR и МНС при отсутствии ко-стимулирующих сигналов приводит к Т-клеточной

анергии, то есть неспособности клеток в ответ на стимуляцию Т-клеточного рецептора делиться и секретировать цитокины [83, 84].

Установлено, что везикулы, выделенные из клеток меланомы, также могут переносить МНС I от опухолевых клеток к АПК, с чем сопряжено изменение профиля экспрессии рецепторов на поверхности АПК. Вероятно, цитокины и мРНК везикулярного происхождения оказывают иммуносупрессорный эффект на АПК, что приводит к уменьшению количества МНС I и молекул CD40 на поверхности клеток [83]. Смещение фенотипа АПК в сторону иммуносупрессорного уменьшает возможность стимуляции цитотоксических Т-лимфоцитов, что также может быть механизмом «ускользания» опухолевых клеток от иммунного ответа [83, 84].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Подводя итог, следует сказать, что в современной литературе существуют указания на то, что внеклеточные везикулы, выделяемые опухолями, могут быть важным фактором в формировании иммуносупрессорного микроокружения. Негативное влияние на иммунитет может осуществляться рецепторными взаимодействиями между таргетными клетками и везикулами, вызывающими анергию или апоптоз Т-клеток. Везикулы и их содержимое могут поглощаться таргетными клетками, что также приведет к передаче иммуносупрессорного сигнала. Действие везикул может быть одной из причин резистентности к терапии и фенотипических изменений в клетках опухоли, индуцированных химио- и радиотерапией. Поскольку действие EVs на клетки иммунитета, в частности Т-клетки, изучено слабо, характеристика EV и идентификация молекулярных механизмов, лежащих в основе их связывания и биологического эффекта, являются актуальной задачей с научной и практической точки зрения. ●

Написание глав 1, 2, 3.1, 3.2 выполнено при поддержке гранта РФФИ № 19-29-04087 мк, глав 3.3 и 4 – при поддержке гранта РФФИ № 17-74-30019.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Valadi H., Ekström K., Bossios A., Sjöstrand M., Lee J.J., Lötvall J.O. // Nat. Cell Biol. 2007. V. 9. № 6. P. 654–659.
- Mulcahy L.A., Pink R.C., Carter D.R.F. // J. Extracell. Vesicles. 2014. V. 3. № 1. P. 24641.
- Lv L.-H., Wan Y.-L., Lin Y., Zhang W., Yang M., Li G.-L., Lin H.-M., Shang C.-Z., Chen Y.-J., Min J. // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. № 19. P. 15874–15885.
- Lespagnol A., Duflaut D., Beekman C., Blanc L., Fiucci G., Marine J.-C., Vidal M., Amson R., Telerman A. // Cell Death Differ. 2008. V. 15. № 11. P. 1723–1733.
- Brinton L.T., Sloane H.S., Kester M., Kelly K.A. // Cell. Mol. Life Sci. 2015. V. 72. № 4. P. 659–671.
- Ludwig N., Whiteside T.L., Reichert T.E. // Intern. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 19. P. 4684.
- Bebelmann M.P., Smit M.J., Pegtel D.M., Baglio S.R. // Pharmacology & Therapeutics. 2018. V. 188. P. 1–11.
- Czernek L., Döchler M. // Arch. Immunol. Ther. Exp. 2017. V. 65. № 4. P. 311–323.
- Barros F.M., Carneiro F., Machado J.C., Melo S.A. // Front. Immunol. 2018. V. 9. P. 730.
- Aiello S., Rocchetta F., Longaretti L., Faravelli S., Todeschini

- M., Cassis L., Pezzuto F., Tomasoni S., Azzollini N., Mister M., et al. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 11518.
11. Gutiérrez-Vázquez C., Villarroya-Beltri C., Mittelbrunn M., Sánchez-Madrid F. // *Immunol. Rev.* 2013. V. 251. № 1. P. 125–142.
 12. Hurwitz S.N., Rider M.A., Bundy J.L., Liu X., Singh R.K., Meckes D.G. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 52. P. 86999–87015.
 13. Haderk F., Schulz R., Iskar M., Cid L.L., Worst T., Willmund K.V., Schulz A., Warnken U., Seiler J., Benner A., et al. // *Sci. Immunol.* 2017. V. 2. № 13. P. eaah5509.
 14. Robbins P.D., Morelli A.E. // *Nat. Rev. Immunol.* 2014. V. 14. № 3. P. 195–208.
 15. Zhang B., Yin Y., Lai R.C., Lim S.K. // *Front. Immunol.* 2014. V. 5. P. 518.
 16. Guescini M., Guidolin D., Vallorani L., Casadei L., Gioacchini A.M., Tibollo P., Battistelli M., Falcieri E., Battistin L., Agnati L.F., et al. // *Exp. Cell Res.* 2010. V. 316. № 12. P. 1977–1984.
 17. Théry C., Ostrowski M., Segura E. // *Nat. Rev. Immunol.* 2009. V. 9. № 8. P. 581–593.
 18. Greening D.W., Gopal S.K., Xu R., Simpson R.J., Chen W. // *Seminars in Cell & Developmental Biology.* 2015. V. 40. P. 72–81.
 19. Kahlert C., Kalluri R. // *J. Mol. Med.* 2013. V. 91. № 4. P. 431–437.
 20. Kahlert C., Melo S.A., Protopopov A., Tang J., Seth S., Koch M., Zhang J., Weitz J., Chin L., Futreal A., et al. // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. № 7. P. 3869–3875.
 21. Abels E.R., Breakefield X.O. // *Cell. Mol. Neurobiol.* 2016. V. 36. № 3. P. 301–312.
 22. Batagov A.O., Kuznetsov V.A., Kurochkin I.V. // *BMC Genomics.* 2011. V. 12 Suppl 3. P. S18.
 23. Kim D.-K., Kang B., Kim O.Y., Choi D., Lee J., Kim S.R., Go G., Yoon Y.J., Kim J.H., Jang S.C., et al. // *J. of Extracellular Vesicles.* 2013. V. 2. № 1. P. 20384.
 24. Kalra H., Simpson R.J., Ji H., Aikawa E., Altevogt P., Askenase P., Bond V.C., Borràs F.E., Breakefield X., Budnik V., et al. // *PLoS Biology.* 2012. V. 10. № 12. P. e1001450.
 25. Keerthikumar S., Chisanga D., Ariyaratne D., Saffar H.A., Anand S., Zhao K., Samuel M., Pathan M., Jois M., Chilamkurti N., et al. // *J. Mol. Biol.* 2016. V. 428. № 4. P. 688–692.
 26. Mathieu M., Martin-Jaular L., Lavieu G., Théry C. // *Nat. Cell Biol.* 2019. V. 21. № 1. P. 9–17.
 27. Trajkovic K., Hsu C., Chiantia S., Rajendran L., Wenzel D., Wieland F., Schwille P., Brugger B., Simons M. // *Science.* 2008. V. 319. № 5867. P. 1244–1247.
 28. Ghossoub R., Lembo F., Rubio A., Gaillard C.B., Bouchet J., Vitale N., Slavik J., Machala M., Zimmermann P. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. № 1. P. 3477.
 29. Christ L., Raiborg C., Wenzel E.M., Campsteijn C., Stenmark H. // *Trends Biochem. Sci.* 2017. V. 42. № 1. P. 42–56.
 30. Hoshino D., Kirkbride K.C., Costello K., Clark E.S., Sinha S., Grega-Larson N., Tyska M.J., Weaver A.M. // *Cell Rep.* 2013. V. 5. № 5. P. 1159–1168.
 31. Kalra H., Drummen G., Mathivanan S. // *IJMS.* 2016. V. 17. № 2. P. 170.
 32. Hessvik N.P., Llorente A. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2018. V. 75. № 2. P. 193–208.
 33. Stuffers S., Sem Wegner C., Stenmark H., Brech A. // *Traffic.* 2009. V. 10. № 7. P. 925–937.
 34. Kosaka N., Iguchi H., Hagiwara K., Yoshioka Y., Takeshita F., Ochiya T. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 15. P. 10849–10859.
 35. Willert T., Hurley J.H. // *Nature.* 2010. V. 464. № 7290. P. 864–869.
 36. Maas S.L.N., Breakefield X.O., Weaver A.M. // *Trends in Cell Biology.* 2017. V. 27. № 3. P. 172–188.
 37. Mathivanan S., Ji H., Simpson R.J. // *J. Proteomics.* 2010. V. 73. № 10. P. 1907–1920.
 38. Wiklander O.P.B., Brennan M.Á., Lötval J., Breakefield X.O., EL Andaloussi S. // *Science Translational Medicine.* 2019. V. 11. № 492. P. eaav8521.
 39. de Vrij J., Maas S.L.N., Kwappenberg K.M.C., Schnoor R., Kleijn A., Dekker L., Luider T.M., de Witte L.D., Litjens M., van Strien M.E., et al. // *Int. J. Cancer.* 2015. V. 137. № 7. P. 1630–1642.
 40. Whiteside T.L. // *Biochem. Soc. Trans.* 2013. V. 41. № 1. P. 245–251.
 41. Sakaguchi S., Yamaguchi T., Nomura T., Ono M. // *Cell.* 2008. V. 133. № 5. P. 775–787.
 42. Matzinger P. // *Annu. Rev. Immunol.* 1994. V. 12. P. 991–1045.
 43. Schwartz R.H. // *Science.* 1990. V. 248. № 4961. P. 1349–1356.
 44. Steinman R.M., Turley S., Mellman I., Inaba K. // *J. Exp. Med.* 2000. V. 191. № 3. P. 411–416.
 45. van Parijs L., Abbas A.K. // *Science.* 1998. V. 280. № 5361. P. 243–248.
 46. Shinohara H., Kuranaga Y., Kumazaki M., Sugito N., Yoshikawa Y., Takai T., Taniguchi K., Ito Y., Akao Y. // *J. Immunol.* 2017. V. 199. № 4. P. 1505–1515.
 47. Gabrusiewicz K., Li X., Wei J., Hashimoto Y., Marisetty A.L., Ott M., Wang F., Hawke D., Yu J., Healy L.M., et al. // *Oncoimmunology.* 2018. V. 7. № 4. P. e1412909.
 48. Andreola G., Rivoltini L., Castelli C., Huber V., Perego P., Deho P., Squarcina P., Accornero P., Lozupone F., Lugini L., et al. // *J. Exp. Med.* 2002. V. 195. № 10. P. 1303–1316.
 49. Keryer-Bibens C., Pioche-Durieu C., Villemant C., Souquère S., Nishi N., Hirashima M., Middeldorp J., Busson P. // *BMC Cancer.* 2006. V. 6. P. 283.
 50. Wieckowski E.U., Visus C., Szajnik M., Szczepanski M.J., Storkus W.J., Whiteside T.L. // *J. Immunol.* 2009. V. 183. № 6. P. 3720–3730.
 51. Sprent J. // *Blood Cells, Molecules, and Diseases.* 2005. V. 35. № 1. P. 17–20.
 52. Martínez-Lorenzo M.J., Anel A., Alava M.A., Piñeiro A., Naval J., Lasierra P., Larrad L. // *Exp. Cell Res.* 2004. V. 295. № 2. P. 315–329.
 53. Klibi J., Niki T., Riedel A., Pioche-Durieu C., Souquère S., Rubinstein E., Le Moulec S., Guigay J., Hirashima M., Guemira F., et al. // *Blood.* 2009. V. 113. № 9. P. 1957–1966.
 54. Wieckowski E., Whiteside T.L. // *Immunol. Res.* 2006. V. 36. № 1–3. P. 247–254.
 55. Taylor D.D., Gerçel-Taylor Ç., Lyons K.S., Stanson J., Whiteside T.L. // *Clin. Cancer Res.* 2003. V. 9. № 14. P. 5113.
 56. González S., López-Soto A., Suarez-Alvarez B., López-Vázquez A., López-Larrea C. // *Trends Immunol.* 2008. V. 29. № 8. P. 397–403.
 57. Ljunggren H.-G. // *Immunity.* 2008. V. 28. № 4. P. 492–494.
 58. Jamieson A.M., Diefenbach A., McMahon C.W., Xiong N., Carlyle J.R., Raulet D.H. // *Immunity.* 2002. V. 17. № 1. P. 19–29.
 59. Gasser S., Orsulic S., Brown E.J., Raulet D.H. // *Nature.* 2005. V. 436. № 7054. P. 1186–1190.
 60. Clayton A., Mitchell J.P., Court J., Linnane S., Mason M.D., Tabi Z. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. № 11. P. 7249–7258.
 61. Clayton A., Tabi Z. // *Blood Cells Mol. Dis.* 2005. V. 34. № 3. P. 206–213.
 62. Lundholm M., Schröder M., Nagaeva O., Baranov V., Widmark A., Mincheva-Nilsson L., Wikström P. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 9. P. e108925.
 63. Theodoraki M.-N., Yerneni S.S., Hoffmann T.K., Gooding W.E., Whiteside T.L. // *Clin. Cancer Res.* 2018. V. 24. № 4. P. 896–905.

64. Poggio M., Hu T., Pai C.-C., Chu B., Belair C.D., Chang A., Montabana E., Lang U.E., Fu Q., Fong L., et al. // *Cell*. 2019. V. 177. № 2. P. 414–427.
65. Chen G., Huang A.C., Zhang W., Zhang G., Wu M., Xu W., Yu Z., Yang J., Wang B., Sun H., et al. // *Nature*. 2018. V. 560. № 7718. P. 382–386.
66. Li P., Liu D., Chen J., Wu J., Zhang G., Wang C., Chen J., Hu B., Li C. // *Int. J. Clin. Exp. Med*. 2019. V. 12. № 5. P. 5333–5340.
67. Kim D.H., Kim H., Choi Y.J., Kim S.Y., Lee J.-E., Sung K.J., Sung Y.H., Paek C.-G., Jung M., Han B., et al. // *Exp. Mol. Med*. 2019. V. 51. № 8. P. 1–13.
68. Clayton A., Al-Taei S., Webber J., Mason M.D., Tabi Z. // *J. Immunol*. 2011. V. 187. № 2. P. 676–683.
69. Borsellino G., Kleinewietfeld M., Di Mitri D., Sternjak A., Diamantini A., Giometto R., Höpner S., Centonze D., Bernardi G., Dell'Acqua M.L., et al. // *Blood*. 2007. V. 110. № 4. P. 1225–1232.
70. Welihinda A.A., Kaur M., Greene K., Zhai Y., Amento E.P. // *Cell. Signal*. 2016. V. 28. № 6. P. 552–560.
71. Muller L., Simms P., Hong C.-S., Nishimura M.I., Jackson E.K., Watkins S.C., Whiteside T.L. // *Oncoimmunology*. 2017. V. 6. № 8. P. e1261243.
72. Smyth L.A., Ratnasothy K., Tsang J.Y.S., Boardman D., Warley A., Lechler R., Lombardi G. // *Eur. J. Immunol*. 2013. V. 43. № 9. P. 2430–2440.
73. Li J., Tian T., Zhou X. // *Critical Reviews in Oncology/Hematology*. 2019. V. 137. P. 27–34.
74. Strauss L., Bergmann C., Whiteside T.L. // *J. Immunol*. 2009. V. 182. № 3. P. 1469–1480.
75. Szajnik M., Czystowska M., Szczepanski M.J., Mandapathil M., Whiteside T.L. // *PLoS One*. 2010. V. 5. № 7. P. e11469.
76. Czystowska M., Strauss L., Bergmann C., Szajnik M., Rabinowich H., Whiteside T.L. // *J. Mol. Med. (Berl)*. 2010. V. 88. № 6. P. 577–588.
77. Charbonneau B., Moysich K.B., Kalli K.R., Oberg A.L., Vierkant R.A., Fogarty Z.C., Block M.S., Maurer M.J., Goergen K.M., Fridley B.L., et al. // *Cancer Immunol. Res*. 2014. V. 2. № 4. P. 332–340.
78. Duan M.-C., Zhong X.-N., Liu G.-N., Wei J.-R. // *J. Immunol. Res*. 2014. V. 2014. P. 730380.
79. Zhou J., Li X., Wu X., Zhang T., Zhu Q., Wang X., Wang H., Wang K., Lin Y., Wang X. // *Cancer Immunol. Res*. 2018. V. 6. № 12. P. 1578–1592.
80. Zheng Y., Wang Z., Deng L., Zhang G., Yuan X., Huang L., Xu W., Shen L. // *Clin. Immunol*. 2015. V. 157. № 1. P. 65–77.
81. Chalmin F., Ladoire S., Mignot G., Vincent J., Bruchard M., Remy-Martin J.-P., Boireau W., Rouleau A., Simon B., Lanneau D., et al. // *J. Clin. Invest*. 2010. V. 120. № 2. P. 457–471.
82. Muller L., Mitsuhashi M., Simms P., Gooding W.E., Whiteside T.L. // *Sci. Rep*. 2016. V. 6. № 1. P. 20254.
83. Chen L., Hasni M.S., Jondal M., Yakimchuk K. // *Autoimmunity*. 2017. V. 50. № 6. P. 370–376.
84. Guery L., Hugues S. // *Front. Immunol*. 2013. V. 4. P. 59.

УДК 577.29

Дарпины – перспективные адресные белки для тераностики

О. Н. Шилова*, С. М. Деев

Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

*E-mail: olga.shilova.n@gmail.com

Поступила в редакцию 02.09.2019

Принята к печати 08.10.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-42-53

РЕФЕРАТ Классической основой адресной терапии являются моноклональные антитела, однако разработка альтернативных связывающих белков позволила использовать в качестве нацеливающих модулей белки неиммуноглобулиновой природы. Дарпины – каркасные белки на основе анкириновых повторов, обладают такими преимуществами перед антителами, как малый размер, стабильность в широком диапазоне температур и значений pH, низкая склонность к агрегации и легкость наработки в гетерологичных системах экспрессии. Различия в строении паратопа дарпинов и антител расширяют спектр молекул-мишеней, а легкость создания гибридных белков слияния позволяет получать биспецифические и мультивалентные конструкции. В представленном обзоре суммированы данные последних лет о разработке терапевтических и визуализирующих соединений на основе дарпинов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА адресная терапия, барназа, дарпин, наночастицы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ DARPin – искусственный белок с анкириновыми повторами, дарпин (Designed Ankyrin Repeat Protein); scFv – одноцепочечный вариабельный фрагмент антитела; HER2 – рецептор эпидермального фактора роста человека 2; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста человека 1; EpcAM – молекула адгезии эпителиальных клеток; IgE – иммуноглобулин E.

ВВЕДЕНИЕ

Разработка гибридной технологии, описанной Кёлером и Мильштейном (Kohler, Milstein) в 1975 году [1], сделала возможным получение моноклональных антител, которые стали использоваться как в исследованиях, так и в диагностике и терапии, благодаря высокой аффинности и специфичности, став той «магической пулей», на которой основана таргетная терапия. Первые терапевтические моноклональные антитела были получены в 1986 году. На данный момент Американским управлением по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (Food and Drug Administration, FDA) для клинического применения одобрено 82 моноклональных антитела, и это число продолжает расти. Однако и у антител есть свои недостатки: их сравнительно большой размер (150 кДа) может ограничивать проникновение как в нормальные ткани [2], так и в солидные опухоли [3], а константная часть помимо увеличения времени циркуляции в крови может вызывать и нежелательные эффекты [4]. Кроме того, полноразмерные антитела требуют сложного фолдинга и специфического гликозилирования и потому должны нарабатываться в клетках млекопитающих, что сильно удорожает

производство. Еще одну проблему представляет гомология между белками мыши и человека, что затрудняет отбор антител к консервативным белкам.

Многие из этих трудностей были преодолены получением укороченных и одноцепочечных вариантов антител. Развитие технологии рекомбинантных антител привело к тому, что классическая иммунизация была заменена полностью синтетическими библиотеками, не зависящими от ограничений на аутоспецифичность лимфоцитов. В дальнейшем разработанные при этом методы отбора молекул по аффинности к лиганду стали применяться для других белков, что позволило обойтись без самих антител [5]. В 2018 году значимость этих работ была подтверждена присуждением Нобелевской премии по химии за изучение «Направленной эволюции ферментов и связывающих белков». Одну половину премии получила американский ученый-биоинженер Френсис Арнольд (Frances H. Arnold) «за направленную эволюцию ферментов»; вторую половину премии получили Джордж Смит (George P. Smith) и сэр Грегори Уинтер (Sir Gregory P. Winter) «за фаговый дисплей пептидов и антител». За последние 20 лет с помощью этих технологий создано множество альтернативных каркасных белков, таких,

как монободы (получены из фибронектина III типа FN3), антикарины (получены из липокалинов), аффибоды (получены из иммуноглобулинсвязывающего белка А) и дарпины (получены из анкириновых повторов). Такие белки, как и антитела, обычно имеют «константную» каркасную часть и «вариабельные» участки, замены аминокислот в которых не приводят к изменению пространственной структуры белка [6]. Получение альтернативных каркасных белков (скаффолдов) состоит из двух стадий: 1) создание библиотеки белковых вариантов путем случайного или сайт-направленного мутагенеза и 2) отбор полученных молекул с помощью фагового, дрожжевого или рибосомного дисплея, связывающего генотип (последовательность гена белка) и фенотип (способность связываться с мишенью).

К преимуществам указанных альтернативных белков можно отнести их малый размер, облегчающий проникновение в опухоль, отсутствие константной части антител, позволяющее избегать цитотоксичности, опосредованной антителами и молекулами системы комплемента, во многих случаях высокая термостабильность, позволяющая долгое время хранить препарат при комнатной температуре без потери активности, легкость наработки в микроорганизмах и даже возможность прямого химического синтеза. Кроме того, создавать и нарабатывать биспецифические молекулы из альтернативных белков гораздо проще, чем получать биспецифические антитела. Еще одно преимущество таких молекул – независимость от иммунизации животных, что упрощает процедуру и расширяет спектр возможных молекул-мишеней за счет включения в него высококонсервативных белков [4].

Многие типы альтернативных скаффолдов созданы на основе белков с повторяющимися мотивами: лейцин-богатые повторы (leucine-rich repeat, LRR), анкириновые повторы (Ankyrin repeat, AR), повторы Armadillo (ArmRP), тетратрикопептидные повторы (TPR). Белки на основе повторов активно используются, поскольку имеют протяженную связывающую поверхность, размер которой можно варьировать, и жесткую каркасную часть, сформированную «константными» участками [7]. В данной работе обсуждаются дарпины – искусственные белки, созданные на основе анкириновых повторов. В эукариотической клетке белки, построенные из анкириновых повторов, связываются с самыми разными мишенями, обеспечивая организацию цитоскелета и регуляцию активности ферментов [8]. Исходное разнообразие таких белков использовано для создания консенсусного мотива, содержащего вариабельные участки и способного объединяться с соседними мотивами в единую жесткую структуру (рис. 1А, В).

ИСПОЛЬЗОВАНИЕ ОСОБЕННОСТЕЙ СТРОЕНИЯ ДАРПИНОВ В НАУЧНЫХ ИССЛЕДОВАНИЯХ И BIOTECHNOLOGII

В качестве связывающих молекул дарпины могут применяться в большинстве технологий, использующих укороченные варианты моноклональных антител. Однако помимо малого размера дарпины обладают и другими полезными свойствами. Легкость наработки в бактериях позволяет создавать белки слияния, добавлять последовательности для очистки и мечения, а отсутствие остатков цистеина в исходной молекуле дарпина позволяет ввести уникальный дополнительный цистеин для точной конъюгации.

Дарпины состоят из плотно упакованных анкириновых повторов, каждый из которых образует β -поворот и две антипараллельные α -спирали. Как правило, такой повтор состоит из 33 аминокислот, шесть из которых образуют связывающую поверхность. При создании рекомбинантных библиотек в эти позиции помещают кодоны случайных аминокислот, за исключением цистеина (чтобы избежать образования дисульфидных связей), а также глицина и пролина (так как некоторые аминокислоты входят в состав α -спирали) [6]. Как правило, дарпины образованы 2–3 связывающими мотивами, заключенными между N- и C-концевыми мотивами, экранирующими гидрофобные области (рис. 1). Дарпины – маленькие белки (14–18 кДа), чрезвычайно термостабильные (T_m , температура плавления, может достигать 90°C), устойчивые к протеазам и денатурирующим агентам. Они могут нарабатываться в бактериях с высоким выходом – до 200 мг белка с 1 л жидкой культуры [6].

Оба конца полипептидной цепи дарпинов формируют альфа-спирали, что облегчает создание геометрически точных мультимеров. Так, на основе двух дарпинов, узнающих разные, но перекрывающиеся эпитопы зеленого флуоресцентного белка, при помощи компьютерного моделирования был создан молекулярный «зажим», обхватывающий молекулу GFP с образованием стабильного комплекса, тем не менее сохраняющего обратимость связывания. Такие зажимы были использованы для ориентированной посадки на чип для поверхностного плазмонного резонанса белков, слитых с GFP, и для хроматографической очистки таких белков на сефарозе, конъюгированной с данным дидарпином. Дидарпины, конъюгированные с флуоресцентным красителем, помогли усилить сигнал от редких GFP-меченых белков на поверхности клеток и позволили точнее детектировать их проточной цитометрией [9].

При помощи компьютерного моделирования создан дарпин, формирующий тример за счет добавленного к нему тримеризующего мотива и связывающийся с тримерным белком аденовируса пятого

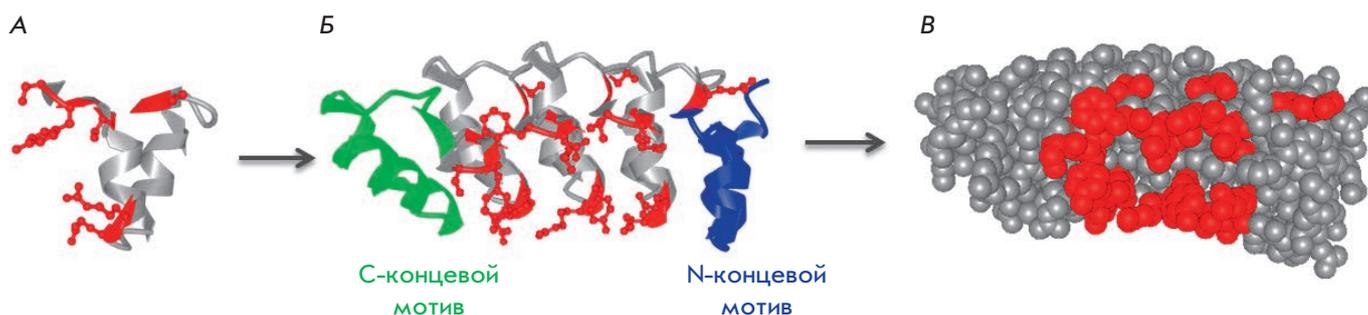


Рис. 1. Строение дарпинов. А – строение консенсусного анкиринового повтора, константная часть обозначена серым цветом, переменные участки – красным цветом. Б – строение молекулы дарпина. Два или три центральных мотива формируют связывающую поверхность за счет переменных аминокислот (обозначены красным цветом), гидрофобные участки экранированы С- и N-концевыми мотивами. В – пространственная структура дарпина, переменные аминокислоты выделены красным

серотипа (Ad5). Для этого белка была показана способность практически необратимо связываться с оболочкой аденовируса. При этом добавление еще одного дарпина, специфичного к рецептору клетки-мишени, позволило эффективно заражать клетки, экспрессирующие соответствующий онкомаркер (HER2, EGFR или EpCAM) [10].

Жесткость и малый размер дарпинов позволили создавать димеры, влияющие на проведение сигнала от внеклеточных рецепторов за счет фиксации рецепторов в определенных конформациях или сближения молекул, генерирующих конкурирующие сигналы. Так, при помощи бивалентного дарпина удалось избирательно подавить активность тучных клеток, связавших иммунные комплексы на основе IgE. Один из модулей этого димера с высокой аффинностью узнает константную часть IgE, связавшуюся с FcεRI, другой связывается с низкоаффинным FcγRIIB, оказывающим ингибирующее действие на тучные клетки. Данный рекомбинантный белок специфически подавляет дегрануляцию тучных клеток *in vivo* [11]. Аналогичный подход применен для создания биспецифического дидарпина, блокирующего проведение митогенного сигнала от рецептора HER2 и оказывающего цитотоксический эффект на HER2-положительные раковые клетки [12].

Помимо мультимеров с использованием гибких линкеров дарпины могут объединяться и в жесткие конструкции за счет введения альтернативных С- и N-концевых мотивов, имеющих общую альфа-спираль. Дарпины в таких ди- и тримерах по-прежнему могут одновременно связывать свои мишени, стабилизируя их для кристаллизации [13]. Один из таких дарпинов, улучшавший кристаллизацию партнеров, использован для создания жестких димеров с дарпинами, специфичными к JNK1, что позволило получить кристаллы этих комплексов и выявить структурные особенности, объясняющие специфичность

дарпинов к изоформе киназы и их способность ингибировать ее активность [14].

К недостаткам дарпинов как связывающих модулей можно отнести их вогнутую связывающую поверхность, жесткость и неполную рандомизацию переменных участков, что потенциально может ограничивать спектр возможных мишеней. Однако и эти ограничения можно преодолеть: для этого созданы дарпины нового поколения – LoopDARPin, в которых центральный β-поворот заменен на более длинную выпуклую петлю H3 из молекулы иммуноглобулина. Эта вставка позволила изменить геометрию антигенсвязывающей поверхности, ввести гибкий участок с большим количеством переменных аминокислотных остатков и улучшить селективность связывания [15].

Однако вогнутая связывающая поверхность дарпинов может служить и их преимуществом. Воспользоваться им позволяет еще одно свойство дарпинов – отсутствие остатков цистеина в белке, что позволяет ввести единственный цистеин в участок вблизи поверхности взаимодействия с мишенью и использовать его для конъюгации. В работе Kummer и соавт. [16] дарпин, специфичный к фосфорилированной форме ERK (pERK), был конъюгирован с мероцианиновым красителем, чувствительным к окружению – интенсивность его флуоресценции возрастает в гидрофобном окружении, т.е. когда дарпин связывается с pERK. Таким образом, создан биосенсор, позволяющий детектировать фосфорилирование ERK. Поскольку показано, что дарпин распознает не сам фосфат, а изменение конформации активационной петли [17], то этот подход может использоваться и для других белков, меняющих конформацию в ходе функционирования.

Таким образом, даже относительные недостатки дарпинов могут быть использованы для создания уникальных конструкций. В свою очередь, преиму-

щества дарпинов позволили найти множество применений этим белкам, в первую очередь в терапии и диагностике онкологических заболеваний.

ПРИМЕНЕНИЕ ДАРПИНОВ В ДИАГНОСТИКЕ И ТЕРАПИИ РАКА

Принципы создания дарпинов были описаны в 2003 году [18], а уже в 2007 году эту технологию применили для создания высокоаффинных белков, связывающихся с онкомаркером HER2 [19]. Впоследствии были получены дарпины, связывающиеся с другими молекулами, вовлеченными в канцерогенез: EpCAM [20], EGFR [21], VEGF [22], HGF [22], катепсином В [23], KRAS [24] и др. Однако на сегодняшний день больше всего адресных агентов разработано на основе дарпинов, связывающихся с HER2. Очевидно, это связано с терапевтической значимостью их мишени. Белок HER2 (ErbB2) является тирозинкиназным рецептором, экспрессируемым в незначительном количестве на поверхности эпителиальных клеток человека. В норме HER2 участвует в различных внутриклеточных путях передачи сигнала, но главным образом стимулирует HER3/PI3K/Akt-путь и каскады активируемых митогенами протеинкиназ (MAP) [25], что приводит к пролиферации клеток. Антиген HER2 избыточно экспрессируется в 20–30% опухолей молочной железы и яичников, поддерживая агрессивные свойства опухоли, а определение уровня экспрессии HER2 включено в стандартные протоколы диагностики рака молочной железы [26]. Амплификация гена *ERBB2* может наблюдаться также в клетках аденокарцином желудка и кишечника [27], карцином яичника [28], эндометрия [29], предстательной железы [30], а также слюнных желез, влагалища, шейки матки и мочевого пузыря [31]. В настоящий момент в терапии HER2-положительного рака применяют два мышиных гуманизированных антитела: трастузумаб (Herceptin, Roche-Genentech), связывающийся с субдоменом IV HER2; и пертузумаб (Perjeta, Roche-Genentech), связывающийся с субдоменом II рецептора [32]. Кроме того, применяется трастузумаб, конъюгированный с ингибитором сборки микротрубочек (трастузумаб-эмтазин, Kadcyla, Roche) [33] и два химических ингибитора тирозинкиназного домена: лапатиниб (Tykerb или Tyverb, GlaxoSmithKlein) [34] и нератиниб (Nerlynx, Pfizer) [35]. Эти препараты одобрены для лечения HER2-положительного рака молочной железы, рака желудка и гастроэзофагеального рака [36], однако в ближайшем будущем показания к их применению могут быть расширены. Согласно результатам исследования MY PATHWAY, достоверный ответ на терапию трастузумабом и пертузумабом показали пациенты с 9 типами HER2-положительных опухолей: колоректальный рак (38% пациентов), рак мочевого

пузыря (33%), рак желчного пузыря (29%), рак слюнной железы (80%), немелкоклеточный рак легкого (13%), рак поджелудочной железы (22%), рак яичника (13%), рак предстательной железы и рак кожи (единичный пациент в каждом случае) [37]. Отсюда можно заключить, что потенциал HER2-специфичной таргетной терапии не исчерпывается раком молочной железы и желудка. При этом существующая таргетная HER2-направленная терапия действительно повышает эффективность лечения, однако полное излечение или продолжительность жизни пациентов более 5 лет по-прежнему являются редкими событиями, что стимулирует поиск новых препаратов.

Основные способы применения дарпинов в разработке препаратов для диагностики и терапии рака суммированы на рис. 2.

Визуализация опухоли важна для предклинических испытаний препаратов на животных, для установления диагноза пациенту и оценки эффективности терапии. В животных моделях могут применяться флуоресцентные дальнекрасные белки, позволяющие осуществлять прижизненную визуализацию, такие, как mCherry [38]. На основе mCherry и HER2-специфичного DARPIn 9_29 создан рекомбинантный белок DARPIn-mCherry, специфично окрашивающий HER2-положительные раковые клетки [39] и использующийся для функционализации наночастиц [40–43] как описано ниже.

В случае визуализации опухоли в организме человека применяют радионуклиды, избирательно накапливающиеся в опухоли. Мономерные дарпины могут служить связывающими модулями для радиоиммунной диагностики, использующей высокоаффинный белок, конъюгированный с носителем радионуклида, как правило, хелатором или квазиковалентными комплексами технеция [44]. Исходно эта технология была разработана для одноцепочечных антител, однако вскоре ее применили и для других каркасных белков, так как основные требования, предъявляемые к связывающим модулям для радиоиммунной диагностики, включают высокую аффинность и малый размер [45, 46]. Дарпины, сочетающие в себе оба этих свойства, могут успешно использоваться для радиоактивной визуализации опухолей. Так, на основе HER2-специфичных дарпинов G3 и 9_29 получены конъюгаты с желаемой фармакокинетикой и пониженным накоплением в печени [47–49].

Что касается терапии рака, то дарпины могут служить как для доставки токсических модулей, так и для ингибирования сигнальных путей клетки за счет специфического связывания мембранных рецепторов. Биспецифический дидарпин с линкером определенной длины дал возможность зафиксировать внеклеточные части соседних рецепторов HER2

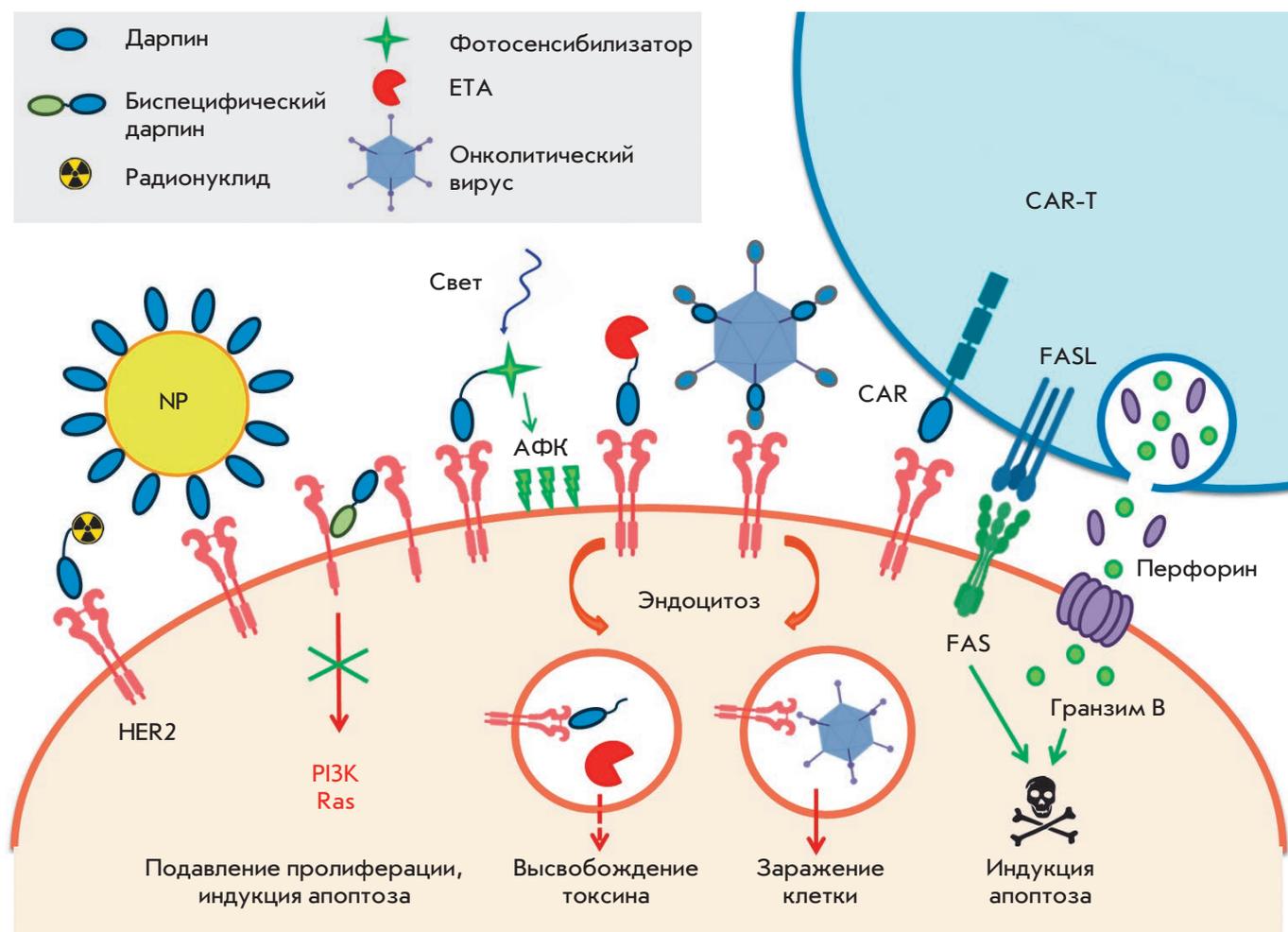


Рис. 2. Применение дарпинов для визуализации и уничтожения раковых клеток. Дарпины могут ингибировать сигнальные молекулы клетки, подавляя пролиферацию клеток или служить направляющими модулями для доставки различных агентов: радионуклидов, наночастиц или липосом, фотосенсибилизаторов, белковых токсинов, онколитических вирусов и лимфоцитов с химерными антигенными рецепторами. HER2 – рецептор эпидермального фактора роста человека 2, NP – наночастица, АФК – активные формы кислорода, PI3K – фосфоинозитид-3-киназа, Ras – малая GTP-аза Ras, CAR – химерный антигенный рецептор, CAR-T – Т-лимфоцит, несущий на поверхности химерный антигенный рецептор, FAS – рецептор смерти (CD95, APO-1) индуктор внешнего пути запуска апоптоза, FASL – лиганд рецептора FAS (CD95L, CD178), ETA – укороченный вариант экзотоксина A *Pseudomonas aeruginosa*

в нефункциональной конформации, не позволяющей образовывать димеры и проводить митогенный сигнал, что вызывало цитостатический и цитотоксический эффект для HER2-зависимых раковых клеток [12]. На основе этого димера создан препарат MP0274, тетрадарпин, содержащий модули, распознающие домены I и IV рецептора HER2, и два модуля, связывающихся с сывороточным альбумином человека, которые увеличивают время циркуляции белка в крови. В 2017 году началась I стадия клинических испытаний этого препарата [50].

Клинические испытания проходит и еще один мультивалентный дарпин – MP0250. Этот белок со-

держит в одной полипептидной цепи модуль, специфичный к фактору роста эндотелия сосудов VEGF-A, модуль, специфичный к фактору роста гепатоцитов HGF, и два модуля, связывающиеся с сывороточным альбумином человека [22]. Таким образом, препарат ингибирует сразу два важных для раковых клеток сигнальных пути: VEGF/VEGFR и HGF/cMet, а связывание с альбумином позволяет добиться длительной циркуляции. MP0250 – первый мультимерный дарпин, проверенный на пациентах [51], в ходе первой фазы клинических испытаний этот препарат хорошо переносился в дозах, достаточных для подавления активности VEGF. В 2018 году началась Ib/II

стадия клинических испытаний MP0250 в сочетании с осимертинибом для лечения пациентов с неплазматическим немелкоклеточным раком легкого (non-squamous non-small cell lung cancer, NSCLC) с мутировавшим EGFR [52]. В 2017 году началась II стадия клинических испытаний MP0250 в сочетании с бортезомибом и дексаметазоном для лечения пациентов с резистентной и рецидивирующей множественной миеломой (refractory and relapsed multiple myeloma, RRMM) [53].

Еще один способ создания дарпинов с желаемой фармакокинетикой – конъюгация с полиэтиленгликолем и применение конъюгатов локально. Один из таких конъюгатов, специфичный к VEGF абиципар, применяется при возрастной дегенерации сетчатки (neovascular age-related macular degeneration, ADE) и диабетическом макулярном отеке (diabetic macular edema, DME) [54]. Этот препарат находится на третьей стадии клинических испытаний.

ОПУХОЛЕСПЕЦИФИЧЕСКИЕ ТОКСИНЫ НА ОСНОВЕ ДАРПИНОВ

Легкость получения дарпинов в бактериальной системе экспрессии дала толчок к созданию противоопухолевых агентов на основе белковых токсинов. Экзотоксин *A Pseudomonas aeruginosa* (PE, ETA) является одним из наиболее эффективных индукторов апоптоза за счет собственной ферментативной активности, угнетающей трансляцию. PE состоит из трех доменов: домен I специфичен к рецептору α -2-микроглобулина животных клеток (LRP1, CD369), он обеспечивает интернализацию молекулы токсина в клетку; домен II содержит сайты протеолиза фурином и дисульфидные связи, восстанавливаемые белок-дисульфидизомеразой, участвующими таким образом во внутриклеточном процессинге молекулы; домен III обладает собственной каталитической активностью – ADP-рибозилирует эукариотический eEF2, блокируя тем самым биосинтез белка в клетке, что в итоге приводит к ее гибели [55]. Доменное строение экзотоксина дает возможность использовать его укороченные варианты, сохраняющие каталитическую активность, заменяя при этом собственный связывающий домен на направляющие молекулы желаемой специфичности. При этом агенту достаточно проникнуть в эндосому, где эффекторный модуль отрезается фуриновой протеазой, после чего токсин при помощи сигнала ретроградного транспорта KDE1 транспортируется в эндоплазматический ретикулум, откуда высвобождается в цитозоль [56].

Дарпин Ec4, специфичный к ErCAM, использован для доставки укороченного варианта экзотоксина *A P. aeruginosa* к клеткам рака прямой кишки линии HT29. Полученный белок DARPin-ETA показал про-

тивоопухолевую активность как *in vitro*, так и *in vivo* [57]. ETA был использован и для подавления роста HER2-положительных опухолей. Поскольку DARPin 9_29 эффективно вызывает интернализацию HER2 в комплексе с присоединившимся белком [58], этот адресный модуль хорошо подходит для доставки фрагментов экзотоксина к раковым клеткам. На основе модуля DARPin 9_29 и фрагмента экзотоксина *A P. aeruginosa* массой 40 кДа был создан адресный токсин DARPin-PE40, который успешно индуцировал апоптоз в клетках, сверхэкспрессирующих HER2, проявляя избирательную токсичность *in vitro*, и эффективно подавлял рост клеток рака молочной железы в ксенографтной модели [59].

Одну из проблем противоопухолевых агентов на основе псевдомонадного экзотоксина представляет их высокая иммуногенность. Будучи белком бактериального происхождения, ETA вызывает образование нейтрализующих антител, которые снижают эффективность терапии и повышают риск анафилактических реакций. Для решения этой проблемы разработаны различные подходы: мутагенез PE с последующей химической модификацией (ПЭГилированием), подавление иммунной системы пациента, выявление и элиминация путем мутагенеза иммунодоминантных эпитопов В- и Т-лимфоцитов. Последний из названных подходов наиболее универсален и совместим с разными схемами терапии опухолей [60]. DARPin-LoPE, содержащий фрагмент экзотоксина с удаленными или мутированными иммунодоминантными эпитопами, показал избирательную токсичность в отношении HER2-сверхэкспрессирующих клеток *in vitro* в пикомолярном диапазоне концентраций [61] и эффективно подавлял рост клеток рака яичника в ксенографтной модели [62]. При этом неспецифическая токсичность и иммуногенность DARPin-LoPE были ниже, чем у DARPin-PE40, и вклад дарпина в эти побочные эффекты был незначительным.

ПРИМЕНЕНИЕ ДАРПИНОВ В АДРЕСНОЙ ФОТОДИНАМИЧЕСКОЙ ТЕРАПИИ

Фотодинамическая терапия рака полагается на использование фотосенсибилизаторов, которые под действием света определенной длины волны заставляют кислород переходить в активные формы, основной из которых является синглетный кислород (1O_2) [63]. Преимущество фотодинамической терапии по сравнению с химиотерапией состоит в меньшем воздействии на нормальные ткани, поскольку освещению подвергается только определенная часть тела. Однако и такая локализация воздействия не позволяет полностью избежать таких побочных эффектов, как сенсibilизация кожи

и сетчатки глаза. Для решения этой проблемы применяются два подхода: увеличение селективности накопления фотосенсибилизатора в опухоли за счет физико-химических свойств самой молекулы и ковалентное присоединение адресных модулей к фотосенсибилизатору (таргетная фотодинамическая терапия) [64]. Первыми адресными молекулами, использованными для специфической доставки фотосенсибилизатора в опухоль, стали моноклональные антитела. Этот подход получил развитие после работы Mew D. и соавт., в которой была показана возможность прямой конъюгации гематопорфирина с моноклональным антителом к антигену миосаркомы и обнаружено преимущество полученного иммуноконъюгата перед гематопорфирином *in vivo* [65]. Дальнейшее развитие адресной фотодинамической терапии привело к созданию конъюгатов, использующих и другие нацеливающие модули, избирательно накапливающиеся в опухоли благодаря особенностям биохимии и сигнальных путей малигнизированных клеток. Так, в случае опухолей, зависимых в своем развитии от фолиевой кислоты, предложено использовать конъюгаты фотосенсибилизаторов с фолиевой кислотой. Разрабатываются пептидные лиганды, служащие средством доставки химических фотосенсибилизаторов в опухоли, клетки которых содержат на поверхности специфические интегрин и рецепторы гормонов [66].

Конъюгаты антител и фотосенсибилизаторов эффективно устраняют раковые клетки, несущие известные поверхностные маркеры, в опытах *in vitro* и *in vivo* [67]. Однако метод химической конъюгации фотосенсибилизаторов и антител имеет и ряд недостатков, таких, как низкая воспроизводимость синтеза конъюгатов, агрегация, наличие в препарате примесей неконъюгированного фотосенсибилизатора, потеря аффинности антитела к рецептору и изменение физических свойств фотосенсибилизатора [68].

Кардинальным решением этих проблем является создание генетически кодируемых гибридных молекул, содержащих и фототоксин, и направляющую часть. Это позволяет исключить необходимость химической конъюгации составных частей и сразу нарабатывать единые рекомбинантные молекулы постоянного состава, что предопределяет их стабильно воспроизводимую функциональность. Создание таких фотосенсибилизаторов стало возможным с открытием фототоксических белков, способных продуцировать активные формы кислорода при облучении светом определенной длины волны. На сегодняшний день известно два типа фототоксических белков. Это белки KillerRed [69] и KillerOrange [70], производные GFP *Aequorea victoria*, и белки miniSOG [71] и miniSOG2 [72] – производные фототропина *Arabidopsis thaliana*.

Дарпин 9_29 был использован для доставки к раковым клеткам фототоксического белка miniSOG (miniSinglet Oxygen Generator). Этот белок получен из LOV2 (Light Oxygen Voltage) домена фототропина 2 (AtPhot2) путем сайт-специфического мутагенеза. LOV-домен в качестве кофактора содержит флавинонуклеотид (FMN), который возбуждается под действием синего света, после чего энергия возбужденного состояния расходуется на образование ковалентной связи с консервативным цистеином-426. Замена цистеина-426, вступающего в эту реакцию, на глицин привела к изменению активности белка: в ответ на облучение синим светом вся энергия возбужденного состояния FMN расходуется на образование синглетного кислорода. После дополнительного мутагенеза был отобран вариант с квантовым выходом синглетного кислорода 0.47 ± 0.05 . Спектр поглощения miniSOG имеет два пика, соответствующих 448 и 473 нм, максимумы спектра флуоресценции приходятся на 500 и 528 нм [71].

Исходно белок miniSOG был разработан как генетически кодируемый маркер для электронной микроскопии: miniSOG генерирует синглетный кислород в количествах, достаточных для инициации процесса окислительной полимеризации диаминобензидина (DAB). Полимер, получаемый при окислении DAB, взаимодействует с тетраоксидом осмия, и продукт этой реакции служит меткой для электронной микроскопии. Наряду с этим существует возможность использования miniSOG в качестве токсического модуля для изучения онтогенеза, избирательной инактивации белков и применения в фотодинамической терапии [73–75].

На основе анти-HER2-мини-антитела и фототоксического белка miniSOG создан генетически кодируемый иммунофотосенсибилизатор 4D5scFv-miniSOG, который селективно уничтожает HER2-положительные клетки аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 при облучении. Показано, что в отношении этих раковых клеток 4D5scFv-miniSOG проявляет цитотоксический эффект, в 8 раз превосходящий эффект химического конъюгата порфирина с таким же адресным доменом [76]. Однако суперпродукция 4D5scFv-miniSOG в бактериях приводит к тому, что большая часть целевого белка находится в тельцах включения, и его ренатурация идет неэффективно. Замена адресного модуля на HER2-специфичный DARPIn 9_29 помогла решить проблему наработки целевого белка в бактериях в растворимом виде и добиться выхода 15 мг с 1 л жидкой культуры. DARPIn-miniSOG показал избирательную токсичность в отношении HER2-сверхэкспрессирующих клеток аденокарциномы молочной железы SK-BR-3 *in vitro* [77]. Интересно,

что благодаря флуоресцентным свойствам DARPin-miniSOG удалось оценить скорость интернализации и рециклизации HER2 [58], а также сравнить скорости интернализации 4D5scFv и DARPin 9_29 в комплексе с данным рецептором [78]. Тем не менее, для визуализации HER2-положительных раковых клеток предпочтительны другие флуоресцентные модули или красители, так как miniSOG имеет довольно низкий квантовый выход флуоресценции, а спектр излучения перекрывается с аутофлуоресценцией [79].

Дарпины могут также использоваться для доставки фототоксичных наночастиц, позволяя создавать многофункциональные противоопухолевые агенты, что мы обсудим далее.

ПРИМЕНЕНИЕ ДАРПИНОВ ДЛЯ ДОСТАВКИ НАНОЧАСТИЦ

Наноструктуры находят все более широкое применение в фундаментальных исследованиях, диагностике и терапии различных заболеваний. Некоторые виды наночастиц исходно обладают уникальными характеристиками, позволяющими использовать их для эффективного контрастирования патогенных очагов с помощью рентгеновского, инфракрасного, акустического и других видов электромагнитных излучений. Больше всего разработок ведется в области противоопухолевых наночастиц, в первую очередь из-за того, что несовершенная васкуляризация и дезорганизация клеточных контактов опухоли позволяют многим типам наночастиц проникать в опухоли более эффективно, чем в нормальные ткани [80, 81]. Преимуществом наночастиц перед низкомолекулярными и белковыми препаратами является возможность объединять в одном агенте несколько функций, в том числе нацеливать частицу на раковые клетки при помощи поверхностных модификаций. Часто с этой целью используют моноклональные антитела, однако для полноразмерных антител по-прежнему остаются актуальными проблемы их правильной ориентации и стандартизации числа антител на одной частице [82]. Помимо антител и их фрагментов для доставки наночастиц могут использоваться альтернативные скаффолды, белки, специфично поглощающиеся опухолью, такие, как факторы роста и трансферрин, аптамеры и низкомолекулярные вещества, например фолиевая кислота [56, 57].

Как и моноклональные антитела, дарпины могут использоваться для функционализации наночастиц [83]. DARPin 9_29 был использован для доставки в опухоль апконвертирующих наночастиц для фотодинамической терапии. Частицы состава $\text{NaYF}_4:\text{Yb}_3^+\text{Tm}_3^+/\text{NaYF}_4$, испускающие ультрафи-

олетовое излучение под действием инфракрасного излучения, были покрыты белком DARPin-mCherry [39], позволяющим визуализировать опухолевые клетки за счет флуоресцентного дальнекрасного модуля mCherry [40]. DARPin 9_29 и содержащий его DARPin-mCherry использованы также для покрытия золотых наночастиц диаметром 5 нм [41] и золотых наностержней [42]. Дарпин эффективно связывался с поверхностью частицы, формируя оболочку в среднем из 35 молекул белка, уменьшая склонность частиц к агрегации. При этом присоединение дарпина к частице оставляло свободным его участок взаимодействия с HER2, что обеспечивало избирательное связывание полученных наночастиц с HER2-гиперэкспрессирующими клетками [41].

Дарпины и белки на их основе успешно присоединяются к наночастицам при помощи карбодии-мидной конъюгации. DARPin 9_29 был ковалентно присоединен к апконвертирующим радиоактивным наночастицам, покрытым сополимером малеинового ангидрида с 1-октадеценом (PMAO). Полученные наночастицы были использованы для визуализации опухоли молочной железы в ксенографтной мышечной модели и показали низкую побочную токсичность *in vivo* [84]. Тот же способ конъюгации был применен для функционализации апконвертирующих наночастиц белком DARPin-mCherry [43]. DARPin-PE40 был таким же образом присоединен к апконвертирующим радиоактивным наночастицам, что позволило визуализировать опухоли *in vivo* и эффективно уничтожать HER2-сверхэкспрессирующие клетки как *in vitro*, так и *in vivo* [85]. Введение уникального остатка цистеина позволило конъюгировать HER2-специфичный дарпин G3 с флуоресцеинмалеимидом, а затем соединить меченый дарпин с суперпарамагнитными наночастицами, покрытыми полимолочной кислотой, путем активации ее С-концевых карбоксильных групп карбодиимидом [86]. Дарпин был присоединен к наноструктурам и при помощи малеимидной конъюгации. Таким образом дарпин 9_29 был соединен с ЕТА-содержащими липосомами, функционализированными по поверхности реактивом Траута [87].

Таким образом, стандартные методики присоединения иммуноглобулинов к наночастицам применимы и к дарпинам. Однако дарпины могут включаться в наноструктуры и за счет встраивания в белки слияния, взаимодействующие с поверхностью частицы. Такой подход позволяет не только добиться желаемой ориентации связывающего модуля, но и собирать нацеливающие модули по принципу конструктора. Так, белок DARPin-Bn, состоящий из DARPin 9_29, гибкого линкера и рибонуклеазы барназы, использован для создания адресных кремниевых наноча-

стиц. Эти наночастицы покрыты белком барстар, содержащим кремнийсвязывающий пептид (SBP-Bs), обеспечивающий прикрепление SBP-Bs к частице. Поскольку барназа и барстар связываются друг с другом с очень высокой аффинностью ($K_a = 10^{14} \text{ M}^{-1}$), их использование позволяло собрать функциональный слой наночастиц в растворе без применения конъюгации или реализовать стратегию претаргетинга, доставляя к клеткам адресный белок, к которому впоследствии присоединялась наночастица [88]. Слияние барназы с пептидом, связывающимся с поверхностью магнетита, позволило использовать тот же белок DARPIn-Vn для функционализации наночастиц из магнетита и их доставки к раковым клеткам [89].

Таким образом, дарпины могут использоваться для создания адресных наночастиц наравне с антителами и их фрагментами. Более того, их малый размер и простота наработки в бактериях, в том числе в виде белков слияния, предоставляют уникальные возможности для сохранения аффинности и специфичности связывания за счет благоприятной ориентации молекулы.

ПРИМЕНЕНИЕ ДАРПИНОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ОНКОЛИТИЧЕСКИХ ВИРУСОВ

Молекулы, полученные из вирусов и бактерий, широко используются для создания противоопухолевых агентов [81], но для разрушения опухолевых клеток можно использовать и целые репликативно активные вирусы [90]. Онколитические вирусы – новый, очень своеобразный класс терапевтических препаратов, во многом действующих в организме пациента самостоятельно. Некоторые вирусы обладают природной тропностью к опухолевым клеткам, но чаще для создания онколитических агентов используют вирусы, поддающиеся перенацеливанию путем модификации поверхностных белков, такие, как вирус кори, аденовирус, вирус везикулярного стоматита, вирус коревой оспы и вирус простого герпеса [90]. Можно изменить природную специфичность вируса за счет адаптерных биспецифических белков, как это успешно сделано для аденовирусов при помощи тримеризующихся дарпинов [10], однако чаще применяется слияние нацеливающих модулей с белками оболочки, поскольку в этом случае все свойства вируса кодируются его геномом. Дарпины, как и одноцепочечные антитела, могут использоваться для подобного изменения специфичности, причем их малый размер позволяет успешно встраивать последовательности, кодирующие дарпины в вирусные векторы.

Белок оболочки вируса кори был модифицирован дарпинами, специфичными к HER2, EGFR или EpCAM. Полученные при этом вирусные ча-

стицы теряли тропность к естественным рецепторам и избирательно заражали клетки, избыточно экспрессирующие соответствующий опухолевый маркер. Вирусные частицы, несущие на поверхности дарпин, специфичный к HER2, вызывали лизис клеток более эффективно, чем вирус, функционализированный HER2-специфичным одноцепочечным антителом. Использование двух соединенных линкером дарпинов, узнающих HER2 и EpCAM, позволило создать биспецифические вирусные частицы, сохранившие высокую цитолитическую активность, характерную для моноспецифичных вирионов [91, 92].

Для заражения HER2-положительных опухолевых клеток использовали также аденоассоциированный вирус, покрытый модифицированным белком оболочки VP2, слитым с дарпином. Полученные вирионы специфически заражали HER2-положительные клетки и доставляли векторы с генами люциферазы либо тимидинкиназы вируса простого герпеса (HSV-TK) к клеткам SK-OV-3 *in vivo*. Вирусные частицы, содержащие генотерапевтический вектор, кодирующий HSV-TK, в сочетании с генциклавиром эффективно подавляли рост ксенографтной опухоли, не вызывая гепатотоксичности [93]. Аналогичные вирусные частицы созданы с использованием EGFR-специфичных дарпина и аффибоди, и оба препарата показали избирательную токсичность в отношении EGFR-положительных клеток *in vitro* [94].

ПРИМЕНЕНИЕ ДАРПИНОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ХИМЕРНЫХ АНТИГЕННЫХ РЕЦЕПТОРОВ

Накопление знаний о функционировании иммунной системы позволило создать технологию адресной терапии рака, использующей цитотоксические лимфоциты – Т-лимфоциты и NK-клетки. Для этого лимфоциты трансдуцируют конструкциями, кодирующими химерный антигенный рецептор (Chimeric Antigen Receptor, CAR), специфичный к опухолевому антигену и имеющий все необходимые для активации клетки домены, включая сигнальные последовательности костимулирующих молекул обычного рецептора [95]. При активации через химерные рецепторы лимфоциты секретируют провоспалительные цитокины и запускают апоптоз клеток-мишеней через рецептор FAS, инициирующий внешний путь активации апоптоза, и гранзимы, напрямую активирующие эффекторные каспазы и каспазо-независимые пути клеточной гибели [96]. Т-клетки с химерным антигенным рецептором (CAR-T) успешно борются с гематологическими опухолями, устойчивыми к химиотерапии, позволяя добиться полного излечения большого числа пациентов [97, 98]. Большинство разработанных на сегодняшний день химерных рецепторов содержат в качестве анти-

генраспознающего домена одноцепочечный вариант антитела, однако дарпины также могут определять специфичность CAR. Более того, дарпины имеют некоторые преимущества перед одноцепочечными антителами: они компактнее, а значит, кодирующие их последовательности занимают меньше места в трансдуцирующем лимфоциты вирусном векторе; дарпины более термодинамически стабильны; и наконец, их связывающая поверхность сформирована единственным полипептидом, в отличие от антител, чей паратоп образован двумя иммуноглобулиновыми доменами, происходящими из разных полипептидов, а значит, дарпины могут использоваться для создания мультиспецифичных CAR [99].

CAR-T с рецептором на основе HER2-специфичного дарпина G3 имели такой же уровень активации, как и клетки с химерным рецептором, содержащим одноцепочечное антитело FRP5. При этом дарпинсодержащие CAR-T проявляли высокую токсичность в отношении HER2-положительных раковых клеток и низкую – в отношении контрольных клеток, не экспрессирующих HER2 [99]. Сходные результаты получены при сравнении CAR-T-терапии на основе антитела 4D5 и дарпинов G3 и 9_29. Все исследованные типы клеток специфически узнавали HER2 и проявляли высокую цитотоксичность в отношении HER2-положительных клеток *in vitro*, наиболее выраженную у клеток с рецепторами на основе дарпина G3. В ксенорафтной модели рака яичника различия между CAR-T на основе разных дарпинов проявились ярче: клетки с рецепторами на основе 4D5scFv и дарпина G3 лучше инфильтрировали опухоль и эффективнее подавляли ее рост [100]. В целом можно заключить, что CAR-T на основе дарпинов не уступают T-лимфоцитам с искусственными рецепторами, содержащими одноцепочечные антитела, а сравнительная простота получения дарпинов и их мономерность облегчают создание химерных рецепторов к разным мишеням.

Естественные киллерные клетки (NK) также могут служить агентами для распознавания опухолевых клеток при помощи химерных антигенных рецепторов. Их цитотоксичность основана на тех же механиз-

мах, что и активность CD8⁺ T-клеток, а природный путь активации дает CAR-NK некоторые преимущества перед CAR-T. NK-клетки не распознают пептид в комплексе с MHC I [101], что снижает риск запуска реакции трансплантат против хозяина (РТПХ). Это свойство уже используется в терапии рака переливанием донорских NK-клеток [102–104] или даже клеток стабильной линии NK-92 [105, 106], что увеличивает эффективность терапии даже без экспрессии клетками химерных рецепторов. Это позволяет создавать препараты на основе стабильных линий NK-клеток, не получая клетки от пациента [107]. К дополнительным преимуществам NK-клеток относится наличие собственных механизмов распознавания перерожденных клеток, которые позволяют им оставаться эффективными противоопухолевыми агентами даже при утрате или мутации химерных антигенных рецепторов. На сегодняшний день не создано противоопухолевых CAR-NK на основе дарпинов, однако их появление, скорее всего, не заставит себя долго ждать.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Дарпины были разработаны как каркасные белки, альтернативные антителам. Они нашли применение в большинстве технологий, где исходно использовались антитела, за исключением тех случаев, где необходимы свойства константной части молекул иммуноглобулинов. Такие преимущества дарпинов, как малый размер, отсутствие необходимости в иммунизации животных и легкость получения белков слияния, делают их перспективными инструментами для исследований и эффективными компонентами терапевтических и диагностических агентов. Не следует делать вывод, что альтернативные каркасные белки полностью заменят антитела, однако можно с уверенностью говорить, что они существенно дополнили набор используемых адресных белков, расширив спектр мишеней за счет другого строения паратопа и предоставив исключительные возможности для создания биспецифических и мультвалентных конструкций. ●

*Работа выполнена при поддержке Российского
научного фонда (№ 19-14-00112).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kohler G., Milstein C. // *Nature*. 1975. V. 256. № 5517. P. 495–497.
- Shah D.K., Betts A.M. // *MAbs*. 2013. V. 5. № 2. P. 297–305.
- Chauhan V.P., Stylianopoulos T., Boucher Y., Jain R.K. // *Annu. Rev. Chem. Biomol. Eng.* 2011. V. 2. № 1. P. 281–298.
- Simeon R., Chen Z. // *Protein Cell*. 2018. V. 9. № 1. P. 3–14.
- Jost C., Plückthun A. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2014. V. 27. № 1. P. 102–112.
- Plückthun A. // *Annu. Rev. Pharmacol. Toxicol.* 2015. V. 55. № 1. P. 489–511.
- Grove T.Z., Cortajarena A.L., Regan L. // *Curr. Opin. Struct. Biol.* 2008. V. 18. № 4. P. 507–515.
- Stumpp M.T., Binz H.K., Amstutz P. // *Drug Discov. Today*. 2008. V. 13. № 15–16. P. 695–701.
- Hansen S., Stüber J.C., Ernst P., Koch A., Bojar D., Batyuk A., Plückthun A. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 16292.
- Dreier B., Honegger A., Hess C., Nagy-Davidescu G., Mittl P.R.E., Grutter M.G., Belousova N., Mikheeva G., Krasnykh V., Plückthun A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 10. P. E869–E877.
- Zellweger F., Gasser P., Brigger D., Buschor P., Vogel M., Eggel A. // *Allergy*. 2017. V. 72. № 8. P. 1174–1183.

12. Jost C., Schilling J., Tamaskovic R., Schwill M., Honegger A., Plückthun A. // *Structure*. 2013. V. 21. № 11. P. 1979–1991.
13. Wu Y., Batyuk A., Honegger A., Brandl F., Mittl P.R.E., Plückthun A. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 11217.
14. Wu Y., Honegger A., Batyuk A., Mittl P.R.E., Plückthun A. // *J. Mol. Biol.* 2018. V. 430. № 14. P. 2128–2138.
15. Schilling J., Schöppe J., Plückthun A. // *J. Mol. Biol.* 2014. V. 426. № 3. P. 691–721.
16. Kummer L., Hsu C.-W., Dagliyan O., MacNevin C., Kaufholz M., Zimmermann B., Dokholyan N.V., Hahn K.M., Plückthun A. // *Chem. Biol.* 2013. V. 20. № 6. P. 847–856.
17. Kummer L., Parizek P., Rube P., Millgramm B., Prinz A., Mittl P.R.E., Kaufholz M., Zimmermann B., Herberg F.W., Pluckthun A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 34. P. E2248–E2257.
18. Forrer P., Stumpp M.T., Binz H.K., Plückthun A. // *FEBS Lett.* 2003. V. 539. № 1–3. P. 2–6.
19. Stumpp M.T., Amstutz P. // *Curr. Opin. Drug Discov. Devel.* 2007. V. 10. № 2. P. 153–159.
20. Winkler J., Martin-Killias P., Plückthun A., Zangemeister-Wittke U. // *Mol. Cancer Ther.* 2009. V. 8. № 9. P. 2674–2683.
21. Steiner D., Forrer P., Plückthun A. // *J. Mol. Biol.* 2008. V. 382. № 5. P. 1211–1227.
22. Binz H.K., Bakker T.R., Phillips D.J., Cornelius A., Zitt C., Göttler T., Sigrist G., Fiedler U., Ekawardhani S., Dolado I., et al. // *MAbs*. 2017. V. 9. № 8. P. 1262–1269.
23. Kramer L., Renko M., Završnik J., Turk D., Seeger M.A., Vasiljeva O., Grütter M.G., Turk V., Turk B. // *Theranostics*. 2017. V. 7. № 11. P. 2806–2821.
24. Bery N., Legg S., Debreczeni J., Breed J., Embrey K., Stubbs C., Kolasinska-Zwierz P., Barrett N., Marwood R., Watson J., et al. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 2607.
25. Yarden Y., Sliwkowski M.X. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2001. V. 2. № 2. P. 127–137.
26. Ménard S., Tagliabue E., Campiglio M., Pupa S.M. // *J. Cell. Physiol.* 2000. V. 182. № 2. P. 150–162.
27. Tal M., Wetzler M., Josefberg Z., Deutch A., Gutman M., Assaf D., Kris R., Shiloh Y., Givol D. // *Cancer Res.* 1988. V. 48. P. 1517–1520.
28. Bookman M.A., Darcy K.M., Clarke-Pearson D., Boothby R.A., Horowitz I.R. // *J. Clin. Oncol.* 2003. V. 21. № 2. P. 283–290. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/12525520>
29. Santin A.D., Bellone S., Roman J.J., McKenney J.K., Pecorelli S. // *Int. J. Gynecol. Obstet.* 2008. V. 102. № 2. P. 128–131.
30. Zhang S., Zhang H.S., Reuter V.E., Slovin S.F., Scher H.I., Livingston P.O. // *Clin. Cancer Res.* 1998. V. 4. № 2. P. 295–302. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/9516914>
31. The AACR Project GENIE Consortium. // *Cancer Discov.* 2017. V. 7. № 8. P. 818–831.
32. Nahta R., Hung M., Esteva F.J. // *Cancer Res.* 2004. V. 64. P. 2343–2346.
33. Junttila T.T., Li G., Parsons K., Phillips G.L., Sliwkowski M.X. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2011. V. 128. № 2. P. 347–356.
34. Scaltriti M., Rojo F., Ocaña A., Anido J., Guzman M., Cortes J., Di Cosimo S., Matias-Guiu X., Ramon y Cajal S., Arribas J., et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* 2007. V. 99. № 8. P. 628–638.
35. Deeks E.D. // *Drugs*. 2017. V. 77. № 15. P. 1695–1704.
36. Meric-Bernstam F., Johnson A.M., Ileana Dumbrava E.E., Raghav K., Balaji K., Bhatt M., Murthy R.K., Rodon J., Piha-Paul S.A. // *Clin. Cancer Res.* 2019. V. 25. № 7. P. 2033–2041.
37. Hainsworth J.D., Meric-Bernstam F., Swanton C., Hurwitz H., Spigel D.R., Sweeney C., Burris H.A., Bose R., Yoo B., Stein A., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2018. V. 36. № 6. P. 536–542.
38. Borovjagin A.V., McNally L.R., Wang M., Curiel D.T., MacDougall M.J., Zinn K.R. // *Mol. Imaging*. 2010. V. 9. № 2. P. 59–75.
39. Миронова К.Е., Черных О.Н., Рябова А.В., Стрёмовский О.А., Прошкина Г.М., Деев С.М. // *Биохимия*. 2014. Т. 79. № 12. С. 1700–1706.
40. Mironova K.E., Khochenkov D.A., Generalova A.N., Rocheva V.V., Sholina N.V., Nechaev A.V., Semchishen V.A., Deyev S.M., Zvyagin A.V., Khaydukov E.V. // *Nanoscale*. 2017. V. 9. № 39. P. 14921–14928.
41. Deyev S., Proshkina G., Ryabova A., Tavanti F., Menziani M.C., Eidelstein G., Avishai G., Kotlyar A. // *Bioconjug. Chem.* 2017. V. 28. № 10. P. 2569–2574.
42. Proshkina G., Deyev S., Ryabova A., Tavanti F., Menziani M.C., Cohen R., Katrivas L., Kotlyar A.B. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2019. V. 11. № 38. P. 34645–34651.
43. Mironova K.E., Khochenkov D.A., Generalova A.N., Rocheva V.V., Sholina N.V., Nechaev A.V., Semchishen V.A., Deyev S.M., Zvyagin A.V., Khaydukov E.V. // *Nanoscale*. 2017. V. 9. № 39. P. 14921–14928.
44. Waibel R., Alberto R., Willuda J., Finnern R., Schibli R., Stichelberger A., Egli A., Abram U., Mach J.-P., Plückthun A., et al. // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. № 9. P. 897–901.
45. Zahnd C., Kawe M., Stumpp M.T., De Pasquale C., Tamaskovic R., Nagy-Davidescu G., Dreier B., Schibli R., Binz H.K., Waibel R., et al. // *Cancer Res.* 2010. V. 70. № 4. P. 1595–1605.
46. Schmidt M.M., Wittrup K.D. // *Mol. Cancer Ther.* 2009. V. 8. № 10. P. 2861–2871.
47. Vorobyeva A., Schulga A., Konovalova E., Güler R., Löfblom J., Sandström M., Garousi J., Chernov V., Bragina O., Orlova A., et al. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 9405.
48. Vorobyeva A., Schulga A., Rinne S.S., Günther T., Orlova A., Deyev S., Tolmachev V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 12. P. 3047.
49. Vorobyeva A., Bragina O., Altai M., Mitran B., Orlova A., Shulga A., Proshkina G., Chernov V., Tolmachev V., Deyev S. // *Contrast Media Mol. Imaging*. 2018. V. 2018. P. 6930425.
50. Baird R., Omlin A., Kiemle-Kallee J., Fiedler U., Zitt C., Feurstein D., Herbst J., Dawson K., vom Baur E., Stumpp M., et al. // *Cancer Res.* 2018. V. 78. № 4 Suppl. OT1–03–02.
51. Azaro A., Rodon J., Middleton M.R., Baird R.D., Herrmann R., Fiedler U., Haunschild J., Häuptle M., Hermann F.J., Schreiner S., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2018. V. 36. № 15_suppl. P. 2520–2520.
52. Kiemle-Kallee J., Fiedler U., Dawson K.M., Haunschild J., Dietschy S., Stumpp M.T., Hermann F., Harstrick A. // *Cancer Res.* 2018. V. 78. № 13 Suppl. CT1.
53. Knop S., Goldschmidt H., Raab M.S., Szarejko M., Jurzyszyn A., Bringham S., Gamberi B., Vacca A., Acosta J., Lemaillet G., et al. // *Blood*. 2018. V. 132 Supplement 1. P. 1980.
54. Smithwick E., Stewart M.W. // *Antiinflamm. Antiallergy. Agents Med. Chem.* 2017. V. 16. № 999. P. 33–45.
55. Shapira A., Benhar I. // *Toxins (Basel)*. 2010. V. 2. № 11. P. 2519–2583.
56. Weldon J.E., Pastan I. // *FEBS J.* 2011. V. 278. № 23. P. 4683–4700.
57. Martin-Killias P., Stefan N., Rothschild S., Pluckthun A., Zangemeister-Wittke U. // *Clin. Cancer Res.* 2011. V. 17. № 1. P. 100–110.
58. Shilova O.N., Proshkina G.M., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // *Acta Naturae*. 2015. V. 7. № 3(26). P. 126–133.
59. Sokolova E., Proshkina G., Kutova O., Shilova O., Ryabova A., Schulga A., Stremovskiy O., Zdobnova T., Balalaeva I., Deyev S. // *J. Control. Release*. 2016. V. 233. P. 48–56.
60. Mazor R., King E.M., Pastan I. // *Am. J. Pathol.* 2018. V. 188. № 8. P. 1736–1743.

61. Прошкина Г.М., Киселева Д.В., Шилова О.Н., Рябова А.В., Шрамова Е.И., Стрёмовский О.А., Деев С.М. // Молекуляр. биология. 2017. Т. 51. № 6. С. 997–1007.
62. Sokolova E.A., Shilova O.N., Kiseleva D.V., Schulga A.A., Balalaeva I.V., Deyev S.M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 10. P. 2399.
63. Agostinis P., Berg K., Cengel K.A., Foster T.H., Girotti A.W., Gollnick S.O., Hahn S.M., Hamblin M.R., Juzeniene A. // *CA Cancer J. Clin.* 2012. V. 61. № 4. P. 250–281.
64. Chilakamarthi U., Giribabu L. // *Chem. Rec.* 2017. V. 17. № 8. P. 775–802.
65. Mew D., Wat C.K., Towers G.H., Levy J.G. // *J. Immunol.* 1983. V. 130. № 3. P. 1473–1477.
66. You H., Yoon H.-E., Jeong P.-H., Ko H., Yoon J.-H., Kim Y.-C. // *Bioorg. Med. Chem.* 2015. V. 23. № 7. P. 1453–1462.
67. Yoo J.-O., Ha K.-S. // *Int. Rev. Cell Mol. Biol.* 2012. V. 295. P. 139–174.
68. Staneloudi C., Smith K.A., Hudson R., Malatesti N., Savoie H., Boyle R.W., Greenman J. // *Immunology.* 2007. V. 120. № 4. P. 512–517.
69. Bulina M.E., Chudakov D.M., Britanova O.V., Yanushevich Y.G., Staroverov D.B., Chepurnykh T.V., Merzlyak E.M., Shkrob M.A., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. № 1. P. 95–99.
70. Sarkisyan K.S., Zlobovskaya O.A., Gorbachev D.A., Bozhanova N.G., Sharonov G.V., Staroverov D.B., Egorov E.S., Ryabova A.V., Solntsev K.M., Mishin A.S., et al. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 12. P. e0145287.
71. Shu X., Lev-ram V., Deerinck T.J., Qi Y., Ramko E.B., Michael W., Jin Y., Ellisman M.H., Tsien R.Y. // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. № 4. P. e1001041.
72. Makhijani K., To T.L., Ruiz-González R., Lafaye C., Royant A., Shu X. // *Cell Chem. Biol.* 2017. V. 24. № 1. P. 110–119.
73. Ryumina A.P., Serebrovskaya E.O., Shirmanova M.V., Snopova L.B., Kuznetsova M.M., Turchin I.V., Ignatova N.I., Klementieva N.V., Fradkov A.F., Shakhov B.E., et al. // *Biochim. Biophys. Acta-Gen. Subj.* 2013. V. 1830. № 11. P. 5059–5067.
74. Lin J.Y., Sann S.B., Zhou K., Nabavi S., Proulx C.D., Malinow R., Jin Y., Tsien R.Y. // *Neuron.* 2013. V. 79. № 2. P. 241–253.
75. Souslova E.A., Mironova K.E., Deyev S.M. // *J. Biophotonics.* 2017. V. 10. № 3. P. 338–352.
76. Mironova K.E., Proshkina G.M., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Lukyanov S.A., Petrov R.V., Deyev S.M. // *Theranostics.* 2013. V. 3. № 11. P. 831–840.
77. Proshkina G.M., Shilova O.N., Ryabova A.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // *Biochimie.* 2015. V. 118. P. 116–122.
78. Kuzichkina E.O., Shilova O.N., Deyev S.M. // *Acta Naturae.* 2018. V. 10. № 4(39). C. 87–95.
79. Shilova O.N., Shilov E.S., Deyev S.M. // *Cytom. Part A.* 2017. V. 91. № 9. P. 917–925.
80. Greish K. // *Methods Mol. Biol.* 2010. V. 624. P. 25–37.
81. Shilova O.N., Shilov E.S., Lieber A., Deyev S.M. // *J. Control. Release.* 2018. V. 286. P. 125–136.
82. Nazarenus M., Zhang Q., Soliman M.G., Del Pino P., Pelaz B., Carregal-Romero S., Rejman J., Rothen-Rutishauser B., Cliff M.J.D., Zellner R., et al. // *Beilstein J. Nanotechnol.* 2014. V. 5. P. 1477–1490.
83. Carter T., Mulholland P., Chester K. // *Immunotherapy.* 2016. V. 8. № 8. P. 941–958.
84. Guryev E.L., Shilyagina N.Y., Kostyuk A.B., Sencha L.M., Balalaeva I.V., Vodenev V.A., Kutova O.M., Lyubeshkin A.V., Yakubovskaya R.I., Pankratov A.A., et al. // *Toxicol. Sci.* 2019. V. 170. № 1. P. 123–132.
85. Guryev E.L., Volodina N.O., Shilyagina N.Y., Gudkov S.V., Balalaeva I.V., Volovetskiy A.B., Lyubeshkin A.V., Sen' A.V., Ermilov S.A., Vodenev V.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2018. V. 115. № 39. P. 9690–9695.
86. Li D.-L., Tan J.-E., Tian Y., Huang S., Sun P.-H., Wang M., Han Y.-J., Li H.-S., Wu H.-B., Zhang X.-M., et al. // *Biomaterials.* 2017. V. 147. P. 86–98.
87. Deyev S., Proshkina G., Baryshnikova O., Ryabova A., Avishai G., Katrivas L., Giannini C., Levi-Kalisman Y., Kotlyar A. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018. V. 130. P. 296–305.
88. Shipunova V.O., Zelepukin I.V., Stremovskiy O.A., Nikitin M.P., Care A., Sunna A., Zvyagin A.V., Deyev S.M. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018. V. 10. № 20. P. 17437–17447.
89. Shipunova V.O., Kotelnikova P.A., Aghayeva U.F., Stremovskiy O.A., Novikov I.A., Schulga A.A., Nikitin M.P., Deyev S.M. // *J. Magn. Magn. Mater.* 2019. V. 469. P. 450–455.
90. Russell S.J., Peng K.-W., Bell J.C. // *Nat. Biotechnol.* 2012. V. 30. № 7. P. 658–670.
91. Friedrich K., Hanauer J.R., Prüfer S., Münch R.C., Völker I., Filippis C., Jost C., Hanschmann K.-M., Cattaneo R., Peng K.-W., et al. // *Mol. Ther.* 2013. V. 21. № 4. P. 849.
92. Hanauer J.R., Gottschlich L., Riehl D., Rusch T., Koch V., Friedrich K., Hutzler S., Prüfer S., Friedel T., Hanschmann K.-M., et al. // *Mol. Ther. Oncolytics.* 2016. V. 3. P. 16003.
93. Münch R.C., Janicki H., Völker I., Rasbach A., Hallek M., Büning H., Buchholz C.J. // *Mol. Ther.* 2013. V. 21. № 1. P. 109–118.
94. Hagen S., Baumann T., Wagner H.J., Morath V., Kaufmann B., Fischer A., Bergmann S., Schindler P., Arndt K.M., Müller K.M. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 3759.
95. Wilkins O., Keeler A.M., Flotte T.R. // *Hum. Gene Ther. Methods.* 2017. V. 28. № 2. P. 61–66.
96. Benmebarek M.-R., Karches C.H., Cadilha B.L., Lesch S., Endres S., Kobold S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 6. P. 1283.
97. Maude S.L., Frey N., Shaw P.A., Aplenc R., Barrett D.M., Bunin N.J., Chew A., Gonzalez V.E., Zheng Z., Lacey S.F., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2014. V. 371. № 16. P. 1507–1517.
98. Kochenderfer J.N., Dudley M.E., Kassim S.H., Somerville R.P.T., Carpenter R.O., Stetler-Stevenson M., Yang J.C., Phan G.Q., Hughes M.S., Sherry R.M., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2015. V. 33. № 6. P. 540–549.
99. Hammill J.A., VanSeggelen H., Helsen C.W., Denisova G.F., Eveleigh C., Tantalos D.G.M., Bassett J.D., Bramson J.L. // *J. Immunother. Cancer.* 2015. V. 3. P. 55.
100. Siegler E., Li S., Kim Y.J., Wang P. // *Hum. Gene Ther.* 2017. V. 28. № 9. P. 726–736.
101. Farag S.S., Caligiuri M.A. // *Blood Rev.* 2006. V. 20. № 3. P. 123–137.
102. Yoon S.R., Lee Y.S., Yang S.H., Ahn K.H., Lee J.-H., Lee J.-H., Kim D.Y., Kang Y.A., Jeon M., Seol M., et al. // *Bone Marrow Transplant.* 2010. V. 45. № 6. P. 1038–1046.
103. Miller J.S., Soignier Y., Panoskaltis-Mortari A., McNearney S.A., Yun G.H., Fautsch S.K., McKenna D., Le C., Defor T.E., Burns L.J., et al. // *Blood.* 2005. V. 105. № 8. P. 3051–3057.
104. Rubnitz J.E., Inaba H., Ribeiro R.C., Pounds S., Rooney B., Bell T., Pui C.-H., Leung W. // *J. Clin. Oncol.* 2010. V. 28. № 6. P. 955–959.
105. Arai S., Meagher R., Swearingen M., Myint H., Rich E., Martinson J., Klingemann H. // *Cytotherapy.* 2008. V. 10. № 6. P. 625–632.
106. Tonn T., Schwabe D., Klingemann H.G., Becker S., Esser R., Koehl U., Suttrop M., Seifried E., Ottmann O.G., Bug G. // *Cytotherapy.* 2013. V. 15. № 12. P. 1563–1570.
107. Rezvani K., Rouce R., Liu E., Shpall E. // *Mol. Ther.* 2017. V. 25. № 8. P. 1769–1781.

УДК 571.27

Роль интерлейкина-37 в патогенезе аллергических заболеваний

И. П. Шиловский, М. Е. Дынева, О. М. Курбачева, Д. А. Кудлай, М. Р. Хаитов*

Государственный научный центр «Институт иммунологии» Федерального медико-биологического агентства, Москва, 115522 Россия

*E-mail: mr.khaitov@nrcii.ru

Поступила в редакцию 20.05.2019

Принята к печати 16.10.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-54-64

РЕФЕРАТ Цитокины семейства интерлейкина-1 (IL-1) играют важную роль в реализации защитных функций врожденного иммунитета и являются ключевыми медиаторами, участвующими в патогенезе широкого круга заболеваний, прежде всего в иммунопатологиях, включая различные проявления аллергии. В семейство IL-1 входят более 11 белков, однако функции многих из них на сегодняшний день известны не до конца. В последнее время ведутся активные исследования биологических свойств интерлейкинов и находят новые члены семейства IL-1. В 2000 году несколькими независимыми группами ученых было сообщено об открытии нового интерлейкина данного семейства, который получил название IL-37, или по новой номенклатуре IL-1F7. IL-37 был отнесен к семейству IL-1 на основании его структурного сходства с другими членами данного семейства. Показано, что активность IL-37 изменяется при воспалительных заболеваниях, таких, как ревматоидный артрит, псориаз, а также при заболеваниях аллергической природы (аллергический ринит, бронхиальная астма и атопический дерматит). В отличие от большинства представителей семейства IL-1, IL-37 действует как негативный регулятор воспаления. Активация IL-37 приводит к супрессии воспаления, что выражается в подавлении воспалительных цитокинов и хемокинов и предотвращении инфильтрации провоспалительных клеток, главным образом, эозинофилов и нейтрофилов. Точные молекулярные и клеточные механизмы противовоспалительного действия IL-37 при развитии аллергических заболеваний (АЗ) на данный момент недостаточно раскрыты. В представленном обзоре обобщены и проанализированы экспериментальные данные о роли IL-37 в патогенезе АЗ, таких, как аллергический ринит, бронхиальная астма и атопический дерматит. **КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** IL-37, бронхиальная астма, противовоспалительные цитокины, провоспалительные цитокины, экспрессия генов.

ВВЕДЕНИЕ

Развитие аллергических заболеваний (АЗ), таких, как бронхиальная астма, аллергический ринит, атопический дерматит, определяется многими факторами, среди которых генетическая предрасположенность [1], а также воздействие аллергенов, инфекций и других негативных факторов окружающей среды. В отдельных регионах мира, например в странах Евросоюза, заболеваемость АЗ достигает 30%; при этом прогнозируется рост до 50% в ближайшие 15 лет [2, 3]. Бронхиальная астма (БА) – гетерогенное заболевание, обычно характеризующееся хроническим воспалением дыхательных путей [2]. Отличительной особенностью аллергической БА (аБА), которая составляет около 70–80% всех случаев заболевания, является повышенный уровень аллерген-специфических IgE-антител в сыворотке крови [4, 5] и высокое содержание эозинофилов в крови, слизистых оболочках дыхательных путей и в бронхоальвеолярном лаваже (БАЛ) [6]. Аллергический ринит (АР), характеризующийся

хроническим воспалением в верхних дыхательных путях [7], может существенно снижать качество жизни, влияя на сон и работоспособность пациентов [2]. Атопический дерматит (АтД) – многофакторное воспалительное заболевание кожи, которое отчасти может быть следствием генетически обусловленных нарушений барьерной функции кожи [8, 9]. По данным различных исследований, АтД, начавшийся в детстве, продолжает персистировать у взрослых в 40–60% случаев [10].

Таким образом, на фоне значительной распространенности АЗ разработка новых способов лечения и профилактики остается актуальной задачей биомедицины. Однако создание новых способов терапии невозможно без изучения молекулярных механизмов патогенеза заболевания.

Согласно современным представлениям [11–13], в развитии АЗ выделяют два этапа: этап сенсибилизации, сопровождающийся развитием гиперчувствительности к аллергену, и эффекторный этап,

сопровождается воспалением, травматизацией и ремоделированием тканей (bronхов при БА, кожных покровов при АтД и слизистой оболочки носа при АР). На этапе сенсибилизации происходит первичная встреча с аллергеном, который, попадая в организм через поврежденный эпителий, презентуется молекулами МНС-II на антигенпрезентирующих клетках (АПК). АПК мигрируют в региональные лимфоузлы и поляризуют нативные Th0-клетки в Th2-клетки, которые продуцируют ряд цитокинов: IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13, формирующих впоследствии основные проявления АЗ [14]. Этот процесс также способствует дифференцировке В-клеток в плазматические антителопродуцирующие клетки. Под действием IL-4 и IL-13 В-клетки переключаются с синтеза IgM-антител на синтез IgE-антител, которые во многом и опосредуют последующие аллергические реакции организма [11, 12].

На эффекторном этапе антитела класса IgE посредством рецепторов FcεRI и FcεRII взаимодействуют с тучными клетками и базофилами. При повторной встрече с аллергеном происходит его взаимодействие с поверхностными IgE-антителами, что приводит к дегрануляции указанных клеток и высвобождению провоспалительных медиаторов. Медиаторы, в свою очередь, привлекают провоспалительные клетки, вызывают расширение сосудов, способствуют образованию микротромбов с локальным повреждением тканей, а также оказывают спазмогенный эффект, приводя к сокращению гладкой мускулатуры, например бронхов, при БА. Параллельно Th2-клетки посредством хемокиновых рецепторов проникают в участок воспаления из кровеносных сосудов, где активируются аллергеном и продуцируют IL-4, IL-5, IL-9 и IL-13. Цитокины IL-4, IL-9 и IL-13 способствуют гиперпродукции слизи бронхиальным эпителием (при БА) или слизистой носовой полости (при АР). IL-5 способствует привлечению эозинофилов в участок воспаления и их активации. Эозинофилы в свою очередь в ходе дегрануляции высвобождают медиаторы воспаления, приводящие к повреждению окружающих тканей [15–17].

Роль Th2-клеток и продуцируемых ими цитокинов в развитии АЗ к настоящему моменту хорошо изучена (см. обзоры [18–20]). В то же время появляются сведения об участии новых, относительно недавно открытых цитокинов в развитии АЗ. Доказано, что представитель семейства IL-1 – IL-33 вовлечен в развитие АЗ. IL-33, выделяемый эпителиальными клетками, активирует врожденные лимфоидные клетки типа 2 (нуоциты) – innate lymphoid cells 2 (ILC2), которые продуцируют значительное количество IL-5 и IL-13, тем самым усиливая про-аллергический Th2-иммунный ответ (см. обзоры [21–23]). В мировой научной литературе появляются сведения об участии в патогене-

зе АЗ другого, не так давно открытого представителя семейства IL-1 – IL-37, роли которого в развитии АЗ и посвящен данный обзор.

ИСТОРИЯ ОТКРЫТИЯ И МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА ГЕНА IL-37

Интерлейкин-37 (IL-37) входит в семейство IL-1, представителями которого являются еще 10 цитокинов: IL-1α, IL-1β, IL-1Ra, IL-18, IL-36α, IL-36Ra, IL-36β, IL-36γ, IL-38, IL-33. Годом открытия IL-37 считается 2000 год, когда независимо друг от друга три коллектива исследователей методами *in silico* описали пять мРНК-транскриптов данного цитокина [24–26]. Изучение биологической функции гена IL-37 значительно осложнялось тем, что этот ген отсутствует у мышей, поэтому создание IL-37-дефектных мышей и последующее их сравнение с мышами дикого типа, имеющими функциональный IL-37, было невозможно [27]. В отличие от человека, IL-37 отсутствует у шимпанзе, хотя у других приматов идентифицирован функциональный ген этого цитокина [28].

IL-37 располагается в локусе 2q12-13 хромосомы 2, где находятся гены большинства цитокинов семейства IL-1 [29]. У мышей кластер генов *IL-1* располагается также в хромосоме 2 [30–32]. Оба локуса, человеческий и мышинный, достаточно сходны, за исключением участка, кодирующего ген *IL-37*, который отсутствует у мышей [27]. В то же время ген *IL-37* у приматов, например у горилл, располагается в хромосоме 2 [28].

Размер гена *IL-37* человека составляет 3617 п.н., а его мРНК подвергается альтернативному сплайсингу, что приводит к образованию пяти различных изоформ IL-37 – а–е (рис. 1). Изоформы а, b и d содержат экзоны 4, 5 и 6; по всей видимости, биологические функции IL-37 связаны именно с этими экзонами [33].

IL-37a имеет уникальную N-концевую последовательность, которую кодирует экзон 3, стартовый для данной изоформы [31]. В четырех других изоформах IL-37 экзон 3 отсутствует, и трансляция белка начинается с экзона 1. Экзоны 4–6 кодируют предполагаемые 12 β-складок, которые затем формируют β-трилистник, структуру, характерную для всех представителей семейства IL-1 [34].

Изоформа IL-37b наиболее хорошо охарактеризована, она состоит из 218 аминокислотных остатков. N-Концевая последовательность, кодируемая двумя первыми экзонами, представляет собой продомен, который отщепляется в процессе созревания цитокина. Экзоны 4–6 выполняют ту же роль, что и в изоформе IL-37a. Таким образом, можно предположить, что изоформа IL-37b, как и IL-37a, имеет биологическое значение [33].

Изоформа IL-37c отличается от IL-37b отсутствием экзона 4, что не позволяет ей в процессе

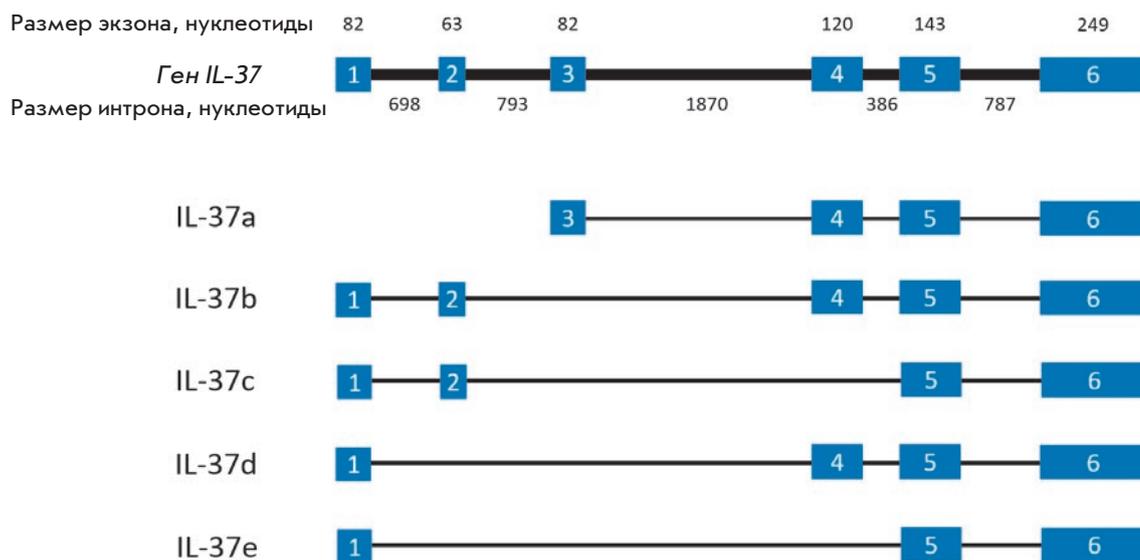


Рис. 1. Структура гена IL-37 и его пяти альтернативных вариантов транскриптов

фолдинга формировать характерную структуру β-трилистника. Вследствие этого можно предполагать отсутствие у нее биологической функциональности. Это характерно и для изоформы IL-37e, которая также не содержит экзона 4. В изоформе IL-37d, в отличие от IL-37b, нет экзона 2, а значит, она может формировать β-трилистники и также быть функциональной формой цитокина [33].

Цитокины семейства IL-1 синтезируются как молекулы-предшественники, содержащие пропептидный домен. Установлено, что главным ферментом, необходимым для процессинга молекул-предшественников в зрелые формы цитокинов и их последующей секреции, является каспаза-1 [35]. IL-37b также синтезируется в виде белка-предшественника, а после стимуляции клеток (например, LPS) переходит в зрелую форму [36]. Сайт расщепления каспазой-1 находится в последовательности, которую кодирует экзон 1. Следовательно, изоформы b, c, d, e, имеющие экзон 1, также содержат сайт расщепления каспазой-1. Изоформа IL-37a не содержит экзон 1, но имеет сайт расщепления каспазой-1, уникальная последовательность которого локализована в экзоне 3.

Наиболее эффективно белок расщепляет именно каспаза-1, в то время как каспаза-4 делает это гораздо медленнее; а другие каспазы не проявляют ферментативной активности по отношению к IL-37 [37]. В отличие от IL-33, секреция IL-37 не связана с гибелью клеток. По всей видимости, процессинг IL-37 каспазами (и/или другими ферментами) не является необходимым для последующей его секреции, поскольку после активации клеток во внеклеточном пространстве детектировались как процессированная форма IL-37, так и его предшественник [38]. Однако стоит отметить, что у IL-37, как и у некоторых представителей семейства IL-1 (IL-1β и IL-33), биологической

активностью обладают как процессированная форма, так и ее предшественник [37]. Кроме того, существует предположение, что неизвестные протеазы могут осуществлять процессинг секретированной зрелой формы IL-37 во внеклеточном пространстве, увеличивая его активность [27]. Показано, что рекомбинантный процессированный белок IL-37 (46–218 а.о.), лишенный 45 аминокислотных остатков с N-концевой части, проявлял в 20–30 раз большую биологическую активность, чем непроцессированный белок [39].

В различных тканях и органах обнаружены разные изоформы IL-37, причем в некоторых органах экспрессируется только одна изоформа. Так, например, в мозге экспрессируется только IL-37a, в почках – IL-37b, а IL-37c в сердце. Две изоформы IL-37d и IL-37e экспрессируются исключительно в костном мозге и семенниках [25, 26]. Зрелый IL-37 и его проформа секретируются активированными макрофагами, дендритными клетками (ДК) и мононуклеарными клетками периферической крови (PBMС, peripheral blood mononuclear cell) [40]. IL-37, который секретируются этими клетками, оказывает свои биологические эффекты посредством уникального рецепторного комплекса.

РЕЦЕПТОРНЫЙ КОМПЛЕКС IL-37 И СИГНАЛЬНЫЕ ПУТИ

Рецепторный комплекс IL-37 сходен с рецептором IL-18 – еще одним представителем IL-1-семейства. IL-18 является одним из основных провоспалительных цитокинов, выступающим в качестве патогенетического фактора в формировании ряда заболеваний [41, 42]. Рецепторный комплекс IL-18 состоит из двух цепей: α (IL-18Rα) и β (IL-18Rβ), каждая из которых имеет TIR-домен [43]. При формировании комплекса IL-18Rα/IL-18/IL-18Rβ домены TIR сближаются, после чего фактор MyD88 связывается с ними и индуцирует провоспалительный эффект [27] (рис. 2).

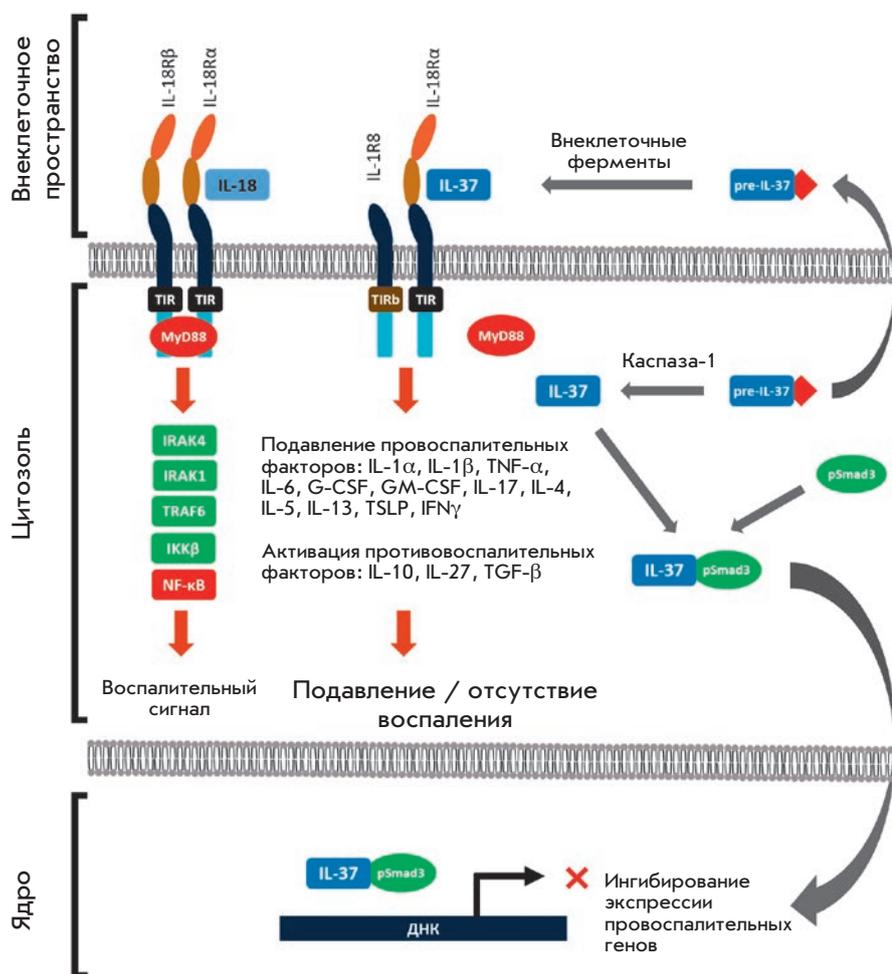


Рис. 2. Механизмы противовоспалительных эффектов IL-37. Провоспалительные свойства IL-18 проявляются при помощи рецепторного комплекса, состоящего из цепей IL-18Rα и IL-18Rβ. Домены TIR сближаются, после чего фактор MyD88 связывается с ними, что индуцирует провоспалительный эффект. IL-37 синтезируется в виде предшественника (pre-IL-37), который способен секретироваться во внеклеточное пространство, где процессируется до зрелой формы по неустановленному механизму. Зрелый IL-37 связывается с цепями IL-18Rα и IL-18Rβ (вместо IL-18Rβ); при этом цепь IL-18R несет мутантный домен TIRb (вместо функционального TIR), что не позволяет вызывать MyD88-опосредованный воспалительный эффект [27]. Предшественник IL-37 способен также процессироваться внутриклеточно до зрелой формы посредством каспазы-1. В цитозоле IL-37 связывается с фосфорилированной формой фактора Smad3 (pSmad3). Комплекс IL-37/pSmad3, по всей видимости (не доказана способность комплекса связываться с ДНК), способен транслоцироваться в ядро и ингибировать транскрипцию провоспалительных генов

IL-37 также способен связываться с цепью IL-18Rα; после нокаута данной цепи IL-37 не мог оказывать противовоспалительный эффект [44], поэтому была предложена гипотеза, согласно которой IL-37b является конкурентным ингибитором IL-18 и тем самым предотвращает воспалительный эффект этого цитокина. Однако это предположение не подтвердилось [37, 45], после чего была предложена иная гипотеза – кроме IL-18Rα IL-37 может также связываться с каким-либо дополнительным рецептором, отличным от IL-18Rβ, что в итоге приводит к активации противовоспалительного пути. Вскоре установили, что дополнительным рецептором для IL-37 является IL-1R8 (SIGIRR). Показано, что комплекс IL-37-IL-1R8-IL-18Rα собирается на поверхности клеток и его присутствие необходимо для формирования дальнейшего противовоспалительного ответа [46]. Рецептор IL-1R8 состоит только из одного внеклеточного Ig-подобного домена с длинным «хвостом», погруженным в цитоплазму и имеющим мутантный TIR-домен [47]. Значимость IL-1R8 для противовоспалительного эффекта IL-37 доказана в опытах на мышах, дефектных по гену данной

цепи. У мышей с нокаутом IL-1R8 не происходило уменьшения воспаления в ответ на введение IL-37 [44, 48] (рис. 2). Указанные факты свидетельствуют о необходимости IL-1R8 и IL-18Rα для проявления противовоспалительных свойств IL-37.

Кроме того, IL-37 способен оказывать противовоспалительный эффект по IL-1R8/IL-18Rα-независимому пути [36]. Исследования, проведенные на клеточной линии A549 рака легкого человека, показали, что клетки A549 обладают меньшей чувствительностью к воспалительным факторам, когда IL-37 ассоциирован со Smad3. В то же время ингибирование Smad3 увеличивало продукцию воспалительных цитокинов. Эксперименты *in vivo*, проведенные на мышах IL-37tg⁻, выявили, что LPS-индуцированное воспаление легких усиливалось после подавления Smad3. Однако точный механизм взаимодействия IL-37 со Smad3 не установлен. Предполагается, что С-концевой домен IL-37 связывается со Smad3, фосфорилируется и проникает в ядро, где подавляет экспрессию провоспалительных генов [49] (рис. 2).

Таким образом, IL-37 проявляет противовоспалительные свойства во внеклеточных и внутриклеточ-

ных условиях. После внутриклеточного синтеза часть белка-предшественника процессируется каспазой-1 и посредством фактора Smad3 осуществляет негативную регуляцию провоспалительных генов. Другая часть белка-предшественника IL-37 секретируется во внеклеточное пространство, где он процессируется и оказывает противовоспалительный эффект путем конкурентного ингибирования провоспалительного IL-18 и активации противовоспалительного сигнального пути посредством рецепторов IL-1R8 и IL-18Ra.

БИОЛОГИЧЕСКИЕ ЭФФЕКТЫ IL-37

В большинстве исследований, проведенных как *in vitro*, так и *in vivo*, изучали изоформу IL-37b, имеющую максимальный среди всех изоформ размер – 218 аминокислотных остатков. У мышей нет IL-37, однако есть функциональный рецепторный комплекс, с которым способен связываться IL-37 человека [27, 39, 48]. Учитывая это, биологическую роль этого цитокина изучали с использованием не только культуры клеток, но и лабораторных мышей.

В исследованиях *in vitro* рекомбинантный IL-37b снижал продукцию провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и TNF- α M1-макрофагами человека после их стимуляции LPS [39]. При этом подавление IL-37 моноклональными антителами приводило к обратному эффекту [50]. Кроме того, IL-37 уменьшает активацию провоспалительных клеток – нейтрофилов, и препятствует их миграции по градиенту хемокинов [51, 52]. Введение IL-37 уменьшает экспрессию IL-1 β в альвеолярных макрофагах мышей [48]. Кроме того, введение рекомбинантного IL-37 ингибирует пролиферацию Th17-клеток у мышей [53]. Таким образом, все эти данные указывают на выраженную противовоспалительную активность IL-37 в отношении эпителиальных клеток, макрофагов, нейтрофилов и мононуклеаров крови.

Биологическую роль IL-37 исследовали *in vivo* на так называемых IL-37tg-мышцах со встроенным геном, кодирующим IL-37b [49]. Этим мышцам вводили LPS, после чего оценивали продукцию ряда провоспалительных и противовоспалительных факторов. Оказалось, что LPS не индуцировал повышение уровней провоспалительных цитокинов: IL-6, IL-1 β , IL-17, IFN γ и др. у мышей дикого типа и IL-37tg, тогда как уровень противовоспалительных цитокинов, таких, как IL-10, увеличивался как у трансгенных мышей, так и у мышей дикого типа [36].

Роль IL-37 изучали также на модели колита, индуцированного у мышей декстрансульфатом натрия. Оказалось, что у IL-37tg-мышей тяжесть воспаления кишечника была значительно ниже: уменьшалась инфильтрация ободочной кишки всеми типами лейкоцитов, снижалась продукция воспалительных

цитокинов (IL-1 β , IL-17, TNF- α), увеличивалась продукция противовоспалительного IL-10. Адаптивный перенос клеток костного мозга от IL-37tg-мышей мышам дикого типа приводил к значительному нивелированию признаков экспериментального колита. Это свидетельствует о противовоспалительном эффекте миелоидных клеток, экспрессирующих IL-37 [49] (см. обзор [27]).

Противовоспалительная роль IL-37 подтверждена и на других моделях: на экспериментальной модели ишемического повреждения сердца [54], острой почечной ишемии [55], локализованного повреждения спинного мозга [56], ожирения и диабета типа 2 у мышей [57, 58] (см. обзор [27]).

Подобную противовоспалительную активность IL-37 ряд авторов связывает с его способностью ослаблять процесс презентации антигенов и тем самым подавлять активацию Т-клеток. Это предположение подтверждается тем фактом, что ДК, выделенные из IL-37tg-мышей, имели пониженный уровень молекул CD40 и МНС класса II [59]. Кроме того, IL-37 повышает уровень Т-регуляторных клеток, которые подавляют воспаление за счет секреции противовоспалительного фактора TGF- β [49, 60].

Однако до сих пор остается неясным, каким образом IL-37 проявляет свой эффект: либо за счет внутриклеточной формы, либо путем связывания внеклеточного IL-37 со своим рецептором на поверхности клеток. При помощи антител, нейтрализующих внеклеточный IL-37, показано, что данный цитокин в отдельных случаях проявляет внеклеточную активность, так как его нейтрализация у IL-37tg-мышей приводила к повышению уровня провоспалительного IL-6 в сыворотке крови [38]. В других исследованиях, напротив, нейтрализация IL-37 в трансфицированных соответствующим трансгеном макрофагах мыши не влияла на продукцию ими IL-6. Этот факт говорит о том, что в клетках данного типа IL-37 функционирует скорее посредством внутриклеточных механизмов [38]. Также введение зрелого IL-37b или его предшественника в макрофаги M1 человека подавляло LPS-индуцированную экспрессию IL-1 β , IL-6, TNF- α , однако эффект практически отсутствовал на макрофагах M2, ДК и клетках РВМС [38, 39]. Однако введение IL-37 в клетки РВМС больных ревматоидным артритом снижало экспрессию провоспалительных цитокинов [53].

Таким образом, можно заключить, что в целом IL-37 является негативным регулятором воспалительного процесса, по всей видимости, за счет снижения экспрессии основных провоспалительных цитокинов, подавления созревания ДК и презентации ими антигена, а также за счет индукции IL-37 Т-регуляторных клеток и противовоспалительных цитокинов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ ДАННЫЕ О РОЛИ IL-37 В ПАТОГЕНЕЗЕ АЛЛЕРГИЧЕСКИХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Наблюдения в клинической практике

Первые сведения о возможном участии IL-37 в патогенезе АЗ появились после того, как с помощью ИФА обнаружили повышение уровня экспрессии самой крупной изоформы – IL-37b в сыворотке крови при АтД. Более того, рост концентрации IL-37b прямо коррелировал с тяжестью симптомов заболевания. Изучение локальной экспрессии этого гена в биопсийном материале кожи иммуно-гистохимическим методом выявило рост экспрессии IL-37 в кератиноцитах эпидермиса и в некоторых стромальных клетках дермы, но не в лимфоцитах, инфильтрировавших ткань кожи. Таким образом, IL-37 у пациентов с АтД индуцировался как системно, так и локально, что может быть связано с активностью в коже другого представителя семейства IL-1 – IL-18, который активируется посредством TLR-сигналинга в ответ на инфекцию *Staphylococcus aureus*, патогена, который зачастую присутствует в больших количествах на коже больных АтД. Учитывая, что IL-18 является провоспалительным цитокином, одновременный рост экспрессии противовоспалительного IL-37 можно объяснить компенсаторной реакцией организма на чрезмерное воспаление при АтД [61] (табл. 1).

В исследовании, опубликованном Liu и соавт., наоборот, обнаружено значительное снижение активности IL-37 при АР [62]. В частности, наблюдалось значительное снижение концентрации IL-37 как в назальном лаваже пациентов с АР, так и в системном кровотоке. У 10 из 40 включенных в исследование детей с АР была диагностирована БА, при этом отсутствовали изменения системного и локального уровня IL-37. АР связан с дисрегуляцией баланса Th1/Th2-цитокинов, но снижение активности IL-37 у пациентов с АР происходит на фоне активации Th2-цитокинов (IL-4, -5 и -13) и подавления Th1-цитокинов (IL-12 и IFN γ). Выраженность таких проявлений АР, как уровень специфических IgE в сыворотке крови и эозинофилия, негативно коррелировала с активностью IL-37. В более детальном исследовании *in vitro* [62] стимуляция клеток РВМС, полученных от пациентов с АР, рекомбинантным IL-37 (rIL-37) приводила к подавлению продукции Th2-цитокинов, но не влияла на продукцию Th1-цитокинов и IL-10. Наоборот, продукция IL-37 клетками РВМС значительно снижалась после стимуляции рекомбинантными Th2-цитокинами, не изменялась после стимуляции Th1-цитокинами и активировалась в ответ на IL-10 [62]. Сходные результаты получены Li и соавт. [63]. Они подтвердили, что культивирование Т-клеток, выделенных из РВМС паци-

ентов с АР, в присутствии рекомбинантного IL-37 приводит к подавлению продукции IL-4, а также IL-17. Однако IL-37 не влиял на продукцию таких цитокинов, как IL-1b, IL-6 и IL-10, дендритными клетками, выделенными из РВМС этих же добровольцев, а также не изменял экспрессию ко-стимуляторных молекул CD80, CD40, HLA-DR и CD86 на их поверхности. Кроме того, присутствие в культуральной среде IL-37 не влияло на способность ДК активировать продукцию IL-4 и IL-17 Т-клетками. Это свидетельствует о роли IL-37 как регулятора врожденного, а не адаптивного иммунитета (табл. 1) [63]. Известно, что эозинофилы, выделяющие эозинофильный катионный белок (ЕСР) и другие провоспалительные факторы, принимают активное участие в повреждении эпителия дыхательных путей. В эозинофилах, выделенных из периферической крови детей с АР и обработанных IL-37, выявлено дозозависимое снижение ЕСР, что подтверждает противовоспалительную роль этого цитокина. Использование назальных стероидных препаратов – один из самых распространенных подходов в терапии этого заболевания. В этом исследовании четырехнедельный курс кортикостероидов приводил к двукратному снижению степени проявления симптомов АР и значительному росту экспрессии IL-37 на этом фоне. Таким образом, Liu и соавт. показали, что развитие симптомов АР связано с недостатком активности IL-37, а восстановление экспрессии IL-37 приводит к нивелированию проявлений заболевания (табл. 1) [62].

Изучено также изменение экспрессии IL-37 при аБА, где было показано значительное снижение продукции IL-37 стимулированными мононуклеарами периферической крови детей с аБА в сравнении со здоровыми добровольцами [50]. Показано также снижение уровня экспрессии ряда генов врожденной иммунной системы, в том числе и гена, кодирующего IL-37, у детей с аБА [64]. Этот эффект связывают с активностью Treg-клеток; количество которых повышено в крови детей с аБА. Более того, в экспериментах *in vitro* эти клетки были способны подавлять IL-5, IL-13 и IFN γ . У детей с неаллергической БА (нБА), несмотря на увеличенное количество Treg-клеток, отмечен существенный рост экспрессии IL-37, а также провоспалительных цитокинов IL-1b и IL-17, что связывают с иным функциональным состоянием Treg-клеток у детей с нБА. В отличие от Treg, выделенных у детей с аБА, Treg-клетки детей с нБА не были способны подавлять экспрессию провоспалительных цитокинов в экспериментах *in vitro* [64] (табл. 1).

Получено еще одно подтверждение снижения активности IL-37 при развитии БА у детей. Обнаружено значительное снижение экспрессии

IL-37 на уровне как мРНК, так и белкового продукта в сыворотке крови, а также в мокроте детей с контролируемой БА (всего 40 детей, из которых примерно у 70% астма имела аллергическую природу) по сравнению со здоровыми добровольцами. Кроме того, клетки, выделенные из мокроты больных астмой детей, при совместном культивировании с rIL-37 демонстрировали снижение продукции провоспалительных цитокинов IL-1b, IL-6 и TNF-α, что доказывает противовоспалительные свойства данного цитокина. Аналогично в CD4⁺ Т-клетках мокроты в присутствии IL-37 снижалась продукция IL-17,

что свидетельствует о способности IL-37 проявлять свой противовоспалительный эффект путем прямого воздействия на клетки (табл. 1). Эти данные свидетельствуют о том, что дефицит IL-37 при БА вносит вклад в развитие воспаления при этой патологии [65]. В сходном исследовании rIL-37 подавлял продукцию эпителиальными клетками, выделенными из мокроты детей с БА, другого провоспалительного фактора – TSLP (табл. 1) [66].

Обобщая результаты работ, посвященных изучению роли IL-37 в патогенезе АЗ, можно констатировать наличие у данного цитокина выраженных

Таблица 1. Роль IL-37 в аллергических заболеваниях. Клинические наблюдения

Патология	Дизайн исследования	Метод детекции	Результат	Ссылка
АтД	55 взрослых пациентов со средней и тяжелой формой АтД.	Определение IL-37b в сыворотке крови методом ИФА, локальной экспрессии в биопсийном материале кожи иммуно-гистохимическим методом.	Уровень IL-37 в сыворотке крови значительно выше у пациентов с АтД. Уровень IL-37 положительно коррелировал с тяжестью симптомов АтД.	[61]
АР	40 детей с АР (из них 10 с БА).	Определение IL-37b в сыворотке крови и назальном лаваже методом ИФА.	Снижение уровня IL-37b в сыворотке крови и назальном лаваже при АР. Уровни назальных Th2-цитокинов отрицательно коррелировали с локальной экспрессией IL-37b. Уровни ECP, IgE и эозинофилии в крови негативно коррелировали с уровнем сывороточного IL-37b. Интраназальное применение глюкокортикостероидного препарата приводило к индукции IL-37b и уменьшению симптомов АР.	[62]
аБА	21 ребенок с аБА.	Определение IL-37 методом ИФА в супернатантах стимулированных РВМС.	Продукция IL-37 клетками, стимулированными РВМС, у детей с аБА значительно снижена.	[50]
аБА и нБА	92 ребенка, из них 74 с аБА и 18 с нБА.	Уровень экспрессии IL-37 в стимулированных РВМС оценивали методом RT-PCR.	Экспрессия IL-37 повышена у пациентов с нБА, у которых также повышено количество нейтрофилов в крови, увеличена экспрессия провоспалительных цитокинов IL-1β и IL-17.	[64]
БА	40 детей с легкой и средней степенью тяжести БА.	Уровень экспрессии IL-37 в сыворотке крови и в мокроте оценивали методом ИФА и RT-PCR.	Экспрессия мРНК IL-37 в мокроте и его уровень в сыворотке крови значительно снижены у пациентов с БА. Культивирование клеток мокроты с rIL-37 приводило к подавлению продукции ими провоспалительных цитокинов TNF-α, IL-1β и IL-6 после стимуляции LPS. Стимулированные в присутствии IL-37 CD4 ⁺ Т-клетки мокроты снижали продукцию IL-17.	[65]
БА	40 детей с БА легкой и средней тяжести.	Инкубация клеток мокроты в присутствии IL-37.	В присутствии IL-37 продукция TSLP эпителиальными клетками мокроты значительно снижалась.	[66]
АР	32 взрослых пациента с АР.	Культивировали CD4 ⁺ Т-клетки, выделенные из РВМС с rIL-37.	После инкубации с IL-37 у пациентов с АР значительно снижалась продукция IL-17 и IL-4 CD4 ⁺ Т-клетками.	[63]

Примечания: АтД – атопический дерматит; АР – аллергический ринит; ИФА – иммуноферментный анализ; ECP – eosinophil cationic protein (эозинофильный катионный белок); РВМС – peripheral blood mononuclear cells (мононуклеары периферической крови); БА – бронхиальная астма; аБА – аллергическая бронхиальная астма; нБА – неаллергическая бронхиальная астма; RT-PCR – real-time polymerase chain reaction (полимеразная цепная реакция в реальном времени); rIL-37 – рекомбинантный интерлейкин-37.

противовоспалительных свойств, которые он проявляет путем прямого воздействия на эозинофилы, Т-клетки и эпителиальные клетки. В большинстве работ показано снижение как системной, так и локальной активности IL-37 при развитии таких АЗ, как аБА и АР. По всей видимости, низкая активность IL-37 способствует более выраженному течению Th2-опосредованной патологии. Однако в ряде исследований получены иные результаты, например, рост системной и локальной экспрессии IL-37 при развитии АтД. Возможная причина такого отличия связана с особенностью патогенеза АтД, в котором Th2-клетки играют ведущую роль на ранней стадии заболевания, а Th1-клетки – на поздней [67]. Кроме того, при нБА также показан рост системной и локальной активности IL-37. Бронхиальная астма – это гетерогенное заболевание; она может развиваться не только по проаллергическому Th2-зависимому пути, связанному с инфильтрацией в ткань легких эозинофилов, но и по Th17-зависимому пути, при котором в легких обнаруживаются и другие провоспалительные клетки – нейтрофилы. Учитывая гетерогенность патогенеза БА, высказывалось предположение о том, что IL-37 может играть различную роль при разных эндотипах БА. Это предположение подтвердили Raedler и соавт. [64], которые наблюдали снижение продукции IL-37 у детей с аБА; при нБА экспрессия IL-37 увеличивалась.

Такие противоречивые данные об изменении активности IL-37 свидетельствуют о гетерогенности молекулярных механизмов АЗ. Возможно, включение в подобные исследования пациентов с более точным фенотипированием позволит понять биологическую роль данного интерлейкина.

Исследования на животных

Исследования на лабораторных животных позволяют более детально оценить биологическую роль того или иного фактора, поскольку существует более широкий набор молекулярно-биологических инструментальных методов, недоступных в клинической практике. К подобному методологическому инструментарию можно отнести: использование нейтрализующих моноклональных антител, создание «нокаутных» мышей и применение rIL-37.

Известно, что у мышей отсутствует ген, кодирующий IL-37, однако на поверхности клеток локализован рецепторный комплекс, способный активировать внутриклеточный сигнал при взаимодействии с IL-37 человека. В одной из первых работ [48] эффект rIL-37, полученного в клетках *E. coli*, изучали на модели аспергиллеза легких у мышей. Мышей парентерально сенсибилизировали грибом *Aspergillus fumigatus* с последующим интраназальным введе-

нием этого же патогена. За несколько часов до интраназальных провокаций мышам внутрибрюшинно вводили rIL-37 в широком диапазоне доз от 1 до 1000 нг/мышь. Оказалось, что IL-37 в дозах 100 и 1000 нг/мышь предотвращал повреждение респираторного тракта, что выражалось в подавлении инфильтрации легких нейтрофилами, Th2- и Th17-клетками, в нивелировании признаков ремоделирования бронхов, таких, как перибронхиальное отложение коллагена, метаплазия эпителия бронхов. Показано, что IL-37 снижал уровень экспрессии провоспалительных цитокинов IL-1 β , IL-6 и IL-17A в ткани легких и активировал IL-10 [48]. Интраназальное введение рекомбинантного IL-37 человека в дозе 1 мкг/мышь приводило к подавлению уровня провоспалительных цитокинов IL-6, IL-12, IL-4, IL-5 и IL-13 в БАЛ мышей, проявления у которых БА были индуцированы OVA. Более того, снижение уровней этих интерлейкинов приводило к нивелированию проявлений экспериментальной БА; а именно, отмечалось существенное подавление эозинофилии легких, признаков ремоделирования бронхов, а также бронхиальной гиперреактивности. Биологический эффект IL-37 в этой модели БА мог проявляться за счет способности конкурентно связываться с рецептором IL-18R α к провоспалительному IL-18. Однако в дополнительных экспериментах с использованием животных с нокаутом генов рецепторов IL-18R α или SIGIRR показано, что положительные эффекты IL-37 утрачивались при инактивации указанных цепей рецептора. Это свидетельствует о том, что IL-37 активирует собственные противовоспалительные сигналы, а не является лишь конкурентным ингибитором IL-18 [50]. Сходные результаты получены на аналогичной OVA-индуцированной модели БА у мышей [68]. Интраназальное введение IL-37 в дозе 1 мкг значительно ослабляло проявления БА у мышей; в частности, происходило снижение гиперреактивности бронхов и воспаления в легких, что связывают с подавлением активности провоспалительных Th2-цитокинов IL-4, IL-6, IL-13 и активацией Th1-цитокина IFN γ (табл. 2) [68].

Более детализированное исследование молекулярных и клеточных механизмов противовоспалительного действия IL-37 проведено Lv J. и соавт. [69] на модели БА у мышей, индуцированной аллергеном клещей домашней пыли (HDM). В отличие от БА, индуцированной OVA, модель с использованием HDM более адекватна клинической ситуации у человека, так как применяется клинически значимый аллерген. Для введения HDM мышам на стадии как сенсибилизации, так и провокации использовали аэрозольный путь без внутрибрюшинной сенсибилизации. Интраназальное введение rIL-37 в дозе

0.2 мкг/мышь не приводило к подавлению признаков БА, тогда как введение IL-37 на стадии провокации значительно ослабляло проявления заболевания, такие, как эозинофильное воспаление в легких и гиперреактивность бронхов. Отмечается, что, в отличие от исследования Lunding и соавт. [50], IL-37 не влиял на дифференцировку Th2-клеток в легких и не супрессировал продукцию IL-4, IL-5, IL-13 и IL-17A. Более того, не выявлено влияния IL-37 на продукцию IgE-антител. Все это свидетельствует об отсутствии у IL-37 способности ингибировать активацию Т-клеток. Однако, несмотря на высокие уровни Th2-цитокинов, была выявлена существенная супрессия хемокина CCL11 после интраназальных введений IL-37. При развитии БА этот хемокин ответствен за привлечение эозинофилов в очаг воспаления – легкие, что объясняет способность IL-37 подавлять эозинофилию в легких. Главным источником CCL11 в легких являются фибробласты и клетки гладкой

мускулатуры дыхательных путей. Примечательно, что, в отличие от исследований *in vivo*, в экспериментах *in vitro* IL-37 не ингибировал продукцию CCL11 указанными клетками. Это объясняется тем, что на этих клетках рецептор для IL-37 представлен слабо, поэтому они нечувствительны к IL-37-опосредованным сигналам. По всей видимости, IL-37 оказывает не прямой эффект на продукцию CCL11 фибробластами и клетками гладкой мускулатуры дыхательных путей. Наибольшее количество копий рецептора выявлено на клетках трахеобронхиального эпителия. Для выявления таких не прямых эффектов в экспериментах *in vitro* клетки трахеобронхиального эпителия обрабатывали IL-37, после чего культивировали их совместно с фибробластами или клетками гладкой мускулатуры в присутствии индукторов CCL11 (IL-4 и IL-13). При таком дизайне эксперимента был установлен мощный эффект ингибирования продукции CCL11 фибробластами

Таблица 2. Роль IL-37 в аллергических заболеваниях. Исследования на лабораторных животных

Модель/вид животных	Экспериментальный протокол	Результат	Ссылка
Аспергиллез легких. Мыши C57BL/6.	Внутрибрюшинное введение rIL-37 в дозах 1000, 100, 10 и 1 нг/мышь до инфекции.	Снижение количества нейтрофилов в БАЛ. Супрессия NLRP3-инфламмосомы в легких. Снижение IL-1 β , IL-6 и IL-17A в ткани легких. Активация IL-10 в ткани легких. Нивелирование признаков ремоделирования бронхов (коллагеноз ткани легких и метаплазия бронхиального эпителия). Подавление инфильтрации легких Th2/Th17-клетками.	[48]
БА, индуцированная OVA. Мыши C57BL/6.	Интраназальное введение rIL-37 в дозе 1 мкг/мышь за 1 сут до аэрозольного введения OVA.	Снижение количества эозинофилов в БАЛ и ткани легких. Подавление гиперплазии эпителия бронхов, продукции слизи и гиперреактивности бронхов. Подавление провоспалительных цитокинов в БАЛ: IL-6, IL-12, IL-4, IL-5 и IL-13.	[50]
АР, индуцированный HDM. Мыши BALB/c.	Интраназальное введение rIL-37 в дозе 1 мкг/мышь на фоне интраназальных провокаций HDM.	Уменьшение назальной гиперреактивности в 3 раза. Снижение уровня аллерген-специфических антител класса IgE. Подавление инфильтрации эозинофилов в слизистую оболочку носовой полости. Супрессия провоспалительных цитокинов IL-4, IL-5, IL-13 и IL-17 в слизистой оболочке носовой полости и активация регуляторного IL-10.	[70]
БА, индуцированная OVA. Мыши BALB/c.	Интраназальное введение rIL-37 в дозе 1 мкг/мышь на фоне провокаций аллергеном.	Снижение гиперреактивности бронхов и инфильтрации легких провоспалительными клетками – лимфоцитами, нейтрофилами и эозинофилами. Подавление IL-4, IL-6 и IL-13 в ткани легких. Снижение пролиферации и миграции клеток гладкой мускулатуры дыхательных путей, эпителиально-мезенхимального перехода.	[68]
БА, индуцированная HDM. Мыши BALB/c.	Интраназальное введение rIL-37 в дозе 0.2 мкг/мышь на фоне сенсibilизации или интраназальных провокаций HDM.	Уменьшение количества эозинофилов в БАЛ и ткани легких, снижение гиперреактивности бронхов. IL-37 супрессировал IL-4/13-индуцированную продукцию CCL11 фибробластами и гладкомышечными клетками дыхательных путей.	[69]

Примечания: rIL-37 – рекомбинантный интерлейкин-37; БАЛ – бронхоальвеолярный лаваж; БА – бронхиальная астма; OVA – ovalbumin allergen (аллерген овальбумин); HDM – house dust mite allergen (аллерген клещей домашней пыли).

и клетками гладкой мускулатуры в ответ на обработку клеток трахеобронхиального эпителия IL-37. Это указывает на не прямое влияние IL-37 на IL-4/IL-13-опосредованную продукцию CCL11, для которого необходим межклеточный контакт указанных типов клеток. Таким образом, на модели аБА у мышей Lv J. и соавт. [69] подтвердили положительные эффекты IL-37 и пролили свет на молекулярные и клеточные механизмы его противовоспалительных свойств. Экзогенный IL-37 активирует клетки трахеобронхиального эпителия, которые при контакте с фибробластами и клетками гладкой мускулатуры дыхательных путей подавляют продукцию ими хемокина CCL11, что в итоге приводит к ослаблению эозинофильного воспаления в легких и восстановлению функции дыхания [69].

На модели АР у мышей выявлен сходный противовоспалительный эффект IL-37. Kim и соавт. [70] индуцировали АР у мышей путем внутрибрюшинных инъекций аллергена клещей домашней пыли (HDM) с последующей стадией интраназальных провокаций тем же аллергеном. В результате у животных развились признаки АР: повышенный уровень IgE, инфильтрация эозинофилами слизистой оболочки носовой полости, а также назальная гиперреактивность, выражавшаяся в повышенной частоте чиханий. При интраназальном введении rIL-37 (1 мкг/мышь) на фоне провокаций мышшей аллергеном отмечено нивелирование всех этих признаков патологии. По всей видимости, ослабление проявлений АР у мышшей связано со способностью IL-37 супрессировать активность провоспалительных цитокинов IL-4, IL-5, IL-13 и IL-17 и активировать регуляторный IL-10 (табл. 2) [70].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Прошло почти 20 лет с тех пор, как был открыт IL-37. За это время накоплено множество экспериментальных доказательств наличия противовоспалительных свойств у данного цитокина. Анализ данных о роли IL-37 в АЗ подтвердил уникальную функцию IL-37 как противовоспалительного агента, что не характерно для других представителей семейства IL-1. Результаты исследований как с использованием клинического материала, полученного от больных АЗ, так и с использованием моделей АЗ на мышах показали, что активация IL-37 приводит к супрессии провоспалительных Th2-цитокинов (IL-4, IL-5 и IL-13), Th17-цитокина (IL-17A), хемокинов и транскрипционных факторов (CCL11, STAT3, NF- κ B и др.). Супрессия указанных цитокинов и факторов в итоге приводит к нивелированию воспаления, что выражается в уменьшении степени инфильтрации органов-мишеней (слизистой оболочки носа при АР и ткани легких при БА) провоспалительными клетками (нейтрофилами и эозинофилами) и снижении гиперреактивности дыхательных путей. Свои биологические свойства внеклеточная форма IL-37 проявляет посредством рецепторного комплекса, состоящего из цепей IL-18R α и IL-1R8; внутриклеточная форма IL-37 способна транслоцироваться в ядро и ингибировать экспрессию провоспалительных генов. Выявленные положительные эффекты IL-37 позволяют рассматривать его в качестве потенциального противовоспалительного агента для цитокиновой терапии АЗ. ●

Работа поддержана грантом РФФ № 19-15-00272.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Khaitov M.R., Akimov V.S. // Russ. Allergol. J. 2004. V. 3. P. 67–74.
2. Demoly P., Hellings P., Muraro A., Papadopoulos N.G., van Ree R. // Global Atlas of Allergy. 2014. P. 406.
3. Gudima G.O., Ilina N.I. // Immunologiya. 2014. V. 35. № 1. P. 48–50.
4. Kurbacheva O.M., Pavlova K.S. // Pract. Pulmonol. 2017. V. 2. P. 14–21.
5. Prosekova E.V., Derkach V.V., Shestovskaya T.N., Netesova S.Y., Ivanova Y.V., Shchegoleva O.V. // Immunologiya. 2010. V. 31. № 3. P. 140–143.
6. Global Initiative for Asthma. 2015. P. 1–132.
7. Kurbacheva O.M., Polner S.A., Smirnov D.S. // Meditsinsky Sov. 2015. V. 3. P. 84–91.
8. Schlapbach C., Simon D. // Allergy. 2014. V. 69. № 12. P. 1571–1581.
9. Elisyutina O.G., Fedenko E.S., Boldyreva M.N., Gudima G.O. // Immunologiya. 2015. V. 36. № 2. P. 122–128.
10. Kuvshinova E.D. // Clin. Pract. Pediatr. 2012. V. 6. № 7. P. 74–78.
11. Shilovskiy I.P., Sundukova M.S., Babakhin A.A., Gaisina A.R., Maerle A.V., Sergeev I.V., Nikolskiy A.A., Barvinckaya E.D., Kovchina V.I., Kudlay D.A., et al. // J. Immunol. Methods. 2019. V. 468. P. 10–19.
12. Shilovskiy I.P., Babakhin A.A., Shershakova N.N., Kamyshnikov O.Y., Sundukova M.S., Gaisina A.R., Laskin A.A., Bzok A.M., Ivanova A.S., Khaitov M.R. // Curr. Trends Immunol. 2015. V. 16. P. 79–91.
13. Shershakova N., Bashkatova E., Babakhin A., Andreev S., Nikonova A., Shilovskiy I., Kamyshnikov O., Bzok A., Elisyutina O., Fedenko E., et al. // PLoS One. 2015. V. 10. № 8. P. 1–15.
14. Fahy J.V. // Nat. Rev. Immunol. 2015. V. 15. P. 57–65.
15. Boyman O., Kaegi C., Akdis M., Bavbek S., Bossios A., Chatzipetrou A., Eiwegger T., Firinu D., Harr T., Knol E., et al. // Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol. 2015. V. 70. № 7. P. 727–754.
16. Hellings P.W., Fokkens W.J., Bachert C., Akdis C.A., Bieber T., Agache I., Canonica G.W., Gevaert P., Joos G., Lund V., et al. // Allergy. 2017. V. 72. № 9. P. 1297–1305.
17. Zhang L., Jiang L.L., Cao Z.W. // Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci. 2017. V. 21. № 20. P. 4501–4508.
18. Steinke J.W., Borish L. // Respir. Res. 2001. V. 2. № 2. P. 66–70.

19. Ngoc P.I., Gold D., Tzianabos A., Weiss S.T., Celedón J.C. // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2005. V. 5. № 2. P. 161–166.
20. Maggi E. // *Immunotechnology.* 1998. V. 3. № 4. P. 233–244.
21. Ohno T., Morita H., Arae K., Matsumoto K., Nakae S. // *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 2012. V. 67. № 10. P. 1203–1214.
22. Saluja R., Khan M., Church M.K., Maurer M. // *Clin. Transl. Allergy.* 2015. P. 1–8.
23. Khaitov M.R., Gaisina A.R., Shilovskiy I.P., Smirnov V.V., Ramenskaia G.V., Nikonova A.A., Khaitov R.M. // *Biochem.* 2018. V. 83. № 1. P. 13–25.
24. Kumar S., McDonnell P., Lehr R., Tierney L., Tzimas M., Griswold D., Capper E., Tal-Singer R., Wells G.I., Doyle M.L., et al. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 14. P. 10308–10314.
25. Busfield S.J., Comrack C.A., Yu G., Chickering T.W., Smutko J.S., Zhou H., Leiby K.R., Holmgren L.M., Gearing D.P., Pan Y. // *Genomics.* 2000. V. 66. № 2. P. 213–216.
26. Pan G., Risser P., Mao W., Baldwin D.T., Zhong A.W., Filvaroff E., Yansura D., Lewis L., Eigenbrot C., Henzel W.J., et al. // *Cytokine.* 2001. V. 13. № 1. P. 1–7.
27. Dinarello C.A., Nold-Petry C., Nold M., Fujita M., Li S., Kim S., Bufler P. // *Eur. J. Immunol.* 2016. V. 46. № 5. P. 1067–1081.
28. Newman T.L., Tuzun E., Morrison V.A., Hayden K.E., Ventura M., McGrath S.D., Rocchi M., Eichler E.E. // *Genome Res.* 2005. V. 15. № 10. P. 1344–1356.
29. Sharaf N., Nicklin M., di Giovine F. // *Cytokine.* 2014. V. 68. № 1. P. 16–22.
30. Kumar S., McDonnell P.C., Lehr R., Tierney L., Tzimas M.N., Griswold D.E., Capper E.A., Tal-Singer R., Wells G.I., Doyle M.L., et al. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 14. P. 10308–10314.
31. Smith D.E., Renshaw B.R., Ketchum R.R., Kubin M., Garka K.E., Sims J.E. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. № 2. P. 1169–1175.
32. Taylor S.L., Renshaw B.R., Garka K.E., Smith D.E., Sims J.E. // *Genomics.* 2002. V. 79. № 5. P. 726–733.
33. Boraschi D., Lucchesi D., Hainzl S., Leitner M., Maier E., Mangelberger D., Oostingh G.J., Pfaller T., Pixner C., Posselt G., et al. // *Eur. Cytokine Netw.* 2011. V. 22. № 3. P. 127–147.
34. Murzin A.G., Lesk A.M., Chothia C. // *J. Mol. Biol.* 1992. V. 223. № 2. P. 531.
35. Keller M., Rüegg A., Werner S., Beer H.D. // *Cell.* 2008. V. 132. № 5. P. 818–831.
36. Sharma S., Kulk N., Nold M.F., Graf R., Kim S.-H., Reinhardt D., Dinarello C.A., Bufler P. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. № 8. P. 5477–5482.
37. Kumar S., Hanning C.R., Brigham-Burke M.R., Rieman D.J., Lehr R., Khandekar S., Kirkpatrick R.B., Scott G.F., Lee J.C., Lynch F.J., et al. // *Cytokine.* 2002. V. 18. P. 61–71.
38. Bulau A.-M., Nold M.F., Li S., Nold-Petry C.A., Fink M., Mansell A., Schwerdt T., Hong J., Rubartelli A., Dinarello C.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 7. P. 2650–2655.
39. Li S., Neff C.P., Barber K., Hong J., Luo Y., Azam T., Palmer B.E., Fujita M., Garlanda C., Mantovani A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 8. P. 2497–2502.
40. Rudloff I., Cho S.X., Lao J.C., Ngo D., McKenzie M., Nold-Petry C.A., Nold M.F. // *J. Leukoc. Biol.* 2017. V. 101. № 4. P. 901–911.
41. Dinarello C.A. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 1999. V. 103. № 1. P. 11–24.
42. Pirozhkov S.V., Litvitskiy P.F. // *Immunologiya.* 2018. V. 39. № 2–3. P. 158–165.
43. Nakanishi K., Yoshimoto T., Tsutsui H., Okamura H. // *Annu. Rev. Immunol.* 2001. V. 19. P. 423–474.
44. Nold-Petry C.A., Lo C.Y., Rudloff I., Elgass K.D., Li S., Gantier M.P., Lotz-Havla A.S., Gersting S.W., Cho S.X., Lao J.C., et al. // *Nat. Immunol.* 2015. V. 16. № 4. P. 354–365.
45. Costelloe C., Watson M., Murphy A., McQuillan K., Loscher C., Armstrong M.E., Garlanda C., Mantovani A., O'Neill L.A.J., Mills K.H.G., et al. // *J. Neurochem.* 2008. V. 105. № 5. P. 1960–1969.
46. Lunding L., Webering S., Vock C., Schröder A., Raedler D., Schaub B., Fehrenbach H., Wegmann M. // *Ann. Am. Thorac. Soc.* 2016. V. 13. P. 95–96.
47. Riva F., Bonavita E., Barbati E., Muzio M., Mantovani A., Garlanda C. // *Front. Immunol.* 2012. V. 3. № 322. P. 1–13.
48. Moretti S., Bozza S., Oikonomou V., Renga G., Casagrande A., Iannitti R.G., Puccetti M., Garlanda C., Kim S., Li S., et al. // *PLoS Pathog.* 2014. V. 10. № 11. P. 1–12.
49. Nold M.F., Nold-Petry C.A., Zepp J.A., Palmer B.E., Bufler P., Dinarello C.A. // *Nat. Immunol.* 2010. V. 11. № 11. P. 1014–1022.
50. Lunding L., Webering S., Vock C., Schröder A., Raedler D., Schaub B., Fehrenbach H., Wegmann M. // *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 2015. V. 70. № 4. P. 366–373.
51. Sakai N., van Sweringen H.L., Belizaire R.M., Quillin R.C., Schuster R., Blanchard J., Burns J.M., Tevar A.D., Edwards M.J., Lentsch A.B. // *J. Gastroenterol. Hepatol.* 2012. V. 27. № 10. P. 1609–1616.
52. Wu B., Meng K., Ji Q., Cheng M., Yu K., Zhao X., Tony H., Liu Y., Zhou Y., Chang C., et al. // *Clin. Exp. Immunol.* 2014. V. 176. № 3. P. 438–451.
53. Ye L., Jiang B., Deng J., Du J., Xiong W., Guan Y., Wen Z., Huang K., Huang Z. // *J. Immunol.* 2015. V. 194. № 11. P. 5110–5119.
54. Yousif N.G., Li J., Yousif F., Ao L., Nold M.F., Nold-Petry C., Fullerton D.A., Dinarello C.A., Meng X. // *Circulation.* 2011. V. Suppl 21. P. 124.
55. Yang Y., Zhang Z.-X., Lian D., Haig A., Bhattacharjee R.N., Jevnikar A.M. // *Kidney Int.* 2015. V. 87. № 2. P. 396–408.
56. Coll-Miró M., Francos-Quijorna I., Santos-Nogueira E., Torres-Espin A., Bufler P., Dinarello C.A., López-Vales R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 5. P. 1411–1416.
57. Ballak D.B., van Diepen J.A., Moschen A.R., Jansen H.J., Hijmans A., Groenhof G.J., Leenders F., Bufler P., Boekschoten M.V., Muller M., et al. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. № 4711. P. 1–12.
58. Ballak D.B., Li S., Johnson L.C., Stienstra R., van Diepen J.D.R., Seals D.R., Dinarello C.A. // *Gerontologist.* 2017. V. 55. № 2. P. 62.
59. Luo Y., Cai X., Liu S., Wang S., Nold-Petry C.A., Nold M.F., Bufler P., Norris D., Dinarello C.A., Fujita M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 42. P. 15178–15183.
60. Shuai X., Wei-min L., Tong Y., Dong N., Sheng Z., Yao Y. // *Sci. Rep.* 2015. V. 28. № 5. P. 14478.
61. Fujita H., Inoue Y., Seto K., Komitsu N., Aihara M. // *J. Dermatol. Sci.* 2013. V. 69. P. 173–175.
62. Liu W., Deng L., Chen Y., Sun C., Wang J., Zhou L., Li H., Luo R. // *Mediators Inflamm.* 2014. V. 2014. P. 1–13.
63. Li C., Shen Y., Wang J., Ma Z.X., Ke X., Wang Z.H., Hong S.L., Hu G.H. // *Int. Immunopharmacol.* 2018. V. 60. P. 152–159.
64. Raedler D., Ballenberger N., Klucker E., Bock A., Otto R., Prazeres Da Costa O., Holst O., Illig T., Buch T., von Mutius E., et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2015. V. 135. № 1. P. 81–91.
65. Charrad R., Berraïes A., Hamdi B., Ammar J., Hamzaoui K., Hamzaoui A. // *Immunobiology.* 2016. V. 221. № 2. P. 182–187.
66. Berraïes A., Hamdi B., Ammar J., Hamzaoui K., Hamzaoui A. // *Immunol. Lett.* 2016. V. 178. P. 1–7.
67. Akdis M. // *Curr. Opin. Allergy Clin. Immunol.* 2010. V. 10. № 5. P. 443–451.
68. Huang N., Liu K., Liu J., Gao X., Zeng Z., Zhang Y., Chen J. // *Int. Immunopharmacol.* 2018. V. 55. P. 198–204.
69. Lv J., Xiong Y., Li W., Cui X., Cheng X., Leng Q., He R. // *Allergy Eur. J. Allergy Clin. Immunol.* 2018. V. 73. № 8. P. 1642–1652.
70. Kim D.H., Kim S.W., Kang J. // *Iranian J. Allergy, Asthma Immunol.* 2017. V. 16. № 5. P. 404–417.

The Role of Heritable Tumors in Evolution of Development: a New Theory of *Carcino-evo-devo*

A. P. Kozlov

Vavilov Institute of General Genetics RAS, Moscow, 119333 Russia
 Biomedical Center, Research Institute of Ultrapure Biologicals and Peter the Great St. Petersburg Polytechnic University, St. Petersburg, 195251 Russia
 E-mail: contact@biomed.spb.ru
 Received June 10, 2019; in final form, August 06, 2019
 DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-65-72

ABSTRACT The hypothesis of evolution by tumor neofunctionalization (the “main hypothesis”) describes the possible role of hereditary tumors in evolution. The present article examines the relationship of the main hypothesis to other biological theories. As shown in this paper, the main hypothesis does not contradict to the existing biological theories, but fills the lacunas between them and explains some unexplained (or not completely understood) questions. Common features of embryonic development and tumorigenesis are described by several recognized theories. Similarities between normal development and tumorigenesis suggest that tumors could participate in the evolution of ontogenesis and in the origin of new cell types, tissues and organs. A wide spectrum of non-trivial explanations and non-trivial predictions in different fields of biology, suggested by the main hypothesis, is an indication of its fundamental nature and the potential to become a new biological theory, a theory of the role of tumors in evolution of development, or *carcino-evo-devo*.

KEYWORDS heritable tumors, embryonic development, *evo-devo*, *carcino-evo-devo*.

ABBREVIATIONS AIS – adaptive immune system; CRC – Core Regulatory Complex; C/T antigens – cancer/testis antigens; RAG – recombination-activating genes; TCR genes – T-cell receptor genes; TEBs – Terminal end buds; WGDs – whole-genome duplications.

INTRODUCTION

Multicellular organisms needed a continuous source of additional cell masses with high biosynthetic and morphogenetic potential as a material for progressive evolution, especially in the line Deuterostomia – Chordata – Vertebrata. The problem of the origin of such cell masses has not been resolved. It is clear that stem cells should participate in this process, but adult and embryonic stem cells are regulated by functional feedback loops and cannot provide considerable amounts of excessive cells. Physiological proliferative processes existing in normal organisms could not provide sizeable extra cell masses because such proliferative processes are functional and are regulated with feedback loops.

On the other hand, tumors and tumor stem cells are not (or less) regulated and potentially could provide the evolving multicellular organisms with unlimited amounts of extra cells with high biosynthetic and morphogenetic potential.

The hypothesis of evolution by tumor neofunctionalization (below I will call it “the main hypothesis”)

suggests that the possible role of hereditary tumors in evolution might consist in providing extra cell masses for the expression of evolutionarily novel genes and gene combinations, and for the origin of new cell types, tissues and organs [1]. The main hypothesis formulated several non-trivial predictions; some of them have already received experimental confirmation [1–3]. In the present article, I will examine the relationship of the main hypothesis to other biological theories.

NON-TRIVIAL EXPLANATIONS OF THE MAIN HYPOTHESIS AND ITS RELATIONSHIP TO OTHER BIOLOGICAL THEORIES

The main hypothesis does not contradict the existing biological theories but fills the lacunas between them and explains some unexplained (or not completely understood) questions (*Fig. 1*). Explanation of the phenomena unexplained on not completely explained by the pre-existing theories, together with non-trivial predictions, is the fundamental demand to the new scientific theory.

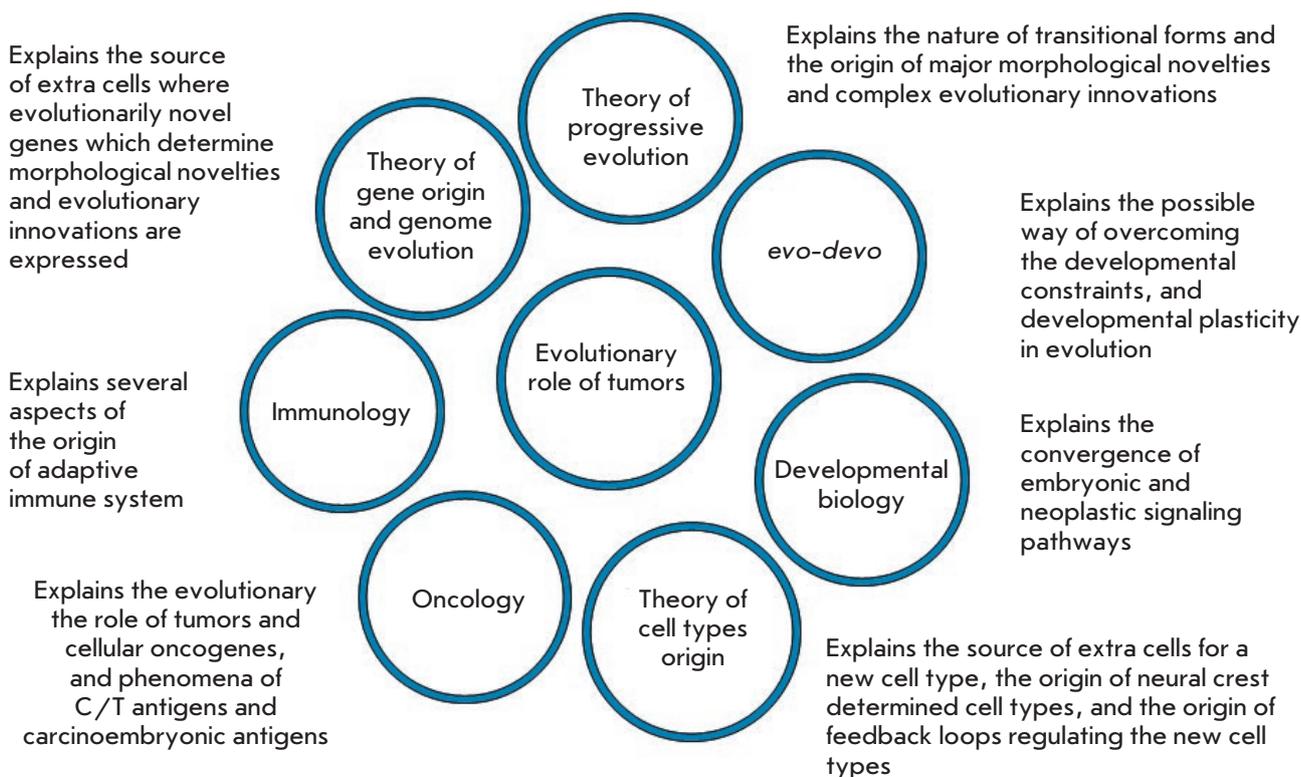


Fig. 1. Non-trivial explanations of the main hypothesis and its relationships to other biological theories

In theory of progressive evolution, the main hypothesis explains the nature of transitional forms, and the origins of complexity. It explains the possible mechanism of the origin of major morphological novelties such as evolutionarily new organs and complex evolutionary innovations such as the adaptive immune system.

In *evo-devo*, the main hypothesis explicates the possible way to overcome developmental constraints, and the mechanism of developmental plasticity in progressive evolution. It also suggests the neoplastic mode of evolution of ontogenesis.

In developmental biology, this hypothesis offers an explanation for the convergence of embryonic and neoplastic signaling pathways.

In the theory of cell types origin, it explains the source of extra cells for a new cell type, the origin of neural crest determined cell types, and the origin of feedback loops regulating the new cell types. The role of oncogenes, tumor suppressor genes, and novel genes and gene combinations in the origin of new cell types is also explained.

In the theory of gene origin and genome evolution, it offers an explanation for the source of extra cells where the evolutionarily novel genes determining the mor-

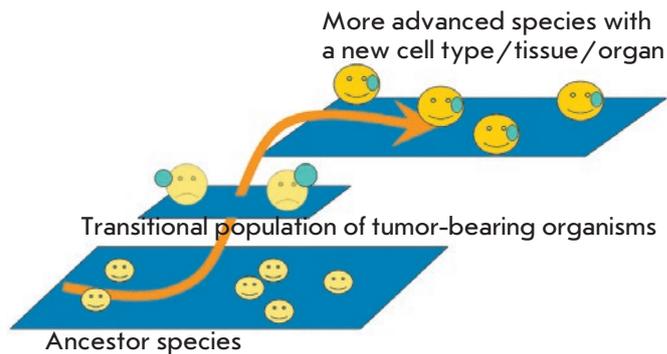


Fig. 2. Population of tumor-bearing organisms with heritable tumors as transition between established species of organisms at different levels of complexity. Modified from [1], with permission

phological novelties and evolutionary innovations are expressed.

In oncology, it construes the evolutionary role of tumors and cellular oncogenes, phenomena of cancer/testis antigens and carcinoembryonic antigens, etc.

In immunology, the main hypothesis explains several aspects of the origin of the adaptive immune system.

Non-trivial explanations offered by the main hypothesis were well accepted by representatives of

corresponding branches of biological science during a number of my presentations to different audiences.

The explanations being most important for the present paper are those of the problem of transitional forms in progressive evolution, the mechanisms of overpassing the developmental constraints, and the origins of complexity and major evolutionary innovations and morphological novelties. I will now examine them in more detail.

TUMOR-BEARING ORGANISMS AS TRANSITIONAL FORMS IN PROGRESSIVE EVOLUTION

According to the main hypothesis, tumor-bearing organisms with hereditary tumors could represent relatively unstable transitional forms that linked phyla with different levels of complexity (*Fig. 2*). Their stabilization was achieved through the expression of novel genes and gene combinations, and the origin of new functions and functional regulatory feedbacks. As we know from physics, the unstable elementary particles (or some unstable transuranium elements) are difficult to observe. In chemistry, the unstable highly reactive transitional molecules are difficult to observe as well. Similarly, it is difficult to find tumor-like transitional structures in paleontological records. A.N. Severtsov has already pointed out that this is because periods of complexity growth were rare and of short-duration [4]. I would add that transitional populations of tumor-bearing organisms could be small, and tumors were soft and not well preserved.

The examples of transitional populations of tumor-bearers are tumor-bearing voles and *Xiphophorus* fishes with melanomas which were discussed in my book [1]. During certain periods of phylogenesis, differentiation of tumor cells in different organisms of these populations could be frequent enough to result in populations of organisms with a new cell type. The organisms with the new cell type would then be selected for their fitness and competitive abilities. Examples of such selection were discussed in the book [1]. New cell types could participate in the formation of new tissues and organs.

TUMORS AS THE GENERAL MECHANISM TO OVERCOME DEVELOPMENTAL CONSTRAINTS

Developmental constraints are defined as limitations on phenotypic variability caused by structural and other features of the developmental system [5]. Restraints on variant phenotype production include physical, morphological, genetic and phyletic constraints [6, 7]. Developmental constraints seriously restrict evolutionary changes in animals [8]. The body plan at certain stages is so embedded in the organism's development that any modification may be lethal [9].

But despite the existence of developmental constraints, morphological novelties have been realized in progressive evolution. The mechanisms through which such transitions happen are not completely understood. The existing hypotheses, e.g. the hypothesis of facilitated variation [10], do not explain how it happened.

My main hypothesis explains that tumors may represent a general way to overcome the developmental constraints in evolutionary perspective, although tumors are connected with present-day pathological conditions. The concept of tumors as engines that search for all possible molecular combinations and innovations by cancellation of major restraints and incompatibilities, formulated in my book [1], helps to understand the possible mechanisms of overpassing the developmental constraints.

Tumors as search engines work in the space of possibilities that have not realized themselves yet. The concept of possibility space is being developed in scientific literature [11–13]. The concepts of morphological, phenotypic and genotype space were also used [5, 7]. The “tumors as a search engine” idea gravitates towards the chaos theory and the complexity theory, which looks for the source of complexity in evolution [14, 15].

The molecular basis of search engine is the global hypomethylation of DNA (discussed in the book), increased global transcription activity [16], and dysregulated transcriptional programs (“transcriptional addiction” [17]) in tumor cells. Gene competition and antagonistic relations between the genes [18, 19] may change significantly in tumor cells due to additional space and resources there. As a result, many unusual genes not expressed in normal cells, including evolutionarily novel genes, are expressed in tumors [2]. Thus, developmental constraints and the compatibility/incompatibility issues are completely or partially abandoned, and unrealized developmental potential is fulfilled.

For morphological innovations, not only novel genes and gene combinations are necessary, but also additional cell masses. According to the main hypothesis, valuable coincidences of unusual gene expression and cell proliferation, which may incidentally happen in tumors, are frozen by natural selection (“frozen accidents” discussed in the book [1]), and lead to the origin of morphological novelties.

Thus, tumors may represent a general mechanism of evolvability of complex organisms and/or developmental plasticity in evolution (see [10, 20] for evolvability and [21, 22] for developmental plasticity). In particular, tumors may facilitate new combinations of “core components” of J. Gerhart and M. Kirschner [10], and/or core regulatory genes of G. Wagner [23], as well as expression of evolutionarily novel genes. On the contra-

ry, anti-cancer selection may be the source of developmental and evolutionary constraints [24].

TUMORS AND THE ORIGIN OF NEW CELL TYPES

The number of cell types in Metazoa increased during evolution and may be a measure of their complexity [19, 25]. That is why scientists were looking for the mechanisms of the origin and evolution of new cell types.

The main hypothesis suggests that evolutionarily novel genes and gene combinations are expressed in tumor cells and give rise to a new function and a new regulatory feedback loop. The new function is selected for its enhancement, which also enhances the regulatory feedback. This leads to differentiation of tumor cells in the novel direction and the origin of a new cell type. The new cell type is inherited due to the mechanisms similar to those in preexisting cell type (see discussion in the book [1]). The evolutionary role of cellular oncogenes might consist in sustaining a definite level of autonomous proliferative processes in evolving populations of multicellular organisms and in promoting the expression of evolutionarily new genes. After the origin of a new cell type, the corresponding oncogene should have turned into a cell type-specific regulator of cell division and gene expression [26, 27]. Non-trivial predictions that follow from such a scenario were confirmed in my lab and discussed in the previous paper [3].

The “sister-cell-type model” suggests that novel cell types arise as pairs (sister cell types) from an ancestral cell type by sub-specialization at the last stages of differentiation [28]. This hypothesis works best in the case of terminally differentiated cells but has difficulties in explaining developmental cell types like neural crest-derived cells [23]. In later publication, the authors formulated the “serial sister cell type” hypothesis: “It is now well established that early animal evolution involved the repeated subdivision of the animal body into distinct regions. We propose that these regionalization events also led to the duplication and subsequent diversification of at least one of the cell types that populated that region. This process produced an iterated series of topographically separate sister cell types that we refer to as serial sister cell types. It is plausible that these cell type duplication events also led to the evolution of serial sister stem cells, as virtually all animal cell types co-occurring in one region develop from asymmetrically dividing, multipotent stem cell-like cells” [29]. This hypothesis may also be called “evolution by cell type duplication”. It does not contradict my main hypothesis but even converges with it. The pre-existing cell type is under control of natural selection. It is also under regulatory control in the organism. The duplication of a cell type means the origin of extra cells, which escape

selection and regulatory control, like in case of gene duplication. The uncontrolled extra cell mass is a neoplasm by definition, which brings the serial sister cell type hypothesis close to the hypothesis of evolution by tumor neofunctionalization.

In tumors, the combination of genes expressed in unrelated or distantly related cell types may be transcribed. In this case, the new cell type will not be in hierarchical relationships predicted by sister-cell-type model. The origin of many cell types from neural crest may be explained in this way. Evolutionarily novel genes expressed in tumors may become targets for core regulatory genes (see Core Regulatory Complex, CRC, [23]) of pre-existing cell types. In such cases, the hierarchical relationship may be conserved.

TUMORS AND THE ORIGIN OF MAJOR EVOLUTIONARY MORPHOLOGICAL NOVELTIES AND COMPLEX EVOLUTIONARY INNOVATIONS

In my book [1], I presented examples when expression of evolutionarily novel genes in tumors was connected with the origin of new organs (placenta in Mammalia and root nodules in Legumes) and new cell types (macromelanophores in Xiphophorus fishes). The mammary gland and the adaptive immune system are new examples of the possible connection with tumors during the origin of new organs and complex evolutionary innovations.

The mammary gland, an evolutionarily novel organ, may represent a neomorphic hybrid, a mosaic organ whose evolution involved the incorporation of characteristics already encoded in the genome but expressed differently by separate populations of skin glands [30]. The mammary gland coopted signaling pathways and genes for secretory products from earlier integumentary structures [31, 32]. The ancestral tumor could be a mechanism for expression of evolutionarily novel gene combinations in breast tissue, as discussed above. A recent study of evolutionarily novel genes in placental mammals also discovered several novel genes expressed in breast tissue [33].

The adaptive immune system (AIS) originated in jawed fishes and represents a major innovation in evolution of complexity [34]. Two macroevolutionary events – the invasion of the RAG transposon and two whole-genome duplications (WGDs) – are believed to determine the relatively rapid (“big bang”) emergence of the AIS in jawed vertebrates [35]. But the origin of clonal expansion and clonal selection of lymphocytes, as well as of different immune cell types and organs, is hard to imagine with only the RAG transposon and WGDs hypotheses. The AIS requires large populations of cells for clonal selection and clonal expansion, and these populations of cells could be provided by an-

cestral tumors. The computer-like search in ancestral tumors for all possible combinations of molecular and cellular events – the search engine – could be a mechanism of the origin of such complicated evolutionary innovation as AIS, with its combinatorial joining of V, D and J elements.

The number of potential Ig/TCR V region is huge, far exceeding the number of available lymphocytes. The expressed repertoire was studied by variety of methods. The conclusion is that the antibody diversity in non-mammalian vertebrates is low, as opposed to mammals, which make the most of this potential [36, 37].

In frogs, the organization and usage of Ig gene loci is similar to that in mammals, but the diversity of antibodies is much smaller, several orders of magnitude less than in mammals. This is due to major difference in cell number and lymphoid organ architecture. There are few cells in the differentiating immune system of frogs, not enough to realize the potential diversity of the V_H locus. Tadpoles have less efficient immune response, i.e. skin graft rejection, and lower Ig and TCR diversity. Simpler organization of the lymphoid frog organs, without lymph nodes or germinal centers, results in poor affinity maturation [36–39].

Thus, cell number limitation represented a serious restriction for the evolution of AIS. Coevolution of lymphoid cell compartment with Ig gene loci might involve tumors. Tumors might provide not only combinatorial possibilities, but also the additional cells necessary for clonal expansion and selection, and for building the structure of lymphoid organs. Indeed, true lymphoid tumors have been discovered in frogs [40, 41].

Without tumors, the origin of such combinatorial innovations as mammary gland and AIS is not possible, because of developmental constraints in established organs and ontogenies.

According to the main hypothesis, the origin of a major evolutionary morphological novelty or complex evolutionary innovation cannot happen by saltatory manner, because it needs the coincidence of too many independent events at different levels of organization. The mechanism for saltatory origin of complex structures does not exist. That is why the unstable transitional state with search engine capabilities – the tumor – is necessary.

TUMOR-LIKE PROPERTIES OF EVOLUTIONARILY NEW ORGANS AS AN INDICATION OF THEIR ORIGIN FROM TUMORS

Parallels between the normal and neoplastic development result in solid tumors with many features of normal organs (atypical tumor organs, [42]), on one side, and some normal organs with features of tumors, on the other side.

Normal organs that have features of tumors may be called tumor-like organs. In my book [1], I examined such tumor-like organ, the placenta. Many tumor-like features of placenta were reviewed, and relation of its origin to recurrent germline retrovirus infection was analyzed. The conclusion was drawn that the placenta may be considered a regulated tumor-like organ. After publication of the book, several reviews have been published that basically confirm this point of view [43–45]. Thus, the placenta is a tumor-like organ, first identified in the literature as such.

The developing mammary gland demonstrates many of the properties associated with tumors, e.g. invasion. Terminal end buds (TEBs), a rapidly proliferating mass of epithelial cells, invades into stromal tissue much like a solid tumor [46]. The mammary gland is an evolutionarily young organ. The evolutionary novelty of the mammary gland may be a reason for higher incidence of breast cancer as compared to cancer incidences in evolutionarily older organs [47].

Like the mammary gland, the prostate gland demonstrates correlation of evolutionary novelty with the highest incidence of cancer [47]. Genes differentially expressed in prostate cancer progression overlap with the genes expressed at the earliest stages of prostate development [48]. This indicates the tumor-like nature of the prostate gland.

The common features of tumor-like organs (placenta, mammary gland and prostate) is the presence of the regulated invasion stage in their organogenesis, and the young evolutionary age of these organs. The mammary gland and prostate also demonstrate the highest incidence of cancer. The main hypothesis suggests that atypical tumor organs can give rise to normal organs in evolution, with tumor-like organs as transitional phase.

TUMORS AND THE GROWTH OF COMPLEXITY

According to the main hypothesis, tumors may be not a consequence, but a prerequisite of the growth of complexity, by providing the building material – extra cells – for expression of evolutionarily novel genes and gene combinations. As it is evident from the above discussion of the origin and evolution of the adaptive immune system (AIS), the access to additional cells necessary for this evolution was not a trivial problem, e.g. for amphibians with their available cell types and stem cells. This problem was resolved in the line Amphibia – Mammalia, with the help of hereditary tumors and tumor stem cells, as suggested by the main hypothesis. With the origin of new functions, atypical tumor-like organs could be stabilized by functional feedbacks, accumulate larger proportion of cells differentiated in new directions and become new organs. The origin of complex organs such as the mammary gland and com-

plex systems such as the AIS may be explained with the help of the “tumors as a search engine” concept discussed above: tumors search for unrealized possibilities in the gene expression possibility space and in the morphological possibility space. Thus, the “tumors as a search engine” concept suggests that chaotic neoplastic development may be a source of complexity in evolution, similarly to suggestion of the dynamical systems theory [14, 15].

TUMORS AND EMBRYONIC DEVELOPMENT

Normal embryonic development and tumorigenesis have many common features, e.g. invasiveness and cell migration, expression of certain genes and signaling pathways, epithelial-mesenchymal transition, etc.

These commonalities are usually explained by re-activation or deregulation of embryonic signaling pathways in tumors [48–52]. On the other hand, many signaling pathways connected with normal development were first discovered as protooncogenes and tumor-suppressor genes. The terminology of “convergence” of embryonic and tumor signaling pathways is also used (e.g. [53]).

Common features of embryonic development and tumorigenesis are described by several recognized theories. The “embryonal rest” or “embryonic remnants” theory of cancer, formulated over a hundred years ago, suggested that tumors may originate from embryonic cells [54, 55]. This theory was finally proved last year by the results of single-cell transcriptome analysis: the transcriptomes of childhood Wilms tumor cells matched to those of specific fetal cell types [56].

The loss of differentiated functions (e.g. due to mutations) causes tumors. On the other hand, tumor cells can differentiate with the loss of malignancy. This and similar evidence constituted the basis of the differentiation theory of cancer. The more recent stem cell theory of cancer interconnects cancer, cell differentiation, and embryonic development.

The similarities between normal development and tumorigenesis suggest that tumors could participate in the evolution of ontogenesis and in the origin of new cell types, tissues and organs. If true, it explains all the above similarities.

TUMORS AND EVO-DEVO

A.N. Severtsov defined the following major ways of the evolution of ontogenesis, or modes of phylembryogenesis, as he called them: archallaxis (the change in original anlagen), when changes were introduced at the earliest stages of organ embryonic development, or *de novo* formation of evolutionarily new organ occurred; deviation, when the changes were introduced in the intermediary stages of organ embryogenesis; and

anaboly, when changes were added at terminal stages of organ ontogenesis, i.e. addition of final stages of morphogenesis [57–59] (see also [60] for review).

From the discussion above it is evident that evolutionarily novel tumor-like organs (placenta, mammary gland, and prostate) represent examples of true archallaxis. The neural crest with its tumor-like cells, recapitulating those of prototype tumor-like formations in early vertebrates [1], may be another example of archallaxis (some researchers consider the neural crest to be a fourth germ layer [61]). Thus, tumors may be a mechanism of the origin of phylogenetically new formations. A.N. Severtsov wrote that unregulated embryonic changes at the earliest stages of organ development produce material for archallaxis, and archallaxis is the most rapid mode of evolution of development [59]. This agrees with the main hypothesis. It is interesting that A.N. Severtsov used the term “new formations,” like oncologists did, and claimed that phylogenetic new formations originated by the archallaxis mode.

The origin of the neocortex in humans, related to tumor-like processes as discussed in my book [1], may be connected to deviation and/or anaboly modes. An interesting example of deviation was discussed by A.N. Severtsov in his classical “Morphological Laws of Evolution” [59]: the evolution of nasal pits in Osteichthyes. In *Belone acus*, there is a serious deviation in development of its olfactory pit, which consists in formation of the large mushroom-like outgrowth at the bottom of the pit. The development of this outgrowth resembles tumor growth.

Embryonic, fetal, infantile, and adult tumors, the possible candidates for playing a role in evolution, could participate in evolution of ontogenesis at its different stages. This assumption predicts recapitulations

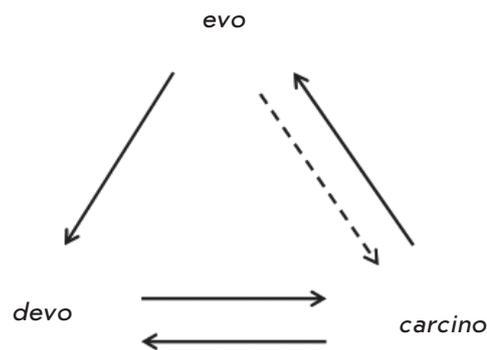


Fig. 3. Carcano-evo-devo diagram: *devo* – normal ontogenies, *carcino* – ontogenies with neoplastic development, *evo* – progressive evolution of ontogenies. Arrows indicate participation in the corresponding process, or essential connections

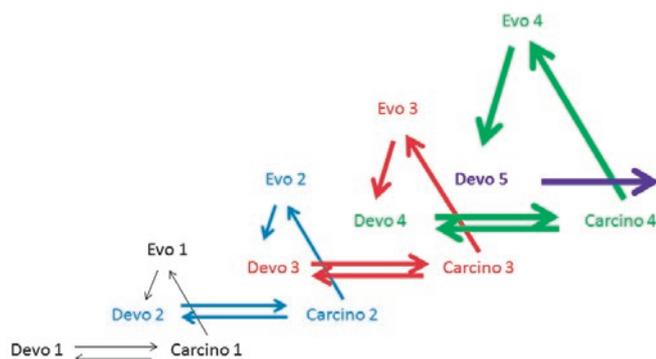


Fig. 4. *Carcino-evo-devo* diagrams showing four successive steps in progressive evolution of ontogenesis with tumor participation. Devo 2, Devo 3, Devo 4 and Devo 5 – ontogenies with evolutionarily new progressive traits

of some tumor features in the most recently evolved organs. Indeed, evolutionarily young organs (placenta, mammary gland, and prostate) recapitulate features of tumors such as invasiveness, the capability of indefinite growth (prostate), the high rates of cancer incidence (mammary gland and prostate), etc.

Thus, tumors may participate in evolution of ontogenesis. Participation of hereditary tumors in evolution of ontogenesis and in the origin of major evolutionary morphological novelties, or phylogenetic new formations, may become an integral part of evolutionary developmental biology, and may be called *carcino-evo-devo*.

CARCINO-EVO-DEVO, A NEW THEORY OF EVOLUTIONARY DEVELOPMENTAL BIOLOGY

A broad spectrum of non-trivial explanations and non-trivial predictions in different fields of biology, suggested by the main hypothesis, is an indication of its fundamental nature and the potential to become a new biological theory, a theory of the role of hereditary tumors in evolution of development, or *carcino-evo-devo*. Evidently, this abbreviation stems from two other abbreviations – *carcinoembryonic* and *evo-devo* – related to two big areas or research that have brought to formulation of the main hypothesis.

The interrelationships between the processes of progressive evolution, normal and neoplastic development may be presented as a diagram (Fig. 3). This diagram represents the relationships between normal ontogenesis and neoplastic development (*devo* ↔ *carcino*); participation of hereditary tumors in progressive evolution (*carcino* → *evo*); and generation of more complex ontogenies in the course of progressive evolution (*evo* → *devo*). This diagram shows that normal ontogenies do not directly participate in progressive evolution (i.e., the lack of *devo* → *evo* arrow), and evolution can influence neoplastic development (e.g. anti-cancer selection, dashed arrow between *evo* and *carcino*).

According to the *carcino-evo-devo* theory, tumor-bearing organisms participate in progressive evolution that generates new more complex ontogenies. In Fig. 4, four *carcino-evo-devo* diagrams show successive steps in progressive evolution of ontogenesis leading to the origin of different morphological novelties and complex evolutionary innovations, with participation of tumors.

The *carcino-evo-devo* diagram reminds the central dogma of molecular biology not only in its outward appearance. Like the central dogma, it contains a fundamental prohibition: a prohibition of saltatory origin of complex evolutionary innovations and morphological novelties directly from normal ontogenies. As I wrote above, the mechanisms of saltatory origin of complex structures do not exist. The *carcino-evo-devo* theory demands the necessity of transitional intermediates with search engine capabilities, which I think are tumor-bearing organisms (*carcino*). I hope that the *carcino-evo-devo* diagram will cause discussion on what the transitional intermediates should be, and on the number of arrows and their possible directions.

Thus, a new theory of the possible role of hereditary tumors in evolution – *carcino-evo-devo* – is being developed. This theory possesses a predictive power, explains many previously unexplained biological phenomena, accommodates a large amount of data, and has a potential of unifying several existing biological theories. It may become a new theory of evolutionary developmental biology. ●

REFERENCES

1. Kozlov A.P. Evolution by Tumor Neofunctionalization. The role of tumors in the origin of new cell types, tissues and organs. Amsterdam, Boston, Heidelberg, London, New York, Oxford, Paris, San Diego, San Francisco, Singapore, Sydney, Tokyo: Elsevier/Academic Press, 2014. 231 p.
2. Kozlov A.P. // Infect. Agents Cancer. 2016. V. 11. P. 34.
3. Makashov A.A., Malov S.V., Kozlov A.P. // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 16410.
4. Severtsov A.N. The main directions of the evolutionary process. Moscow: Dumnov Publishing House, 1925.
5. Maynard Smith J., Burian R., Kauffman S., Alberch P., Campbell J., Goodwin B., Lande R., Raup D., Wolpert L. // The Quarterly Review of Biology. 1985. V. 60. P. 265–287.
6. Gilbert S.F. Developmental Biology, 6th edition. Sunderland (MA): Sinauer Associates Inc., U.S. 2000. 695 p.
7. Wagner A. Origins of Evolutionary Innovations. Oxford, UK: Oxford University Press, 2011. 253 p.

8. Galis F., Metz J.A.J., von Alphen J.J.M. // *Annual Reviews of Ecology, Evolution and Systematics*. 2018. V. 49. P. 499–522.
9. Raff R.A. *The Shape of Life*. Chicago and London: Univ. of Chicago Press, 1996. 544 p.
10. Gerhart J., Kirschner M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 8582–8589.
11. Popper K. // *Advances in Scientific Philosophy*. Amsterdam: Rodopi, 1991. P. 329–362.
12. Katsman R. *Literature, history, choice: The Principle of Alternative History in Literature (S.Y. Agnon, The City with All That is Therein)*. Newcastle upon Tyne, UK: Cambridge Scholars Publishing, 2013. 30 p.
13. Rescher N. *A journey through philosophy in 101 anecdotes*. Pittsburgh, PA: University of Pittsburgh Press, 2015. 304 p.
14. Kaneko K. // *Artificial Life*. 1994. V. 1. P. 163–177.
15. Warren K. *Chaos theory and complexity theory*. Encyclopedia of Social Work. Oxford, UK: Oxford University Press, 2013.
16. Kotsantis P., Marques Silva L., Irscher S., Jones R.M., Foles L., Gromak N., Paterman E. // *Nature Communications*. 2016. V. 7. № 13087.
17. Bradner J.E., Hnisz D., Young R.A. // *Cell*. 2017. V. 168. P. 629–643.
18. Kozlov A.P. *Regulatory mechanisms as an expression and the result of evolution of competitive relations between the genes*. In: *Explorations of the Fauna of the Seas 17 (25). Salinity Adaptations of the Aquatic Animals*. Leningrad: Academy of Sciences of the U.S.S.R., 1976. P. 237–245.
19. Kozlov A.P. // *J. Theor. Biol.* 1979. V. 81. P. 1–17.
20. Kirschner M., Gerhart J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. P. 8420–8427.
21. West-Eberhard M.J. *Developmental plasticity and evolution*. New York: Oxford University Press, 2003. 814 p.
22. Moczek A.P. // *Heredity*. 2015. V. 115. P. 302–305.
23. Wagner G.P. *Homology, genes, and evolutionary innovation*. Princeton: Princeton University Press, 2014. 496 p.
24. Galis F., Metz J.A.J. // *BioEssays*. 2003. V. 25. P. 1035–1039.
25. Valentine J.W., Collins A.G., Meyer C.P. // *Paleobiology*. 1994. V. 20. P. 131–142.
26. Kozlov A.P. // *Theoretical and Mathematical Aspects of Morphogenesis*. Moscow: Nauka, 1987. P. 136–140.
27. Kozlov A.P. // *Med. Hypotheses*. 1996. V. 46. P. 81–84.
28. Arendt D. // *Nat. Rev. Genet.* 2008. V. 9. P. 868–882.
29. Arendt D., Musser J.M., Baker C.V.H., Bergman A., Cepko C., Erwin D.H., Pavlicev M., Schlosser G., Widder S., Laubichler M.D., Wagner G.P. // *Nature Rev. Genet.* 2016. V. 17. P. 744–757.
30. Blackburn D.G. // *Mammal. Rev.* 1991. V. 21. P. 81–96.
31. Vorbach C., Capecchi M.R., Penninger J.M. // *BioEssays*. 2006. V. 28. P. 606–616.
32. Oftedal O.T. // *J. Mammary Gland Biol. Neoplasia*. 2002. V. 7. P. 225–252.
33. Dunwell T.L., Paps J., Holland P.W.H. // *Proc. R. Soc. B* 2017. V. 284. № 20171357.
34. Muller V., de Boer R.J., Bonhoeffer S., Szathmany E. // *Biol. Rev.* 2018. V. 93. P. 505–528.
35. Flajnik M.F., Kasahara M. // *Nat. Rev. Genet.* 2010. V. 11. P. 47–59.
36. Du Pasquier L. // *Fundamental immunology*, 3rd edition. New York: Raven Press, 1993.
37. Flajnik M., Miller K., Du Pasquier L. // *Fundamental immunology*. Philadelphia: Lippincott, Williams and Wilkins, 2003. P. 519–570.
38. Du Pasquier L., Robert J., Courtet M., Musmann R. // *Immunol. Rev.* 2000. V. 175. P. 201–213.
39. Robert J., Ohta Y. // *Dev. Dyn.* 2009. V. 238. P. 1249–1270.
40. Robert J., Cohen N. // *Immunol. Rev.* 1998. V. 166. P. 231–243.
41. Goyos A., Robert J. // *Front. Biosci.* 2009. V. 14. P. 167–176.
42. Egeblad M., Nakasone E.S., and Werb Z. // *Dev. Cell*. 2010. V. 18. P. 884–901.
43. Kurlak L.O., Knofler M., Mistry H.D. // *Placenta*. 2017. V. 56. P. 24.
44. Costanzo V., Bardelli A., Siena S., Abrignani S. // *Open Biol.* 2018. V. 8. № 180081.
45. Bronchud M.H. // *Ecancermedicalsecience*. 2018. V. 12. № 840.
46. Wiseman B.S., Werb Z. // *Science*. 2002. V. 296. P. 1046–1049.
47. Davies J.A. // *Organogenesis*. 2004. V. 1. P. 60–63.
48. Schaefer E.M., Marchionni L., Huang Z., Simons B., Blackman A., Yu W., Parmigiani G., Berman D.M. // *Oncogene*. 2008. V. 27. P. 7180–7191.
49. Ma Y., Zhang P., Wang F., Yang J., Yang Z., Qin H. // *J. Cell Mol. Med.* 2010. V. 14. P. 2697–2701.
50. Micalizzi D.S., Farabaugh S.M., Ford H.L. // *J. Mam. Gland Biol. Neopl.* 2010. V. 15. P. 117–134.
51. Aiello N.M., Stanger B.Z. // *Dis. Model Mech.* 2016. V. 9. P. 105–114.
52. Kohrman A.Q., Matus D.Q. // *Trends Cell Biol.* 2017. V. 27. P. 12–25.
53. Hnisz D., Schuijers J., Lin C.Y., Weintraub A.S., Abraham B.J., Lee T.I., Bradner J.E., Young R.A. // *Molecular Cell*. 2015. V. 58. P. 1–9.
54. Durante F. // *Arch. Memor. Observ. Chir. Prat.* 1874. V. 11. P. 217.
55. Cohnheim J. *Lectures on General Pathology*, vol. 2. London: The New Sydenham Society, 1889. 1434 p.
56. Young M.D., Mitchell T.J., Vieira Braga F.A., Tran M.G.B., Stewart B.J., Ferdinand J.R., Collord G., Botting R.A., Popescu D.M., Loudon K.W. // *Science*. 2018. V. 361. P. 594–599.
57. Severtsov A.N. // *Jena Z. Naturwiss.* 1927. V. 56. P. 51–180.
58. Severtsov A.N. // *Zool. Zhur.* 1935. V. 14. P. 1–8.
59. Severtsov A.N. *Morphological Laws of Evolution*. Collection of works, vol. 5. Moscow, Leningrad: Publishing House of the Academy of Sciences of the U.S.S.R., 1949.
60. Gould S.J. *Ontogeny and Phylogeny*. Cambridge: Belknap Press: An Imprint of Harvard University Press, 1977. 520 p.
61. Hall B.K. // *Evolution & Development*. 2000. V. 2. P. 3–5.

УДК 576.315.42

Картирование заряда на поверхности вирионов и вирусоподобных частиц вирусов растений со спиральной структурой

М. В. Архипенко*, Н. А. Никитин, О. А. Баранов, Е. А. Евтушенко, И. Г. Атабеков, О. В. Карпова
 Московский государственный университет им. М. В. Ломоносова, биологический факультет,
 Москва, 119234 Россия

*E-mail: markhipenko@gmail.com

Поступила в редакцию 12.06.2019

Принята к печати 25.10.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-73-78

РЕФЕРАТ Особенности формирования вирионов у вирусов растений со спиральной структурой изучены недостаточно. Определенный вклад в понимание молекулярных механизмов сборки вирусных частиц и развития инфекции может внести изучение распределения заряда на поверхности вирионов. До настоящего времени у большинства вирусов определен только общий заряд вириона (изоэлектрическая точка). С целью изучения распределения заряда на поверхности спиральных вирусов растений нами впервые были использованы положительно заряженные магнитные наночастицы. Показано, что заряд у исследуемых вирусов распределен неравномерно, а зона с повышенной плотностью отрицательного заряда находится на одном торце вириона вирусов, принадлежащих к различным таксономическим группам. В формировании этой зоны ключевую роль играет вирусная РНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вирусы растений, магнитные наночастицы, картирование поверхностного заряда.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВТМ – вирус табачной мозаики; ХВК – X-вирус картофеля; ВМАльт – вирус мозаики альтернантеры; БО – белок оболочки; ВПЧ – вирусоподобные частицы; вРНП – вирусные рибонуклеопротеиды; МЧ – магнитные наночастицы; МН – микрококковая нуклеаза; ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение физико-химических характеристик вирионов вирусов растений, в том числе распределения заряда на их поверхности, может внести определенный вклад в понимание молекулярных механизмов развития инфекции в первично инфицированной клетке или при перемещении транспортной формы РНК-содержащих вирусов (вирионов/вРНП) в соседние незараженные клетки. В настоящее время существует ряд работ, описывающих особенности формирования поверхностного заряда у икосаэдрических вирусов [1–3], а также определены изоэлектрические точки вирионов с различным типом симметрии [4, 5]. Согласно опубликованным данным, изоэлектрические точки большинства вирусов растений лежат в диапазоне от 3.6 до 6.3. При нейтральных значениях рН эти вирусы обладают суммарным отрицательным поверхностным зарядом [4, 5]. Однако распределение заряда на поверхности вирусных частиц, имеющих спиральную структуру капсида, практически не изучено. По нашим предварительным данным поверх-

ность некоторых вирионов может быть заряжена неравномерно. Трансляционная активация геномной нуклеиновой кислоты РНК-содержащих вирусов растений в ходе инфекции также может быть связана с распределением заряда на поверхности вирусной частицы.

В данной работе предложен способ картирования заряда на поверхности вирионов со спиральной структурой с помощью магнитных наночастиц (МЧ) fluidMAG-DEAE. Изучено распределение заряда на поверхности спиральных вирусов растений, относящихся к различным таксономическим группам (роды *Tobamovirus* – вирус табачной мозаики (ВТМ) и *Potexvirus* – X-вирус картофеля (ХВК) и вирус мозаики альтернантеры (ВМАльт)), а также на вирусоподобных частицах (ВПЧ) и вирусных рибонуклеопротеидах (вРНП), полученных из компонентов вирионов.

Предположение о связи распределения заряда на поверхности вирусов растений и его возможной неоднородности на протяжении всего вириона с до-

ступностью инкапсидированной РНК для взаимодействия с рибосомами и упаковкой РНК в белке оболочки (БО) до сих пор не обсуждалось.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Выделение препаратов вирусов, вирусных РНК и белков оболочки

Препараты ХВК и ВТМ выделяли согласно [6] и [7] соответственно; препарат ВМАльт – согласно [8]. РНК выделяли фенольным методом с некоторыми модификациями [9]. Белки оболочки ХВК и ВМАльт получали методом солевой депротеинизации [10]. Белок оболочки ВТМ получали ацетатным методом [11].

Получение реполимеров БО (ВПЧ) ВТМ и ВМАльт, ВРНП ХВК

Для получения реполимеров БО ВТМ и ВМАльт использовали методики, описанные в [11, 12] соответственно, ВРНП ХВК получали согласно [13].

Обработка вирионов и вирусоподобных частиц РНКазой А и микрококковой нуклеазой

Для обработки вирионов и ВПЧ с конечной концентрацией 0.05 мг/мл использовали РНКазу А из расчета 1 мкг на 4 мкг вируса. Инкубацию проводили в течение 30 мин, реакцию останавливали, помещая пробы в лед. При обработке микрококковой нуклеазой (МН) (50 ед. акт. фермента на 1 мкг РНК) в пробу предварительно добавляли 100 мМ CaCl₂. Реакцию останавливали, добавляя 250 мМ EGTA. При выделении РНК из обработанных нуклеазами вирионов в качестве соосадителя использовали тРНК.

Ультразвуковая обработка вирионов ВТМ

Вирусные частицы ВТМ обрабатывали ультразвуком с помощью ультразвукового гомогенизатора Ultrasonic Processor. Обработку осуществляли при концентрации ВТМ 0.05 мг/мл в течение 60 с во льду.

Получение комплексов вирионов/вирусоподобных частиц (ВПЧ) с магнитными наночастицами

Вирионы/ВПЧ инкубировали с магнитными частицами fluidMAG-DEAE (Chemicell, Германия) в водном растворе с конечной концентрацией вирионов или ВПЧ 0.05 мг/мл в течение 20 мин.

Просвечивающая электронная микроскопия и метод анализа траекторий наночастиц

Образцы сорбировали на медных сеточках и контрастировали по методике, описанной в [14]. Анализ проводили с помощью электронных микроскопов

JEOL JEM-1011 и JEOL JEM-1400 (JEOL, Япония) при 80 кВ.

Исследование препаратов в жидкости проводили с помощью метода анализа траекторий наночастиц с использованием прибора NanoSight NS500 и программного обеспечения NanoSight NTA 2.3 (NanoSight, Великобритания). При регистрации видеозаписей броуновского движения частиц и их обработке использовали следующие настройки: 10 повторов по 60 с видеозаписи при чувствительности камеры (Camera level) 14 и пороге выделения частиц (Detection Threshold) 5. Значения среднего гидродинамического диаметра и концентрации частиц представлены в виде 95% доверительного интервала.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Для картирования зарядов на поверхности вириона был использован гидрозоль магнитных наночастиц (МЧ) fluidMAG-DEAE (Chemicell, Германия) с заявленным гидродинамическим диаметром 50 нм. Данные МЧ состоят из магнитного ядра на основе оксидов железа и оболочки из крахмала, функционализированного диэтиламиноэтиловыми группами. Благодаря положительному заряду этих групп МЧ могут использоваться для картирования отрицательного заряда на поверхности биологических структур. Наличие магнетитового ядра позволяет детектировать положение МЧ в комплексе с вирусными частицами методом просвечивающей электронной микроскопии (ПЭМ).

Измеренный методом анализа траекторий наночастиц средний гидродинамический диаметр МЧ составил 72 ± 3 нм. Согласно данным ПЭМ, индивидуальные МЧ собраны в агрегаты, содержащие от 2 до 20 наночастиц.

Сборку комплексов вирионов ВТМ с МЧ проводили в условиях, когда суммарный заряд вирусных частиц имел отрицательные значения. Взаимодействие МЧ с ВТМ в жидкости изучали с помощью анализа траекторий наночастиц. Средний эквивалентный гидродинамический диаметр ВТМ составил 115 ± 3 нм. Добавление МЧ к вирусу приводило к увеличению среднего диаметра до 134 ± 8 нм при неизменной концентрации частиц, составившей $(1.6 \pm 0.1) \times 10^{14}$ и $(1.6 \pm 0.2) \times 10^{14}$ частиц/мл соответственно, что свидетельствовало об образовании комплекса.

Анализ комплексов ВТМ–МЧ с помощью ПЭМ показал, что магнитные частицы эффективно образуют комплексы с ВТМ и связываются только с одним торцом вириона (рис. 1А). Также были детектированы так называемые «паукообразные» комплексы, представляющие собой группу вирионов, одновременно взаимодействующих одним торцом с магнитными наночастицами (рис. 1Б). Комплексы, в которых МЧ

одновременно взаимодействовали с двумя противоположными торцами ВТМ, не обнаружены.

Этот факт (МЧ взаимодействуют только с одним концом частиц ВТМ) обратил на себя наше внимание. В дальнейших исследованиях использовали препарат ВТМ, в котором нативные частицы длиной 300 нм были «поломаны» с помощью ультразвука (ВТМ^{УЗ}). Средняя длина полученных частиц составила 149 ± 83 нм.

Методом ПЭМ показано, что МЧ связываются строго с одним торцом части ВТМ^{УЗ} (рис. 2А), как это наблюдается и в случае нативных вирионов (рис. 1А). При этом определенное количество частиц ВТМ^{УЗ} не взаимодействовало с МЧ (рис. 2Б). Если бы МЧ взаимодействовали с «обломанными» торцами фрагментированных вирионов, то, статистически, в растворе должны были бы встречаться ВТМ^{УЗ}, оба торца которых ассоциированы с МЧ. Однако зафиксировать такой тип взаимодействия не удалось.

Известно, что каждая субъединица БО ВТМ содержит сайт связывания РНК, который взаимодействует с тремя нуклеотидами вирусной РНК. Такое взаимодействие БО–РНК происходит, когда остаток гуанина находится в третьей позиции сайта связывания [15, 16]. В пределах 69 первых нуклеотидов РНК ВТМ остатки гуанина отсутствуют [17]. Таким образом, на протяжении первых 50–60 нуклеотидов взаимодействие между РНК и БО является слабым, и это может повлиять на распределение заряда по поверхности вириона ВТМ.

Для выяснения роли отдельных компонентов вириона в формировании области с повышенным отрицательным зарядом на одном конце вирусной частицы ВТМ были получены реполимеры БО ВТМ (вирусоподобные частицы – ВПЧ), имеющие спиральную структуру, аналогичную структуре вириона, но не содержащие РНК [18]. Анализ комплексов, полученных при инкубации реполимеров ВТМ с МЧ, показал, что МЧ либо не взаимодействуют с ВПЧ ВТМ, либо связываются со всей поверхностью реполимеров (рис. 3А). Образование комплексов МЧ с торцами ВПЧ ВТМ при этом не наблюдалось. Так как связывание реполимеров с МЧ происходило при pH 5.6 (условие образования реполимеров ВТМ), в качестве контроля использовали комплексы ВТМ–МЧ, полученные в тех же условиях. Оказалось, что при pH 5.6 МЧ также взаимодействовали только с одним торцом вирионов ВТМ (рис. 3Б).

Таким образом, отрицательный заряд равномерно распределен на поверхности ВПЧ, полученных при полимеризации БО ВТМ в отсутствие РНК, а не локализован на одном из торцов, как у вириона. Вероятно, существенный вклад в формирование

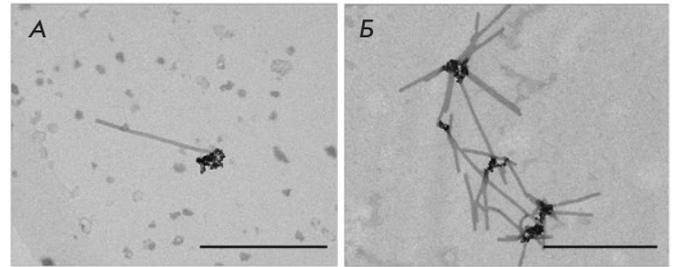


Рис. 1. МЧ образуют комплексы с одним торцом нативного вириона ВТМ. Масштабные отрезки 500 нм

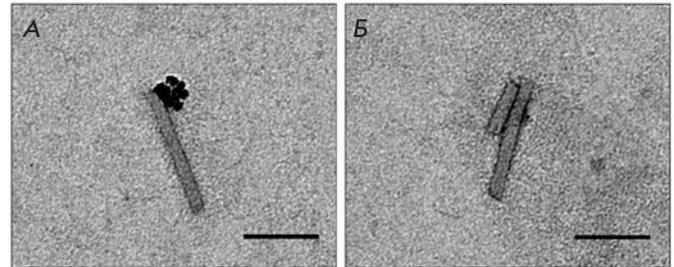


Рис. 2. МЧ образуют комплексы с одним торцом ВТМ, обработанных ультразвуком (ВТМ^{УЗ}). Масштабные отрезки 100 нм

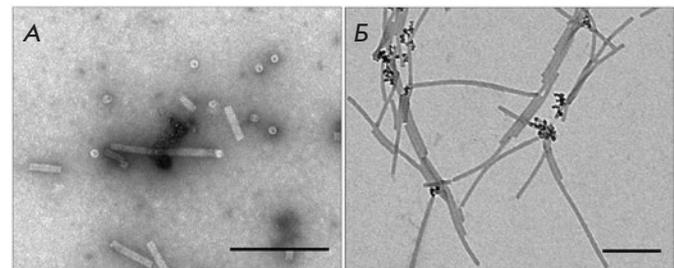


Рис. 3. МЧ не проявляют специфического сродства к торцам реполимеров БО ВТМ. А – образование комплексов нативного ВТМ с МЧ в условиях получения реполимеров БО ВТМ; Б – контроль. Масштабные отрезки 200 нм

зоны с повышенной плотностью отрицательного заряда на одном торце нативного ВТМ вносит РНК.

Для того чтобы оценить вклад вирусной РНК в формирование поверхностного заряда, вирионы ВТМ обрабатывали нуклеазами двух типов – РНКазой А и микрококковой нуклеазой.

Способность РНКаз воздействовать на РНК ВТМ в составе вириона была проанализирована в предварительных экспериментах. Вирионы обрабатывали нуклеазами, затем выделяли РНК и анализировали с помощью электрофореза в 1% агарозном геле. РНКазы А гидролизовала нуклеиновую кислоту

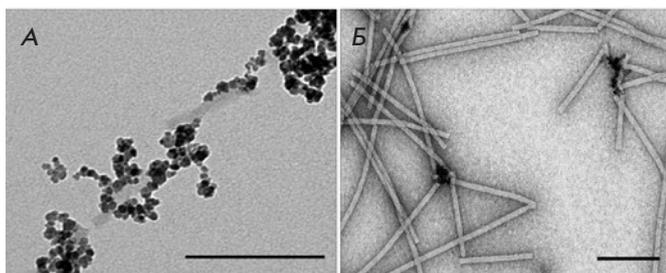


Рис. 4. Анализ взаимодействия МЧ с вирионами ВТМ, обработанными РНКазой А (А) и микрококковой нуклеазой (Б). Масштабные отрезки 200 нм

до фрагментов с электрофоретической подвижностью, сопоставимой с подвижностью тРНК, использованной в качестве соосадителя, и меньше (данные не приведены).

Микрококковая нуклеаза, как показано ранее [19], не гидролизует РНК в составе вириона. Однако нельзя исключить, что на одном из торцов вириона, где фиксируется формирование зоны с повышенной плотностью отрицательного заряда, присутствует менее плотная укладка БО или более слабое взаимодействие БО с РНК на протяжении первых 50–60 нуклеотидов [17, 20], и небольшие фрагменты РНК ВТМ в этих пределах могут подвергаться гидролизу. Использованный метод анализа не позволил нам зафиксировать эти изменения.

Не выявлено преимущественного сродства магнитных наночастиц к торцам вирионов, обработанных РНКазой А, взаимодействие происходило со всей поверхностью вирусных частиц (рис. 4А). Заряд на поверхности вирионов ВТМ, содержащих деградированную РНК, распределен равномерно, как и у ВПЧ ВТМ (рис. 3А). Однако необычная картина была получена при инкубации МЧ с вирионами, обработанными МН. Магнитные наночастицы не только располагались вблизи торцов вирионов, но и взаимодействовали со всей поверхностью вирионов (рис. 4Б). Можно предположить, что МН все же способна частично гидролизовать фрагмент РНК, который и формирует зону с повышенной плотностью

отрицательного заряда. Это согласуется с моделью котрансляционного механизма разборки ВТМ [21]. Скорее всего, торец вириона ВТМ, взаимодействующий с МЧ, содержит 5'-конец РНК ВТМ.

Дальнейшее изучение распределения поверхностного заряда вирионов было продолжено на вирусах с гибким нитевидным вирионом, относящихся к роду *Potexvirus* – X-вирусе картофеля (ХВК) и вирусе мозаики альтернантеры (ВМАльт). Нами не найдены данные о распределении заряда на поверхности ВМАльт и ХВК, известна лишь изоэлектрическая точка ХВК (pI 4.4).

БО ВМАльт, как и БО ВТМ, способен *in vitro* в отсутствие РНК формировать стабильные протяженные частицы, близкие по длине и сходные по морфологии с вирионами ВМАльт – вирусоподобные частицы ВМАльт (ВПЧ ВМАльт) [12].

Как видно из рис. 5, МЧ, как и в случае с ВТМ, образуют комплексы с ВМАльт, связываясь с одним торцом нативного вириона (рис. 5А).

Анализ комплексов ВПЧ ВМАльт с МЧ методом электронной микроскопии показал, что МЧ распределяются по поверхности частиц. При этом сродства МЧ к торцам ВПЧ не наблюдалось (рис. 5Б). Следовательно, как и в случае ВТМ, заряд на поверхности ВМАльт распределен неравномерно, и область с повышенной плотностью отрицательного заряда также расположена на одном торце вириона и обусловлена присутствием РНК. Аналогичные результаты получены и для вирионов ХВК (рис. 5В).

Ранее мы показали, что инкапсидированная РНК ХВК и ВМАльт в отличие от РНК ВТМ не способна транслироваться *in vitro* [22, 23].

Начиная это исследование, мы предполагали, что обнаруженные нами ранее трансляционные свойства РНК в составе ВТМ и ряда потексвирусов [22, 24] будут коррелировать с распределением плотности заряда на поверхности вирусных частиц, что котрансляционная разборка ВТМ может быть связана с неравномерным распределением отрицательного заряда на поверхности частиц и его концентрации на торце, содержащем 5'-конец РНК ВТМ [20, 25]. В то же время у потексвирусов, чья вирусная РНК

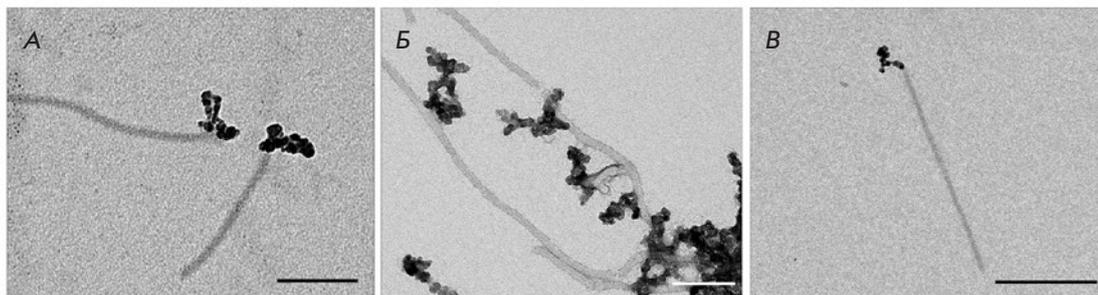


Рис. 5. Образование комплексов МЧ с вирионами ВМАльт (А), ВПЧ ВМАльт (Б) и вирионами ХВК (В). Масштабные отрезки 100 (А, Б) и 200 (В) нм

Рис. 6. Анализ взаимодействия МЧ с вирионами ХВК, обработанными РНКазой А. Масштабный отрезок 100 нм

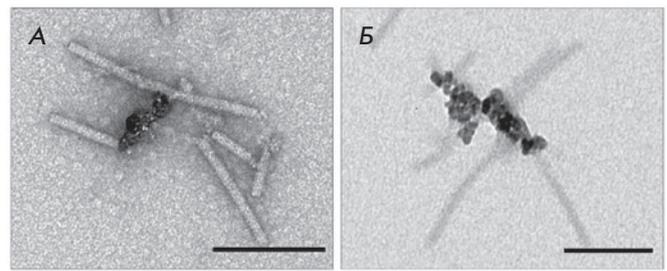
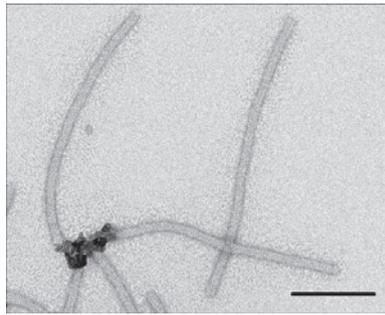


Рис. 7. Образование комплексов МЧ с vRNP ХВК (А) и с vRNP ХВК, обработанных МН (Б). Масштабные отрезки 100 нм

Результаты картирования отрицательного заряда на поверхности частиц вирусов растений со спиральной структурой

Объект/обработка	ВТМ	ВМАльт	ХВК
Вирионы			
Обработка ультразвуком			
ВПЧ			
РНКаза А			
МН			
vRNP			
vRNP + МН			

недоступна для рибосом в составе вириона до специфической трансляционной активации, мы будем наблюдать равномерное распределение заряда на поверхности вириона. Полученные нами данные не подтвердили это предположение.

Неожиданный результат получен для вирионов ХВК, обработанных РНКазой А. Ранее было показано, что обработка ХВК РНКазами (А и Т1) приводит к деградации РНК до коротких сегментов (5–6 нуклеотидов) [26]. При этом фрагменты деградированной РНК остаются в составе вирионов, морфологически сходных с нитевидными частицами ХВК. В отличие от ВТМ зафиксировано взаимодействие МЧ с торцами вирионов ХВК (рис. 6). Таким образом, заряд на поверхности вирионов ХВК, содержащих деградированную РНК, распределен неравномерно, как и в нативных вирионах (рис. 5В). Можно предположить, что фрагмент РНК, находящийся на торце вирусной частицы, остается связанным с БО и формирует зону с повышенной плотностью отрицательного заряда. Полученный результат согласуется с различиями в трансляционных свойствах инкапсулированной РНК в составе вирионов ХВК и ВТМ.

В отличие от ВТМ, БО ХВК не способен к полимеризации в отсутствие РНК [27]. Однако БО ХВК

при инкубации с РНК *in vitro* способен образовывать vRNP, состоящие из РНК, и БО ХВК, имеющие спиральную «головку», идентичную по своей структуре белковой спирали вирионов ХВК, и «хвост» – РНК, свободную от БО («однохвостые частицы») [28].

Изучение взаимодействия магнитных наночастиц с vRNP ХВК выявило связывание МЧ с РНК, свободной от БО («хвосты» vRNP) (рис. 7А). Отсутствие взаимодействия МЧ с поверхностью «головки» vRNP можно объяснить конкурентным связыванием всех доступных МЧ со свободной РНК. Для его предотвращения vRNP были обработаны МН. Известно, что БО ХВК одевает 5'-конец РНК при обработке vRNP, и 5'-концевые участки РНК, инкапсулированные в БО в составе vRNP, при обработке МН сохраняют свою целостность и трансляционные свойства [13]. Согласно результатам анализа этих комплексов, удаление свободной РНК приводит к тому, что большая часть МЧ взаимодействует с торцами обработанных МН vRNP (рис. 7Б), как и в случае нативного ХВК (рис. 5В).

Скорее всего, торец вирусных частиц, с которым взаимодействуют МЧ, содержит 5'-конец РНК.

Результаты экспериментов обобщены в таблице.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В работе проведено картирование поверхностного заряда ВТМ (род *Tobamovirus*), ХВК и ВМАльт (род *Potexvirus*).

Известно, что при сборке ВТМ БО, организованный в 20S диски, взаимодействует с участком РНК, расположенным на расстоянии около 1000 нуклеотидов от 3'-конца молекулы (origin assembly) [18]. В то же время сборка вирионов ХВК начинается непосредственно с 5'-конца молекулы, РНК взаимодействует с мономерами и димерами БО [27]. Данных о процессе сборки ВМАльт мало, но, по-видимому, она происходит так же, как у ХВК [29]. Следует отметить, что у ВТМ, ХВК и ВМАльт, несмотря

на то, что сборка вирионов происходит по различным сценариям, поверхностный заряд распределен неравномерно, зона с повышенной плотностью отрицательного заряда находится на одном торце вириона. Ключевую роль в формировании этой зоны, по-видимому, играет 5'-конец вирусной РНК. Скорее всего, это может быть объяснено менее плотной упаковкой 5'-конца РНК в БО, что необходимо для инициации трансляции РНК-зависимой РНК-полимеразы на первых этапах инфекции РНК-содержащих вирусов с позитивным геномом. ●

Работа поддержана грантом
РФФИ № 18-04-00028.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Javidpour L., Lošdorfer Božič A., Naji A., Podgornik R. // J. Chem. Phys. 2013. V. 139. № 15. P. 154709.
- Lošdorfer Božič A., Podgornik R. // J. Physics: Condensed Matter. 2017. V. 30. № 2. P. 024001.
- Carrillo P.J., Hervás M., Rodríguez-Huete A., Pérez R., Mateu M.G. // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. P. 9543.
- Oster G. // J. Biol. Chem. 1951. V. 190. P. 55–59.
- Michen B., Graule T. // J. Appl. Microbiol. 2010. V. 109. № 2. P. 388–397.
- Nikitin N., Ksenofontov A., Trifonova E., Arkhipenko M., Petrova E., Kondakova O., Kirpichnikov M., Atabekov J., Dobrov E., Karpova O. // FEBS Lett. 2016. V. 590. № 10. P. 1543–1551.
- Trifonova E.A., Nikitin N.A., Kirpichnikov M.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2015. V. 70. № 4. P. 194–197.
- Ivanov P.A., Mukhamedzhanova A.A., Smirnov A.A., Rodionova N.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. // Virus Genes. 2011. V. 42. № 2. P. 268–271.
- Karpova O.V., Tyulkina L.G., Atabekov K.J., Rodionova N.P. // J. Gen. Virol. 1989. V. 70. P. 2287–2297.
- Petrova E.K., Trifonova E.A., Nikitin N.A., Kondakova O.A., Atabekov J.G., Karpova O.V. // Moscow Univ. Biol. Sci. Bull. 2016. V. 71. № 1. P. 45–49.
- Atabekov J., Nikitin N., Arkhipenko M., Chirkov S., Karpova O. // J. Gen. Virol. 2011. V. 92. P. 453–456.
- Mukhamedzhanova A.A., Smirnov A.A., Arkhipenko M.V., Ivanov P.A., Chirkov S.N., Rodionova N.P., Karpova O.V., Atabekov J.G. // Open Virol. J. 2011. V. 5. P. 136–140.
- Nikitin N.A., Trifonova E.A., Petrova E.K., Borisova O.V., Karpova O.V., Atabekov J.G. // Sel'skokhozyaistvennaya Biologiya [Agricultural Biology]. 2014. V. 5. P. 28–34.
- Nikitin N., Trifonova E., Evtushenko E., Kirpichnikov M., Atabekov J., Karpova O. // PLoS One. 2015. V. 10. № 11. P. e0142415.
- Namba K., Pattanayek R., Stubbs G. // J. Mol. Biol. 1989. V. 208. № 2. P. 307–325.
- Wilson T.M.A., McNicol J.W.A. // Arch. Virol. 1995. V. 140. № 9. P. 1677–1685.
- Goelet P., Lomonosoff G.P., Butler P.J., Akam M.E., Gait M.J., Karn J. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1982. V. 79. № 19. P. 5818–5822.
- Klug A.I. // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B. Biol. Sci. 1999. V. 354(1383). P. 531–535.
- Karpova O.V., Zayakina O.V., Arkhipenko M.V., Sheval E.V., Kiselyova O.I., Poljakov V.Yu., Yaminsky I.V., Rodionova N.P., Atabekov J.G. // J. Gen. Virol. 2006. V. 87. № 9. P. 2731–2740.
- Lomonosoff G.P., Butler P.J. // FEBS Lett. 1980. V. 113(2). P. 271–274.
- Liu N., Chen Y., Peng B., Lin Y., Wang Q., Su Z., Zhang W., Li H., Shen J. // Biophys. J. 2013. V. 105. № 12. P. 2790–2800.
- Atabekov J.G., Rodionova N.P., Karpova O.V., Kozlovsky S.V., Poljakov V.Yu. // Virology. 2000. V. 271. № 2. P. 259–263.
- Mukhamedzhanova A.A., Karpova O.V., Rodionova N.P., Atabekov J.G. // Dokl. Biochem. Biophys. 2009. V. 428. № 2. P. 239–241.
- Arkhipenko M.V., Nikitin N.A., Donchenko E.K., Karpova O.V., Atabekov J.G. // Acta Naturae. 2017. V. 9. № 4(35). P. 52–57.
- Wilson T.M.A. // Virology. 1984. V. 137. № 2. P. 255–265.
- Rodionova N.P., Karpova O.V., Kozlovsky S.V., Zayakina O.V., Arkhipenko M.V., Atabekov J.G. // J. Mol. Biol. 2003. V. 333. № 3. P. 565–572.
- Kaftanova A.S., Kiselev N.A., Novikov V.K., Atabekov J.G. // Virology. 1975. V. 67. № 1. P. 283–287.
- Karpova O.V., Arkhipenko M.A., Zayakina O.V., Nikitin N.A., Kiselyova O.I., Kozlovsky S.V., Rodionova N.P., Atabekov J.G. // Mol. Biol. 2006. V. 40. № 4. P. 628–634.
- Donchenko E., Trifonova E., Nikitin N., Atabekov J., Karpova O. // Adv. Virol. 2018. V. 2018. № 1973705. P. 1–11.

УДК 616: 614.4

Феномен «экранирования» индукции цитокинов микробиомом пародонта при сочетании пародонтита с сахарным диабетом типа 2

И. П. Балмасова^{1*}, Я. А. Ломакин², Э. А. Бабаев¹, В. Н. Царев¹, А. Г. Габибов²,
И. В. Смирнов², В. Д. Кнорре², Л. А. Овчинникова², Н. В. Гнучев³, Е. Н. Хурс³, М. С. Деев⁴,
Н. Н. Костин², С. Д. Арутюнов¹

¹Московский государственный медико-стоматологический университет им. А.И. Евдокимова Минздрава РФ, Москва, 127473 Россия

²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия

³Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

⁴Российский университет дружбы народов, Москва, 117198 Россия

*E-mail: iri.balm@mail.ru

Поступила в редакцию 30.10.2019

Принята к печати 02.12.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-79-87

РЕФЕРАТ Заболевания пародонта, особенно полимикробной этиологии, довольно часто сочетаются с сахарным диабетом типа 2, протекая при этом более тяжело и влияя на течение сахарного диабета. Эту особенность в последние годы связывают со способностью пародонтопатогенной микрофлоры не только вызывать местный инфекционный процесс в полости рта, но и, взаимодействуя с иммунной системой человека, быть индукторами разнообразных системных эффектов. В связи с этим в слюне больных хроническим пародонтитом, ассоциированным и не ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, с помощью мультиплексного магнитно-флуоресцентного иммуноанализа определено содержание 17 цитокинов. Выявлены значительные различия между группами больных с наличием/отсутствием сопутствующего сахарного диабета типа 2 при полном соответствии их клинических характеристик по пяти цитокинам – MCP-1, GM-CSF, интерлейкинам-5 и -6, интерферону- γ . Показано снижение уровня всех этих цитокинов (феномен «экранирования») в слюне больных хроническим пародонтитом в сочетании с сахарным диабетом типа 2 по сравнению с содержанием в слюне пациентов без сопутствующей патологии, а их характеристики были в той или иной степени связаны с активацией макрофагов. Учитывая эти данные, высказана гипотеза о способности пародонтопатогенов, проникающих внутрь клеток, влиять на систему макрофагов пародонта с вовлечением их в реализацию системных эффектов при сопутствующем сахарном диабете типа 2.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА интерлейкины, мультиплексный магнитно-флуоресцентный иммуноанализ, пародонтопатогены, сахарный диабет типа 2, хемокины, хронический пародонтит, цитокиновый профиль слюны.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ IL – интерлейкин; TNF α – фактор некроза опухолей альфа; IFN γ – интерферон- γ ; MCP-1 – хемоаттрактантный белок-1 моноцитов; MIP-1 β – воспалительный белок-1 β макрофагов; G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; AUC – площадь под ROC-кривой (area under ROC curve); ROC-кривая – рабочая характеристика приемника (receive operating characteristic).

ВВЕДЕНИЕ

Заболевания полости рта затрагивают почти половину населения мира, при этом значение микробного поражения пародонта особенно велико, поскольку не имеет ни возрастных, ни географических, ни расовых ограничений [1, 2]. На долю болезней околозубных тканей в мире приходится от 50 до 90% от всех заболеваний полости рта [1, 3, 4], при этом около 7%

жителей планеты страдают тяжелыми формами хронического пародонтита [5].

Особой характеристикой хронического пародонтита является его полимикробная этиология, связанная с преобладанием в составе биопленки тканей пародонта определенного устойчивого сообщества бактерий (пародонтопатогенов) с выраженными инвазивными свойствами, находящихся в симбиотических

отношениях друг с другом, способных к подавлению иммунных реакций и развитию хронического воспаления [6, 7], принимающего со временем системный характер [8, 9].

Системные эффекты пародонтогенов, связанные с их способностью персистировать в организме человека в составе макрофагов [10, 11], приводят к их широкой диссеминации и участию в развитии разнообразных системных патологических процессов [6, 12], таких, как инфекционный эндокардит [13], атеросклероз [14] и другие заболевания сердечно-сосудистой системы [15], бактериальная пневмония [16], ожирение [17], сахарный диабет [18], исходы беременности [19], ревматоидный артрит [20, 21], болезнь Альцгеймера [22], воспалительные заболевания кишечника [23], рак толстой кишки [24] и многие другие. Особое место в этом списке занимает сахарный диабет [18, 25].

Сахарный диабет – одно из наиболее распространенных метаболических заболеваний [26]. По прогнозам International Diabetes Federation (IDF) число больных сахарным диабетом будет неуклонно возрастать и к 2030 году превысит 500 миллионов [27]. Сахарный диабет возникает либо из-за неспособности β -клеток поджелудочной железы вырабатывать инсулин, либо из-за развития устойчивости периферических тканей к инсулину [28], поэтому выделяют два типа этого заболевания. Инсулинзависимый диабет типа 1, диагностируемый примерно у 10% всех больных сахарным диабетом, связан с аутоиммунным повреждением β -клеток поджелудочной железы, что приводит к потере секреции инсулина. Инсулиннезависимый диабет типа 2 (90% всех больных сахарным диабетом) проявляется относительной гиперинсулинемией, вызванной устойчивостью клеток к действию инсулина [29]. Общими факторами риска сахарного диабета типа 2 считаются ожирение и системное воспаление [30].

Отмечается, что в основе патогенеза сахарного диабета типа 2 лежат четыре ведущих механизма – гипергликемия, резистентность клеток к инсулину, гиперлипидемия, иммунные дисфункции [31]. Нарушения, обусловленные этими механизмами, тесно связаны между собой в патогенезе ожирения, воспаления и сахарного диабета. В эту совокупность патологических процессов вполне встраивается и хронический пародонтит, поскольку высокая распространенность пародонтита в различные возрастные периоды характерна именно для пациентов с нарушениями углеводного и липидного обмена [29]. Основные маркеры сахарного диабета типа 2 очень тесно связаны с уровнем воспалительных процессов и степенью повреждения пародонтальных тканей при хроническом пародонтите [32, 33]. При этом тяжесть воспалительного процесса при различных

заболеваниях обычно определяют по изменениям цитокинового профиля в крови [34, 35], цереброспинальной жидкости [36, 37] и в слюне [38].

Локальные изменения в тканях пародонта при сахарном диабете типа 2 характеризуются усилением продукции активных форм кислорода и провоспалительных цитокинов (IL-1, IL-6, TNF α), в основе которых лежит накопление продуктов гликирования и их активное взаимодействие с рецепторами. Повышение уровня провоспалительных цитокинов приводит к развитию окислительного стресса и стимуляции дальнейшего распада тканей пародонта [39].

За последние годы получены противоречивые данные о том, что первично – сахарный диабет типа 2 или пародонтит, и какое из этих заболеваний сильнее влияет на сопутствующее [40]. Например, диабетическая нефропатия и сердечно-сосудистые осложнения достоверно чаще развиваются при сахарном диабете типа 2 с сопутствующим хроническим пародонтитом, чем без него [41], а эффективная терапия одного из этих заболеваний благоприятно сказывается на течении другого [42, 43]. Эта концепция нашла подтверждение и в других исследованиях, согласно которым системный воспалительный статус, спровоцированный пародонтопатогенными бактериями при хроническом пародонтите, способствует развитию диабета типа 2 [44]. Доказано, что провоспалительные цитокины играют довольно значительную роль в формировании резистентности к инсулину [45], принимают участие в развитии гиперлипидемии, являющейся одним из важнейших патогенетических признаков сахарного диабета [46].

Цель нашей работы состояла в определении характерных особенностей цитокинового профиля ротовой жидкости при сочетании хронического пародонтита и сахарного диабета типа 2 с использованием клинической модели ассоциации этих патологических процессов.

И хронический пародонтит, и сахарный диабет типа 2 являются многофакторными заболеваниями, в развитие которых вовлечены разнообразные патогенетические механизмы, что значительно затрудняет разработку достаточно эффективных экспериментальных моделей на животных.

Так, поскольку заболевания пародонта у животных регистрируются исключительно редко, то их воспроизводят путем наложения лигатур и других травмирующих приемов. Однако, несмотря на большой объем данных, полученных на экспериментальных животных, иногда бывает очень трудно оценить применимость этих результатов к людям, поскольку простая и воспроизводимая модель, которая действительно имитирует патогенез заболеваний пародонта у человека, до сих пор отсутствует [47, 48].

Аналогичная ситуация складывается и при попытке получить надежную экспериментальную модель сахарного диабета на животных. В качестве примера можно говорить о химически и хирургически индуцированных моделях, использовании генетически модифицированных животных. Однако считается, что такие модели позволяют изучать только отдельные стороны патогенеза сахарного диабета, не говоря уже о том, что большинство существующих экспериментальных моделей не позволяют дифференцировать сахарный диабет типа 1 и типа 2 [49, 50].

Все обозначенные проблемы заставили нас обратиться к клинической модели, в основу которой положены существенные ограничения по возможному влиянию индивидуальных признаков заболеваний. Поэтому в основную группу исследования были включены больные старше 45 лет, у которых и хронический пародонтит, и сахарный диабет типа 2 имели среднетяжелое течение, осложненное артериальной гипертензией II степени при наличии ожирения I–II степени, поскольку это заболевание практически никогда не протекает без осложнений.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациенты с хроническим пародонтитом, ассоциированным и не ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, и здоровые доноры (контроль)

Использованная нами клиническая модель включала три группы с примерно равным соотношением мужчин и женщин в возрасте от 45 до 60 лет: (1) основная группа – 11 пациентов с сочетанием хронического пародонтита и сахарного диабета типа 2; (2) группа сравнения – 9 больных хроническим пародонтитом; (3) контрольная группа – 12 здоровых доноров. У больных хроническим пародонтитом отсутствовали врожденные аномалии со стороны челюстно-лицевого аппарата, папиллярно-маргинально-альвеолярный индекс (РМА) не превышал 60%, глубина пародонтальных карманов находилась на уровне 3–5 мм при подвижности зубов I–II степени, лечебные мероприятия последние 6 месяцев не проводились. Продолжительность заболевания сахарным диабетом типа 2 составляла 3–10 лет. Все пациенты принимали пероральные сахароснижающие препараты. Мониторинг больных осуществляли, контролируя уровень гликированного гемоглобина фракции HbA1c в крови – основного критерия качества компенсации углеводного обмена при сахарном диабете [51]. Уровень гликированного гемоглобина (HbA1c) в период наблюдения составлял 6.5–11.3%.

Протокол исследования одобрен этическим комитетом Московского государственного медико-сто-

матологического университета им. А.И. Евдокимова Минздрава России. Все пациенты предоставили информированное согласие на участие в исследовании.

Анализ цитокинового профиля ротовой жидкости

Материалом для исследования служили образцы цельной нестимулированной слюны (1 мл), которые собирали в мерную стерильную пластиковую пробирку. Образцы слюны хранили при -80°C до дальнейшего анализа. После размораживания образцы слюны центрифугировали при 16100 *g* в течение 10 мин при 4°C . Супернатант разбавляли в 2.5 раза фосфатно-солевым буфером (PBS) с 0.5% Tween-20.

Уровень цитокинов в образцах слюны определяли с использованием мультиплексного магнитно-флуоресцентного иммуноанализа с использованием набора Human Cytokine 17-plex Assay на приборе Bio-Plex 200 (Bio-Rad, США) в соответствии с инструкцией производителя. Определяли набор из 17 цитокинов различного профиля, включая: (1) хемокины – интерлейкин-8 (IL-8), хемоаттрактантный белок-1 моноцитов (MCP-1), воспалительный белок-1 β макрофагов (MIP-1 β); (2) факторы роста – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (G-CSF), гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор (GM-CSF), интерлейкин-7 (IL-7); (3) провоспалительные цитокины – интерлейкин-1 β (IL-1 β), интерлейкин-6 (IL-6), фактор некроза опухолей- α (TNF α), интерлейкин-17A (IL-17A); (4) цитокины гуморального иммунного ответа – интерлейкины-4, -5, -13 (IL-4, IL-5, IL-13); (5) цитокины клеточного иммунного ответа – интерлейкины-2, -12 (IL-2, IL-12(p70)), интерферон- γ (IFN γ); (6) цитокин иммуносупрессорного действия – интерлейкин-10 (IL-10).

Статистическая обработка данных

Данные обрабатывали с использованием пакета статистических программ SPSS (версия 21) и Sigma-Plot 12.5. Статистический анализ различий между группами больных и здоровых доноров (контроль) проводили с помощью непараметрического U-критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Содержание различных цитокинов в слюне анализировали, сопоставляя 95% доверительные интервалы показателей, и путем построения ROC-кривых, отражающих соотношение чувствительности и специфичности каждого теста в виде величины площади под кривой – AUC, как представлено на графиках.

На *рис. 1* и в *таблице* представлены результаты сравнительного анализа уровней хемокинов в слюне и ROC-кривые их диагностического значения

Цитокиновый профиль в слюне пациентов с хроническим пародонтитом, ассоциированным и не ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, и здоровых доноров. Концентрация цитокинов указана в пг/мл

Цитокины	Хронический пародонтит		Хронический пародонтит, ассоциированный с сахарным диабетом типа 2		Здоровые контроли	
	медиана	IQR	медиана	IQR	медиана	IQR
IL-1 β	■591	(82–867)	■226	(53–399)	50	(40–128)
IL-2	■19	(11–25)	7.4	(4.9–14.4)	2.3	(2.0–7.7)
IL-4	■2.5	(1.2–2.6)	1.2	(0.6–2.1)	0.6	(0.5–1.2)
IL-5	13.7	(4.9–14.0)	2.2	(1.5–10.7)	7.5	(7.4–8.7)
IL-6	■278	(14–303)	20	(5–52)	8.0	(6.4–74.7)
IL-7	5.5	(2.9–10.6)	■9.9	(2.8–16.6)	1.5	(1.5–1.5)
IL-8	■2554	(760–2859)	1245	(522–2964)	381	(362–588)
IL-10	■10.3	(4.2–12.0)	4.8	(1.0–17)	3.0	(1.0–4.8)
IL-12(p70)	1.5	(0.5–4.0)	■1.2	(0.8–1.5)	0.6	(0.5–0.6)
IL-13	■1.1	(0.4–1.3)	0.4	(0.4–0.9)	0.4	(0.4–0.4)
IL-17A	■23	(14–43)	9.1	(5.8–19.5)	4.3	(4.0–11.0)
G-CSF	■296	(141–305)	161	(33–279)	82	(71–85)
GM-CSF	■6.5	(5.9–8.7)	2.4	(1.0–5.4)	1.0	(1.0–1.7)
IFN γ	18	(17–26)	7.3	(4.6–9.5)	7.1	(3.6–24.9)
MCP-1	302	(251–415)	151	(126–269)	87	(65–260)
MIP-1 β	■27	(26–41)	17	(11–36)	10.2	(9.2–14.6)
TNF α	■115	(45–268)	■43	(26–92)	12	(11–23)

Примечание. Результаты представлены как медиана и интерквартильное распределение (IQR). Красным цветом и символом ■ обозначены значения концентрации цитокинов, значимо отличающиеся от группы здоровых доноров, $p < 0.05$. Серым показаны концентрации цитокинов, значимо отличающиеся в группах пациентов с хроническим пародонтитом, ассоциированным и не ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, $p < 0.05$.

по группам исследования. Как следует из сравнения 95% доверительных интервалов, существует тенденция к росту содержания таких хемокинов, как IL-8 и белок MIP-1 β в слюне обеих групп хронического пародонтита, но только в группе без сахарного диабета типа 2 этот рост становится статистически значимым по сравнению с контролем при довольно высоком диагностическом значении теста (AUC от 0.8 до 0.96). В то же время не выявлено значимых различий в повышении уровня IL-8 в группах хронического пародонтита, ассоциированного и не ассоциированного с сахарным диабетом типа 2 (AUC = 0.575), а уровни MIP-1 β можно оценить как умеренные (AUC=0.725). Уровень хемоаттрактанта моноцитов MCP-1 в слюне был значимо ниже у больных хроническим пародонтитом, ассоциированным с сахарным диабетом типа 2. В этом случае диагностическое значение теста можно оценить как высокое (AUC = 0.775).

Особое диагностическое значение хемокина MCP-1 в полости рта при сахарном диабете типа 2 отмечено и другими авторами [52]. В частности, подчеркнута его прямая связь с величиной бактериальной на-

грузки в ротовой полости, поскольку при снижении нагрузки на фоне лечебно-профилактических мероприятий падает и уровень MCP-1 в слюне [52]. Однако в нашем случае получен парадоксальный результат: при прочих равных условиях и в отсутствие лечебных мероприятий уровень MCP-1 в полости рта при хроническом пародонтите, ассоциированном с сахарным диабетом типа 2, был ниже, чем при хроническом пародонтите без сопутствующей соматической патологии. Казалось бы, роль пародонтопатогенных бактерий в последнем случае значительно возрастает [53], но опубликованы и альтернативные результаты [54].

На рис. 2 и в таблице приведены результаты аналогичного анализа содержания ряда факторов роста в слюне больных и здоровых индивидов. Уровень гранулоцитарного колониестимулирующего фактора (G-CSF) в слюне больных хроническим пародонтитом имеет тенденцию к повышению, но только в отсутствие сахарного диабета типа 2 тенденция становится статистически значимым отклонением. Содержание гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF) в слюне во всех случаях

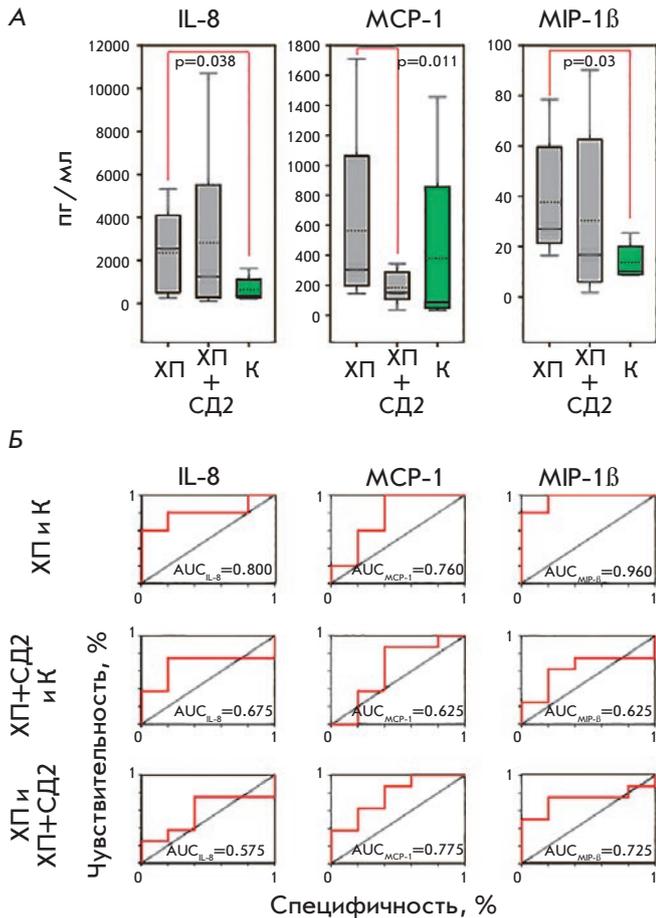


Рис. 1. 95% доверительные интервалы уровней хемокинов в слюне (А) и ROC-кривые их диагностического значения (Б) в группах исследования: ХП + СД2 – больные хроническим пародонтитом в сочетании с сахарным диабетом типа 2, ХП – больные хроническим пародонтитом, К – контрольная группа, СД2 – сахарный диабет типа 2, AUC – площадь под ROC-кривой

больше, чем в контроле при наличии хронического пародонтита, а уровень IL-7, значимо высокий только при ассоциации хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2. Особого внимания среди этих отклонений заслуживают различия между уровнями GM-CSF при хроническом пародонтите, ассоциированном и не ассоциированном с сахарным диабетом типа 2, более высокие в последнем случае.

Показано, что при сочетании хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2 именно GM-CSF, правда, в сыворотке крови, а не в слюне, входит в кластер патогенетически значимых цитокинов [55]. Получены косвенные свидетельства возможного дефицита этого цитокина при ассоциации указанных заболеваний, поскольку экзогенное введение GM-CSF способствует выживаемости экспериментальных животных [56].

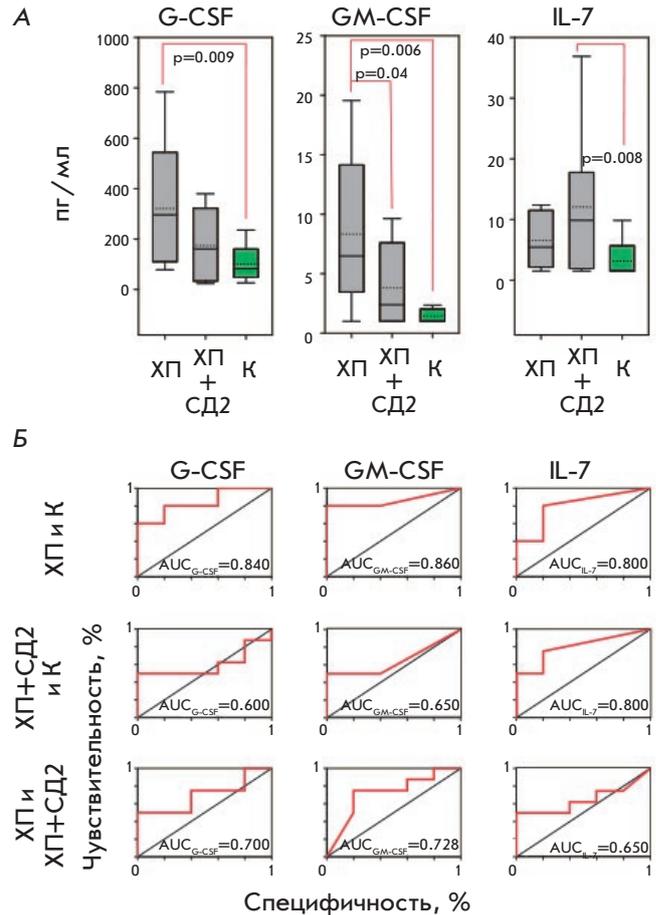
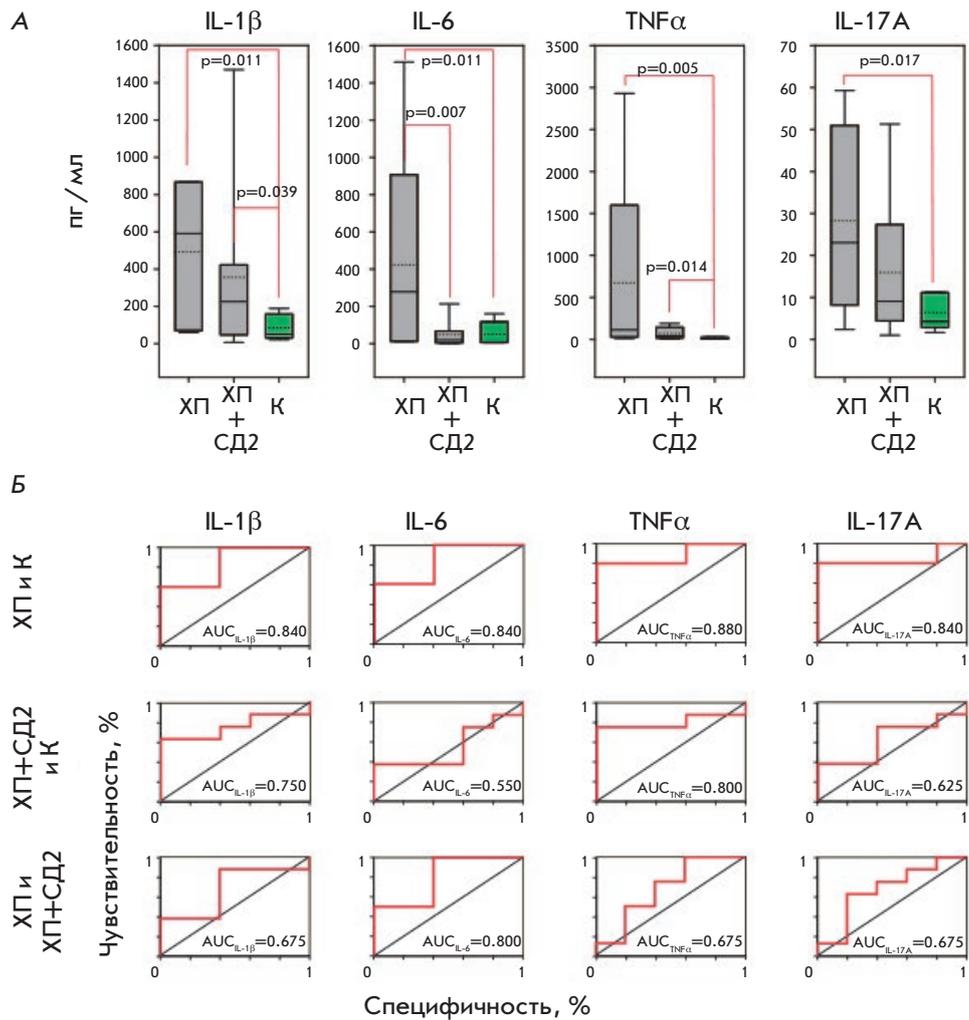


Рис. 2. 95% доверительные интервалы уровней факторов роста в слюне (А) и ROC-кривые их диагностического значения (Б) в группах исследования: ХП + СД2 – больные хроническим пародонтитом в сочетании с сахарным диабетом типа 2, ХП – больные хроническим пародонтитом, К – контрольная группа, AUC – площадь под ROC-кривой

Далее анализировали профиль из четырех цитокинов провоспалительного действия: три из них секретируются преимущественно клетками врожденного иммунитета, в первую очередь, макрофагами (IL-1β, IL-6, TNFα), а IL-17A принадлежит к продуктам секреции одной из категорий Т-хелперных клеток – Th17 (рис. 3, таблица).

Как следует из рис. 3, содержание IL-1β и TNFα в слюне было статистически значимо повышено в обеих группах хронического пародонтита независимо от наличия сопутствующего диабета типа 2. Уровень IL-17A значимо повышался в группе хронического пародонтита, тогда как при сочетанной патологии наблюдалась лишь тенденция к повышению. Группы хронического пародонтита, ассоциированного и не ассоциированного с сахарным диабетом типа 2, различались только содержанием IL-6 в слюне,

Рис. 3. 95% доверительные интервалы уровней провоспалительных цитокинов в слюне (А) и ROC-кривые их диагностического значения (Б). ХП + СД2 – больные хроническим пародонтитом в сочетании с сахарным диабетом типа 2, ХП – больные хроническим пародонтитом, К – контрольная группа, AUC – площадь под ROC-кривой



которое значимо увеличивалось только при хроническом пародонтите без сопутствующей патологии.

IL-6 считается одним из важнейших предикторов сахарного диабета типа 2 и его сосудистых осложнений. При этом высказываются предположения о системном механизме участия этого цитокина в патогенезе атеросклероза через активацию клеток эндотелия, повышение роли тромбообразующей функции у тромбоцитов, стимуляцию пролиферации клеток гладкомышечного слоя сосудов, повышенное накопление липидов в макрофагах [57, 58]. В нашей работе выявлено снижение локального уровня IL-6 в слюне больных при сочетании хронического пародонтита и сахарного диабета типа 2.

Определено также содержание цитокинов, продуцируемых преимущественно Т-хелперными клетками типа 2 (Th2) и так или иначе связанных с развитием гуморального иммунного ответа (рис. 4, таблица).

Как и в случае других цитокинов, содержание IL-4, IL-13 и IL-10, секретируемых Th2, в слюне больных хроническим пародонтитом в сочетании с сахарным диабетом типа 2 оказалось выше, чем в контроле,

но ниже, чем у больных хроническим пародонтитом без сопутствующей патологии, но эти отличия имели невысокую диагностическую значимость (AUC < 0.65). Только содержание IL-5, который продуцируется не только Th2, но и лимфоцитами врожденного иммунитета типа 2 [59], различалось в двух группах хронического пародонтита (AUC = 0.75).

IL-5 является фактором роста эозинофилов в жировой ткани, в том числе и при сахарном диабете типа 2 [60]. Гиперэозинофилия способствует переходу активированных макрофагов в фенотип M2 с последующим подавлением последних воспалительных реакций [60, 61]. Элиминация одного из компонентов этой системы, как IL-5 в нашей работе, приводит к индукции жировой ткани инсулинорезистентности, характеризующей сахарный диабет типа 2, и усугубляет течение воспалительных реакций [60, 62].

На рис. 5 и в таблице представлены результаты определения уровней цитокинов, продуцируемых дендритными клетками, макрофагами, Т-хелперами типа 1 и цитотоксическими Т-клетками. Все они имеют отношение к развитию клеточного иммун-

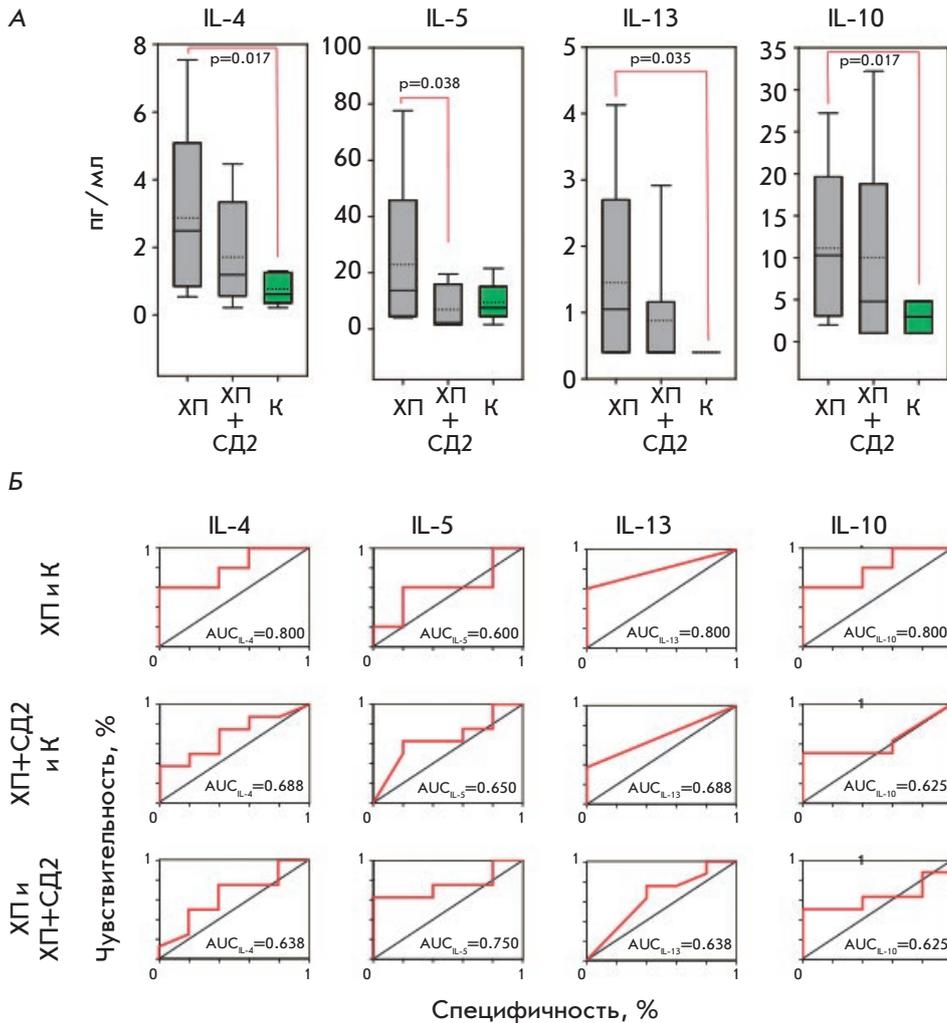


Рис. 4. 95% доверительные интервалы уровней цитокинов Th2 в слюне (А) и ROC-кривые их диагностического значения (Б). ХП + СД2 – больные хроническим пародонтитом в сочетании с сахарным диабетом типа 2, ХП – больные хроническим пародонтитом, К – контрольная группа, AUC – площадь под ROC-кривой

ного ответа – активная фракция интерлейкина-12 (IL-12(p70)), IL-2, интерферон- γ (IFN γ).

Повышение уровней IL-12 и IL-2 в слюне больных хроническим пародонтитом (ассоциированным и не ассоциированным с сахарным диабетом типа 2) было значимо выше, чем в контрольной группе, но различия между группами больных не выявлены. Секретция IFN γ , судя по его содержанию в слюне, при хроническом пародонтите снижена, причем более значительно при сочетании заболевания с сахарным диабетом типа 2.

Опубликованы данные о снижении уровня IFN γ в сыворотке крови при сахарном диабете типа 2, особенно в процессе лечения [63]. При этом одной из функций IFN γ является индукция фенотипа M1 макрофагов [64].

В таблице представлены уровни цитокинов в слюне пациентов с хроническим пародонтитом, ассоциированным и не ассоциированным с сахарным диабетом типа 2. Видно, что у пациентов с пародонтитом концентрация 12 из 17 цитокинов статистически значимо выше, чем в контрольной группе. Группы боль-

ных хроническим пародонтитом, ассоциированным или не ассоциированным с сахарным диабетом типа 2, однозначно различались содержанием только пяти цитокинов.

Интересная гипотеза выдвинута международным коллективом авторов с участием российских исследователей [65]. Суть этой гипотезы заключается в следующем. Ключевым фактором патогенеза сахарного диабета является гипергликемия. Из клеток иммунной системы важную роль играют макрофаги, активация которых сопровождается поляризацией их функций с формированием двух фенотипов – классически активированных макрофагов M1 и альтернативно активированных макрофагов M2. Оба фенотипа, благодаря продукции разных цитокинов, имеют важное значение в развитии ассоциированного с диабетом воспаления и сосудистых осложнений. Сама гипергликемия (без учета дополнительных влияний) индуцирует смешанный M1/M2-цитокиновый профиль, который и формирует определенное соотношение воспалительных и сосудистых реакций.

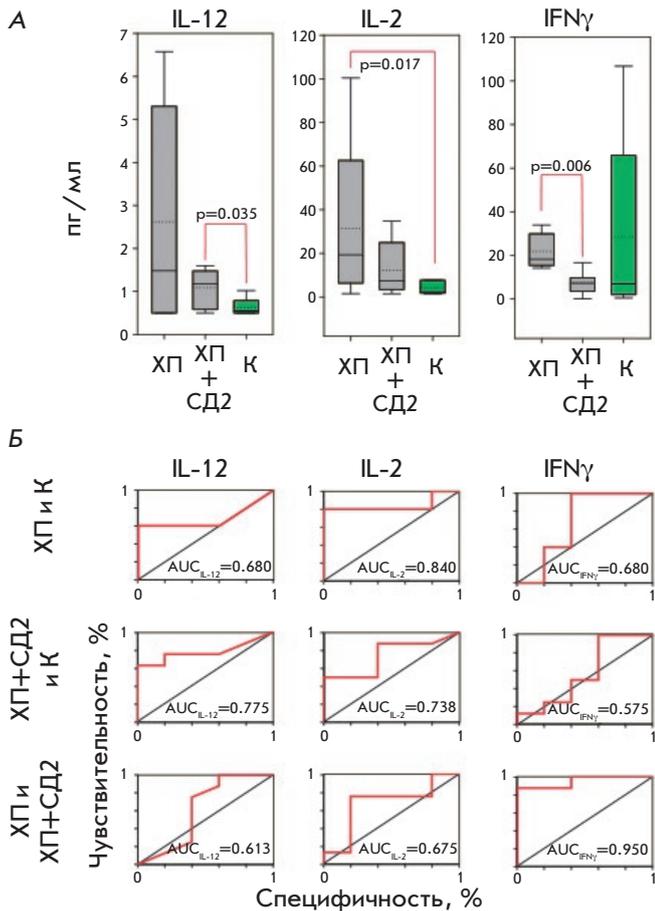


Рис. 5. 95% доверительные интервалы уровней цитокинов клеточного иммунного ответа в слюне (А) и ROC-кривые их диагностического значения (Б) в группах: XП + СД2 – хронический пародонтит в сочетании с сахарным диабетом типа 2, XП – больные хроническим пародонтитом, К – контрольная группа, AUC – площадь под ROC-кривой

По-видимому, наблюдаемые нами особенности цитокинового профиля при хроническом пародонтите в сочетании с сахарным диабетом типа 2 среднетяжелого течения формируются при наличии такого

дополнительного фактора, как хронический пародонтит, этиологически связанный с системой пародонтопатогенных бактерий, способных к персистенции.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Выявлены особенности локального цитокинового профиля слюны, характерные для хронического пародонтита, ассоциированного с сахарным диабетом типа 2. Эти особенности отсутствуют при хроническом пародонтите без сопутствующего диабета и включают статистически значимые изменения в содержании белка МСР-1, гранулоцитарно-макрофагального колониестимулирующего фактора (GM-CSF), интерлейкинов-6 и -5, интерферона- γ .

Основной особенностью изменений цитокинового профиля является снижение продукции названных цитокинов, позволяющее предположить, что при ассоциации хронического пародонтита с сахарным диабетом типа 2 происходит своеобразное «экранирование» фактора, индуцирующего продукцию цитокинов. На роль такого фактора при хроническом пародонтите может претендовать этиологически связанная с ним пародонтопатогенная микрофлора.

Другая важная особенность изменений цитокинового профиля, выявленная в процессе обсуждения результатов, – потенциально возможная связь этих отклонений с системой макрофагов и условиями их активации.

Сочетание этих признаков позволяет предложить гипотезу, согласно которой «экранирование» избирательного влияния пародонтопатогенов на цитокиновый статус слюны связано с их переходом к внутриклеточному паразитированию в макрофагах, обеспечивающему впоследствии системные эффекты этих бактерий. ●

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Horz H.P., Conrads G. // Expert Rev. Anti-infective Therapy. 2007. V. 5. № 4. P. 703–715.
- Kassebaum N.J., Smith A.G.C., Bernabe E., Fleming T.D., Reynolds A.E., Vos T, Murray C.J.L., Marcenes W, GBD 2015 Oral Health Collaborators // J. Dental Res. 2017. V. 96. № 4. P. 380–387.
- Pihlstrom B.L., Michalowicz B.S., Johnson N.W. // Lancet. 2005. V. 366. № 9499. P. 1809–1820.
- Xu P., Gunsolley J. // Virulence. 2014. V. 5. № 3. P. 424–432.
- Rawal I., Ghosh S., Hameed S.S., Shivashankar R., Ajay V.S., Patel S.A., Goodman M., Ali M.K., Narayan K.M.V., Tandon N., et al. // BioMed. Central Oral Hlth. 2019. V. 19. № 1. P. 191–200.
- Hajishengallis G., Darveau R.P., Curtis M.A. // Nat. Rev. Microbiology. 2012. V. 10. № 10. P. 717–725.
- Hajishengallis G., Lamont R.J. // Mol. Oral Microbiol. 2012. V. 27. № 6. P. 409–419.
- Hajishengallis G. // Nat. Rev. Immunol. 2015. V. 15. № 1. P. 30–44.
- Hegde R., Awan K.H. // Disease-a-Month. 2019. V. 65. № 6. P. 185–192.
- Baek K., Ji S., Choi Y. // J. Dental Res. 2018. V. 97. № 2. P. 192–200.
- Slocum C., Coats S.R., Hua N., Kramer C., Papadopoulos G., Weinberg E.O., Gudino C.V., Hamilton J.A., Darveau R.P., Genco C.A. // PLoS Pathogens. 2014. V. 10. № 7. e1004215.
- Han Y.W., Wang X.J. // J. Dental Res. 2013. V. 92. № 6. P. 485–491.

13. Xu P, Alves J.M., Kitten T, Brown A, Chen Z, Ozaki L.S., Manque P, Ge X, Serrano M.G., Puiu D, et al. // *J. Bacteriology*. 2007. V. 189. № 8. P. 3166–3175.
14. Tonetti M.S. // *J. Clin. Periodontol.* 2009. V. 36. № 10. P. 15–19.
15. Genco R.J., van Dyke T.E. // *Nat. Rev. Cardiol.* 2010. V. 7. № 9. P. 479–480.
16. Paju S., Scannapieco F.A. // *Oral Diseases*. 2007. V. 13. № 6. P. 508–512.
17. Suvan J., D’Aiuto F., Moles D.R., Petrie A., Donos N. // *Obesity Rev.* 2011. V. 12. № 5. P. 381–404.
18. Moodley A., Wood N.H., Shangase S.L. // *SADJ*. 2013. V. 68. № 6. P. 260–264.
19. Han Y.W. // *J. Dental Res.* 2011. V. 90. № 3. P. 289–293.
20. Kim J.H., Choi I.A., Lee J.Y., Kim K.H., Kim S., Koo K.T., Kim T.I., Seol Y.J., Ku Y., Rhyu I.C., et al. // *J. Periodontal Implant Sc.* 2018. V. 48. № 6. P. 347–359.
21. Pan W., Yin W., Yang L., Xue L., Ren J., Wei W., Lu Q., Ding H., Liu Z., Nabar N.R., et al. // *J. Clin. Periodontol.* 2019. V. 46. № 3. P. 286–296.
22. Poole S., Singhrao S.K., Kesavalu L., Curtis M.A., Crean S. // *J. Alzheimer’s Disease*. 2013. V. 36. № 4. P. 665–677.
23. Ismail Y., Mahendran V., Octavia S., Day A.S., Riordan S.M., Grimm M.C., Lan R., Lemberg D., Tran T.A., Zhang L. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 5. P. e38217.
24. Castellarin M., Warren R.L., Freeman J.D., Dreolini L., Krzywinski M., Strauss J., Barnes R., Watson P., Allen-Vercoe E., Moore R.A., et al. // *Genome Res.* 2012. V. 22. № 2. P. 299–306.
25. Дзагурова Л.А. Метаболические показатели в оценке эффективности лечения воспалительных заболеваний пародонта у больных сахарным диабетом. Ставрополь: ФГБОУ ВО СтГМУ, 2010.
26. Danaei G., Finucane M.M., Lu Y., Singh G.M., Cowan M.J., Paciorek C.J., Lin J.K., Farzadfar F., Khang Y.H., Stevens G.A., et al. // *Lancet*. 2011. V. 378. № 9785. P. 31–40.
27. Ida S., Kaneko R., Murata K. // *J. Dental Res.* 2019. V. 2019. ID4684815. P. 1–10.
28. Expert Committee on the Diagnosis and Classification of Diabetes Mellitus. // *Diabetes Care*. 2003. V. 26. № 1. P. 5–20.
29. Ng M.L., Wadham C., Sukocheva O.A. // *Internat. J. Mol. Med.* 2017. V. 39. № 2. P. 243–252.
30. Shao S., Yang Y., Yuan G., Zhang M., Yu X. // *DNA Cell Biol.* 2013. V. 32. № 2. P. 41–49.
31. Verhulst M.J.L., Loos B.G., Gerdes V.E.A., Teeuw W.J. // *Frontiers Endocrinol (Lausanne)*. 2019. V. 10. P. 1–49.
32. Lew J.H., Naruishi K., Kajjura Y., Nishikawa Y., Ikuta T., Kido J.I., Nagata T. // *Cell. Physiol. Biochem.* 2018. V. 50. P. 973–986.
33. Zhou M., Rong R., Munro D., Zhu C., Gao X., Zhang Q., Dong Q. // *Public Library Sci.* 2013. V. 8. № 4. e61516.
34. Belogurov A.Jr., Zakharov K., Lomakin Y., Surkov K., Avtushenko S., Kruglyakov P., Smirnov I., Makshakov G., Lockshin C., Gregoriadis G., et al. // *Neurotherapeutics*. 2016. V. 13. № 4. P. 895–904.
35. Lomakin Y., Belogurov A.Jr., Glagoleva I., Stepanov A., Zakharov K., Okunola J., Smirnov I., Genkin D., Gabibov A. // *Mediators Inflamm.* 2016. V. 2016. P. 2847232.
36. Ziganshin R.H., Ivanova O.M., Lomakin Y.A., Belogurov A.A. Jr., Kovalchuk S.I., Azarkin I.V., Arapidi G.P., Anikanov N.A., Shender V.O., Piradov M.A., et al. // *Mol. Cell. Proteomics*. 2016. V. 15. № 7. P. 2366–2378.
37. Belogurov A.A. Jr., Ivanova O.M., Lomakin Y.A., Ziganshin R.H., Vaskina M.I., Knorre V.D., Klimova E.A., Gabibov A.G., Ivanov V.T., Govorun V.M. // *Biochemistry (Moscow)*. 2016. V. 81. № 11. P. 1293–1302.
38. Lomeli-Martinez S.M., Valentin-Goméz E., Varela-Hernández J.J., Alvarez-Zavala M., Sanchez-Reyes K., Ramos-Solano M., Cabrera-Silva R.I., Ramirez-Anguiano V.M., Lomeli-Martinez M.A., Martinez-Salazar S.Y., et al. // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. P. 1465.
39. Sonnenschein S.K., Meyle J. // *Periodontology* 2000. 2015. V. 69. № 1. P. 221–254.
40. Chee B., Park B., Bartold P.M. // *Internat. J. Evidence-Based Healthcare*. 2013. V. 11. № 4. P. 317–329.
41. Preshaw P.M., Alba A.L., Herrera D., Jepsen S., Konstantinidis A., Makrilakis K., Taylor R. // *Diabetologia*. 2012. V. 55. № 1. P. 21–31.
42. Gurav A.N. // *Curr. Diabetes Rev.* 2013. V. 9. № 5. P. 355–361.
43. Lalla E., Papapanou P.N. // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2011. V. 7. № 12. P. 738–748.
44. Wang G.P. // *Genome Medicine*. 2015. V. 7. № 1. P. 40–42.
45. Tilg H., Moschen A.R. // *Trends Endocrinol. Metabolism*. 2008. V. 19. № 10. P. 371–379.
46. Iacopino A.M. // *Ann. Periodontol.* 2001. V. 6. № 1. P. 125–137.
47. Oz H.S., Puleo D.A. // *J. Biomed. Biotechnol.* 2011. V. 2011. P. 754857.
48. Fawzy El-Sayed K.M., Dorfer C.E. // *Tissue Engineering. Part C Methods*. 2017. V. 23. № 12. P. 900–925.
49. Chatzigeorgiou A., Halapas A., Kalafatakis K., Kamper E. // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2018. V. 14. P. 140–162.
50. Rees D.A., Alcolado J.C. // *Diabetic Medicine*. 2005. V. 22. P. 359–370.
51. Calisti L., Tognetti S. // *Acta Biomedica de l’Ateneo Parmense*. 2005. V. 76. № 3. P. 59–62.
52. Anbalagan R., Srikanth P., Mani M., Barani R., Seshadri K.G., Janarthanan R. // *Diabetes Res. Clin. Practice*. 2017. V. 130. P. 204–210.
53. Бабаев Э.А., Балмасова И.П., Мкртумян А.М., Кострюкова С.Н., Вахитова Е.С., Ильина Е.Н., Царев В.Н., Габиров А.Г., Арутюнов С.Д. // *Бюл. эксп. биол. мед.* 2017. Т. 163. № 6. С. 682–686.
54. Liu L.S., Gkranas N., Farias B., Spratt D., Donos N. // *Clin. Oral Investigations*. 2018. V. 22. № 8. P. 2743–2762.
55. Miranda T.S., Heluy S.L., Cruz D.F., da Silva H.D.P., Feres M., Figueiredo L.C., Duarte P.M. // *Clin. Oral Invest.* 2019. V. 23. № 2. P. 641–650.
56. Frydrych L.M., Bian G., Fattahi F., Morris S.B., O’Rourke R.W., Lumeng C.N., Kunkel S.L., Ward P.A., Delano M.J. // *J. Immunol.* 2019. V. 202. № 3. P. 931–942.
57. Alharby H., Abdelati T., Rizk M., Youssef E., Moghazy K., Gaber N., Yafei S. // *Cardiovascular Endocrinol. Metab.* 2019. V. 8. № 3. P. 73–76.
58. Reiss A.B., Siegart N.M., De Leon J. // *J. Clin. Lipidol.* 2017. V. 12. P. 14–23.
59. Molofsky A.B., Nussbaum J.C., Liang H.E., van Dyken S.J., Cheng L.E., Mohapatra A., Chawla A., Locksley R.M. // *J. Exp. Medicine*. 2013. V. 210. № 3. P. 535–549.
60. Wu D., Molofsky A.B., Liang H.E., Ricardo-Gonzalez R.R., Jouihan H.A., Bando J.K., Chawla A., Locksley R.M. // *Science*. 2011. V. 332. № 6026. P. 243–247.
61. Wensveen F.M., Valentić S., Šestan M., Turk Wensveen T., Polić B. // *Eur. J. Immunol.* 2015. V. 45. № 9. P. 2446–2456.
62. Patsouris D., Li P.P., Thapar D., Chapman J., Olefsky J.M., Neels J.G. // *Cell Metabolism*. 2008. V. 8. № 4. P. 301–309.
63. Nekoua M.P., Fachinan R., Atchamou A.K., Nouatin O., Amoussou-Guenou D., Amoussou-Guenou M.K., Moutairou K., Yessoufou A. // *African Hlth Sci.* 2016. V. 16. № 3. P. 712–724.
64. Genin M., Clement F., Fattaccioli A., Raes M., Michiels C. // *BMC Cancer*. 2015. V. 15. P. 577.
65. Moganti K., Li F., Schmuttmaier C., Riemann S., Klüter H., Gratchev A., Harmsen M.C., Kzhyskowska J. // *Immunobiology*. 2017. V. 222. № 10. P. 952–959.

УДК 616-001/-009

Пептид CGRP и субстанция P как предикторы венозной тазовой боли

С. Г. Гаврилов¹, Г. Ю. Васильева², И. М. Васильев², О. И. Ефремова¹¹Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова Минздрава РФ, Москва, 119049 Россия²Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, 123007 Россия

*E-mail: gavriloffsg@mail.ru

Поступила в редакцию 20.06.2019

Принята к печати 14.10.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-88-92

РЕФЕРАТ Определено содержание в плазме крови пептида, относящегося к гену кальцитонина (calcitonin gene related peptide, CGRP), и субстанции P (CP) у пациентов с расширением внутритазовых вен. Обследованы 30 женщин с расширением внутритазовых вен и рефлюксом крови по ним по данным ультразвукового ангиосканирования. В группу 1 включены 18 больных с клиническими признаками синдрома тазового венозного полнокровия (СТВП), включая венозную тазовую боль (ВТБ). Группу 2 составили 12 женщин без каких-либо клинических проявлений СТВП на фоне расширения тазовых вен. В исследование включены 10 здоровых женщин в возрасте 21–22 лет. В группе 1 интенсивность ВТБ колебалась от 4 до 8 баллов (4.84 ± 0.43 в среднем). Уровень CGRP колебался от 0.39 до 1.01 нг/мл (в среднем 0.71 ± 0.11 нг/мл), CP – от 0.005 до 1.33 нг/мл (в среднем 0.42 ± 0.18 нг/мл). В группе 2 значения CGRP составили 0.15–0.32 нг/мл (среднее 0.26 ± 0.02 нг/мл), CP – 0.003–0.3 нг/мл (среднее 0.15 ± 0.06). В этой группе уровни изучаемых пептидов были в 3–5 раз ниже, чем у больных с ВТБ. В группе 3 средние значения CGRP составили 0.06 ± 0.003 нг/мл, CP – 0.03 ± 0.001 нг/мл. Эти значения рассматривали как референтные. Статистический анализ проводили на основании этих показателей. Корреляционный анализ выявил сильную взаимосвязь между уровнями CGRP и ВТБ ($r = 0.82$), среднюю – между значениями CP и тазовой болью в группе 1. Относительный риск развития ВТБ при повышении уровня CGRP в группе 1 в 19 раз выше, чем во второй ($RR = 19.19$; 95% ДИ: 2.78–132.35). Во второй группе столь очевидных взаимосвязей не выявлено. Уровни CGRP и CP в плазме крови высоко коррелируют с наличием венозной тазовой боли. Вероятно, CGRP и CP играют существенную роль в формировании болевого синдрома у пациентов с СТВП.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА венозная тазовая боль, пептид, относящийся к гену кальцитонина (CGRP), субстанция P. **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ВТБ – венозная тазовая боль; СТВП – синдром тазового венозного полнокровия; CGRP – пептид, относящийся к гену кальцитонина (calcitonin gene related peptide); CP – субстанция P.

ВВЕДЕНИЕ

Хроническая тазовая боль (ХТБ) представляет одну из актуальных и сложных проблем современной медицины [1, 2]. По данным ВОЗ, ХТБ встречается у 2.4–24% населения с преобладанием женщин репродуктивного возраста [3]. По другим данным, ХТБ страдают 3.8% женщин, а ежегодные затраты на лечение ХТБ в странах Европы составляют 3.8 млрд евро [4, 5]. У 10–30% пациентов с ХТБ причиной пеллалгий является синдром тазового венозного полнокровия (СТВП), а у 10% всей женской популяции имеют место расширение и рефлюкс крови по тазовым венам и у 60% из них формируется СТВП [6–9]. В работе Hansrani и соавт. [10] убедительно доказана связь между ХТБ и СТВП у женщин с клапанной недостаточностью внутритазовых вен. Таким образом, тазовая венозная недостаточность является весомым

фактором развития ХТБ. Причины возникновения венозной тазовой боли (ВТБ) до конца не изучены, а имеющиеся гемодинамические и воспалительные гипотезы не могут до конца объяснить причину возникновения болевого синдрома у одних пациентов и его отсутствие у других при одинаковых морфофункциональных изменениях тазовых вен [11–13]. Доказано отсутствие очевидной связи между диаметром висцеральных вен таза и выраженностью ВТБ [14, 15]. Вместе с тем, на возможную связь между нейрогенным воспалением, гиперпродукцией и повышением активности вазоактивных нейропептидов и формированием ВТБ указывают результаты ряда работ [16–19].

Цель настоящей работы состояла в определении содержания в плазме крови пептида, относящегося к гену кальцитонина (calcitonin gene related peptide,

CGRP), и субстанции P (CP) у пациентов с расширением внутритазовых вен и выявлении корреляционных связей между уровнями этих альгогенов и ВТБ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациенты

В исследование включены 30 женщин в возрасте от 22 до 42 лет, у которых расширение внутритазовых вен и патологический рефлюкс крови по ним выявлены по результатам трансабдоминального и трансвагинального ультразвукового ангиосканирования (УЗАС) вен таза. Исследование одобрено локальным этическим комитетом РНИМУ им. Н.И. Пирогова и зарегистрировано на *clinicaltrials.gov* (NCT03921788). Все больные подписали информированное согласие на участие в исследовании.

Дизайн исследования

Пациенты были разделены на группы в зависимости от наличия/отсутствия венозной тазовой боли (ВТБ) в соответствии с критериями включения/исключения. Критериями включения в исследование служили репродуктивный возраст, обнаружение расширения вен таза и ретроградного кровотока по параметральным, маточным, гонадным венам более 0.5 с по данным УЗАС, отсутствие какой-либо сопутствующей патологии, сопровождающейся хронической тазовой болью (ХТБ), согласие пациента на участие в исследовании. Критериями исключения считали отсутствие расширенных тазовых вен и рефлюкса крови по ним при выполнении УЗАС, заболевания, клиническое течение которых предполагает ХТБ и другие разновидности хронического болевого синдрома, включая мигрень. С этой целью все больные консультированы гинекологом, урологом и неврологом, им выполнены ультразвуковые исследова-

ования внутренних половых органов и мочевыделительной системы.

В группу 1 включены 18 пациенток с клиническими признаками синдрома тазового венозного полнокровия (СТВП), включая венозную тазовую боль. Выраженность ВТБ оценивали с помощью визуально-аналоговой шкалы (ВАШ), в этой группе больных она колебалась от 4 до 8 баллов. Во второй группе (12 пациенток) отсутствовали какие-либо клинические проявления СТВП на фоне расширения тазовых вен.

Третью, контрольную группу, составили 10 добровольцев без каких-либо острых и хронических заболеваний, сопровождающихся болевым синдромом, у них отсутствовала варикозная трансформация вен таза и нижних конечностей визуально и по данным УЗАС. Результаты клинического и ультразвукового исследований представлены в табл. 1.

Иммуноферментный анализ

Забор венозной крови из кубитальной вены осуществляли в одно и то же время (8.00–8.30 ч), натощак, в положении сидя, через 7 дней после окончания последней менструации. Кровь отбирали в вакуумные пробирки объемом 4.0 мл, содержащие K_2 -EDTA, центрифугировали в течение 10 мин со скоростью 3000 об/мин. По 1.0 мл плазмы крови помещали в 2 пробирки типа «Эппендорф». Биологический материал немедленно замораживали и хранили при температуре $-80^{\circ}C$ для последующего анализа. CGRP и субстанцию P (CP) исследовали с помощью конкурентного иммуноферментного анализа (ELISA) с коммерческими наборами Peninsula laboratories, LLC фирмы Vachem Group (США). Стандарты и образцы анализировали в нескольких повторностях. Использовали рекомендованный производителем протокол № 5 с инкубацией при $4^{\circ}C$ в течение 14–16 ч (over night). Оптическую плотность измеряли

Таблица 1. Клинические данные и результаты ультразвуковых исследований ($n = 30$)

Показатель		Группа 1 ($n = 18$)	Группа 2 ($n = 12$)	Группа 3 ($n = 10$)
Возраст, лет		30.2 ± 2.4	$31.6 \pm 1.9^*$	$21.3 \pm 0.8^{**}$
ИМТ		23.4 ± 0.8	$22 \pm 0.6^*$	$20.4 \pm 0.3^{**}$
Количество родов		1–3	1–3	0
Стаж заболевания/обнаружения варикозных вен таза, лет		4.9 ± 1.3	$3.3 \pm 1.1^*$	0
ВТБ, $n/\%$		18/100	0	0
ХТБ любой другой локализации, %		0	0	0
КН	Параметральные вены, $n/\%$	30/100	30/100	0
	Маточные вены, $n/\%$	9/50	5/41.6	0
	Гонадные вены, $n/\%$	4/22.2	3/25	0

Примечание. ИМТ – индекс массы тела; КН – клапанная недостаточность. * $p > 0.05$; ** $p < 0.05$.

на иммуноферментном анализаторе Stat Fax 2100 (микропланшетный фотометр Awareness Technology Inc., США) в стандартных 96-луночных планшетах при длине волны 450 нм. Концентрацию нейропептидов рассчитывали с использованием компьютерной программы Cobas EIA Recalibration Software (F.Hoffmann – La Roche Ltd, Швейцария).

Статистическая обработка

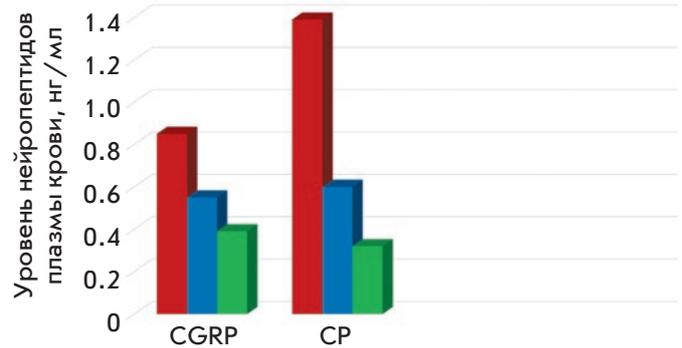
Статистический анализ проведен с использованием компьютерных программ Microsoft Excel, Statistica 6.0 и статистического онлайн-калькулятора medstatistic.ru. Рассчитывали среднее арифметическое (M) и стандартное отклонение (σ). Данные представлены в виде абсолютных и относительных величин. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Взаимосвязь между клиническими и лабораторными показателями оценивали с использованием корреляционно-регрессионного анализа (r) и расчета относительного риска (RR).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Данные трансабдоминального и трансвагинального УЗАС свидетельствовали об отсутствии значимых отличий в распространенности клапанной недостаточности тазовых вен у больных 1-й и 2-й групп. У пациентов второй группы, несмотря на патологический рефлюкс крови по гонадным (25%) и маточным (41.6%) венам, отсутствовали признаки тазового венозного полнокровия. Диаметр внутритазовых вен не учитывали вследствие отсутствия сколь-либо значимой взаимосвязи с наличием и выраженностью ВТБ, что согласуется с результатами, полученными ранее [14, 15]. Результаты лабораторных исследований выявляют статистически значимые различия между группами.

Группа 1

Среди пациентов этой группы интенсивность ВТБ колебалась от 4 до 8 баллов, составив в среднем 4.84 ± 0.43 балла. Уровень CGRP в группе 1 колебался от 0.39 до 1.01 нг/мл (в среднем 0.71 ± 0.11 нг/мл), CP – от 0.005 до 1.33 нг/мл (0.42 ± 0.18 нг/мл в среднем). У шести пациентов с выраженностью ВТБ 5–8 баллов уровни CGRP находились в пределах 0.69–1.01 нг/мл, CP – от 0.006 до 1.45 нг/мл. В двух наблюдениях с максимальной болью 8 баллов отмечено сочетание повышения концентрации нейропептидов: CGRP – 0.69 нг/мл, CP – 1.33 нг/мл у одной пациентки; CGRP – 1.01 нг/мл, CP – 1.45 нг/мл – у второй. Вероятно, сочетанное увеличение продукции этих белков способствует формированию более выраженного болевого синдрома. У шести пациентов тазовая боль интенсивностью 4 балла сопровождалась менее



Выраженность ВТБ: ■ 8 баллов ■ 5–6 баллов ■ 4 балла

Содержание CGRP, CP и выраженность венозной тазовой боли у больных первой группы

значимым увеличением концентраций CGRP (0.39–0.51 нг/мл) и CP (0.005–0.38 нг/мл). На рисунке представлены клиничко-лабораторные параллели между интенсивностью ВТБ и уровнем нейротрансмиттеров.

Примечательно, что, в отличие от CGRP, уровни CP в плазме крови больных этой группы варьировали в широких пределах: от нормальных значений до значительных (1.45 нг/мл). Причину этого феномена предстоит изучить в ходе дальнейшей работы.

Группа 2

У пациентов второй группы отсутствовала ВТБ. Содержание CGRP у них составило 0.15–0.32 нг/мл (среднее – 0.26 ± 0.02 нг/мл), CP – 0.003–0.3 нг/мл (среднее – 0.15 ± 0.06). В этой группе уровни нейропептидов были в 3–5 раз ниже, чем у больных с ВТБ. Установить какие-либо закономерности между значениями CGRP и CP у пациентов без тазовых болей не удалось.

Группа 3

У добровольцев отсутствовали указания на хронический болевой синдром любой локализации. Средние значения CGRP у них составили 0.06 ± 0.003 нг/мл, CP – 0.03 ± 0.001 нг/мл. Эти значения рассматривали как референтные, статистический анализ проводили с использованием этих показателей.

Корреляционный анализ выявил сильную взаимосвязь между уровнями CGRP и ВТБ ($r = 0.82$) и среднюю – между значениями CP и тазовой болью в первой группе больных. Значения относительного риска формирования ВТБ при повышении уровня CGRP в первой группе были в 19 раз выше, чем во второй ($RR = 19.19$; 95% ДИ: 2.78–132.35), что свидетельствует о прямой взаимосвязи между ВТБ и содержанием CGRP. Во второй группе столь очевидных взаимосвязей не выявлено.

Таблица 2. Выраженность ВТБ и содержание CGRP и CP в плазме крови в исследуемых группах

Показатель	Группа 1 (n = 18)	Группа 2 (n = 12)	p*	Группа 3 (n = 10)	p**
ВТБ, баллы	4.84 ± 0.43	0	-	0	-
CGRP, нг/мл	0.71 ± 0.11	0.26 ± 0.02	0.0004	0.06 ± 0.003	0.0001
CP, нг/мл	0.42 ± 0.18	0.15 ± 0.06	0.166	0.03 ± 0.001	0.05

*Сравнение групп 1 и 2. **Сравнение групп 2 и 3.

В табл. 2 представлены интенсивность ВТБ и результаты определения содержания CGRP и CP в исследуемых группах.

Выявлены статистически значимые различия в уровнях CGRP в плазме крови пациентов первой и второй групп. Различия в содержании CP плазмы крови в этих группах статистически недостоверны. Вместе с тем, очевидна тенденция к росту этого показателя у пациентов с ВТБ. Значения CGRP и CP в третьей группе значимо ниже, чем во второй, что, вероятно, свидетельствует о том, что сам факт существования варикозных вен таза вне зависимости от наличия или отсутствия болевого синдрома может сопровождаться увеличением содержания этих нейропептидов.

Еще в 1985 году Fischer и Vorn отметили выраженные сердечно-сосудистые эффекты CGRP (вазодилатация, гипотензия, положительное хронотропное и инотропное действие на сердце) при его внутривенном введении [20]. CGRP широко распространен в периферической и центральной нервной системе, а его рецепторы представлены в проводящих путях болевой чувствительности и обычно колокализуются с другими нейропептидами, включая вещество P [21]. Рецепторы к CGRP и CP обнаружены и во внутритазовых венах женщин [17, 22]. Установлено высокое содержание CP в эндотелиальных клетках вен яичника и усиление тазовой боли при внутривенном введении CGRP пациентам с СТВП. Это, в свою очередь, стало веским доводом в пользу изучения влияния этих нейротрансмиттеров на формирование ВТБ у больных СТВП. Обследование женщин с венозной тазовой болью, обусловленной СТВП, и здоровых добровольцев выявило существенные различия, а именно, усилие боли у женщин с СТВП и отсутствие какой-либо реакции у здоровых людей при внутривенном введении CGRP [17]. По мнению Stones [22], возникновение тазовой боли при СТВП обусловлено не столько расширением вены, сколько формированием нейрогенного воспаления. Автор сравнивает мигрень, при которой головные боли возникают на фоне сосудистых нарушений, с развитием болевого синдрома при нарушении венозного оттока из тазовых органов.

Результаты определения уровней CGRP и CP в плазме крови в группах больных с расширением внутритазовых вен и рефлюксом крови указывают на существование тесной взаимосвязи между уровнями этих нейропептидов и тазовой болью. Это, в определенной мере, служит косвенным подтверждением теории веноспецифического воспаления, возникающего на фоне варикозной трансформации вен и сопровождающегося гипоксией стенки вены, которую следует рассматривать в качестве повреждающего агента, способствующего формированию нейрогенного воспаления в стенке вены. Вероятно, застой крови во внутритазовых венозных сплетениях и формирующаяся тазовая венозная гипертензия вызывают активацию каскада патологических реакций, сопровождающихся активацией эндотелиоцитов и дегрануляцией тучных клеток. Не исключено, что эти процессы генерируют повышение синтеза CGRP и CP в периваскулярных ганглиях, которые ответственны за развитие нейрогенного воспаления венозной стенки и возникновение ВТБ.

На сегодняшний день отсутствуют референтные значения CGRP и CP у здоровых людей. Имеющиеся данные разноречивы, некоторые из них свидетельствуют об отсутствии этих веществ в плазме здоровых людей, другие утверждают, что концентрация CGRP в норме колеблется от 2 до 36 пмоль/л, а CP не превышает 0.1–0.19 нг/мл [23–25]. По данным нашего исследования концентрация CGRP и CP у добровольцев женского пола не превышает 0.06 ± 0.003 и 0.03 ± 0.001 нг/мл соответственно. Вместе с тем, следует учитывать различия в тест-системах, использованных в разных работах. Полученные результаты, свидетельствуют о целесообразности и перспективности этого направления научного поиска.

Следует отметить, что CGRP и CP – лишь два вазоактивных нейропептида, содержание которых определено у пациентов с венозной тазовой болью. Между тем, процесс формирования болевого синдрома при СТВП включает активацию целого спектра нейротрансмиттеров и альгогенов (нейрокинин А, эндотелины, простагландины, оксид азота, интерлейкин-1, фактор некроза опухоли-α и др.). В част-

ности, по мнению Agu и соавт. [26] и Yang и соавт. [27], снижение экспрессии эндотелина-1 в сочетании с уменьшением количества рецепторов эндотелина-V служит фактором снижения вазоконстрикторной активности вен и формирования их варикозной трансформации. Показано, что у женщин с хроническим заболеванием вен прием микронизированной очищенной фракции флавоноидов приводит к повышению уровня эндотелина-1 на фоне снижения концентрации фактора некроза опухоли- α (TNF- α), что косвенно указывает на участие эндотелина-1 в регуляции венозного тонуса [28]. Эти данные свидетельствуют о необходимости дальнейшего изучения нейробиологических причин венозной тазовой боли, что позволит оценить воздействие других белковых соединений на патологические процессы в стенке вены.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Экспрессия CGRP и CP в плазме крови высоко коррелирует с наличием венозной тазовой боли. Эти

нейропептиды играют, по-видимому, существенную роль в процессе формирования болевого синдрома у пациентов с синдромом тазового венозного полнокровия. Высокое содержание CGRP и CP при ВТБ, резистентной к традиционной флеботропной терапии, может служить показанием к применению блокаторов этих нейротрансмиттеров при такой форме заболевания. ●

Исследование выполнено в рамках научно-исследовательской работы «Разработка инновационных технологий профилактики и лечения хирургических заболеваний, связанных с нарушением кровообращения и гипоксией» (№ 01201254811) Российского национального исследовательского медицинского университета им. Н.И. Пирогова (РНИМУ) и Программы фундаментальных исследований (тема 65.1) Института медико-биологических проблем (ИМБП).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Howard F.M. // Obstet. Gynecol. 2003. V. 101. № 3. P. 594–611.
- Champaneria R., Shah L., Moss J., Gupta J.K., Birch J., Middleton L.J., Daniels J.P. // Hlth Technol. Assess. 2016. V. 20. № 5. P. 1–108.
- Latthe P., Latthe M., Say L., Gulmezoglu M., Khan K.S. // BMC Public Hlth. 2006. V. 6. № 177. P. 1–7.
- Mathias S.D., Kuppermann M., Liberman R.F., Lipschutz R.C., Steege J.F. // Obstet. Gynecol. 1996. V. 87. P. 321–327.
- Riding D.M., Hansrani V., McCollum C. // Vasc. Hlth Risk Manag. 2017. V. 27. № 13. P. 439–447.
- Belenky A., Bartal G., Atar E., Bachar G.N. // Am. J. Roentgenol. 2002. V. 179. P. 625–627.
- Ignacio E.A., Dua R., Sarin S., Harper A.S., Yim D., Mathur V., Venbrux A.C. // Semin. Intervent. Radiol. 2008. V. 25. P. 361–368.
- Meneses L.Q., Uribe S., Tejos C., Andia M.E., Fava M., Irrarrazaval P. // Phlebology. 2011. V. 26. № 4. P. 157–161.
- Fassiadis N. // Int. Angiol. 2006. V. 25. № 1. P. 1–3.
- Hansrani V., Morris J., Caress A.L., Payne K., Seif M., McCollum C.N. // Eur. J. Obstet. Gynecol. Reprod. Biol. 2016. V. 196. P. 21–25.
- Danziger N. // J. Mal. Vasc. 2007. V. 32. № 1. P. 1–7.
- Mansilha A., Sousa J. // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 6. P. 1669.
- Phillips D., Deipolyi A.R., Hesketh R.L., Midia M., Oklu R. // J. Vasc. Interv. Radiol. 2014. V. 25. № 5. P. 725–733.
- Dos Santos S.J., Holdstock J.M., Harrison C.C., Lopez A.J., Whiteley M.S. // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 2015. V. 49. № 1. P. 90–94.
- Гаврилов С.Г., Москаленко Е.П., Каралкин А.В., Лебедев И.С., Сон Д.А., Турищева О.О. // Флебология. 2017. Т. 11. № 1. С. 28–31.
- Kindgen-Milles D., Arndt J.O. // Pain. 1996. V. 64. P. 139–142.
- Stones R.W., Thomas D.C., Beard R.W. // Clin. Auton. Res. 1992. V. 2. № 5. P. 343–348.
- Gyftopoulos K., Chondrogianni C., Papadaki H. // Fertil. Steril. 2011. V. 95. № 8. P. 2554–2556.
- Kee Z., Kodji X., Brain S.D. // Front. Physiol. 2018. V. 19. № 9. P. 1249.
- Fischer J.A., Born W. // Peptides. 1985. V. 6. P. 265–271.
- Schou W.S., Ashina S., Amin F.M., Goadsby P.J., Ashina M. // J. Headache Pain. 2017. V. 18. № 1. P. 34.
- Stones R.W., Loesch A., Beard R.W., Burnstock G. // Obstet. Gynecol. 1995. V. 85. № 2. P. 273–278.
- Stevenson J.C., MacDonald D.W.R., Warren R.C., Booker M.W., Whitehead M.J. // Br. Med. J. 1986. V. 293. P. 1329–1330.
- Schifter S. // Peptides. 1991. V. 12. № 2. P. 365–369.
- Левченко М.В., Орлов В.И., Светличная С.В. // Рос. вестн. акушера-гинеколога. 2008. № 3. С. 5–8.
- Agu O., Hamilton G., Baker D.M., Dashwood M.R. // Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg. 2002. V. 23. № 2. P. 165–171.
- Yang L., Qi G.Y., Cao Y.X., Liu J., Zhao M. // Zhonghua Wai Ke Za Zhi. 2008. V. 46. № 17. P. 1325–1328.
- Pietrzycka A., Kózka M., Urbanek T., Stpniewski M., Kucharzewski M. // Curr. Vasc. Pharmacol. 2015. V. 13. № 6. P. 801–808.

УДК 577.24

Генетическая вариабельность основной помпы множественной лекарственной устойчивости AcrAB-TolC определяет резистентность грамотрицательных бактерий к SkQ1

П. А. Назаров^{1,2*}, Е. А. Котова¹, В. П. Скулачев^{1,3}, Ю. Н. Антоненко¹¹НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119992 Россия²Митотех, Москва, 119991 Россия³НИИ митоинженерии, Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

*E-mail: nazarovpa@gmail.com

Поступила в редакцию 16.10.2019

Принята к печати 18.11.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-93-98

РЕФЕРАТ Новый антибиотик SkQ1, действующий на бактериальную биоэнергетику, очень эффективен против грамположительных и грамотрицательных бактерий. Однако некоторые грамотрицательные бактерии, такие, как *Escherichia coli* и *Klebsiella pneumoniae*, проявляют к нему высокую устойчивость, причем у различных грамотрицательных бактерий эта устойчивость определяется идентичностью аминокислотных последовательностей белка-транспортера AcrB и соответствующего белка из *E. coli*. SkQ1 откачивается из клеток *E. coli* с помощью основной помпы множественной лекарственной устойчивости AcrAB-TolC. Нами показано, что устойчивость *E. coli* к SkQ1, в отличие от устойчивости к хлорамфениколу, не зависит от малого вспомогательного белка помпы – AcrZ.

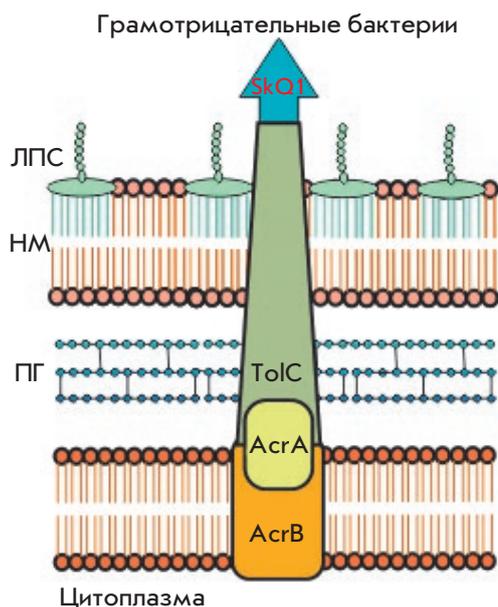
КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА SkQ1, AcrZ, помпа AcrAB-TolC, множественная лекарственная устойчивость.

ВВЕДЕНИЕ

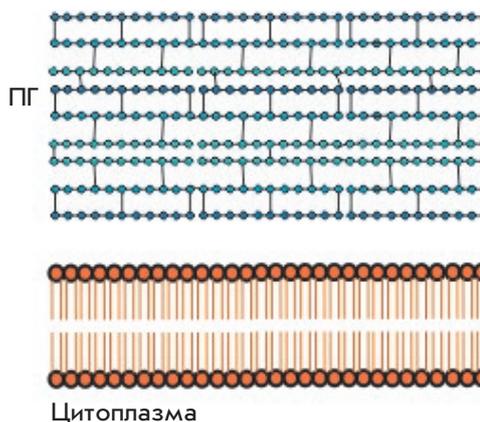
SkQ1 – пластохинон, конъюгированный с децилтрифенилфосфонием, – является представителем нового класса антибиотиков, которые влияют непосредственно на бактериальную биоэнергетику. Благодаря способности подавлять рост широкого спектра грамотрицательных и грамположительных бактерий SkQ1 может найти применение в медицине и сельском хозяйстве, поэтому важным представляется изучение его влияния на микробные экосистемы и развитие устойчивости к нему. Нами показано [1, 2], что устойчивость бактерии *Escherichia coli* к SkQ1 обусловлена наличием специфической помпы множественной лекарственной устойчивости (МЛУ) AcrAB-TolC (рис. 1), определяющей резистентность к широкому спектру антибиотиков, поверхностно-активных веществ, солей желчных кислот, красителей и малых органических молекул [3]. Однако в нашей работе [1] не были проанализированы все TolC-зависимые помпы, а именно предполагаемая TolC-зависимая помпа EmrKY-TolC и EntS, а также белок AcrZ. Известно,

что состоящий из 49 аминокислотных остатков небольшой вспомогательный белок внутренней мембраны AcrZ (он же YbhT) связывается с комплексом AcrAB-TolC, в состав которого входят белки AcrA, AcrB и TolC, и повышает способность помпы откачивать из клетки определенные классы субстратов, такие, как тетрациклин, пурамицин и хлорамфеникол [4].

Бактерии обладают генетической пластичностью, что позволяет им реагировать на широкий спектр экологических угроз, таких, как антибиотики. Бактерии используют две основные генетические стратегии выживания: (1) приобретение детерминант устойчивости посредством горизонтального переноса гена и (2) мутации, связанные с мишенями антибиотиков [5]. Аминокислотные последовательности белков AcrA, AcrB и TolC идентичны у лабораторных субштаммов В и К-12 *E. coli* [6]. Ранее мы показали, что удаление любого из белков AcrA, AcrB или TolC приводит к полной потере устойчивости к SkQ1 [1]. Расстояние между оперонами TolC и AcrB в хромо-



Грамотрицательные бактерии



Грамположительные бактерии

Рис. 1. Схема клеточной стенки бактерий (ЛПС – липополисахариды, НМ – наружная мембрана, ПГ – пептидогликановый слой) и антибактериальное действие SkQ1 в отношении грамположительных и грамотрицательных бактерий. Чувствительность грамотрицательных бактерий к SkQ1 зависит от структуры белков-компонентов помпы AcrAB-TolC

	МИК, мкг/мл
<i>Escherichia coli</i>	19
<i>Rhodobacter sphaeroides</i>	0.6–1.2
<i>Photobacterium phosphoreum</i>	0.6–1.2

	МИК, мкг/мл
<i>Bacillus subtilis</i>	0.6–1.2
<i>Staphylococcus aureus</i>	0.6–1.2

соем *E. coli* составляет около 175 т.п.н. [7], таким образом, вероятность приобретения устойчивости, опосредованной помпой AcrAB-TolC, через межвидовой горизонтальный перенос генов очень мала.

На сегодняшний день устойчивость, опосредованная помпой МЛУ, представляет собой единственный известный механизм резистентности к SkQ1, а AcrAB-TolC является единственным известным насосом, удаляющим SkQ1 из клетки. На основании данных о способности малого белка AcrZ регулировать устойчивость к таким антибиотикам, как тетрациклин, пурамицин и хлорамфеникол [4], можно предположить, что устойчивость к SkQ1 также модулируется AcrZ. С другой стороны, резистентность к SkQ1 могла бы модулироваться локальными и глобальными регуляторами транскрипции, а также посредством посттранскрипционной и посттрансляционной регуляции [8].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использованы стандартные лабораторные штаммы *E. coli*, штаммы MG1655 и W3110 (F-lambda-IN (rrnD-rrE) 1 rph-1). Штаммы *E. coli* MC1061, DH5α и BL21(DE3) предоставлены С.С. Соколовым (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ), штамм *E. coli* JM109 – Л.А. Новиковой (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ), штамм *E. coli*

GR70N получен от Ю.В. Берцовой (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ), штамм *E. coli* XL1-Blue приобретен у компании «Евроген» (Москва, Россия).

Делеционные штаммы *E. coli* ЕСК0751 (лишенные гена *acrZ*), ЕСК0584 (лишенные гена *entS*), ЕСК2363 (лишенные гена *emrY*), ЕСК2364 (лишенные гена *emrK*) любезно предоставлены Н. Niki (National Institute of Genetics, Япония) [9].

Staphylococcus aureus получен из коллекции микроорганизмов МГУ им. М.В. Ломоносова (№ 144). *Photobacterium phosphoreum* предоставлен А.Д. Исмаиловым (НИИ ФХБ им. А.Н. Белозерского МГУ). *Rhodobacter sphaeroides* получен от G. Klug (Institute for Microbiology and Molecular Biology at Justus-Liebig-University of Giessen, Германия).

Бактериальные клетки выращивали при 37°C в среде LB или Мюллера–Хинтона при частоте встряхивания 140 об / мин как описано в [1].

Исследование устойчивости к SkQ1 осуществляли методом двойных разведений в жидкой питательной среде с использованием панелей собственного производства согласно рекомендациям Института клинических и лабораторных стандартов (Clinical and Laboratory Standards Institute, CLSI). Для исследования была использована жидкая среда Мюллера–Хинтона (HIMEDIA, Мумбай, Индия). Панель концентраций готовили в 96-луночном микротитро-

Таблица 1. Восприимчивость бактерий к SkQ1: измерения минимальной ингибирующей концентрации (МИК). Сравнение активности SkQ1 с различными антибиотиками по отношению к *Staphylococcus aureus* в одинаковых условиях

Бактерия	Антибиотик	МИК, мкг/мл	Источник
Штаммы <i>E. coli</i>			
W3110	SkQ1	19	[1]
MG1655	SkQ1	19	Данная работа
JM109	SkQ1	19	«
BL21(DE3)	SkQ1	19	«
XL1-Blue	SkQ1	19	«
DH5 α	SkQ1	19	«
MC1061	SkQ1	19	«
GR70N	SkQ1	19	«
<i>E. coli</i> MG1655 делеционные штаммы			
AcrD, AcrE, AcrF, MacA, MacB, MdtA, MdtB, MdtC, MdtE, MdtF, EmrA, EmrB	SkQ1	19	[1]
AcrZ, EmrK, EmrY, EntS	SkQ1	19	Данная работа
AcrA, AcrB, TolC	SkQ1	0.6–1.2	[1]
<i>R. sphaeroides</i>	SkQ1	0.6–1.2	Данная работа
<i>P. phosphoreum</i>	SkQ1	0.6–1.2	«
<i>K. pneumoniae</i>	SkQ1	>19	«
<i>S. aureus</i>	SkQ1	0.6–1.2	Данная работа, [1]
	Канамицин	2.5	Данная работа
	«	3.1	[10]
	Хлорамфеникол	5	Данная работа
	«	3.1	[10]
	Ампициллин	2.5	Данная работа
	«	1.6	[10]
	Стрептомицин	6.3	[10]
Полимиксин В	100	[10]	

вальном планшете в объеме 200 мкл. Бактериальную суспензию (50 мкл) в среде Мюллера–Хинтона добавляли к каждой лунке для получения 250 мкл суспензии (5×10^5 КОЕ/мл). Полученную суспензию инкубировали при 37°C в течение 20 ч [1].

Минимальную ингибирующую концентрацию (МИК) определяли как самую низкую концентрацию, которая полностью ингибировала рост бактерий. Рост бактерий наблюдали визуально наряду с измерениями OD₆₂₀ [1].

Для биоинформатического анализа мы использовали поисковый инструмент BLASTp (NCBI, <https://blast.ncbi.nlm.nih.gov>), базу данных STRING v.10.5 (EMBL, <http://string.embl.de/>) и базу данных BioCyc из коллекции баз данных Pathway/Genome (PGDBs, <https://biocyc.org/>) BioCyc.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Мы сравнили устойчивость различных лабораторных штаммов *E. coli* и выяснили, что все эти штаммы устойчивы к SkQ1 (табл. 1). Это объясняется, по-видимому, идентичностью первичной структуры белков AcrA, AcrB и TolC у всех изученных нами штаммов [6].

Ранее [1] нами было показано, что граммотрицательные бактерии *P. phosphoreum* и *R. sphaeroides*, в отличие от штаммов *E. coli*, не обладают устойчивостью к SkQ1. Из данных, приведенных в табл. 2, следует, что аминокислотная последовательность белков этих бактерий, аннотированных как AcrB, довольно сильно отличается от последовательности белка AcrB из *E. coli*. Уровень их идентичности с белком AcrB *E. coli* составляет 65 и 33% соответственно, что и определяет, по-видимому, чувствительность этих бактерий к SkQ1. Отметим, что белок AcrD, удаление которого не влияет на чувствительность к SkQ1, на 66% идентичен последовательности белка AcrB, что сравнимо с белками AcrB из *P. phosphoreum* и *R. sphaeroides*. Таким образом, для резистентности бактерий к SkQ1 требуется большее сходство аминокислотной последовательности их белка AcrB с последовательностью белка AcrB из *E. coli*. Чтобы проверить это заключение, мы проанализировали первичную структуру белка AcrB другой граммотрицательной бактерии *Klebsiella pneumoniae*, которая оказалась на 91.5% идентичной структуре белка AcrB из *E. coli*. Это дало нам основание предположить наличие резистентности к SkQ1 у *K. pneumoniae*, что и было подтверждено экспериментально (табл. 1 и 2).

Анализ антибактериальной активности SkQ1 по отношению к делеционным мутантам *E. coli* по белкам EmrK, EmrY и EntS (рис. 2) показал, что минимальные ингибирующие концентрации SkQ1 были такими же, как определенные нами для штамма дикого типа *E. coli* (табл. 1).

Чтобы проверить роль белка AcrZ в устойчивости *E. coli* к SkQ1, мы сравнили устойчивость штаммов дикого типа *E. coli* MG1655 и штаммов с делецией белков AcrZ и AcrB. Если белок AcrZ участвует в функционировании помпы МЛЮ AcrAB-TolC с формированием комплекса AcrABZ-TolC, то для удаления SkQ1 устойчивость делеционного мутанта по белку AcrZ должна быть выше устойчивости му-

Таблица 2. Сравнение последовательностей гена *acrB* из различных штаммов грамотрицательных бактерий с *acrB* из штамма *E. coli*

Бактерия	Идентификационный номер	Покрытие, %	Идентичность, %	Устойчивость к SkQ1
<i>E. coli</i> MG1655	NP_414995.1	100	100	ДА
<i>E. coli</i> W3110	BAE76241.1	100	100	ДА
<i>E. coli</i> AcrB*	NP_416965.1*	99	66	НЕТ
<i>E. coli</i> BL21(DE3)	CAQ30935.1	100	100	ДА
<i>E. coli</i> DH5 α	KGA88788.1	100	100	ДА
<i>R. sphaeroides</i>	ANS33442.1	97	33	НЕТ
<i>P. phosphoreum</i>	CEO37741.1	98	65	НЕТ
<i>K. pneumoniae</i>	CDO13174.1	99	91.5	ДА

Примечание. В случае делеционного мутанта *E. coli* MG1655 по белку AcrB, обозначенного звездочкой, сравнение проводили с последовательностью белка AcrD. Идентичность аминокислотной последовательности определяли как процент идентичных аминокислотных остатков в соответствующих положениях в выровненных последовательностях. Покрытие определяли как процент выровненной последовательности белка AcrB. Отсутствие (НЕТ) и наличие (ДА) устойчивости к SkQ1 определяли по отношению к *E. coli*, где МИК SkQ1, сравнивая с МИК SkQ1 для *E. coli*, служила критерием устойчивости.

танта с делецией белка AcrB, но ниже, чем у белка дикого типа. Если белок AcrZ не участвует в функционировании помпы AcrAB-TolC, то устойчивость мутанта с делецией белка AcrZ должна быть такой же, как у штамма дикого типа, и выше, чем в случае делеции белка AcrB. В качестве положительного контроля в этих опытах использовали хлорамфеникол [10], удаление которого из клетки усиливается под действием белка AcrZ [4]. Влияние белка AcrZ на устойчивость к SkQ1 и хлорамфениколу определяли одновременно, чтобы исключить зависимость получаемых результатов от условий эксперимента.

В наших экспериментах делеционный мутант по белку AcrZ обладал такой же устойчивостью к SkQ1, как и штаммы дикого типа *E. coli* (*puc. 3*), тогда как три штамма *E. coli* (WT, Δ AcrZ и Δ AcrB) показали разные уровни устойчивости к хлорамфениколу (*puc. 3*) как описано ранее [4]. Согласно [4], связывание AcrZ с AcrB может вызывать конформационные изменения в его периплазматическом домене, что влияет на распознавание и захват субстратов с низкой гидрофобностью. Поскольку SkQ1 является высокогидрофобным соединением ($\log P = 4.11$) [11, 12], его распознавание помпой может не регулироваться связыванием AcrZ с AcrB.

Анализ делеционных мутантов показал, что помпа EmrKY-TolC не принимает участие в откачке SkQ1 из бактериальной клетки. Удаление гена *entS* также не влияло на откачку SkQ1 из бактериальной клетки. Таким образом, подтвердилось наше заключение о том, что AcrAB-TolC является единственной помпой, откачивающей SkQ1.

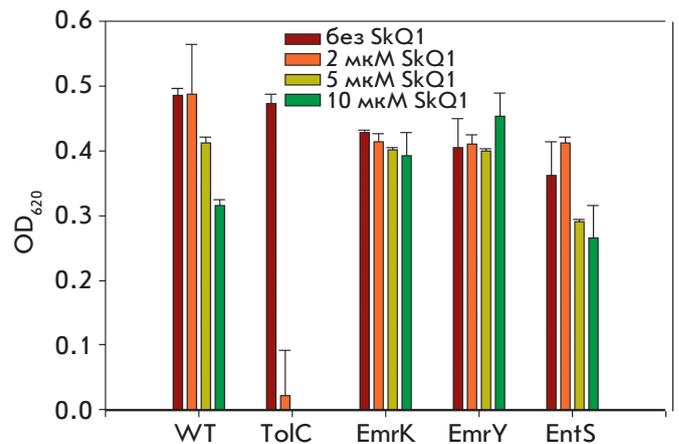


Рис. 2. Токсичность SkQ1 в отношении *E. coli* MG1655 и его делеционных мутантов Δ TolC (положительный контроль), Δ EmrK, Δ EmrY и Δ EntS. SkQ1 (2–10 мкМ) добавляли к бактериальным культурам ($1-5 \times 10^5$ клеток / мл), помещенным в 96-луночные планшеты. Плотность клеток определяли по поглощению при 620 нм. После этого бактерии растили в течение 20 ч при 37°C и снова измеряли плотность клеток. Данные представляют собой средние значения \pm стандартное отклонение, по меньшей мере, для трех экспериментов

Другим возможным модулятором устойчивости к SkQ1 могла бы быть 6S РНК, регулятор сигма-70-зависимой транскрипции генов [13]. Наши предварительные исследования не выявили различий в устойчивости к SkQ1 между делеционным мутан-

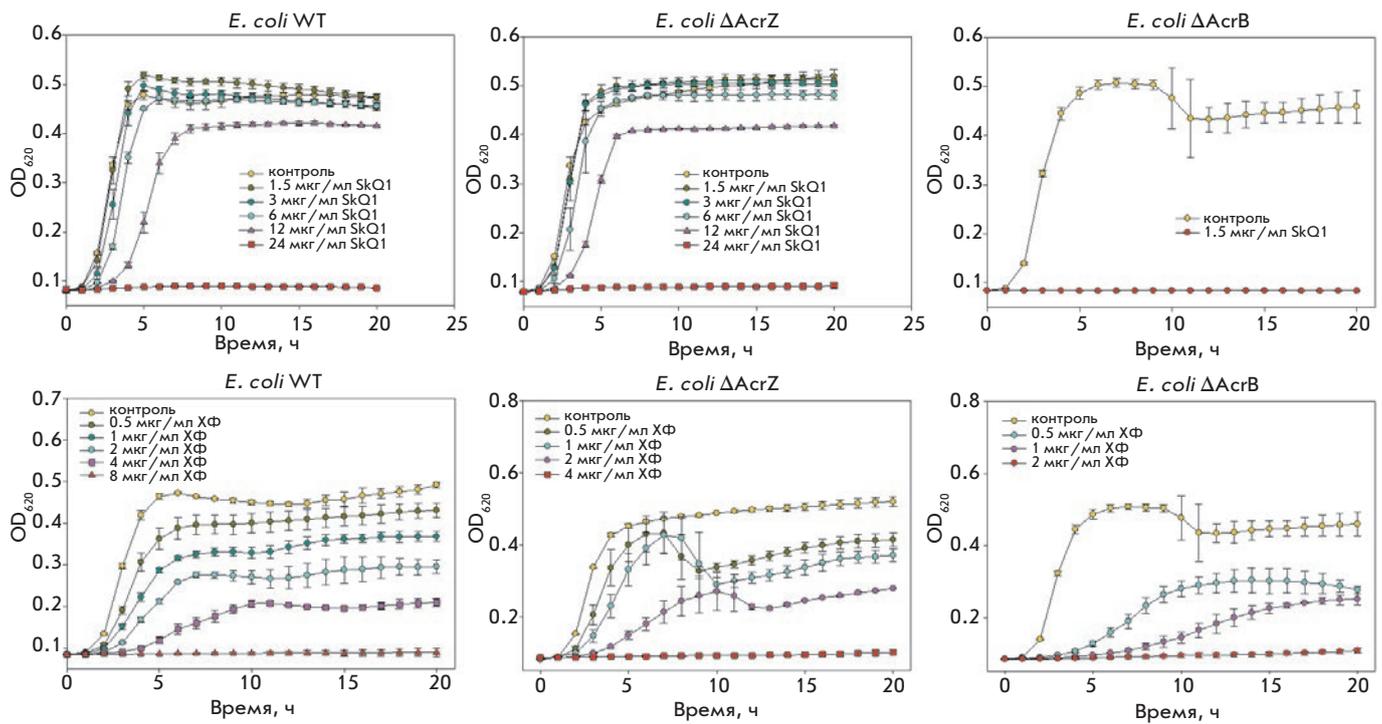


Рис. 3. Влияние SkQ1 (верхняя панель) и хлорамфеникола (ХФ) (нижняя панель) на рост бактерий *E. coli* (WT, Δ AcrB и Δ AcrZ). SkQ (1.5–24 мкг/мл) или хлорамфеникол (0.5–8 мкг/мл) добавляли к бактериальным культурам (5×10^5 клеток/мл), помещенным в 96-луночные планшеты. Рост оценивали по ежечасно измеряемой во время инкубации оптической плотности при 620 нм с помощью планшетного спектрофотометра Multiskan FC (Thermo Fisher Scientific, США). Бактериям давали расти в течение 20 ч при 37°C. Точки данных представляют собой средние значения \pm стандартное отклонение, по меньшей мере, для трех экспериментов

том *E. coli* по белку SsrS и штаммом *E. coli* дикого типа. Нельзя исключить, что устойчивость к таким антибиотикам, нацеленным на биоэнергетику, как SkQ1, может быть повышена за счет тривиального увеличения уровня экспрессии. Недавно было показано [13], что экспрессию помп плеiotропной лекарственной устойчивости у дрожжей *Saccharomyces cerevisiae* можно индуцировать додецилтрифенилфосфонием, другим представителем этого класса антибиотиков, т.е. додецилтрифенилфосфоний может служить как активатором, так и ингибитором лекарственной устойчивости [14, 15]. Однако нет прямой взаимосвязи между временной активацией экспрессии и постоянным увеличением плеiotропной устойчивости к подобным веществам.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, полученные результаты показывают, что SkQ1 является эффективным антибиотиком, устойчивость к которому бактерий *E. coli* обусловлена лишь наличием помпы AcrAB-TolC. Существенный фактор, определяющий устойчивость других грамотрицательных бактерий к SkQ1, – идентичность их белков AcrB и AcrB из *E. coli*. Белок AcrZ не участвует в формировании устойчивости к SkQ1, иными словами, обычный способ регуляции устойчивости за счет влияния на помпу МЛЮ AcrAB-TolC через белок AcrZ не эффективен в случае SkQ1. ●

Работа поддержана грантом РНФ № 16-14-10025. Мы благодарны А.С. Корзиной за помощь на протяжении всего проекта.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Nazarov P.A., Osterman I.A., Tokarchuk A.V., Karakozova M.V., Korshunova G.A., Lyamzaev K.G., Skulachev M.V., Kotova E.A., Skulachev V.P., Antonenko Y.N. // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 1394.

2. Khailova L.S., Nazarov P.A., Sumbatyan N.V., Korshunova G.A., Rokitskaya T.I., Dedukhova V.I., Antonenko Y.N., Skulachev V.P. // Biochemistry (Mosc.). 2015. V. 80. № 12. P. 1589–1597.
 3. Pos K.M. // Biochim. Biophys. Acta. 2009. V. 1794. № 5. P. 782–793.

4. Hobbs E.C., Yin X., Paul B.J., Astarita J.L., Storz G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 41. P. 16696–16701.
5. Munita J.M., Arias C.A. // *Microbiol. Spectr.* 2016. V. 4. № 2. 10.1128/microbiolspec.VMBF-0016-2015.
6. Karakozova M.V., Nazarov P.A. // *Bull. RSMU*. 2018. V. 2. P. 32–36.
7. Keseler I.M., Mackie A., Peralta-Gil M., Santos-Zavaleta A., Gama-Castro S., Bonavides-Martínez C., Fulcher C., Huerta A.M., Kothari A., Krummenacker M., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41 (Database issue). P. D605–D612.
8. El Meouche I., Dunlop M.J. // *Science*. 2018. V. 362. № 6415. P. 686–690.
9. Baba T., Ara T., Hasegawa M., Takai Y., Okumura Y., Baba M., Datsenko K.A., Tomita M., Wanner B.L., Mori H. // *Mol. Syst. Biol.* 2006. V. 2. 2006.0008. doi: 10.1038/msb4100050
10. Sabath L.D., Garner C., Wilcox C., Finland M. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 1976. V. 9. № 6. P. 962–969.
11. Martyushin A.A., Tsarev D.A., Grigorenko M.A., Fedorov I.I., Ramenskaya G.V., Tashlitsky V.N., Skulachev V.P. // *Pharmacia*. 2008. V. 5. P. 23–29.
12. Antonenko Y.N., Avetisyan A.V., Bakeeva L.E., Chernyak B.V., Chertkov V.A., Domnina L.V., Ivanova O.Y., Izyumov D.S., Khailova L.S., Klishin S.S., et al. // *Biochemistry (Mosc.)*. 2008. V. 73. № 12. P. 1273–1287.
13. Wassarman K.M. // *Microbiol. Spectr.* 2018. V. 6. № 3. 10.1128/microbiolspec.RWR-0019-2018.
14. Galkina K.V., Besedina E.G., Zinovkin R.A., Severin F., Knorre D. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 8131. P. 1–11.
15. Knorre D.A., Markova O.V., Smirnova E.A., Karavaeva I.E., Sokolov S.S., Severin F.F. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2014. V. 450. № 4. P. 1481–1484.

УДК 577.175.82

Катехоламины в слезной жидкости как маркеры болезни Паркинсона: клиническое и экспериментальное исследование

А. Р. Ким^{1*}, М. Р. Нодель^{2,3}, Т. А. Павленко⁴, Н. Б. Чеснокова⁴, Н. Н. Яхно², М. В. Угрюмов¹¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334 Россия²Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия³Российский национальный исследовательский медицинский университет имени Н. И. Пирогова, Российский геронтологический научно-клинический центр, Москва, 129226 Россия⁴Национальный медицинский исследовательский центр глазных болезней имени Гельмгольца Минздрава России, Москва, 105062 Россия

*E-mail: alexandrrkim@gmail.com

Поступило в редакцию 09.08.2019

Принято к печати 17.10.2019

DOI: 10.32607/20758251-2019-11-4-99-103

РЕФЕРАТ Важным подходом к ранней диагностике болезни Паркинсона (БП) считается обнаружение периферических биомаркеров на самой ранней стадии заболевания. Нами изучена возможность использования в качестве маркеров изменений концентрации катехоламинов в слезной жидкости больных с БП. Обнаружено, что концентрация норадреналина и дофамина у больных БП увеличена по сравнению с возрастным контролем, что более выражено на стороне появления двигательных симптомов. Напротив, концентрация адреналина в слезной жидкости больных снижена с обеих сторон. Поскольку нет оснований считать, что маркеры клинической стадии БП можно использовать и для диагностики доклинических стадий, изучен состав слезной жидкости у мышей при нейротоксическом моделировании доклинической и клинической стадий БП. Показано, что концентрация норадреналина в слезной жидкости мышей при моделировании клинической стадии БП выше, чем в контроле. На модели доклинической стадии обнаружена тенденция к увеличению концентрации норадреналина. Таким образом, у больных БП и у мышей на моделях доклинической и клинической стадий БП присутствуют однонаправленные изменения состава слезной жидкости, которые могут рассматриваться как перспективные биомаркеры для ранней диагностики этого заболевания.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА биомаркеры, болезнь Паркинсона, нелеченные больные, слезная жидкость, экспериментальные модели.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БП – болезнь Паркинсона; ВЭЖХ-ЭД – высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией; ДГБА – 3,4-дигидроксипензиламин; МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – распространенное нейродегенеративное заболевание, которое характеризуется, в частности, гибелью дофаминергических нейронов nigrostriatной системы мозга. Клинически БП проявляется через много лет после начала патологического процесса при гибели большей части дофаминергических нейронов черной субстанции, что объясняет существующие ограничения фармакотерапии заболевания [1]. Отсюда следует, что важнейшей задачей является разработка ранней

(доклинической) диагностики БП, которая позволит выявить заболевание до появления первых двигательных симптомов и использовать превентивную нейропротекторную терапию [1].

В последнее время все большее внимание уделяется изучению изменений зрения при БП и приводящих к этому патологических процессов в глазу и вспомогательном аппарате глаза как потенциальных источников периферических биомаркеров БП [2]. Важную роль играет нарушение метаболизма катехоламинов, которые обеспечивают передачу

Таблица 1. Клинические характеристики когорт пациентов

Когорта	N	Пол, м / ж	Возраст, лет	Оценка стадии БП			Длительность болезни, лет
				Шкала Hoehn-Yahr	UPDRS II (повседневная деятельность)	UPDRS III (двигательная активность)	
Больные с БП	26	16 / 10	60.3 ± 2.0	1.8 ± 0.1	8.7 ± 1.0	23.6 ± 2.3	2.6 ± 0.3
Контроль	19	4 / 15	57.4 ± 2.9	-	-	-	-

зрительной информации в сетчатке, регулируют скорость аккомодации и внутриглазное давление [2]. Кроме того, при БП изменениям подвергается и ткань век, содержащая многочисленные железы, секреторный продукт которых входит в состав слезной жидкости. Конъюнктив, выстилающая внутреннюю поверхность век, и находящиеся в ней железы имеют симпатическую иннервацию [3], дисфункция которой отмечается при БП в рамках мультисистемной дегенерации, затрагивающей как центральные, так и периферические отделы автономной нервной системы [4].

Сбор слезной жидкости – это несложная неинвазивная процедура, в отличие от взятия крови или ликвора, которые традиционно используются для поиска периферических биомаркеров [5]. Тем не менее, поиску биомаркеров БП в слезе посвящены лишь единичные работы, причем в них анализируется только белковый состав слезы. Так, показано, что в слезной жидкости больных с БП повышается уровень фактора некроза опухоли [6], увеличивается концентрация олигомерного α-синуклеина [7] и меняется протеомный профиль в целом [8]. Эти исследования указывают на перспективность поиска биомаркеров БП в слезе. Однако имеет смысл анализировать не только белки, но и низкомолекулярные вещества, вовлеченные в патогенез БП, в частности катехоламины, которые активно изучают в качестве потенциальных биомаркеров БП в крови и ликворе [9].

Следует подчеркнуть, что нет данных, согласно которым биомаркеры, обнаруженные у пациентов с диагностированной клинической стадией БП, могут использоваться на доклинической стадии этого заболевания [1]. Поэтому нами проведен сравнительный анализ изменения концентрации катехоламинов в слезной жидкости нелеченых больных с ранней стадией БП и у животных при моделировании доклинической и клинической стадий этого заболевания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Пациенты с БП и контрольная группа

Анализировали пробы слезной жидкости, взятые у 26 пациентов с диагнозом БП на 1–2 стадиях

по Hoehn-Yahr до начала противопаркинсонической терапии и у лиц сходного возраста без двигательных нарушений. Все пациенты дали письменное согласие на проведение исследования.

Диагноз БП был поставлен в соответствии с клиническими диагностическими критериями Международного общества изучения двигательных расстройств 2015 года (MDS-2015). В контрольную группу вошли индивиды того же возраста без неврологических болезней. В исследование не включали пациентов с офтальмологическими заболеваниями. Ключевые клинические характеристики когорт представлены в *табл. 1*.

Сбор слезной жидкости проводили утром с помощью стерильной фильтровальной бумаги (шириной 5 мм), которую закладывали за нижнее веко, как при проведении теста Ширмера. Слезную жидкость собирали путем естественной сорбции на тест-полоску в отсутствие стимуляции слезотечения в течение 5 мин. Длину намоченной части полоски измеряли для расчета объема пробы, после чего помещали полоски в пробирки с 0.1 н. HClO₄, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C.

Животные

В работе использовали 30 мышей-самцов линии C57BL/6 в возрасте 2–2.5 месяцев и массой 22–26 г (питомник «Пушино»). Животных содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Для моделирования БП на доклинической стадии проводили двукратное подкожное введение 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) (Sigma, США) в разовой дозе 8 мг/кг. Для моделирования БП на клинической стадии подкожно вводили МФТП 4 раза в дозе 10 мг/кг. Интервал между инъекциями в обоих случаях составлял 2 ч [10]. Контрольная группа получала 0.9% NaCl по аналогичной схеме.

Через 2 недели после введения МФТП или 0.9% NaCl оценивали состояние мышей по показателю пройденного пути в тесте «открытое поле» с помощью установки для анализа поведения животных PhenoMaster (TSE Systems, Германия). Далее у животных, находящихся под изофлурановым наркозом, собирали слезную жидкость с помощью полосок

из фильтровальной бумаги шириной 2.5 мм, аналогичных полоскам Ширмера.

После сбора слезной жидкости анестезированных мышшей декапитировали, из мозга выделяли дорсальный стриатум согласно ранее описанной методике [10]. Пробы стриатума взвешивали, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C .

Высокоэффективная жидкостная хроматография (ВЭЖХ)

Концентрацию катехоламинов (норадреналин, адреналин и дофамин) измеряли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ-ЭД). Пробы гомогенизировали с помощью ультразвукового гомогенизатора Labsonic M (Sartorius, Франция) в 200 мкл 0.1 н. HClO_4 (Sigma, США), содержащих внутренний стандарт 3,4-дигидроксибензиламин (ДГБА, Sigma) в концентрации 25 пмоль/мл, после чего центрифугировали (20 мин при 2000 г).

ВЭЖХ проводили на обращенно-фазной колонке ReproSil-Pur, ODS-3, 4×100 мм с диаметром пор 3 мкм (Dr. Maјsch GmbH, Германия) при температуре $+30^{\circ}\text{C}$ и скорости подвижной фазы 1.2 мл/мин, поддерживаемой жидкостным хроматографом LC-20ADsp (Shimadzu, Япония) согласно [11].

Статистика

Данные ВЭЖХ представлены в виде среднего в процентах от контроля \pm стандартная ошибка среднего. Поскольку БП развивается асимметрично, в группе больных данные были перегруппированы на соответствующие ипсилатеральной стороне (пробы слезной жидкости, собранной из глаза на стороне начала и большей тяжести двигательных симптомов) и контралатеральной стороне (пробы, собранные на стороне, где двигательные симптомы отсутствовали или были выражены минимально). В контрольной группе и у экспериментальных животных данные, полученные при анализе слезной жидкости правого и левого глаза, усредняли.

Нормальность данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Статистический анализ результатов проводили с помощью параметрического t -критерия Стьюдента или непараметрического критерия Манна–Уитни в программном пакете GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, США). Критерием значимости считали $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В этой работе впервые измерена концентрация катехоламинов в слезной жидкости пациентов с БП до начала лечения. Показано, что уровень норадреналина и дофамина в слезной жидкости больных значительно

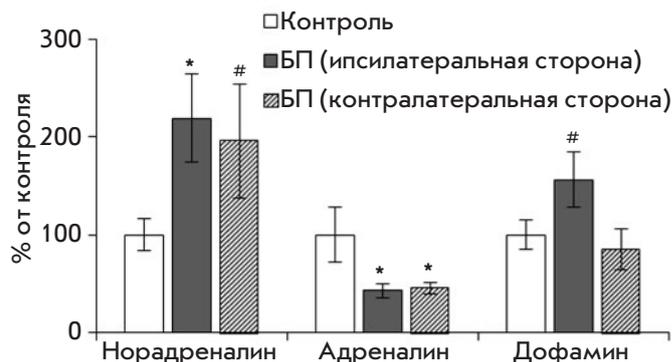


Рис. 1. Концентрация катехоламинов в слезной жидкости больных с БП, взятой из глаза на стороне проявления моторных симптомов (ипсилатеральной) и на противоположной (контралатеральной) стороне. * $p < 0.05$, # $p < 0.15$ относительно контрольной группы

но выше, чем у здоровых лиц (контроль) того же возраста (рис. 1). Обнаружена отчетливая асимметрия: повышение концентрации норадреналина и дофамина в большей степени выражено на ипсилатеральной стороне, т.е. на стороне большей выраженности моторных симптомов, по сравнению с контралатеральной стороной. Поскольку нами не обнаружены статистически значимые различия в объеме собранных проб (данные не представлены), выявленную асимметрию в концентрации дофамина и норадреналина у пациентов с БП нельзя объяснить асимметричной гипокинезией мышц глаз с нарушением оттока слезной жидкости. Тем не менее, асимметрия в изменении содержания маркеров в слезе хорошо согласуется с представлениями об асимметричном характере развития БП. Так, при диагностировании БП на ранней клинической стадии пороговая деградация нигростриатной дофаминергической системы и моторные нарушения проявляются только с одной стороны [12]. Следует подчеркнуть, что асимметрия в составе слезы является первым наблюдением асимметричности развития БП за пределами нигростриатной системы [12].

В отличие от норадреналина и дофамина, уровень адреналина в слезной жидкости снижался как на ипси-, так и на контралатеральной стороне (рис. 1). Такая реакция похожа на выявленное ранее снижение содержания адреналина в плазме крови у больных с БП [9]. Следует отметить, что источник катехоламинов в слезной жидкости точно не установлен. При этом известно, что в кровь адреналин попадает из надпочечников, а норадреналин и дофамин – преимущественно из окончаний симпатических норадренергических нейронов [13]. Вероятно, обнаруженные в слезе катехоламины имеют такое же происхождение.

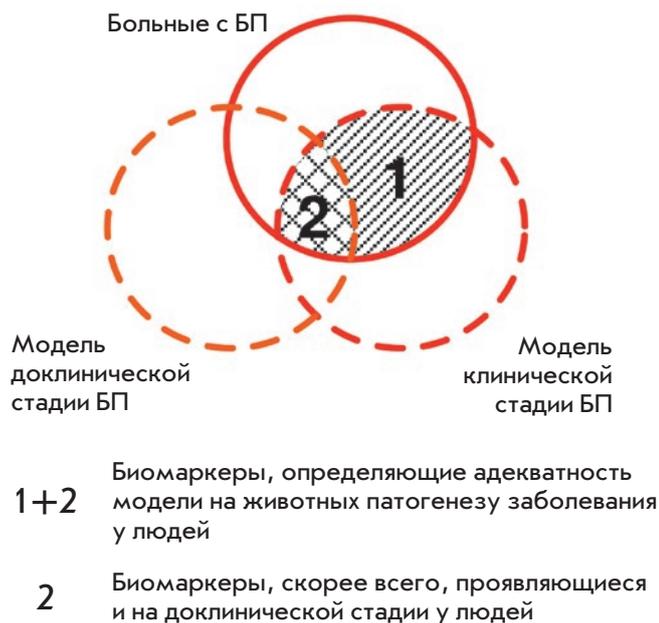


Рис. 2. Схема методологии проверки биомаркеров

Изменения концентрации катехоламинов в слезной жидкости больных БП потенциально могли бы использоваться для разработки ранней диагностики. Тем не менее, всегда существует риск того, что биомаркеры, выявленные у больных на клинической стадии, отсутствуют на доклинической стадии. В связи с этим, особую ценность приобретает экспериментальное моделирование БП, поскольку с его помощью можно воспроизвести обе стадии заболевания [1, 10]. Так, согласно созданной нами общей методологии, совпадение биомаркеров, обнаруженных у больных

и у животных при моделировании клинической стадии БП, свидетельствует о корректном воспроизведении данных аспектов патогенеза этого заболевания (рис. 2). Некоторые из них можно считать биомаркерами доклинической стадии БП, если они выявляются и на модели доклинической стадии [9].

Важной особенностью БП является то, что для нее точно определен пороговый уровень нейродегенерации, после которого возникают двигательные симптомы: это гибель 50–60% тел дофаминергических нейронов в черной субстанции, потеря 70–80% аксонов дофаминергических нейронов в стриатуме и соответственно снижение уровня дофамина в стриатуме на 70–80% по сравнению с контролем [1].

Как следует из представленных результатов, через 2 недели после двукратного введения МФТП в дозе 8 мг/кг у мышей отсутствовали изменения в тесте «открытое поле», а уровень дофамина в стриатуме снизился на 65.6% (рис. 3). В свою очередь, у животных, получивших четыре инъекции по 10 мг/кг МФТП, показатель пройденного пути снизился почти в 2 раза, а уровень дофамина в стриатуме упал на 83.3% (рис. 3). Таким образом, воспроизведенные в данной работе модели доклинической и ранней клинической стадий БП у мышей полностью соответствуют описанным выше ключевым параметрам.

Концентрация норадреналина в слезной жидкости мышей на модели доклинической стадии БП имела тенденцию ($p < 0.15$) к повышению на 57.6% и на 111% – на модели клинической стадии БП по сравнению с контролем (рис. 4). Уровень адреналина и дофамина был ниже порога чувствительности метода, что скорее всего связано с малым объемом собранных проб (1–2 мкл). Существуют способы сти-

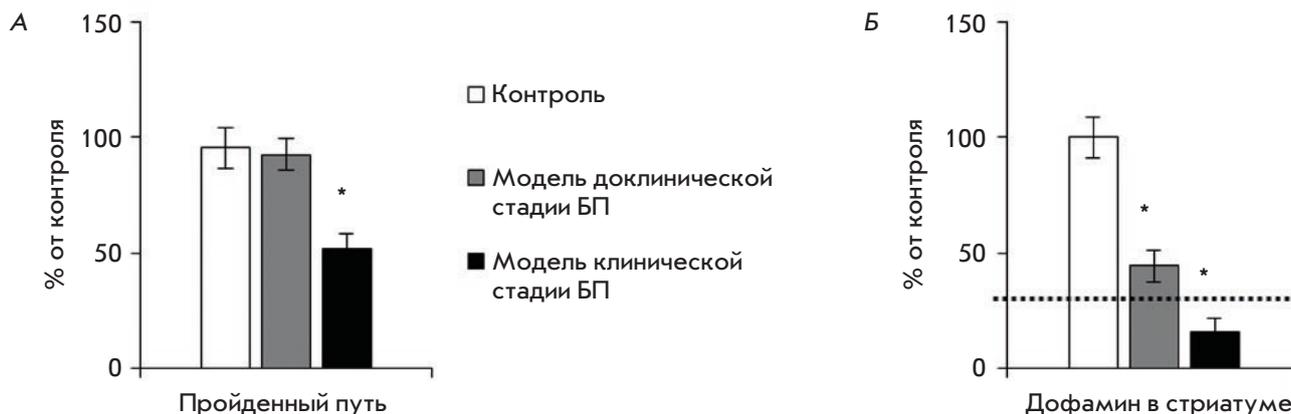


Рис. 3. Пройденный путь в тесте «открытое поле» (А) и концентрация дофамина в стриатуме (Б) у контрольных мышей и мышей при моделировании доклинической и клинической стадий БП. * $p < 0.05$ относительно контрольной группы, пунктир – порог проявления нарушений моторики

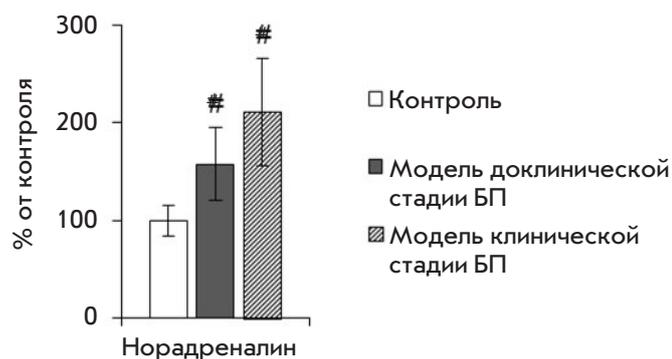


Рис. 4. Концентрация норадреналина в слезной жидкости контрольных мышей и мышей при моделировании доклинической и клинической стадий БП. # $p < 0.15$ относительно контрольной группы

мулировать слезотечение у животных с помощью холиномиметиков [14], однако известно, что состав слезной жидкости при стимуляции значительно меняется [15].

Сравнение изменений в содержании норадреналина, адреналина и дофамина в слезной жидкости больных с БП и у мышей при моделировании БП выявило во всех трех случаях повышение концентрации норадреналина в сравнении с контролем (табл. 2).

Таблица 2. Сравнительный анализ биомаркеров

Биомаркер	Больные с БП	Модели БП на мышах	
		клиническая стадия	доклиническая стадия
Норадреналин	↑	↑#	↑#
Адреналин	↓	н.о.	н.о.
Дофамин	↑#	н.о.	н.о.

Примечание. ↑, ↓ – увеличение и снижение концентрации биомаркера в слезе в сравнении с контролем, н.о. – не определялось, # – тенденция ($p < 0.15$).

Таким образом, у больных с БП и у мышей на моделях доклинической и клинической стадий БП обнаружено повышение концентрации норадреналина в слезной жидкости, которое можно рассматривать как перспективный биомаркер для ранней диагностики БП. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке программы Президиума РАН № 18 «Инновационные разработки в биомедицине» (проект № 0088-2019-0013).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Угрюмов М.В. // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2015. Т. 115. С. 4–14.
- Чеснокова Н.Б., Павленко Т.А., Угрюмов М.В. // Журн. неврологии и психиатрии им. С.С. Корсакова. 2017. Т. 117. С. 124–131.
- Diebold Y., Ríos J.D., Hodges R.R., Rawe I., Dartt D.A. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 2001. V. 42. P. 2270–2282.
- Goldstein D.S. // Compr. Physiol. 2013. V. 3. P. 1569–1610.
- Börger M., Funke S., Bähr M., Grus F., Lingor P. // Basal Ganglia. 2015. V. 5. P. 63–69.
- Çomoğlu S.S., Güven H., Acar M., Öztürk G., Koçer B. // Neurosci. Lett. 2013. V. 553. P. 65–67.
- Hamm-Alvarez S.F., Okamoto C.T., Janga S.R., Feigenbaum D., Edman M.C., Freire D., Shah M., Ghanshani R., Mack W.J., Lew M.F. // Biomark. Med. 2019. V. 13. P. 941–952.
- Boerger M., Funke S., Leha A., Roser A.E., Wuestemann A.K., Maass F., Bähr M., Grus F., Lingor P. // Parkinsonism Relat. Disord. 2019. V. 63. P. 3–9.
- Kim A., Nigmatullina R., Zalyalova Z., Soshnikova N., Krasnov A., Vorobyeva N., Georgieva S., Kudrin V., Narkevich V., Ugrumov M. // Mol. Neurobiol. 2019. V. 56. P. 3437–3450.
- Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A., Kucheryanu V.G., Bocharov E.V., Kryzhanovsky G.N., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Klodt P.M., Rayevsky K.S., Pronina T.S. // Neuroscience. 2011. V. 181. P. 175–188.
- Kim A.R., Pavlenko T.A., Katargina L.A., Chesnokova N.B., Ugrumov M.V. // Acta Naturae. 2018. V. 10. № 3 (38). P. 62–67.
- Djaldetti R., Ziv I., Melamed E. // Lancet Neurol. 2006. V. 5. P. 796–802.
- Goldstein D.S., Eisenhofer G., Kopin I.J. // J. Pharmacol. Exp. Ther. 2003. V. 305. P. 800–811.
- Karn R.C., Laukaitis C.M. // Proteomes. 2015. V. 3. P. 283–297.
- Stuchell R.N., Feldman J.J., Farris R.L., Mandel I.D. // Invest. Ophthalmol. Vis. Sci. 1984. V. 25. P. 374–377.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

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

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

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

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

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

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

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

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

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

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

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

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

- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не μM ; нм, но не nm).
- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только « \times ». Знак « \times » ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом « \cdot » обозначаются комплексы соединения в химических формулах, а также нековалентные комплексы (ДНК:РНК и т.п.).
- Используются только «кавычки», но не “кавычки”.
- В формулах используются буквы латинского и греческого алфавитов.
- Латинские названия родов и видов животного мира пишутся курсивом, таксонов более высокого ранга, а также названия вирусов и бактериофагов в латинской транскрипции – прямым шрифтом.
- Названия генов (кроме обозначения генов дрожжей) пишутся строчным курсивом, названия белков – прямым шрифтом.
- Названия нуклеотидов (А, Т, G, С, U), аминокислотных остатков (Arg, Ile, Val и т.д.) и фосфатов (АТФ, АМР и т.д.) пишутся в латинской транскрипции прямым шрифтом.
- Нумерация азотистых оснований и аминокислотных остатков пишется без дефиса (Т34, 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.

Ссылка 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.

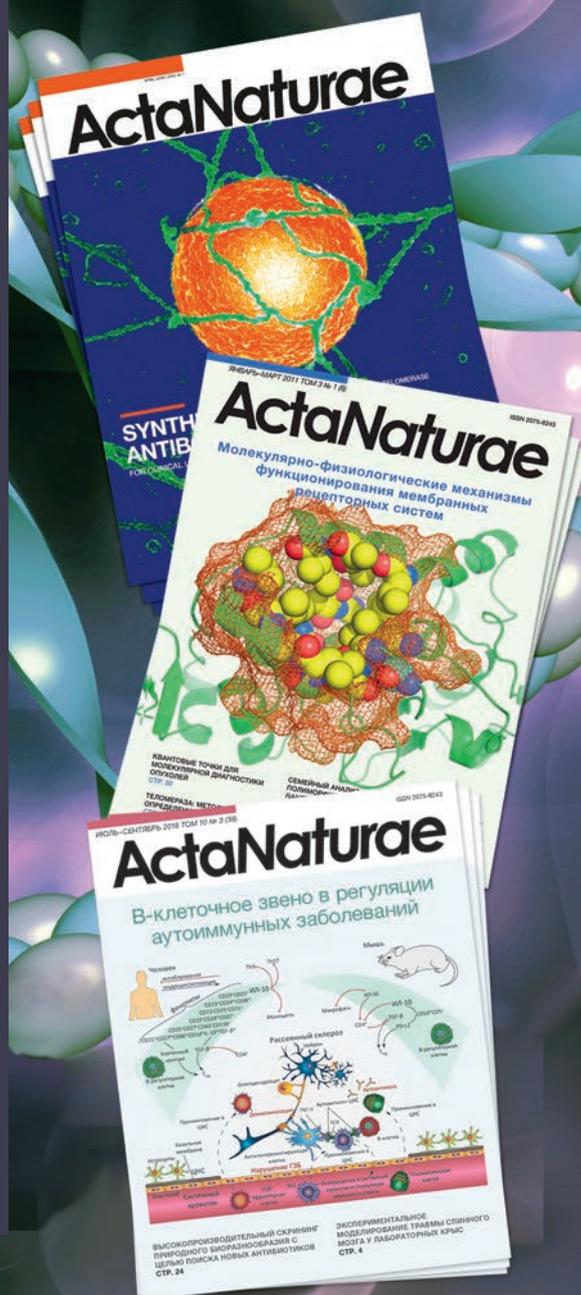
Ссылки на *патенты* должны содержать фамилии и инициалы авторов, вид патентного документа (авторское свидетельство или патент), номер, название страны, выдавшей документ, индекс международной классификации изобретений, год выдачи патента.

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

Acta Naturae

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

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



ИНФОРМАЦИЯ ДЛЯ АВТОРОВ:

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

