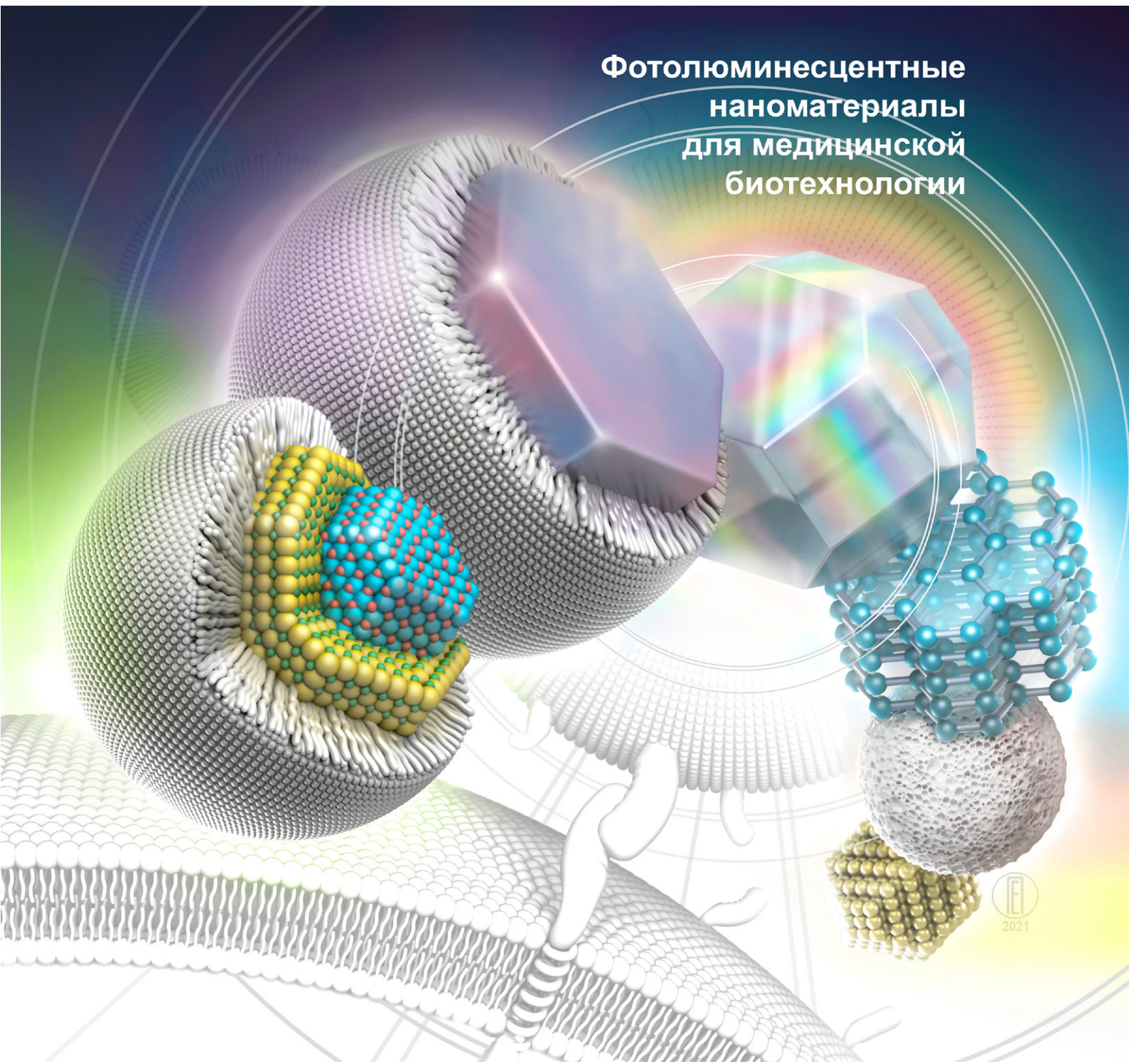


Acta Naturae

Фотолуминесцентные
наноматериалы
для медицинской
биотехнологии



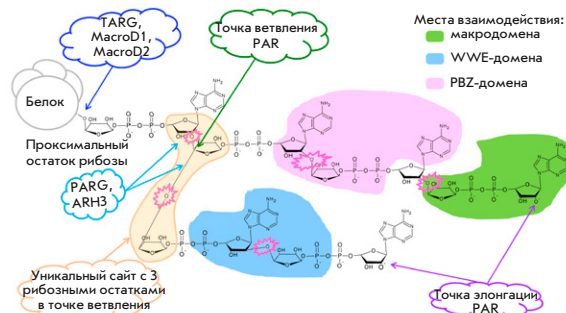
МЕХАНИЗМЫ КОНТРОЛЯ
КАЧЕСТВА БАКТЕРИАЛЬНОЙ
ТРАНСЛЯЦИИ
СТР. 32

НА РАСПУТЬЕ: МЕХАНИЗМЫ
АПОПТОЗА И АУТОФАГИИ В ЖИЗНИ
И СМЕРТИ КЛЕТКИ
СТР. 106

Функционирование кода поли(ADP-рибозил)ирования

Н. В. Малюченко, Д. О. Кошкина, А. В. Феофанов,
В. М. Студитский, М. П. Кирпичников

Поли(ADP-рибозил)ирование играет важнейшую роль в клеточном метаболизме, влияет на работу белков, вовлеченных в репарацию повреждений ДНК, регуляцию структуры хроматина, экспрессию генов, процессинг РНК, биогенез рибосом и трансляцию белка. В обзоре рассмотрено, каким образом молекулы поли-ADP-рибозы (PAR), состоящие из однотипных мономеров, могут избирательно участвовать в различных клеточных процессах, реализуя так называемый «PAR-код». Нарушение метаболизма PAR сопряжено с развитием патологических процессов, приводящих к опухолевым, сердечно-сосудистым и нейродегенеративным заболеваниям.

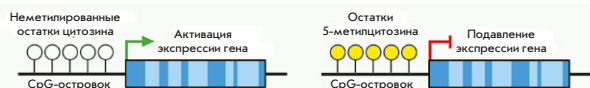


Структура PAR на поверхности белковой глобулы и сайты взаимодействия

Вовлечение эпигенетического механизма метилирования ДНК в развитие рассеянного склероза

И. С. Киселев, О. Г. Кулакова, А. Н. Бойко, О. О. Фаворова

Эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов – группа молекулярных механизмов в клетке, вызывающих изменения активности генов без изменений их нуклеотидной последовательности. В обзоре рассмотрены молекулярные механизмы, лежащие в основе процесса метилирования ДНК. Описаны факторы риска РС, которые могут влиять на уровень метилирования ДНК и тем самым модулировать экспрессию генов, вовлеченных в патогенез заболевания. Основное внимание уделено анализу данных о дифференциальном метилировании ДНК из различного биологического материала больных РС, полученных с использованием кандидатного подхода и высокопроизводительных методов.

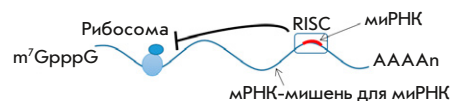


Метилирование остатков цитозина в составе CpG-островка, расположенного в промоторной области гена

микроРНК при миелодиспластическом синдроме

Ю. А. Веряскина, С. Е. Титов, И. Б. Ковынев, С. С. Федорова, Т. И. Пospelova, И. Ф. Жимулёв

Миелодиспластические синдромы (МДС), представляющие собой группу гематологических нарушений с неэффективной дифференцировкой гемопоэтических предшественников, дисплазией костного мозга, генетической нестабильностью и повышенным риском развития острого миелоидного лейкоза, занимают особое место среди онкологических заболеваний крови. Обзор посвящен роли микроРНК в регуляции гемопоэза и патогенезе МДС. Приведены данные о взаимосвязи уровней экспрессии микроРНК с прогнозом общей выживаемости и ответа на проводимую терапию.

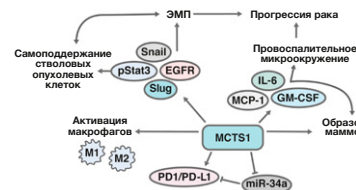


Механизм подавления трансляции мРНК гена-мишени миРНК при помощи комплекса RISC, включающего зрелую миРНК

Роль белков MCTS1 и DENR в регуляции механизмов, ассоциированных с злокачественным перерождением клеток

Е. Ю. Широкова, В. С. Прасолов, П. В. Спирин

Белки MCTS1 и DENR участвуют в реинициации трансляции. Считается, что повышенная экспрессия MCTS1 и DENR сопряжена с развитием ряда злокачественных заболеваний. В обзоре рассмотрены данные об этих белках с целью определения возможности их применения как потенциальных прогностических и терапевтических мишеней при борьбе со злокачественными заболеваниями.



Схема, иллюстрирующая вклад MCTS1 в эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), реализацию механизма ухода опухолевых клеток от иммунного надзора и активацию провоспалительных факторов клетками опухоли

Acta Naturae

ТОМ 13, № 2 (49), АПРЕЛЬ—ИЮНЬ 2021
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. Габибов, С.Н. Кочетков

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

Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре

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

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

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, 2021

Номер подписан в печать 29 июня 2021 г.
Тираж 100 экз. Цена свободная.
Отпечатано в типографии: НИУ ВШЭ,
г. Москва, Измайловское шоссе, 44, стр. 2

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: 1.845

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Ю. А. Веряскина, С. Е. Титов, И. Б. Ковынев,
С. С. Федорова, Т. И. Поспелова,
И. Ф. Жимулёв
микроРНК при миелодиспластическом
синдроме 4
- Е. Л. Гурьев, С. Шанвар, А. В. Звягин,
С. М. Деев, И. В. Балалаева
Фотолюминесцентные наноматериалы
для медицинской биотехнологии. 16
- А. С. Зареченская, П. В. Сергиев,
И. А. Остерман
Механизмы контроля качества
бактериальной трансляции 32
- И. С. Киселев, О. Г. Кулакова, А. Н. Бойко,
О. О. Фаворова
Вовлечение эпигенетического механизма
метилирования ДНК в развитие рассеянного
склероза 45
- Н. В. Малюченко, Д. О. Кошкина,
А. В. Феофанов, В. М. Студитский,
М. П. Кирпичников
Функционирование кода
поли(ADP-рибозил)ирования 58

К. А. Сенкевич, А. Э. Копытова, Т. С. Усенко,
А. К. Емельянов, С. Н. Пчелина

**Болезнь Паркинсона, ассоциированная
с мутациями в гене GBA: молекулярные
аспекты и возможные подходы к лечению . . . 70**

А. Ф. Халирахманов, К. Ф. Идрисова,
Р. Ф. Гайфуллина, С. В. Зинченко,
Р. И. Литвинов, А. З. Шарафеев,
А. П. Киясов, А. А. Ризванов

**Патогенез, диагностика и лечение
гемостатических нарушений
у пациентов с COVID-19 79**

Б. С. Шенкман, А. К. Цатурян,
И. М. Вихлянецв, И. Б. Козловская,
А. И. Григорьев

**Молекулярные механизмы изменения
мышечного тонуса в условиях космического
полета и при его моделировании 85**

Е. Ю. Широкова, В. С. Прасолов,
П. В. Спирин

**Роль белков MCTS1 и DENR в регуляции меха-
низмов, ассоциированных со злокачественным
перерождением клеток 98**

В. Л. Шляпина, С. В. Юртаева, М. П. Рубцова,
О. А. Донцова

**На распутье: механизмы апоптоза
и аутофагии в жизни и смерти клетки 106**

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Е. А. Глубокова, И. А. Ленева,
Н. П. Карташова, И. Н. Фалынскова,
Р. М. Тихов, Н. Ю. Кузнецов

**Исследование эффективности новых
ингибиторов вирусного канала
M2 (R)-6-(1-адамантил)-1,3-оксазинан-2-она
и (R)-6-(1-адамантил)-пиперидин-2,4-диона
в отношении штамма вируса гриппа
А/Калифорния/04/2009 на модели
гриппозной пневмонии мышей 116**

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

C. Crane-Robinson
Forces for Folding 126

Правила для авторов 129

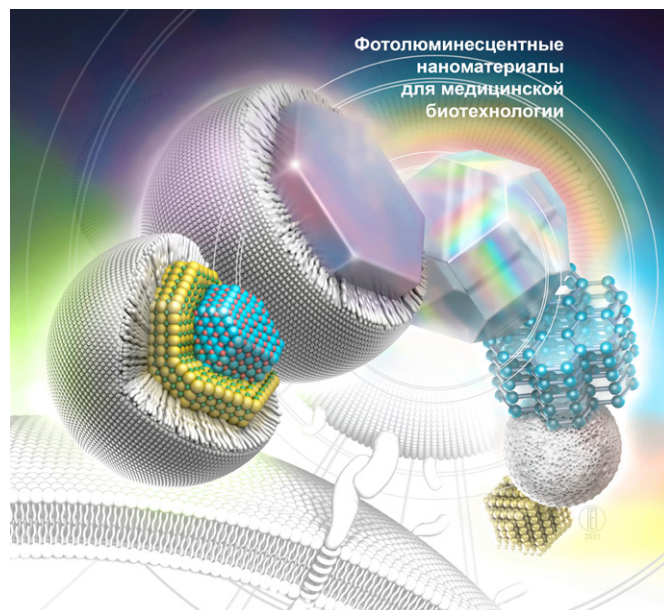


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью Гурьева и др.)

УДК 616.006

микроРНК при миелодиспластическом синдроме

Ю. А. Веряскина^{1,2*}, С. Е. Титов^{2,3}, И. Б. Ковынев⁴, С. С. Федорова⁴, Т. И. Поспелова⁴, И. Ф. Жимулёв²

¹Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090, Россия

²Институт молекулярной и клеточной биологии СО РАН, Новосибирск, 630090, Россия

³АО «Вектор-Бест», Новосибирск, 630117, Россия

⁴Новосибирский государственный медицинский университет МЗ РФ, Новосибирск, 630091, Россия

*E-mail: microrna@inbox.ru

Поступила в редакцию 21.09.2020

Принята к печати 15.12.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11209

РЕФЕРАТ Миелодиспластические синдромы (МДС), представляющие собой группу гематологических нарушений с неэффективной дифференцировкой гемопоэтических предшественников, дисплазией костного мозга, генетической нестабильностью и повышенным риском развития острого миелоидного лейкоза, занимают особое место среди онкологических заболеваний крови. В развитии МДС участвуют как генетические, так и эпигенетические факторы, включая микроРНК – короткие некодирующие РНК, которые являются важными регуляторами нормального гемопоэза. Нарушение экспрессии микроРНК может способствовать развитию гематологических опухолей. Для прогноза течения МДС используется международная система оценки, которая учитывает кариотип, количество бластных клеток и степень дефицита различных клеток крови. Однако общая выживаемость и эффективность проводимой терапии не всегда соответствуют прогнозу. Поиск новых биомаркеров с последующей их интеграцией в прогностическую систему позволит максимально персонализировать проводимую терапию. Нами представлен полный обзор о роли микроРНК в регуляции гемопоэза и патогенезе МДС. Также приведены данные о взаимосвязи уровней экспрессии микроРНК с прогнозом общей выживаемости и ответа на проводимую терапию.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА миелодиспластический синдром, микроРНК, острый миелоидный лейкоз.

ВВЕДЕНИЕ

микроРНК (миРНК, miR) – короткие некодирующие РНК, которые регулируют экспрессию генов на пост-транскрипционной стадии. На сегодняшний день анонсировано более 2600 миРНК человека, каждая из которых способна регулировать сотни генов-мишеней [1]. миРНК играют ключевые регуляторные роли в различных биологических процессах, включая пролиферацию, дифференцировку клеток, контроль клеточного цикла, апоптоз, ангиогенез [2–5]. Кроме того, в патогенезе опухолей различного генеза, включая гематологические, миРНК могут действовать либо как онкогены, либо как опухолевые супрессоры [6, 7]. миРНК участвуют в регуляции дифференцировки и развития гемопоэтических стволовых клеток (ГСК), поэтому очевидно, что изменения уровней их экспрессии могут способствовать развитию миелоидных и лимфоидных новообразований [8].

Миелодиспластические синдромы (МДС) представляют собой гетерогенную группу нарушений

ГСК, характеризующихся дефицитом одного или нескольких типов клеток крови из-за неэффективного гемопоэза, а также дисплазией клеток костного мозга [9]. Эпидемиологические данные по уровню заболеваемости МДС в России отсутствуют, но по данным программы SEER (Surveillance, Epidemiology, and End Results) США за 2012–2017 годы МДС выявлен у 28032 человек, причем преимущественно у лиц старше 70 лет [10]. МДС также имеет повышенный риск трансформации в острый миелоидный лейкоз (ОМЛ) [11]. Механизмы возникновения и развития МДС до конца не изучены, а современные методы лечения и диагностики недостаточно эффективны из-за неоднородности этого заболевания [12].

Поскольку сведения о роли миРНК в развитии и прогнозе МДС фрагментарны, то данный обзор сфокусирован на обсуждении роли миРНК в нормальном гемопоэзе, а также на комплексном анализе вариаций уровней их экспрессии при развитии МДС, в том числе и при измененном кариотипе. Особое

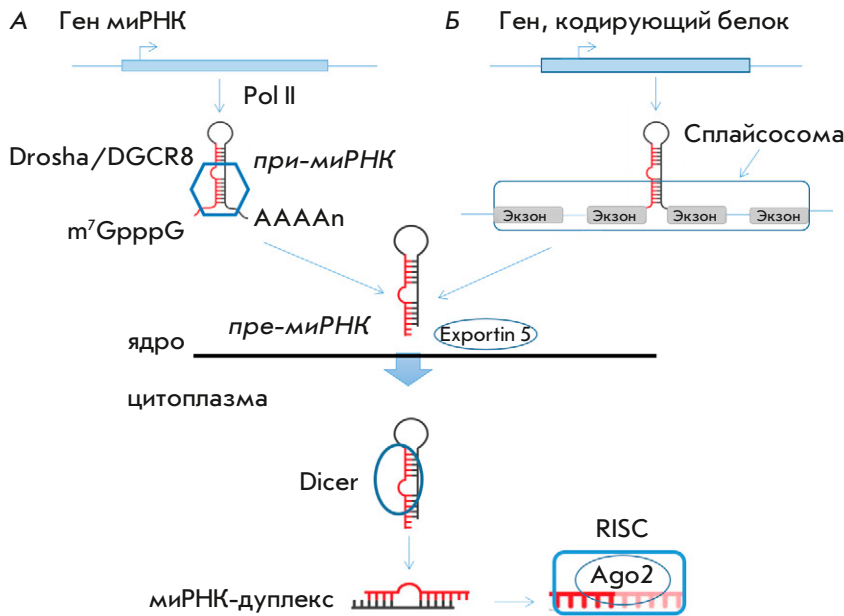


Рис. 1. Процессинг миРНК. А – канонический путь процессинга миРНК. миРНК транскрибируются с помощью РНК-полимеразы II для получения первичного транскрипта («при-миРНК»). «При-миРНК» расщепляется микропроцессором, который включает в ферменты Drosha и DGCR8, образуя предшественник миРНК («пре-миРНК»). Пре-миРНК экспортируется из ядра в цитоплазму с помощью белка Exportin 5. Фермент Dicer расщепляет петлю, и одна нить миРНК-дуплекса связывается с белком Ago2 с образованием РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC). Б – один из вариантов неканонического пути процессинга миРНК (Drosha-независимый). В ходе сплайсинга образуются короткие интронные шпильки, которые служат субстратом для дальнейшего процессинга миРНК

внимание уделено использованию миРНК в качестве перспективных прогностических маркеров развития МДС и оценки эффективности ответа на проводимую терапию.

БИОГЕНЕЗ микроРНК

Открытие малой некодирующей РНК *lin-4* у *Caenorhabditis elegans* в 1993 году послужило фундаментом для нового направления научных исследований. Основной находкой данного открытия стала способность миРНК *lin-4* негативно регулировать экспрессию гена *lin-14* на посттранскрипционном уровне путем комплементарного связывания уникальной короткой последовательности миРНК *lin-4* (область seed) и 3'-нетранслируемой области (3'-UTR) мРНК гена *lin-14* [13, 14]. На сегодняшний день по данным ресурса PubMed опубликовано порядка 100000 статей, содержащих результаты исследования миРНК. Часть генов миРНК располагается в интронах и, в редких случаях, в экзонах белоккодирующих генов, но большая часть находится в межгенных областях и регулируется собственными промоторами. Промоторы миРНК подобны промоторам белоккодирующих генов, однако транскрипт подвергается более сложному процессингу [15].

Зрелая миРНК состоит из 18–24 нуклеотидов, которая формируется путем многоступенчатого процесса с участием многочисленных ферментов: ДНК → первичные «при-миРНК» → предшественники «пре-миРНК» → зрелые миРНК. Процессинг миРНК может проходить по каноническому и неканоническому пути (рис. 1). Канонический путь процессинга миРНК встречается чаще, чем неканонический. При каноническом варианте при по-

мощи РНК-полимеразы II (Pol II) транскрибируется «при-миРНК» с последующим преобразованием в «пре-миРНК» комплексом, состоящим из DGCR8 и Drosha. Затем шпильчатая РНК длиной примерно 70 нуклеотидов («пре-миРНК») экспортируется в цитоплазму при помощи комплекса, в который входят белки Exportin 5/RanGTP. Далее эндонуклеаза Dicer удаляет концевую петлю, что приводит к формированию зрелого дуплекса миРНК. Поскольку различные ткани могут содержать альтернативные цепи миРНК, то для обозначения функциональной цепи зрелым миРНК часто присваивается суффикс «5р» или «3р». Как правило, нить с более низкой 5'-стабильностью или 5'-урацилом считается направляющей, далее она попадает в состав комплекса RISC (РНК-индуцируемый комплекс сайленсинга), непосредственно участвующего в регуляции генов-мишеней, а оставшаяся «пассажирская цепь» удаляется (рис. 2). Экспрессия гена-мишени подавляется путем расщепления мРНК на 10–11 нуклеотидов выше 5'-конца направляющей цепи. Это опосредуется активностью белка Ago2, одного из основных компонентов комплекса RISC [16].

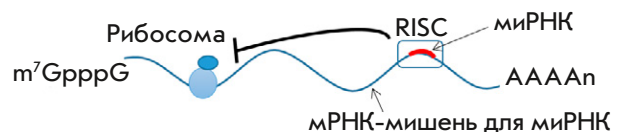


Рис. 2. Механизм подавления трансляции мРНК гена-мишени миРНК при помощи комплекса RISC, включающего зрелую миРНК. Комплекс RISC препятствует продвижению рибосомы по мРНК, блокируя трансляцию

Помимо этого, существуют неканонические пути биогенеза миРНК. В этих путях задействованы различные комбинации белков, участвующих в каноническом пути; в основном они различаются наличием/отсутствием ферментов Drosha и Dicer [17]. Drosha/DGCR8-независимые пути могут генерировать пре-миРНК-подобные шпильки, которые служат субстратами для фермента Dicer. Так, в ходе сплайсинга образуются «миртроны» – короткие интронные шпильки. Таким образом, сплайсинг может выступать в качестве альтернативы ферменту Drosha. Образование шпилек такого рода возможно в качестве побочного продукта процессинга других РНК, к примеру, тРНК. Dicer-независимые пути – это весьма редкие частные случаи процессинга определенных миРНК. В частности, процессинг миРНК-451, занимающей важное место в кроветворении, протекает по такому неканоническому пути. При-миR-451 обрабатывается комплексом ферментов Drosha/DGCR8, и полученная пре-miR-451 напрямую связывается с белком Ago2 – основным компонентом комплекса RISC [18]. Процессинг миРНК с использованием некоторых неканонических путей встречается относительно редко, поэтому в данном обзоре мы не будем их рассматривать детально.

В большинстве случаев миРНК взаимодействуют с 3'-UTR мРНК генов-мишеней, однако, опубликованы данные о взаимодействии миРНК с другими областями, включая 5'-UTR, кодирующую последовательность и промоторы генов [16]. Зрелые миРНК в большинстве случаев взаимодействуют с мРНК-мишенью за счет полного либо частичного комплементарного связывания seed-области миРНК с 3'-UTR мРНК-мишени. Стоит отметить, что возможность неполной комплементарности связывания обуславливает наличие у одной миРНК множество генов-мишеней [19]. Степень комплементарности определяет, происходит ли Ago2-зависимое расщепление мРНК-мишени или ингибирование трансляции [16]. На сегодняшний момент доступен ряд ресурсов (miRTarBase, TargetScan, mirDB, miRWalk, miRanda), позволяющих прогнозировать гены-мишени миРНК и тем самым идентифицировать миРНК, максимально специфичные для исследуемых заболеваний. Однако для понимания роли миРНК в механизмах инициации и развития заболеваний крови необходимы комплексные знания о функциях миРНК в поддержании нормального гемопоэза.

миРНК В НОРМАЛЬНОМ ГЕМОПОЭЗЕ

Гемопоэз – процесс образования клеток крови, который начинается в раннем эмбриональном периоде и представляет собой каскад делений и дифферен-

цировки мультипотентной гемопоэтической стволовой клетки (ГСК) [20]. Стволовые клетки подвергаются симметричному и асимметричному делению, за счет этого поддерживается пул стволовых клеток, а также образуются дифференцированные клетки. Симметричное деление предполагает образование двух идентичных клеток, а асимметричное – одной исходной и одной дифференцированной, способной проходить путь от мультипотентного предшественника до зрелой клетки крови. Мультипотентные предшественники (МПП) дают начало общему лимфоидному предшественнику (ОЛП) и общему миелоидному предшественнику (ОМП). МДС представляют собой группу заболеваний гемопоэтических стволовых клеток, характеризующихся мультилинейной дисплазией в миелокариоцитах и неэффективным гемопоэзом. Нарушения развития клеток миелоидной линии лежат в основе патогенеза МДС [21].

В поддержании нормального гемопоэза участвуют как генетические, так и эпигенетические механизмы регуляции, включая миРНК (рис. 3). Chen и соавт. опубликовали одну из первых работ, описывающих роль миРНК в контроле дифференцировки гемопоэтических линий клеток млекопитающих [22]. миРНК, как показано в многочисленных исследованиях, участвуют в регуляции всех ветвей иерархического дерева развития клеток крови [23, 24]. Особо стоит отметить, что мутации гена *Dicer*, продукт которого является ключевым участником процессинга миРНК, влияют на нормальный гемопоэз, подчеркивая важную роль миРНК-регуляции в нем [25, 26]. Баланс между самообновлением и дифференцировкой стволовых клеток также контролируется посредством миРНК. Выделяют 33 миРНК, специфичных для гемопоэза, в частности miR-17, -24, -146, -155, -128 и miR-181, которые блокируют дифференцировку ГСК в более зрелые клетки крови [27]. miR-22 также участвует в контроле самообновления ГСК [28]. В обзорной статье Gupta и соавт. акцент сделан на повышении уровней экспрессии miR-146a, -10a, -29a, -126, -17 и miR-181 в ГСК, и на их функции, которая заключается в поддержании фенотипа ГСК и регуляции перехода МПП в ОМП или ОЛП [8]. На клетках мышцы установлено, что miR-125a, -99, -130a и miR-33 участвуют в контроле самообновления ГСК [26, 29–31].

Диагноз МДС основан на выявлении диспластических изменений одного или нескольких ростков гемопоэза. Морфологические изменения клеток эритро-, гранулоцито- и мегакариопоэза в костном мозге и крови очень разнообразны, а соотношение нормальных и диспластических элементов у разных больных существенно варьирует. Клеточная линия считается измененной, если число диспластических

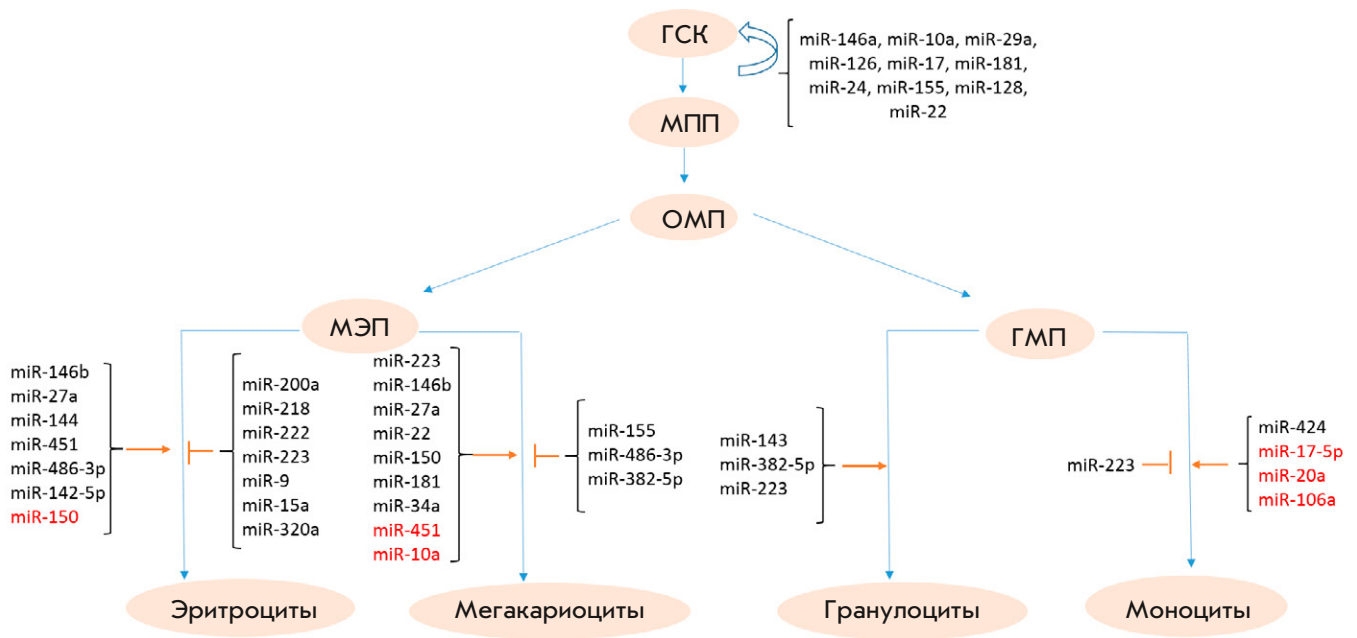


Рис. 3. Схема миелопоэза с указанием списка miRNA (miR), участвующих в регуляции разных этапов нормального гемопоэза. Черным приведены названия miRNA, уровень экспрессии которых повышен, а красным – понижен, в процессе регуляции гемопоэза (ГСК – гемопозитические стволовые клетки, МПП – мультипотентный предшественник, ОМП – общий миелоидный предшественник, МЭП – мегакариоцит-эритроидный предшественник, ГМП – предшественник гранулоцитов и макрофагов)

элементов в ней более 10%. Далее рассмотрим роль miRNA в развитии каждой линии кроветворения более подробно.

Эритропоэз – процесс дифференцировки ОМП в общий предшественник мегакариоцитов и эритроцитов (МЭП) с последующим образованием эритроцитов. Дисплазия эритроцитов выражается в изменении их формы, в частности, возникающей вследствие нарушения цитоскелета. МДС часто сопровождается анемией. Анализ опубликованных данных показал, что miRNA контролируют каждый шаг в процессах кроветворения. Одни miRNA способствуют дифференцировке предшественников в зрелые клетки крови, а другие блокируют эти процессы, воздействуя на гены-мишени, вовлеченные в гемопоэз (рис. 4).

В частности, повышенные уровни экспрессии miR-200a, -218, -222, -223, -9, -15a, -320a блокируют, а miR-27a, -451, -144, -486-3p, -146b способствуют эритропоэзу [32–46]. Кроме того, пониженный уровень экспрессии miR-150 способствует эритропоэзу [39]. Показано, что уровни экспрессии miR-142-3p, miR-142-5p, miR-146a и miR-451 динамически изменяются во время дифференцировки эритроидной линии [40]. Интересно и то, что высокая гипоксическая среда значительно увеличивает количество эритроцитов, а также влияет на профили miRNA эритроцитов человека. Особо отмечается значительное увеличение уровней экспрессии miR-144-5p и miR-30b-5p [47].

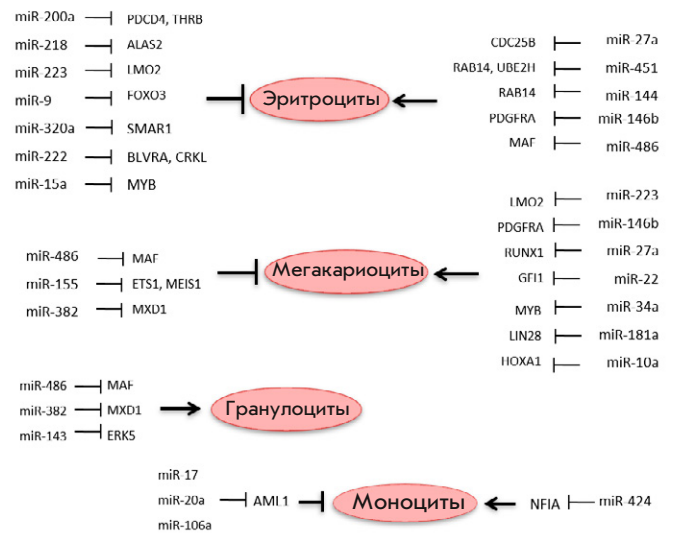


Рис. 4. miRNA и их гены-мишени, участвующие в регуляции гемопоэза

Мегакариопоэз представляет собой многоэтапный процесс, финальным этапом которого является образование тромбоцитов [48]. Как уже отмечено, miR-451 способствует эритропоэзу, однако уровень экспрессии miR-451 понижен в процессе дифференцировки мегакариоцитов, что указывает на решающую роль данной miRNA на стадии дифференцировки обще-

го предшественника эритроцитов и мегакариоцитов [49]. Аналогичным образом действует miR-150, повышенный уровень экспрессии которой способствует мегакариопоэзу, а пониженный эритропоэзу [50]. Анализ опубликованных данных показал, что повышение уровня экспрессии miR-223, -27a, -22, -146b, -34a, -181a способствует дифференцировке мегакариоцитов, тогда как повышенный уровень экспрессии miR-155, -486-3p, -382-5p ингибирует дифференцировку мегакариоцитов [35, 46, 51–56]. Кроме того, экспрессия miR-10a подавляется во время дифференцировки мегакариоцитов [57].

Гранулоциты и моноциты формируются в результате последовательных этапов дифференцировки, начиная с ОМП. Отмечено, что miR-486-3p способствует дифференцировке гранулоцитов при подавлении дифференцировки моно-макрофагов [45]. Повышенный уровень экспрессии miR-223 способствует гранулопоэзу и блокирует моноцитарно-макрофагальную дифференцировку [37]. Кроме того, уровни экспрессии miR-143 и miR-382-5p повышены в ходе гранулоцитарной дифференцировки [56, 58]. В ходе дифференцировки моноцитов наблюдается повышение уровня экспрессии miR-424 и снижение уровня miR-17-5p, -20a и miR-106a [59–61]. Сформирован профиль миРНК зрелых моноцитов и гранулоцитов, выделенных из пуповинной крови, и идентифицированы 46 миРНК, уровни экспрессии которых изменялись в обоих типах клеток относительно ОМП. Отмечено снижение уровней экспрессии miR-125b и miR-10a в зрелых клетках – в 10 и 100 раз соответственно [62].

миРНК ПРИ МДС

миРНК вовлечены в регуляцию нормального гемопоэза, поэтому не удивительно, что изменение уровня их экспрессии может способствовать развитию гематологических неоплазий. За последние 10 лет опубликованы результаты ряда масштабных исследований профиля экспрессии миРНК при МДС (табл. 1) [63–83]. Результаты, полученные в этих исследованиях, совпадают лишь частично, что, безусловно, связано с типом и качеством образцов, методами анализа, а также способами статистической обработки данных.

Установлено, что при МДС подавлена экспрессия гена *DICER1*, ключевого участника канонического пути процессинга миРНК [71]. Отмечается, что повышение уровня экспрессии miR-205-5p способствует развитию МДС за счет подавления *PTEN*, т.е., в кроветворных клетках эта миРНК действует как онкоген. Кроме того, повышение уровня экспрессии miR-205-5p не было связано с понижением общей выживаемости или прогнозом определен-

ной группы МДС. Это указывает на участие miR-205-5p в инициации, но не в прогрессии МДС [82]. Предполагается, что увеличение уровней экспрессии miR-10a/b связано с расширением пула миелобластов [79].

миРНК, детектируемые в крови, относятся к группе «циркулирующих миРНК». Стоит отметить, что миРНК анализируют не только в крови, но и в особых структурных элементах – экзосомах. Экзосомы, связанные с раком, представляют собой наноразмерные мембранные пузырьки (внеклеточные везикулы), которые играют важную роль в микроокружении опухоли. Отмечается, что опухолевые клетки выделяют значительно больше экзосом в микроокружение опухоли, чем нормальные клетки, что приводит к повышению уровня экзосом в кровеносной системе. Ген, способствующий росту опухоли, может транспортироваться экзосомами и способствовать метастазированию. В частности, миРНК, находящиеся в экзосомах, могут участвовать в онкогенезе [84]. Проведен уникальный сравнительный анализ уровней экспрессии миРНК в плазме крови и миРНК, инкапсулированных в везикулы. Обнаружено значительное снижение уровней экспрессии miR-103a-3p, -103b, -107, -221-3p, -221-5p и miR-130b-5p в плазме пациентов с МДС более поздних стадий. В свою очередь, уровни экспрессии miR-127-3p, -154-5p, -323b-3p, -382-3p, -409-5p и miR-485-3p, кластеризованных в хромосомной области 14q32, повышены на ранних стадиях МДС. По-видимому, определенный профиль экспрессии миРНК в плазме и фракции везикул можно рассматривать как два разных биомаркера МДС [83].

миРНК И ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ МДС

Неоднократно показано, что изменение кариотипа коррелирует с уникальным профилем экспрессии миРНК (табл. 2).

Максимально полно результаты изучения корреляций между уровнями экспрессии миРНК и кариотипом пациентов с МДС рассмотрены в обзоре [85]. Для МДС характерны несбалансированные хромосомные аномалии, из которых наиболее распространены del(5q), моносомия хромосомы 7 или del(7q), трисомия хромосомы 8 и del(20q) [88]. Обнаружено значительное снижение уровня экспрессии miR-595 при МДС с -7/7q, а также при сложном кариотипе, включающем аномалии хромосомы 7 [86]. Выявлено снижение относительного уровня экспрессии miR-194-5p у пациентов с МДС и трисомией хромосомы 1 по сравнению с носителями нормального кариотипа [66]. Изучена роль miR-150 в развитии МДС с del(5q). Мишенью этой миРНК является транскрипционный фактор MYB, подавление которого способству-

Таблица 1. миРНК, дифференциально экспрессирующиеся при МДС

Исследуемый материал	миРНК с повышенным уровнем экспрессии	миРНК с пониженным уровнем экспрессии	Ссылка
КМ	miR-21, miR-720	miR-671-5p, miR-BART13	[63]
КМ/МНК	miR-17-3p, miR-17-5p, miR-21, miR-155, miR-18a, miR-126, miR-181a, miR-10a, miR-10b, miR-15a, miR-16, miR-222		[64]
ПК	miR-17-3p, miR-17-5p, miR-21, miR-18a, miR-15a, miR-142-3p		[64]
КМ	miR-299-3p, miR-299-5p, miR-323-3p, miR-329, miR-665, miR-370, miR-409-3p, miR-431, miR-432, miR-494, miR-654-5p	miR-196a, miR-423-5p, miR-525-5p, miR-507, miR-583, miR-940, miR-1284, miR-1305	[65]
КМ	miR-194-5p и miR-320a		[66]
КМ		miR-378	[67]
КМ		miR-93-5p	[68]
КМ/МНК		miR-124a, miR-155, miR-182, miR-200c, miR-342-5p, let-7a	[69]
КМ	miR-99a-5p		[70]
КМ	miR-4462	miR-30d-5p, miR-222-3p, miR-30a-3p	[71]
КМ	miR-661		[72]
КМ/МНК		miR-124	[73]
КМ/МНК	miR-636	miR-103, miR-140, miR-150, miR-342, miR-378, miR-483, miR-632	[74]
КМ	miR-21		[75]
КМ/МНК	miR-222, miR-10a, miR-196a, miR-320, miR-100	miR-124, miR-206, miR-26, miR-97, miR-875-5p, miR-146a, miR-150, let-7e	[76]
КМ	miR-550a-5p		[77]
КМ	miR-210 и miR-155		[78]
КМ	miR-10a и miR-10b		[79]
Плазма		miR-16 и let-7a	[80]
Плазма	miR-150-5p	miR-16-5p, miR-27a-3p, miR-199a-5p, miR-451a	[81]
КМ	miR-205-5p		[82]
Плазма/ везикулы	miR-10a-5p, miR-29a-3p, miR-34a-5p, miR-99b-5p, miR-125a-5p, miR-146b-5p, miR-150-3p/5p		[83]
Плазма	let-7a-3p, miR-21-3p, miR-221-3p, miR-221-3p/5p, miR-223-3p		[83]

Примечание. КМ – костный мозг, ПК – периферическая кровь, МНК – мононуклеарные клетки.

ет ингибированию пролиферации [89]. Внимание привлекает также участие миРНК в развитии МДС у пациентов с del(5q). Подчеркивается, что для МДС с данным кариотипом характерна aberrantная экспрессия более 20 миРНК, причем большинство из них локализованы вне удаляемой области 5q32 [90]. Анализ профиля экспрессии 13 миРНК, локализованных на 5q, выявил значительное снижение

уровней экспрессии miR-145 и miR-146a у пациентов с МДС и del(5q) по сравнению с контрольной группой и пациентами с диплоидным кариотипом [91]. Однако опубликованы данные, согласно которым уровни экспрессии miR-378 и miR-146a значительно снижены, а уровень miR-34a повышен при МДС с del(5q), тогда как уровни экспрессии miR-143 и miR-145 немного повышены [92].

Таблица 2. Дифференциальная экспрессия миРНК при МДС в зависимости от кариотипа

Тип хромосомно-го нарушения	миРНК с повышенным уровнем экспрессии	миРНК с пониженным уровнем экспрессии	Ссылка
del(5q)	miR-34a, miR-148a, miR-451, miR-486, miR-125a/b, miR-151, miR-199a, miR-10a/b, miR-29c, miR-130a, miR-24, miR-126, miR-335, miR-99b, miR-21, miR-17, miR-18a, miR-155	miR-128b, miR-95, miR-213, miR-520c, miR-146a, miR-449a, miR-300, miR-210, miR-193a-3p, miR-874, miR-589, miR-150, miR-143-3p, miR-378, miR-145	[85]
Моносомия 7/ del(7q)	miR-144, miR-451, miR-92a, miR-96, miR-340, miR-433, miR-105	miR-140-5p, miR-196b, miR-25, miR-590-3p, miR-511, miR-134	[85]
Трисомия 8	miR-511, miR-146b, miR-134, miR-410, miR-153, miR-433, miR-105, miR-383	miR-10b, miR-452, miR-152, miR-181b, miR-28, miR-92, miR-10a, miR-324-3p, let-7a, miR-497, miR-24, miR-196b, miR-19a, miR-181c, miR-20a, miR-130b, miR-99a, miR-100, miR-515-3p, miR-199a	[85]
del(20q)	miR-206, miR-296-5p, miR-34b, miR-323-5p, miR-499-5p, miR-493, miR-503, miR-632, miR-98, miR-769-5p	miR-144, miR-451, miR-92a	[85]
Моносомия 7/ del(7q)		miR-595	[86]
t (2; 11)(p21; q23)	miR-125b-1		[87]
Трисомия 1		miR-194-5p	[66]

Сбалансированные хромосомные изменения у пациентов с МДС встречаются редко. Одной из хромосомных транслокаций при МДС является t(2; 11)(p21; q23). Повышение уровня экспрессии miR-125b-1, находящейся вблизи точки разрыва хромосомы 11, подтверждает, что изменение профилей экспрессии миРНК ассоциировано с хрупкими сайтами генома [87].

Анализ уровней экспрессии миРНК, находящихся на хромосоме 8 (при трисомии по этой хромосоме), показал увеличение уровня экспрессии лишь одной из них – miR-383. Этот результат указывает на то, что увеличение плоидности не способствует повышению уровня большинства миРНК на этой хромосоме, подтверждая сложность опосредованных механизмов регуляции МДС при помощи миРНК [90].

Мутации – неотъемлемая часть генетических изменений, способствующих развитию МДС, в частности, мутации генов *SF3B1*, *SRSF2* и *U2AF1*, участвующих в сплайсинге, являются частым событием при МДС [88]. Показано, что уровни экспрессии let-7, miR-423 и miR-103a при МДС с мутациями в этих генах ниже, чем в образцах дикого типа, что предполагает существование сложных молекулярно-генетических каскадов при МДС [93]. Анализ связи между соматическими мутациями и уровнями циркулирующих миРНК при МДС показал, что мутации в гене *Dnmt3a* ассоциированы с изменениями уровней экспрессии около 30 миРНК в плазме и порядка 20 миРНК в везикулах, а в клетках с мутантным геном *SF3B1* дифференциально экспрессируются примерно 20 миРНК в плазме и 10 миРНК в везикулах, при этом лишь miR-100-5p и miR-450b-5 имеют оди-

наковую динамику изменения уровней экспрессии как в плазме, так и в везикулах [83].

МИКРОРНК И ТЕРАПИЯ ПРИ МДС

В последнее десятилетие наблюдается значительный прорыв в лечении МДС. Одобрены три гипометилирующие препараты: азацитидин, децитабин и леналидомид. Тем не менее добиться ответа на проводимую терапию удается не всегда [94]. Опубликовано множество работ, направленных на анализ корреляции экспрессии миРНК с ответом на терапию при МДС. Так, определение уровня экспрессии miR-21 может использоваться для прогноза ответа на гипометилирующие агенты: более высокая частота ответов на проводимую терапию отмечена у пациентов с низкими уровнями экспрессии miR-21 в сыворотке [95].

Уровень экспрессии miR-124 у пациентов с МДС был ниже, чем у здоровых доноров, но лечение низкими дозами гипометилирующего агента децитабина позволило повысить уровень экспрессии miR-124 у семи из 18 пациентов [73].

Анализ экспрессии миРНК в клетках костного мозга до и во время лечения гипометилирующим агентом азацитидином показал, что пациенты с повышенным уровнем экспрессии miR-17-3p и пониженными уровнями miR-100-5p и miR-133b значительно лучше отвечали на проводимую терапию. Важно отметить, что высокий уровень miR-100-5p в начале исследования был связан с более короткой общей выживаемостью. Кроме того, наблюдалось снижение уровней экспрессии miR-10b-5p, miR-15a-5p/b-5p, miR-24-3p и miR-148b-3p у пациентов, отвечающих на терапию

Таблица 3. миРНК, ассоциированные с прогрессированием заболевания

миРНК	Материал	Уровень экспрессии при МДС	Эффект	Ссылка
miR-422a, miR-617, miR-181a, miR-222, miR-210	КМ	Повышение	Прогрессирование заболевания	[85]
miR-196b-5p	КМ	Повышение	Риск трансформации в ОМЛ	[101]
miR-29b	КМ	Снижение	Риск трансформации в ОМЛ	[102]
miR-125a	КМ	Повышение	Снижение общей выживаемости	[103]
let-7a	КМ	Повышение	Снижение общей выживаемости	[85]
miR-194-5p	КМ	Снижение	Снижение общей выживаемости	[66]
miR-22	КМ	Повышение	Снижение общей выживаемости	[28, 104]
miR-661	КМ	Повышение	Снижение общей выживаемости	[72]
miR-126, miR-155	КМ	Повышение	Снижение общей выживаемости/ без прогрессирования	[69]
miR-124a	КМ	Повышение	Снижение общей выживаемости	[69]
miR-223-3p	Плазма	Снижение	Снижение общей выживаемости	[81]
miR-451	Плазма	Снижение	Снижение выживаемости без прогрессирования	[81]

Примечание. КМ – костный мозг.

[96]. Отмечено также, что анализ профилей экспрессии miR-423-5p, -126-3p, 151a-3p, -125a-5p и miR-199a-3p в плазме пациентов с МДС позволяет предсказать ответ на лечение азацитидином [83].

При МДС подтипа del(5q) применяют иммуномодулирующий и антиангиогенный препарат леналидомид. Анализ уровней экспрессии миРНК в клетках костного мозга, полученных от пациентов с МДС с del(5q) в ходе лечения леналидомидом, выявил дифференциальную экспрессию миРНК, картированных в 14q32 [97]. Остается решить, вызвано ли изменение профилей экспрессии миРНК действием леналидомида или просто уменьшением количества аномальных клонов. В другом исследовании обнаружено снижение уровней экспрессии miR-34a-3p и miR-34a-5p, а также повышение уровней miR-378-3p и miR-378-5p в моноцитах периферической крови при воздействии леналидомида по сравнению с уровнями экспрессии до проведения терапии [98]. Показано увеличение уровней экспрессии miR-143 и miR-145 при воздействии леналидомида, при этом отмечена их роль в чувствительности МДС к проводимой терапии [99]. Определение точного механизма действия леналидомида при МДС имеет важное значение для онкогематологии. Однако в настоящее время отсутствуют маркеры, позволяющие предсказать ответ на этот препарат. Предполагается, что миРНК можно рассматривать в качестве перспективных молекулярных предикторов ответа на леналидомид.

микрРНК И ПРОГНОЗ ПРИ МДС

Для прогноза течения МДС используется международная система оценки (IPSS-R – Revised

International Prognostic Scoring System), которая делит пациентов на пять подгрупп риска, учитывает кариотип, количество бластных клеток и степень дефицита различных клеток крови. В частности, эта прогностическая система позволяет оценить общую выживаемость и риск трансформации в ОМЛ у пациентов с МДС [100]. Однако эта система не полностью отражает генетическую сложность этого заболевания. Помимо признанных предикторов, в качестве потенциальных прогностических маркеров МДС рассматриваются миРНК. МДС считается заболеванием, которое предшествует лейкозу: примерно в 30% случаев МДС в конечном итоге переходит в ОМЛ [11]. Анализ опубликованных данных указывает на существование различий в профилях экспрессии миРНК на ранней и поздней стадиях МДС, что подтверждает участие миРНК в патогенезе МДС и, как следствие, в трансформации МДС в ОМЛ (табл. 3).

Kuang и соавт. опубликовали обзор данных о корреляции уровней экспрессии миРНК со степенью прогрессии заболевания. В частности, повышенные уровни miR-422a, -617, -181a, -222 и miR-210 связаны с прогрессией заболевания, а повышенные уровни miR-17-5p, miR-20a и miR-34a ассоциированы с МДС низкого риска [85]. В дальнейшем представления о вкладе миРНК в развитие МДС были расширены. Так, установлено, что уровень экспрессии miR-196b-5p повышен в группах более высокого риска, а также у пациентов с ОМЛ, который развился на фоне МДС. Это позволяет рассматривать miR-196b-5p в качестве биомаркера, связанного с риском трансформации МДС в лейкоз [101]. Кроме того, показа-

но, что снижение уровня экспрессии miR-29b также способствует трансформации МДС в ОМЛ [102]. Показано, что в группах с прогнозируемым высоким риском уровни экспрессии miR-21, -146b-5p, -126 и miR-155 были значительно выше, чем при низком риске в соответствии с системой прогноза IPSS. Более того, высокие уровни экспрессии miR-126 и miR-155 коррелировали со значительно меньшей общей выживаемостью и выживаемостью без трансформации в лейкоз, предполагая, что эти miРНК могут быть связаны с прогрессированием МДС и его трансформацией в ОМЛ [69]. Обнаружено, что уровень экспрессии miR-595 снижен при МДС высокого риска, однако подчеркивается, что полученные данные требуют подтверждения на большой выборке. Кроме того, прямой мишенью miR-595 является ген *RPL27A*, подавление экспрессии которого нарушает эритропоэз [86]. Отмечается, что miR-125a также способствует нарушению эритропоэза, уровень ее экспрессии повышен при МДС и отрицательно коррелирует с общей выживаемостью пациентов [103].

В ряде работ обнаружены корреляции между уровнями экспрессии miРНК и прогнозом выживаемости пациентов при МДС. В частности, пониженные уровни экспрессии miR-181 и miR-21 коррелируют с более длительным общим выживанием, а повышенные уровни экспрессии *let-7a* коррелируют с меньшей выживаемостью пациентов [85]. Кроме того, низкий уровень экспрессии miR-194-5p коррелирует со снижением общей выживаемости пациентов при МДС [66].

Возможность использования для анализа не только клеток КМ, но и крови пациентов позволяет рассматривать miРНК в качестве доступных маркеров развития и прогноза заболевания. Анализ циркулирующих miРНК в плазме пациентов с МДС показал, что уровни экспрессии miR-27a-3p, -150-5p, -199a-5p, -223-3p и miR-451a были снижены при МДС более высокого риска. Кроме того, низкий уровень экспрессии miR-451 ассоциирован со снижением выживаемости без прогрессии МДС, а низкий уровень miR-223-3p – со значительным снижением общей выживаемости пациентов [81]. Представлена диагностическая панель, включающая miR-144, -16, -25, -451, -651, -655 и *let-7a*, которая позволяет разделять пациентов с нормальным кариотипом в зависимости от прогноза выживаемости [105].

Помимо МДС *de novo* в клинической практике встречаются случаи вторичного МДС на фоне предшествующей цитостатической терапии, которые содержат ряд генетических изменений, общих с первичными МДС. Однако стоит отметить, что международная прогностическая система IPSS-R ориентирована только на первичные МДС. Вторичные

МДС неоднородны и требуют такой же тщательной дифференциации в отношении риска, как и первичные, поэтому поиск прогностических маркеров для вторичных МДС наряду с МДС *de novo* представляет актуальную задачу онкогематологии [88]. Опубликованы единичные результаты анализа уровней экспрессии miРНК при вторичном МДС. В частности, уровень экспрессии miR-99a-5p в группах МДС высокого риска и при вторичном МДС на фоне предшествующей терапии был выше, чем в группах низкого риска [70].

МУТАЦИИ В ГЕНАХ МИКРОРНК ПРИ МДС

Изменение уровней экспрессии miРНК и, как следствие, развитие неоплазий ассоциированы не только с мутациями белоккодирующих генов, но также непосредственно с мутациями самих генов miРНК. Так, в одном исследовании у семи пациентов с МДС выявлены мутации в генах miРНК. Все мутации были гетерозиготными и большинство из них локализовались в *seed*-области гена miR-142-3p. Наличие мутации в *seed*-области способствует образованию новых генов-мишеней, а также потери генов-мишеней, обычно специфичных для данной miРНК. Таким образом, можно сделать вывод, что мутации, затрагивающие *seed*-область, снижают специфичность к мишени, способствуя развитию лейкозов [106].

Подобно белоккодирующим генам, гены miРНК также регулируются посттранскрипционно, что можно рассматривать как еще один механизм регуляции уровней экспрессии miРНК. В частности, транскрипционный фактор TWIST-1 способствует увеличению экспрессии miR-10a/b, связываясь непосредственно с промоторами генов miR-10a/b, способствуя развитию МДС [79]. Другой пример – регуляция miR-34a транскрипционным фактором, кодируемым опухолевым геном-супрессором *p53*. Кроме того, уровень экспрессии miR-34a повышается на ранней стадии МДС [85].

Гиперметилирование промоторов генов miРНК также вносит вклад в патогенез и прогрессирование МДС. В частности, гиперметилирование промотора miR-34b, обнаруженное при МДС, произошло, вероятно, во время прогрессирования в ОМЛ [85]. Кроме того, гипометилирование промоторов *let-7a-3* и miR-124-3 коррелирует с низкой выживаемостью и плохим прогнозом при МДС [107, 108].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Молекулярно-генетические маркеры все чаще применяются для описания опухолей различного генеза, включая МДС [109–113]. Анализ как генетических, так и эпигенетических маркеров позволяет отличить МДС от других нарушений гемопоэза. Установлено,

что различные подтипы МДС имеют уникальные профили экспрессии миРНК. Тем не менее для понимания сложных механизмов, регулирующих взаимодействие миРНК с их генами-мишенями при МДС, необходимы дальнейшие исследования. В большинстве работ анализируют уровни экспрессии миРНК в КМ или периферической крови. Стоит отметить высокую стабильность миРНК, что делает доступным анализ материала КМ, фиксированного в парафиновых блоках или на предметных стеклах.

Необходимо признать, что в настоящее время нет универсальной прогностической шкалы, которая включает все значимые параметры МДС. Поэтому актуальной задачей клинической онкологии является поиск дополнительных молекулярно-генетических маркеров с возможностью интеграции в уже существующие международные прогностические системы. Одними из наиболее перспективных маркеров в данном контексте считаются миРНК. Полученные на сегодняшний день данные о роли миРНК при МДС указывают на потенциал миРНК в качестве инструмента для диагностики, прогноза выживаемости и терапевтического ответа пациентов при МДС.

Помимо диагностических и прогностических задач, одним из перспективных направлений, связанных с миРНК, является анализ использования миРНК для противоопухолевой терапии. В качестве потенциального средства против рака легкого наиболее хорошо изучена miR-mimics-34, инкапсулированная в липидные наночастицы. Кроме того, в нескольких доклинических исследованиях изучена стратегия, основанная на подавлении онко-миРНК с использованием антисмысловых олигонуклеотидов (anti-миРНК). Применение химически модифициро-

ванного ингибитора miR-21 при МДС способствует нормальному эритропоэзу и увеличению гематокрита [114].

В заключение хотелось бы отметить, что встречается также вторичный МДС, связанный с нарушениями морфологии клеток КМ и дисбалансом различных видов клеток крови, схожим с первичным МДС. Вторичный МДС может развиваться после цитостатической терапии, а также на фоне аутоиммунных заболеваний, солидных новообразований, некоторых инфекций и другой патологии, сопровождающейся реактивными нарушениями гемопоэза. Особый интерес представляет вторичный МДС, выявляемый при морфологическом исследовании костного мозга при злокачественных лимфомах еще до начала терапии. Важно, что у больных неходжкинскими злокачественными лимфомами с признаками дисплазии клеток эритроидного ряда анемия встречается почти в 2 раза чаще, чем у пациентов с нормальной морфологией клеток костного мозга, и в совокупности ассоциированы с высокими темпами опухолевой прогрессии, низкой трехлетней выживаемостью и резистентностью к проводимой терапии [115].

Таким образом, поиск дополнительных дифференциально-диагностических маркеров МДС *de novo* и вторичных поражений гемопоэза позволит максимально персонализировать проводимую терапию и оптимизировать прогностическую оценку течения заболевания. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-34-60024.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kozomara A., Birgaoanu M., Griffiths-Jones S. // Nucl. Acids Res. 2019. V. 8. № 47(D1). P. 155–162.
- Bueno M.J., Malumbres M. // Biochim. Biophys. Acta. 2011. V. 1812. № 5. P. 592–601.
- Pileczki V., Cojocneanu-Petric R., Maralani M., Neagoe I.B., Sandulescu R. // Clujul. Med. 2016. V. 89. № 1. P. 50–55.
- Landskroner-Eiger S., Moneke I., Sessa W.C. // Cold Spring Harb. Perspect. Med. 2013. V. 3. № 2. P. a006643.
- Hwang H.W., Mendell J.T. // Br. J. Cancer. 2006. V. 94. № 6. P. 776–780.
- Zhang B., Pan X., Cobb G.P., Anderson T.A. // Dev. Biol. 2007. V. 302. № 1. P. 1–12.
- Mardani R., Jafari Najaf Abadi M.H., Motieian M., Taghizadeh-Boroujeni S., Bayat A., Farsinezhad A., Gheibi Hayat S.M., Motieian M., Pourghadamyari H. // J. Cell. Physiol. 2019. V. 234. № 6. P. 8465–8486.
- Gupta R., Rahman K. Hematopathology. Singapore: Springer, 2019. P. 435–448.
- Montalban-Bravo G., Garcia-Manero G. // Am. J. Hematol. 2018. V. 93. № 1. P. 129–147.
- SEER Cancer Statistics Review, 1975–2013 / Eds Howlader N. et al. Bethesda, MD: National Cancer Institute, 2016. http://seer.cancer.gov/csr/1975_2013/
- Chen J., Kao Y.R., Sun D., Todorova T.I., Reynolds D., Narayanagari S.R., Montagna C., Will B., Verma A., Steidl U. // Nat. Med. 2019. V. 25. № 1. P. 103–110.
- Lindsley R.C. // Hematol. Am. Soc. Hematol. Educ. Program. 2017. V. 1. P. 447–452.
- Wightman B., Ha I., Ruvkun G. // Cell. 1993. V. 75. № 5. P. 855–862.
- Lee R.C., Feinbaum R.L., Ambros V. // Cell. 1993. V. 75. № 5. P. 843–854.
- Corcoran D.L., Pandit K.V., Gordon B., Bhattacharjee A., Kaminski N., Benos P.V. // PLoS One. 2009. V. 4. № 4. e5279.
- O'Brien J., Hayder H., Zayed Y., Peng C. // Front. Endocrinol. (Lausanne). 2018. V. 9. P. 402.
- Abdelfattah A.M., Park C., Choi M.Y. // Biomol. Concepts. 2014. V. 5. № 4. P. 275–287.
- Yang J.S., Lai E.C. // Mol. Cell. 2011. V. 43. № 6. P. 892–903.
- Agarwal V., Bell G.W., Nam J.W., Bartel D.P. // Elife. 2015. V. 4. e05005.
- Wang L.D., Wagers A.J. // Nat. Rev. Mol. Cell. Biol. 2011. V. 12. № 10. P. 643–655.

21. Will B., Zhou L., Vogler T.O., Ben-Neriah S., Schinke C., Tamari R., Yu Y., Bhagat T.D., Bhattacharyya S., Barreyro L., et al. // *Blood*. 2012. V. 120. № 10. P. 2076–2086.
22. Chen C.Z., Li L., Lodish H., Bartel D. // *Science*. 2004. V. 303. P. 83–86.
23. Montagner S., Dehó L., Monticelli S. // *BMC Immunol*. 2014. V. 15. P. 14.
24. Kotaki R., Koyama-Nasu R., Yamakawa N., Kotani A. // *Int. J. Mol. Sci*. 2017. V. 18. № 7. P. 1495.
25. Muljo S.A., Ansel K.M., Kanellopoulou C., Livingston D.M., Rao A., Rajewsky K. // *J. Exp. Med*. 2005. V. 202. № 2. P. 261–269.
26. Guo S., Lu J., Schlanger R., Zhang H., Wang J.Y., Fox M.C., Purton L.E., Fleming H.H., Cobb B., Merckenschlager M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 32. P. 14229–14234.
27. Georgantas R.W. 3rd, Hildreth R., Morisot S., Alder J., Liu C., Heimfeld S., Calin G.A., Croce C.M., Civin C.I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 8. P. 2750–2755.
28. Song S.J., Ito K., Ala U., Kats L., Webster K., Sun S.M., Jongen-Lavrencic M., Manova-Todorova K., Teruya-Feldstein J., Avigan D.E. // *Cell Stem Cell*. 2013. V. 13. № 1. P. 87–101.
29. Khalaj M., Woolthuis C.M., Hu W., Durham B.H., Chu S.H., Qamar S., Armstrong S.A., Park C.Y. // *J. Exp. Med*. 2017. V. 214. № 8. P. 2453–2470.
30. Herrera-Merchan A., Cerrato C., Luengo G., Dominguez O., Piris M.A., Serrano M., Gonzalez S. // *Cell Cycle*. 2010. V. 9. № 16. P. 3277–3285.
31. Krivdova G., Erwin S.E., Voisin V., Murison A., Hermans K.G., Prat L.G., Gan O.I., Wagenblast E., Trotman-Grant A., Lechman E.R. // *Blood*. 2018. V. 132 (Suppl. 1). P. 3824.
32. Li Y., Zhang Q., Du Z., Lu Z., Liu S., Zhang L., Ding N., Bao B., Yang Y., Xiong Q., et al. // *Br. J. Haematol*. 2017. V. 176. № 1. P. 50–64.
33. Li Y., Liu S., Sun H., Yang Y., Qi H., Ding N., Zheng J., Dong X., Qu H., Zhang Z., et al. // *Int. J. Mol. Sci*. 2015. V. 16. № 12. P. 28156–28168.
34. Jiang L., Wang X., Wang Y., Chen X. // *Cell Biochem. Funct*. 2018. V. 36. № 2. P. 95–105.
35. Yuan J.Y., Wang F., Yu J., Yang G.H., Liu X.L., Zhang J.W. // *J. Cell. Mol. Med*. 2009. V. 13. № 11–12. P. 4551–4559.
36. Zhang Y., Li L., Yu C., Senyuk V., Li F., Quigley J.G., Zhu T., Qian Z. // *Sci. Rep*. 2018. V. 8. № 1. P. 6519.
37. Vian L., Di Carlo M., Pelosi E., Fazi F., Santoro S., Cerio A.M., Boe A., Rotilio V., Billi M., Racanicchi S. // *Cell Death Differ*. 2014. V. 21. № 2. P. 290–301.
38. Wang D., Si S., Wang Q., Luo G., Du Q., Liang Q., Guo X., Zhang G., Feng J., Leng Z. // *Cell. Physiol. Biochem*. 2018. V. 46. № 1. P. 365–374.
39. Bruchova-Votavova H., Yoon D., Prchal J.T. // *Leuk. Lymphoma*. 2010. V. 51. № 4. P. 686–693.
40. Jin H.L., Kim J.S., Kim Y.J., Kim S.J., Broxmeyer H.E., Kim K.S. // *Mol. Cells*. 2012. V. 34. № 2. P. 177–183.
41. Kim M., Tan Y.S., Cheng W.C., Kingsbury T.J., Heimfeld S., Civin C.I. // *Br. J. Haematol*. 2015. V. 168. № 4. P. 583–597.
42. Felli N., Pedini F., Romania P., Biffoni M., Morsilli O., Castelli G., Santoro S., Chicarella S., Sorrentino A., Peschle C., et al. // *Haematologica*. 2009. V. 94. № 4. P. 479–486.
43. Zhao H., Kalota A., Jin S., Gewirtz A.M. // *Blood*. 2009. V. 113. P. 505–516.
44. Mittal S.P., Mathai J., Kulkarni A.P., Pal J.K., Chattopadhyay S. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol*. 2013. V. 45. № 11. P. 2519–2529.
45. Bianchi E., Bulgarelli J., Ruberti S., Rontautoli S., Sacchi G., Norfo R., Pennucci V., Zini R., Salati S., Prudente Z., et al. // *Cell Death Differ*. 2015. V. 22. № 12. P. 1906–1921.
46. Zhai P.F., Wang F., Rui S., Lin H.S., Jiang C.L., Yang G.H., Yu J., Zhang J.W. // *J. Biol. Chem*. 2014. V. 289. P. 22600–22613.
47. Sun L., Fan F., Li R., Niu B., Zhu L., Yu S., Wang S., Li C., Wang D. // *Front. Physiol*. 2018. V. 9. P. 1099.
48. Deutsch V.R., Tomer A. // *Br. J. Haematol*. 2006. V. 134. № 5. P. 453–466.
49. Kohrs N., Kolodziej S., Kuvardina O.N., Herglotz J., Yillah J., Herkt S., Piechatzek A., Salinas Riester G., Lingner T., Wichmann C., et al. // *PLoS Genet*. 2016. V. 12. № 3. e1005946.
50. Lu J., Guo S., Ebert B.L., Zhang H., Peng X., Bosco J., Pretz J., Schlanger R., Wang J.Y., Mak R.H., et al. // *Dev. Cell*. 2008. V. 14. № 6. P. 843–853.
51. Ben-Ami O., Pencovich N., Lotem J., Levanon D., Groner Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 1. P. 238–243.
52. Weiss C.N., Ito K. // *Blood Adv*. 2019. V. 3. № 1. P. 33–46.
53. Navarro F., Gutman D., Meire E., Cáceres M., Rigoutsos I., Bentwich Z., Lieberman J. // *Blood*. 2009. V. 114. № 10. P. 2181–2192.
54. Li X., Zhang J., Gao L., McClellan S., Finan M.A., Butler T.W., Owen L.B., Piazza G.A., Xi Y. // *Cell Death Differ*. 2012. V. 19. № 3. P. 378–386.
55. Romania P., Lulli V., Pelosi E., Biffoni M., Peschle C., Marziali G. // *Br. J. Haematol*. 2008. V. 143. № 4. P. 570–580.
56. Zini R., Rossi C., Norfo R., Pennucci V., Barbieri G., Ruberti S., Rontautoli S., Salati S., Bianchi E., Manfredini R. // *Stem Cells Dev*. 2016. V. 25. № 19. P. 1433–1443.
57. Zarif M.N., Soleimani M., Abolghasemi H., Amirizade N., Arefi E., Rahimian A. // *Hematology*. 2013. V. 18. № 2. P. 93–100.
58. Hartmann J.U., Bräuer-Hartmann D., Kardosova M., Wurm A.A., Wilke F., Schödel C., Gerloff D., Katzerke C., Krakowsky R., Namasu C.Y., et al. // *Cell Death Dis*. 2018. V. 9. № 8. P. 814.
59. Rosa A., Ballarino M., Sorrentino A., Sthandier O., De Angelis F.G., Marchioni M., Masella B., Guarini A., Fatica A., Peschle C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 19849–19854.
60. Shen X., Tang J., Hu J., Guo L., Xing Y., Xi T. // *Biotechnol. Lett*. 2013. V. 35. № 11. P. 1799–1806.
61. Fontana L., Pelosi E., Greco P., Racanicchi S., Testa U., Liuzzi F., Croce C.M., Brunetti E., Grignani F., Peschle C. // *Nat. Cell. Biol*. 2007. V. 9. № 7. P. 775–787.
62. Rajasekhar M., Schmitz U., Flamant S., Wong J.J., Bailey C.G., Ritchie W., Holst J., Rasko J.E.J. // *Sci. Rep*. 2018. V. 8. № 1. P. 7264.
63. Borze I., Scheinin I., Siitonen S., Elonen E., Juvonen E., Knuutila S. // *Leuk. Lymphoma*. 2011. V. 52. № 8. P. 1567–1573.
64. Pons A., Nomdedeu B., Navarro A., Gaya A., Gel B., Diaz T., Valera S., Rozman M., Belkaid M., Montserrat E., et al. // *Leuk. Lymphoma*. 2009. V. 50. № 11. P. 1854–1859.
65. Dostalova Merkerova M., Krejcik Z., Votavova H., Belickova M., Vasikova A., Cermak J. // *Eur. J. Hum. Genet*. 2011. V. 19. № 3. P. 313–319.
66. Choi J.S., Nam M.H., Yoon S.Y., Kang S.H. // *Leuk. Res*. 2015. V. 39. № 7. P. 763–768.
67. Kuang X., Wei C., Zhang T., Yang Z., Chi J., Wang L. // *Int. J. Oncol*. 2016. V. 49. № 5. P. 1921–1930.
68. Liang H.W., Luo B., Du L.H., He R.Q., Chen G., Peng Z.G., Ma J. // *Cancer Med*. 2019. V. 8. № 13. P. 6021–6035.
69. Choi Y., Hur E.H., Moon J.H., Goo B.K., Choi D.R., Lee J.H. // *Korean J. Intern. Med*. 2019. V. 34. № 2. P. 390–400.
70. Ying L.E., Zhang X.P., Xiong Y.Q., Li X.Y., Zhao W.H., Long Y., Luo J., Cheng P., Liu Z.F. // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2019. V. 27. № 1. P. 134–140.
71. Ozdogan H., Gur Dedeoglu B., Oztumur Isalakoglu Y., Aydos A., Kose S., Atalay A., Yegin Z.A., Avcu F., Uckan Cetinkaya D., Ilhan O. // *Leuk. Res*. 2017. V. 63. P. 62–71.

72. Kang S.H., Choi J.S. // *Leuk. Lymphoma*. 2019. V. 60. № 11. P. 2779–2786.
73. Meng Y.S., Gao S., Hua F.L., Li Y. // *Zhongguo Shi Yan Xue Ye Xue Za Zhi*. 2016. V. 24. № 6. P. 1807–1810.
74. Erdogan B., Facey C., Qualtieri J., Tedesco J., Rinker E., Isett R.B., Tobias J., Baldwin D.A., Thompson J.E., Carroll M., et al. // *Exp. Hematol*. 2011. V. 39. № 9. P. 915–926.
75. Bhagat T.D., Zhou L., Sokol L., Kessel R., Caceres G., Gundabolu K., Tamari R., Gordon S., Mantzaris I., Jodlowski T. // *Blood*. 2013. V. 121. № 15. P. 2875–2881.
76. Sokol L., Caceres G., Volinia S., Alder H., Nuovo G.J., Liu C.G., McGraw K., Clark J.A., Sigua C.A., Chen D.T., et al. // *Br. J. Haematol*. 2011. V. 153. № 1. P. 24–32.
77. Zhang Y.H., Yang Y., Zhang C., Sun Y.F., Zhu W., Ma C.L., Zhou X.Y. // *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi*. 2016. V. 18. № 12. P. 1302–1307.
78. Lee D.W., Futami M., Carroll M., Feng Y., Wang Z., Fernandez M., Whichard Z., Chen Y., Kornblau S., Shpall E.J., et al. // *Oncogene*. 2012. V. 31. P. 4085–4094.
79. Li X., Xu F., Chang C., Byon J., Papayannopoulou T., Deeg H.J., Marcondes A.M. // *Haematologica*. 2013. V. 98. № 3. P. 414–419.
80. Zuo Z., Calin G.A., de Paula H.M., Medeiros L.J., Fernandez M.H., Shimizu M., Garcia-Manero G., Bueso-Ramos C.E. // *Blood*. 2011. V. 18. № 2. P. 413–415.
81. Dostalova Merkerova M., Hrustincova A., Krejcik Z., Votavova H., Ratajova E., Cermak J., Belickova M. // *Neoplasma*. 2017. V. 64. № 4. P. 571–578.
82. Jang S.J., Choi I.S., Park G., Moon D.S., Choi J.S., Nam M.H., Yoon S.Y., Choi C.H., Kang S.H. // *Leuk. Res*. 2016. V. 47. P. 172–177.
83. Hrustincova A., Krejcik Z., Kundrat D., Szikszai K., Belickova M., Pecherkova P., Klema J., Vesela J., Hrubá M., Cermak J., et al. // *Cells*. 2020. V. 9. № 4. P. 794.
84. Huang T., Deng C.X. // *Int. J. Biol. Sci*. 2019. V. 15. № 1. P. 1–11.
85. Kuang X., Chi J., Wang L. // *Hematology*. 2016. V. 21. № 10. P. 593–602.
86. Alkhatibi H.A., McLornan D.P., Kulasekararaj A.G., Malik F., Seidl T., Darling D., Gaken J., Mufti G.J. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 30. P. 47875–47890.
87. Bousquet M., Quelen C., Rosati R., Mansat-De Mas V., La Starza R., Bastard C., Lippert E., Talmant P., Lafage-Pochitaloff M., Leroux D., et al. // *J. Exp. Med*. 2008. V. 205. № 11. P. 2499–2506.
88. Veryaskina Y.A., Titov S.E., Kovynev I.B., Pospelova T.I., Zhimulev I.F. // *Medicina (Kaunas)*. 2020. V. 56. № 8. P. E376.
89. Hussein K., Theophile K., Büsche G., Schlegelberger B., Göhring G., Kreipe H., Bock O. // *Leuk. Res*. 2010. V. 34. № 3. P. 328–334.
90. Fang J., Varney M., Starczynowski D.T. // *Curr. Pharm. Des*. 2012. V. 18. № 22. P. 3170–3179.
91. Starczynowski D.T., Kuchenbauer F., Argiropoulos B., Sung S., Morin R., Muranyi A., Hirst M., Hogge D., Marra M., Wells R.A., et al. // *Nat. Med*. 2010. V. 16. № 1. P. 49–58.
92. Votavova H., Grmanova M., Dostalova Merkerova M., Belickova M., Vasikova A., Neuwirtova R., Cermak J. // *J. Hematol. Oncol*. 2011. V. 4. P. 1.
93. Aslan D., Garde C., Nygaard M.K., Helbo A.S., Dimopoulos K., Hansen J.W., Severinsen M.T., Treppendahl M.B., Sjø L.D., Grønbaek K., et al. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 9. P. 9951–9963.
94. Zeidan A.M., Linhares Y., Gore S.D. // *Blood Rev*. 2013. V. 27. № 5. P. 243–259.
95. Kim Y., Cheong J.W., Kim Y.K., Eom J.I., Jeung H.K., Kim S.J., Hwang D., Kim J.S., Kim H.J., Min Y.H. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 2. e86933.
96. Krejcik Z., Belickova M., Hrustincova A., Votavova H., Jonasova A., Cermak J., Dyr J.E., Dostalova Merkerova M. // *Cancer Biomark*. 2018. V. 22. № 1. P. 101–110.
97. Krejčík Z., Beličková M., Hruštincová A., Kléma J., Zemanová Z., Michalová K., Čermák J., Jonášová A., Dostálová Merkerová M. // *Cancer Genet*. 2015. V. 208. № 4. P. 156–161.
98. Merkerova M.D., Krejcik Z., Belickova M., Hrustincova A., Klema J., Stara E., Zemanova Z., Michalova K., Cermak J., Jonasova A. // *Eur. J. Haematol*. 2015. V. 95. № 1. P. 35–43.
99. Venner C.P., Woltosz J.W., Nevill T.J., Deeg H.J., Caceres G., Platzbecker U., Scott B.L., Sokol L., Sung S., List A.F., et al. // *Haematologica*. 2013. V. 98. № 3. P. 409–413.
100. Greenberg P.L., Tuechler H., Schanz J., Sanz G., Garcia-Manero G., Solé F., Bennett J.M., Bowen D., Fenaux P., Dreyfus F., et al. // *Blood*. 2012. V. 120. № 12. P. 2454–2465.
101. Wen J., Huang Y., Li H., Zhang X., Cheng P., Deng D., Peng Z., Luo J., Zhao W., Lai Y., et al. // *Int. J. Hematol*. 2017. V. 105. № 6. P. 777–783.
102. Kirimura S., Kurata M., Nakagawa Y., Onishi I., Abe-Suzuki S., Abe S., Yamamoto K., Kitagawa M. // *Pathology*. 2016. V. 48. № 3. P. 233–241.
103. Gañán-Gómez I., Wei Y., Yang H., Pierce S., Bueso-Ramos C., Calin G., Boyano-Adánez Mdel C., García-Manero G. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 4. e93404.
104. Ma Y., Qiao T., Meng Y. // *Leuk. Lymphoma*. 2020. P. 1–3.
105. Zuo Z., Maiti S., Hu S., Loghavi S., Calin G.A., Garcia-Manero G., Kantarjian H.M., Medeiros L.J., Cooper L.J., Bueso-Ramos C.E. // *Mod. Pathol*. 2015. V. 28. № 3. P. 373–382.
106. Thol F., Scherr M., Kirchner A., Shahswar R., Battmer K., Kade S., Chaturvedi A., Koenecke C., Stadler M., Platzbecker U., et al. // *Haematologica*. 2015. V. 100. № 4. e122–4.
107. Wang H., Zhang T.T., Jin S., Liu H., Zhang X., Ruan C.G., Wu D.P., Han Y., Wang X.Q. // *Clin. Epigenetics*. 2017. V. 9. P. 91.
108. Wu D.H., Yao D.M., Yang L., Ma J.C., Wen X.M., Yang J., Guo H., Li X.X., Qian W., Lin J., et al. // *Leuk. Lymphoma*. 2017. V. 58. № 1. P. 96–103.
109. Veryaskina Y.A., Titov S.E., Kometova V.V., Rodionov V.V., Zhimulev I.F. // *Noncoding RNA*. 2020. V. 6. № 2. P. 16.
110. Titov S.E., Ivanov M.K., Karpinskaya E.V., Tsvilikova E.V., Shevchenko S.P., Veryaskina Y.A., Akhmerova L.G., Poloz T.L., Klimova O.A., Gulyaeva L.F., et al. // *BMC Cancer*. 2016. V. 16. P. 201.
111. Veryaskina Y.A., Titov S.E., Kovynev I.B., Pospelova T.I., Zhimulev I.F. // *Cells*. 2020. V. 9. P. 2318.
112. Titov S.E., Demenkov P.S., Lukyanov S.A., Sergiyko S.V., Katanyan G.A., Veryaskina Y.A., Ivanov M.K. // *J. Clin. Pathol*. 2020. V. 73. № 11. P. 722–727.
113. Kovynev I.B., Titov S.E., Ruzankin P.S., Agakishiev M.M., Veryaskina Y.A., Nedel'ko V.M., Pospelova T.I., Zhimulev I.F. // *Biomedicines*. 2020. V. 8. P. 607.
114. Rupaimoole R., Slack F. // *Nat. Rev. Drug Discov*. 2017. V. 16. P. 203–222.
115. Дьячкова Н.Ю., Ковынев И.Б., Воропаева Е.Н., Шамаева Г.В., Лямкина А.С. // *Вестник СО РАМН*. 2011. Т. 31. № 2. С. 37–40.

УДК 577.35.577.345

Фотолюминесцентные наноматериалы для медицинской биотехнологии

Е. Л. Гурьев¹, С. Шанвар¹, А. В. Звягин^{1,2,3}, С. М. Деев^{2,3}, И. В. Балалаева^{1*}¹Нижегородский государственный университет им. Н.И. Лобачевского, Нижний Новгород, 603022 Россия²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия³Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России, Москва, 119991 Россия

*E-mail: irin-b@mail.ru

Поступила в редакцию 30.08.2020

Принята к печати 12.10.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11180

РЕФЕРАТ Создание разнообразных наноматериалов, обладающих фотолюминесцентными свойствами, существенно расширило арсенал подходов, применяемых в современной биомедицине. Уникальные фотофизические свойства таких материалов позволяют существенно улучшить чувствительность и специфичность диагностических методов, повысить эффективность терапии, а также дают возможность применять тераностический подход к лечению с использованием конъюгатов наночастиц с функциональными макромолекулами. Наиболее широкое применение получили такие наноматериалы, как полупроводниковые квантовые точки, малые кластеры золота, углеродные точки, наноалмазы, полупроводниковые наночастицы пористого кремния и антистоксовые нанофосфоры. Нами рассмотрены перспективные группы фотолюминесцентных наноматериалов как основы для биотехнологического использования, в частности, для разработки агентов для оптических методов диагностики, сенсорики и различных видов терапии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА фотолюминесцентные наноматериалы, биотехнологическое применение, оптическая диагностика и терапия, химические сенсоры, квантовые точки, кластеры золота, углеродные точки, наноалмазы, пористый кремний, антистоксовые нанофосфоры.

ВВЕДЕНИЕ

В последние десятилетия в медицине наметился качественный сдвиг в сторону более точного и персонализированного лечения за счет сочетания ранней диагностики, терапии и последующего мониторинга течения болезни. Такой подход получил название тераностика. Нанотехнологии в комплексе с оптическими, акустическими и другими методами неинвазивного воздействия занимают в этой области главенствующую нишу. Наночастицы способны успешно сочетать в себе несколько функций благодаря своим уникальным свойствам, таким, как программируемость физических и химических характеристик, наличие реакционноспособных функциональных групп, большая удельная площадь поверхности и оптимальный размер. Данные особенности позволяют наночастицам выступать не только в качестве самостоятельных терапевтических и/или контрастирующих агентов и средств доставки, но и в качестве платформы для создания мультифункциональных комплексов. В этом контексте широкие возможности

открывают оптически активные наночастицы, позволяющие осуществлять визуализацию целевых клеток или субклеточных структур одновременно с таргетным терапевтическим воздействием.

Одна из групп наноматериалов, используемых в методах оптической диагностики, сенсорики и терапии, – плазмонно-резонансные частицы золота, серебра и других металлов. На основе наночастиц этого типа предложен ряд сенсоров для качественного и количественного определения различных химических соединений и биологических макромолекул, а также агентов для визуализации целевых клеток и воздействия на них [1–3]. Однако подавляющее большинство развиваемых подходов базируется на применении фотолюминесцентных (ФЛ) наноматериалов. В зависимости от химической структуры, формы и размеров свойства таких материалов значительно отличаются, что позволяет решать широкий круг практических задач. На сегодняшний день в биомедицинских исследованиях наиболее широко используются квантовые точки, малые кластеры зо-

лота, углеродные точки, наноалмазы, полупроводниковые наночастицы пористого кремния и антистоксовы нанофосфоры.

Нами рассмотрены группы фотолюминесцентных наноматериалов, представляющие интерес в качестве основы для разработки агентов для медицинской биотехнологии, в частности, оптических методов диагностики, сенсорики и в различных видах терапии.

КВАНТОВЫЕ ТОЧКИ

Наиболее хорошо изученными ФЛ-наноматериалами являются квантовые точки (КТ, англ. quantum dots, QDs) [4–6]. КТ – это неорганические нанокристаллы, состоящие, как правило, из элементов II и VI или III и V групп и имеющие размер от 2 до 10 нм. Наиболее часто КТ синтезируют с использованием таких соединений, как CdSe, CdS, CdTe, InAs и GaAs, в объемном состоянии обладающие свойствами полупроводников. КТ обладают ФЛ с квантовым выходом более 50% и узким симметричным пиком эмиссии, положение которого определяется размером и составом частиц (рис. 1) [7, 8].

ФЛ-свойства КТ определяются дискретными энергетическими уровнями, которые возникают вследствие ограничения свободного движения носителей заряда (электронов и дырок). При поглощении кванта возбуждающего излучения электрон переходит в зону проводимости; возбужденное состояние длится от единиц до десятков наносекунд. Испускание фотона происходит в результате излучательной рекомбинации электрон-дырочной пары, причем энергия фотона соответствует разности между высшим дырочным и низшим электронным уровнями. Частицы меньшего размера имеют большую разность энергий между соответствующими уровнями, результатом чего является большая энергия высвечиваемых фотонов и их меньшая длина волны соответственно.

В биомедицине, как правило, применяются КТ усовершенствованной структуры, наиболее часто – структуры ядро/оболочка. Оболочку КТ формируют из соединений сходной кристаллической структуры, обладающих свойствами более широкозонных полупроводников [13–15]. Чаще других используют КТ состава CdSe/ZnS, проявляющие ФЛ во всей видимой области спектра, в зависимости от размера частицы. Оболочка обеспечивает увеличенный квантовый выход фотолюминесценции, способствует стабилизации поверхности КТ и не позволяет ионам тяжелых металлов попадать в окружающую среду, снижая тем самым токсическое действие таких КТ относительно КТ без оболочки [16, 17].

В процессе синтеза поверхность полупроводниковых КТ покрывается гидрофобными соединениями,

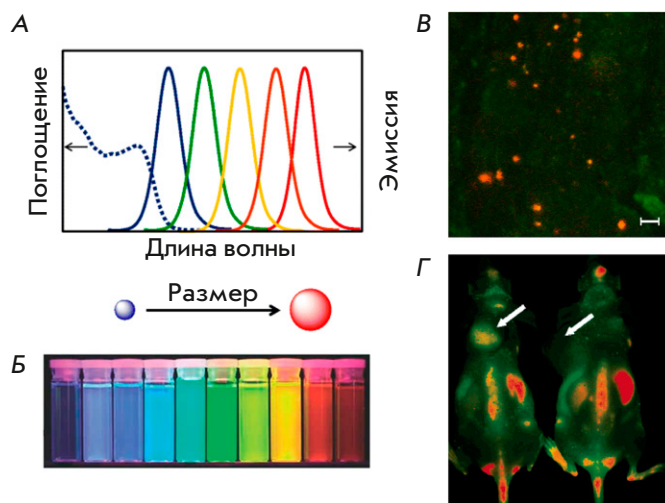


Рис. 1. А – зависимость спектра эмиссии флуоресценции квантовых точек состава CdSe/ZnS от размера. Адаптировано из [9] с разрешения правообладателя: © 2017 by the authors. Licensee MDPI, Basel. Б – флуоресцентная фотография суспензий квантовых точек при облучении ультрафиолетовым светом (максимумы эмиссии на 443, 473, 481, 500, 518, 543, 565, 587, 610 и 655 нм). Адаптировано из [10] с разрешения правообладателя: John Wiley and Sons. © 2010 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. В – визуализация целевых конъюгатов квантовых точек (QD-4D5scFv) в ксенографтной опухоли SK-BR-3. Изображение получено методом конфокальной флуоресцентной микроскопии. Масштабный отрезок 10 мкм. Адаптировано из [11] с разрешения правообладателя. © 2019 by the authors. Licensee MDPI, Basel. Г – прижизненная визуализация распределения целевых конъюгатов квантовых точек (QD705-RGD) в организме мыши-носителя ксенографтной опухоли U87MG (показана стрелкой). Автофлуоресценция тканей мыши показана зеленым, флуоресцентный сигнал квантовых точек показан красным. Адаптировано из [12] с разрешения правообладателя. © 2006 American Chemical Society

что делает их практически нерастворимыми в воде. Для достижения коллоидной устойчивости и биосовместимости поверхность КТ может быть модифицирована различными способами. Первая группа подходов подразумевает обмен гидрофобных поверхностных лигандов на гидрофильные либо покрытие амфифильными соединениями [18]. Альтернативным подходом является формирование дополнительной внешней оболочки из органических полимеров [19, 20] либо неорганических соединений (оксид кремния) [21]. Отсутствие коллоидной стабильности получаемых КТ ограничивает их широкое применение в биомедицинских приложениях. Описаны разнообразные подходы к решению этой задачи, однако надежный

и воспроизводимый протокол до настоящего времени не разработан [22].

КТ обладают рядом полезных фотофизических свойств, таких, как высокий квантовый выход ФЛ и коэффициент экстинкции, позволяющие визуализировать единичные наночастицы; широкий диапазон поглощения и узкие симметричные пики эмиссии ФЛ, дающие возможность проводить мультиплексный анализ [23]; долговременная фотостабильность, позволяющая осуществлять продолжительный трекинг отдельных молекул; широкие возможности многофотонного возбуждения, выгодно отличающие КТ от органических флуорофоров [24]. В дополнение к этим свойствам к настоящему моменту разработано множество подходов к поверхностной функционализации КТ и присоединению различных направляющих/токсических модулей, специфичных к молекулам-мишеням, что позволяет получать многофункциональные комплексы с желаемым набором свойств [25–27].

Флуоресцентный имиджинг клеток, тканей и органов составляет главную область использования КТ (рис. 1). За более чем 20 лет применения визуализация клеточных структур с помощью КТ стала стандартным подходом. Специфичность окрашивания определенных компонентов клеток достигается использованием направляющих молекул, таких, как антитела, пептиды, фрагменты нуклеиновых кислот и др. Внешние модули присоединяют к частицам методами химической конъюгации [28, 29] или путем самосборки при помощи молекулярных адапторов стрептавидин–биотин [30, 31], или барназа–барстар [32–35]. Подобные таргетные комплексы активно применяют в оптической микроскопии, исследовании клеток с помощью проточной цитометрии [36, 37], в иммуногистохимическом [38, 39] и иммуноферментном анализе [40, 41].

Ряд фотофизических свойств делает КТ незаменимыми в случае подходов, недоступных для органических флуорофоров. В частности, фотостабильность КТ позволяет исследовать динамику перемещения различных молекул. В ряде работ проведен трекинг нескольких рецепторов [42–44], интегринов [45, 46], транспортных белков [47] и липидов мембран [48].

Один из недостатков КТ – прерывистый (мерцающий, англ. *blinking*) характер их ФЛ. Мерцание возникает при попадании одного или обоих составляющих экситона (электрон и дырка) на поверхность частицы, что ведет к появлению заряда частицы и тушению ФЛ в результате безызлучательной рекомбинации [49]. Для преодоления этого явления разработан ряд способов, обеспечивающих полное или частичное подавление мерцания ФЛ сигнала КТ [50, 51].

КТ применяются для создания сенсоров, способных оценивать количественное содержание в среде различных соединений. С этой целью используют эффекты изменения характеристик эмиссии (положения пиков, интенсивности, поляризации, кинетических параметров), связанные с присоединением к поверхности КТ целевых молекул [52–56]. Разработано множество сенсоров с применением КТ в качестве одного из участников FRET-пары (Förster resonance energy transfer). Подобные системы успешно применяются для изучения взаимодействия между лигандом и рецептором, специфичного детектирования последовательностей ДНК, выявления изменений в конформации белковых молекул [57–59].

Активно разрабатываются сенсоры, сочетающие указанные подходы и предназначенные для широкого круга задач: выявления вирусов и бактерий, определения активности ферментов и присутствия малых органических молекул, различных ионов, измерения pH [60–62].

Выбор компонентов синтезируемых КТ позволяет получать частицы с эмиссией ФЛ в ближней ИК-области, попадающей в окно прозрачности биоткани, в котором минимальны поглощение и рассеяние света [63]. Пики эмиссии подобных частиц сохраняются узкими и симметричными, а размер КТ остается в пределах нескольких нанометров. Такие характеристики позволяют активно использовать агенты на основе КТ для прижизненного неинвазивного имиджинга клеток, тканей и органов. В ряде работ сообщалось об успешной доставке агентов на основе КТ к опухолевым клеткам различного происхождения и эндотелиоцитам опухолевых сосудов [12, 35, 64–66]. КТ, излучающие в ближней ИК-области, способны эффективно маркировать первичные опухоли и могут использоваться для поиска метастазов [67–69], картирования лимфоузлов [70, 71], исследования сосудистой сети [72] и трекинга целевых опухолевых клеток [73, 74].

Комплексы КТ с действующими агентами также имеют очевидный терапевтический потенциал, в частности, для фотодинамической терапии. При переносе энергии с КТ через органические красители (технология FRET) или непосредственно на молекулу кислорода может наблюдаться выраженный фотосенсибилизирующий эффект [75, 76]. Наконец, КТ могут применяться для мониторинга эффективности доставки препаратов [77, 78] и нуклеиновых кислот [79, 80].

Применение КТ в клинической практике сдерживается их нежелательными токсическими эффектами, связанными с присутствием в их составе ионов тяжелых металлов и иных опасных веществ (Cd, Pb, As, Te, Se). Динамика их высвобождения в окружающую среду зависит, в частности, от оболочки

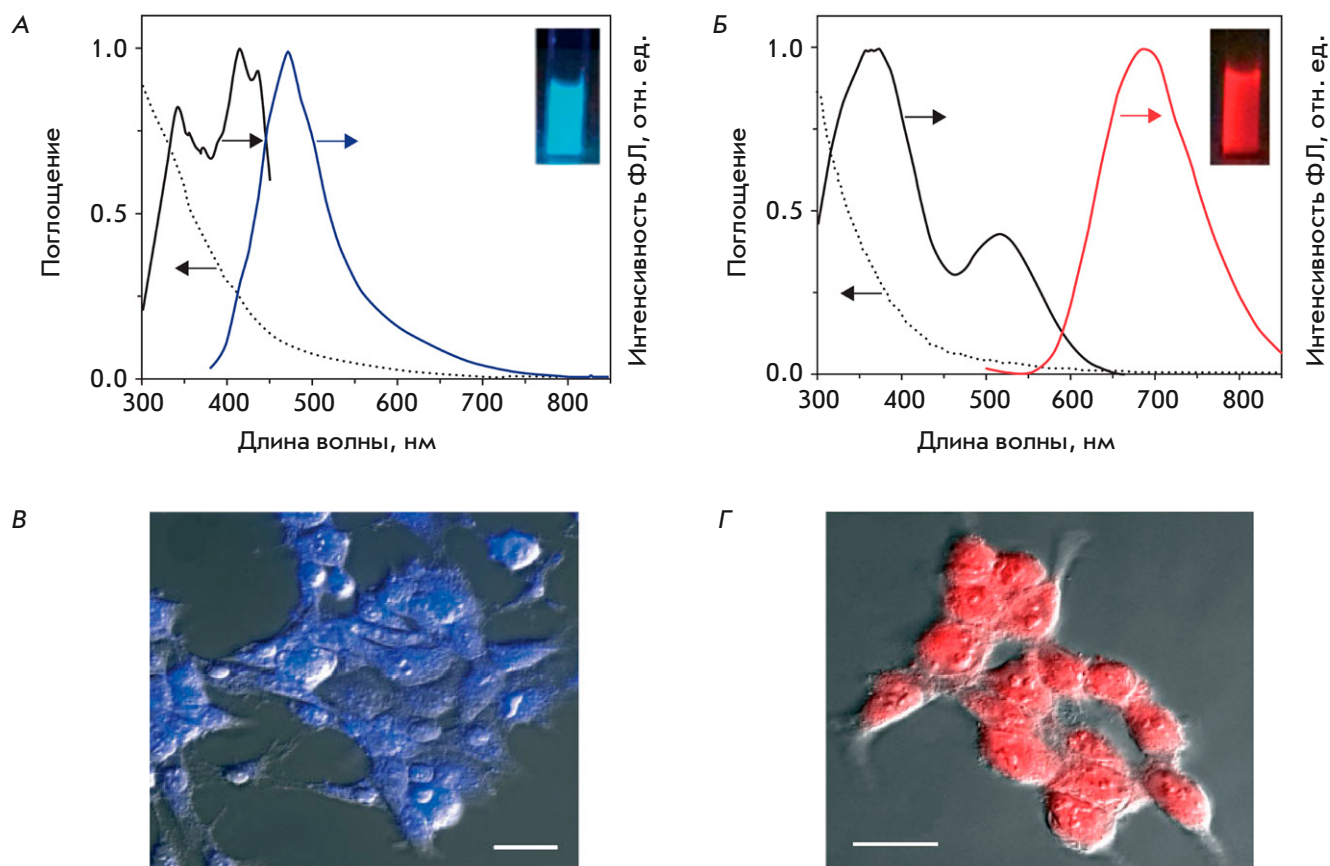


Рис. 2. А, Б – спектр поглощения (пунктир), возбуждения (черный) и эмиссии ФЛ (цветной) нанокластеров золота. Вставки – флуоресцентные фотографии суспензий нанокластеров золота. В, Г – визуализация клеток HEK293 с помощью нанокластеров золота, излучающих в синей области спектра (В), и нанокластеров золота, покрытых бычьим сывороточным альбумином, излучающих в красной области спектра (Г). Наложение изображения в проходящем свете и ФЛ-сигнала нанокластеров золота. Масштабный отрезок 50 мкм. Адаптировано из [88] с разрешения правообладателя: John Wiley and Sons. © 2014 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim

или полимерного покрытия КТ. Использование биодеградируемого покрытия приводит к значительному высвобождению компонентов и явным токсическим последствиям [81–83]. Более прочная полимерная оболочка позволяет свести к минимуму побочные эффекты КТ, но сильно увеличивает время их удержания в почках и селезенке [84–86]. Подобное поведение КТ может существенно увеличивать риск развития токсичности в случае их клинического использования. Пути преодоления описанных ограничений, по-видимому, лежат в области поиска и создания ФЛ-агентов иного химического состава.

МАЛЫЕ КЛАСТЕРЫ ЗОЛОТА

Малые кластеры золота, состоящие из 2–100 атомов, по своим свойствам существенно отличаются от более крупных золотых наночастиц размером несколько нанометров и более. Кластеры золота обла-

дают интенсивной флуоресценцией со значительным Стоксовым сдвигом, длительным временем жизни возбужденного состояния и высоким квантовым выходом, а также обладают фотостабильностью и биосовместимостью. ФЛ кластеров золота обусловлена переходом электронов между дискретными молекулярными энергетическими уровнями. Размер и состав кластеров определяют положение пиков эмиссии ФЛ в диапазоне от УФ до ИК (рис. 2А,Б) [87, 88].

Малые кластеры золота применяют как в качестве визуализирующих агентов, в частности, для отслеживания дифференцировки и перемещения клеток, так и высокочувствительных флуоресцентных зондов (рис. 2В,Г) [89–91]. Присоединение направляющих молекул различного рода (белки, пептиды, полимеры или малые молекулы) позволяет получать конъюгаты малых кластеров золота с целевыми свойствами [92–95].

В качестве агентов для имиджинга кластеры золота позволяют достичь высокой четкости изображения и точности локализации [96, 97]. Кластеры золота, покрытые бычьим сывороточным альбумином, позволяют быстро и эффективно визуализировать опухолевые клетки и целые опухоли [98]. После попадания в клетки малые кластеры золота способны длительное время испускать флуоресценцию (до 28 дней *in vitro*), при этом они имеют более низкую цитотоксичность, чем квантовые точки, и незначительно влияют на жизнеспособность клеток при той же дозе [99]. Оптические свойства позволили малым кластерам золота стать востребованными флуоресцентными зондами для таких аналитических целей, как обнаружение биомолекул [100], отслеживание распределения и накопления лекарств *in vivo* и *in vitro* [101].

К особенностям кластеров золота относится способность к электролюминесценции, что используется при разработке сенсоров [102], в частности, для обнаружения ДНК и микроРНК. Так, предложен электрохимический биосенсор для определения генов пероксидаз с использованием в качестве метки флуоресцентных кластеров золота [103].

Малые кластеры золота могут применяться для таргетной доставки лекарств, присоединяемых к их поверхности. Показана эффективная доставка и контролируемое высвобождение противоопухолевых препаратов (доксорубин, цисплатина, каптоприла и 6-меркаптопурина) с помощью кластеров золота, инкапсулированных в дендримеры [104]. Кластеры золота могут использоваться и в генной терапии, обеспечивая системную доставку генов и визуальный контроль внутриклеточного транспорта. Подобные векторы выгодно отличаются низкой цитотоксичностью, хорошей флоростабильностью и отсутствием иммунного ответа [105].

Еще одно интересное свойство кластеров золота – радиосенсибилизирующая способность, обусловленная высоким коэффициентом поглощения ионизирующего излучения, существенно большим, чем у органических молекул [106, 107]. Способность кластеров золота к увеличению радиочувствительности опухолевых клеток *in vivo* позволяет увеличивать терапевтическую эффективность лучевой терапии путем локального повышения концентрации Au в опухоли [108].

Применению флуоресцентных кластеров золота в качестве контрастирующих агентов «мешает» широкий пик эмиссии ФЛ, что затрудняет использование нескольких агентов одновременно [88]. Также нерешенной остается проблема безопасности наноматериалов из золота и других благородных металлов. Существуют данные о вызываемом малыми кла-

стерами золота окислительном стрессе и нарушении работы митохондрий, воздействии на нуклеиновые кислоты, а также о влиянии на уровень провоспалительных цитокинов, деструкции печени и др. [3, 109, 110]. С другой стороны, многообразие структур и состава агентов на основе кластеров золота, применяемых в таких исследованиях, не позволяет сделать вывод о конкретных причинах этих негативных последствий.

УГЛЕРОДНЫЕ ТОЧКИ

Углеродные точки (англ. carbon dots, C-dots) – это кластеры атомов углерода размером 2–8 нм, обладающие фотолюминесцентными свойствами. Они содержат значительное количество атомов водорода и кислорода, а также следовые количества азота, и могут иметь аморфную структуру (углерод в sp^2 - и sp^3 -гибридизации) либо структуру графена (sp^2 -гибридизованные атомы) [111, 112]. Преимуществами углеродных точек являются их флоростабильность, широкие возможности модификации поверхности и дешевизна производства, поскольку они могут быть получены из сажи многих углеродсодержащих материалов, в том числе растительного происхождения, с помощью химической обработки [113–115].

Углеродным точкам свойственна яркая ФЛ в диапазоне 300–500 нм, которая определяется дефектами поверхности частиц, рекомбинацией экситонов и квантово-размерными эффектами (рис. 3А,Б). Отсутствие токсичности позволяет рассчитывать на широкое применение углеродных точек в биомедицине, о чем свидетельствует множество исследований [114, 116, 117].

Углеродные точки эффективно применяются в качестве флуорофоров при разработке сенсоров, в частности, для определения содержания ионов металлов. Присоединение к ним селективных лигандов позволило создать сенсоры ионов Ag^+ , Al^{3+} , Zn^{2+} , Hg^{2+} и Cu^{2+} [120–124]. Путем соединения углеродных точек (с ФЛ в синей области) с квантовыми точками (с ФЛ в красной области) и покрытия бычьим сывороточным альбумином создан ратиометрический сенсор для сверхчувствительного определения ионов меди [125]. Углеродные точки успешно применяются для создания высокочувствительных систем иммунофлуоресцентного и иммуноферментного анализа различных антигенов [126, 127]. С использованием технологии FRET разработан рН-чувствительный зонд на основе углеродных точек и рН-чувствительного красителя FITC, выступающего в качестве акцептора [128, 129]. Показано использование углеродных точек в ратиометрических комплексах для оценки внутриклеточной темпера-

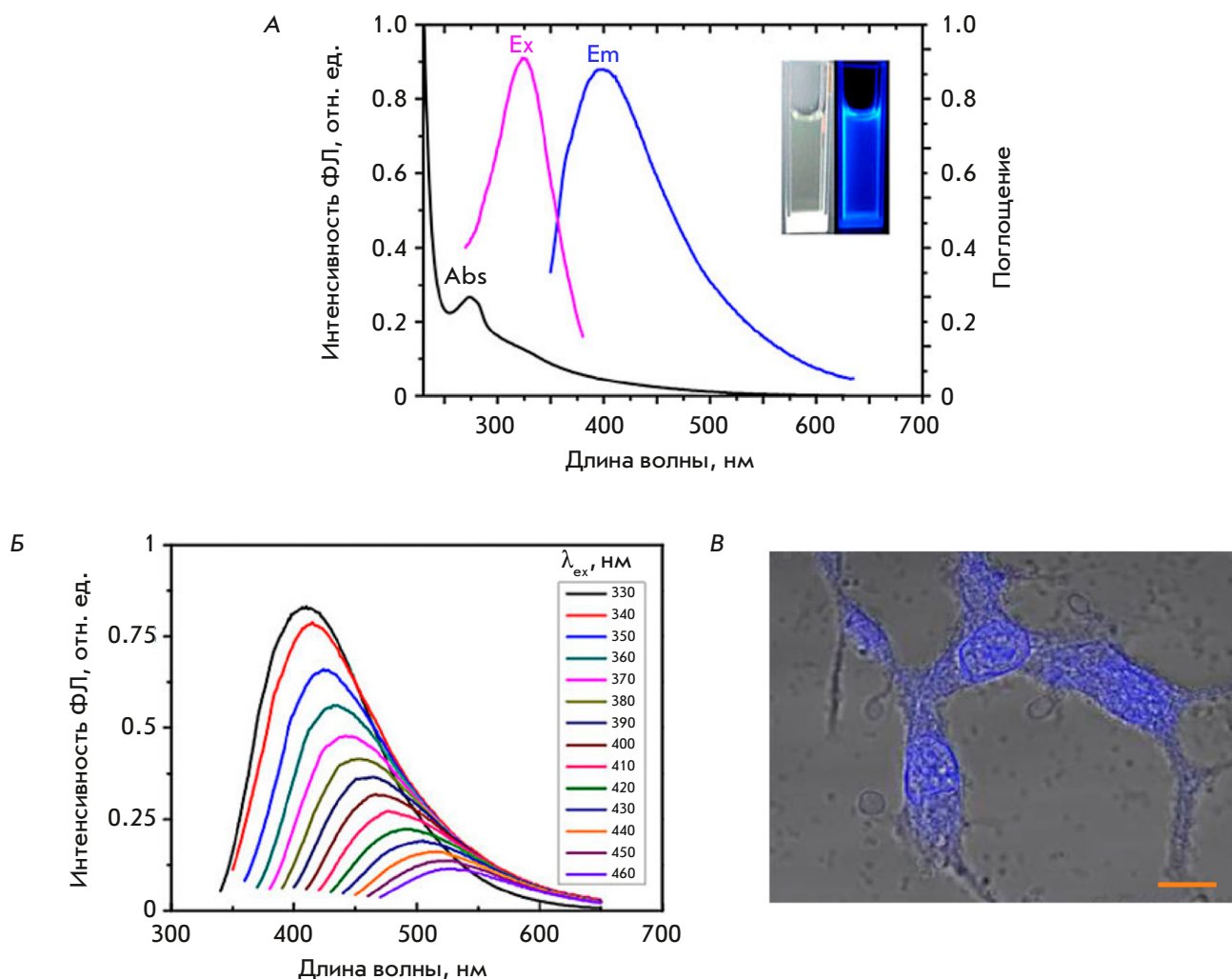


Рис. 3. А – спектр поглощения, возбуждения и эмиссии ФЛ-углеродных точек. Вставка – светлопольная и флуоресцентная фотографии суспензий углеродных точек. Б – спектр эмиссии ФЛ-углеродных точек при возбуждении светом с различными длинами волн. Адаптировано из [118] с разрешения правообладателя: © 2019 The Authors, Royal Society Publishing. В – визуализация клеток 293Т с помощью углеродных точек, допированных азотом. Наложение изображения в проходящем свете и ФЛ-сигнала углеродных точек. Масштабный отрезок 10 мкм. Адаптировано из [119] с разрешения правообладателя: Dove Medical Press Ltd. © 2016 Informa PLC, London

туры. Комплексы из двух типов углеродных кластеров, отличающихся по спектру эмиссии ФЛ, термочувствительны в диапазоне от 15 до 90°C, стабильны при значениях pH от 4 до 9 и могут использоваться для картирования температурного состояния клетки [130].

Помимо сенсоров углеродные точки используются как носители для доставки лекарств. В частности, путем ковалентного присоединения к их модифицированной поверхности получены конъюгаты с противоопухолевым препаратом оксалиплатин [131]. Альтернативной системой доставки лекарств являются конъюгаты углеродных точек с золотыми наностержнями, имеющие pH-чувствительные

связи. Такие конъюгаты демонстрируют активное высвобождение связанного с ними доксорубина при изменении pH и воздействии радиации. Функционализация таких конъюгатов фолиевой кислотой позволила создать тераностический комплекс, пригодный как для эффективной визуализации опухолевых клеток, так и для направленной доставки препаратов с контролируемым высвобождением [132]. Направляющее действие фолиевой кислоты позволяет с помощью подобных комплексов детектировать даже единичные опухолевые клетки в организме [133].

Другое тераностическое применение углеродных точек – создание комплексов с кремнийорганически-

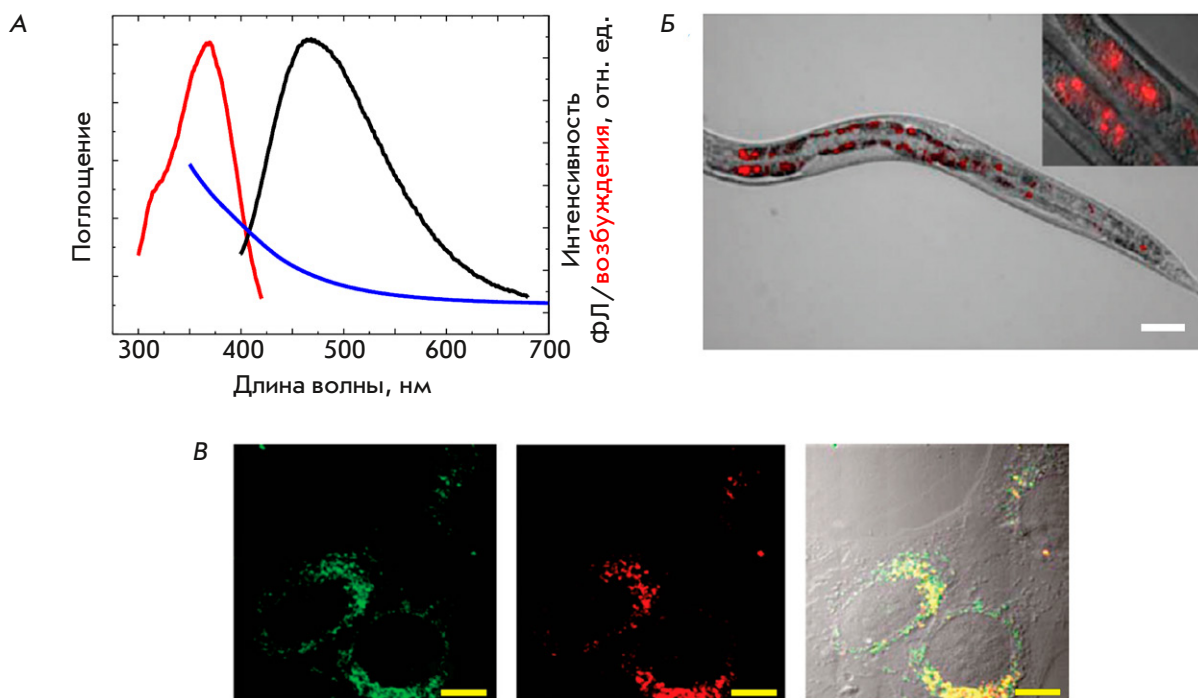


Рис. 4. А – спектр поглощения (синий), возбуждения (эмиссия на 490 нм) и эмиссии ФЛ-наноалмазов. Адаптировано из [145] с разрешения правообладателя: IOP Publishing. © Copyright 2020 IOP Publishing, Bristol. Б – визуализация кишечника свободноживущих червей *Caenorhabditis elegans* с помощью наноалмазов, покрытых бычьим сывороточным альбумином. Вставка – увеличенное изображение клеток кишечника, содержащих наноалмазы. Наложение изображений, полученных методом дифференциального интерференционного контраста и эпифлуоресцентных изображений в диапазоне выше 600 нм при возбуждении в диапазоне 510–560 нм. Масштабный отрезок 50 мкм. Адаптировано из [146] с разрешения правообладателя: American Chemical Society. © Copyright (2010) American Chemical Society. В – визуализация клеток HeLa с помощью наноалмазов. Слева направо: конфокальное флуоресцентное изображение липосом, окрашенных LysoTracker, полученное в диапазоне 500–530 нм; конфокальное флуоресцентное изображение наноалмазов, полученное в диапазоне 600–750 нм; наложение изображений. Масштабный отрезок 10 мкм. Адаптировано из [147] с разрешения правообладателя: American Chemical Society. © Copyright (2009) American Chemical Society

ми наносферами. Такие структуры обладают свойствами мезопористости, что позволяет включать в их состав противоопухолевые препараты. Комплексы обладают способностью к рН-зависимому высвобождению препаратов (доксорубина) и фототермической активностью при облучении в ближнем ИК-диапазоне [134].

Отсутствие токсичности и биосовместимость углеродных точек открывают перспективы их использования как альтернативы полупроводниковым квантовым точкам, однако требуется модификация их фотофизических свойств с целью смещения максимумов эмиссии ФЛ в ближний ИК-диапазон [135, 136].

НАНОАЛМАЗЫ

Близкими фотолюминесцентными свойствами обладает еще один тип углеродных наноматериалов – наноалмазы [137, 138]. Наноалмазы состоят из атомов углерода в sp^3 -гибридизации, собранных в кристал-

лическую решетку с кубической сингонией. Дефекты в структуре кристаллической решетки, формирующие локализованные возбужденные состояния при поглощении квантов света в видимом диапазоне, вызывают фотолюминесценцию наноалмазов [139] (рис. 4А). С этой целью частицы наноалмазов легируют атомами азота, образующими в процессе синтеза локальные дефекты разных типов [140], причем положение максимумов эмиссии и их интенсивность определяются типами дефектов и общим количеством азота. В частности, отрицательно заряженные азотные вакансии (NV^-) вызывают ФЛ в области 650–700 нм, что наиболее предпочтительно для задач биоимиджинга [141–144].

Наноалмазы в настоящий момент рассматриваются как перспективная система адресной доставки лекарственных средств, характеризующаяся высокой эффективностью доставки и низкой токсичностью [148–150]. Существует множество потенциальных

биологических и медицинских применений наноалмазов, включая их использование в биосовместимых композитах и имплантатах, в адресной доставке лекарств, компонентах биосенсоров и стабильных твердых носителей для синтеза пептидов (рис. 4Б,В). Визуализация и терапия с использованием наноалмазов помогают в ранней диагностике, лечении и эффективной профилактике ряда заболеваний. Использование наноалмазов в различных методах визуализации позволяет эффективно определять стадию заболевания, проводить неинвазивный контроль эффективности лечения и, как подчеркнуто, прогнозировать длительность и глубину ремиссии [151].

Zurbuchen и соавт. продемонстрировали технику субклеточной мультимодальной визуализации (с помощью оптической и электронной микроскопии), которая облегчает локализацию наноалмазов, имеющих флуоресцентные NV-центры. Благодаря ФЛ-свойствам наноалмазов показана возможность их использования в качестве агентов для диагностики заболеваний нервной системы [152].

Наноалмазы хорошо подходят для загрузки лекарственными препаратами благодаря большой площади поверхности и возможности ее функционализации. Так, Huang и соавт. показали эффективное присоединение доксорубина к наноалмазам с его последующим высвобождением. Обнаружено, что подобное соединение менее токсично в отношении нормальных клеток при сохранении высокой активности в отношении клеток колоректального рака человека, чем свободный доксорубин. Пролонгированное высвобождение обеспечило поддержание необходимой концентрации препарата с использованием меньшей вводимой дозы [153]. Показано, что кластеры наноалмазов способны окружать доставляемые препараты, что изолирует доставляемый агент от здоровых клеток, пока не будет достигнуто основное место назначения. Таким образом, комплекс наноалмазы–лекарство позволяет большей части введенной дозы препарата достичь целевой области, увеличивая таргетность воздействия [154].

Наноалмазы рассматриваются также в качестве перспективного инструмента для доставки генов, благодаря которому эффективность генной терапии значительно увеличивается. Показана эффективная доставка и последующая экспрессия гена зеленого флуоресцентного белка с использованием остроконечных наноалмазов в качестве носителя [155]. Еще одно интересное направление в использовании наноалмазов – регенеративная тканевая инженерия. Yang и соавт. разработан наноалмазный полимерный каркас, который поддерживал рост и дифференциацию остеобластов, а также усиливал биоминерализацию

и стимулировал таким образом образование костей *in vitro* [156].

Несмотря на явные достоинства наноалмазов, их практическое применение ограничивается трудоемкостью их синтеза. Также требуют решения проблемы агрегации и корректировки ФЛ-свойств наноалмазов.

ПОЛУПРОВОДНИКОВЫЕ НАНОЧАСТИЦЫ ПОРИСТОГО КРЕМНИЯ

Флуоресцентные свойства полупроводниковых наночастиц пористого кремния, как и у квантовых точек, зависят от квантово-размерных эффектов. Эти частицы обладают биосовместимостью, биodeградируемостью и низкой токсичностью [157, 158]. От размеров частиц и модификации их поверхности зависит положение максимумов эмиссии ФЛ в видимой или ближней ИК-области (рис. 5) [138, 159, 160]. Крупные частицы кремния, не являющегося прямозонным полупроводником, имеют очень низкий уровень выхода ФЛ. Напротив, частицы диаметром до 5 нм проявляют свойства прямозонных полупроводников и яркую ФЛ, не достигающую, тем не менее, уровня квантовых точек [161].

Значительное содержание кремния в земной коре существенно удешевляет синтез кремниевых частиц относительно прочих неорганических наноматериалов. Полупроводниковые частицы пористого кремния использовали для создания эффективных сенсоров уровня pH, концентрации тяжелых металлов, углеводов, пестицидов, антибиотиков и других соединений [163–165]. Благодаря эмиссии ФЛ в ближнем ИК-диапазоне возможен длительный мониторинг биораспределения наночастиц кремния в живых организмах [158]. Присоединение к наночастицам кремния белковых либо иных направляющих модулей позволяет получать наноконструкции как для специфичной визуализации клеток и субклеточных структур, так и для имиджинга на уровне целого организма (рис. 5) [162, 166–168].

Пористые кремниевые наночастицы успешно использовали для доставки и контролируемого pH-зависимого высвобождения препаратов, в частности доксорубина [169]. Кремниевые частицы способны проявлять фототермический эффект, а именно, обеспечивать нагрев опухолевой ткани до 60°C при облучении лазером с длиной волны 1064 нм, вызывая апоптоз и подавление ангиогенеза *in vivo* [170]. Пористая структура наночастиц позволяет легко загружать в них препараты, в частности, капиллярным методом: частицы достаточно погрузить в концентрированный раствор препарата [171, 172]. Поверхность частиц пористого кремния в большинстве случаев имеет отрицательный поверхностный

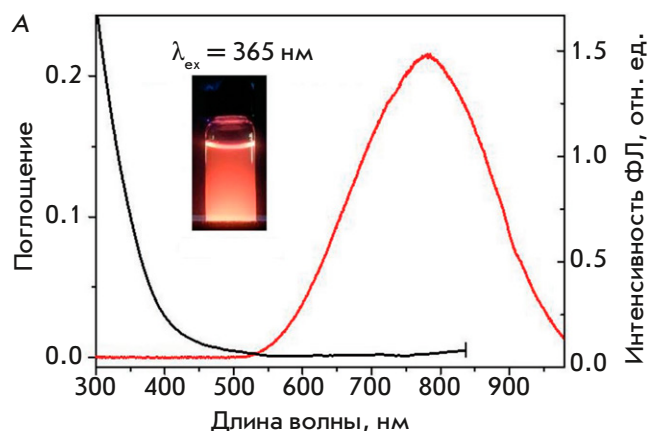
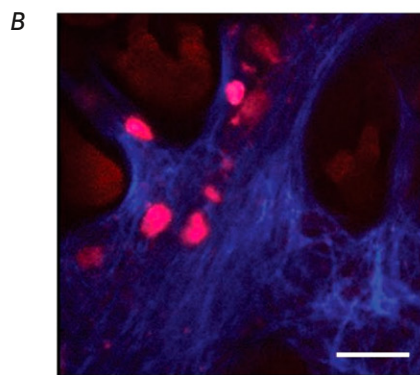
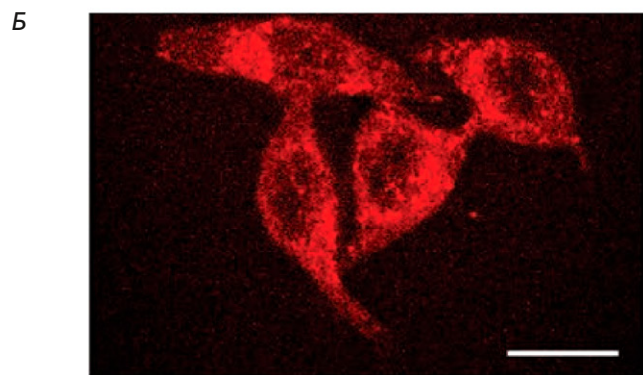


Рис. 5. А – спектры поглощения и эмиссии ФЛ-наночастиц пористого кремния при возбуждении светом с длиной волны 365 нм. Вставка – фотография коллоидного раствора частиц пористого кремния при облучении светом с длиной волны 365 нм. Б – клетки HeLa, маркированные целевыми конъюгатами на основе наночастиц пористого кремния. Изображение получено методом двухфотонной микроскопии при мощности возбуждающего излучения 10 мВт. Масштабный отрезок 15 мкм. В – *in vivo* изображение ксенографтной опухоли HeLa после введения целевых конъюгатов на основе наночастиц пористого кремния, полученное методом двухфотонной микроскопии. Масштабный отрезок 75 мкм. Адаптировано из [162] с разрешения правообладателя: John Wiley and Sons. © 2017 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim



заряд, что позволяет абсорбировать положительно заряженные молекулы, такие как иммуноглобулин-связывающий белок А [173]. На принципе абсорбции основана контролируемая доставка небольших молекул белка. Однако из-за слабых взаимодействий препарата с частицами можно говорить только о быстрой разгрузке в отличие от длительных периодов разгрузки при ковалентном связывании лекарственного средства с носителем [174]. С другой стороны, с помощью гидроксирования поверхности пор возможна ковалентная загрузка препаратов, в частности доксорубина, с его последующим высвобождением [175]. Связывание препаратов с частицами пористого кремния приводит к улучшению их растворимости [176–178], повышению биоустойчивости [179], а также способности препаратов проникать через биологические барьеры организма.

Среди ограничений применения наночастиц пористого кремния стоит отметить проблему достижения яркой ФЛ в окне прозрачности биоткани. Сместить максимум эмиссии ФЛ в ближнюю ИК-область можно увеличив размер частиц, но это приведет к одновременному значительному снижению выхода ФЛ. Также не полностью решена проблема получения стабильных коллоидных водных растворов частиц пористого кремния, устойчивых к действию кислорода [138].

АНТИСТОКСОВЫЕ НАНОФОСФОРЫ

Значительная автофлуоресценция биологических тканей затрудняет регистрацию целевого сигнала ФЛ-меток и зондов [180, 181]. Это особенно актуально для прижизненной визуализации отдельных клеток или тканей организма, где уровень автофлуоресценции является главным ограничением чувствительности методов оптического имиджинга. Решению задачи отделения целевого сигнала экзогенных зондов от сигнала внутренних флуорофоров способствует изучение наноматериалов, обладающих антистоксовой ФЛ.

Антистоксовые нанофосфоры (НАФ, наноразмерные антистоксовые фосфоры, англ. UCNP – up-conversion nanoparticles) представляют собой неорганические нанокристаллы, состоящие из оптически инертной матрицы-хозяина (NaYF_4 , Y_2O_3 , NaPrF_4 , La_2O_3 , Lu_2O_3 , LuPO_4 , GdVO_4 , NaGdF_4) и оптически активных ионов лантаноидов, выступающих в качестве центров люминесценции [182, 183]. Наиболее хорошо изучены НАФ состава $\text{NaYF}_4:\text{Yb}^{3+}:\text{Er}^{3+}/\text{Tm}^{3+}$, которые активно используются в биомедицинских приложениях [137, 184, 185].

Уникальные оптические свойства НАФ основаны на феномене ап-конверсии – нелинейном оптическом процессе, в котором наночастица последовательно поглощает два или более низкоэнергетических фото-

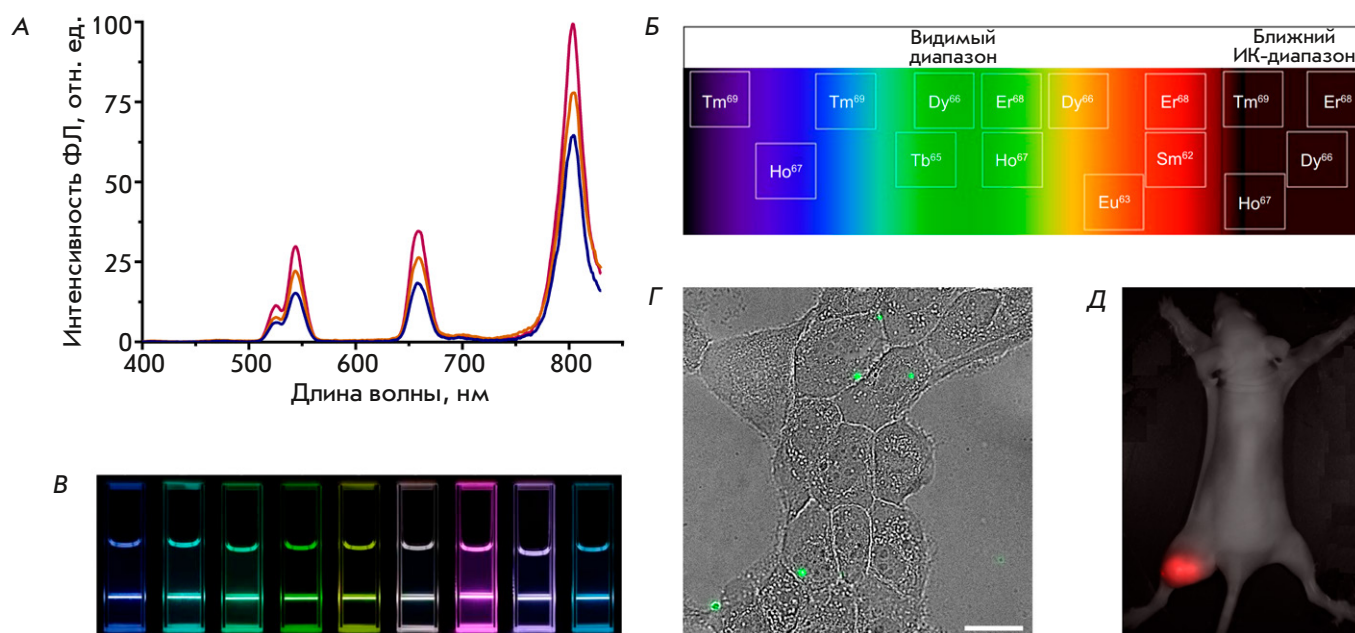


Рис. 6. А – спектр эмиссии ФЛ НАФ состава NaYF₄:Yb,Er,Tm при возбуждении светом с длиной волны 980 нм различной мощности. Б – зависимость между типом легирующего иона и длиной волны излучения НАФ. Адаптировано из [187] с разрешения правообладателя: Dove Medical Press Ltd. © 2019 Informa PLC, London. В – фотографии коллоидных растворов НАФ различного состава при облучении светом с длиной волны 980 нм. Адаптировано из [188] с разрешения правообладателя: John Wiley and Sons. © 2013 WILEY-VCH Verlag GmbH & Co. KGaA, Weinheim. Г – визуализация клеток линии SK-BR-3 целевыми комплексами на основе НАФ состава NaYF₄:Yb,Er. Наложение просветного изображения и ФЛ-сигнала в диапазоне 420–840 нм, полученных с помощью системы широкопольной флуоресцентной микроскопии. Масштабный отрезок 20 мкм. Д – визуализация ксенографтной опухоли SK-BR-3 тераностическими комплексами на основе НАФ состава NaYF₄:Yb,Tm. Наложение светлопольного изображения и ФЛ-сигнала в диапазоне 485–831 нм, полученных с помощью лабораторной имиджинговой системы

на и испускает высокоэнергетический фотон с более короткой длиной волны. Энергия возбуждающего ИК-света поглощается ионами сенсibilизатора (Yb³⁺) и безызлучательно передается на окружающие ионы-сенсibilизаторы Yb³⁺ и ионы-активаторы Er³⁺ и/или Tm³⁺. Возбужденные состояния ионов лантаноидов являются долгоживущими, что создает возможность поглощения более одного кванта света с последующей передачей энергии тому же иону-активатору. Энергия на этих ионах аккумулируется, что вызывает их переход на высокие энергетические уровни. Возвращение в исходное состояние сопровождается либо безызлучательной передачей энергии, либо испусканием фотонов с энергиями, превосходящими энергию возбуждающего света. Ионы Er³⁺ и Tm³⁺ имеют несколько энергетических уровней, что обеспечивает несколько узких пиков эмиссии в видимой и ИК-областях спектра (рис. 6) [186].

Благодаря своим фотофизическим свойствам, НАФ обладают рядом преимуществ перед другими флуорофорами, применяемыми в биомедицине. Выраженные максимумы эмиссии дают возмож-

ность регистрировать ФЛ-сигнал, четко отличая его от автофлуоресценции ткани и рассеянного возбуждающего излучения. Возбуждение ФЛ ближним ИК-светом, попадающим в окно прозрачности биоткани, позволяет добиться большей глубины визуализации. При использовании НАФ, легированных тулием, максимум эмиссии ФЛ также находится в ближней ИК-области. Продолжительное время жизни ФЛ (до миллисекунд) позволяет реализовать оптические схемы отложенной регистрации, увеличивая соотношение сигнал/шум [189]. Наконец, НАФ обладают высокой химической и фотостабильностью и невысокой токсичностью [190, 191].

Среди ограничений использования НАФ нужно отметить невысокие значения коэффициента конверсии излучения (в пределах 1–2%) в сравнении с линейными флуоресцентными материалами. Как и в случае других наноматериалов, необходимы надежные и стабильные методики получения, модификации и функционализации НАФ, равно как и исследование возможных негативных последствий их применения [183, 185, 192, 193]. Несмотря на это, по-

лучено множество свидетельств успешного использования НАФ в создании агентов для оптического и мультимодального имиджинга [194, 195], сенсоров [196, 197], агентов для фотодинамической и фототермальной терапии [198, 199].

На сегодняшний день НАФ представляют собой не просто превосходные визуализирующие агенты для флуоресцентной диагностики, но также и высокоэффективную платформу для сборки мультифункциональных комплексов в рамках тераностики [200–202]. Так, возможность модификации их поверхности посредством таргетных модулей иммуноглобулиновой и неиммуноглобулиновой природы позволяет использовать НАФ для высокоточной оптической диагностики онкологических заболеваний. Показана возможность использования НАФ для специфической визуализации опухолевых клеток и экспериментальных опухолей [190, 203–206]. Присоединение к биосовместимым НАФ бифункциональных таргетных токсинов, специфичных к опухолевым клеткам определенного молекулярного профиля, позволяет реализовать терапевтический потенциал создаваемых комплексов [207, 208], в том числе с использованием преимуществ сочетанной терапии. Показано усиление эффективности терапевтических модулей (β -эмиттера и таргетного токсина) более чем на два порядка в отношении опухолевых клеток при одновременном воздействии в составе тераностического наноконструкта [209].

НАФ позволяют применять глубоко проникающее ИК-излучение для возбуждения ФЛ с последующей передачей на органическую молекулу-эффектор (в случае фотодинамической терапии) или золотые/серебряные наночастицы (при фототермической терапии). В ряде работ показано эффективное фотодинамическое воздействие на опухолевые клетки с использованием комплексов НАФ с малыми молекулами (бенгальский розовый, рибофлавин) [210] и фототоксическими белками (KillerRed, mCherry) [106, 211].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Разработка разнообразных наноматериалов, обладающих фотолюминесцентными свойствами, значительно расширила арсенал подходов, применяемых в современной биомедицине. Уникальные фотофизические свойства новых материалов позволяют существенно улучшить чувствительность и специфичность диагностических методов, а также дают возможность применять тераностический подход к лечению с использованием конъюгатов ФЛ-наночастиц с функциональными макромолекулами. Размер и поверхностные свойства ФЛ-наночастиц обеспечивают эффективную доставку низкомолеку-

лярных терапевтических агентов различной природы, а также биологически активных макромолекул. Несмотря на положительные особенности, присущие каждому типу описанных выше ФЛ-наноматериалов, необходимо признать, что у них есть и общий недостаток, который является ключевой проблемой, препятствующей их активному внедрению в широкую клиническую практику. Речь идет о реакции иммунной системы организма на наноматериалы, вводимые в кровоток с целью системной доставки. Клетки иммунной системы, обеспечивающие защиту от любых чужеродных агентов, атакуют наноматериалы, в результате чего они не достигают патогенных клеток-мишеней, а вместо этого быстро инактивируются и накапливаются в здоровых тканях, прежде всего в печени. Проблему короткой циркуляции наночастиц традиционно пытались решать путем покрытия инертными полимерами, маскирующими их от иммунной системы. Эта технология создания так называемых стелс-наноагентов, прежде всего липосом, использовалась неоднократно в течение последних десятилетий, однако не обеспечила кардинального решения указанной проблемы. Недавно предложен принципиально новый подход, позволяющий существенно продлить время циркуляции наноагентов и, как следствие, увеличить их терапевтическую активность. Он не требует какой-либо модификации наночастиц. Подход, названный «цитоблокадой мононуклеарной фагоцитарной системы», заключается во введении в организм относительно небольшого количества антител против собственных эритроцитов. В результате иммунная система «сосредотачивается» на атаке на собственные эритроциты и на какое-то время «перестает видеть» вводимые наноматериалы. За это время они способны найти целевые патогенные объекты и обеспечить терапевтическое действие. Важная характерная черта данного подхода – его универсальность, т.е. независимость от природы, размера и других свойств наночастиц [212]. К этому подходу идеологически близок способ, при котором в организм сначала вводят «инертные» наноагенты, вызывающие на себя атаку иммунной системы, и только потом наночастицы с лекарством [213]. Таким образом, следует заключить, что исследования, направленные на практическое применение тераностических ФЛ-препаратов, должны фокусироваться на сочетании высокоэффективных адресных наноагентов, способных с высокой точностью распознать патогенный очаг [214], и технологиях, обеспечивающих достаточно продолжительное время циркуляции наноагентов в кровотоке. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке РФФИ (проект № 19-14-50575).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dykman L.A., Khlebtsov N.G. // *Biomaterials*. 2016. V. 108. P. 13–34. doi: 10.1016/j.biomaterials.2016.08.040
2. Singh P., Pandit S., Mokkapati V.R.S.S., Garg A., Ravikumar V., Mijakovic I. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 7. P. 1979. doi: 10.3390/ijms19071979
3. Azharuddin M., Zhu G.H., Das D., Ozgur E., Uzun L., Turner A.P.F., Patra H.K. // *Chem. Commun. (Camb.)*. 2019. V. 55. № 49. P. 6964–6996. doi: 10.1039/c9cc01741k
4. Chan W.C., Maxwell D.J., Gao X., Bailey R.E., Han M., Nie S. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2002. V. 13. № 1. P. 40–46. doi: 10.1016/s0958-1669(02)00282-3
5. Watson A., Wu X., Bruchez M. // *Biotechniques*. 2003. V. 34. № 2. P. 296–300. doi: 10.2144/03342bi01
6. Pleskova S., Mikheeva E., Gornostaeva E. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018. V. 1048. P. 323–334. doi: 10.1007/978-3-319-72041-8_19
7. Ozkan M. // *Drug Discov. Today*. 2004. V. 9. № 24. P. 1065–1071. doi: 10.1016/S1359-6446(04)03291-X
8. Gao X., Yang L., Petros J.A., Marshall F.F., Simons J.W., Nie S. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2005. V. 16. № 1. P. 63–72. doi: 10.1016/j.copbio.2004.11.003
9. Wen L., Qiu L., Wu Y., Hu X., Zhang X. // *Sensors*. 2017. V. 17. P. 1736. doi: 10.3390/s17081736
10. Mansur H.S. // *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* 2010. V. 2. P. 113–129. doi: 10.1002/wnan.78
11. Kutova O.M., Guryev E.L., Sokolova E.A., Alzeibak R., Balalaeva I.V. // *Cancers*. 2019. V. 11. P. 68. doi: 10.3390/cancers11010068
12. Cai W., Shin D.-W., Chen K., Gheysens O., Cao Q., Wang S.X., Gambhir S.S., Chen X. // *Nano Lett.* 2006. V. 6. № 4. P. 669–676. doi: 10.1021/nl052405t
13. Hines M.A., Guyot-Sionnest P. // *J. Phys. Chem.* 1996. V. 100. P. 468–471. doi: 10.1021/jp9530562
14. Parra G.G., Ferreira L.P., Gonçalves P.J., Sizova S.V., Oleinikov V.A., Morozov V.N., Kuzmin V.A., Borissevitch I.E. // *Nanoscale Res. Lett.* 2018. V. 13. № 1. P. 40. doi: 10.1186/s11671-018-2449-x
15. Wegner K.D., Dussert F., Truffier-Boutry D., Benayad A., Beal D., Mattera L., Ling W.L., Carrière M., Reiss P. // *Front. Chem.* 2019. V. 7. P. 466. doi: 10.3389/fchem.2019.00466
16. Baláž P., Baláž M., Dutková E., Zorkovská A., Kováč J., Hronec P., Kováč J.Jr., Čaplovičová M., Mojžiš J., Mojžišová G., et al. // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2016. V. 58. P. 1016–1023. doi: 10.1016/j.msec.2015.09.040
17. Modlitbová P., Pořízka P., Novotný K., Drbohlavová J., Chamradová I., Farka Z., Zlámalová-Gargošová H., Romih T., Kaiser J. // *Ecotoxicol. Environ. Saf.* 2018. V. 153. P. 23–31. doi: 10.1016/j.ecoenv.2018.01.044
18. Wageh S., Maize M., Donia A.M., Al-Ghamdi A.A., Umar A. // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2015. V. 15. № 12. P. 9861–9867. doi: 10.1166/jnn.2015.10346
19. Pellegrino T., Manna L., Kudera S., Liedl T., Koktysh D., Rogach A.L., Keller S., Radler J., Natile G., Parak W.J. // *Nano Lett.* 2004. V. 4. P. 703–707. doi: 10.1021/nl035172j
20. Tomczak N., Liu R., Vancso J.G. // *Nanoscale*. 2013. V. 5. № 24. P. 12018–12032. doi: 10.1039/c3nr03949h
21. Gofman V.V., Aubert T., Ginste D.V., van Deun R., Beloglazova N.V., Hens Z., De Saeger S., Goryacheva I.Y. // *Biosens. Bioelectron.* 2016. V. 79. P. 476–481. doi: 10.1016/j.bios.2015.12.079
22. Foubert A., Beloglazova N.V., Rajkovic A., Sas B., Madder A., Goryacheva I.Y., De Saeger S. // *Trends Anal. Chem.* 2016. V. 83. P. 31–48. doi: 10.1016/j.trac.2016.07.008
23. Rousserie G., Sukhanova A., Even-Desrumeaux K., Fleury F., Chames P., Baty D., Oleinikov V., Pluot M., Cohen J.H., Nabiev I. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2010. V. 74. № 1. P. 1–15. doi: 10.1016/j.critrevonc.2009.04.006
24. Durr N.J., Larson T., Smith D.K., Korgel B.A., Sokolov K., Ben-Yakar A. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. P. 941–945. doi: 10.1021/nl062962v
25. Medintz I.L., Uyeda H.T., Goldman E.R., Mattoussi H. // *Nat. Mater.* 2005. V. 4. № 6. P. 435–446. doi: 10.1038/nmat1390
26. Smith A., Duan H., Mohs A., Nie S. // *Adv. Drug Del. Rev.* 2008. V. 60. № 11. P. 1226–1240. doi: 10.1016/j.addr.2008.03.015
27. Sperling R.A., Parak W.J. // *Philos. Trans. R. Soc. A. Math. Phys. Eng. Sci.* 2010. V. 368. № 1915. P. 1333–1383. doi: 10.1098/rsta.2009.0273
28. Sukhanova A., Venteo L., Devy J., Artemyev M., Oleinikov V., Pluot M., Nabiev I. // *Lab. Invest.* 2002. V. 82. P. 1259–1261. doi: 10.1097/01.lab.0000027837.13582.e8
29. Jiang W., Mardiyani S., Fischer H., Chan W.C.W. // *Chem. Mater.* 2006. V. 18. P. 872–878. doi: 10.1021/cm051393+
30. Yu Y., Duan S., He J., Liang W., Su J., Zhu J., Hu N., Zhao Y., Lu X. // *Oncol. Rep.* 2016. V. 36. № 2. P. 886–892. doi: 10.3892/or.2016.4866
31. Tomlinson I.D., Kovtun O., Crescentini T.M., Rosenthal S.J. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2019. V. 29. № 8. P. 959–964. doi: 10.1016/j.bmcl.2019.02.024
32. Nikitin M.P., Zdobnova T.A., Lukash S.V., Stremovskiy O.A., Deyev S.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 13. P. 5827–5832. doi: 10.1073/pnas.1001142107
33. Zdobnova T.A., Dorofeev S.G., Tananaev P.N., Vasiliev R.B., Balandin T.G., Edelweiss E.F., Stremovskiy O.A., Balalaeva I.V., Turchin I.V., Lebedenko E.N., et al. // *J. Biomed. Opt.* 2009. V. 14. № 2. P. 021004. doi: 10.1117/1.3122775
34. Zdobnova T.A., Stremovskiy O.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 10. e48248. doi: 10.1371/journal.pone.0048248
35. Balalaeva I.V., Zdobnova T.A., Krutova I.V., Brillkina A.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // *J. Biophotonics*. 2012. P. 1–8. doi: 10.1002/jbio.201200080
36. Buranda T., Wu Y., Sklar L.A. // *Methods Mol. Biol.* 2011. V. 699. P. 67–84. doi: 10.1007/978-1-61737-950-5_4
37. Kovtun O., Ross E.J., Tomlinson I.D., Rosenthal S.J. // *Chem. Commun. (Camb.)*. 2012. V. 48. № 44. P. 5428–5430. doi: 10.1039/c2cc31951a
38. Sun J.Z., Chen C., Jiang G., Tian W.Q., Li Y., Sun S.R. // *Int. J. Nanomedicine*. 2014. V. 9. P. 1339–1346. doi: 10.2147/IJN.S58881
39. Tang T., Zhang D.L. // *Oncol. Lett.* 2017. V. 13. № 5. P. 2937–2944. doi: 10.3892/ol.2017.5856
40. Beloglazova N.V., Sobolev A.M., Tessier M.D., Hens Z., Goryacheva I.Y., De Saeger S. // *Methods*. 2017. V. 116. P. 141–148. doi: 10.1016/j.jymeth.2017.01.004
41. Suzuki M., Udaka H., Fukuda T. // *J. Pharm. Biomed. Anal.* 2017. V. 143. P. 110–115. doi: 10.1016/j.jpba.2017.05.014
42. Dahan M., Lévi S., Luccardini C., Rostaing P., Riveau B., Triller A. // *Science*. 2003. V. 302. № 5644. P. 442–445. doi: 10.1126/science.1088525
43. Lidke D.S., Nagy P., Heintzmann R., Arndt-Jovin D.J., Post J.N., Grecco H.E., Jares-Erijman E.A., Jovin T.M. // *Nat. Biotech.* 2004. V. 22. № 2. P. 198–203. doi: 10.1038/nbt929
44. Madhankumar A.B., Mrowczynski O.D., Patel S.R., Weston C.L., Zacharia B.E., Glantz M.J., Siedlecki C.A., Xu L.C., Connor J.R. // *Acta Biomater.* 2017. V. 58. P. 205–213. doi: 10.1016/j.actbio.2017.06.002
45. Echarte M.M., Bruno L., Arndt-Jovin D.J., Jovin T.M., Pietrasanta L.I. // *FEBS Lett.* 2007. V. 581. № 16. P. 2905–2913. doi: 10.1016/j.febslet.2007.05.041

46. Arora N., Syed A., Sander S., Smith E.A. // *Phys. Biol.* 2014. V. 11. № 6. P. 066001. doi: 10.1088/1478-3975/11/6/066001
47. Bailey D.M., Kovtun O., Rosenthal S.J. // *Methods Mol. Biol.* 2017. V. 1570. P. 165–177. doi: 10.1007/978-1-4939-6840-4_11
48. Chang J.C., Rosenthal S.J. // *ACS Chem. Neurosci.* 2012. V. 3. № 10. P. 737–743. doi: 10.1021/cn3000845
49. Efros A.L., Nesbitt D.J. // *Nat. Nanotechnol.* 2016. V. 11. № 8. P. 661–671. doi: 10.1038/nnano.2016.140
50. Omogo B., Gao F., Bajwa P., Kaneko M., Heyes C.D. // *ACS Nano.* 2016. V. 10. № 4. P. 4072–4082. doi: 10.1021/acsnano.5b06994
51. Thomas E.M., Ghimire S., Kohara R., Anil A.N., Yuyama K.I., Takano Y., Thomas K.G., Biju V. // *ACS Nano.* 2018. V. 12. № 9. P. 9060–9069. doi: 10.1021/acsnano.8b03010
52. Susha A.S., Javier A.M., Parak W.J., Rogach A.L. // *Colloids Surf. A.* 2006. V. 281. P. 40–43. doi: 10.1016/j.colsurfa.2006.02.014
53. Shang L., Zhang L., Dong S. // *Analyst.* 2009. V. 134. № 1. P. 107–113. doi: 10.1039/b812458b
54. Generalova A.N., Oleinikov V.A., Sukhanova A., Artemyev M.V., Zubov V.P., Nabiev I. // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 39. № 1. P. 187–193. doi: 10.1016/j.bios.2012.07.030
55. Zhang H., Zhang L., Liang R.P., Huang J., Qiu J.D. // *Anal. Chem.* 2013. V. 85. № 22. P. 10969–10976. doi: 10.1021/ac402496e
56. Kavosia B., Navaee A., Salimi A. // *Luminescence.* 2018. V. 204. P. 368–374. doi: 10.1016/j.jlumin.2018.08.012
57. Patolsky F., Gill R., Weizmann Y., Mokari T., Banin U., Willner I. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. № 46. P. 13918–13919. doi: 10.1021/ja035848c
58. Guo Y., Sakonsinsiri C., Nehlmeier I., Fascione M.A., Zhang H., Wang W., Pöhlmann S., Turnbull W.B., Zhou D. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2016. V. 55. № 15. P. 4738–4472. doi: 10.1002/anie.201600593
59. Yang L.H., Ahn D.J., Koo E. // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2016. V. 69. P. 625–630. doi: 10.1016/j.msec.2016.07.021
60. Algar R.W., Tavares A.J., Krull U.J. // *Anal. Chim. Acta.* 2010. V. 673. P. 1–25. doi: 10.1016/j.aca.2010.05.026
61. Hu J., Wang Z.Y., Li C.C., Zhang C.Y. // *Chem. Commun. (Camb.)* 2017. V. 53. № 100. P. 13284–13295. doi: 10.1039/c7cc07752a
62. Lesiak A., Drzozga K., Cabaj J., Bański M., Malecha K., Podhorodecki A. // *Nanomaterials (Basel).* 2019. V. 9. № 2. P. E192. doi: 10.3390/nano9020192
63. Cassette E., Helle M., Bezdetnaya L., Marchal F., Dubertret B., Pons T. // *Adv. Drug. Deliv. Rev.* 2013. V. 65. № 5. P. 719–731. doi: 10.1016/j.addr.2012.08.016
64. Balalaeva I.V., Zdobnova T.A., Sokolova E.A., Deyev S.M. // *Rus. J. Bioorganic Chem.* 2015. V. 41. № 5. P. 536–542. doi: 10.1134/s1068162015050040
65. Akerman M.E., Chan W.C.W., Laakkonen P., Bhatia S.N., Ruoslahti E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 20. P. 12617. doi: 10.1073/pnas.152463399
66. Gao X., Cui Y., Levenson R.M., Chung L.W.K., Nie S. // *Nat. Biotech.* 2004. V. 22. № 8. P. 969–976. doi: 10.1038/nbt994
67. Helle M., Cassette E., Bezdetnaya L., Pons T., Leroux A., Plénat F., Guillemin F., Dubertret B., Marchal F. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 8. e44433. doi: 10.1371/journal.pone.0044433
68. Jeong S., Jung Y., Bok S., Ryu Y.M., Lee S., Kim Y.E., Song J., Kim M., Kim S.Y., Ahn G.O., et al. // *Adv. Healthc. Mater.* 2018. V. 7. № 2. e1800695. doi: 10.1002/adhm.201800695
69. Mangeolle T., Yakavets I., Lequeux N., Pons T., Bezdetnaya L., Marchal F. // *Photodiagnosis Photodyn. Ther.* 2019. V. 26. P. 150–156. doi: 10.1016/j.pdpdt.2019.03.010
70. Si C., Zhang Y., Lv X., Yang W., Ran Z., Sun P. // *J. Surg. Res.* 2014. V. 192. № 2. P. 305–311. doi: 10.1016/j.jss.2014.07.028
71. Bakalova R., Zhelev Z., Nikolova B., Murayama S., Lazarova D., Tsoneva I., Aoki I. // *Gen. Physiol. Biophys.* 2015. V. 34. № 4. P. 393–398. doi: 10.4149/gpb_2015007
72. Wang H., Yang H., Xu Z.P., Liu X., Roberts M.S., Liang X. // *Pharmaceutics.* 2018. V. 10. № 4. P. E244. doi: 10.3390/pharmaceutics10040244
73. Han H.S., Niemeyer E., Huang Y., Kamoun W.S., Martin J.D., Bhaumik J., Chen Y., Roberge S., Cui J., Martin M.R., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. № 5. P. 1350–1355. doi: 10.1073/pnas.1421632111
74. Zhang Z., Yuan Y., Liu Z., Chen H., Chen D., Fang X., Zheng J., Qin W., Wu C. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2018. V. 10. № 32. P. 26928–26935. doi: 10.1021/acsnano.8b08735
75. Ipe B.I., Lehnig M., Niemeyer C.M. // *Small.* 2005. V. 1. № 7. P. 706–709. doi: 10.1002/smll.200500105
76. Shen Y., Sun Y., Yan R., Chen E., Wang H., Ye D., Xu J.J., Chen H.Y. // *Biomaterials.* 2017. V. 148. P. 31–40. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.09.026
77. Savla R., Taratula O., Garbuzenko O., Minko T. // *J. Control. Release.* 2011. V. 153. № 1. P. 16–22. doi: 10.1016/j.jconrel.2011.02.015
78. Yang X., Zhang W., Zhao Z., Li N., Mou Z., Sun D., Cai Y., Wang W., Lin Y. // *J. Inorg. Biochem.* 2017. V. 167. P. 36–48. doi: 10.1016/j.jinorgbio.2016.11.023
79. Zhu H., Zhang S., Ling Y., Meng G., Yang Y., Zhang W. // *J. Control. Release.* 2015. V. 220 (Pt A). P. 529–544. doi: 10.1016/j.jconrel.2015.11.017
80. Lin G., Chen T., Zou J., Wang Y., Wang X., Li J., Huang Q., Fu Z., Zhao Y., Lin M.C., et al. // *Front. Pharmacol.* 2017. V. 8. P. 182. doi: 10.3389/fphar.2017.00182
81. Fan J., Sun Y., Wang S., Li Y., Zeng X., Cao Z., Yang P., Song P., Wang Z., Xian Z., et al. // *Biomaterials.* 2016. V. 78. P. 102–114. doi: 10.1016/j.biomaterials.2015.11.029
82. Yong K.T., Law W.C., Hu R., Ye L., Liu L., Swihart M.T., Prasad P.N. // *Chem. Soc. Rev.* 2013. V. 42. № 3. P. 1236–1250. doi: 10.1039/c2cs35392j
83. Sharma V.K., McDonald T.J., Sohn M., Anquandah G.A.K., Pettine M., Zboril R. // *Chemosphere.* 2017. V. 188. P. 403–413. doi: 10.1016/j.chemosphere.2017.08.130
84. Yang R.S., Chang L.W., Wu J.P., Tsai M.H., Wang H.J., Kuo Y.C., Yeh T.K., Yang C.S., Lin P. // *Environ. Health. Perspect.* 2007. V. 115. № 9. P. 1339–1343. doi: 10.1289/ehp.10290
85. Fitzpatrick J.A., Andreko S.K., Ernst L.A., Waggoner A.S., Ballou B., Bruchez M.P. // *Nano Lett.* 2009. V. 9. № 7. P. 2736–2741. doi: 10.1021/nl901534q
86. Carvalho S.M.D., Mansur A.A.P., Mansur H.S., Guedes M.I.M.C., Lobato Z.I.P., Leite M.F. // *Mater. Sci. Eng. C Mater. Biol. Appl.* 2017. V. 71. P. 412–424. doi: 10.1016/j.msec.2016.10.023
87. Zheng J., Zhang C.W., Dickson R.M. // *Phys. Rev. Lett.* 2004. V. 93. P. 077402. doi: 10.1103/PhysRevLett.93.077402
88. Palmal S., Jana N.R. // *WIREs Nanomed. Nanobiotechnol.* 2014. V. 6. № 1. P. 102–110. doi: 10.1002/wnan.1245
89. Wen F., Dong Y., Feng L., Wang S., Zhang S., Zhang X. // *Anal. Chem.* 2011. V. 83. P. 1193–1196. doi: 10.1021/ac1031447
90. Wang Y., Chen J.-T., Yan X.-P. // *Anal. Chem.* 2013. V. 85. P. 2529–2535. doi: 10.1021/ac303747t
91. Liu M., Tang F., Yang Z., Xu J., Yang X. // *J. Anal. Methods. Chem.* 2019. 1095148. doi: 10.1155/2019/1095148
92. El-Sayed I.H., Huang X., El-Sayed M.A. // *Cancer Lett.* 2006. V. 239. № 1. P. 129–135. doi: 10.1016/j.canlet.2005.07.035
93. Chen D., Luo Z., Li N., Lee J.Y., Xie J., Lu J. // *Adv. Funct. Mater.* 2013. V. 23. P. 4324–4331. doi: 10.1002/adfm.201300411
94. Xia F., Hou W., Zhang C., Zhi X., Cheng J., de la Fuente J.M., Song J., Cui D. // *Acta Biomater.* 2018. V. 68. P. 308–319. doi: 10.1016/j.actbio.2017.12.034
95. Proshkina G., Deyev S., Ryabova A., Tavanti F., Menziani

- M.C., Cohen R., Katrivas L., Kotlyar A. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2019. V. 11. № 38. P. 34645–34651. doi: 10.1021/acsami.9b10441.
96. Wang C., Wang Y., Xu L., Shi X., Li X., Xu X., Sun H., Yang B., Lin Q. // *Small*. 2013. V. 9. № 3. P. 413–420. doi: 10.1002/sml.201201849
97. 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. doi: 10.1021/acs.bioconjugchem.7b00410.
98. Zhang W., Ye J., Zhang Y., Li Q., Dong X., Jianga H., Wang X. // *RSC Adv*. 2015. V. 5. № 78. P. 63821–63826. doi: 10.1039/C5RA11321K
99. Wang X., Cai X., Hu J., Shao N., Wang F., Zhang Q., Xiao J., Cheng Y. // *J. Am. Chem. Soc*. 2013. V. 135. № 26. P. 9805–9810. doi: 10.1021/ja402903h
100. Qin L., He X., Chen L., Zhang Y. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2015. V. 7. № 10. P. 5965–5971. doi: 10.1021/acsami.5b00269
101. Chen Z., Qian S., Chen J., Cai J., Wu S., Cai Z. // *Talanta*. 2012. V. 94. P. 240–245. doi: 10.1016/j.talanta.2012.03.033
102. Li W., Chen X. // *Nanomedicine (London)*. 2015. V. 10. № 2. P. 299–320. doi: 10.2217/nnm.14.169
103. Zhou Y., Tang L., Zeng G., Chen J., Wang J., Fan C., Yang G., Zhang Y., Xie X. // *Biosens. Bioelectron*. 2015. V. 65. P. 382–389. doi: 10.1016/j.bios.2014.10.063
104. Wang H.H., Lin C.A.J., Lee C.H., Lin Y., Tseng Y.-M., Hsieh C.-L., Chen C.-H., Tsai C.-H., Hsieh C.-T., Shen J., et al. // *ACS Nano*. 2011. V. 5. № 6. P. 4337–4344. doi: 10.1021/nn102752a
105. Tao Y., Li Z., Ju E., Ren J., Qu X. // *Nanoscale*. 2013. V. 5. № 13. P. 6154–6160. doi: 10.1039/c3nr01326j
106. Liang L., Lu Y., Zhang R., Care A., Ortega T.A., Deyev S.M., Qian Y., Zvyagin A.V. // *Acta Biomaterialia*. 2017. V. 51. P. 461–470. doi: 10.1016/j.actbio.2017.01.004
107. Kefayat A., Ghahremani F., Motaghi H., Amouheidari A. // *Nanomedicine*. 2019. V. 16. P. 173–184. doi: 10.1016/j.nano.2018.12.007
108. Hainfeld J.F., Smilowitz H.M., O'Connor M.J., Dilmanian F.A., Slatkin D.N. // *Nanomed*. 2013. V. 8. P. 1601–1609. doi: 10.2217/nnm.12.165
109. Lopez-Chaves C., Soto-Alvaredo J., Montes-Bayon M., Betterm J., Llopis J., Sanchez-Gonzalez C. // *Nanomedicine*. 2018. V. 14. № 1. P. 1–12. doi: 10.1016/j.nano.2017.08.011.
110. Raftis J.B., Miller M.R. // *Nano Today*. 2019. V. 26. P. 8–12. doi: 10.1016/j.nantod.2019.03.010
111. Xu X., Ray R., Gu Y., Ploehn H.J., Gearheart L., Raker K., Scrivens W.A. // *J. Am. Chem. Soc*. 2004. V. 126. P. 12736–12737. doi: 10.1021/ja040082h
112. Sun Y.P., Zhou B., Lin Y., Wang W., Fernando K.A., Pathak P., Meziani M.J., Harruff B.A., Wang X., Wang H., et al. // *J. Am. Chem. Soc*. 2006. V. 128. P. 7756–7757. doi: 10.1021/ja062677d
113. Himaja A.L., Karthik P.S., Singh S.P. // *Chem. Rec*. 2015. V. 15. P. 595–615. doi: 10.1002/tcr.201402090
114. Mishra V., Patil A., Thakur S., Kesharwani P. // *Drug Discov. Today*. 2018. V. 23. № 6. P. 1219–1232. doi: 10.1016/j.drudis.2018.01.006
115. Boakye-Yiadom K.O., Kesse S., Opoku-Damoah Y., Filli M.S., Aquib M., Joelle M.M.B., Farooq M.A., Mavlyanova R., Raza F., Bavi R., et al. // *Int. J. Pharm*. 2019. V. 10. № 564. P. 308–317. doi: 10.1016/j.ijpharm.2019.04.055
116. Du J., Xu N., Fan J., Sun W., Peng X. // *Small*. 2019. V. 15. № 32. e1805087. doi: 10.1002/sml.201805087
117. Nekouei K., Amiri M., Sillanpää M., Marken F., Boukherroub R., Szunerits S. // *Chem. Soc. Rev*. 2019. V. 48. № 15. P. 4281–4316. doi: 10.1039/c8cs00445e
118. Li J., Tang K., Yu J., Wang H., Tu M., Wang X. // *R. Soc. Open Sci*. 2019. V. 6. № 1. P. 181557. doi: 10.1098/rsos.181557
119. Lu S.S., Guo S.S., Xu P.X., Li X.R., Zhao Y.M., Gu W., Xue M. // *Int. J. Nanomedicine*. 2016. V. 11. P. 6325–6336. doi: 10.2147/IJN.S119252
120. Algarra M., Campos B.B., Radotić K., Mutavdžić D., Bandoz T., Jiménez-Jiménez J., Rodríguez-Castellón E., Esteves da Silva J.C.G. // *J. Mater. Chem. A*. 2014. № 2. P. 8342–8351. doi: 10.1039/C4TA00264D
121. Kim Y., Jang G., Lee T.S. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2015. V. 7. P. 15649–15657. doi: 10.1021/acsami.5b04724
122. Zhang Z., Shi Y., Pan Y., Cheng X., Zhang L., Chen J., Li M.-J., Yi C. // *J. Mater. Chem. B*. 2014. V. 2. P. 5020–5027. doi: 10.1039/c4tb00677a
123. Yuan C., Liu B., Liu F., Han M.Y., Zhang Z. // *Anal. Chem*. 2014. V. 86. № 2. P. 1123–1130. doi: 10.1021/ac402894z
124. Zhu A., Qu Q., Shao X., Kong B., Tian Y. // *Angew. Chem. Int. Ed*. 2012. V. 51. P. 7185–7189. doi: 10.1002/anie.201109089
125. Qu Q., Zhu A., Shao X., Shi G., Tian Y. // *Chem. Commun*. 2012. V. 48. P. 5473–5475. doi: 10.1039/c2cc31000g
126. Zhu L., Cui X., Wu J., Wang Z., Wang P., Hou Y., Yang M. // *Anal. Methods*. 2014. V. 6. P. 4430–4436. doi: 10.1039/C4AY00717D
127. Wu Y., Wei P., Pengpumpkiat S., Schumacher E.A., Remcho V.T. // *Anal. Chem*. 2015. V. 87. P. 8510–8516. doi: 10.1021/acs.analchem.5b02019
128. Shi W., Li X., Ma H. // *Angew. Chem. Int. Ed*. 2012. V. 51. P. 6432–6435. doi: 10.1002/anie.201202533
129. Du F., Ming Y., Zeng F., Yu C., Wu S. // *Nanotechnology*. 2013. V. 24. P. 365101. doi: 10.1088/0957-4484/24/36/365101
130. Wang C., Hu T., Thomas T., Song S., Wen Z., Wang C., Song Q., Yang M. // *Royal Soc. Chem*. 2018. V. 10. P. 21809–21817. doi: 10.1039/c8nr07445c
131. Zheng M., Liu S., Li J., Qu D., Zhao H., Guan X., Hu X., Xie Z., Jing X., Sun Z. // *Adv. Mater*. 2014. V. 26. P. 3554–3560. doi: 10.1002/adma.201306192
132. Liu Q., Xu S., Niu C., Li M., He D., Lu Z., Ma L., Na N., Huang F., Jiang H., et al. // *Biosens. Bioelectron*. 2015. V. 64. P. 119–125. doi: 10.1016/j.bios.2014.08.052
133. Mewada A., Pandey S., Thakur M., Jadhav D., Sharon M. // *J. Mater. Chem. B*. 2014. V. 2. P. 698–705. doi: 10.1039/c3tb21436b
134. Singh R.K., Patel K.D., Mahapatra C., Kang M.S., Kim H.-W. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2016. V. 8. № 37. P. 24433–24444. doi: 10.1021/acsami.6b07494
135. Liu J.J., Li D.W., Zhang K., Yang M.X., Sun H.C., Yang B. // *Small*. 2018. V. 14. P. 1703919. doi: 10.1002/sml.201703919
136. Li Y., Bai G., Zeng S., Hao J. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2019. V. 11. № 5. P. 4737–4744. doi: 10.1021/acsami.8b14877
137. Sreenivasan V.K., Zvyagin A.V., Goldys E.M. // *J. Phys. Condens. Matter*. 2013. V. 25. № 19. P. 194101. doi: 10.1088/0953-8984/25/19/194101
138. Montalti M., Cantelli A., Battistelli G. // *Chem. Soc. Rev*. 2015. V. 44. № 14. P. 4853–4921. doi: 10.1039/c4cs00486h
139. Aharonovich I., Greentree A.D., Praver S. // *Nat. Photonics*. 2011. V. 5. P. 397–405. doi: 10.1038/nphoton.2011.54
140. Xing Y., Dai L. // *Nanomed. (London)*. 2009. V. 4. № 2. P. 207–218. doi: 10.2217/17435889.4.2.207
141. Vajjayanthimala V., Cheng P.Y., Yeh S.H., Liu K.K., Hsiao C.H., Chao J.I., Chang H.C. // *Biomaterials*. 2012. V. 33. № 31. P. 7794–7802. doi: 10.1016/j.biomaterials.2012.06.084.
142. Wu T.J., Tzeng Y.K., Chang W.W., Cheng C.A., Kuo Y., Chien C.H., Chang H.C., Yu J. // *Nat. Nanotechnol*. 2013. V. 8. № 9. P. 682–689. doi: 10.1038/nnano.2013.147
143. Gerstenhaber J.A., Barone F.C., Marcinkiewicz C., Li J.,

- Shiloh A.O., Sternberg M., Lelkes P.I., Feuerstein G. // *Int. J. Nanomedicine*. 2017. V. 12. P. 8471–8482. doi: 10.2147/IJN.S146946
144. van der Laan K., Hasani M., Zheng T., Schirhagl R. // *Small*. 2018. V. 14. № 19. e1703838. doi: 10.1002/sml.201703838
145. Kharin A., Rogov A., Geloan A., Lysenko V., Bonacina L. // *J. Phys. Conf. Series*. 2016. V. 740. P. 012010. doi:10.1088/1742-6596/740/1/012010
146. Mohan N., Chen C.-S., Hsieh H.-H., Wu Y.-C., Chang H.-C. // *Nano Lett.* 2010. V. 10. № 9. P. 3692–3699. doi: 10.1021/nl1021909
147. Faklaris O., Joshi V., Irinopoulou T., Tauc P., Sennour M., Girard H., Gesset C., Arnault J.-C., Thorel A., Boudou J.-P., et al. // *ACS Nano*. 2009. V. 3. № 12. P. 3955–3962. doi: 10.1021/nn901014j
148. Schrand A.M., Huang H., Carlson C., Schlager J.J., Ōsawa E., Hussain S.M., Dai L. // *J. Phys. Chem. B*. 2007. V. 111. № 1. P. 2–7. doi: 10.1021/jp066387v
149. Vaijayanthimala V., Tzeng Y.K., Chang H.C., Li C.L. // *Nanotechnology*. 2009. V. 20. № 42. P. 425103. doi: 10.1088/0957-4484/20/42/425103
150. Huang Y.A., Kao C.W., Liu K.K., Huang H.S., Chiang M.H., Soo C.R., Chang H.C., Chiu T.W., Chao J.I., Hwang E. // *Sci. Rep.* 2014. V. 4. P. 6919. doi: 10.1038/srep06919
151. Fu C.-C., Lee H.-Y., Chen K., Lim T.-S., Wu H.-Y., Lin P.-K., Wei P.-K., Tsao P.-H., Chang H.-C., Fann W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. P. 727–732. doi: 10.1073/pnas.0605409104
152. Zurbuchen M.A., Lake M.P., Kohan S.A., Leung B., Bouchard L.-S. // *Sci. Rep.* 2013. V. 3. P. 2668. doi: 10.1038/srep02668
153. Huang H., Pierstorff E., Osawa E., Ho D. // *Nano Lett.* 2007. V. 7. P. 3305–3314. doi: 10.1021/nl071521o
154. Sachdeva M.S. // *Expert Opin. Investig. Drugs*. 1998. V. 7. P. 1849–1864. doi: 10.1517/13543784.7.11.1849
155. Chu Z., Miu K., Lung P., Zhang S., Zhao S., Chang H.-C., Lin G., Li Q. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 11661. doi: 10.1038/srep11661
156. Yang L., Webster T.J. // *IEEE Pulse*. 2014. V. 5. № 2. P. 34–39. doi: 10.1109/MPUL.2013.2296800
157. Canham L.T. // *Adv. Mater.* 1995. V. 7. P. 1033–1037. doi: 10.1002/adma.19950071215
158. Park J.H., Gu L., von Maltzahn G., Ruoslahti E., Bhatia S.N., Sailor M.J. // *Nat. Mater.* 2009. V. 8. № 4. P. 331–336. doi: 10.1038/nmat2398
159. Chinnathambi S., Chen S., Ganesan S., Hanagata N. // *Adv. Healthc. Mater.* 2014. V. 3. № 1. P. 10–29. doi: 10.1002/adhm.201300157
160. Dasog M., De los Reyes G.B., Titova L.V., Hegmann F.A., Veinot J.G. // *ACS Nano*. 2014. V. 8. № 9. P. 9636–9648. doi: 10.1021/nn504109a
161. Takagahara T., Takeda K. // *Phys. Rev. B Condens. Matter*. 1992. V. 46. № 23. P. 15578–15581. doi: 10.1103/physrevb.46.15578
162. Kim D., Kang J., Wang T., Ryu H.G., Zuidema J.M., Joo J., Kim M., Huh Y., Jung J., Ahn K.H., et al. // *Adv. Mater.* 2017. V. 29. № 39. P. 1703309. doi: 10.1002/adma.201703309
163. Chu B., Wang H., Song B., Peng F., Su Y., He Y. // *Anal. Chem.* 2016. V. 88. № 18. P. 9235–9242. doi: 10.1021/acs.analchem.6b02448
164. Ma S.D., Chen Y.L., Feng J., Liu J.J., Zuo X.W., Chen X.G. // *Anal. Chem.* 2016. V. 88. № 21. P. 10474–10481. doi: 10.1021/acs.analchem.6b02448
165. Wang H., He Y. // *Sensors (Basel)*. 2017. V. 17. № 2. E268. doi: 10.3390/s17020268
166. Erogbogbo F., Tien C.A., Chang C.W., Yong K.T., Law W.C., Ding H., Roy I., Swihart M.T., Prasad P.N. // *Bioconjug. Chem.* 2011. V. 22. № 6. P. 1081–1088. doi: 10.1021/bc100552p
167. Tolstik E., Osminkina L.A., Matthäus C., Burkhardt M., Tsurikov K.E., Natashina U.A., Timoshenko V.Y., Heintzmann R., Popp J., Sivakov V. // *Nanomedicine*. 2016. V. 12. № 7. P. 1931–1940. doi: 10.1016/j.nano.2016.04.004
168. Cao Z., Peng F., Hu Z., Chu B., Zhong Y., Su Y., He S., He Y. // *Nanoscale*. 2017. V. 9. № 22. P. 7602–7611. doi: 10.1039/c7nr00530j
169. Wang Q., Bao Y., Ahire J., Chao Y. // *Adv. Healthc. Mater.* 2012. V. 2. P. 189–198. doi: 10.1002/adhm.201100010
170. Yu X., Yang K., Chen X., Li W. // *Biomaterials*. 2017. V. 143. P. 120–129. doi: 10.1016/j.biomaterials.2017.07.037
171. Bimbo L.M., Mäkilä E., Laaksonen T., Laaksonen T., Laaksonen P., Strommer K., Kauppinen E.I., Salonen J., Linder M.B., Hirvonen J., Santos H.A. // *Biomaterials*. 2011. V. 32. № 34. P. 9089–9099. doi: 10.1016/j.biomaterials.2011.08.011
172. Foraker A.B., Walczak R.J., Cohen M.H., Boiarski T.A., Grove C.F., Swaan P.W. // *Pharm. Res.* 2003. № 20. P. 110–116. doi: 10.1023/a:1022211127890
173. Schwartz M.P., Yu C., Alvarez S.D., Migliori B., Godin D., Chao L., Sailor M.J. // *Phys. Status Solidi A*. 2007. V. 204. P. 1444–1448. doi: 10.1002/pssa.200674380
174. Pastor E., Matveeva E., Valle-Gallego A., Goycoolea F.M., Garcia-Fuentes M. // *Colloid Surf. B*. 2011. V. 88. P. 601–609. doi: 10.1016/j.colsurfb.2011.07.049
175. Wu E.C., Park J.-H., Park J., Segal E., Cunin F., Sailor M.J. // *ACS Nano*. 2008. V. 2. P. 2401–2409. doi: 10.1021/nn800592q
176. Salonen J., Laitinen L., Kaukonen A.M., Tuura J., Björkqvist M., Heikkilä T., Vähä-Heikkilä K., Hirvonen J., Lehto V.-P. // *J. Control. Release*. 2005. V. 108. P. 362–374. doi: 10.1016/j.jconrel.2005.08.017
177. Salonen J., Kaukonen A.M., Hirvonen J., Lehto V.P. // *J. Pharm. Sci.* 2008. V. 97. № 2. P. 632–653. doi: 10.1002/jps.20999
178. Santos H.A., Salonen J., Bimbo L.M., Lehto V.-P., Peltonen L., Hirvonen J. // *J. Drug Deliv. Sci. Tech.* 2011. V. 21. № 2. P. 139–155. doi: 10.1016/S1773-2247(11)50016-4
179. Wang F., Hui H., Barnes T.J., Barnett C., Prestidge C.A. // *Mol. Pharmaceutics*. 2010. V. 7. № 1. P. 227–236. doi: 10.1021/mp900221e
180. Zvyagin A.V., Song Z., Nadort A., Sreenivasan V.K.A., Deyev S.M. *Handbook of Nano-Optics and Nanophotonics*. Berlin, Heidelberg: Springer, 2013. P. 563–596. doi: 10.1007/978-3-642-31066-9_15
181. Tuchin V.V. // *J. Biomed. Photon. Eng.* 2016. V. 2. № 3. P. 3042. doi: 10.18287/JBPE16.02.030201
182. Min Y., Li J., Liu F., Padmanabhan P., Yeow E.K., Xing B. // *Nanomaterials (Basel)*. 2014. V. 4. № 1. P. 129–154. doi: 10.3390/nano4010129
183. Lingeshwar Reddy K., Balaji R., Kumar A., Krishnan V. // *Small*. 2018. V. 14. № 37. e1801304. doi: 10.1002/sml.201801304
184. Song Z., Anissimov Y.G., Zhao J., Nechaev A.V., Nadort A., Jin D., Prow T.W., Roberts M.S., Zvyagin A.V. // *J. Biomed. Opt.* 2012. V. 18. P. 061215. doi: 10.1117/1.JBO.18.6.061215
185. Wen S., Zhou J., Zheng K., Bednarkiewicz A., Liu X., Jin D. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 2415. doi: 10.1038/s41467-018-04813-5
186. Zhan Q., Qian J., Liang H., Somesfalean G., Wang D., He S., Zhang Z., Andersson-Engels S. // *ACS Nano*. 2011. V. 5. № 5. P. 3744–3757. doi: 10.1021/nn200110j
187. Singh R., Dumlupinar G., Andersson-Engels S., Melgar S. // *Int. J. Nanomed.* 2019. V. 14. P. 1027–1038. doi: 10.2147/IJN.S188887
188. Zhong Y., Tian G., Gu Z., Yang Y., Gu L., Zhao Y., Ma Y., Yao J. // *Adv. Mater.* 2014. V. 26. № 18. P. 2831–2837. doi: 10.1002/adma.201304903
189. Zhou J., Liu Q., Feng W., Sun Y., Li F. // *Chem. Rev.* 2015. V. 115. № 1. P. 395–465. doi: 10.1021/cr400478f
190. Generalova A.N., Kochneva I.K., Khaydukov E.V., Semch-

- ishen V.A., Guller A.E., Nechaev A.V., Shekhter A.B., Zubov V.P., Zvyagin A.V., Deyev S.M. // *Nanoscale*. 2015. V. 7. № 5. P. 1709–1717. doi: 10.1039/c4nr05908e
191. Guryev E.L., Shilyagina N.Y., Kostyuk A.B., Sencha L.M., Balalaeva I.V., Vodeneev 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. doi: 10.1093/toxsci/kfz086
192. Muhr V., Wilhelm S., Hirsch T., Wolfbeis O.S. // *Acc. Chem. Res.* 2014. V. 47. № 12. P. 3481–3493. doi: 10.1021/ar500253g
193. Oliveira H., Bednarkiewicz A., Falk A., Fröhlich E., Lisjak D., Prina-Mello A., Resch S., Schimpel C., Vrček I.V., Wysokińska E., et al. // *Adv. Healthc. Mater.* 2019. V. 8. № 1. e1801233. doi: 10.1002/adhm.201801233
194. Chen F., Bu W., Cai W., Shi J. // *Curr. Mol. Med.* 2013. V. 13. № 10. P. 1613–1632. doi: 10.2174/156652401366613111122133
195. Park Y.I., Lee K.T., Suh Y.D., Hyeon T. // *Chem. Soc. Rev.* 2015. V. 44. № 6. P. 1302–1317. doi: 10.1039/c4cs00173g
196. DaCosta M.V., Doughan S., Han Y., Krull U.J. // *Anal. Chim. Acta*. 2014. V. 832. P. 1–33. doi: 10.1016/j.aca.2014.04.030
197. Radunz S., Andresen E., Würth C., Koerdts A., Tschiche H.R., Resch-Genger U. // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. № 12. P. 7756–7764. doi: 10.1021/acs.analchem.9b01174
198. Khaydukov E.V., Mironova K.E., Semchishen V.A., Generalova A.N., Nechaev A.V., Khochenkov D.A., Stepanova E.V., Lebedev O.I., Zvyagin A.V., Deyev S.M., et al. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 35103. doi: 10.1038/srep35103
199. Li P., Yan Y., Chen B., Zhang P., Wang S., Zhou J., Fan H., Wang Y., Huang X. // *Biomater. Sci.* 2018. V. 6. № 4. P. 877–884. doi: 10.1039/c7bm01113j
200. Grebenik E.A., Kostyuk A.B., Deyev S.M. // *Russ. Chem. Rev.* 2016. V. 85. № 12. P. 1277–1296. doi: 10.1070/RCR4663
201. Shanwar S., Liang L., Nechaev A.V., Bausheva D.K., Balalaeva I.V., Vodeneev V.A., Roy I., Zvyagin A.V., Guryev E.L. // *Materials*. 2021. V. 14. № 7. P. 1657. doi: 10.3390/ma14071657
202. Shramova E.I., Kotlyar A.B., Lebedenko E.N., Deyev S.M., Proshkina G.M. // *Acta Naturae*. 2020. V. 12. № 3. P. 102–113. doi: 10.32607/actanaturae.11028
203. Grebenik E.A., Nadort A., Generalova A.N., Nechaev A.V., Sreenivasan V.K.A., Khaydukov E.V., Semchishen V.A., Popov A.P., Sokolov V.I., Akhmanov A.S., et al. // *J. Biomed. Optics*. 2013. V. 18. № 7. P. 076004. doi: 10.1117/1.JBO.18.7.076004
204. Grebenik E.A., Generalova A.N., Nechaev A.V., Khaydukov E.V., Mironova K.E., Stremovskiy O.A., Lebedenko E.N., Zvyagin A.V., Deyev S.M. // *Acta Naturae*. 2014. V. 6. № 4. P. 48–53. doi: 10.32607/20758251-2014-6-4-48-53
205. Rocheva V.V., Savelyev A.G., Nechaev A.V., Generalova A.N., Semchishen V.A., Zvyagin A.V., Khaydukov E.V. // *Opt. Spectrosc.* 2019. V. 126. № 1. P. 92–94. doi: 10.1134/S0030400X19010144
206. Polikarpov D., Liang L., Care A., Sunna A., Campbell D., Walsh B., Balalaeva I.V., Zvyagin A.V., Gillatt D., Guryev E.L. // *Biomolecules*. 2019. V. 9. № 12. P. 820. doi: 10.3390/biom9120820
207. Guryev E.L., Smyshlyaeva A.S., Shilyagina N.Y., Shanwar S., Kostyuk A.B., Shulga A.A., Konovalova E.V., Zvyagin A.V., Deyev S.M., Petrov R.V. // *Dokl. Biochem. Biophysic.* 2020. V. 491. № 1. P. 73–76. doi: 10.1134/S160767292002009X
208. Guryev E.L., Smyshlyaeva A.S., Shilyagina N.Y., Sokolova E.A., Shanwar S., Kostyuk A.B., Lyubeshkin A.V., Schulga A.A., Konovalova E.V., Lin Q., Roy I., Balalaeva I.V., Deyev S.M., Zvyagin A.V. // *Molecules*. 2020. V. 25. № 18. P. 4302. doi: 10.3390/molecules25184302
209. Guryev E.L., Volodina N.O., Shilyagina N.Yu., Gudkov S.V., Balalaeva I.V., Volovetskii A.B., Lyubeshkin A.V., Sen A.V., Ermilov S.A., Vodeneev V.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. № 39. P. 9690–9695. doi: 10.1073/pnas.1809258115
210. Liang L., Care A., Zhang R., Lu Y., Packer N.H., Sunna A., Qian Y., Zvyagin A.V. // *ACS Appl. Mat. Interfaces*. 2016. V. 8. № 19. P. 11945–11953. doi: 10.1021/acsami.6b00713
211. 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. doi: 10.1039/c7nr04092j
212. Nikitin M.P., Zelepukin I.V., Shipunova V.O., Sokolov I.L., Deyev S.M., Nikitin P.I. // *Nat. Biomed. Eng.* 2020. V. 4. № 7. P. 717–731. doi: 10.1038/s41551-020-0581-2
213. Zelepukin I.V., Yaremenko A.V., Yuryev M.V., Mirkasymov A.B., Sokolov I.L., Deyev S.M., Nikitin P.I., Nikitin M.P. // *J. Control. Release*. 2020. V. 326. P. 181–191. doi: 10.1016/j.jconrel.2020.07.014
214. Shilova O.N., Deyev S.M. // *Acta Naturae*. 2019. V. 11. № 4. P. 42–53. doi: 10.32607/20758251-2019-11-4-42-53

УДК 577.21;579.23

Механизмы контроля качества бактериальной трансляции

А. С. Зареченская¹, П. В. Сергиев^{2,3,4}, И. А. Остерман^{2,4,5*}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, 119991 Россия

²Сколковский институт науки и технологии, Центр наук о жизни, Сколково, 143028 Россия

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Институт функциональной геномики, Москва, 119991 Россия

⁴Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

⁵Научно-технологический университет «Сириус», Научный центр генетики и наук о жизни, Сочи, 354340 Россия

*E-mail: i.osterman@skoltech.ru

Поступила в редакцию 02.04.2021

Принята к печати 13.05.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11401

РЕФЕРАТ Остановки рибосом, возникающие в процессе трансляции, приводят к значительному снижению жизнеспособности клеток, которые вынуждены тратить ресурсы на синтез новых рибосом, поэтому все бактерии выработали те или иные механизмы спасения рибосом. Обычно высвобождению рибосом предшествует гидролиз связи тРНК–пептид, однако в ряде случаев рибосома оказывается способной продолжить трансляцию благодаря действию определенных факторов. В данном обзоре описаны механизмы высвобождения рибосом в ходе *транс*-трансляции, активности факторов ArfA, ArfB, BrfA, ArfT, HflX и RqcP/H, а также возобновления трансляции под действием EF-P, EF-4 и EttA. Несмотря на возможность некоторых систем дублировать друг друга, большинство из них играют собственную функциональную роль, связанную с контролем качества бактериальной трансляции при определенных нарушениях, возникших в результате мутаций, стрессовых условий культивирования или действия антибиотиков.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА трансляция, бактерии, контроль качества, терминация, *транс*-трансляция.

ВВЕДЕНИЕ

В бактериальной клетке синтез белка происходит при помощи 70S рибосомы, в состав которой входят малая 30S и большая 50S субчастицы (рис. 1) [1–3]. Инициация трансляции начинается с взаимодействия 30S субъединицы в комплексе с фактором IF3 с участком посадки рибосомы на мРНК. Затем фактор инициации IF2 в комплексе с GTP доставляет инициаторную fMet-тРНК в Р-сайт, а IF1 связывается в А-сайте. Завершается инициация связыванием 50S субъединицы, гидролизом GTP и уходом факторов инициации. В ходе элонгации с А-сайтом рибосомы связывается тройной комплекс aa-тРНК (аминоацил-тРНК)–EF-Tu–GTP. В случае правильного распознавания кодона антикодоном тРНК GTP подвергается гидролизу. Ацилированный конец тРНК перемещается в пептидилтрансферазный центр (ПТЦ), а EF-Tu высвобождается. Посредством транспептидазной реакции, катализируемой большой субчастицей рибосомы, пептидная цепь переносится на аминоацил-

тРНК, занимающую А-сайт. Фактор EF-G катализирует перемещение рибосомы на один кодон вперед по мРНК, вследствие чего деацилированная тРНК перемещается в Е-сайт, а пептидил-тРНК занимает Р-сайт, освобождая тем самым А-сайт для следующей aa-тРНК. После диссоциации EF-G цикл элонгации повторяется. Когда в А-сайт попадает стоп-кодон, его узнают факторы терминации класса I, RF1 или RF2, что запускает остановку синтеза белка. Оба фактора содержат консервативный мотив GGQ, который катализирует гидролиз связи пептидил-тРНК и тем самым высвобождает новосинтезированный пептид. Фактор терминации класса II, RF3, также обладающий GTPазной активностью, обеспечивает диссоциацию комплекса RF1 или RF2 с рибосомой. Далее белки RRF и EF-G способствуют разборке 30S и 50S субъединиц рибосомы, а последующее присоединение IF3 к малой субъединице освобождает ее от тРНК и мРНК. Таким образом цикл трансляции завершается.

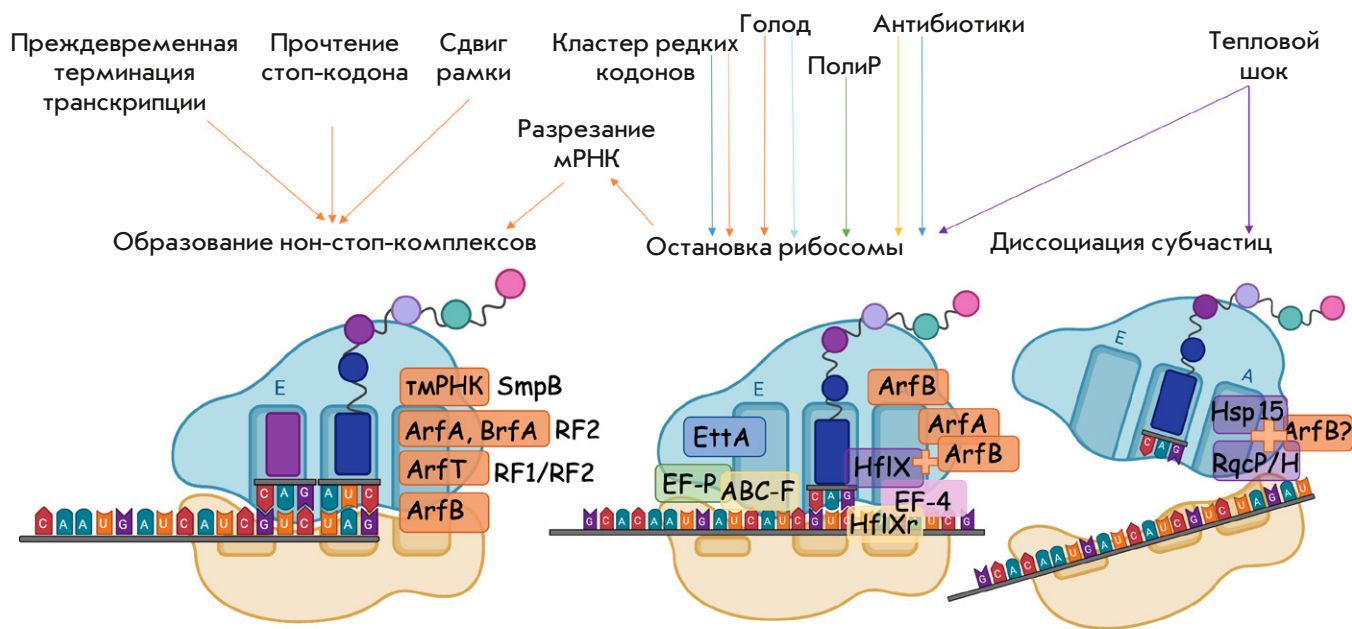


Рис. 1. Основные причины остановки трансляции и пути их решения. Схематично изображены возможные причины остановки биосинтеза белка в бактериальной клетке и факторы, используемые клеткой для решения этой проблемы. Слева – образовавшийся в процессе трансляции нон-стоп-комплекс. Такой тип субстрата распознается факторами, вызывающими аварийную терминацию с последующим гидролизом пептидил-тРНК (tmRNA, ArfA, BrfA, ArfB, ArfT). В центре – заблокированный комплекс на интактной матрице. В случае голода такая рибосома стабилизируется в состоянии гибернации при помощи EttA, при прохождении полипролиновой последовательности возобновлению трансляции способствует EF-P. Возобновление трансляции также обеспечивает EF-4. Если такой комплекс образуется под действием антибиотика, он может быть субстратом для ряда белков ABC-F, а также HflX и, возможно, HflXr. Если же причиной остановки был кластер редких кодонов мРНК, то, вероятнее всего, с рибосомой связывается ArfB. Справа – незапланированная диссоциация рибосомных субчастиц. Высвобождению 50S субъединицы могут способствовать факторы RqcP/H и Hsp15. (Все иллюстрации выполнены при помощи BioRender.com)

В отличие от эукариот, в клетках которых трансляции предшествует процессинг мРНК, бактерии практически не имеют возможности контролировать качество матрицы перед началом синтеза белка. Трансляция в бактериальной клетке происходит одновременно с транскрипцией. Подобное сопряжение двух важнейших процессов во времени и пространстве, с одной стороны, является преимуществом: оно не только позволяет клетке производить белки с большей скоростью, но и лежит в основе регуляторного механизма аттенуации. С другой стороны, отсутствие какой-либо проверки мРНК перед трансляцией неизбежно приводит к остановкам рибосомы в случае синтеза белка на матрице, поврежденной ввиду различных обстоятельств. Наиболее распространенной причиной подобных ситуаций является застревание рибосомы на поврежденной мРНК и образование так называемого нон-стоп-комплекса [3]. Список проблем, которые могут возникнуть в ходе трансляции, не ограничивается только отсутствием стоп-кодона в мРНК (рис. 1). Продвижение ри-

босомы может остановиться и на неповрежденной матрице, например, при трансляции «редких» кодонов, полипролиновых участков [4] или в условиях аминокислотного голода. Остановки рибосомы также возникают при действии на клетку антибактериальных агентов, нарушающих биосинтез белка [5]. Безусловно, такой широкий спектр возможных проблем привел к появлению разнообразных механизмов, направленных на их решение. В некоторых случаях остановка трансляции используется для регуляции экспрессии генов и тогда она не должна восприниматься клеткой как проблема, требующая специального решения [6]. В настоящем обзоре рассмотрены основные причины возникновения проблем при биосинтезе белка в бактериальной клетке и способы, при помощи которых бактерии высвобождают застрявшие рибосомы. Изучение некоторых из них представляет высокую практическую значимость, поскольку действие ряда систем спасения лежит в основе механизмов устойчивости к антибиотикам.

Факторы, решающие проблему остановленной трансляции, можно разделить на два типа:

1. Факторы, вызывающие аварийную терминацию трансляции, в первую очередь, с последующим гидролизом пептидил-тРНК и высвобождением рибосомы.

2. Факторы, вызывающие реактивацию трансляции в аварийных условиях.

Рассмотрим подробнее причины остановки трансляции и системы спасения, работающие в каждом конкретном случае.

ФАКТОРЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ АВАРИЙНУЮ ТЕРМИНАЦИЮ ТРАНСЛЯЦИИ, С ПОСЛЕДУЮЩИМ ГИДРОЛИЗОМ ПЕПТИДИЛ-ТРНК И ВЫСВОБОЖДЕНИЕМ РИБОСОМЫ

Одной из наиболее распространенных проблем, с которой рибосома может встретиться в процессе трансляции мРНК, – отсутствие стоп-кодона [3]. Подобная ошибка может возникнуть вследствие целого ряда причин. Среди них выделяют преждевременную терминацию транскрипции, сдвиг рамки считывания, активность эндо- и экзонуклеаз, а также прочитывание стоп-кодона в качестве смыслового [3]. Нон-стоп-комплексы могут образовываться и в результате действия некоторых эндорибонуклеазных токсинов, необходимых для остановки трансляции при неблагоприятных стрессовых условиях [7]. Образование и накопление нон-стоп-комплексов токсично для клетки, и отсутствие специальных механизмов ликвидации таких комплексов приводит к быстрому снижению способности клетки синтезировать белки [3, 8, 9]. В таком случае на жизнеспособности клетки сказывается не только недостаток белков, синтез которых внезапно прервался, но и в большей степени – нехватка рибосом для осуществления трансляции других мРНК. Обычно рибосомы не могут легко диссоциировать, будучи частью нон-стоп-комплекса, так как взаимодействия между пептидил-тРНК, рибосомой и мРНК прочно удерживают комплекс вместе [1, 10]. Поэтому перед бактериями стоит первоочередная задача спасения рибосом, попавших в аварию. Ее сложность продиктована необходимостью избирательного гидролиза нужных пептидил-тРНК. Иными словами, механизм должен достаточно точно отличать нон-стоп-комплексы от рибосом, осуществляющих нормальную элонгацию.

***транс*-Трансляция**

Наиболее распространенным механизмом спасения подобного рода комплексов рибосом является *транс*-трансляция, осуществляемая при помощи транспортно-матричной РНК (тмРНК), которую кодирует ген *ssrA*, и белка SmpB. Строение тмРНК и механизм *транс*-трансляции подробно описаны в ряде работ

[3, 11–14]. тмРНК получила свое название благодаря способности сочетать функции как транспортной, так и матричной РНК. 5'- и 3'-концы тмРНК образуют структуру, напоминающую Ala-тРНК, которая распознается аланил-тРНК-синтетазой. Помимо тРНК-подобного домена, тмРНК содержит два–четыре псевдоузла и специализированную рамку считывания, кодирующую короткий пептид длиной 8–35 аминокислот в зависимости от вида. Она не имеет старт-кодона, что делает невозможным ее обычную трансляцию [3].

Для осуществления своей функции тмРНК необходим белок SmpB [15]. SmpB стабилизирует тмРНК, способствует ее распознаванию аланил-тРНК-синтетазой, а также обеспечивает присоединение EF-Tu, необходимого для доставки тмРНК к рибосоме. Взаимодействие тмРНК с EF-Tu аналогично связыванию EF-Tu и aa-тРНК, что подтверждается стабилизацией этого комплекса на рибосоме под действием кирромицина [16].

На первом шаге *транс*-трансляции комплекс тмРНК–SmpB–EF-Tu–GTP связывается в А-сайте рибосомы. В отличие от тройного комплекса, который взаимодействует с мРНК в А-сайте, комплекс тмРНК–SmpB–EF-Tu–GTP взаимодействует с пустым А-сайтом. В таком случае кодон-антикодонное взаимодействие заменяется на взаимодействие SmpB с участком рибосомы в ходе стандартного протекания трансляции, связывающего мРНК с 3'-стороны от Р-сайта. При этом комплекс тмРНК–SmpB–EF-Tu запускает гидролиз GTP. Если канал мРНК пуст, то тмРНК остается в А-сайте для продолжения трансляции по кодирующей части тмРНК. Если в канале находится мРНК, то взаимодействие не происходит из-за стерического перекрытия. Таким образом, механизм *транс*-трансляции не затрагивает транслирующие рибосомы [17].

Появление комплекса тмРНК–SmpB в А-сайте приводит к переносу полипептидной цепи на Ala-тмРНК и сопровождается последующей транслокацией деацилированной тРНК из Р-сайта в Е-сайт и пептидил-тмРНК–SmpB из А-сайта в Р-сайт. Во время транслокации рамка считывания тмРНК входит в канал мРНК так, что ее первый кодон, известный как «кодон возобновления», вытесняет С-концевую часть SmpB из декодирующего центра. *транс*-Трансляция продолжается до тех пор, пока не будет достигнут стоп-кодон тмРНК, который узнают канонические факторы терминации RF1 или RF2, прекращающие трансляцию и высвобождающие полипептид с довеском, закодированным в тмРНК. Далее полипептид распознается несколькими протеазами, включая ClpXP, ClpAP, HflB и Tsp13, что приводит к его быстрой деградации (рис. 2) [3, 18].

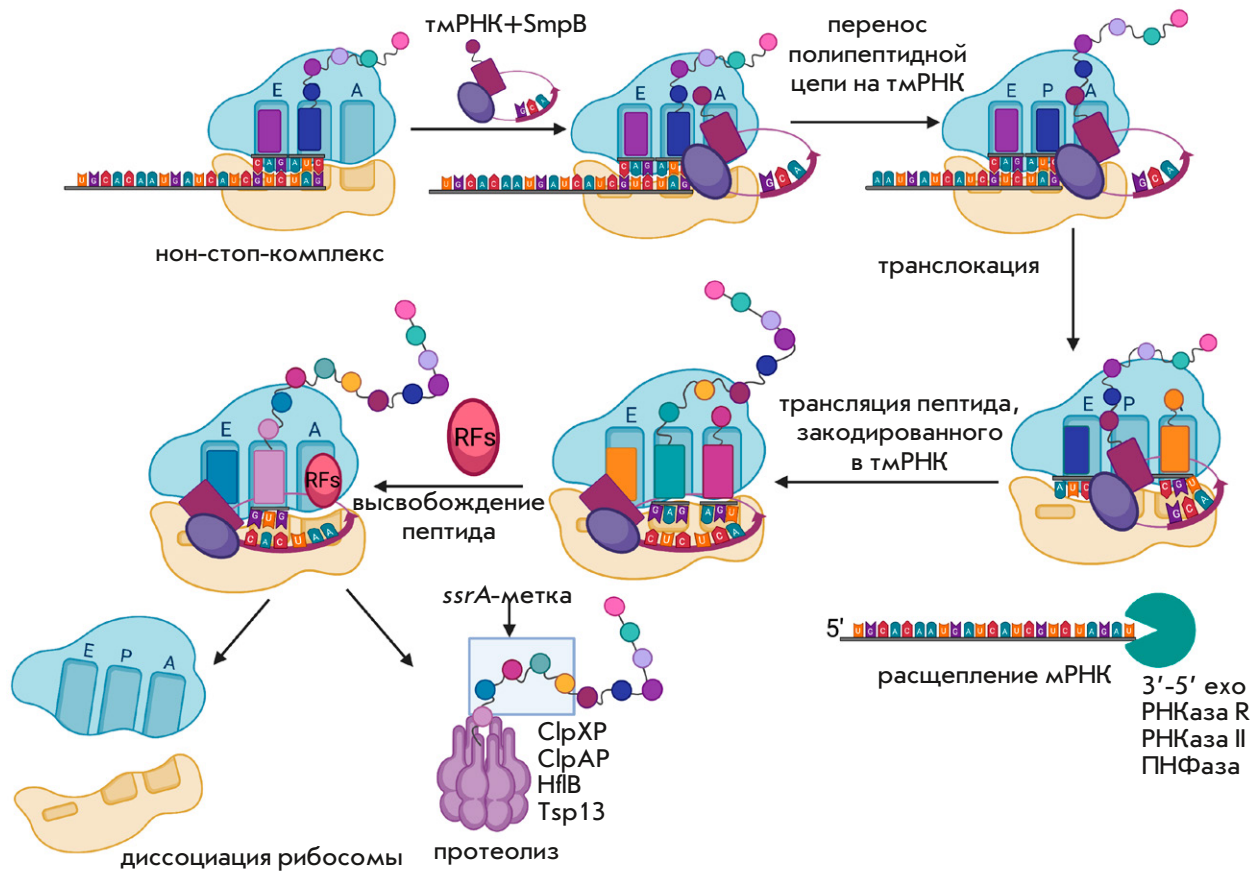


Рис. 2. Освобождение рибосомы путем *транс*-трансляции. Комплекс тмРНК–SmpB распознает рибосому в составе нон-стоп-комплекса, связывается в свободном А-сайте. Появление комплекса тмРНК–SmpB в А-сайте приводит к переносу полипептидной цепи на Ala-тмРНК и сопровождается последующей транслокацией деацилированной тРНК из Р-сайта в Е-сайт и пептидил-тмРНК–SmpB из А-сайта в Р-сайт. *транс*-Трансляция продолжается до тех пор, пока не будет достигнут стоп-кодон тмРНК, который узнают канонические факторы терминации RF1 или RF2, прекращающие трансляцию и высвобождающие полипептид с довеском, закодированным в тмРНК. Далее полипептид распознается несколькими протеазами, включая ClpXP, ClpAP, HflB и Tsp13, что приводит к его быстрой деградации [3, 11–14]

Взаимодействие протеазы и *ssrA*-метки обеспечивает белок-посредник SspB. Деградация подвергается также исходная мРНК, входившая в нон-стоп-комплекс, во избежание повторной трансляции и повторения аварийных ситуаций [3]. В клетках *Escherichia coli* данный процесс осуществляет РНКаза R, которую привлекает тмРНК–SmpB [19]. Таким образом, тмРНК играет в жизнедеятельности клетки три важные роли: участвует в спасении рибосом, в контроле качества белка и мРНК [13].

Резервные пути высвобождения рибосомы с помощью ArfA и BrfA

Когда активность *транс*-трансляции ограничена, для спасения рибосомы используется запасной план – резервный путь высвобождения при помощи белка ArfA (от *англ.* alternative ribosome rescue

factor A). ArfA действует путем привлечения к рибосоме RF2, который в свою очередь гидролизует пептидил-тРНК в нон-стоп-комплексах (*рис. 3*) [20, 21].

Компенсирова отсутствие стоп-кодона в А-сайте, ArfA позволяет RF2 гидролизовать пептидил-тРНК [22]. Таким образом, в высвобождении рибосом с помощью ArfA основную роль играет мотив GGQ RF2, гидролизующий пептидил-тРНК, а мотив SPF, распознающий стоп-кодон, не имеет большого значения [23]. В отличие от *транс*-трансляции, действие ArfA приводит только к высвобождению рибосом, но не сопровождается последующей деградацией растущих полипептидов или мРНК [20–24]. Интересно, что ArfA привлекает исключительно RF2, но не RF1. RF2 сам по себе способен высвобождать арестованные рибосомы с достаточно низкой активностью,

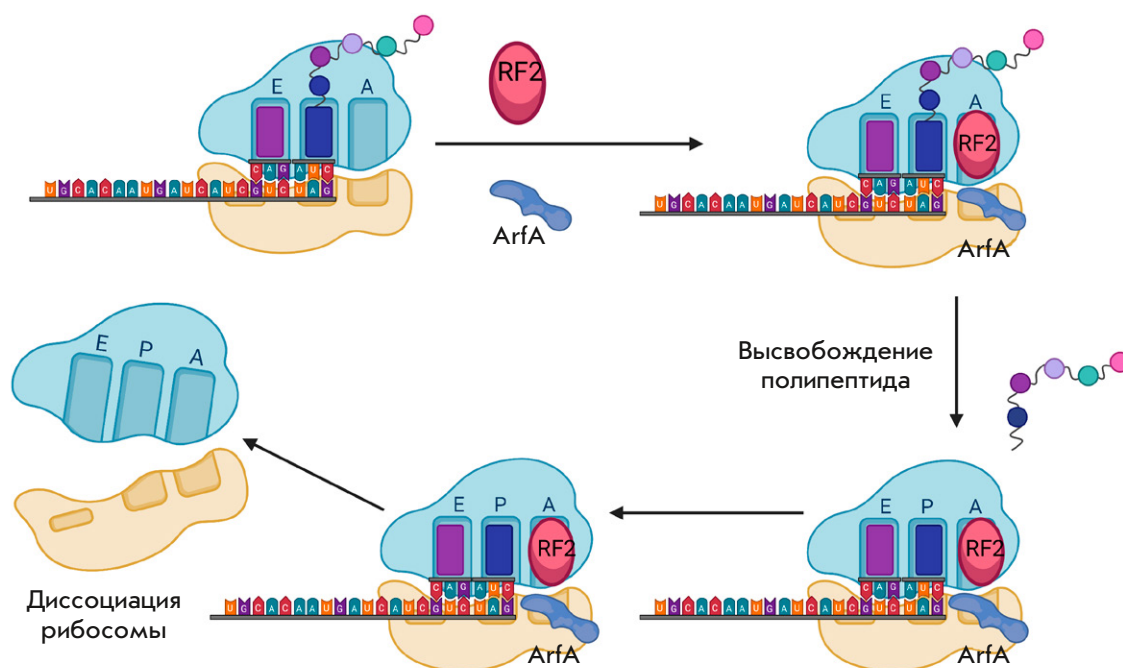


Рис. 3. Высвобождение рибосомы при помощи ArfA. ArfA связывается на месте 3'-концевой части мРНК [22], компенсируя отсутствие стоп-кодона в А-сайте, он позволяет RF2 гидролизовать пептидил-тРНК

а ArfA усиливает эту активность [25] за счет непосредственного взаимодействия с RF2 [26].

Стоит отметить, что ArfA синтезируется с нон-стоп-мРНК и его экспрессия прямо регулируется работой системы *транс*-трансляции [27]. мРНК ArfA *E. coli* принимает структуру шпильки и содержит сайт расщепления РНКазой III, которая удаляет стоп-кодон и последние 18 кодонов открытой рамки считывания. Ген *arfA* *Neisseria gonorrhoeae* не имеет сайта расщепления РНКазой III, однако шпилька способствует терминеции транскрипции перед стоп-кодомом, тем самым обеспечивая ингибирование синтеза ArfA [28]. Застрявшие на мРНК ArfA рибосомы высвобождаются в ходе *транс*-трансляции, а белок подвергается быстрому протеолизу [29]. В отдельных случаях мРНК ArfA может сохранить стоп-кодон, тогда осуществляется классический вариант терминеции трансляции с образованием полноразмерного продукта, но на С-концевом участке полноразмерного ArfA находится гидрофобный участок, вследствие чего белок образует агрегаты и при этом все-таки расщепляется внутриклеточными протеазами. Если же активность *транс*-трансляции ограничена или нарушена, то образуется укороченный ArfA без довеска, вызывающего деградацию *ssrA*. Такой укороченный продукт приходит на замену системе тмРНК-SmpB. Подобный механизм регуляции делает ArfA истинной резервной системой спасения рибосом, функционирующей только тогда, когда активность *транс*-трансляции низкая или отсутствует [27].

Стратегию высвобождения рибосомы при помощи белка ArfA используют только грамотрицательные

бактерии. В клетках грамположительных бактерий реализуются другие механизмы. Долгое время считали, что канонические факторы высвобождения не принимают в них участие. Однако недавно описан способ спасения рибосом в клетках *Bacillus subtilis*, аналогичный действию ArfA [30]. Центральную роль в нем играет белок BrfA (от *англ.* *Bacillus rescue factor A*). Подобно ArfA он узнает нон-стоп-комплексы и привлекает к застрявшей рибосоме фактор терминеции RF2. С-Концевой участок белка также связывается с каналом мРНК, только если он не занят частью мРНК с 3'-конца от Р-сайта. Сходство с ArfA проявляется и на уровне регуляции: BrfA синтезируется с нон-стоп-мРНК, а его экспрессия зависит от активности *транс*-трансляции. Тем не менее, белки ArfA и BrfA не имеют структурного сходства и эволюционно далеки друг от друга. Кроме того, несмотря на то что оба они привлекают на помощь RF2, взаимодействие каждого из этих белков с RF2 различно [30]. Вероятно, у грамположительных и грамотрицательных бактерий параллельно сформировались резервные механизмы высвобождения рибосом, позволяющие подстраховать систему *транс*-трансляции.

ArfB: альтернативная спасательная система

Альтернативный способ спасения заблокированных рибосом обеспечивает белок ArfB (от *англ.* *alternative ribosome rescue factor B*). Ген *arfB* был впервые идентифицирован как супрессор летальности у мутанта *E. coli*, в котором отсутствовала как *транс*-трансляция, так и белок ArfA [24].

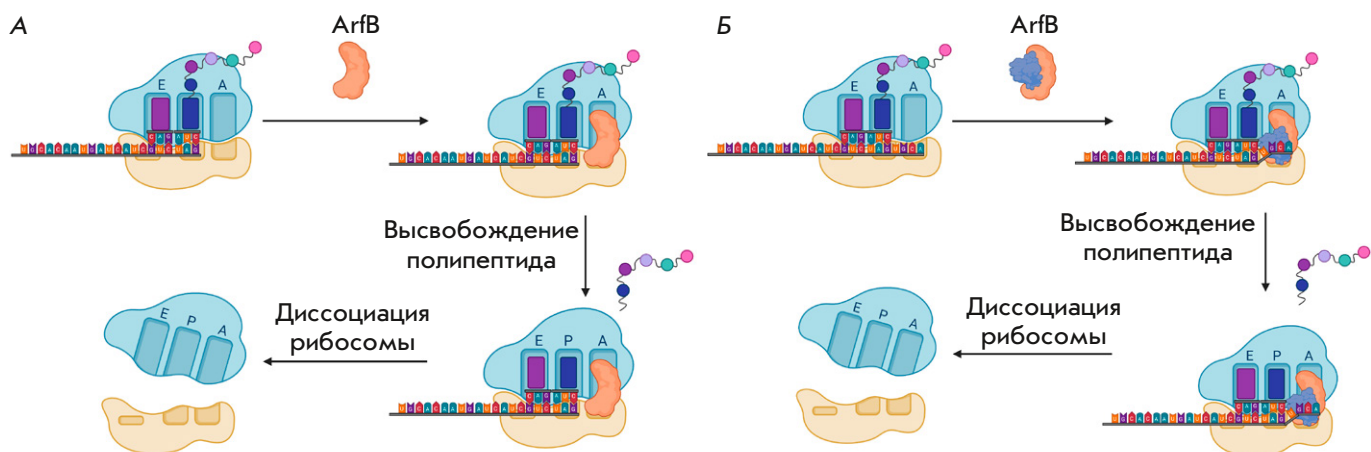


Рис. 4. А – ArfB связывается в тоннеле мРНК рибосомы в составе нон-стоп-комплекса. После его связывания гибкий линкерный участок белка позволяет N-концевому домену проникнуть в ПТЦ для высвобождения пептида. Далее комплекс ArfB и рибосомы диссоциирует [24]. Б – сценарий спасения рибосомы при помощи ArfB при занятом А-сайте. Если протяженный фрагмент мРНК выступает из Р-сайта, то этот фрагмент перемещается за пределы мРНК тоннеля в межсубъединичное пространство и стабилизируется там при помощи дополнительной копии белка ArfB [35]. Каталитический ArfB при этом выполняет функцию гидролиза пептидил-тРНК. Далее комплекс ArfB и рибосомы диссоциирует

Гомологи гена *arfB* обнаружены в 34% секвенированных геномов как грамположительных, так и грамотрицательных бактерий [31]. В отличие от ArfA, гомологи ArfB присутствуют также в клетках эукариот [32].

N-Концевой домен ArfB гомологичен каталитическим доменам RF1 и RF2. Этот домен содержит мотив GGQ, который играет решающую роль в ArfB-опосредованном гидролизе пептидил-тРНК. При этом несколько важных аминокислотных остатков, необходимых для распознавания задержанного комплекса и связывания застрявшей рибосомы, располагаются вовсе не в N-, а напротив, в C-концевом домене белка. Домен, способный осуществлять взаимодействие со стоп-кодоном, у ArfB отсутствует [33]. Очищенный ArfB из *E. coli* и *C. crescentus* способен гидролизовать пептидил-тРНК в нон-стоп-комплексах *in vitro* в отсутствие факторов терминации RF1 и RF2 (рис. 4А) [24, 31].

Субстратом тмРНК и ArfA служит рибосома со свободным А-сайтом, аналогичная ситуация предполагалась и для ArfB, однако выяснилось, что ArfB способен взаимодействовать с рибосомами и в том случае, когда небольшой отрезок мРНК выступает из Р-сайта [34]. В такой ситуации нуклеотиды декодирующего центра перестраиваются, что приводит к расширению тоннеля мРНК. Подобная пластичность позволяет избежать стерического перекрытия С-концевого домена ArfB и короткого фрагмента мРНК, способствуя тем самым высвобождению рибосомы. С-Концевой домен служит своеобразным сенсо-

ром, распознающим рибосомы со свободным А-сайтом или перестроенным декодирующим центром. После его связывания в тоннеле мРНК гибкий линкерный участок белка позволяет N-концевому домену проникнуть в ПТЦ для высвобождения пептида. Далее вращение субчастиц рибосомы друг относительно друга приводит к перемещению деацелированного ССА-конца тРНК в Е-сайт. Комплекс ArfB и рибосома диссоциирует, а ее последующей разборке способствует релизинг-фактор RRF [35]. Как и в случае ArfA, действие ArfB высвобождает рибосому, не вызывая деградацию синтезированного пептида.

Субстратами ArfB могут быть и рибосомы с достаточно протяженным фрагментом мРНК (рис. 4Б) [35]. В этом случае нуклеотиды центра декодирования не изменяют своего положения, и работает совершенно иной механизм. Выступающая мРНК перемещается за пределы мРНК тоннеля в межсубъединичное пространство и стабилизируется там при помощи дополнительной копии белка ArfB, в то время как каталитический ArfB выполняет функцию гидролиза. Таким образом, ArfB способен функционировать как в мономерной, так и в мультимерной форме, что позволяет ему эффективно распознавать две группы субстратов. Это придает ему способность высвобождать застрявшие рибосомы не только при обрыве матрицы, но и в случае набора редких кодонов или полипролиновых участков. В этом проявляется сходство ArfB с его эукариотическим гомологом – белком ICT1, высвобождающим, по некоторым данным, митохондриальные рибосо-

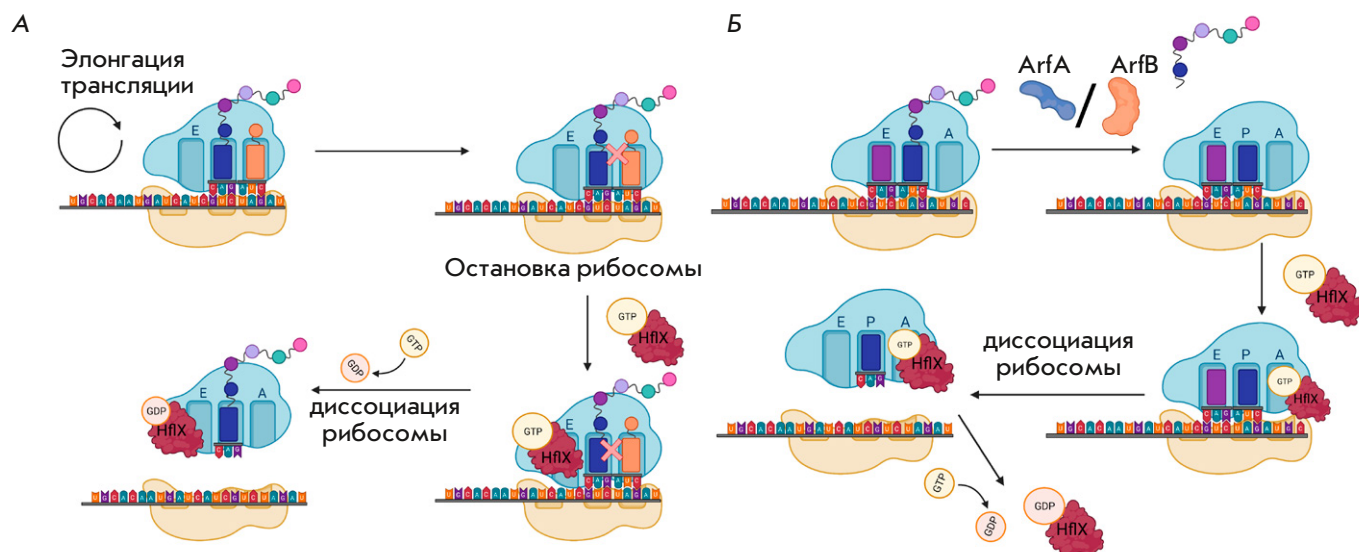


Рис. 5. Возможные механизмы работы HflX. А – HflX может связываться со свободным Е-сайтом [38]. Застопорившийся пептид в ПТЦ является для HflX сигналом к гидролизу GTP. Далее HflX расщепляет 70S рибосому на 50S и 30S субчастицы, которые впоследствии могут быть использованы в другом раунде трансляции. Б – HflX способен связаться в А-сайте застопорившейся рибосомы [39]. Предварительно в такой модели пептид высвобождается при помощи фактора спасения ArfA или ArfB. Далее HflX–GTP связывается с А-сайтом и вызывает диссоциацию рибосомных субчастиц

мы, застрявшие при трансляции кластера редких кодонов [32].

Удаление *arfB* у *C. crescentus* не сказывается на жизнеспособности, однако в сочетании с делецией *ssrA* оно летально [31]. Тем не менее, ArfB не может полностью компенсировать потерю *транс*-трансляции, так как штамм *C. crescentus* Δ *ssrA* имеет выраженный дефект роста [3]. Кроме того, в отличие от ArfA, синтез самого ArfB не связан с *транс*-трансляционной активностью, поэтому он, скорее всего, не функционирует исключительно как резервная система *транс*-трансляции [24, 31]. Действие ArfB, как и ArfA, высвобождает рибосому, но не приводит к последующей направленной деградации синтезированного пептида или мРНК. Возможно ArfB необходим для распознавания и других возможных нарушений трансляции, например, высвобождения рибосомы из *нон-стоп-комплексов*, образованных под действием теплового шока [3, 35].

ArfT высвобождает рибосомы, используя иной механизм

Необычный способ спасения рибосом обнаружен у возбудителя туляремии *Francisella tularensis*. Данная бактерия не содержит ArfA и ArfB, и тем не менее инактивация системы *ssrA/SmpB* не является летальной мутацией. Транспозонный мутагенез с последующим глубоким секвенированием выявил новый альтернативный фактор спасения рибосомы, получивший название ArfT [36].

Установлено, что удаление гена *arfT* приводит к потере жизнеспособности только у мутантов *F. tularensis*, не способных к *транс*-трансляции. Сверхэкспрессия ArfT, напротив, способствует интенсивному росту таких клеток [36]. ArfT имеет некоторое сходство с ArfA, и эти два фактора, возможно, распознают *нон-стоп-комплексы* похожим образом. С-Концевой «хвост» ArfA связывается в пустом канале мРНК застрявших рибосом, используя несколько остатков лизина и аргинина, включая консервативный мотив KGKGS. Ни один из этих остатков сам по себе не важен для активности ArfA, однако замена отдельных остатков снижает активность спасения рибосомы *in vitro*. Последовательность KKGSTNKK вблизи С-конца ArfT содержит, как и ArfA, ряд положительно заряженных остатков, поэтому, по-видимому, ArfT может использовать эту последовательность для связывания рибосомы [37]. ArfT вызывает гидролиз пептидил-тРНК, работая совместно с факторами терминации, однако в отличие от ArfA, привлекающего только RF2, ArfT взаимодействует как с RF2, так и с RF1. Так, в ходе *in vitro* моделирования аварийной трансляции добавление к *нон-стоп-комплексу* ArfT и RF1 *F. tularensis* привело к гидролизу пептидил-тРНК с эффективностью 95%, а добавление ArfT и RF2 *F. tularensis* – к гидролизу с эффективностью 84% [36].

Несмотря на сходство С-концевой последовательности ArfT и ArfA, способность ArfT активировать как RF1, так и RF2 может означать, что ArfT взаимо-

действует с факторами высвобождения иначе, нежели ArfA. Кроме того, стоит отметить, что образование ArfT не регулируется посредством терминации трансляции.

ФАКТОРЫ, ВЫЗЫВАЮЩИЕ АВАРИЙНУЮ ТЕРМИНАЦИЮ ТРАНСЛЯЦИИ, НЕ СВЯЗАННУЮ С ГИДРОЛИЗОМ ПЕПТИДИЛ-ТРНК

HflX

Тепловой шок – еще одна причина остановки трансляции. При этом системам спасения приходится иметь дело с 70S рибосомой с пептидил-ТРНК в Р-сайте и неповрежденной мРНК в А-сайте. Одним из факторов, способных распознать подобный субстрат, является белок HflX *E. coli*.

Известно несколько вариантов возможного механизма работы HflX. Согласно одному из них, HflX может связываться со свободным Е-сайтом (рис. 5А) [38]. Застопорившийся пептид в ПТЦ служит сигналом к гидролизу GTP HflX. Далее HflX расщепляет 70S рибосому на 50S и 30S субчастицы, которые впоследствии могут использоваться в другом раунде трансляции. После расщепления рибосомы HflX может связываться с А-сайтом, чтобы предотвратить повторное связывание 50S и 30S субчастиц и блокировать присоединение других GTPаз [38]. Также показано, что HflX способен связаться в А-сайте застопорившейся рибосомы (рис. 5Б) [39]. Предварительно в такой модели пептид высвобождается при помощи фактора спасения ArfA или ArfB. Далее HflX-GTP связывается с А-сайтом и вызывает диссоциацию рибосомных субчастиц.

HflXr

В основе механизма действия значительного количества антибактериальных агентов лежит подавление трансляции. Многие из них связываются с ПТЦ, тем самым ингибируя пептидилтрансферазную реакцию [40]. Устойчивость к такого рода антибиотикам, как правило, обусловлена присутствием в бактериальной клетке эффлюксной помпы либо механизмов, модифицирующих или инактивирующих молекулу антибиотика [41]. Кроме того, недавно обнаружили, что делеция гена *hflX* у патогенной бактерии *Mycobacterium abscessus* приводит к усилению чувствительности к антибактериальным агентам класса макролидов. Продукт данного гена способен разбирать рибосомы, заблокированные под действием макролидов, и таким образом играет важную роль в развитии антибиотикорезистентности у некоторых патогенов [42].

Нетривиальный механизм резистентности, связанный, возможно, с работой белка HflXr, описан у *Listeria monocytogenes* [5, 43]. Этот белок являет-

ся гомологом HflX *E. coli*, функция которого заключается в разборке остановленной рибосомы [5]. Хотя HflXr также способен разбирать рибосомные субчастицы, нельзя утверждать, что его действие прямо связано с вытеснением антибиотика. Так, несмотря на то что делеция гена *hflXr* делает бактерии более чувствительными к эритромицину и линкомицину, фенотип чувствительности проявлялся только при одновременной делеции еще одного гена – *lmo0919* [5].

Высвобождение рибосомы с помощью RqcH и RqcP

Среди причин внезапной остановки биосинтеза белка есть и достаточно необычная – преждевременная диссоциация рибосомных субчастиц. Высвобождение 50S субъединицы из комплекса с пептидил-ТРНК осуществляется при этом с помощью нескольких механизмов. Один из них реализуется белками RqcH и RqcP (рис. 6) [44]. Действие данных белков частично дублирует активность ssgA/тмРНК, поскольку также приводит к навешиванию на полипептид метки, распознаваемой внутриклеточными протеазами.

RqcH, обнаруженный у *B. subtilis* (от *Rqc2 homolog*), является гомологом эукариотического фактора контроля качества трансляции Rqc2. В модели, представленной на рис. 6, белок RqcP связывается с 50S субъединицей рибосомы и стабилизирует ТРНК в Р-сайте [44, 45]. RqcH доставляет к 50S заряженную аланиновую ТРНК, которая занимает свободный А-сайт. RqcH специфично связывает Ala-ТРНК благодаря тому, что нуклеотиды G35 и C36 антикодона ТРНК и аминокислотные остатки NFACT-N-домена RqcH образуют взаимодействия наподобие уотсон-криковских [46]. Далее происходит перенос полипептидной цепи. Затем RqcP теряет сродство к рибосоме, что способствует ее перемещению наподобие транслокации: деацилированная ТРНК при этом передвигается в Е-сайт, пептидил-ТРНК – в Р-сайт. Позже для стабилизации пептидил-ТРНК в Р-сайте RqcP присоединяется вновь. RqcH либо диссоциирует, либо, будучи присоединенным к рибосоме, привлекает Ala-ТРНК. Далее цикл подобной «элонгации» может повторяться до момента, пока фактор RqcH не диссоциирует и полипептид не будет высвобожден. Фактор, который при таком развитии событий проводит гидролиз пептидил-ТРНК, на данный момент точно не установлен. Предполагается, что такую роль может выполнять ArfB [44].

Hsp15

Белки RqcH и RqcP отсутствуют у актинобактерий и гамма-протеобактерий. Однако стоит отметить, что белок RqcP является гомологом белка Hsp15 *E. coli* [44]. Обратим внимание, что, как и RqcH/RqcP, Hsp15 связывается с 50S субчастицей, заблокиро-

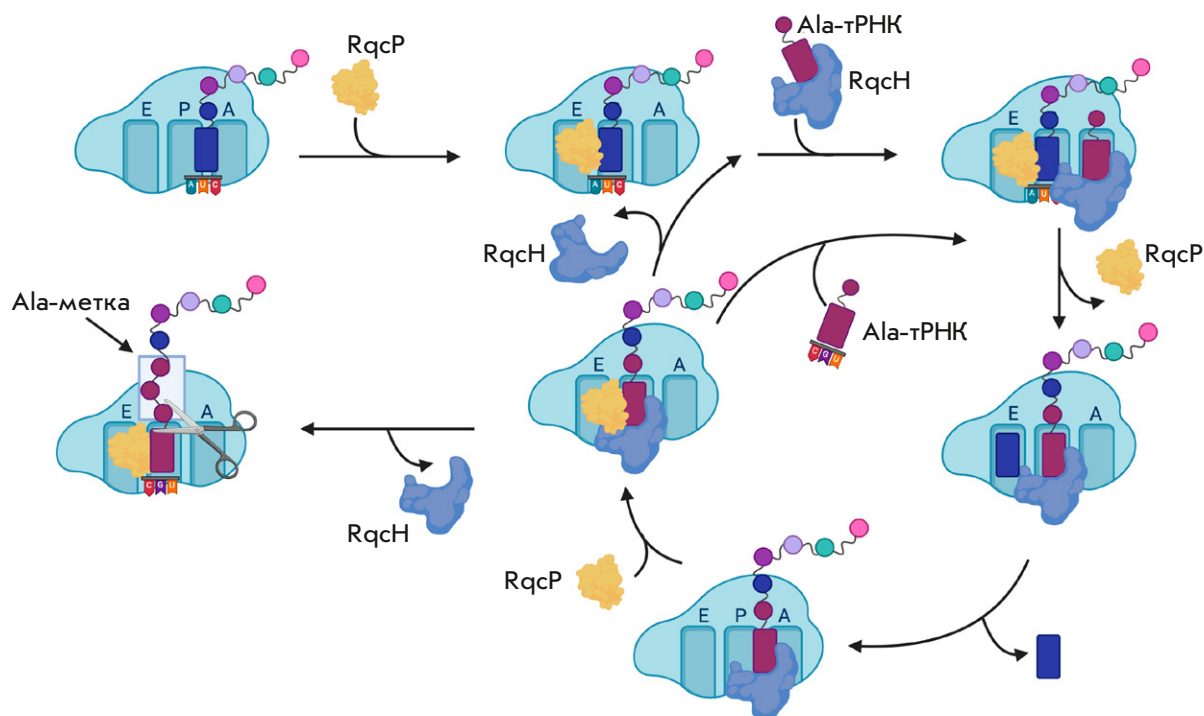


Рис. 6. Механизм действия белков RqcP и RqcH (YabO). RqcP связывается с 50S субъединицей рибосомы и стабилизирует тРНК в Р-сайте [44, 45]. RqcH доставляет к 50S заряженную аланиновую тРНК, которая занимает свободный А-сайт. Далее происходит перенос полипептидной цепи. Затем RqcP теряет стродство к рибосоме, что способствует ее перемещению наподобие транслокации: деацилированная тРНК при этом передвигается в Е-сайт, пептидил-тРНК – в Р-сайт. Позже для стабилизации пептидил-тРНК в Р-сайте RqcP присоединяется вновь. Присоединенный к рибосоме RqcH привлекает Ala-тРНК. Далее цикл подобной «элонгации» может повторяться до момента, пока фактор RqcH не диссоциирует и полипептид не будет высвобожден. Фактор, который при таком развитии событий проводит гидролиз пептидил-тРНК, на данный момент точно не установлен. Такую роль, по-видимому, может выполнять ArfB

ванной после внезапной разборки рибосомы. Hsp15 не взаимодействует с 70S рибосомами, поскольку присутствие малой субчастицы препятствует его связыванию. При незапланированной разборке рибосомы большая субчастица оказывается доступной для Hsp15. При этом пептидил-тРНК может располагаться в А-сайте ввиду отсутствия субъединицы 30S. Однако это неблагоприятная ситуация, поскольку при занятом А-сайте фактор высвобождения не способен связаться с 50S субчастицей. Установлено, что белок Hsp15 способствует перемещению пептидил-тРНК из А-сайта в Р-сайт. Далее высвобождение полипептидной цепи предположительно может осуществлять ArfB. Существенное отличие данного механизма от действия белков RqcH и RqcP состоит в том, что синтезированная полипептидная цепь не направляется на деградацию [47].

PrfH

В 1992 году был идентифицирован участок генома *E. coli* K-12, кодирующий аминокислотную последовательность, обладающую значительным сходством

с последовательностью RF1 и RF2 [48]. Этот элемент получил название *prfH* (от *англ.* protein release factor homologue). Позже выяснилось, что значительное количество геномов бактерий, даже эволюционно далеких друг от друга, содержат ортологи данного гена. Белок PrfH имеет много общего с факторами терминации трансляции RF1 и RF2 и рассматривается как их паралог [49].

Существует несколько предложений относительно функции PrfH и того, какой комплекс рибосомы может быть его субстратом. Наиболее вероятной все же остается гипотеза о том, что PrfH является фактором спасения рибосомы [49].

Так, обнаружено, что сверхэкспрессия *prfH* увеличивает устойчивость бактерий *Pseudomonas aeruginosa* к действию азитромицина [50]. Кроме того, при помощи репортерной системы показано, что сверхэкспрессия *prfH* приводит к снижению числа задержанных комплексов рибосомы и модельной мРНК, образованных под влиянием азитромицина.

Тем не менее, роль PrfH на данный момент остается неизвестной и подлежит дальнейшему изучению.

Факторы и механизмы высвобождения остановленных рибосом

Причина остановки	Фактор спасения	Механизм высвобождения рибосом	Распространенность
Образование аварийных комплексов	<i>транс</i> -Трансляция (тмРНК/SmpB)	Возобновление трансляции при помощи тмРНК. Мечение полипептида и мРНК	99% бактериальных геномов
	ArfA	Привлечение фактора RF2	Грамотрицательные
	BrfA	Привлечение фактора RF2	<i>Bacillus subtilis</i>
	ArfT	Привлечение RF или RF2	<i>Francisella tularensis</i>
	ArfB	Самостоятельный гидролиз пептидил-тРНК	Грамотрицательные и грамположительные
	HflX	Разборка рибосомных субчастиц	Грамотрицательные и грамположительные
Внезапная диссоциация субчастиц	RqcH/RqcP + ArfB (?)	Имитация элонгации трансляции для присоединения Ala-метки к полипептиду. Гидролиз	Кроме гамма-протеобактерий и актинобактерий
	Hsp15 + ArfB(?)	Перемещение пептидил-тРНК в Р-сайт. Гидролиз	Грамотрицательные и грамположительные
Кластер редких кодонов, полипролиновый участок, вторичная структура	EF-P	Помощь в образовании пептидной связи при прохождении сложного участка	Грамотрицательные и грамположительные
	EF-4	Помощь при прохождении сложного участка	Грамотрицательные и грамположительные
	ArfB	Гидролиз пептидил-тРНК	Грамотрицательные и грамположительные
Действие антибиотиков	HflXr	Разборка рибосомы	<i>Listeria monocytogenes</i>
	ABC-F-белки	Диссоциация антибиотика	Грамположительные
	PrfH-?	Неизвестен	Грамотрицательные и грамположительные

АТФ-связывающей кассеты (ABC) типа F, которые связываются с рибосомами и способствуют диссоциации комплекса рибосомы и антибиотика [43, 67, 68]. Отдельного упоминания заслуживает EttA – белок ABC-F, обнаруженный у *E. coli* [69]. EttA не способствует приобретению устойчивости к антибиотикам, но при этом действует как фактор трансляции, ограничивая активность рибосом в ответ на низкий уровень АТФ [70, 71]. При высоких концентрациях ADP EttA связывается с 70S рибосомой в Р-сайте, стабилизируя ее в так называемом состоянии гибернации. Это связывание препятствует синтезу белка и позволяет перенести неблагоприятные условия при помощи ограничения трансляции.

Также действие некоторых белков ABC-F лежит в основе механизмов устойчивости к антибиотикам. Подробный обзор белков ABC-F, защищающих рибосому от антибиотиков, представлен в работе [40]. Такие белки ABC-F связываются в Е-сайте рибосомы. Связывание вызывает небольшое вращение 30S субъединицы против часовой стрелки относительно 50S, что приводит к сдвигу тРНК и позволяет ARD-домену белка проникнуть в ПТЦ, вызывая диссоциацию антибиотика. Предположительно, это происходит потому, что связывание белка вызывает аллостерические конформационные изменения в нуклеотидах ПТЦ, которые содержат сайт связывания антибиотика. Белки ABC-F, обнаруженные у многих

бактерий, таких, как, например, *Pseudomonas aeruginosa*, *Staphylococcus aureus*, *Enterococcus faecalis*, *B. subtilis*, придают этим организмам устойчивость к широкому спектру антибиотиков [40].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Способность высвобождать рибосомы, застрявшие на мРНК в процессе трансляции, заметно повышает жизнеспособность и поэтому закрепилась в процессе отбора (таблица). Большинству бактерий для жизни необходим по крайней мере один механизм спасения рибосом. При этом наибольшее распространение получила система *транс*-трансляции – гены *ssrA* и *smrB* обнаружены более чем у 99% видов бактерий [3]. Поскольку компоненты системы *транс*-трансляции представлены практически во всех бактериальных геномах, а мутации в генах, кодирующих такие белки, снижают жизнеспособность клеток, белки-участники данной системы рассмотрены как привлекательные мишени для новых антибактериальных препаратов. Эти соображения подкреплялись также тем, что *транс*-трансляция специфична для бактериальных клеток, что снижает вероятность возможных побочных эффектов. Методом высокопроизводительного скрининга отобраны несколько соединений – потенциальных ингибиторов высвобождения нон-стоп-комплексов посредством *транс*-трансляции [8]. В основе механизма одного из них

лежит предотвращение мечения полипептида, тогда как другие ингибируют протеолиз белков, содержащих метку. Одно из соединений ингибирует как присоединение метки, так и последующий протеолиз белка.

Клетки практически всех исследованных видов бактерий, способных выживать в отсутствие *транс*-трансляции, содержат альтернативный фактор высвобождения [72]. Так, при делеции *ssrA* жизнеспособность клеток *E. coli* поддерживает *arfA*, *B. subtilis* – *brfA*, *F. tularensis* – *arfT*, а в клетках *S. crescentus* – *arfB*. *Shigella flexneri* и *N. gonorrhoeae* не способны выживать без *транс*-трансляции [27]. Возможно, данный факт объясняется тем, что эти патогены не содержат гомолога *ArfA E. coli*, способного заменить систему тмРНК–*SmpB* [27, 73]. Отметим, что *ArfT* взаимодействует с RF1/2 *F. tularensis*, но не способен связаться с RF1/2 *E. coli*. Фактор *BrfA* взаимодействует исключительно с RF2 *B. subtilis*. Таким образом, описанные выше системы спасения рибосом, не являются взаимозаменяемыми у разных видов [26]. При этом в отсутствие *транс*-трансляции абсолютно все альтернативные спасательные системы не обеспечивают достаточной активности. Делеция *ssrA* или *smpB* приводит к проявлению множества различных фенотипов. Так, лишённые *ssrA* мутанты могут обладать повышенной чувствительностью к действию антибиотиков, колебаниям температуры, а также иметь дефекты вирулентности [27, 74]. *транс*-Трансляция сохраняется у всех бактерий, ни один вид не приспособился использовать исключительно *ArfA*, *ArfB* или другие системы. Активность тмРНК/*smpB* не только высвобождает

застрявшие рибосомы, но и способствует удалению недосинтезированных полипептидных цепей и поврежденных мРНК, что также дает ей значительное преимущество перед резервными системами спасения. Частичным аналогом *транс*-трансляции в каком-то смысле можно назвать систему *RqcH–RqcP*, работа которой также приводит к деградации неправильного полипептида.

Дополнительные системы спасения рибосом как резервные, так и самостоятельные сложно назвать механизмами контроля качества биосинтеза белка. В результате работы этих систем «некачественные» мРНК и синтезированные на их основе полипептиды не направляются на деградацию специально. Поскольку при всем разнообразии резервных механизмов ни один из них не дублирует *транс*-трансляцию, возникает предположение, что в случае остановки трансляции первоочередную задачу представляет именно спасение рибосом. Безусловно, *транс*-трансляция наиболее выгодна, так как избавляет клетку от нежелательных и потенциально токсичных молекул. Однако, когда ее активность ограничена или отсутствует, реализуется главная потребность – спасение заблокированных рибосомных субчастиц для осуществления последующих раундов синтеза белка. Таким образом, бактерии приобрели разнообразные системы спасения трансляции, направленные главным образом не на контроль качества мРНК, а на высвобождение рибосомных субчастиц. ●

Работа выполнена при поддержке гранта
РНФ № 20-74-10031.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schmeing T.M., Ramakrishnan V. // Nature. 2009. V. 461. № 7268. P. 1234–1242.
- Laursen B.S., Sorensen H.P., Mortensen K.K., Sperling-Petersen H.U. // Microbiol. Mol. Biol. Rev. 2005. V. 69. № 1. P. 101–123.
- Keiler K.C. // Nat. Rev. Microbiol. 2015. V. 13. № 5. P. 285–297.
- Rajkovic A., Ibbá M. // Annu. Rev. Microbiol. 2017. V. 71. № 1. P. 117–131.
- Duval M., Dar D., Carvalho F., Rocha E.P.C., Sorek R., Cossart P. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2018. V. 115. № 52. P. 13359–13364.
- Ito K., Chiba S. // Annu. Rev. Biochem. 2013. V. 82. P. 171–202.
- Bandyra K.J., Luisi B.F. // RNA Biol. 2013. V. 10. № 4. P. 627–635.
- Ramadoss N., Alumasa J.N., Chang H., Brinker A., Keiler K.C. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2013. V. 110. № 25. P. 10282–10287.
- Chadani Y., Ono K., Ozawa S., Takahashi Y., Takai K., Nanamiya H., Tozawa Y., Kutsukake K., Abo T. // Mol. Microbiol. 2010. V. 78. № 4. P. 796–808.
- Ivanova N., Pavlov M.Y., Ehrenberg M. // J. Mol. Biol. 2005. V. 350. № 5. P. 897–905.
- Komine Y., Yokogawa T., Nishikawa K., Inokuchi H. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1994. V. 91. P. 9223–9227.
- Atkins J.F., Gesteland R.F. // Nature. 1996. V. 379. № 6568. P. 3105–3114.
- Janssen B.D., Hayes C.S. // Adv. Protein Chem. Struct. Biol. 2012. V. 86. P. 151–191.
- Abo T., Ueda K., Sunohara T., Ogawa K., Aiba H. // Genes Cells. 2002. V. 7. № 7. P. 629–638.
- Kyoko Hanawa-Suetsugu M.T., Inokuchi H., Himeno H., Muto A. // Nucl. Acids Res. 2002. V. 30. № 7. P. 1620–1629.
- Shimizu Y., Ueda T. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 23. P. 15987–15996.
- Neubauer C., Gillet R., Kelley A.C., Ramakrishnan V. // Science. 2012. V. 335. № 6074. P. 1366–1369.
- Keiler K.C., Waller P.R., Sauer R.T. // Science. 1996. V. 271. № 5251. P. 990–993.
- Richards J., Mehta P., Karzai A.W. // Mol. Microbiol. 2006. V. 62. № 6. P. 1700–1712.
- Demo G., Svidritskiy E., Madireddy R., Diaz-Avalos R., Grant T., Grigorieff N., Sousa D., Korostelev A.A. // Elife. 2017. V. 6. P. e23687.
- Kurita D., Chadani Y., Muto A., Abo T., Himeno H. // Nucl. Acids Res. 2014. V. 42. № 21. P. 13339–13352.
- Huter P., Muller C., Beckert B., Arenz S., Berninghausen

- O., Beckmann R., Wilson D.N. // *Nature*. 2017. V. 541. № 7631. P. 546–549.
23. Chadani Y., Ito K., Kutsukake K., Abo T. // *Mol. Microbiol.* 2012. V. 86. № 1. P. 37–50.
24. Chadani Y., Ono K., Kutsukake K., Abo T. // *Mol. Microbiol.* 2011. V. 80. № 3. P. 772–785.
25. Himeno H., Nameki N., Kurita D., Muto A., Abo T. // *Biochimie*. 2014. V. 114. P. 102–112.
26. Kurita D., Abo T., Himeno H. // *J. Biol. Chem.* 2020. V. 295. № 38. P. 13326–13337.
27. Abo T., Chadani Y. // *Front. Microbiol.* 2013. V. 5. P. 156.
28. Schaub R.E., Poole S.J., Garza-Sanchez F., Benbow S., Hayes C.S. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 35. P. 29765–29775.
29. Garza-Sanchez F., Schaub R.E., Janssen B.D., Hayes C.S. // *Mol. Microbiol.* 2011. V. 80. № 5. P. 1204–1219.
30. Shimokawa-Chiba N., Muller C., Fujiwara K., Beckert B., Ito K., Wilson D.N., Chiba S. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 5397.
31. Feaga H.A., Viollier P.H., Keiler K.C. // *mBio*. 2014. V. 5. № 6. P. e01916.
32. Akabane S., Ueda T., Nierhaus K.H., Takeuchi N. // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 9. P. e1004616.
33. Burroughs A.M., Aravind L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 8. P. 1981.
34. Müller C., Crowe-McAuliffe C., Wilson D.N. // *Front. Microbiol.* 2021. V. 12. P. 652980.
35. Carbone C.E., Demo G., Madireddy R., Svidritskiy E., Korostelev A.A. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 5552.
36. Goralski T.D.P., Kirimanjeswara G.S., Keiler K.C. // *mBio*. 2018. V. 9. № 6. P. e02436–02418.
37. James N.R., Brown A., Gordiyenko Y., Ramakrishnan V. // *Science*. 2016. V. 354. № 6318. P. 1437–1440.
38. Coatham M.L., Brandon H.E., Fischer J.J., Schummer T., Wieden H.J. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 4. P. 1952–1961.
39. Zhang Y., Mandava C.S., Cao W., Li X., Zhang D., Li N., Zhang Y., Zhang X., Qin Y., Mi K., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2015. V. 22. № 11. P. 906–913.
40. Ero R., Kumar V., Su W., Gao Y.G. // *Protein Sci.* 2019. V. 28. № 4. P. 684–693.
41. Blair J.M., Webber M.A., Baylay A.J., Ogbolu D.O., Piddock L.J. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2015. V. 13. № 1. P. 42–51.
42. Rudra P., Hurst-Hess K.R., Cotten K.L., Partida-Miranda A., Ghosh P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. V. 117. № 1. P. 629–634.
43. Wilson D.N., Hauryliuk V., Atkinson G.C. // *Nat. Rev.* 2020. V. 18. № 11. P. 637–648.
44. Crowe-McAuliffe C., Takada H., Murina V., Polte C., Kasvandik S., Tenson T., Ignatova Z., Atkinson G.C., Wilson D.N., Hauryliuk V. // *Mol. Cell*. 2021. V. 81. № 1. P. 115–126.
45. Lytvynenko I., Paternoga H., Thrun A., Balke A., Muller T.A., Chiang C.H., Nagler K., Tsapraillis G., Anders S., Bischofs I., et al. // *Cell*. 2019. V. 178. № 1. P. 76–90.
46. Filbeck S.C.F., Paternoga H., Tsapraillis G., Joazeiro C., Pfeffer S. // *Mol. Cell*. 2021. V. 81. № 1. P. 1–11.
47. Jiang L., Schaffitzel C., Bingel-Erlenmeyer R., Ban N., Korber P., Koning R.I., de Geus D.C., Plaisier J.R., Abrahams J.P. // *J. Mol. Biol.* 2009. V. 386. № 5. P. 1357–1367.
48. Herman J., Pel M.R., Grivell L.A. // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. № 17. P. 4423–4442.
49. Baranov P.V., Vestergaard B., Hamelryck T., Gesteland R.F., Nyborg J., Atkins J.F. // *Biol. Direct*. 2006. V. 1. P. 28.
50. Shi J.L.Y., Zhang Y., Jin Y., Bai F., Cheng Z., Jin S., Wu W. // *Antimicrob. Agents Chemother.* 2018. V. 62. № 2. P. e01867–01817.
51. Li G.-W., Oh E., Weissman J.S. // *Nature*. 2012. V. 484. № 7395. P. 538–541.
52. Schrader J.M., Zhou B., Li G.-W., Lasker K., Childers W.S., Williams B., Long T., Crosson S., McAdams H.H., Weissman J.S., et al. // *PLoS Genet.* 2014. V. 10. № 7. P. e1004463.
53. Hummels K.R., Kearns D.B. // *FEMS Microbiol. Rev.* 2020. V. 44. № 2. P. 208–218.
54. Katz A., Solden L., Zou S.B., Navarre W.W., Ibba M. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 5. P. 3261–3271.
55. Peil L., Starosta A.L., Virumae K., Atkinson G.C., Tenson T., Remme J., Wilson D.N. // *Nat. Chem. Biol.* 2012. V. 8. № 8. P. 695–697.
56. Park J.H., Johansson H.E., Aoki H., Huang B.X., Kim H.Y., Ganoza M.C., Park M.H. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 4. P. 2579–2590.
57. Roy H., Zou S.B., Bullwinkle T.J., Wolfe B.S., Gilreath M.S., Forsyth C.J., Navarre W.W., Ibba M. // *Nat. Chem. Biol.* 2011. V. 7. № 10. P. 667–669.
58. Navarre W.W., Zou S.B., Roy H., Xie J.L., Savchenko A., Singer A., Edvokimova E., Prost L.R., Kumar R., Ibba M., et al. // *Mol. Cell*. 2010. V. 39. № 2. P. 209–221.
59. Lassak J., Keilhauer E.C., Furst M., Wuichet K., Godeke J., Starosta A.L., Chen J.M., Sogaard-Andersen L., Rohr J., Wilson D.N., et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2015. V. 11. № 4. P. 266–270.
60. Rajkovic A., Erickson S., Witzky A., Branson O.E., Seo J., Gafken P.R., Frietas M.A., Whitelegge J.P., Faull K.F., Navarre W., et al. // *mBio*. 2015. V. 6. № 3. P. e00823.
61. Rajkovic A., Hummels K.R., Witzky A., Erickson S., Gafken P.R., Whitelegge J.P., Faull K.F., Kearns D.B., Ibba M. // *J. Biol. Chem.* 2016. V. 291. № 21. P. 10976–10985.
62. Schnier J., Schwelberge H.G., Smit-McBride Z., Kang H.A., Hershey J.W. // *Mol. Cell Biol.* 1991. V. 11. № 6. P. 3105–3114.
63. Starosta A.L., Lassak J., Peil L., Atkinson G.C., Woolstenhulme C.J., Virumae K., Buskirk A., Tenson T., Remme J., Jung K., et al. // *Cell Rep.* 2014. V. 9. № 2. P. 476–483.
64. Peil L., Starosta A.L., Lassak J., Atkinson G.C., Virumae K., Spitzer M., Tenson T., Jung K., Remme J., Wilson D.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 38. P. 15265–15270.
65. Balakrishnan R., Oman K., Shoji S., Bundschuh R., Fredrick K. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 21. P. 13370–13383.
66. Gagnona M.G., Lina J., Steitz T.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. № 18. P. 4994–4999.
67. Sharkey L.K.R., O'Neill A.J. // *ACS Infect. Dis.* 2018. V. 4. № 3. P. 239–246.
68. Crowe-McAuliffe C., Graf M., Huter P., Takada H., Abdelshahid M., Nováček J., Murina V., Atkinson J.C., Hauryliuk V., Wilson D.N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. № 36. P. 8978–8983.
69. Chen B., Boel G., Hashem Y., Ning W., Fei J., Wang C., Gonzalez R.L.Jr., Hunt J.F., Frank J. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2014. V. 21. № 2. P. 152–159.
70. Meir M., Rozenblit A., Fliger S., Geffen Y., Barkan D. // *BMC Microbiol.* 2020. V. 20. № 1. P. 288.
71. Murina V., Kasari M., Takada H., Hinno M., Saha C.K., Grimshaw J.W., Seki T., Reith M., Putrins M., Tenson T., et al. // *J. Mol. Biol.* 2019. V. 431. № 18. P. 3568–3590.
72. Korostelev A.A. // *RNA*. 2011. V. 17. № 8. P. 1409–1421.
73. Ramadoss N.S., Zhou X., Keiler K.C. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 2. P. e57537.
74. Keiler K.C., Shapiro L. // *J. Bacteriol.* 2003. V. 185. № 2. P. 573–580.

УДК 577.21

Вовлечение эпигенетического механизма метилирования ДНК в развитие рассеянного склероза

И. С. Киселев*, О. Г. Кулакова, А. Н. Бойко, О. О. Фаворова

Российский национальный исследовательский медицинский университет им. Н.И. Пирогова
Минздрава РФ, Москва, 117997 Россия

*E-mail: Kiselev.ivan.1991@gmail.com

Поступила в редакцию 05.06.2020

Принята к печати 24.09.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11043

РЕФЕРАТ Эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов – это группа ключевых молекулярных механизмов в клетке, которые вызывают изменения активности генов без изменений в их нуклеотидной последовательности, причем эти изменения могут наследоваться дочерними клетками. Один из основных эпигенетических механизмов – метилирование ДНК в положении С5 цитозинового основания в составе CpG-динуклеотидов. Стремительно растет число работ, посвященных поиску паттернов метилирования, специфичных для рассеянного склероза (РС) – тяжелого хронического заболевания центральной нервной системы аутоиммунной природы. При этом вопрос о вкладе метилирования ДНК в формирование различных клинических фенотипов этого высокогетерогенного заболевания только начал привлекать внимание исследователей. В обзоре рассмотрены молекулярные механизмы, лежащие в основе процесса метилирования ДНК. Описаны факторы риска РС, которые могут влиять на уровень метилирования ДНК и тем самым модулировать экспрессию генов, вовлеченных в патогенез заболевания. Основное внимание уделено анализу данных о дифференциальном метилировании ДНК из различного биологического материала больных РС, полученных с использованием кандидатного подхода и высокопроизводительных методов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА метилирование ДНК, эпигенетика, рассеянный склероз.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ВПРС – вторично-прогрессирующий рассеянный склероз; ДМС – дифференциально метилированный CpG-сайт; КИС – клинически изолированный синдром; МНК – мононуклеарные клетки периферической крови; ППРС – первично-прогрессирующий рассеянный склероз; РРС – ремиттирующий рассеянный склероз; РС – рассеянный склероз; ЦНС – центральная нервная система; BER (Base Excision Repair) – эксцизионная репарация оснований; DNMT (DNA-methyltransferase) – ДНК-метилтрансфераза; EDSS (Expanded Disability Status Scale) – расширенная шкала инвалидизации; GWAS (Genome Wide Association Study) – полногеномный поиск ассоциации; HDAC (Histone Deacetylase) – гистоновая деацетилаза; MBD (Methyl-Binding Domain Protein) – белок с метилсвязывающим доменом; NGS (Next Generation Sequencing) – высокопроизводительное секвенирование; SAM (S-Adenosyl Methionine) – S-аденозилметионин; TET (TET Methylcytosine Dioxygenase) – метилцитозин-диоксигеназа TET; Rep – репрессорные белки.

ВВЕДЕНИЕ

Под эпигенетическими процессами понимают наследуемые (по крайней мере, в ходе митоза) изменения в экспрессии генов, которые не затрагивают нуклеотидной последовательности ДНК [1]. Однако в настоящее время это классическое определение все чаще расширяют, включая в число рассматриваемых эпигенетических явлений стабильные долгосрочные вариации в транскрипционном профиле клеток, которые не обязательно наследуются [2].

Основные механизмы эпигенетической регуляции экспрессии генов представлены на *рис. 1*. К ним от-

носятся метилирование ДНК (А), модификация гистонов – функционально значимые биохимические изменения хроматина, которые влияют на доступность определенных геномных локусов для ферментов транскрипции (Б), а также регуляция экспрессии генов на различных уровнях реализации генетической информации при участии некодирующих регуляторных РНК, среди которых наиболее хорошо изучены микроРНК, вовлеченные в регуляцию экспрессии на посттранскрипционном уровне (В) [3].

Эти механизмы, действуя синергично, формируют систему контроля основных клеточных процессов,

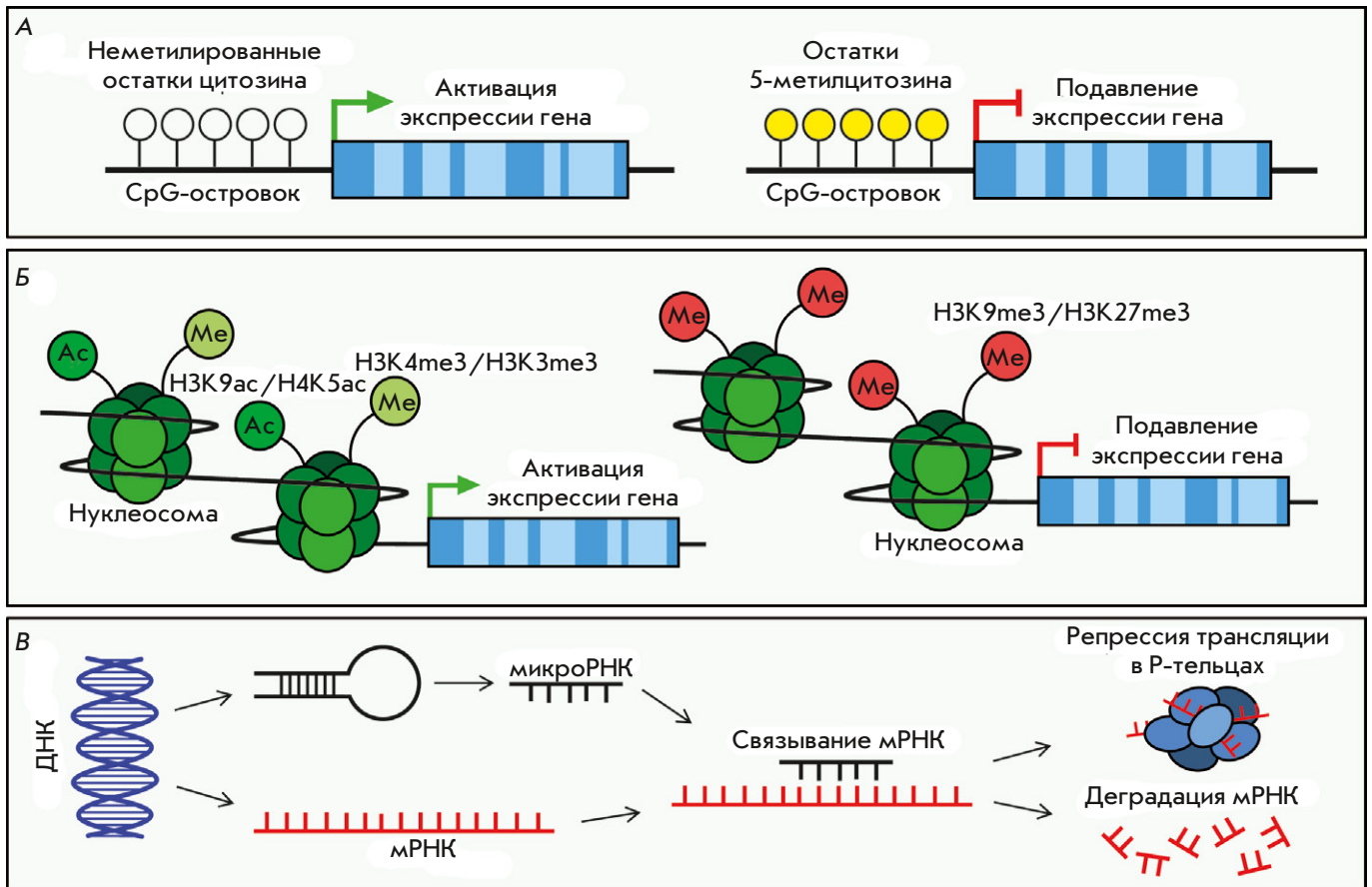


Рис. 1. Основные эпигенетические механизмы, вовлеченные в процесс регуляции экспрессии генов. Экзон-интронная структура генов изображена как чередование синих и голубых участков. А – метилирование остатков цитозина в составе CpG-островка, расположенного в промоторной области гена. Б – наиболее распространенные модификации гистонов, способствующие активации экспрессии генов (H3K9ac/H4K5ac – ацетилирование лизина 9 гистона H3 или лизина 5 гистона H4; H3K4me3/H3K3me3 – триметилирование лизина 3 или лизина 4 гистона H3) и ее подавлению (H3K9me3/H3K27me3 – триметилирование лизина 9 или лизина 27 гистона H3). В – микроРНК-опосредованная репрессия трансляции и дегградация мРНК

а потому имеют решающее значение для нормального развития и дифференцировки всех клеточных линий организма [4]. В настоящее время доказано, что влияние многих факторов внешней среды опосредовано различными эпигенетическими механизмами [5]. При этом в ряде случаев такое взаимодействие приводит к стабильным патологическим изменениям, лежащим в основе многих хронических заболеваний [6].

Хотя изучение роли эпигенетических механизмов в развитии распространенных заболеваний человека началось преимущественно с онкологических заболеваний [7], в настоящее время все большее внимание исследователей привлекают заболевания иной природы, в частности, аутоиммунные и нейродегенеративные [8, 9]. Выявление характерных для этих патологий особенностей эпигенетической регуляции может помочь в понимании механизмов их развития

и способствовать разработке новых эффективных терапевтических препаратов.

В этом обзоре мы остановимся на одном из основных механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов – метилировании ДНК – и его роли в развитии рассеянного склероза (РС) – тяжелого социально значимого заболевания центральной нервной системы (ЦНС), характеризующегося хроническим аутоиммунным воспалением и нейродегенерацией.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ МЕХАНИЗМЫ ЭПИГЕНЕТИЧЕСКОЙ РЕГУЛЯЦИИ ЭКСПРЕССИИ ГЕНОВ

Метилирование ДНК – универсальный эпигенетический механизм, способный различными путями подавлять экспрессию генов и вовлеченный в регуляцию активности двух других упомянутых механизмов – модификации гистонов и регуляции экс-

прессии генов регуляторными некодирующими РНК. В подавляющем большинстве случаев ДНК метилируется в положении С5 остатка цитозина в составе CpG-динуклеотидов (CpG-сайтов). CpG-сайты, подвергающиеся метилированию, распределены в геноме неравномерно, они могут образовывать скопления, называемые CpG-островками (CpG-islands). CpG-островки – это участки ДНК протяженностью не менее 500 п.н. с содержанием нуклеотидов G и C более 55% и соотношением реального количества CpG-сайтов к ожидаемому при равномерном их распределении по геному более 65% [10]. CpG-островки и соседние области (shore) в пределах 2 т.п.н. от них имеют наибольшее функциональное значение, так как при их метилировании/деметиловании эффективно изменяется уровень экспрессии близлежащих генов (см. рис. 1А). Выделяют также отдаленные области (shelf), расположенные в пределах 2 т.п.н. от соседних областей, и остальную часть генома (sea), где CpG-сайты распределены сравнительно равномерно и встречаются редко. Около 70% промоторов генов содержат CpG-островки [11], что и определяет участие последних в процессах регуляции экспрессии генов в клетке.

Общая схема, суммирующая современные представления о молекулярных механизмах метилирования и деметилирования CpG-сайтов генома и об их вовлечении в регуляцию экспрессии генов, представлена на рис. 2.

Метилирование ДНК осуществляется с помощью ДНК-метилтрансфераз (DNMT) – ферментов, которые способны переносить метильную группу к пятому атому углерода в остатке цитозина с образованием 5-метилцитозина (5mC), используя в качестве донора S-аденозилметионин (SAM) [12]. Семейство DNMT включает DNMT1, DNMT2 и подсемейство DNMT3, состоящее из DNMT3a, DNMT3b и DNMT3L. DNMT1 поддерживает метилирование ДНК после репликации и способна быстро метилировать вновь синтезированную цепь ДНК по матрице материнской, а подсемейство DNMT3 участвует в метилировании ДНК *de novo* [13]. DNMT2, или TRDMT1, tRNA (cytosine-5-)methyltransferase, строго говоря, не является ДНК-метилтрансферазой и участвует в метилировании цитозина в положении 38 антикодоновой петли тРНК.

Метилирование CpG-сайтов в промоторной области гена привлекает белки с метилсвязывающим

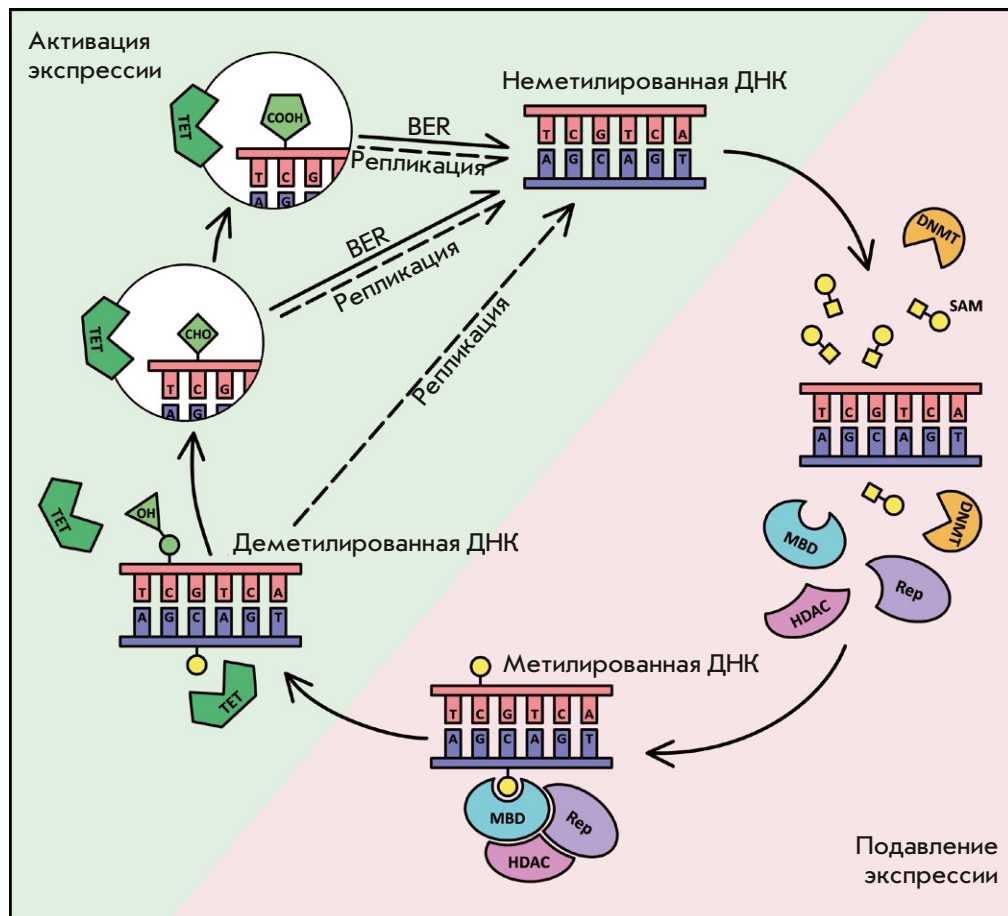


Рис. 2. Метилирование ДНК как эпигенетический механизм регуляции экспрессии генов (см. описание в тексте). BER (Base Excision Repair) – эксцизионная репарация оснований; DNMT (DNA-methyltransferase) – ДНК-метилтрансфераза; HDAC (Histone Deacetylase) – гистоновая деацетилаза; MBD (Methyl-Binding Domain Protein) – белок с метилсвязывающим доменом; SAM (S-Adenosyl Methionine) – S-аденозилметионин; TET (TET Methylcytosine Dioxygenase) – метилцитозин-диоксигеназа TET; Rep – репрессорные белки

доменом (methyl-binding domain proteins, MBD), которые способны подавлять экспрессию генов по двум различным механизмам. Первой реакцией на метилирование промотора является сборка на основе MBD белковых комплексов, включающих корепрессорные белки (Rep), которые обеспечивают быстрое подавление экспрессии за счет препятствования связыванию транскрипционных факторов [14]. Для длительной стабильной супрессии генов белки с MBD способны привлекать гистоновые деацетилазы (HDAC) и таким образом инициировать другой механизм эпигенетической регуляции экспрессии генов – модификацию гистонов, приводящую к конденсации хроматина в области гена [15, 16].

Деметилирование 5-метилцитозина происходит при участии метилцитозин-диоксигеназ ТЕТ (Tet Methylcytosine Dioxygenase) 1, 2 и 3, относящихся к одному семейству. Они способны катализировать окисление 5-метилцитозина в 5-гидроксиметилцитозин, затем в 5-формилцитозин и, наконец, в 5-карбоксилцитозин [17]. Образовавшиеся модифицированные основания не воспринимаются молекулярной машиной клетки как метилированные и могут оставаться относительно стабильными, постепенно теряясь при синтезе новых молекул ДНК в ходе репликации; этот пассивный процесс деметилирования называется «зависимым от репликации разведением» (replication-dependent dilution). Кроме того, 5-формилцитозин и 5-карбоксилцитозин могут активно элиминироваться независимо от репликации путем отщепления от сахарофосфатного остова ДНК при участии тимин-ДНК-гликозилазы с последующим исправлением разрыва по механизму эксцизионной репарации оснований [17].

Как упомянуто выше, процесс метилирования ДНК тесно связан с эпигенетическим механизмом модификации гистонов [16]. К наиболее значимым модификациям гистонов относятся ацетилирование и метилирование (см. рис. 1Б). Ацетилирование гистонов происходит по остаткам лизина и катализируется ацетилтрансферазами гистонов; в обратном процессе участвуют гистоновые деацетилазы. Высокие уровни ацетилирования гистонов способствуют менее плотной укладке хроматина и соответственно повышенной доступности ДНК для хроматинсвязывающих белков и ферментов, участвующих в транскрипции, тогда как пониженное ацетилирование производит противоположный эффект. Метилирование гистонов по остаткам лизина или аргинина катализируется гистон-метилтрансферазами, при этом влияние метилирования на плотность упаковки хроматина и, следовательно, на экспрессию генов зависит от местоположения аминокислотного остатка и количества присоединенных к нему метильных групп [18].

микроРНК-опосредованная регуляция экспрессии генов (см. рис. 1В) также в значительной степени зависит от уровня метилирования ДНК, так как осуществляется на посттранскрипционном уровне, и количество микроРНК в клетке зависит от уровня метилирования их генов [19]. микроРНК – это небольшие (18–25 нуклеотидов) одноцепочечные некодирующие молекулы РНК, способные комплементарно связываться с мРНК гена-мишени. Связывание происходит преимущественно в 3'-нетранслируемой области мишени и запускает каскад реакций, приводящих к подавлению синтеза ее белкового продукта. Полная комплементарность микроРНК и мРНК-мишени при их связывании вызывает активацию ферментов эндонуклеазного комплекса и последующую деградацию мРНК-мишени, в то время как неполная комплементарность ведет к подавлению трансляции на стадиях инициации или элонгации, отщеплению поли-А-последовательности мРНК и транслокации ее в Р-тельца для последующего хранения или деградации [20].

В целом, из трех описанных механизмов эпигенетической регуляции экспрессии генов наиболее хорошо изучен процесс метилирования ДНК. К настоящему моменту накоплен большой объем информации, свидетельствующий о ключевой роли этого процесса в развитии многих аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний человека [8, 9], в частности, в развитии РС. Далее мы рассмотрим совокупность данных, в которых анализируется вклад метилирования ДНК в развитие этого тяжелого заболевания ЦНС.

ЭПИДЕМИОЛОГИЧЕСКИЕ, КЛИНИЧЕСКИЕ И ЭТИОЛОГИЧЕСКИЕ ОСОБЕННОСТИ РАССЕЯННОГО СКЛЕРОЗА

РС – хроническое заболевание аутоиммунной природы, которое сочетает в своем патогенезе демиелинизацию аксонов ЦНС и нейродегенерацию и сопровождается прогрессирующей неврологической дисфункцией [3]. Вследствие неуклонного нарастания неврологического дефицита происходит необратимая инвалидизация пациентов в молодом трудоспособном возрасте, что обуславливает высокую социальную и экономическую значимость заболевания. РС встречается практически по всему земному шару, но распространенность его в разных популяциях сильно варьирует. В РФ это заболевание встречается с частотой около 80 случаев на 100 000 населения [21]. При этом его распространенность возрастает, что связано не только с повышением продолжительности жизни больных и успехами в диагностике РС, но и с истинным повышением заболеваемости [22].

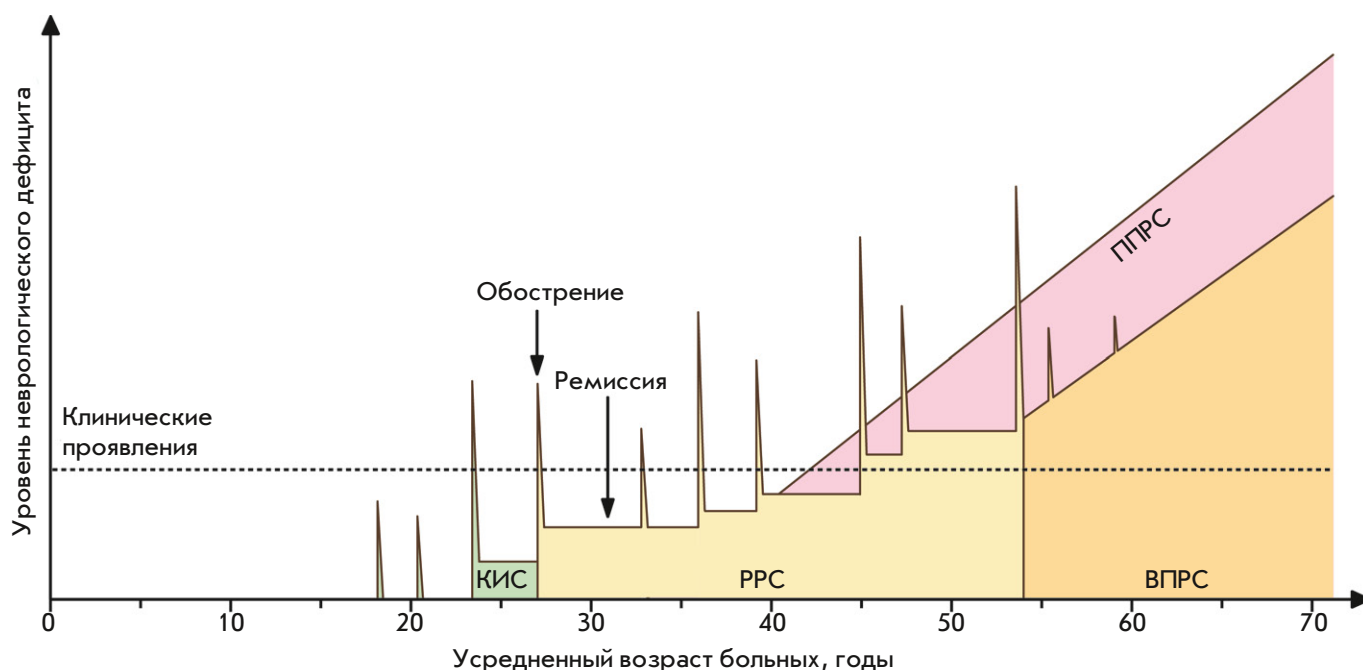


Рис. 3. Схематическое представление динамики изменений неврологической симптоматики, происходящих при разных типах течения РС. Пунктирной линией отмечен уровень неврологического дефицита, при котором возникают клинические проявления болезни. При единичном изолированном во времени эпизоде клинических нарушений, характерных для РРС, ставят диагноз «клинически изолированный синдром» (КИС); после этого могут следовать долгие годы ремиссии. Повторные обострения, перемежающиеся периодами ремиссии, позволяют диагностировать «ремиттирующий РС» (РРС). В ряде случаев РРС при его длительном течении перетекает во вторично-прогрессирующий РС (ВПРС), характеризующийся неуклонным прогрессированием неврологического дефицита. Представлен также первично-прогрессирующий РС (ППРС), который характеризуется неврологическими ухудшениями без выраженных ремиссий с самого начала болезни; при этом клинические проявления ППРС возникают позже, чем при РРС. Временная шкала построена на основании усредненных значений возраста дебюта разных типов течения РС [23, 24, 26]. Количество и длительность обострений и ремиссий представлены схематически

Течение РС характеризуется выраженной клинической гетерогенностью. В большинстве случаев у больных наблюдается ремиттирующее течение РС (РРС), характеризующееся сменами периодов нарастания степени неврологического дефицита (обострениями) и снижения или исчезновения неврологической симптоматики (ремиссиями). При отсутствии эффективной медикаментозной терапии примерно у половины больных РРС в течение 10 лет от начала заболевания развивается вторично-прогрессирующее течение РС (ВПРС), которое характеризуется неуклонным нарастанием степени неврологического дефицита [23]. У 10–15% пациентов подобная клиническая картина наблюдается с самого начала болезни, и при таком тяжелом течении заболевания его называют первично-прогрессирующим РС (ППРС) [24]. Показано, что для разных типов течения РС характерна различная степень выраженности вовлеченных в патогенез аутоиммунных, воспалительных и нейродегенеративных процессов [25]. Динамика

изменений уровня неврологического дефицита, наблюдаемая при различных типах течения РС – РРС, ВПРС и ППРС, – представлена на рис. 3.

Общепризнанно, что РС, как и другие распространенные аутоиммунные болезни с выраженным воспалительным компонентом, относится к многофакторным заболеваниям и развивается при воздействии факторов внешней среды у лиц с генетической предрасположенностью. Взаимодействие наследственных и внешних факторов при этом может опосредоваться эпигенетическими механизмами регуляции экспрессии генов и, в первую очередь, метилированием ДНК [3].

К настоящему времени выявлено достаточно большое количество факторов внешней среды, которые могут быть триггерами развития заболевания, и многие из них могут влиять на эпигенетические механизмы регуляции экспрессии генов. К таким внешним факторам относятся, например, вирусные инфекции. Так, наблюдается четкая связь высоко-

го риска РС с перенесенным ранее инфекционным мононуклеозом – заболеванием, вызываемым вирусом Эпштейна–Барр [27]. Латентный мембранный белок 1 (latent membrane protein 1, LMP1) вируса Эпштейна–Барр гомологичен поверхностному белку В-лимфоцитов CD40 и участвует в стимулировании В-лимфоцит-опосредованных иммунных и воспалительных реакций, тем самым повышая риск развития РС и других аутоиммунных заболеваний [28]. Помимо непосредственной стимуляции CD40-зависимых сигнальных путей LMP1 способен активировать эпигенетический механизм метилирования ДНК клеток, что ведет к повышению общего уровня метилирования генома клетки хозяина; следствием этого является модуляция экспрессии различных генов [29].

Еще один важный фактор риска РС – курение табака [30]. Исследования последних лет показали, что курение, как и инфицирование вирусом Эпштейна–Барр, стимулирует метилирование ДНК, в том числе и у больных РС [31, 32]. Кроме того, курение способствует модификации гистонов и изменению профилей экспрессии микроРНК в ряде клеточных популяций [33, 34], т.е. влияет на все три основных механизма эпигенетической регуляции экспрессии генов. Влияние других факторов риска РС, таких, как уровень витамина D [35] и женских половых гормонов [36, 37], на экспрессию генов также может в существенной степени опосредоваться эпигенетическими процессами [38–40].

Изучению генетических особенностей РС традиционно отводится большое внимание. Первой областью генома, для которой показана связь с заболеванием, стал локус генов главного комплекса гистосовместимости HLA. К настоящему моменту основным маркером риска РС признан аллель *1501 высокополиморфного гена *DRB1*, относящегося к HLA класса II. Помимо него в европейских популяциях с заболеванием ассоциированы и другие варианты гена *DRB1*: *0301, *0405, *0801, *1303 и т.д., а также ряд аллелей генов HLA класса I (HLA-A*0301, HLA-B*3701, *3801 и *4402, HLA-C*05 и *07) [41]. Наибольшую эффективность в обнаружении новых маркеров предрасположенности к РС за пределами локуса HLA показал полногеномный поиск ассоциации (Genome Wide Association Study, GWAS), который к настоящему моменту позволил выявить более 200 полиморфных вариантов, ассоциированных с заболеванием. Вместе с тем, совокупный вклад всех идентифицированных к настоящему моменту генетических вариантов по разным оценкам может объяснить не более 48% наследуемости [42]. Эпигенетические механизмы, влияющие на экспрессию генов в различных клетках или тканях, но не связанные с изменением нуклеотидной последовательности ДНК, могут оказаться

ключевыми при решении проблемы «недостающей» наследуемости при РС.

ИЗУЧЕНИЕ МЕТИЛИРОВАНИЯ ДНК ПРИ РАССЕЯННОМ СКЛЕРОЗЕ

Исследования, посвященные анализу метилирования ДНК при развитии РС, начались более 10 лет назад с применением различных методических подходов, наиболее распространенными из которых стали анализ дифференциального метилирования отдельных генов-кандидатов и полногеномный анализ метилирования с применением чипов высокой плотности или высокопроизводительного секвенирования (NGS, next generation sequencing). Первым для изучения эпигенетической регуляции при РС начали использовать самый доступный подход – анализ метилирования ДНК в области перспективных генов-кандидатов. Такой анализ проводили преимущественно с помощью пиросеквенирования или MALDI-TOFF-масс-спектрометрии продуктов амплификации ДНК-матрицы после ее бисульфитной конверсии, а также с использованием метилчувствительной или метилспецифической ПЦР с последующим сравнением средних уровней метилирования CpG-сайтов в исследуемых фрагментах. В качестве сравниваемых групп выступали, как правило, группы больных РС и здоровых индивидов. Такие исследования немногочисленны (найдено всего 16 публикаций) и были проведены на ДНК из цельной крови и из некоторых ее фракций, а также из ткани мозга (табл. 1).

Как видно из табл. 1, в цельной крови и в различных популяциях лейкоцитов больных РС выявляли дифференциальное метилирование генов, вовлеченных в регуляцию активности аутоиммунных реакций (*IL2RA*, *PTPN6*, *SOCS1*) [44, 47, 51] и поддержание функционирования ЦНС (*PADI2*, *CDKN2A*, *RUNX3*, *NEUROG1*, *BDNF*) [48, 50, 51]. При этом наблюдаемые различия в уровнях метилирования ДНК оказываются разнонаправленными, что указывает на вовлечение этого процесса как в активацию воспалительного процесса в ЦНС [47, 51], так и в его подавление [44, 48, 50]. Кроме того, в клетках крови наблюдали гиперметилирование гена *VDR*, кодирующего рецептор витамина D [43], дефицит которого считается одним из основных внешних триггеров развития РС, а также генов *DNMT1*, *TET2*, вовлеченных в процессы метилирования и деметилирования ДНК соответственно [46].

При изучении панели из 56 генов в свободной ДНК сыворотки крови обнаружены различия в уровнях метилирования этих генов, которые позволяют отличить больных РС в стадии обострения от больных в ремиссии и от здоровых добровольцев контрольной группы с чувствительностью и специфичностью, пре-

Таблица 1. Данные о метилировании ДНК у больных РС, полученные с использованием «кандидатного» подхода

Источник ДНК	Исследованные группы	Основной результат	Год [ссылка]
Т-лимфоциты	Больные РС, контрольная группа	Выявлено гиперметилирование области альтернативного промотора гена <i>VDR</i> у больных РС.	2017 [43]
	Больные РС, контрольная группа	Выявлено гипометилирование промоторной области гена <i>IL2RA</i> у больных РС.	2017 [44]
Мононуклеарные клетки периферической крови	Больные РС, контрольная группа	Выявлена связь гиперметилирования ретротранспозонов LINE-1 с высоким риском РС и низкой эффективностью терапии интерфероном-бета.	2017 [45]
	Больные РС, контрольная группа	Анализ гена <i>IL2RA</i> не выявил различий в его метилировании в сравниваемых группах.	2017 [44]
	Больные РС, контрольная группа	Выявлено гиперметилирование промоторов генов <i>TET2</i> и <i>DNMT1</i> у больных РС. Значимых различий в глобальном метилировании не выявлено.	2014 [46]
	Больные РС, контрольная группа	Выявлено гиперметилирование промотора гена <i>PTPN6</i> у больных РС.	2012 [47]
	Больные РС, контрольная группа	При анализе генов <i>PADI2</i> и <i>PADI4</i> выявлено гипометилирование промотора гена <i>PADI2</i> у больных РС.	2012 [48]
	Монозиготные близнецы, дискордантные по диагнозу РС	При анализе гена <i>CIITA</i> не выявлено его дифференциальное метилирование между сравниваемыми группами.	2008 [49]
Цельная кровь	Больные РС	Выявлено гипометилирование гена <i>BDNF</i> у больных с более высокой скоростью прогрессирования заболевания.	2018 [50]
	Больные РС в обострении и в ремиссии, контрольная группа	При анализе генов <i>RUNX3</i> , <i>MLH1</i> , <i>IGF2</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>SOC1</i> , <i>NEUROG1</i> , <i>CACNA1G</i> и <i>CRABP1</i> выявлено дифференциальное метилирование <i>RUNX3</i> , <i>CDKN2A</i> , <i>SOC1</i> и <i>NEUROG1</i> у больных РС в сравнении с контролями. Различий между больными в обострении и ремиссии не наблюдалось.	2018 [51]
	Больные РС, контрольная группа	При анализе гена <i>TMEM39A</i> не выявлено его дифференциальное метилирование между сравниваемыми группами.	2017 [52]
	Больные РС, контрольная группа	Выявлено гиперметилирование ретротранспозонов LINE-1 у больных, причем уровень метилирования коррелировал со средним уровнем инвалидизации по шкале EDSS.	2016 [53]
	Больные РС, больные ПППС	При анализе генов <i>HLA-DRB1*1501</i> и <i>HLA-DRB5</i> не выявлено связи их метилирования с клинической формой РС.	2010 [54]
Сыворотка крови	Больные РС, контрольная группа	Выявлено гиперметилирование элементов подсемейства L1PA2 ретротранспозонов LINE-1 у больных РС.	2018 [55]
	Больные РС в обострении и в ремиссии, контрольная группа	Выявлено гиперметилирование гена <i>MOG</i> у больных РС в обострении при сравнении с больными в ремиссии и контрольной группой.	2016 [56]
	Больные РС в обострении и в ремиссии, контрольная группа	При анализе панели из 56 генов выявлены значимые различия уровней их метилирования между всеми тремя группами.	2010 [57]
Ткани мозга	Больные РС, контрольная группа	При анализе гена <i>IL2RA</i> не выявлено различий в его метилировании в сравниваемых группах.	2017 [44]
	Больные РС, контрольная группа	Выявлено гипометилирование гена <i>PADI2</i> в нормальном белом веществе головного мозга больных РС.	2007 [58]

вышающими 70% [57]. В работе [56] в сыворотке крови больных РС обнаружено гиперметилирование гена *MOG*, кодирующего один из белков миелиновой оболочки. По мнению авторов, это может указывать на нарушение экспрессии *MOG* в олигодендроцитах ЦНС, ДНК которых попадает в кровоток после их разрушения в ходе демиелинизации. При изучении непосредственно тканей головного мозга выявлено гипометилирование гена пептидил-аргининдеими-

назы типа 2 (*PADI2*), участвующей в посттрансляционной модификации ключевого белка миелиновой оболочки нейронов – основного белка миелина [58]. Тот факт, что снижение уровня метилирования этого гена обнаруживается также в мононуклеарных клетках периферической крови (МНК) больных РС [48], может указывать на вовлечение в модуляцию его экспрессии регуляторных механизмов, универсальных для разных тканей.

Единственное исследование, в котором сравнивали уровни метилирования генов *HLA-DRB1* и *HLA-DRB5* в цельной крови больных РС и ППРС [54], не выявило значимых различий между этими группами.

Несколько в стороне стоят исследования, посвященные уровню метилирования ретротранспозонов суперсемейства LINE. В нормальных условиях эти повторяющиеся последовательности содержат много метилированных CpG-сайтов, что предотвращает транскрипцию их генов [59], поэтому анализ их дифференциального метилирования используется как простой способ оценки глобального уровня метилирования генома при различных опухолях и некоторых аутоиммунных заболеваниях [55]. Уровень метилирования ретротранспозонов семейства LINE-1 изучали у больных РС в МНК, в цельной крови и в сыворотке крови [45, 53, 55]; во всех случаях наблюдали гиперметилирование LINE-1. Кроме того, обнаружена связь более высокого уровня метилирования LINE-1 с выраженной инвалидизацией по шкале EDSS и низкой эффективностью терапии РС интерфероном-бета [45, 53]. Хорошая воспроизводимость данных о гиперметилировании элементов LINE-1 у больных РС и связь уровней их метилирования с тяжестью болезни и эффективностью медикаментозной терапии указывает на то, что ретротранспозоны семейства LINE-1 могут стать перспективными диагностическими и прогностическими маркерами РС.

В целом, данные, полученные с использованием «кандидатного» подхода, позволили показать, что процесс метилирования ДНК вовлечен в патогенез РС, и открыли дорогу для изучения этого эпигенетического механизма регуляции экспрессии генов у больных РС с помощью менее чувствительных, однако гораздо более производительных полногеномных методов. Применение этих методов, к которым относятся в первую очередь биологические чипы высокой плотности и высокопроизводительное секвенирование (next generation sequencing, NGS), позволяет обнаруживать по всему геному дифференциально метилированные сайты (ДМС) – отдельные CpG-сайты, уровни метилирования которых меняются при РС. В табл. 2 суммированы результаты полногеномных исследований метилирования ДНК у больных РС при использовании различных групп сравнения.

Важно отметить, что порог статистической значимости (p), используемый для выявления ДМС на полногеномном уровне, колеблется в разных работах в широком диапазоне. В пяти из 18 представленных в табл. 2 публикаций [32, 60–63] вводили поправки на множественные сравнения и значимыми считали различия при $p_{FDR} < 0.05$. В остальных

исследованиях использовали более мягкий порог статистической значимости: номинальное значение p в интервале от 0.05 до 0.0005. Помимо величины p , в качестве критерия отбора ДМС обычно используют минимальную разницу среднего уровня метилирования CpG-сайта между сравниваемыми группами (β), которая чаще всего варьирует в пределах 5–10% [64, 65]. Так как ДМС, не удовлетворяющие критериям, выбранным авторами опубликованных работ, часто оказываются не представленными в публикациях, в ходе дальнейшего обсуждения мы будем опираться на значения p и β , использованные для идентификации ДМС авторами.

В качестве источника ДНК в проведенных исследованиях в основном используются различные фракции и клетки крови (цельная кровь, сыворотка, МНК), CD4+, CD8+ Т-лимфоциты, CD19+ В-лимфоциты, CD14+ моноциты); ткани мозга изучали только в нескольких работах. В отдельных работах использовали близнецовый метод, однако в большинстве случаев сравнивали группы больных РС и здоровых индивидов. В единичных исследованиях анализировали изменение метилирования ДНК у больных РС под влиянием терапии разными препаратами и на стадиях обострения и ремиссии, а также при сравнении больных РС с больными ВПРС и/или ППРС.

Среди приведенных в табл. 2 результатов особняком стоят данные, полученные при анализе профилей метилирования ДНК в парах монозиготных близнецов, дискордантных по диагнозу РС. При сравнении уровней метилирования ДНК из CD4+ Т-лимфоцитов таких близнецов не наблюдали существенных различий ни в одной из трех изученных пар: количество ДМС, наблюдаемых при сравнении близнецов из каждой пары, оказалось меньшим, чем при сравнении неродственных здоровых индивидов [69]. При изучении той же популяции лимфоцитов у близнецов выявили дифференциальное метилирование гена *FIRRE*, а при анализе метилирования ДНК в МНК наблюдали ДМС в области генов *TMEM232* и *ZBTB16* [61]. Однако в группу больных [61] вошли пациенты и с РС, и с ВПРС, и с ППРС, поэтому выявленные ДМС можно рассматривать только как эпигенетические маркеры, характерные для РС в целом. Можно констатировать, что исследования, проведенные близнецовым методом, пока не привели к однозначным заключениям.

Как видно из табл. 2, в большинстве опубликованных работ сравнивали уровни метилирования ДНК из Т-лимфоцитов (в первую очередь CD4+) больных РС и в контрольной группе, однако зачастую получены довольно противоречивые данные. В частности, можно сравнить результаты шести таких ис-

Таблица 2. Данные о метилировании ДНК у больных РС, полученные с использованием высокопроизводительных методов анализа

Источник ДНК	Группы	Основной результат	Год [ссылка]
CD4+ Т-лимфоциты	Монозиготные близнецы, дискордантные по диагнозу РС (смешанная группа РРС, ВПРС и ППРС)	Выявлено дифференциальное метилирование гена <i>FIRRE</i> .	2019 [61]
	Больные РРС, контрольная группа	Выявлено дифференциальное метилирование в области генов <i>MOG/ZFP57</i> , <i>HLA-DRB1</i> , <i>NINJ2/LOC100049716</i> и <i>SLFN12</i> у больных РРС.	2019 [66]
	Больные РРС и ВПРС, контрольная группа	Выявлено гиперметилирование последних экзонов гена <i>VMP1/MIR21</i> у больных РРС при сравнении с контрольной группой и с больными ВПРС.	2018 [67]
	Больные РРС до и после лечения диметилфумаратом	Выявлено 945 ДМС, 97% которых было гиперметилировано после лечения. ДМС генов <i>SNORD1A</i> , <i>SHTN1</i> , <i>MZB1</i> и <i>TNF</i> расположены в промоторной области.	2018 [64]
	Больные РРС, контрольная группа	Выявлено дифференциальное метилирование локуса HLA в области генов <i>HLA-DRB1</i> , <i>HLA-DRB5</i> и <i>RNF39</i> . ДМС также обнаружены в области генов <i>HCG4B</i> , <i>PM20D1</i> и <i>ERICH1</i> .	2017 [65]
	Больные РРС, контрольная группа	Не выявлено значимых различий в метилировании ДНК больных РРС и здоровых контролей.	2015 [60]
	Больные РРС, контрольная группа	Выявлено дифференциальное метилирование локуса HLA (19 ДМС) в области гена <i>HLA-DRB1</i> и 55 ДМС за его пределами, многие из них локализованы в генах, ассоциация которых с РС показана ранее.	2014 [68]
	Монозиготные близнецы, дискордантные по диагнозу РС	Не выявлено значимых различий в метилировании ДНК у близнецов.	2010 [69]
CD8+ Т-лимфоциты	Больные РРС, контрольная группа	Выявлено дифференциальное метилирование генов <i>HLA-DRB1</i> и <i>SLFN12</i> у больных РРС; наблюдается глобальное гиперметилирование ДНК	2019 [66]
	Больные РРС, контрольная группа	Выявлено 79 ДМС, ни один из которых не располагался в области гена <i>HLA-DRB1</i> .	2015 [70]
	Больные РРС, контрольная группа	Выявлено гиперметилирование ДНК у больных РРС по сравнению с контролем. Различий в уровнях метилирования отдельных ДМС не выявлено.	2015 [60]
CD19+ В-лимфоциты	Больные РРС на лечении, контрольная группа	Выявлено крупное скопление ДМС в области гена <i>LTA</i> , а также ДМС в области РС-ассоциированных генов <i>SLC44A2</i> , <i>LTBR</i> , <i>CARD11</i> и <i>CXCR5</i> .	2018 [71]
CD14+ моноциты	Больные РРС, контрольная группа	Выявлено 2 ДМС в области гена <i>HLA-DRB1</i> .	2018 [72]
CD4+, CD8+, CD19+ и CD14+ лейкоциты	Больные РРС и ВПРС, контрольная группа	Уровни метилирования ДНК оценивали в CD4+, CD8+, CD19+ и CD14+ клетках по отдельности с последующим отбором ДМС, универсальных для разных клеточных типов. Выявлены паттерны метилирования, специфические для РРС и ВПРС.	2019 [73]
Мононуклеарные клетки периферической крови	Монозиготные близнецы, дискордантные по диагнозу РС (смешанная группа РРС, ВПРС и ППРС)	Выявлено и реплицировано на независимой выборке дифференциальное метилирование генов <i>TMEM232</i> и <i>ZBTB16</i> у больных РС. Прием интерферона-бета индуцирует гипометилирование генов <i>RSAD2</i> , <i>MX1</i> и <i>PLSCR1</i> .	2019 [61]
	Больные РРС, ППРС, контрольная группа	Выявлено гиперметилирование ДНК больных ППРС при сравнении как с больными РРС, так и с контрольной группой. 30 ДМС выявлены при сравнении РРС с контролем, 67 – при сравнении ППРС с контролем, 51 – при сравнении двух форм РС между собой.	2016 [74]
Цельная кровь	Больные РРС, контрольная группа	Выявлена связь курения с уровнем метилирования ДНК у больных РРС. Различия были более существенными для женщин и носителей гаплотипов риска РС из локуса HLA.	2017 [32]
	Больные РРС, контрольная группа	Не выявлено значимых различий в метилировании ДНК больных РРС и здоровых контролей.	2015 [60]
Ткани мозга	Больные РРС, контрольная группа	Выявлено глобальное гипометилирование ДНК и 2811 отдельных ДМС у больных РРС.	2019 [62]
	Демиелинизированная и нормальная ткань мозга больных РС	В демиелинизированной ткани гиппокампа выявлено дифференциальное метилирование 16 генов, экспрессия которых характерна для астроцитов и нейронов.	2017 [75]
	Больные РРС, контрольная группа	У больных РС выявлено гиперметилирование генов, участвующих в поддержании жизнедеятельности олигодендроцитов; гены, вовлеченные в протеолитические процессы, были гипометилированы.	2014 [63]

следований, выполненных на CD4+ Т-лимфоцитах. Так в работе [60] не выявлено значимых различий в метилировании ДНК у больных РС и здоровых доноров. В исследовании [66] у больных РС обнаружены ДМС в области генов *MOG/ZFP57*, *HLA-DRB1*, *NINJ2/LOC100049716* и *SLFN12*, а в [67] – кластеры ДМС в двух последних экзонах гена *VMP1/MIR21*. Еще в двух работах, выполненных одной и той же исследовательской группой, также выявлены значимые различия в профилях метилирования у больных РС и здоровых индивидов [65, 68]. Единственной дифференциально метилированной областью, идентифицированной в обеих работах, оказался локус HLA, гиперметилированный у больных, преимущественно в области гена *HLA-DRB1*, а маркеры дифференциального метилирования за пределами локуса HLA, обнаруженные в [65] и [68], различались между собой и не были выявлены в других упомянутых исследованиях.

Результаты, полученные в трех исследованиях метилирования ДНК из CD8+ Т-лимфоцитов, также оказываются трудносопоставимыми. В работе [60] обнаружено глобальное гиперметилирование ДНК при РС, но не выявлено значимых различий метилирования отдельных CpG-сайтов. Данные о глобальном гиперметилировании ДНК подтверждены в [66], где ДМС выявлены в области генов *HLA-DRB1* и *SLFN12* у больных РС. Тенденцию к глобальному гиперметилированию не наблюдали в [70], однако в этой работе нашли 79 отдельных ДМС по всему геному, ни один из которых не располагался в генах *HLA-DRB1* и *SLFN12*.

При изучении CD19+ В-лимфоцитов кластер ДМС обнаружен в области гена *LTA*, а также ряд ДМС в области генов *SLC44A2*, *LTBR*, *CARD11* и *CXCR5*, которые, по данным GWAS, ассоциированы с РС [71]. Следует отметить, что группа больных РС в этом исследовании была гетерогенной: в нее вошли как пациенты, не подвергающиеся медикаментозной терапии, так и больные, принимающие различные иммуномодулирующие препараты. В CD14+ моноцитах больных РС метилирование гена *HLA-DRB1* оказалось сниженным, причем преимущественно у носителей аллеля *DRB1*1501* [72].

Отдельного внимания заслуживает недавнее комплексное исследование [73], в котором оценили уровни метилирования ДНК во всех упомянутых популяциях лейкоцитов крови (CD4+ и CD8+ Т-лимфоциты, CD19+ В-лимфоциты и CD14+ моноциты) больных РС и ВПРС, а также у здоровых индивидов контрольной группы, с последующим отбором ДМС, универсальных для разных клеточных типов. Это существенно повысило мощность статистического анализа и позволило выявить паттерны метилиро-

вания, специфичные для больных РС и ВПРС, которые затем были валидированы в образцах ДНК из CD14+ моноцитов и цельной крови независимых групп больных и здоровых индивидов. Хотя применение подобного комплексного подхода и не позволяет детально проанализировать роль метилирования ДНК в функционировании отдельных популяций лейкоцитов крови при развитии заболевания, однако способствует выявлению особенностей метилирования ДНК, характеризующих разные клинические формы РС. Это может быть полезно для их дифференциальной диагностики на ранних стадиях заболевания, а кроме того, дает ключи к разработке новых препаратов, высокоэффективных при терапии форм РС, пока плохо поддающихся лечению.

В качестве более доступного объекта для поиска маркеров метилирования ДНК, характеризующих разные формы РС, могут быть использованы МНК – фракция клеток крови, по большей части состоящая из всех упомянутых ранее субпопуляций лейкоцитов. В работе, выполненной в нашей лаборатории с использованием дизайна «случай–контроль», анализировали уровни метилирования ДНК из МНК больных РС и ППРС, что позволило показать преимущественное гиперметилирование ДНК из МНК больных ППРС при сравнении как с больными РС, так и с контрольной группой, а также выявить спектр индивидуальных ДМС, специфичных для каждой из исследуемых форм РС [74]. Это пока единственное полногеномное исследование, выполненное для больных ППРС, и его результаты, несомненно, требуют валидации на независимых выборках.

Отдельно стоит упомянуть пока крайне немногочисленные исследования, посвященные анализу метилирования ДНК до и после курса терапии иммуномодулирующими препаратами. В ДНК из CD4+ Т-лимфоцитов одних и тех же больных РС выявлено множество ДМС по всему геному, 97% которых были гиперметилированы после лечения [64]. Показано [61], что прием пациентами интерферона бета индуцирует в МНК гипометилирование генов *RSAD2*, *MX1* и *PLSCR1*. Хотя эти данные и нуждаются в независимом подтверждении, они свидетельствуют о важной роли эпигенетического механизма метилирования ДНК в развитии и подавлении патологического процесса при РС. Кроме того, они показывают, что при подборе гомогенных групп больных РС для анализа метилирования ДНК необходимо принимать во внимание не только тип течения РС [74], но и прием иммуномодулирующих препаратов [64].

Только в единичных работах [32, 60] в качестве биологического материала для поиска профилей дифференциального метилирования, характеризи-

ющих РС, использовали сыворотку и цельную кровь, так как источником ДНК, попадающей в кровоток, может быть широкий спектр различных клеток организма, и наблюдаемые изменения в уровнях метилирования ДНК сложно интерпретировать. В работе [60] не обнаружено значимых различий в профилях метилирования ДНК из цельной крови, а в [32] показана связь курения с уровнем метилирования ДНК из цельной крови больных РС, причем наиболее значимые различия обнаружены у женщин и носителей гаплотипов риска РС в локусе HLA. К настоящему моменту выполнены три исследования, в которых анализировали метилирование ДНК в различных тканях головного мозга при РС. Отдельные ДМС выявлены при сравнении демиелинизированной и нормальной ткани гиппокампа больных РС [75], а также белого вещества мозга [62] и фронтальной коры [63] больных РС и контрольной группы. Различия в дизайне исследований и выборе биологического материала не позволяют уверенно сопоставлять результаты этих работ.

В целом, несмотря на довольно обширный объем накопленных данных, фактически единственной областью генома, дифференциальное метилирование которой в одном и том же биологическом материале подтверждено в независимых исследованиях, является локус генов HLA [65, 66]. С другой стороны,

показано, что при развитии РС (по меньшей мере в различных популяциях лейкоцитов крови) могут существовать универсальные паттерны дифференциального метилирования ДНК [73]. Развивая этот подход, мы провели поиск ДМС, выявленных более чем в одном исследовании, с использованием как «кандидатного» подхода (табл. 1), так и высокопроизводительных методов анализа ДНК (табл. 2), независимо от того, какие популяции лейкоцитов использовались в качестве источника ДНК. Такие гены вместе с основными функциями их белковых продуктов представлены в табл. 3.

Представленные в табл. 3 гены участвуют в иммунном ответе (HLA-DQB1, HLA-DRB1, HLA-DRB5, USP35), передаче сигнала (AHRR, ATP11A, GNG7, HOXC4, ZFYVE28) и взаимодействии с матриксом (DLGAP2, TNXB). Функция генов DYDC2 и ERICH1 пока остается неизученной. Большинство из перечисленных генов идентифицированы в [73] как маркеры РС, универсальные для разных популяций лейкоцитов, что свидетельствует в пользу их вклада в развитие РС на уровне общих для разных клеточных типов интегральных систем регуляции жизнедеятельности клетки. Дифференциальное метилирование гена HLA-DRB1 при РС наблюдали в четырех работах [65, 66, 68, 72]. Хотя авторы работы [73] не включили ДМС в области гена HLA-DRB1 в число

Таблица 3. Гены, дифференциально метилированные при РС в различных популяциях лейкоцитов крови по данным не менее чем двух независимых исследований, и биологические функции их белковых продуктов согласно базам данных UniProt [76] и NCBI Gene [77]

Ген	Биологическая функция белкового продукта	Ссылка
AHRR	Репрессор рецептора ароматических углеводов, вовлечен в метаболизм ксенобиотиков, а также в регуляцию роста и дифференцировки клеток.	[68, 73]
ATP11A	Каталитический компонент комплекса P4-АТР-азы и флипазы, который обеспечивает поддержание асимметричного распределения фосфолипидов на мембранах.	[73, 74]
DLGAP2	Может играть роль в молекулярной организации синапсов и сигналинге нервных клеток.	[70, 73]
DYDC2	Неизвестна	[70, 73]
ERICH1	Неизвестна	[65, 73]
GNG7	Гамма-субъединица G-белка, участвует в передаче сигналов в аденилатциклаза-зависимых путях в некоторых областях мозга.	[68, 73]
HLA-DQB1	В составе молекул МНС класса II участвует в презентации пептидов антигена для распознавания CD4+ Т-лимфоцитами.	[68, 73]
HLA-DRB1	В составе молекул МНС класса II участвует в презентации пептидов антигена для распознавания CD4+ Т-лимфоцитами.	[65, 66, 68, 72]
HLA-DRB5	В составе молекул МНС класса II участвует в презентации пептидов антигена для распознавания CD4+ Т-лимфоцитами.	[65, 68, 73]
HOXC4	Фактор транскрипции, вовлеченный в обеспечение позиционирования клеток в рамках передне-задней оси тела в ходе онтогенеза.	[73, 74]
TNXB	Опосредует взаимодействие между клетками и внеклеточным матриксом.	[70, 73]
USP35	Участвует в супрессии NF-κB и ингибировании PARK2-опосредованной деградации митохондрий.	[68, 73]
ZFYVE28	Отрицательный регулятор передачи сигналов рецептора эпидермального фактора роста.	[73, 74]

РС-ассоциированных, в эту категорию попали другие HLA-гены: HLA-A, HLA-H, HLA-J, HLA-DR α , HLA-DQB1, HLA-DRB5; кроме того, HLA-DRB1 был обнаружен в числе маркеров дифференциального метилирования, характерных для ВПРС.

Общепризнанно, что генам HLA принадлежит ведущая роль в формировании генетической предрасположенности к РС, и уровень значимости ассоциации аллеля HLA-DRB1*15 с развитием РС при исследованиях методом GWAS превышает $p < 5 \times 10^{-1000}$ [42]. Достаточно показательно, что из более чем 200 GWAS-идентифицированных генов риска РС только для генов HLA наблюдали различия в уровнях метилирования не менее чем в двух независимых исследованиях. В большинстве же случаев при развитии заболевания эффект метилирования ДНК и влияние вариативности генов на наследственную предрасположенность полигенной природы, судя по всему, проявляются на разных спектрах генов, что определяет относительную независимость этих процессов друг от друга. При этом метилирова-

ние ДНК практически не затрагивает мастер-гены, но оказывает небольшой эффект на уровни экспрессии многих генов.

В целом, полученные к настоящему моменту данные свидетельствуют о вовлечении в развитие РС эпигенетического механизма метилирования ДНК, действующего в разных клетках крови и тканях мозга. Дальнейшее расширение списка известных генов, подвергающихся эпигенетической регуляции при РС, внесет весомый вклад в представления о патогенезе заболевания. Кроме того, можно рассчитывать на определение генов, уровни метилирования которых отличаются при разных типах течения РС или изменяются при воздействии иммуномодулирующих препаратов, что может способствовать разработке эффективных прогностических тестов и выявлению новых терапевтических мишеней. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 19-115-50123.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Dupont C., Armant D.R., Brenner C.A. // *Semin. Reprod. Med.* 2009. V. 27. № 5. P. 351–357.
- <http://www.roadmapepigenomics.org/overview>. (Accessed April 9, 2020)
- Oksenberg J.R. // *Expert. Rev. Neurother.* 2013. V. 13. № 12. Suppl. P. 11–19.
- Das A. *Epigenetics, the Environment, and Children's Health Across Lifespans*. Berlin: Springer, 2016. P. 353–359.
- Alegria-Torres J.A., Baccarelli A., Bollati V. // *Epigenomics*. 2011. V. 3. № 3. P. 267–277.
- Olden K., Freudenberg N., Dowd J., Shields A.E. // *Health Aff.* 2011. V. 30. № 5. P. 833–841.
- Kanwal R., Gupta S. // *J. Appl. Physiol.* 2010. V. 109. № 2. P. 598–605.
- Surace A.E.A., Hedrich C.M. // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. № JULY. P. 1525.
- Urduinguio R.G., Sanchez-Mut J.V., Esteller M. // *Lancet Neurol.* 2009. V. 8. № 11. P. 1056–1072.
- Takai D., Jones P.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 6. P. 3740–3745.
- Saxonov S., Berg P., Brutlag D.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 5. P. 1412–1417.
- Moore L.D., Le T., Fan G. // *Neuropsychopharmacology*. 2013. V. 38. № 1. P. 23–38.
- Xu F., Mao C., Ding Y., Rui C., Wu L., Shi A., Zhang H., Zhang L., Xu Z. // *Curr. Med. Chem.* 2010. V. 17. № 33. P. 4052–4071.
- Choy M.-K., Movassagh M., Goh H.-G., Bennett M.R., Down T.A., Foo R.S.Y. // *BMC Genomics*. 2010. V. 11. № 1. P. 519.
- Jones P.L., Veenstra G.J., Wade P.A., Vermaak D., Kass S.U., Landsberger N., Strouboulis J., Wolffe A.P., Jan Veenstra G.C., Wade P.A., et al. // *Nat. Genet.* 1998. V. 19. № 2. P. 187–191.
- MacDonald J.L., Roskams A.J. // *Prog. Neurobiol.* 2009. V. 88. № 3. P. 170–183.
- Bochtler M., Kolano A., Xu G.-L. // *Bioessays*. 2017. V. 39. № 1. P. 1–13.
- Lawrence M., Daujat S., Schneider R. // *Trends Genet.* 2016. V. 32. № 1. P. 42–56.
- Chhabra R. // *ChemBioChem*. 2015. V. 16. № 2. P. 195–203.
- Baulina N.M., Kulakova O.G., Favorova O.O. // *Acta Naturae*. 2016. V. 8. № 1. P. 21–33.
- Boyko A., Smirnova N., Petrov S., Gusev E. // *Mult. Scler. Demyelinating Disord.* 2016. V. 1. № 1. P. 13.
- Bramow S., Frischer J.M., Lassmann H., Koch-Henriksen N., Lucchinetti C.F., Sørensen P.S., Laursen H. // *Brain*. 2010. V. 133. № 10. P. 2983–2998.
- Koch M., Kingwell E., Rieckmann P., Tremlett H., UBC MS Clinic Neurologists. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 2010. V. 81. № 9. P. 1039–1043.
- Koch M., Kingwell E., Rieckmann P., Tremlett H. // *Neurology*. 2009. V. 73. № 23. P. 1996–2002.
- Yadav S.K., Mindur J.E., Ito K., Dhib-Jalbut S. // *Curr. Opin. Neurol.* 2015. V. 28. № 3. P. 206–219.
- Scalfari A., Neuhaus A., Degenhardt A., Rice G.P., Muraro P.A., Daumer M., Ebers G.C. // *Brain*. 2010. V. 133. № 7. P. 1914–1929.
- Ascherio A., Munger K.L. // *Ann. Neurol.* 2007. V. 61. № 4. P. 288–299.
- Afrasiabi A., Parnell G.P., Fewings N., Schibeci S.D., Basuki M.A., Chandramohan R., Zhou Y., Taylor B., Brown D.A., Swaminathan S., et al. // *Genome Med.* 2019. V. 11. № 1. P. 26.
- Niller H.H., Wolf H., Minarovits J. // *Semin. Cancer Biol.* 2009. V. 19. № 3. P. 158–164.
- Hernán M.A., Olek M.J., Ascherio A. // *Am. J. Epidemiol.* 2001. V. 154. № 1. P. 69–74.
- Wan E.S., Qiu W., Baccarelli A., Carey V.J., Bacherman H., Rennard S.I., Agusti A., Anderson W., Lomas D.A., DeMeo D.L. // *Hum. Mol. Genet.* 2012. V. 21. № 13. P. 3073–3082.
- Marabita F., Almgren M., Sjöholm L.K., Kular L., Liu Y., James T., Kiss N.B., Feinberg A.P., Olsson T., Kockum I., et al. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 14589.
- Marczylo E.L., Amoako A.A., Konje J.C., Gant T.W., Marczylo T.H. // *Epigenetics*. 2012. V. 7. № 5. P. 432–439.
- Ito K., Lim S., Caramori G., Chung K.F., Barnes P.J., Adcock

- I.M. // *FASEB J.* 2001. V. 15. № 6. P. 1110–1112.
35. Munger K.L., Zhang S.M., O'Reilly E., Hernán M.A., Olek M.J., Willett W.C., Ascherio A. // *Neurology.* 2004. V. 62. № 1. P. 60–65.
36. Alonso A., Jick S.S., Olek M.J., Ascherio A., Jick H., Hernán M.A., Alonso Á., Jick S.S., Olek M.J., Ascherio A., et al. // *Arch. Neurol.* 2005. V. 62. № 9. P. 1362–1365.
37. Runmarker B., Andersen O. // *Brain.* 1995. V. 118 (Pt 1). P. 253–261.
38. Joshi S., Pantalena L.-C., Liu X.K., Gaffen S.L., Liu H., Rohowsky-Kochan C., Ichiyama K., Yoshimura A., Steinman L., Christakos S., et al. // *Mol. Cell. Biol.* 2011. V. 31. № 17. P. 3653–3669.
39. Boyne D.J., Friedenreich C.M., McIntyre J.B., Stanczyk F.Z., Courneya K.S., King W.D. // *Cancer Causes Control.* 2017. V. 28. № 12. P. 1369–1379.
40. Piperigkou Z., Franchi M., Götte M., Karamanos N.K. // *Matrix Biol.* 2017. V. 64. P. 94–111.
41. Hollenbach J.A., Oksenberg J.R. // *J. Autoimmun.* 2015. V. 64. P. 13–25.
42. Patsopoulos N.A., Baranzini S.E., Santaniello A., Shoostari P., Cotsapas C., Wong G., Beecham A.H., James T., Replogle J., Vlachos I.S., et al. // *Science (80-).* 2019. V. 365. № 6460. P. eaav7188.
43. Ayuso T., Aznar P., Soriano L., Olaskoaga A., Roldán M., Otano M., Ajuria I., Soriano G., Lacruz F., Mendioroz M. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 3. P. e0174726.
44. Field J., Fox A., Jordan M.A., Baxter A.G., Spelman T., Gresle M., Butzkueven H., Kilpatrick T.J., Rubio J.P. // *Genes Immun.* 2017. V. 18. № 2. P. 59–66.
45. Pinto-Medel M.J., Oliver-Martos B., Urbaneja-Romero P., Hurtado-Guerrero I., Ortega-Pinazo J., Serrano-Castro P., Fernández Ó., Leyva L. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 8727.
46. Calabrese R., Valentini E., Ciccarone F., Guastafierro T., Bacalini M.G., Ricigliano V.A.G., Zampieri M., Annibali V., Mechelli R., Franceschi C., et al. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2014. V. 1842. № 7. P. 1130–1136.
47. Kumagai C., Kalman B., Middleton F.A., Vyshkina T., Massa P.T. // *J. Neuroimmunol.* 2012. V. 246. № 1–2. P. 51–57.
48. Calabrese R., Zampieri M., Mechelli R., Annibali V., Guastafierro T., Ciccarone F., Coarelli G., Umeton R., Salvetti M., Caiafa P. // *Mult. Scler.* 2012. V. 18. № 3. P. 299–304.
49. Ramagopalan S.V., Dymont D.A., Morrison K.M., Herrera B.M., Deluca G.C., Lincoln M.R., Orton S.M., Handunnetthi L., Chao M.J., Sadovnick A.D., et al. // *BMC Med. Genet.* 2008. V. 9. № 1. P. 63.
50. Nociti V., Santoro M., Quaranta D., Losavio F.A., De Fino C., Giordano R., Palomba N., Rossini P.M., Guerini F.R., Clerici M., et al. // *PLoS One.* 2018. V. 13. № 10. P. e0206140.
51. Sokratous M., Dardiotis E., Bellou E., Tsouris Z., Michalopoulou A., Dardioti M., Siokas V., Rikos D., Tsatsakis A., Kovatsi L., et al. // *J. Mol. Neurosci.* 2018. V. 64. № 3. P. 478–484.
52. Wagner M., Sobczykński M., Bilińska M., Pokryszko-Dragan A., Cyrul M., Kuśnierczyk P., Jasek M. // *J. Mol. Neurosci.* 2017. V. 62. № 2. P. 181–187.
53. Neven K.Y., Piola M., Angelici L., Cortini F., Fenoglio C., Galimberti D., Pesatori A.C., Scarpini E., Bollati V. // *BMC Genet.* 2016. V. 17. № 1. P. 84.
54. Handel A.E., De Luca G.C., Morahan J., Handunnetthi L., Sadovnick A.D., Ebers G.C., Ramagopalan S.V. // *J. Neuroimmunol.* 2010. V. 223. № 1–2. P. 120–123.
55. Dunaeva M., Derksen M., Pruijn G.J.M. // *Mol. Neurobiol.* 2018. V. 55. № 6. P. 4681–4688.
56. Olsen J.A., Kenna L.A., Tipon R.C., Spelios M.G., Stecker M.M., Akirav E.M. // *EBioMedicine.* 2016. V. 10. P. 227–235.
57. Liggett T., Melnikov A., Tilwalli S., Yi Q., Chen H., Replogle C., Feng X., Reder A., Stefoski D., Balabanov R., et al. // *J. Neurol. Sci.* 2010. V. 290. № 1–2. P. 16–21.
58. Mastronardi F.G., Noor A., Wood D.D., Paton T., Moscarello M.A. // *J. Neurosci. Res.* 2007. V. 85. № 9. P. 2006–2016.
59. Slotkin R.K., Martienssen R. // *Nat. Rev. Genet.* 2007. V. 8. № 4. P. 272–285.
60. Bos S.D., Page C.M., Andreassen B.K., Elboudwarej E., Gustavsen M.W., Briggs F., Quach H., Leikfoss I.S., Bjølgerud A., Berge T., et al. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 3. P. e0117403.
61. Souren N.Y., Gerdes L.A., Lutsik P., Gasparoni G., Beltrán E., Salhab A., Kämpfel T., Weichenhan D., Plass C., Hohlfeld R., et al. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 2094.
62. Kular L., Needhamsen M., Adzemovic M.Z., Kramarova T., Gomez-Cabrero D., Ewing E., Piket E., Tegnér J., Beck S., Piehl F., et al. // *Clin. Epigenetics.* 2019. V. 11. № 1. P. 86.
63. Huynh J.L., Garg P., Thin T.H., Yoo S., Dutta R., Trapp B.D., Haroutunian V., Zhu J., Donovan M.J., Sharp A.J., et al. // *Nat. Neurosci.* 2014. V. 17. № 1. P. 121–130.
64. Maltby V.E., Lea R.A., Ribbons K.A., Sanders K.A., Kennedy D., Min M., Scott R.J., Lechner-Scott J. // *Mult. Scler. J. – Exp. Transl. Clin.* 2018. V. 4. № 3. P. 2055217318787826.
65. Maltby V.E., Lea R.A., Sanders K.A., White N., Benton M.C., Scott R.J., Lechner-Scott J. // *Clin. Epigenetics.* 2017. V. 9. № 1. P. 71.
66. Rhead B., Brorson I.S., Berge T., Adams C., Quach H., Moen S.M., Berg-Hansen P., Celius E.G., Sangurdekar D.P., Bronson P.G., et al. // *PLoS One.* 2018. V. 13. № 10. P. e0206511.
67. Ruhrmann S., Ewing E., Piket E., Kular L., Cetrulo Lorenzi J.C., Fernandes S.J., Morikawa H., Aeinehband S., Sayols-Baixeras S., Aslibekyan S., et al. // *Mult. Scler.* 2018. V. 24. № 10. P. 1288–1300.
68. Graves M.C., Benton M., Lea R.A., Boyle M., Tajouri L., Macartney-Coxson D., Scott R.J., Lechner-Scott J. // *Mult. Scler.* 2014. V. 20. № 8. P. 1033–1041.
69. Baranzini S.E., Mudge J., van Velkinburgh J.C., Khankhanian P., Khrebtukova I., Miller N.A., Zhang L., Farmer A.D., Bell C.J., Kim R.W., et al. // *Nature.* 2010. V. 464. № 7293. P. 1351–1356.
70. Maltby V.E., Graves M.C., Lea R.A., Benton M.C., Sanders K.A., Tajouri L., Scott R.J., Lechner-Scott J. // *Clin. Epigenetics.* 2015. V. 7. № 1. P. 118.
71. Maltby V.E., Lea R.A., Graves M.C., Sanders K.A., Benton M.C., Tajouri L., Scott R.J., Lechner-Scott J. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 17418.
72. Kular L., Liu Y., Ruhrmann S., Zheleznyakova G., Marabita F., Gomez-Cabrero D., James T., Ewing E., Lindén M., Górnikiiewicz B., et al. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 2397.
73. Ewing E., Kular L., Fernandes S.J., Karathanasis N., Lagani V., Ruhrmann S., Tsamardinos I., Tegner J., Piehl F., Gomez-Cabrero D., et al. // *EBioMedicine.* 2019. V. 43. P. 411–423.
74. Kulakova O.G., Kabilov M.R., Danilova L.V., Popova E.V., Baturina O.A., Tsareva E.Y., Baulina N.M., Kiselev I.S., Boyko A.N., Favorov A.V., et al. // *Acta Naturae.* 2016. V. 8. № 3(30). P. 103–110.
75. Chomyk A.M., Volsko C., Tripathi A., Deckard S.A., Trapp B.D., Fox R.J., Dutta R. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 8696.
76. <https://www.uniprot.org/>. (Accessed May 17, 2020)
77. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/gene>. (Accessed May 17, 2020)

УДК 577.29, 577.22, 575.113.12

Функционирование кода поли(ADP-рибозил)ирования

Н. В. Малюченко^{1*}, Д. О. Кошкина¹, А. В. Феофанов^{1,2}, В. М. Студитский^{1,3},
М. П. Кирпичников^{1,2}

¹Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

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

³Fox Chase Cancer Center, Philadelphia, PA, 19111-2497 USA

*E-mail: mal_nat@mail.ru

Поступила в редакцию 16.07.2020

Принята к печати 09.10.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11089

РЕФЕРАТ Поли(ADP-рибозил)ирование играет важнейшую роль в клеточном метаболизме. Ковалентное поли(ADP-рибозил)ирование влияет на работу белков, вовлеченных в репарацию повреждений ДНК, регуляцию структуры хроматина, экспрессию генов, процессинг РНК, биогенез рибосом и трансляцию белка. Нековалентные поли-ADP-рибоза-зависимые взаимодействия определяют такие реакции клеток на стресс и вирусное вторжение, как воспаление, иммунный ответ и гормональная сигнализация. В обзоре рассмотрено, каким образом молекулы поли-ADP-рибозы (PAR), состоящие из однотипных мономеров, могут избирательно участвовать в различных клеточных процессах, реализуя так называемый «PAR-код». Обсуждается способность PAR формировать посредством жидкофазного разделения биомолекулярные функциональные кластеры, что способствует быстрому пространственному разделению биохимических процессов и эффективному привлечению необходимых компонентов. Уровень PAR в клетках строго контролируется совокупностью регуляторных белков. Нарушение метаболизма PAR сопряжено с развитием патологических процессов, приводящих к опухолевым, сердечно-сосудистым и нейродегенеративным заболеваниям. Фармакологическая коррекция уровня PAR может стать перспективным подходом к лечению различных дисфункций.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА поли-ADP-рибоза, PARP, PARG, PAR-код, NAD⁺, фазовое разделение.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ADPR – ADP-рибоза; ADPR_o – ADP-рибозные остатки; PAR – поли(ADP-рибоза); PARG – поли(ADP-рибоза)гликогидролаза; PARP – поли(ADP-рибоза)полимераза.

ВВЕДЕНИЕ

О существовании третьей нуклеиновой кислоты – поли(ADP-рибозы) (PAR), известно уже более полувека. В отличие от ДНК и РНК PAR имеет довольно простую структуру, состоящую из повторяющихся мономеров ADP-рибозы (ADPR), и не кодирует информацию о белках и РНК (рис. 1) [1]. Однако участие PAR в метаболизме клеток и их гибели, а также строго регулируемый синтез, обмен и деградация PAR указывают на исключительно важную роль этой нуклеиновой кислоты в клетке [2–4]. Как правило, PAR ковалентно присоединяется к белкам, меняя их активность, поэтому поли(ADP-рибозил)ирование часто рассматривают как посттрансляционную модификацию белков [3, 4]. Известно, что такая ковалентная модификация регулирует работу белков, вовлеченных в ряд ключевых ядерных и цитоплазматических активностей, таких, как репарация по-

вреждений ДНК, регуляция структуры хроматина, экспрессия генов, процессинг РНК, биогенез рибосом и трансляция [4–7]. Кроме того, существуют PAR-опосредованные нековалентные взаимодействия, обусловленные наличием PAR-узнающих доменов у ряда белков. Нековалентные взаимодействия PAR играют важную роль в событиях, определяющих различные формы реакции клеток на вторжение вируса и стресс, такие, как воспаление, гормональная сигнализация и иммунный ответ [2, 8–11]. Накоплены многочисленные свидетельства участия PAR в патологических процессах. Например, показано, что β-амилоид-опосредованный окислительный стресс при болезни Альцгеймера сопровождается повышенным содержанием PAR, PAR взаимодействует также с α-синуклеином, ускоряющим формирование токсичных фибрилл при болезни Паркинсона [12]. Существование связи между PAR

и процессами, происходящими при развитии опухолей, показано во многих исследованиях [13–17]. Еще в 1979 году впервые установили, что ингибирование поли(ADP-рибозил)ирования аналогами никотинамида повышает чувствительность раковых клеток к цитотоксическим повреждениям [18]. На сегодняшний момент более 200 подобных соединений проходят доклинические и клинические исследования в качестве противоопухолевых средств, а четыре ингибитора PARP уже применяются в клинике [15, 19–22]. PAR участвует в процессе перепрограммирования клеток: интенсивное поли(ADP-рибозил)ирование обнаружено в индуцированных плюрипотентных стволовых клетках, а ингибирование синтеза PAR уменьшает способность соматических клеток, обработанных набором факторов Яманаки (с-Myc, Sox2, Oct4), к дедифференцировке [23–25]. Эти наблюдения, а также тот факт, что PAR-синтезирующий фермент – PARP-1, рекрутирует белок KLF4 для активации экспрессии теломеразы и индукции плюрипотентности стволовых клеток, могут указывать на то, что нарушения в системе регуляции PAR могут вызвать формирование более агрессивного фенотипа опухолевых стволовых клеток. Серьезного внимания заслуживают работы по исследованию влияния поли(ADP-рибозил)ирования на продолжительность жизни [26–28] и развитие прогерии (синдромы преждевременного старения – Вернера [29] и Кокейна [30]). Интересно, что окислительное повреждение клетки вызывает активацию PARP-1, которое в свою очередь способствует сердечной и сосудистой дисфункции в различных патофизиологических условиях [31, 32]. Фармакологическое ингибирование PAR рассматривается в качестве перспективного подхода к коррекции неонкологических заболеваний, к которым относятся ишемический инсульт, острый панкреатит, септический шок, астма и острое повреждение легких [19, 31–34].

В целом, уровень PAR в клетках строго контролируется ферментами и поддерживается на невысоком уровне за счет тонко настроенного баланса активностей поли(ADP-рибоза)полимераз (PARP) и поли(ADP-рибоза)гликогидролаз (PARG). Определенные стрессовые стимулы могут приводить к быстрому увеличению уровня PAR и запуску PAR-зависимых процессов.

Каким образом молекулы PAR, состоящие из однотипных мономеров ADP-рибозы, могут выполнять столь разнообразные функции? Как работает так называемый PAR-код? В настоящем обзоре рассмотрены механизмы работы PAR-кода, зависящие от длины и ветвления полимеров, обсуждаются белки, принимающие участие в создании, редактировании и функционировании этого кода.

БЕЛКИ, СИНТЕЗИРУЮЩИЕ PAR

Поли(ADP-рибозил)ирование начинается с присоединения первого остатка ADP-рибозы к белкам-акцепторам (как правило, по остаткам глутамата, аспартата, лизина, аспарагина, серина и цистеина) с помощью ферментов PARP. Эти уникальные гликозилтрансферазы катализируют реакцию переноса ADP-рибозильных остатков (ADPRo), донором которых служит NAD⁺, на доступные группы белков и последующее наращивание цепи за счет образования гликозидных связей (1''-2', реже 1'''-2'') между рибозильными группами мономеров ADP-рибозы. При этом образуется полимер, прикрепленный к белку ковалентной связью (рис. 1), содержащий от двух до нескольких сот звеньев мономера [35–37]. В качестве акцепторов PAR-цепей может выступать целый ряд ассоциированных с хроматином белков, включая коровые и линкерные гистоны, топоизомеразы, ДНК-лигазы, ДНК-полимеразы и PARP [5].

Белки, синтезирующие PAR, часто называют PAR-писателями (PAR-writers). PARP – основные ферменты, формирующие структурное разнообразие PAR – основу PAR-кода. Катализировать ADP-рибозилирование способны также бактериальные ADP-рибозилтрансферазы (ADPRT, например, холерный и дифтерийный токсины) и члены разных семейств белков дрожжей и животных, такие, как аргинин-специфичные эктоферменты (ARTC) и сиртуины (SIRT).

Семейство PARP человека объединяет 17 известных белков, которые различаются длиной полипептидной цепи, структурой некаталитических доменов, способностью модифицировать акцепторные белки, а также уровнем экспрессии и распределением в клетке [2, 4, 5, 13, 38, 39]. Всех членов данного семейства отличает наличие достаточно консервативной С-концевой аминокислотной последовательности, содержащей каталитический центр – характерный признак PARP (PARP signature). Большинство PARP (PARP-3, 4, 6–8, 10–12, 14–16) моно-ADP-рибозилируют белки и только четыре PARP (PARP-1, 2, 5a, 5b) способны к поли(ADP-рибозил)ированию. Высокая эволюционная консервативность первичных структур каталитического центра PARP показывает, что функции этих ферментов чрезвычайно важны для клетки и организма в целом. Уникальное свойство каталитического кармана PARP – наличие домена складки ART, ключевой мотив которого триада гистидин-тирозин-глутамат (HYE) в PARP-1–4, 5a и 5b или триада гистидин-тирозин-гидрофобная аминокислота (HYФ) – в PARP 6–8, 10–12, 14–16 [36]. В обеих триадах (HYE и HYФ) консервативный гистидин образует водородную связь с 2-ОН-рибозой аденозина

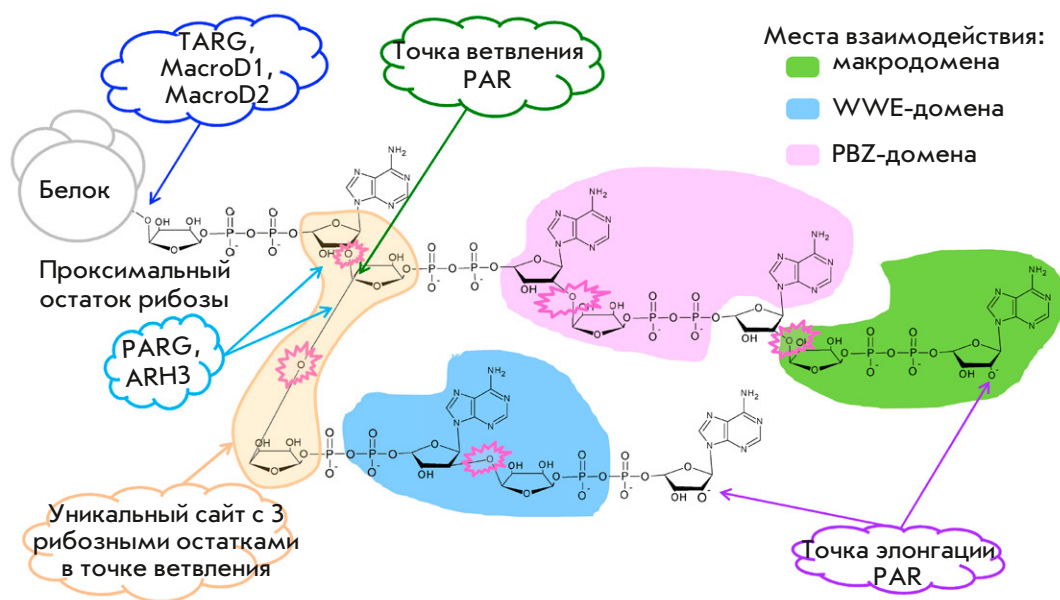


Рис. 1. Структура PAR на поверхности белковой глобулы и сайты взаимодействия. Показаны точки элонгации и ветвления остатков ADP-рибозы. Розовым зубчатым контуром выделены O-гликозидные связи соседних ADP-рибозных остатков. Голубыми и синими стрелками отмечены сайты гидролиза PAR различными белками. Желтый контур – уникальный сайт в точке ветвления, содержащий три остатка рибозы. Зеленым, розовым и голубым контурами выделены области взаимодействия белков, содержащих различные PAR-связывающие домены. Зеленый контур – область связывания макродоменов, предпочтительно взаимодействующих с концевой ADPR. Розовый контур – область взаимодействия доменов PBZ, способных одновременно связываться с аденинами в двух соседних ADP-рибозных единицах PAR. Голубой контур – область взаимодействия домена WWE, распознающего изо-ADP-рибозу, содержащую специфическую 2', 1'-O-гликозидную связь

Таблица 1. Подсемейства PARP

Подсемейства PARP	Представители подсемейств и их особенности
ДНК-зависимые PARP	Активируются при повреждении ДНК благодаря наличию ДНК-связывающих доменов. Главный представитель – PARP-1 (ARTD1), имеет три ДНК-связывающих домена (так называемые цинковые пальцы) для распознавания повреждений. Другие члены этой группы – PARP-2 (ARTD2) и PARP-3 (ARTD3).
Танкиразы	Содержат повторы анкириновых доменов и высокоспецифичные мотивы SAM (Sterile alpha motif), ответственные за белок-белковые взаимодействия. Представители: танкираза-1 (PARP-5a, ARTD5) и танкираза-2 (PARP-5b, ARTD6).
СССН PARP	Содержат домен цинкового пальца с мотивами СССРН типа CX ₇₋₁₁ CX ₃₋₉ CX ₃ H, который участвует во взаимодействиях с РНК. Содержат общий WWE-домен. Представители: TTPARP (PARP-7, ARTD7), PARP-12 (ARTD12) и PARP-13 (ARTD13).
Макро-PARP	Обладают макродоменами. Опосредуют ассоциацию поли- (и, возможно, моно-) ADP-рибозилированных белков. Представители: BAL1 (PARP-9, ARTD9), BAL2 (PARP-14, ARTD8) и BAL3 (PARP-15, ARTD7).
Другие PARP	PARP-белки, не включенные в перечисленные подсемейства. Представители: PARP-4 (ARTD4), PARP-6 (ARTD17), PARP-8 (ARTD16), PARP-10 (ARTD10), PARP-11 (ARTD11) и PARP-16 (ARTD15).

NAD⁺, а консервативные остатки тирозина – π-π-стэкинг-взаимодействия с остатком никотинамида NAD⁺. Вероятно, различие в последнем аминокислотном остатке в триадах определяет способность к поли(ADP-рибозил)ированию [40] или моно-ADP-рибозилированию [41]. В настоящий момент семейство PARP по структурно-функциональным особенностям сгруппировано в пять подсемейств (табл. 1).

Основную часть синтеза PAR выполняют PARP-1 и PARP-2 (соответственно 75–95% и 5–15%) в ответ на повреждения ДНК [42–44]. Исследования *in vivo*

и на культурах клеток показали, что уменьшение содержания PARP-1 или PARP-2 приводит к повышенной чувствительности клеток к действию ионизирующего излучения, окислительного стресса и алкилирующих агентов [45].

БЕЛКИ, ГИДРОЛИЗИРУЮЩИЕ PAR-ПОЛИМЕРЫ

В клетке происходит активный синтез и гидролиз PAR-полимеров [6, 46]. За удаление ковалентно связанной с белками ADPR и возможную модуляцию PAR-кода отвечают ADP-рибозилгидролаза

3 (ARH3), гликогидролазы PAR (PARG), TARG/С6orf130, MacroD1 и MacroD2 и семейство гидролаз NUDIX [2, 3, 6, 41], за которыми закрепилось общее название PAR-стиратели (PAR-erasers). Многие из этих ферментов содержат мотив складки макромолекулы, который позволяет им взаимодействовать с ADP-рибозилированными субстратами. Деградация PAR происходит в два этапа: полимерная цепь сначала расщепляется до единичных ADP_R, а затем гидролизу подвергается присоединенный к белку проксимальный остаток (рис. 1). Гидролазы PARG и ARH3 эффективно расщепляют уникальные 2'-1"-гликозидные рибозо-рибозные связи и высвобождают свободные фрагменты ADP_R, но при этом оставляют присоединенную к акцепторному белку проксимальную ADP_R [47]. Несколько ферментов – TARG, MacroD1 и MacroD2 – гидролизуют эфирную связь между оставшейся рибозой и акцепторными аминокислотами белка, окончательно удаляя ADP_R. Сложная система функционирования гидролаз, которая изменяет локальную концентрацию и длину PAR (т.е. модулирует PAR-код), дополняется еще и тонкой регуляцией специфичности распознавания ADP_R в комплексе с различными аминокислотными остатками, в частности: ARH1 с Arg, ARH3 с Ser, а MacroD1, MacroD2 и TARG1 с Glu и Asp [3].

Белки, контролирующие деградацию PAR, считаются привлекательными мишенями для таргетной терапии [6]. Первой группой соединений, модулирующих активность PARG, были интеркаляторы ДНК, способные образовывать комплекс с PAR и тем самым защищать от гидролиза PARG [48]. Интеркаляторы влияют на активность PARG не посредством прямого взаимодействия с ферментом, а путем ограничения его доступа к субстрату. Позже обнаружили полифенольные соединения, встречающиеся в природе, такие, как танины, которые непосредственно ингибируют активность PARG [49]. В частности показано, что галлотанин ингибирует PARG и запускает синтетическую летальность в BRCA2-дефицитных опухолях [50]. В настоящий момент исследовано и описано несколько классов ингибиторов PARG: ADP-HPD, родаминовые ингибиторы, PDD00017273. Разрабатываются также подходы, направленные на стабилизацию мРНК PARG РНК-связывающими белками (HuR) [6, 51–53].

БЕЛКИ, РАСПОЗНАЮЩИЕ СТРУКТУРНЫЕ ОСОБЕННОСТИ PAR

За последнее десятилетие были найдены белки, содержащие в своем составе модули, способные распознавать («считывать») PAR-структуры, связывая отличающиеся формы ADP_R-полимеров, и функционировать в качестве так называемых «PAR-

читателей» (PAR-readers) [3, 39, 54–56]. Сотни типов белков прямо или косвенно взаимодействуют с PAR, что может вызывать субклеточное перераспределение белков и тем самым влиять на многие клеточные процессы. Структуры PAR-связывающих модулей белков варьируют от хорошо организованных доменов до неупорядоченных структур (табл. 2).

ПРИНЦИПЫ РАБОТЫ PAR-КОДА

Таким образом, в клетке существует сложная система синтеза, функционирования и деградации PAR, регулирующая функции белков с помощью «кода», создаваемого структурой PAR. PAR-код формируется как длиной, так и характером ветвления полимера PAR. Каким образом работает PAR-код?

Длина PAR

Показано, что при определенных условиях PAR может быть токсичным для клеток [9]. Снижение экспрессии PARG, приводящее к накоплению PAR в клетке, вызывает усиление гибели клеток под действием повреждающих агентов как *in vitro*, так и *in vivo*, а мыши с нокаутом PARG погибают на 3.5 день эмбрионального развития [80]. Ранее PAR-опосредованную цитотоксичность объясняли «суицидальной» гипотезой, заключающейся в энергетическом кризисе клетки, вызванном PARP-зависимым истощением запасов NAD⁺ [81, 82]. Поскольку для синтеза молекулы NAD⁺ используются четыре молекулы ATP, предполагалось, что активная работа PARP может истощать запасы макроэргических молекул, вызывать подавление клеточных энергозависимых процессов, таких, как гликолиз и митохондриальное дыхание, и, в конечном итоге, вызывать гибель клетки [83]. Однако установлено, что сами PAR-полимеры могут быть токсичными для клеток, а степень цитотоксичности, как показано на примере корковых нейронов [81], возрастает с увеличением длины полимерной цепи и имеет дозозависимый характер (рис. 2). При этом внутриклеточное введение анти-PAR-антител существенно снижает цитотоксичность. Механизмы цитотоксичности высокомолекулярных PAR изучаются. Установлено, что в ответ на обработку изолированных митохондрий очищенной PAR из мембран митохондрий высвобождается апоптозиндуцирующий фактор (AIF) [84]. Данный процесс происходит и в клетках, вызывая в них транслокацию AIF в ядро и инициацию клеточной гибели по механизму каспаза-независимого апоптоза. Этот вид программируемой клеточной гибели, вызванный гиперактивацией синтеза PAR, получил название партанатоз (parthanatos). Активация партанатоза может происходить при сильном повреждении ДНК в результате воздействия алкилирующих

Таблица 2. PAR-узнающие модули

Модуль	Описание	Механизм узнавания	Представитель	Функция	Ссылка
PBM	~20 а.о. [HKR] xx[AIQVY][KR] ₂ [AILV] [FILPV] (где x –любая аминокислота)	Связывание опосредуется электростатическими взаимодействиями между отрицательно заряженными группами в составе PAR и положительно заряженной PBM-консенсусной последовательностью, может достигать высокого родства со значениями констант диссоциации (K_d) комплексов в субмикромольном или наномольном диапазонах. Взаимодействия усиливаются при tandemном расположении PBM-модулей внутри одного белка	H1, H2A, H2B, H3, H4, p21, p53, XRCC1, XPA, MSH6, ERCC6, ATM, MRE11, ДНК-ПКcs, KU70, ДНК-лигаза 3, NF-kB, TERT, DEK, CAD, CENP-A, CENP-B, ламин A/C, BUB3, hCAP-D2, HK1, HKDC1, G3BP1, hnRNPA1, hnRNPK, hnRNPH, hnRNPG, hnRNPM, iNOS hnRNPA2B1, hnRNPC1C2, AURKAIP1, RECQL5, WRN, TOP1	PBM-модули присутствуют во многих белках, участвующих в ответе на повреждения ДНК, в репликации, транскрипции, а также в структурных перестройках хроматина	[54, 55, 57–59]
Макро- домены	Эволюционно консервативные структурные модули из ~130–190 а.о., которые складываются в характерную глобулярную сэндвич-складку, состоящую из β -листа из шести цепей, окруженного пятью α -спиралями. Обнаруживаются в белках с различными клеточными функциями. MacroD-мотив: Nx(6)GG[V/L/I]D и G[V/I/A][Y/F]G	Распознают концевые остатки ADP-рибозы. Значения K_d лежат в микромолярном диапазоне. ADPR-связывающие сайты расположены во внутренней полости макродомена	Макродомены широко распространены во всех царствах природы, включая эукариот и архей. Семейства: MacroH2A, MacroD, Macro2, ALC1, PARG, SUD-M. Белки: GDAP2, TARG1 (сborf130), PARP-9, PARP-14, PARP-15	Регулирующее влияние на: меж- и внутриклеточную передачу сигналов, транскрипцию, репарацию ДНК, поддержание геномной стабильности, динамику теломер, дифференцировку и пролиферацию, гибель клеток. Макродомены ряда белков обладают каталитической активностью. PARG использует макродомен для связывания и гидролиза PAR. MacroD и Sborf130 вовлечены в деацетилирование O-ацетил-ADP-рибозы (метаболит сиртуин-опосредованного деацетилирования Lys). Каталитически активные макродомены вирусов семейства Coronaviridae, Togaviridae и Heperviridae противодействуют врожденному иммунному ответу, мешая PARP-опосредованной противовирусной защите	[60–64]
PBZ	~30 а.о. C2H2-тип: [K/R] xxCx[F/Y] GxxCxbbxxxxHxxx[F/Y] xH	У PBZ отсутствует вторичная структура, и распознавание субстрата достигается за счет водородных связей. Предполагают, что один модуль PBZ содержит два сайта связывания, которые одновременно распознают аденины в двух соседних ADPRo в составе PAR, что является отличительной особенностью взаимодействия PBZ	APLF, CHFR и SNM1A	Сигнализация о повреждениях ДНК. APLF способствует удержанию специфических субъединиц NHEJ в репарации двухцепочечных повреждений ДНК и стимулирует скорость NHEJ-репарации. CHFR участвует в регуляции начала митоза	[55, 65, 66]
WWE	~80–100 а.о. Шесть антипараллельных β -тяжей домена WWE образуют половину структуры бочонка с α -спиралью в его центральной части	Взаимодействие происходит через фосфатные группы на каждой стороне изо-ADP-рибозы, связывающиеся с положительно заряженным краем домена WWE, и сопровождается проникновением ароматического кольца аденина в связующий карман. Характерна высокая аффинность ($K_d \sim 370$ нМ) и специфичность связывания	RNF146/Iduna	RNF146 представляет собой убиквитинлигазу E3, которая специфически распознает белковые субстраты, конъюгированные с PAR, и направляет их на протеасомную деградацию	[67, 68]
FHA/ BRCT	~80–100 а.о.	Фосфатсвязывающие карманы взаимодействуют с остатками ADP- или изо-ADP-рибозы	APTX, PNKP, XRCC1, NBS1, BARD1, ДНК-лигаза 4	Сигнализация повреждений и репарация ДНК	[69]

Модуль	Описание	Механизм узнавания	Представитель	Функция	Ссылка
RRM	~60–80 а.о.	Каноничная структура RRM состоит из четырех анти-параллельных β-цепей и двух α-спиралей, расположенных на одной стороне β-листа. RRM-домен характеризуется наличием 6 или 8 а.о. консенсусов, в которых экспонируется ароматический остаток, образующий π-π-стекинг с основаниями РНК	Семейства: BRUNO, CPEB, DAZ, EIF, ELAVL, ENOX, G3BP, HNRP, IGF2BP, MSI, PABPC, PPARGC, PTBP, RALY, RAVER, RBM, RBMS, RBMY1, SAF, SF3B, SFRS, SNRP, U2AF. Белки: ASF/SF2, NONO, SPEN, SR140, SRRP35, SSB, SYNCRIP, TARDBP, THOC4, RBMX, TAF15, PARP-10, PARP-14	Метаболизм РНК, сигнализация повреждений и репарация ДНК. Мишени: гетерогенные ядерные рибонуклеопротеины, белки, участвующие в регуляции альтернативного сплайсинга белковых компонентов малых ядерных рибонуклеопротеидов и белков, регулирующих стабильность и трансляцию РНК	[70–72]
SR и KR богатые мотивы	Вариабельные	Предположительно, электростатические взаимодействия	ASF/SF2, dMi-2	Экспрессия генов, метаболизм РНК	[54]
ОВ-складка	~70–150 а.о. Связывание олигонуклеотидов / олигосахаридов	Взаимодействия с остатками изо-ADP-рибозы	SSB1, BRCA2	Сигнализация повреждений и репарация ДНК	[73]
Домены PIN	~130–150 а.о.	Предположительно, электростатические взаимодействия	EXO1	Сигнализация повреждений и репарация	[74]
RG/ RGG-повторы	Tri-RGG: RGG(X ₀₋₄) ₄ RGG(X ₀₋₄) ₄ RGG Di-RGG RGG(X ₀₋₄) ₂ RGG Tri-RG RG(X ₀₋₄) ₂ RG(X ₀₋₄) ₂ RG Di-RG RG(X ₀₋₄) ₂ RG	Предположительно, электростатические взаимодействия. Кроме того, между RGG-повторами часто встречаются ароматические остатки, которые способствуют гидрофобным взаимодействиям с азотистыми основаниями	Tri-RGG: FUS/TLS, EWS/EWSR1, TAF15, нуклеолин, фибрилларин, SERBP1, hnRNP U, hnRNP A1, LSM14/ Scd6, CHTOP, GAR1, MLL4. Di-RGG: Sam68, RPS2, hnRNP K, SYNCRIP, BRWD3, PSF, FMRP, SPRN, RasiP1 NSD1, Aven, hnRNPUL1. Tri-RG: MRE11/A, Sm-D1/D3, KDM4E, PABP1, CIRBP, ING5, SHANK1, BAZ1A, MBD2, DDX5, DDX5, TDRD3, ILF3, 53BP1, Coilin, DHX9. Di-RG: ADAM20, E2F-1, E2F-1, Gemin 5, HMGA1, DGCR14, PDGFRB, FXR2; SRSF1, ABL2, SETD5, CPSF, BRD4, MBP, MBNL1, TGFbR, NFKBIL1, RBBP6	Связывание различных вторичных структур РНК (G-квадруплексы, гуаниновые тетрады). Биогенез мяРНК. Альтернативный сплайсинг, репрессия трансляции (LSM14A/Scd6). Сигналинг ДНК-повреждений. Апоптоз. Фолдинг G-квадруплексов. Сборка стрессовых гранул и формирование белковых конденсатов	[75–79]

агентов, а также при окислительном стрессе, гипоксии, гипогликемии или воспалении.

В зависимости от длины PAR может взаимодействовать с разными регуляторными белками (рис. 2). Белок-супрессор p53 человека нековалентно взаимодействует с PAR и имеет три потенциальных сайта связывания [56]. PAR длиной более 50 ADPРо способен к высокоаффинному взаимодействию с p53, а PAR длиной 38–50 и 5–38 ADPРо связывается с p53 соответственно умеренно и слабо [85]. При этом PAR из 16 и 55 ADPРо формируют один и три типа комплексов с белком p53 с константами диссоциации 250 и 130 нМ соответственно [85].

Другой пример белка, взаимодействующего с PAR, – фактор эксцизионной репарации нуклеотидов (ХРА). ХРА содержит домен типа цинковые пальцы, участвует в распознавании поврежденного участка ДНК и во взаимодействии с другими компонентами системы репарации. ХРА не связывается с короткими PAR (16 ADPРо), но формирует комплекс в соотношении 1 : 1 с молекулами PAR длиной 55 ADPРо ($K_d \sim 370$ нМ) [85]. В С-концевой части белка ХРА идентифицирован PAR-связывающий сайт, перекрывающийся с областью взаимодействия с фактором ТФИИИ, который принимает участие в инициации транскрипции [86], а вместе с белками репарационного комплек-

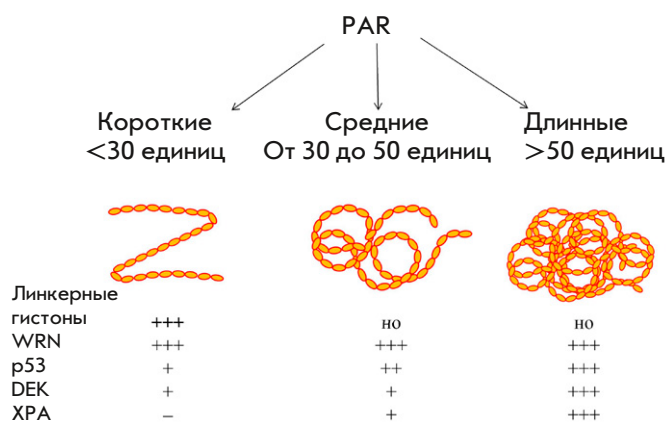


Рис. 2. Длина PAR влияет на связывание с PAR-связывающими белками. Количество крестиков качественно характеризует относительную силу взаимодействия конкретного белка с PAR-цепями различной длины: +++ – высокая, ++ – средняя, + – низкая, – – не взаимодействует, но – не определялось

са участвует в эксцизионной репарации нуклеотидов [56]. Возможно, таким образом взаимодействие с PAR может регулировать активность ХРА в процессе эксцизионной репарации нуклеотидов.

Взаимодействие онкобелка DEK с PAR также оказалось зависящим от длины полимера. DEK вовлечен в различные внутриклеточные события: репликацию [87, 88] и репарацию ДНК [89], процессинг РНК [90], а также в регуляцию транскрипции [91–93]. Показано, что высокие уровни DEK поддерживают иммортализацию клеток, подавляют старение и апоптоз [94, 95]. DEK также связан с несколькими аутоиммунными расстройствами [96]. Ряд функций DEK регулируются либо непосредственным поли(ADP-рибозил)ированием, либо нековалентным взаимодействием с PAR. Картирование PAR-связывающих участков DEK показало, что район 195–222 а.о. DEK эффективно связывается с PAR, а два других участка DEK взаимодействуют более слабо [97]. Цепи PAR длиной более 57 ADP_{Ro} образуют комплексы с DEK с $K_d \sim 60$ нМ. PAR длиной 34–54 ADP_{Ro} с умеренной эффективностью взаимодействует с DEK, в случае более коротких полимеров взаимодействие ослабевает. Поли(ADP-рибозил)ирование нарушает способность DEK связывать ДНК через домен SAP, а нековалентные взаимодействия с PAR-полимерами очень слабо ингибируют взаимодействие DEK с ДНК [89].

Некоторые белки, напротив, эффективно взаимодействуют с короткими полимерами PAR (рис. 2). Так, показано [97], что гистон H1 активно связывается с полимерами длиной 15–19 ADP_{Ro}. Нековалентные взаимодействия PAR с гистоном H1 реализуются через C-концевой домен белка, обогащенный остатками лизина [98]. При этом PAR и ДНК конкурируют за связывание с гистоном H1.

Предполагается, что PAR может вытеснять гистон H1 из хроматина, сохраняя его в непосредственной близости от разрыва цепи и реализуя тем самым «челночный гистоновый механизм» [99].

Отметим, что линкерные и коровые гистоны могут не только участвовать в нековалентных взаимодействиях с PAR, но и подвергаться ковалентному поли(ADP-рибозил)ированию при активации PARP. Установлено, что PARP-1 и PARP-2 модифицируют C- и N-концы гистонов H1 и H2B соответственно, вызывая тем самым релаксацию структуры хроматина и облегчая доступ белков репарации к месту повреждения [100–103].

Фактор WRN одинаково эффективно связывается как с короткими полимерами PAR (10–50 ADP_{Ro}), так и с длинными (> 50 ADP_{Ro}) [104]. Взаимодействие с PAR прямо влияет на функционирование фактора WRN [104], участвующего в таких аспектах метаболизма ДНК, как репликация, репарация и поддержание длины теломер [105, 106]. Мутация в гене WRN вызывает наследственную болезнь Вернера, при которой наблюдаются преждевременное старение и высокая вероятность образования опухолей [106], что можно объяснить высокой восприимчивостью к генотоксическому стрессу на клеточном уровне. Показано, что PAR может конкурировать с ДНК за связывание с N-концевым участком фактора WRN, в котором локализуется как ДНК-связывающий домен, так и РВМ-домен [104]. PAR в концентрации 10 мкМ ингибирует хеликазную, а при > 50 мкМ и экзонуклеазную активность WRN. Такие эффекты могут быть вызваны конформационными изменениями WRN при связывании с PAR, приводящими к аллостерическому ингибированию фермента.

Почему различные белки предпочитают PAR разной длины? Молекулярные основы узнавания PAR не установлены. Возможно, что полимеры PAR в зависимости от их длины и ветвления формируют различные вторичные структуры (рис. 2). Молекулярное моделирование показывает, что PAR длиной пять ADP_{Ro} имеют компактную неупорядоченную структуру, а ADP_{Ro} длиной 25 и более остатков PAR могут формировать несколько глобулярных субдоменов, соединенных развернутыми участками [107]. Методом кругового дихроизма показано, что полимеры PAR (~ 32 ADP_{Ro}) способны принимать спиральные конформации в присутствии 0.1 мМ спермина, 0.5 мМ CaCl₂, 0.5 мМ MgCl₂, >3 М NaCl или при pH > 5 [38].

Ветвление PAR

Хотя ветвящиеся цепи PAR были выявлены около 40 лет назад [108], их биологические функции и взаимодействия с другими компонентами ядра клетки до сих пор остаются предметом обсуждений. Образование

ветвящихся цепей PAR связано с работой PARP-1 и PARP-2 [40, 109–111]. Уникальность ветвления заключается в том, что три остатка ADP-рибозы становятся связанными друг с другом (рис. 1), а известные белковые модули связывания PAR умеют распознавать либо один, либо два остатка [3]. Таким образом, несколько PAR-связывающих доменов должны быть скоординированы вместе, чтобы взаимодействовать с разветвленным сайтом PAR. Действительно, показано, что белок APLF, обладающий двумя тандемными PBZ-мотивами, способен к такому связыванию, а потеря второго PBZ переключала распознавание APLF с разветвленных PAR на линейные. APLF действует как гистоновый шаперон, который предпочтительно связывается с тетрамером H3/H4 и способствует высвобождению гистонов для релаксации структуры хроматина [66, 112]. Разветвленные цепи PAR обеспечивают привлечение APLF для восстановления повреждений ДНК, а в клетках с дефицитом PARP-2 нарушается кинетика рекрутирования APLF к участкам повреждения ДНК. Другие кандидаты на взаимодействие с разветвленными сайтами PAR – белки семейства PARP, многие из которых содержат тандемы PAR-распознающих доменов [4, 38]. Установлено, что PARP-2 взаимодействует с PAR за счет своего N-концевого участка, так называемого NTR, не обладающего определенной структурой [43, 113]. NTR PARP-2 обладает гомологией с SAP-доменами других белков, участвующих в организации хроматина и репарации ДНК, таких, как Ku70 и APE1 [44, 113, 114]. Удаление NTR приводило к нарушению взаимодействия PARP-2 с PAR и потере его ферментатив-

ной активности [109]. Поскольку PARP-2 связывается с PAR, то возникает вопрос – играет ли это связывание существенную роль в привлечении PARP-2 к повреждениям в клетке? Обобщая данные различных лабораторий, можно предположить следующую картину: PARP-1 первым ($T_{1/2} \sim 1.6$ с) приходит к месту повреждения [7, 110, 111, 115–118] и синтезирует первые цепочки PAR (рис. 3). PARP-2 приходит позже (через ~ 30 с), накапливается в районе места повреждения ДНК (~ 2 мин) и синтезирует вторичные PAR преимущественно разветвленного типа [109]. Обработка клеток олапарибом (ингибитор PARP) приводит к отмене рекрутирования PARP-2, а в клетках с дефицитом PARP-1 привлечение PARP-2 к месту повреждения происходит с низкой эффективностью [42]. Эти результаты показывают, что PARP-2 распознает синтезированную PARP-1 PAR, которая опосредует привлечение PARP-2 к повреждениям в ДНК. При этом для PARP-1 характерно кратковременное, а для PARP-2 длительное накопление в зоне повреждения [118].

Не исключено также, что функциями разветвленной PAR являются привлечение уникальных белков и создание высокомолекулярных конденсатов, специализирующих на реализации определенных процессов в клетке.

Участие PAR в формировании субклеточных жидкофазных структур

Многие субклеточные компартменты не ограничены мембранами. Они образуются путем разделения жидких фаз и позволяют клетке пространственно ограни-

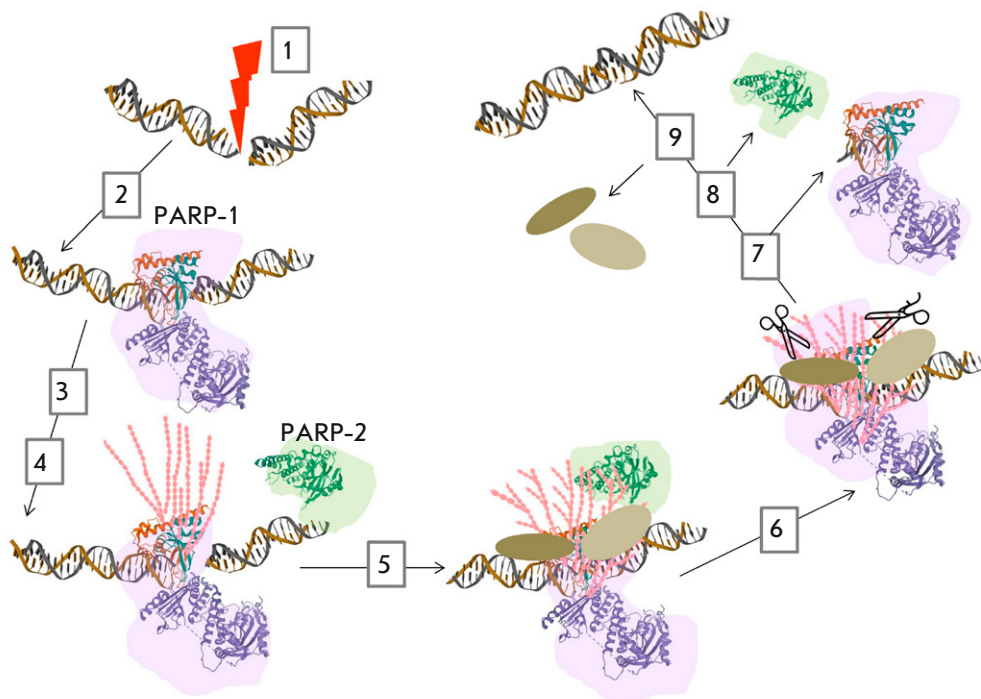


Рис. 3. Схема совместной работы PARP-1 и PARP-2 при репарации поврежденной ДНК. 1) повреждение ДНК; 2) PARP-1 первым ($T_{1/2} \sim 1.6$ с) связывается в месте повреждения; 3) PARP-1 синтезирует цепочки PAR; 4) рекрутирование (через ~ 30 с) и накопление (в течение ~ 2 мин) PARP-2 в районе повреждения ДНК; 5) синтез PARP-2 вторичных цепей PAR и привлечение факторов репарации (PAR-распознающих белков); 6) деградация полимеров PAR гидролазами; 7) диссоциация PARP-1 и 8) PARP-2; 9) репарация ДНК и диссоциация факторов репарации

чивать биохимические процессы [119, 120]. Примерами немембранных органелл (биомолекулярных конденсатов), образованных в процессе фазовых переходов макромолекулярных комплексов, являются ядрышко, ядерные тельца, тельца Кахалья, ДНК-фокусы (foci), тельца PML и стрессовые гранулы. Важнейшую роль в формировании таких конденсатов играют полимеры нуклеиновых кислот и белков, имеющие домены с неупорядоченной структурой, или, как их традиционно называют, «домены низкой сложности» (low complexity domains). Такие домены характеризуются тенденцией к энергетически выгодной конденсации за счет формирования слабых, но мультивалентных взаимодействий между полимерами [110, 121–123]. Одноцепочечные нуклеиновые кислоты представляют собой идеальный мультивалентный каркас для формирования многочисленных связей с неупорядоченными белковыми доменами и образования биомолекулярных конденсатов [124, 125]. В настоящее время появляется все больше свидетельств важной роли PAR в инициации формирования таких конденсатов (рис. 4) [3]. PAR обладает достаточно простой структурой из повторяющихся мономеров, характеризующейся большой площадью связывающей поверхности, которая может распознаваться различными белками. Адениновые основания PAR находятся в антиконформации, что делает их доступными для возможного взаимодействия с другими молекулами [126]. Кроме того, для PAR характерна активная кинетика синтеза и деградации, что позволяет PAR служить временным каркасом для инициации молекулярных конденсатов, а затем разрушения этих структур, что обеспечивает быстрые фазовые переходы «по требованию» (в ответ на изменения микроокружения). Несколько научных групп показали, что PAR индуцирует регулируемое

образование молекулярных конденсатов путем рекрутирования белков, содержащих домены с неупорядоченной структурой [38, 59, 127, 128]. Возможно, что длина, ветвление и концентрация PAR влияют на формирование таких молекулярных конденсатов через изменение площади каркаса, доступного для связывания белков. Электростатическое взаимодействие между PAR и белками, имеющее решающее значение для разделения фаз, может быть нарушено внесением отрицательного заряда в белки (например, путем их регуляторного фосфорилирования) [75].

Показано, что PAR участвует в организации жидкофазных немембранных органелл, таких, как ядрышко, стрессовые гранулы и фокусы ДНК (центры повреждения ДНК) [3, 38, 129]. Описан механизм формирования немембранных репарационных компартментов, опосредованный взаимодействием неупорядоченных доменов FUS с PAR [127]. Такие компартменты способствуют достижению высокой эффективности процесса репарации за счет локального концентрирования белков репарации и изоляции поврежденной ДНК от неповрежденной [75, 127, 130].

Другие жидкофазные немембранные компартменты, связанные с PAR – рибонуклеопротеиновые структуры – стрессовые гранулы и Р-тельца (рис. 4). Эти образования участвуют в метаболизме РНК, включая контроль стабильности и трансляции мРНК [131]. Поли(ADP-рибозил)ирование служит важным регулятором динамики рибонуклеопротеиновых структур. При длительном стрессе и чрезмерной активации синтеза PAR образование рибонуклеопротеиновых комплексов приобретает патологический характер, приводя к формированию нерастворимых агрегатов.

Механизм фазового перехода с участием PAR обеспечивает создание временных транскрипцион-

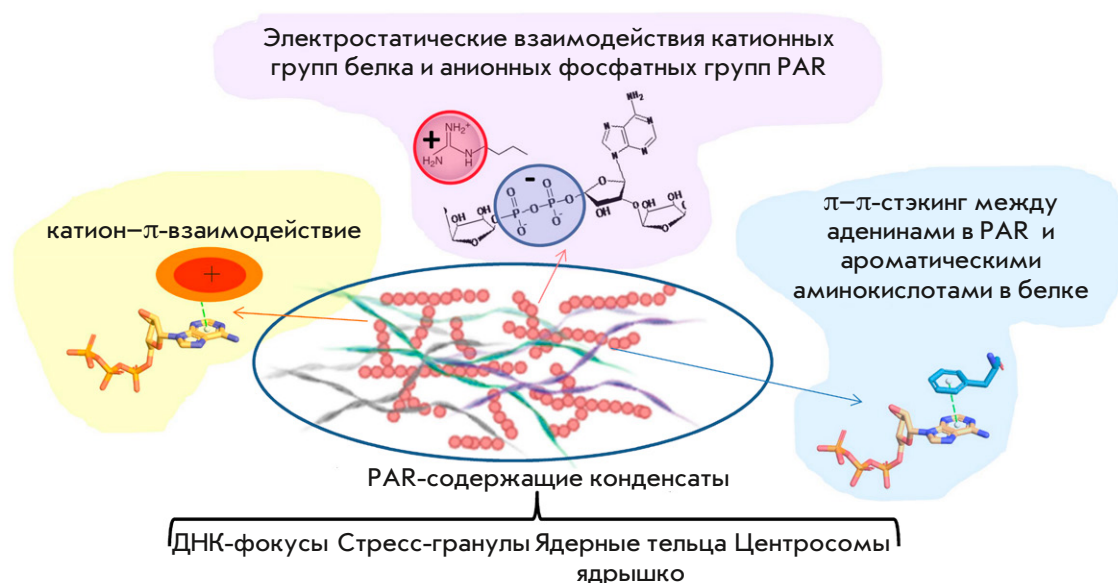


Рис. 4. PAR-зависимые биомолекулярные конденсаты, образующиеся посредством фазового расслоения, и взаимодействия PAR-белок, стабилизирующие эти конденсаты

ных комплексов на экспрессируемых генах за счет С-концевого домена (CTD) РНК-полимеразы II, который содержит домен с неупорядоченной структурой, способный к мультивалентным взаимодействиям [132–134]. Фосфорилирование CTD высвобождает РНК-полимеразу II из таких транскрипционных комплексов. Известно, что PARP-1 локализуется вблизи промоторов экспрессируемых генов, его активность стимулирует посттрансляционные модификации, способствующие транскрипции, а также вытесняет гистон H1, повышая тем самым доступность промоторов ДНК [135, 136]. Таким образом, образование временных конденсатов транскрипционных комплексов способствует локальному формированию активной транскрипционной среды.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Одним из механизмов адаптации и запуска необходимых процессов в клетке в ответ на различные стрессовые стимулы является синтез PAR – полимерных структур различной длины, подобных нуклеиновым кислотам. Несмотря на то что последовательность PAR не кодирует информацию как ДНК или РНК, тем не менее, длина и структура полимеров PAR формируют PAR-код, который распознается множеством белков, участвующих в процессах репарации, транскрипции и организации структуры хроматина. Уровень PAR в клетках непостоянен, он строго контролируется ферментами, синтезирующими, распоз-

нающими и гидролизующими PAR. Жидкофазные биомолекулярные компартменты, в которых PAR выступает в качестве каркаса, на котором конденсируются белки, имеющие домены с неупорядоченной структурой, и их партнеры собираются для повышения эффективности определенных биохимических процессов, например, транскрипции, репарации, биогенеза РНК, а затем оперативно разбираются после гидролиза PAR. Нарушение метаболизма PAR сопряжено с развитием патологических процессов в организме, приводящих к опухолевым, сердечно-сосудистым и нейродегенеративным заболеваниям, а также к преждевременному старению. Поэтому белки, модулирующие PAR-код, считаются важными мишенями для таргетной терапии. Действительно, несколько ингибиторов PARP уже успешно применяют в качестве противоопухолевых средств, а другие разрабатываются и проходят тестирование. Не менее перспективными мишенями представляются ферменты, гидролизующие PAR. Рассматриваются также возможности применения соединений, контролирующих уровень PAR, в терапии неонкологических заболеваний. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 17-54-33045).

Авторы заявляют, что у них нет конфликта интересов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Chambon P, Weill J.D., Mandel P. // Biochem. Biophys. Res. Commun. 1963. V. 11. P. 39–43.
- Gupte R., Liu Z., Kraus W.L. // Genes Dev. 2017. V. 31. № 2. P. 101–126.
- Luscher B., Butepage M., Ecker L., Krieg S., Verheugd P., Shilton B.H. // Chem. Rev. 2018. V. 118. № 3. P. 1092–1136.
- Kraus W.L. // Genes Dev. 2020. V. 34. № 5–6. P. 251–253.
- Sutcu H.H., Matta E., Ishchenko A.A. // J. Mol. Biol. 2020. V. 432. P. 1769–1791.
- O'Sullivan J., Tedim Ferreira M., Gagne J.P., Sharma A.K., Hendzel M.J., Masson J.Y., Poirier G.G. // Nat. Commun. 2019. V. 10. № 1. P. 1182.
- Liu C., Vyas A., Kassab M.A., Singh A.K., Yu X. // Nucl. Acids Res. 2017. V. 45. № 14. P. 8129–8141.
- Kim M.Y., Zhang T., Kraus W.L. // Genes Dev. 2005. V. 19. № 17. P. 1951–1967.
- Luo X., Kraus W.L. // Genes Dev. 2012. V. 26. P. 417–432.
- Vyas S., Chang P. // Nat. Rev. Cancer. 2014. V. 14. № 7. P. 502–509.
- Kashima L., Idogawa M., Mita H., Shitashige M., Yamada T., Ogi K., Suzuki H., Toyota M., Ariga H., Sasaki Y. // J. Biol. Chem. 2012. V. 287. № 16. P. 12975–12984.
- Kim S., Kwon S.H., Kam T.I., Panicker N., Karuppagounder S.S., Lee S., Lee J.H., Kim W.R., Kook M., Foss C.A., et al. // Neuron. 2019. V. 103. № 4. P. 627–641 e627.
- Marti J.M., Fernandez-Cortez M., Serrano-Saenz S., Zamudio-Martinez E., Delgado-Bellido D., Garcia-Diaz A., Oliver F.J. // Cancers (Basel). 2020. V. 12. № 3. P. 739–765.
- Grimaldi G., Catara G., Palazzo L., Corteggio A., Valente C., Corda D. // Biochem. Pharmacol. 2019. V. 167. P. 64–75.
- Nilov D., Maluchenko N., Kurgina T., Pushkarev S., Lys A., Kutuzov M., Gerasimova N., Feofanov A., Svedas V., Lavrik O., Studitsky V.M. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 6. P. E2159.
- Malyuchenko N.V., Kotova E.Y., Kulaeva O.I., Kirpichnikov M.P., Studitskiy V.M. // Acta Naturae. 2015. V. 7. № 3. P. 27–37.
- Masutani M., Fujimori H. // Mol. Aspects Med. 2013. V. 34. № 6. P. 1202–1216.
- Terada M., Fujiki H., Marks P.A., Sugimura T. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1979. V. 76. № 12. P. 6411–6414.
- Min A., Im S.A. // Cancers (Basel). 2020. V. 12. № 2. P. 394–410.
- Patel M., Nowsheen S., Maraboyina S., Xia F. // Cell Biosci. 2020. V. 10. P. 35.
- Nilov D.K., Tararov V.I., Kulikov A.V., Zakharenko A.L., Gushchina I.V., Mikhailov S.N., Lavrik O.I., Švedas V.K. // Acta Naturae. 2016. V. 8. № 2. P. 108–115.
- Sherstyuk Y.V., Ivanisenko N.V., Zakharenko A.L., Sukhanova M.V., Peshkov R.Y., Eltsov I.V., Kutuzov M.M., Kurgina T.A., Belousova E.A., Ivanisenko V.A., et al. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 21. № 1. P. 214–239.
- Liu Z K.W. // Mol. Cell. 2017. V. 65. № 4. P. 589–603 e589.
- Yoo Y.D., Huang C.T., Zhang X., Lavaute T.M., Zhang S.C. // Stem Cells. 2011. V. 29. № 12. P. 1975–1982.
- Chiou S.H., Jiang B.H., Yu Y.L., Chou S.J., Tsai P.H., Chang W.C., Chen L.K., Chen L.H., Chien Y., Chiou G.Y. // J. Exp. Med. 2013. V. 210. № 1. P. 85–98.

26. Shilovsky G.A., Shram S.I., Morgunova G.V., Khokhlov A.N. // *Biochemistry (Moscow)*. 2017. V. 82. № 11. P. 1391.
27. Burkle A., Diefenbach J., Brabeck C., Beneke S. // *Pharmacol. Res.* 2005. V. 52. № 1. P. 93–99.
28. Muiras M.L., Muller M., Schachter F., Burkle A. // *J. Mol. Med. (Berlin)*. 1998. V. 76. № 5. P. 346–354.
29. Deschenes F., Massip L., Garand C., Lebel M. // *Hum. Mol. Genet.* 2005. V. 14. № 21. P. 3293–3308.
30. Thorslund T., von Kobbe C., Harrigan J.A., Indig F.E., Christiansen M., Stevnsner T., Bohr V.A. // *Mol. Cell. Biol.* 2005. V. 25. № 17. P. 7625–7636.
31. Henning R.J., Bourgeois M., Harbison R.D. // *Cardiovasc. Toxicol.* 2018. V. 18. № 6. P. 493–506.
32. Cao S., Sun Y., Wang W., Wang B., Zhang Q., Pan C., Yuan Q., Xu F., Wei S., Chen Y. // *J. Cell. Mol. Med.* 2019. V. 23. № 10. P. 6897–6906.
33. Rao P.D., Sankrityayan H., Srivastava A., Kulkarni Y.A., Mulay S.R., Gaikwad A.B. // *Drug Discov. Today*. 2020. V. 25. № 7. P. 1253–1261.
34. Berger N.A., Besson V.C., Boulares A.H., Burkle A., Chiarugi A., Clark R.S., Curtin N.J., Cuzzocrea S., Dawson T.M., Dawson V.L., et al. // *B. J. Pharmacol.* 2018. V. 175. № 2. P. 192–222.
35. D'Amours D., Desnoyers S., D'Silva I., Poirier G.G. // *Biochem. J.* 1999. V. 342. P. 249–268.
36. Hottiger M.O., Hassa P.O., Luscher B., Schuler H., Koch-Nolte F. // *Trends Biochem. Sci.* 2010. V. 35. № 4. P. 208–219.
37. Burkle A. // *FEBS J.* 2005. V. 272. № 18. P. 4576–4589.
38. Leung A.K.L. // *Trends Cell Biol.* 2020. V. 30. № 5. P. 370–383.
39. Karlberg T., Langelier M.F., Pascal J.M., Schuler H. // *Mol. Aspects Med.* 2013. V. 34. № 6. P. 1088–1108.
40. Rolli V., O'Farrell M., Menissier de Murcia J., de Murcia G. // *Biochemistry*. 1997. V. 36. № 40. P. 12147–12154.
41. Vyas S., Matic I., Uchima L., Rood J., Zaja R., Hay R.T., Ahel I., Chang P. // *Nat. Commun.* 2014. V. 5. P. 4426.
42. Shieh W.M., Ame J.C., Wilson M.V., Wang Z.Q., Koh D.W., Jacobson M.K., Jacobson E.L. // *J. Biol. Chem.* 1998. V. 273. № 46. P. 30069–30072.
43. Ame J.C., Rolli V., Schreiber V., Niedergang C., Apiou F., Decker P., Höger T., de Murcia J.M., de Murcia G. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 25. P. 17860–17868.
44. Huber A., Bai P., de Murcia J.M., de Murcia G. // *DNA Repair (Amst.)*. 2004. V. 3. № 8–9. P. 1103–1108.
45. Menissier de Murcia J., Ricoul M., Tartier L., Niedergang C., Huber A., Dantzer F., Schreiber V., Amé J.C., Dierich A., LeMeur M., et al. // *EMBO J.* 2003. V. 22. № 9. P. 2255–2263.
46. Tulin A.S., Spradling A. // *Science*. 2003. V. 299. P. 560–562.
47. Slade D.D.M., Barkauskaite E., Weston R., Lafite P., Dixon N., Ahel M., Leys D., Ahel I. // *Nature*. 2011. V. 477. P. 616–620.
48. Tavassoli M., Tavassoli M.H., Shall S. // *Biochim. Biophys. Acta*. 1985. V. 827. № 3. P. 228–234.
49. Tsai Y.J., Abe H., Maruta H., Hatano T., Nishina H., Sakagami H., Okuda T., Tanuma S. // *Biochem. Int.* 1991. V. 24. № 5. P. 889–897.
50. Fathers C., Drayton R.M., Solovieva S., Bryant H.E. // *Cell Cycle*. 2012. V. 11. № 5. P. 990–997.
51. Gravells P., Neale J., Grant E., Nathubhai A., Smith K.M., James D.I., Bryant H.E. // *DNA Repair (Amst.)*. 2018. V. 61. P. 25–36.
52. Chand S.N., Zarei M., Schiewer M.J., Kamath A.R., Romeo C., Lal S., Cozzitorto J.A., Nevler A., Scolaro L., Londin E., et al. // *Cancer Res.* 2017. V. 77. № 18. P. 5011–5025.
53. Slama J.T., Aboul-Ela N., Jacobson M.K. // *J. Med. Chem.* 1995. V. 38. № 21. P. 4332–4336.
54. Teloni F., Altmeyer M. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 3. P. 993–1006.
55. Krietsch J., Rouleau M., Pic E., Ethier C., Dawson T.M., Dawson V.L., Masson J.Y., Poirier G.G., Gagné J.P. // *Mol. Aspects Med.* 2013. V. 34. № 6. P. 1066–1087.
56. Pleschke J.M.K., Kleczkowska H.E., Strohm M., Althaus F.R. // *J. Biol. Chem.* 2000. V. 275. P. 40974–40980.
57. Zhou Z.D., Chan C.H., Xiao Z.C., Tan E.K. // *Cell Adh. Migr.* 2011. V. 5. № 6. P. 463–471.
58. Kamaletdinova T., Fanaei-Kahrani Z., Wang Z.Q. // *Cells*. 2019. V. 8. № 12. P. 1625–1645.
59. Duan Y., Du A., Gu J., Duan G., Wang C., Gui X., Ma Z., Qian B., Deng X., Zhang K., et al. // *Cell Res.* 2019. V. 29. № 3. P. 233–247.
60. Žaja R., Mikoč M.A., Barkauskaite E., Ahel I. // *Biomolecules*. 2013. V. 3. № 1. P. 1–17.
61. Chen D.V., Vollmar M., Rossi M.N., Phillips C., Kraehenbuehl R., Slade D., Mehrotra P.V., von Delft F., Crosthwaite S.K., Gileadi O., Denu J.M., Ahel I. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. P. 13261–13271.
62. Alhammad Y.M.O., Fehr A.R. // *Viruses*. 2020. V. 12. № 4. P. 384–396.
63. Grunewald M.E., Chen Y., Kuny C., Maejima T., Lease R., Ferraris D., Aikawa M., Sullivan C.S., Perlman S., Fehr A.R. // *PLoS Pathog.* 2019. V. 15. № 5. P. e1007756.
64. Rack J.G., Perina D., Ahel I. // *Annu. Rev. Biochem.* 2016. V. 85. P. 431–454.
65. Ahel I., Ahel D., Matsusaka T., Clark A.J., Pines J., Boulton S.J., West S.C. // *Nature*. 2008. V. 451. P. 81–85.
66. Li G.Y., McCulloch R.D., Fenton A.L., Cheung M., Meng L., Ikura M., Koch C.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 20. P. 9129–9134.
67. Wang Z.M., Michaud G.A., Cheng Z., Zhang Y., Hinds T.R., Fan E., Cong F., Xu W. // *Genes Dev.* 2012. V. 26. P. 235–240.
68. Kang H.C.L., Lee Y.I., Shin J.H., Andrabi S.A., Chi Z., Gagne J.P., Lee Y., Ko H.S., Lee B.D., Poirier G.G., Dawson V.L., Dawson T.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. P. 14103–14108.
69. Li M., Lu L.X., Yang C.Y., Wang S., Yu X. // *Genes Dev.* 2013. V. 27. № 16. P. 1752–1768.
70. Vyas S., Chesarone-Cataldo M., Todorova T., Huang Y.H., Chang P. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 2240.
71. Bock F.J., Todorova T.T., Chang P. // *Mol. Cell*. 2015. V. 58. № 6. P. 959–969.
72. Messias A.C., Sattler M. // *Acc. Chem. Res.* 2004. V. 37. № 5. P. 279–287.
73. Zhang F., Chen Y., Li M., Yu X. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 20. P. 7278–7283.
74. Zhang F., Shi J., Chen S.H., Bian C., Yu X. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 22. P. 10782–10794.
75. Altmeyer M., Neelsen K.J., Teloni F., Pozdnyakova I., Pellegrino S., Grofte M., Rask M.B.D., Streicher W., Jungmichel S., Nielsen M.L., et al. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 8088.
76. Chong P.A., Vernon R.M., Forman-Kay J.D. // *J. Mol. Biol.* 2018. V. 430. № 23. P. 4650–4665.
77. Thandapani P., O'Connor T.R., Bailey T.L., Richard S. // *Mol. Cell*. 2013. V. 50. P. 613–623.
78. Masuzawa T., Oyoshi T. // *ACS Omega*. 2020. V. 5. № 10. P. 5202–5208.
79. Ozdilek B.A., Thompson V.F., Ahmed N.S., White C.I., Batey R.T., Schwartz J.C. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № 13. P. 7984–7996.
80. Koh D.W., Lawler A.M., Poitras M.F., Sasaki M., Wattler S., Nehls M.C., Stöger T., Poirier G.G., Dawson V.L., Dawson T.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2004. V. 101. № 51. P. 17699–17704.
81. Andrabi S.A., Umanah G.K., Chang C., Stevens D.A., Karuppagounder S.S., Gagne J.P., Poirier G.G., Dawson V.L., Dawson T.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 28.

- P. 10209–10214.
82. Berger N.A., Sims J.L., Catino D.M., Berger S.J. // *Princess Takamatsu Symp.* 1983. V. 13. P. 219–226.
 83. Chiarugi A. // *Trends Pharmacol. Sci.* 2002. V. 23. № 3. P. 122–129.
 84. Yu S.W., Andrabi S.A., Wang H., Kim N.S., Poirier G.G., Dawson T.M., Dawson T.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. № 48. P. 18314–18319.
 85. Fahrer J., Kranaster R., Altmeyer M., Marx A., Burkle A. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. № 21. P. e143.
 86. Buratowski S. // *Cell.* 1994. V. 77. № 1. P. 1–3.
 87. Alexiadis V., Waldmann T., Andersen J., Mann M., Knippers R., Gruss C. // *Genes Dev.* 2000. V. 14. № 11. P. 1308–1312.
 88. Ganz M., Vogel C., Czada C., Jorke V., Gwosch E.C., Kleiner R., Mach A.P., Zancchi F.C., Diaspro A., Kappes F., et al. // *PLoS One.* 2019. V. 14. № 8. P. e0213130.
 89. Kappes F., Fahrer J., Khodadoust M.S., Tabbert A., Strasser C., Mor-Vaknin N., Moreno-Villanueva M., Bürkle A., Markovitz D.M., Ferrando-May E. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. № 10. P. 3245–3257.
 90. Soares L.M., Zanier K., Mackereth C., Sattler M., Valcarcel J. // *Science.* 2006. V. 312. № 5782. P. 1961–1965.
 91. Campillos M., Garcia M.A., Valdivieso F., Vazquez J. // *Nucl. Acids Res.* 2003. V. 31. № 5. P. 1571–1575.
 92. Gamble M.J., Fisher R.P. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2007. V. 14. № 6. P. 548–555.
 93. Sanden C., Jarvstrat L., Lennartsson A., Brattas P.L., Nilsson B., Gullberg U. // *Mol. Cancer.* 2014. V. 13. P. 215.
 94. Wise-Draper T.M., Allen H.V., Jones E.E., Habash K.B., Matsuo H., Wells S.I. // *Mol. Cell. Biol.* 2006. V. 26. № 20. P. 7506–7519.
 95. Broxmeyer H.E., Mor-Vaknin N., Kappes F., Legendre M., Saha A.K., Ou X., O’Leary H., Capitano M., Cooper S., Markovitz D.M. // *Stem Cells.* 2013. V. 31. № 8. P. 1447–1453.
 96. Mor-Vaknin N., Rivas M., Legendre M., Mohan S., Yuanfan Y., Mau T., Johnson A., Huang B., Zhao L., Kimura Y., et al. // *Arthritis Rheumatol.* 2018. V. 70. № 4. P. 594–605.
 97. Fahrer J., Popp O., Malanga M., Beneke S., Markovitz D.M., Ferrando-May E., Bürkle A., Kappes F. // *Biochemistry.* 2010. V. 49. № 33. P. 7119–7130.
 98. Malanga M., Atorino L., Tramontano F., Farina B., Quesada P. // *Biochim. Biophys. Acta.* 1998. V. 1399. № 2–3. P. 154–160.
 99. Althaus F.R. // *J. Cell. Sci.* 1992. V. 102 (Pt 4). P. 663–670.
 100. Thomas C., Ji Y., Wu C., Datz H., Boyle C., MacLeod B., Patel S., Ampofo M., Currie M., Harbin J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. № 20. P. 9941–9946.
 101. Sultanov D.C., Gerasimova N.S., Kudryashova K.S., Maluchenko N.V., Kotova E.Y., Langelier M.F., Pascal J.M., Kirpichnikov M.P., Feofanov A.V., Studitsky V.M. // *AIMS Genet.* 2017. V. 4. № 1. P. 21–31.
 102. Maluchenko N.V., Sultanov D.S., Kotova E.Y., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M., Feofanov A.V. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2019. V. 489. № 1. P. 377–379.
 103. Maluchenko N.V., Kulaeva O.I., Kotova E., Chupyrkina A.A., Nikitin D.V., Kirpichnikov M.P., Studitsky V.M. // *Mol. Biol. (Moscow).* 2015. V. 49. № 1. P. 1–15.
 104. Popp O., Veith S., Fahrer J., Bohr V.A., Burkle A., Mangerich A. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. № 1. P. 179–188.
 105. Lebel M., Monnat R.J., Jr. // *Ageing Res. Rev.* 2018. V. 41. P. 82–97.
 106. Orlovetskie N., Serruya R., Abboud-Jarrous G., Jarrous N. // *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 2017. V. 1867. № 1. P. 42–48.
 107. D’Annessa I., Coletta A., Desideri A. // *Biopolymers.* 2014. V. 101. № 1. P. 78–86.
 108. Miwa M., Saikawa N., Yamaizumi Z., Nishimura S., Sugimura T. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1979. V. 76. № 2. P. 595–599.
 109. Chen Q., Kassab M.A., Dantzer F., Yu X. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 3233.
 110. Alemasova E.E., Lavrik O.I. // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № 8. P. 3811–3827.
 111. Sukhanova M.V., Abrakhi S., Joshi V., Pastre D., Kutuzov M.M., Anarbaev R.O., Curmi P.A., Hamon L., Lavrik O.I. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 6. P. e60.
 112. Mehrotra P.V., Ahel D., Ryan D.P., Weston R., Wiechens N., Kraehenbuehl R., Hughes T.O., Ahel I. // *Mol. Cell.* 2011. V. 41. № 1. P. 46–55.
 113. Riccio A.A., Cingolani G., Pascal J.M. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 4. P. 1691–1702.
 114. Aravind L., Koonin E.V. // *Trends Biochem. Sci.* 2000. V. 25. № 3. P. 112–114.
 115. Ali A.A., Timinszky G., Arribas-Bosacoma R., Kozlowski M., Hassa P.O., Hassler M., Ladurner A.G., Pearl L.H., Oliver A.W. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012. V. 19. № 7. P. 685–692.
 116. Haince J.F., McDonald D., Rodrigue A., Dery U., Masson J.Y., Hendzel M.J., Poirier G.G. // *J. Biol. Chem.* 2008. V. 283. P. 1197–1208.
 117. Langelier M.F., Planck J.L., Roy S., Pascal J.M. // *Science.* 2012. V. 336. P. 728–732.
 118. Mortusewicz O., Ame J.C., Schreiber V., Leonhardt H. // *Nucl. Acids Res.* 2007. V. 35. № 22. P. 7665–7675.
 119. Zhang H., Ji X., Li P., Liu C., Lou J., Wang Z., Wen W., Xiao Y., Zhang M., Zhu X. // *Sci. China Life Sci.* 2020. V. 63. № 7. P. 953–985.
 120. Gao X.M., Zhang Z.H. // *Yi Chuan.* 2020. V. 42. № 1. P. 45–56.
 121. Banani S.F., Rice A.M., Peeples W.B., Lin Y., Jain S., Parker R., Rosen M.K. // *Cell.* 2016. V. 166. № 3. P. 651–663.
 122. Li P., Banjade S., Cheng H.C., Kim S., Chen B., Guo L., Llaguno M., Hollingsworth J.V., King D.S., Banani S.F., et al. // *Nature.* 2012. V. 483. № 7389. P. 336–340.
 123. Nakashima K.K., Vibhute M.A., Spruijt E. // *Front Mol. Biosci.* 2019. V. 6. P. 21.
 124. Yamamoto T., Yamazaki T., Hirose T. // *Soft Matter.* 2020. V. 16. № 19. P. 4692–4698.
 125. Kohata K., Miyoshi D. // *Biophys. Rev.* 2020. V. 12. № 19. P. 669–676.
 126. Schultheisz H.L., Szymczyna B.R., Williamson J.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2009. V. 131. № 40. P. 14571–14578.
 127. Singatulina A.S., Hamon L., Sukhanova M.V., Desforges B., Joshi V., Bouhss A., Lavrik O.I., Pastré D. // *Cell Rep.* 2019. V. 27. № 6. P. 1809–1821 e1805.
 128. McGurk L., Gomes E., Guo L., Mojsilovic-Petrovic J., Tran V., Kalb R.G., Shorter J., Bonini N.M. // *Mol. Cell.* 2018. V. 71. № 5. P. 703–717 e709.
 129. Leung A.K. // *J. Cell. Biol.* 2014. V. 205. № 5. P. 613–619.
 130. Mastrocola A.S., Kim S.H., Trinh A.T., Rodenkirch L.A., Tibbetts R.S. // *J. Biol. Chem.* 2013. V. 288. № 34. P. 24731–24741.
 131. Balagopal V., Parker R. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 2009. V. 21. № 3. P. 403–408.
 132. Boehning M., Dugast-Darzacq C., Rankovic M., Hansen A.S., Yu T., Marie-Nelly H., McSwiggen D.T., Kokic G., Dailey G.M., Cramer P., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2018. V. 25. № 9. P. 833–840.
 133. Lu H., Liu R., Zhou Q. // *Transcription.* 2019. V. 10. № 3. P. 157–163.
 134. Portz B., Shorter J. // *Trends Biochem. Sci.* 2020. V. 45. № 1. P. 1–3.
 135. Krishnakumar R., Kraus W.L. // *Mol. Cell.* 2010. V. 39. № 5. P. 736–749.
 136. Nalabothula N., Al-jumaily T., Eteleeb A.M., Flight R.M., Xiaorong S., Moseley H., Rouchka E.C., Fondufe-Mittendorf Y.N. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 8. P. e0135410.

УДК 577.2:616, 577.2:579

Болезнь Паркинсона, ассоциированная с мутациями в гене *GBA*: молекулярные аспекты и возможные подходы к лечению

К. А. Сенкевич^{1,2,3*}, А. Э. Копытова^{1,2}, Т. С. Усенко^{1,2}, А. К. Емельянов^{1,2}, С. Н. Пчелина^{1,2,4}

¹Национальный исследовательский центр «Курчатовский институт» ФГБУ Петербургский институт ядерной физики им. Б.П. Константинова, Гатчина, Ленинградская область, 188300 Россия

²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова Министерства здравоохранения РФ, Санкт-Петербург, 197022 Россия

³Montreal Neurological Institute, McGill University, Montréal, QC, H3A 1A1, Canada

⁴Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197376 Россия

*E-mail: senkkon@gmail.com

Поступила в редакцию 29.05.2020

Принята к печати 03.09.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11031

РЕФЕРАТ Болезнь Паркинсона (БП) – мультифакторное нейродегенеративное заболевание. К настоящему моменту в полногеномных ассоциативных исследованиях выявлено более 70 локусов, ассоциированных с риском БП. Варианты в гене *GBA*, кодирующем глюкоцереброзидазу, достаточно часто находят у пациентов с БП во всех популяциях мира, что способствует интенсивному изучению данного гена. У пациентов с БП, ассоциированной с мутациями в гене *GBA* (*GBA*-БП), выявлен ряд биохимических особенностей. В частности, показано снижение активности глюкоцереброзидазы, накопление субстрата глюкозилцерамида. Выявление данных особенностей позволило выдвинуть гипотезу о возможности лечения *GBA*-БП с использованием новых стратегий, направленных на восстановление активности глюкоцереброзидазы, а также на снижение концентрации субстрата. В нашей статье рассмотрены молекулярно-генетические механизмы патогенеза *GBA*-БП и возможные подходы к лечению данной формы заболевания.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА болезнь Паркинсона, *GBA*, глюкоцереброзидаза, лечение.

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – полиэтиологическое нейродегенеративное заболевание, относящееся к классу синуклеинопатий, в число которых входят также деменция с тельцами Леви (ДТЛ) и мульти-системная атрофия (МСА) [1]. Синуклеинопатии представляют собой группу заболеваний, нейродегенерация при которых обусловлена накоплением и агрегацией белка альфа-синуклеина в нейрональных (БП, ДТЛ) и глиальных (МСА) клетках головного мозга [1].

Патоморфологически БП определяется как нейродегенеративное заболевание с преимущественным поражением дофаминергических нейронов черной субстанции с формированием в цитоплазме выживших нейронов белковых агрегатов, так называемых телец Леви, основным компонентом которых является белок альфа-синуклеин [3–5].

БП – наиболее распространенная синуклеинопатия, частота встречаемости которой среди лиц стар-

ше 60 лет составляет 1–3% [2]. Моторные симптомы проявляются при гибели примерно 50–60% дофаминергических нейронов черной субстанции головного мозга [3–5]. Однако процесс нейродегенерации начинается за много лет до развития моторных симптомов и может характеризоваться широким спектром немоторных симптомов, таких, как запоры, нарушение обоняния, депрессия, различные расстройства сна (включая расстройства поведения в фазу сна с быстрыми движениями глаз (РПБДГ)) и др. [6].

Несмотря на принятый термин синуклеинопатии, за последние годы установлено, что при ряде генетически обусловленных форм БП тельца Леви не образуются. В ходе аутопсии тельца Леви не обнаружены более чем у 50% пациентов с БП, обусловленной мутациями в гене *LRRK2* [7]. Агрегированные формы альфа-синуклеина не найдены также в клетках головного мозга пациентов с мутациями в гене *PRKN* [8]. Более того, тельца Леви отсутствуют у 8% пациентов со спорадической БП (сБП) [9].

Известно, что БП имеет мультифакторный характер, и в развитие заболевания вносят вклад как генетические факторы, так и факторы окружающей среды. В настоящее время идентифицирован ряд генов, ассоциированных с развитием БП [10]. Наибольший вклад в риск БП вносят варианты в гене глюкоцереброзидазы (*GBA*) [11–13]. Мутации в гене *GBA* обнаруживаются у 5–20% пациентов с БП (в зависимости от популяции) с наибольшей частотой среди евреев-ашкенази [11]. Важно отметить, что мутации в гене *GBA*, несмотря на их достаточно высокую частоту при БП, обладают низкой пенетрантностью. Так, в возрасте 80 лет и старше клиническая картина заболевания развивается у 9–30% носителей мутаций гена *GBA* [14–16]. Обращает на себя внимание тот факт, что мутации в гене *GBA* ассоциированы также с развитием других синуклеинопатий, в частности с ДТЛ [17]. Противоречивыми остаются данные об ассоциации вариантов в гене *GBA* с МСА [18–20]. Недавно обнаружили ассоциацию мутаций в гене *GBA* с развитием РПБДГ [21, 22]. Следует отметить, что более чем у 80% пациентов с данным заболеванием развивается БП или другие синуклеинопатии (ДТЛ, МСА) [23].

В рамках данного обзора рассмотрены молекулярные основы патогенеза *GBA*-БП, а также терапевтические подходы к лечению данной формы заболевания.

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ СВЯЗЬ БОЛЕЗНИ ПАРКИНСОНА И БОЛЕЗНИ ГОШЕ

Среди лизосомных болезней накопления самой частой является болезнь Гоше (БГ) [24]. К развитию этого заболевания приводят гомозиготные точковые мутации или гетерозиготные компаундные мутации в гене *GBA*, снижающие активность глюкоцереброзидазы (*GCase*) [25, 26]. На сегодняшний день известно более 400 мутаций в гене *GBA* [27]. Следует отметить, что гомозиготные варианты, приводящие к полной потере активности *GCase*, летальны [28, 29]. Для развития организма необходима остаточная активность фермента. В зависимости от выраженности снижения активности *GCase* выделяют как «благоприятные», так и «неблагоприятные» варианты гена. Остаточная активность *GCase* с «благоприятными» гомозиготными мутациями (р.N370S, р.V394L и р.R463C) составляет 20–35% от уровня активности фермента дикого типа, тогда как при «неблагоприятных» вариантах остаточная активность составляет 5–10% (мутации р.L444P, р.T323I) или отсутствует (с.84dupG) [30, 31]. Описаны также полиморфные варианты гена (р.E326K, р.T369M), ассоциированные со снижением активности *GCase* до 50% [30, 32], которые в гомозиготном состоянии не приводят к развитию БГ [33, 34].

Известно три типа БГ [35], из которых наиболее распространена БГ первого типа с благоприятным

прогнозом. В конце XX века опубликован ряд клинических наблюдений пациентов с симптомами паркинсонизма, которые при этом были родственниками пациентов с БГ [36–39].

В 2004 году впервые выявили ассоциацию между мутациями в гене *GBA* и БП [40]. Позднее данная ассоциация была подтверждена в крупномасштабном мультицентровом исследовании [13]. Обнаружено, что частота мутаций в гене *GBA* у пациентов с БП варьирует в разных популяциях [12, 41–43], превалируя среди евреев-ашкенази (до 20%) [44]. Впоследствии увеличение риска развития БП в 6–10 раз среди гетерозиготных носителей мутации в гене *GBA* было показано во многих популяциях [12, 13, 43]. Оказалось, что носительство вариантов р.E326K и р.T369M увеличивает риск БП в 1.5–2 раза [12, 45, 46]. При этом риск БП не зависит от гомозиготного/гетерозиготного статуса носительства мутаций в гене *GBA* [16]. В то же время показано, что фенотип БП и возраст начала заболевания ассоциированы с типом мутации [11, 47, 48].

ОСОБЕННОСТИ ФЕНОТИПА ПАЦИЕНТОВ С *GBA*-БП

Пациенты с *GBA*-БП характеризуются особым фенотипом: заболевание начинается раньше, чем при спорадической форме БП (сБП) [48], более выражены немоторные симптомы, включая когнитивный дефицит, а темпы прогрессирования заболевания выше, чем при сБП [49–54]. Показано также, что у пациентов с *GBA*-БП чаще встречаются галлюцинации, более выражен риск депрессии и тревожности [47, 53, 55–57]. При этом когнитивные нарушения и психические симптомы в большей степени характерны для носителей «неблагоприятных» мутаций (р.L444P, с.84dupG, 370Rec), чем для носителей более «благоприятных» аллелей (р.N370S) [47]. Интересно, что у носителей вариантов гена, ассоциированных с незначительным повышением риска БП (р.E326K, р.T369M), также превалируют когнитивные нарушения по сравнению с пациентами с сБП [58].

ФУНКЦИЯ *GCase* В НОРМЕ И ПРИ ПАТОЛОГИИ

Ген *GBA* кодирует лизосомный фермент *GCase*, который расщепляет глюкозилцерамид (*GlcCer*) до глюкозы и церамида. *GCase* является мембраносвязанным белком с пятью сайтами гликозилирования [27, 59]. При снижении активности фермента в лизосомах накапливаются *GlcCer* и лизосфинголипид глюкозилсфингозин (*GlcSph*), образующийся при деацетилировании *GlcCer*. Накопление этих веществ в лизосомах пациентов с БГ приводит к образованию фенотипически измененных макрофагов, так называемых клеток Гоше. Накопление клеток Гоше в различных органах и тканях приводит к развитию симптомов БГ (изменениям в костях, гепатоспленомегалии, анемии) [60].

В процессе синтеза белка, кодируемого мутантным геном *GBA*, в эндоплазматическом ретикулуме (ЭР) происходит нарушение фолдинга, изменение нативной конформации фермента и его транспорта в лизосомы (рис. 1). После созревания в ЭР белок связывается с интегральным мембранным белком лизосом типа 2 (LIMP-2). Белок LIMP-2, кодируемый геном *SCARB2*, обеспечивает транспорт GCase из ЭР в лизосомы, где в условиях кислой среды белки диссоциируют [61]. Показано, что изменение экспрессии *LIMP-2* у мышей, моделирующих БП, приводит к снижению активности GCase, а также к повреждению дофаминергических нейронов, опосредованному накоплением альфа-синуклеина [62].

Транспорту комплекса GCase-LIMP-2 в лизосому способствуют различные белки. В частности, белок теплового шока БТШ70 с програнулином, в качестве кошаперона [63]. Более того, показано, что програнулин модулирует активность GCase [64, 65]. Интересно, что локус гена *GRN*, кодирующего про-

гранулин, а также варианты в гене *SCARB2* были ассоциированы с развитием БП [66–68].

Для функциональной активности GCase необходимы белки-кофакторы. Кислая среда в лизосомах благоприятна для функционирования GCase, однако для увеличения каталитической активности фермента необходим белок сапозин С [69]. Лизосомный белок сапозин С обеспечивает максимально возможную активность GCase, а также препятствует протеолизу фермента [70]. Предполагается, что сапозин С связывает белок с GlcCer и направляет субстрат к активному центру фермента [69]. Сапозин С – один из трех белков, кодируемых геном *PSAP*. Редкие мутации в этом гене приводят к развитию БГ [71]. Однако в одном из исследований не подтвердили существование связи между вариантами в гене *PSAP* и БП [72].

Патогенез GBA-БП не ясен. Предполагается, что снижение активности GCase может вызывать дисфункцию лизосом, а впоследствии и снижение деградации альфа-синуклеина. В ходе исследова-

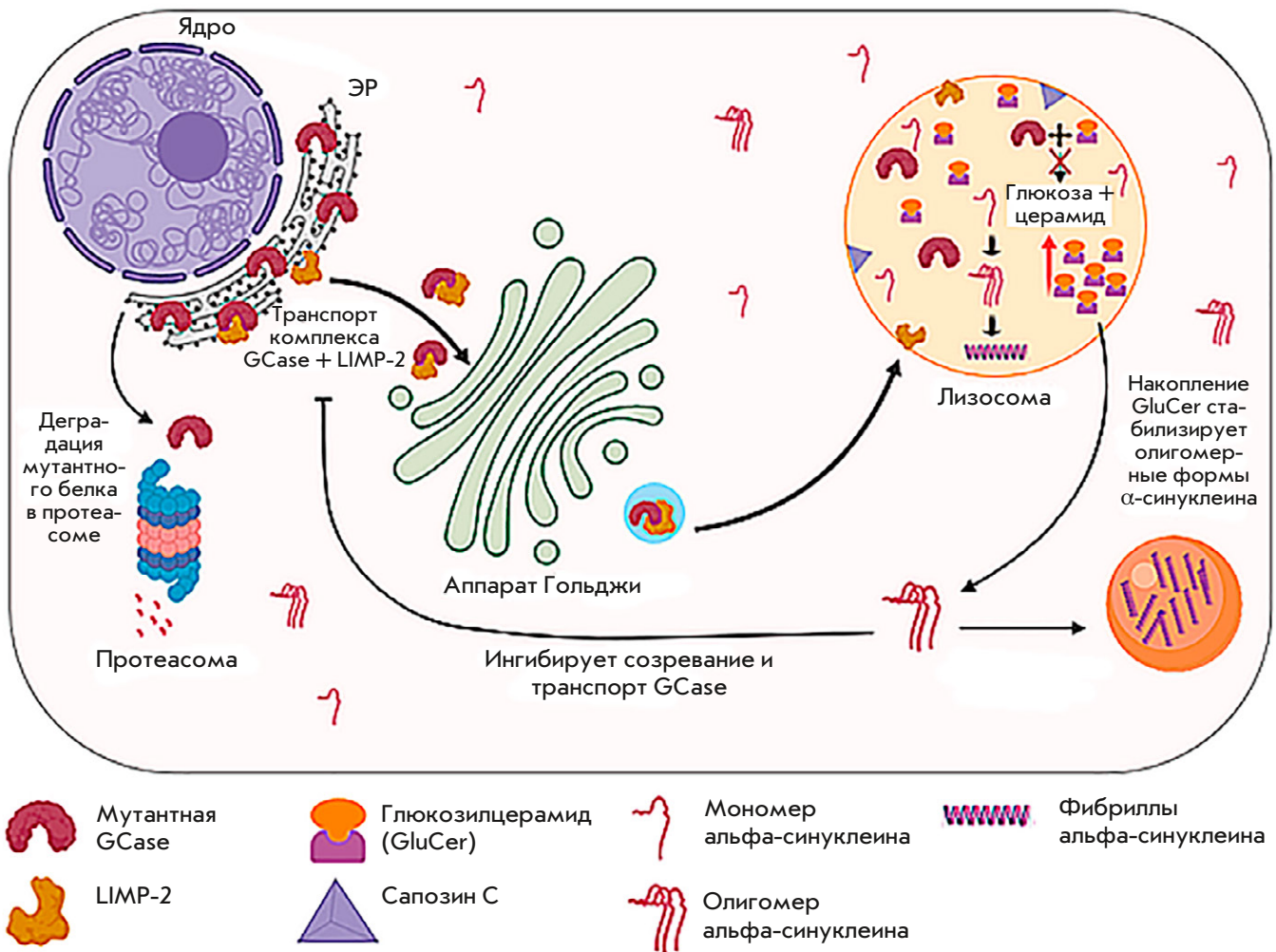


Рис. 1. Метаболизм GCase и возможное взаимодействие с альфа-синуклеином

ний, в том числе *in vitro*, на животных моделях и *post mortem*, выявлен ряд особенностей взаимодействия GCase и альфа-синуклеина, позволяющих сделать предположение о молекулярных основах патогенеза GBA-БП. Обнаружено физическое взаимодействие между GCase и альфа-синуклеином в кислой среде *in vitro* [73, 74]. Как уже упоминалось, GCase является мембраносвязанным белком. Взаимодействие GCase с альфа-синуклеином может приводить к образованию мембранного комплекса «GCase–альфа-синуклеин». Предполагается, что подобная структура может повышать эффективность расщепления альфа-синуклеина протеазами [59]. Показано также, что нарушение деградации альфа-синуклеина в лизосомах может приводить к снижению активности GCase [75, 76] и к увеличению агрегации альфа-синуклеина [75, 76]. При этом липиды мембраны лизосом и сфинголипиды, в частности, могут влиять на агрегацию альфа-синуклеина [77, 78]. Более того, в исследованиях *in vitro* и *in vivo* показано взаимодействие сфинголипидов GlcCer и GlcSph с альфа-синуклеином, которое может приводить к накоплению нейротоксических форм белка в результате его олигомеризации [75, 79, 80]. В экспериментах на нейрональной клеточной культуре также показано, что сфинголипиды способствуют агрегации альфа-синуклеина [81]. Соответственно снижение синтеза глюкозилцерамида приводит к уменьшению концентрации альфа-синуклеина [82]. Недавно выявлена обратная корреляция между уровнем белка GCase и соотношением альфа-синуклеина, фосфорилированного по Ser129, и общего альфа-синуклеина [83]. Моделирование возможных патогенетических путей позволило предположить, что влияние дисфункции GCase на повышение уровня фосфорилированного альфа-синуклеина частично обусловлено повышением уровня глюкозилсфингозина в черной субстанции [83].

Если снижение активности GCase в крови и накопление лизосфинголипидов считаются биомаркерами БГ [35], то изменение этих параметров у гетерозиготных носителей мутаций в гене *GBA* долгое время не обнаруживали. С развитием современных методов определения активности GCase и концентрации метаболитов (жидкостная хроматография с тандемной масс-спектрометрией) нами и другими авторами выявлено снижение активности GCase в крови пациентов с GBA-БП [32, 84]. Повышение концентрации лизосфинголипидов крови показано при GBA-БП [85, 86]. Снижение активности GCase обнаружено также в клетках крови пациентов с сБП [32], однако, в ряде исследований эти данные не были подтверждены [84, 87, 88]. Показано также снижение активности GCase в спинномозговой жидкости и черной субстанции мозга пациентов с сБП [89–91]. При этом необходимо

отметить, что активность GCase снижается с возрастом [92].

Таким образом, согласно наиболее распространенной гипотезе механизма развития БП у носителей мутаций в гене *GBA*, накопление GlcCer, GlcSph обусловлено снижением ферментативной активности GCase (loss of function), что приводит к нарушению аутофагии и олигомеризации альфа-синуклеина [75].

Ранее мы обнаружили повышение концентрации олигомерных форм альфа-синуклеина в плазме крови пациентов как с БГ, так и с GBA-БП [84, 93, 94]. Также накопление альфа-синуклеина и снижение активности GCase было показано в различных отделах головного мозга при сБП [90]. На моделях паркинсонизма на животных показано накопление сфинголипидов и агрегатов альфа-синуклеина в мозгу, а также их колокализация [79]. У модельных животных выявлена обратная корреляция между активностью GCase, когнитивной дисфункцией и моторным дефицитом [82]. Таким образом, можно предположить, что незначительное, но длительное снижение ферментативной активности GCase может быть триггером к накоплению альфа-синуклеина. Как уже упоминалось, пациенты с GBA-БП имеют особенный клинический фенотип [49–51, 53, 56, 57] с преобладанием когнитивных нарушений, тревоги и депрессии [53, 56, 95]. Сходный фенотип характерен для пациентов с мутациями и мультипликациями гена *SNCA*, кодирующего альфа-синуклеин [96, 97]. Возможно, что GBA-БП и *SNCA*-ассоциированная БП развиваются по сходному патогенетическому пути и имеют сходную фенотипическую картину.

Однако опубликованы данные, которые не согласуются с обсуждаемой выше гипотезой. Так, в аутопсийном материале черной субстанции пациентов с GBA-БП обнаружено снижение активности GCase [89, 98, 99], но не найдено повышения концентрации сфинголипидов [100]. Согласно альтернативной гипотезе (gain of function), в результате мутаций GCase приобретает токсическую функцию и нарушает работу ЭР и транспорт белков в клетке [101].

Получены также данные о вкладе воспаления в агрегацию альфа-синуклеина и развитие БП [102]. Показано, что альфа-синуклеин может прямо провоцировать воспалительный ответ [103, 104]. Нами, а также другими авторами обнаружено, что концентрация цитокинов в крови пациентов с GBA-БП повышена по сравнению с сБП [105, 106].

ВОЗМОЖНЫЕ ПОДХОДЫ К ТЕРАПИИ GBA-БП

Терапия БП до настоящего времени остается полностью симптоматической и не позволяет замедлить скорость прогрессирования гибели нейронов головного мозга. Сегодня не существует препаратов, позво-

Препараты для лечения GBA-БП, проходящие тестирование в рамках клинических исследований

Препарат	Фармакологическая группа	Механизм	Фаза
Амброксол	Фармакологический шаперон	Активация GCase	II
Венглустат (GZ/SAR402671)	Субстратредуцирующая терапия	Снижение концентрации субстрата (ингибирование глюкозилцерамидсинтазы)	II
LTI-291	Фармакологический шаперон	Аллостерический активатор GCase	Ib

ляющих осуществлять профилактику или замедлять темпы заболевания. Золотым стандартом лечения остается леводопа, предложенная в 1961 году [107]. Поиск препаратов или соединений, которые могут оказывать терапевтический или нейропротективный эффект, считается приоритетным направлением в исследованиях БП.

Известные молекулярные особенности GBA-БП позволили выдвинуть гипотезу о возможном профилактическом и лечебном эффекте препаратов, направленных на повышение активности GCase, а также на снижение концентрации сфинголипидов. В настоящее время проходят клинические исследования ряда препаратов (таблица). Следует отметить, что необходимым условием для использования подобных препаратов при лечении БП является их способность проходить через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ).

В настоящее время при лечении БГ применяют фермент-заместительную терапию (ФЗТ) и субстратредуцирующую терапию [108, 109]. В первом случае используют внутривенное введение рекомбинантного фермента GCase [109]. Препараты ФЗТ успешно применяют при БГ типа I. Однако эти лекарственные средства не проходят через ГЭБ, поэтому они не оказывают терапевтического эффекта на неврологические симптомы у больных БГ типа II и III и не могут быть эффективны при БП.

Предполагается, что купировать симптомы БП можно с помощью субстратредуцирующей терапии. В настоящее время для лечения БГ используют миглустат, элиглустат [110, 111] (рис. 2). В основе действия этих препаратов лежит селективное ингибирование биосинтеза GlcCer за счет ингибирования глюкозилцерамидсинтазы, что обеспечивает снижение уровня субстрата GCase [108, 109]. Следует отметить, что миглустат, несмотря на его способность проникать через ГЭБ, оказался неэффективным при нейропатических формах БГ [112]. При этом предположили, что разработка более эффективно проходящих через ГЭБ терапевтических средств данного класса может модифицировать клиническое течение нейропатических форм БГ, а также GBA-БП [82, 113]. Первое клиническое исследование препарата данной группы проходит в настоящее время на пациентах с GBA-БП. В ходе фазы I клинических

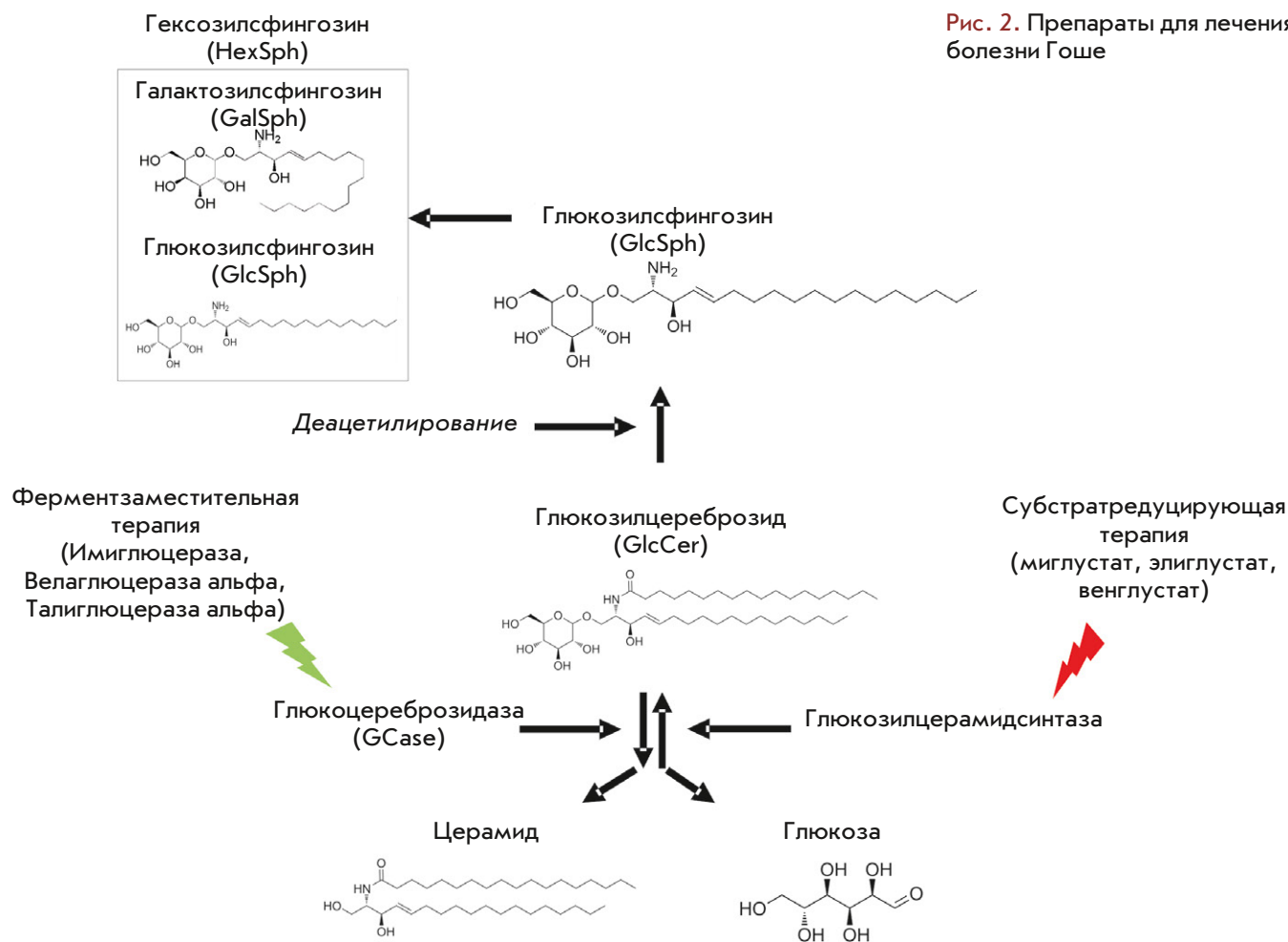
исследований показали, что венглустат может проникать в центральную нервную систему; проводится II фаза исследований (<https://www.clinicaltrials.gov/ct2/show/study/NCT02906020>).

Наиболее перспективным в случае GBA-БП представляется поиск небольших химических соединений – фармакологических шаперонов, которые связываются с ферментами, способствуя их фолдингу и транспорту в органеллы. Подобная стратегия рассматривается в качестве потенциального подхода к повышению ферментативной активности GCase, поскольку большинство мутаций гена GBA приводят к аминокислотным заменам, расположенным вне активного центра фермента, которые вызывают нарушение активности GCase, влияя на созревание данного белка. Механизм действия фармакологических шаперонов заключается в их связывании с GCase, что способствует правильной сборке фермента в ЭР и его транспорту в лизосомы, где в условиях низких значений pH происходит диссоциация вещества и фермента GCase [114].

Одно из таких веществ – амброксола гидрохлорид (амброксол), зарегистрированный в качестве препарата, снижающего гиперсекрецию слизи в дыхательных путях, а также применяемый при заболевании гиалиновой мембраны у новорожденных. Модулирующий эффект амброксола на GCase описан в 2009 году [115]. Эффективность амброксола в восстановлении ферментативной активности GCase показана как на клеточных линиях, так и на моделях паркинсонизма на животных. Амброксол многократно протестирован *in vitro* [115–119] и *in vivo* [120–123].

Нашим коллективом, а также другими авторами показано, что первичная культура макрофагов, полученных из моноцитов периферической крови пациентов с GBA-БП и БГ, может быть использована для персонализированного скрининга и оценки эффективности фармакологических шаперонов [124, 125]. Культивирование макрофагов периферической крови, полученных от пациентов с БГ, а также GBA-БП, в присутствии амброксола привело к повышению активности GCase и снижению концентрации лизосфинголипидов [124–126]. Последние данные показывают, что действие амброксола может зависеть от типа мутаций в гене GBA. На линии фибробластов, полученных от пациентов с БГ с «неблагоприятны-

Рис. 2. Препараты для лечения болезни Гоше



ми» мутациями в гене *GBA* (например, L444P/L444P или D409H/L444P), амброксол оказался менее эффективным, чем в случае пациентов с БГ с мутацией N370S/N370S [124]. На моделях БП на животных показана способность амброксола проходить через ГЭБ и увеличивать активность GCase, а также снижать агрегацию альфа-синуклеина [127].

Недавно завершилось первое клиническое исследование препарата амброксол для лечения GBA-БП. В этом открытом, не рандомизированном исследовании без контрольной группы участвовало 18 пациентов с БП (8 GBA-БП, 10 БП), получавших амброксол перорально [119]. Препарат показал свою безопасность и способность проходить через ГЭБ. У пациентов отмечалась положительная динамика клинической картины, однако, следует отметить небольшую выборку обследуемых, а также отсутствие группы плацебо-контроля, что затрудняет интерпретацию результатов [119]. В настоящее время проводится исследование эффективности амброксола для лечения БП с деменцией [128].

Другой фармакологический шаперон GCase – иминосахар изофагомин [129]. Исследования *in vitro* и *in*

vivo показали эффективность изофагомина в восстановлении активности мутантной GCase, снижении уровня субстратов, а также в замедлении скорости развития нейродегенерации [114, 130, 131].

В ходе клинических исследований изофагомина для лечения БГ обнаружена безопасность и удовлетворительная переносимость препарата. Однако клинический эффект был минимальным и третья фаза исследований не проводилась (<https://ir.amicusrx.com/news-releases/news-release-details/amicus-therapeutics-announces-preliminary-results-phase-2-study>).

Также в настоящее время зарегистрировано клиническое исследование еще одного молекулярного шаперона GCase (препарат LTI-291 (LTI/Allegran)). Данное исследование, направленное на оценку эффективности препарата для лечения GBA-БП, находится на 1b фазе (<https://www.trialregister.nl/trial/7061>) (таблица).

Нами построена модель *in silico* мутантной GCase с учетом сайтов гликозилирования фермента [132]. С использованием методов молекулярного докинга проводится нами поиск возможных модификаций

аллостерических фармакологических шаперонов GCase, повышающих их связывание с ферментом и, как следствие, их эффективность в восстановлении ферментативной активности GCase (неопубликованные данные).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Изучение патогенетических основ GBA-БП позволило за короткое время выявить новые терапевтические мишени. В настоящий момент актуальным становится расширение когорты пациентов GBA-БП для проведения клинических исследований. Важным представляется скрининг мутаций в гене *GBA* сре-

ди пациентов с БП с целью их возможного участия в клинических исследованиях. Масштаб исследований по выявлению новых активаторов GCase и увеличивающееся количество соединений, получивших разрешение на проведение клинических испытаний, позволяют предполагать, что GBA-БП может стать первой формой паркинсонизма, к которой будут разработаны новые терапевтические подходы. ●

*Исследование поддержано грантами
РНФ № 17-75-20159, 19-15-00315.*

Рисунок 1 создан с помощью BioRender.com.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- McCann H., Stevens C.H., Cartwright H., Halliday G.M. // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2014. V. 20 Suppl. 1. P. S62–67.
- Ascherio A., Schwarzschild M.A. // *Lancet Neurol.* 2016. V. 15. P. 1257–1272.
- Agid Y. // *Lancet.* 1991. V. 337. P. 1321–1324.
- Schulz J.B., Falkenburger B.H. // *Cell Tissue Res.* 2004. V. 318. P. 135–147.
- Hirsch E., Graybiel A.M., Agid Y.A. // *Nature.* 1988. V. 334. P. 345–348.
- Schapira A.H.V., Chaudhuri K.R., Jenner P. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2017. V. 18. P. 435–450.
- Kalia L.V., Lang A.E., Hazrati L.N., Fujioka S., Wszolek Z.K., Dickson D.W., Ross O.A., van Deerlin V.M., Trojanowski J.Q., Hurtig H.I., et al. // *JAMA Neurol.* 2015. V. 72. P. 100–105.
- Schneider S.A., Alcalay R.N. // *Mov. Disord.* 2017. V. 32. P. 1504–1523.
- Henderson M.X., Sengupta M., Trojanowski J.Q., Lee V.M.Y. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2019. V. 7. P. 183.
- Hernandez D.G., Reed X., Singleton A.B. // *J. Neurochem.* 2016. V. 139. P. 59–74.
- Gan-Or Z., Amshalom I., Kilarski L.L., Bar-Shira A., Gana-Weisz M., Mirelman A., Marder K., Bressman S., Giladi N., Orr-Urtreger A. // *Neurology.* 2015. V. 84. P. 880–887.
- Emelyanov A.K., Usenko T.S., Tesson C., Senkevich K.A., Nikolaev M.A., Miliukhina I.V., Kopytova A.E., Timofeeva A.A., Yakimovsky A.F., Lesage S., et al. // *Neurobiol. Aging.* 2018. V. 71. P. 267.e7–267.e10.
- Sidransky E., Nalls M.A., Aasly J.O., Aharon-Peretz J., Annesi G., Barbosa E.R., Bar-Shira A., Berg D., Bras J., Brice A., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2009. V. 361. P. 1651–1661.
- Anheim M., Elbaz A., Lesage S., Durr A., Condroyer C., Viallet F., Pollak P., Bonaiti B., Bonaiti-Pellie C., Brice A. // *Neurology.* 2012. V. 78. P. 417–420.
- Rana H.Q., Balwani M., Bier L., Alcalay R.N. // *Genet. Med.* 2013. V. 15. P. 146–149.
- Alcalay R.N., Dinur T., Quinn T., Sakanaka K., Levy O., Waters C., Fahn S., Dorovski T., Chung W.K., Pauciulo M., et al. // *JAMA Neurol.* 2014. V. 71. P. 752–757.
- Nalls M.A., Duran R., Lopez G., Kurzawa-Akanbi M., McKeith I.G., Chinnery P.F., Morris C.M., Theuns J., Crosiers D., Cras P., et al. // *JAMA Neurol.* 2013. V. 70. P. 727–735.
- Srullijes K., Hauser A.K., Guella I., Asselta R., Brockmann K., Schulte C., Solda G., Cilia R., Maetzler W., Schols L., et al. // *Eur. J. Neurol.* 2013. V. 20. P. e61–62.
- Mitsui J., Matsukawa T., Sasaki H., Yabe I., Matsushima M., Durr A., Brice A., Takashima H., Kikuchi A., Aoki M., et al. // *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2015. V. 2. P. 417–426.
- Sklerov M., Kang U.J., Liang C., Clark L., Marder K., Pauciulo M., Nichols W.C., Chung W.K., Honig L.S., Cortes E., et al. // *Mov. Disord. Clin. Pract.* 2017. V. 4. P. 574–581.
- Gan-Or Z., Mirelman A., Postuma R.B., Arnulf I., Bar-Shira A., Dauvilliers Y., Desautels A., Gagnon J.F., Leblond C.S., Frauscher B., et al. // *Ann. Clin. Transl. Neurol.* 2015. V. 2. P. 941–945.
- Gamez-Valero A., Iranzo A., Serradell M., Vilas D., Santamaria J., Gaig C., Alvarez R., Ariza A., Tolosa E., Beyer K. // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2018. V. 50. P. 94–98.
- Barber T.R., Lawton M., Rolinski M., Evetts S., Baig F., Ruffmann C., Gornall A., Klein J.C., Lo C., Dennis G., et al. // *Sleep.* 2017. V. 40. P. zsx071.
- Mehta A. // *Eur. J. Intern. Med.* 2006. V. 17 Suppl. P. S2–5.
- Hassan S., Lopez G., Stubblefield B.K., Tayebi N., Sidransky E. // *Mol. Genet. Metab.* 2018. V. 125. P. 1–3.
- Hruska K.S., LaMarca M.E., Scott C.R., Sidransky E. // *Hum. Mutat.* 2008. V. 29. P. 567–583.
- Do J., McKinney C., Sharma P., Sidransky E. // *Mol. Neurodegener.* 2019. V. 14. P. 36.
- Mignot C., Gelot A., Bessieres B., Daffos F., Voyer M., Menez F., Fallet Bianco C., Odent S., Le Duff D., Loget P., et al. // *Am. J. Med. Genet. A.* 2003. V. 120a. P. 338–344.
- Wei M., Han A., Wei L., Ma L. // *Front. Pediatr.* 2019. V. 7. P. 201.
- Montfort M., Chabas A., Vilageliu L., Grinberg D. // *Hum. Mutat.* 2004. V. 23. P. 567–575.
- Horowitz M., Pasmanik-Chor M., Ron I., Kolodny E.H. // *Mol. Genet. Metab.* 2011. V. 104. P. 35–38.
- Alcalay R.N., Levy O.A., Waters C.C., Fahn S., Ford B., Kuo S.H., Mazzoni P., Pauciulo M.W., Nichols W.C., Gan-Or Z., et al. // *Brain.* 2015. V. 138. P. 2648–2658.
- Duran R., Mencacci N.E., Angeli A.V., Shoai M., Deas E., Houlden H., Mehta A., Hughes D., Cox T.M., Deegan P., et al. // *Mov. Disord.* 2013. V. 28. P. 232–236.
- Walker J.M., Lwin A., Tayebi N., LaMarca M.E., Orvisky E., Sidransky E. // *Clin. Genet.* 2003. V. 63. P. 237–238.
- Stirnemann J., Belmatoug N., Camou F., Serratrice C., Froissart R., Caillaud C., Levade T., Astudillo L., Serratrice J., Brassier A., et al. // *Int. J. Mol. Sci.* 2017. V. 18. P. 441.
- Miller J.D., McCluer R., Kanfer J.N. // *Ann. Intern. Med.* 1973. V. 78. P. 883–887.
- Neil J.F., Glew R.H., Peters S.P. // *Arch. Neurol.* 1979. V. 36. P. 95–99.
- Soffer D., Yamanaka T., Wenger D.A., Suzuki K., Suzuki K. // *Acta Neuropathol.* 1980. V. 49. P. 1–6.

39. McKeran R.O., Bradbury P., Taylor D., Stern G. // *J. Neurol. Neurosurg. Psychiatry*. 1985. V. 48. P. 172–175.
40. Lwin A., Orvisky E., Goker-Alpan O., LaMarca M.E., Sidransky E. // *Mol. Gene. Metab*. 2004. V. 81. P. 70–73.
41. Bras J., Paisan-Ruiz C., Guerreiro R., Ribeiro M.H., Morgado A., Januario C., Sidransky E., Oliveira C., Singleton A. // *Neurobiol. Aging*. 2009. V. 30. P. 1515–1517.
42. Neumann J., Bras J., Deas E., O'Sullivan S.S., Parkkinen L., Lachmann R.H., Li A., Holton J., Guerreiro R., Paudel R., et al. // *Brain*. 2009. V. 132. P. 1783–1794.
43. Ran C., Brodin L., Forsgren L., Westerlund M., Ramezani M., Gellhaar S., Xiang F., Fardell C., Nissbrandt H., Soderkvist P., et al. // *Neurobiol. Aging*. 2016. V. 4. P. 212.e215–212.e211.
44. Gan-Or Z., Giladi N., Rozovski U., Shifrin C., Rosner S., Gurevich T., Bar-Shira A., Orr-Urtreger A. // *Neurology*. 2008. V. 70. P. 2277–2283.
45. Huang Y., Deng L., Zhong Y., Yi M. // *Parkinsons Dis*. 2018. V. 2018. P. 1048084.
46. Mallett V., Ross J.P., Alcalay R.N., Ambalavanan A., Sidransky E., Dion P.A., Rouleau G.A., Gan-Or Z. // *Neurol. Genet*. 2016. V. 2. P. e104.
47. Thaler A., Bregman N., Gurevich T., Shiner T., Dror Y., Zmira O., Gan-Or Z., Bar-Shira A., Gana-Weisz M., Orr-Urtreger A., et al. // *Parkinsonism Relat. Disord*. 2018. V. 55. P. 45–49.
48. Blauwendraat C., Heilbron K., Vallerga C.L., Bandres-Ciga S., von Coelln R., Pihlstrom L., Simon-Sanchez J., Schulte C., Sharma M., Krohn L., et al. // *Mov. Disord*. 2019. V. 34. P. 866–875.
49. Alcalay R.N., Caccappolo E., Mejia-Santana H., Tang M., Rosado L., Orbe Reilly M., Ruiz D., Ross B., Verbitsky M., Kiselev S., et al. // *Neurology*. 2012. V. 78. P. 1434–1440.
50. Cilia R., Tunesi S., Marotta G., Cereda E., Siri C., Tesei S., Zecchinelli A.L., Canesi M., Mariani C.B., Meucci N., et al. // *Ann. Neurol*. 2016. V. 80. P. 662–673.
51. Liu G., Boot B., Locascio J.J., Jansen I.E., Winder-Rhodes S., Eberly S., Elbaz A., Brice A., Ravina B., van Hilten J.J., et al. // *Ann. Neurol*. 2016. V. 80. P. 674–685.
52. Iwaki H., Blauwendraat C., Leonard H.L., Liu G., Maple-Grodem J., Corvol J.C., Pihlstrom L., van Nimwegen M., Hutten S.J., Nguyen K.H., et al. // *Neurol. Genet*. 2019. V. 5. P. e348.
53. Creese B., Bell E., Johar I., Francis P., Ballard C., Aarsland D. // *Am. J. Med. Genet. B Neuropsychiatr. Genet*. 2018. V. 177. P. 232–241.
54. Brockmann K., Srujies K., Pflederer S., Hauser A.K., Schulte C., Maetzer W., Gasser T., Berg D. // *Mov. Disord*. 2015. V. 30. P. 407–411.
55. Liu G., Locascio J.J., Corvol J.C., Boot B., Liao Z., Page K., Franco D., Burke K., Jansen I.E., Trisini-Lipsanopoulos A., et al. // *Lancet Neurol*. 2017. V. 16. P. 620–629.
56. Senkevich K.A., Miliukhina I.V., Beletskaya M.V., Gracheva E.V., Kudrevatykh A.V., Nikolaev M.A., Emelyanov A.K., Kopytova A.E., Timofeeva A.A., Yakimovskii A.F., et al. // *Zh. Nevrol. Psikhiatr. Im. S. S. Korsakova*. 2017. V. 117. P. 81–86.
57. Thaler A., Gurevich T., Bar Shira A., Gana Weisz M., Ash E., Shiner T., Orr-Urtreger A., Giladi N., Mirelman A. // *Parkinsonism Relat. Disord*. 2017. V. 36. P. 47–51.
58. Davis M.Y., Johnson C.O., Leverenz J.B., Weintraub D., Trojanowski J.Q., Chen-Plotkin A., van Deerlin V.M., Quinn J.F., Chung K.A., Peterson-Hiller A.L., et al. // *JAMA Neurol*. 2016. V. 73. P. 1217–1224.
59. Yap T.L., Jiang Z., Heinrich F., Gruschus J.M., Pfefferkorn C.M., Barros M., Curtis J.E., Sidransky E., Lee J.C. // *J. Biol. Chem*. 2015. V. 290. P. 744–754.
60. Dandana A., Ben Khelifa S., Chahed H., Miled A., Ferchichi S. // *Pathobiology*. 2016. V. 83. P. 13–23.
61. Reczek D., Schwake M., Schroder J., Hughes H., Blanz J., Jin X., Brondyk W., van Patten S., Edmunds T., Saftig P. // *Cell*. 2007. V. 131. P. 770–783.
62. Rothaug M., Zunke F., Mazzulli J.R., Schweizer M., Altmeppen H., Lullmann-Rauch R., Kallemeijn W.W., Gaspar P., Aerts J.M., Glatzel M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. P. 15573–15578.
63. Jian J., Tian Q.Y., Hettinghouse A., Zhao S., Liu H., Wei J., Grunig G., Zhang W., Setchell K.D.R., Sun Y., et al. // *EBio-Medicine*. 2016. V. 13. P. 212–224.
64. Valdez C., Ysselstein D., Young T.J., Zheng J., Krainc D. // *Hum. Mol. Genet*. 2019. V. 29. P. 716–726.
65. Zhou X., Paushter D.H., Pagan M.D., Kim D., Nunez Santos M., Lieberman R.L., Overkleeft H.S., Sun Y., Smolka M.B., Hu F. // *PLoS One*. 2019. V. 14. P. e0212382.
66. Hopfner F., Schulte E.C., Mollenhauer B., Bereznai B., Knauf F., Lichtner P., Zimprich A., Haubenberger D., Pirker W., Brucke T., et al. // *Mov. Disord*. 2013. V. 28. P. 538–540.
67. Alcalay R.N., Levy O.A., Wolf P., Oliva P., Zhang X.K., Waters C.H., Fahn S., Kang U., Liang C., Ford B., et al. // *NPJ Parkinsons Dis*. 2016. V. 2. P. 16004.
68. Nalls M.A., Blauwendraat C., Vallerga C.L., Heilbron K., Bandres-Ciga S., Chang D., Tan M., Kia D.A., Noyce A.J., Xue A., et al. // *Lancet Neurol*. 2019. V. 18. P. 1091–1102.
69. Tamargo R.J., Velayati A., Goldin E., Sidransky E. // *Mol. Genet. Metab*. 2012. V. 106. P. 257–263.
70. Sun Y., Qi X., Grabowski G.A. // *J. Biol. Chem*. 2003. V. 278. P. 31918–31923.
71. Kang L., Zhan X., Ye J., Han L., Qiu W., Gu X., Zhang H. // *Blood Cells Mol. Dis*. 2018. V. 68. P. 60–65.
72. Ouled Amar Bencheikh B., Leveille E., Ruskey J.A., Spiegelman D., Liong C., Fon E.A., Rouleau G.A., Dauvilliers Y., Dupre N., Alcalay R.N., et al. // *Neurobiol. Aging*. 2018. V. 72. P. 187.e181–187.e183.
73. Yap T.L., Velayati A., Sidransky E., Lee J.C. // *Mol. Genet. Metabolism*. 2013. V. 108. P. 56–64.
74. Yap T.L., Gruschus J.M., Velayati A., Westbroek W., Goldin E., Moaven N., Sidransky E., Lee J.C. // *J. Biol. Chem*. 2011. V. 286. P. 28080–28088.
75. Mazzulli J.R., Xu Y.H., Sun Y., Knight A.L., McLean P.J., Caldwell G.A., Sidransky E., Grabowski G.A., Krainc D. // *Cell*. 2011. V. 146. P. 37–52.
76. Mazzulli J.R., Zunke F., Tsunemi T., Toker N.J., Jeon S., Burbulla L.F., Patnaik S., Sidransky E., Marugan J.J., Sue C.M., et al. // *J. Neurosci*. 2016. V. 36. P. 7693–7706.
77. Galvagnion C. // *J. Parkinsons Dis*. 2017. V. 7. P. 433–450.
78. Galvagnion C., Brown J.W.P., Ouberaï M.M., Flagmeier P., Vendruscolo M., Buell A.K., Sparr E., Dobson C.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. P. 7065–7070.
79. Taguchi Y.V., Liu J., Ruan J., Pacheco J., Zhang X., Abbasi J., Keutzer J., Mistry P.K., Chandra S.S. // *J. Neurosci*. 2017. V. 37. P. 9617–9631.
80. Suzuki M., Sango K., Wada K., Nagai Y. // *Neurochem. Internat*. 2018. V. 119. P. 97–106.
81. Zunke F., Moise A.C., Belur N.R., Gelyana E., Stojkowska I., Dzaferbegovic H., Toker N.J., Jeon S., Fredriksen K., Mazzulli J.R. // *Neuron*. 2018. V. 97. P. 92–107.e110.
82. Sardi S.P., Viel C., Clarke J., Treleaven C.M., Richards A.M., Park H., Olszewski M.A., Dodge J.C., Marshall J., Makino E., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. P. 2699–2704.
83. Gündner A.L., Duran-Pacheco G., Zimmermann S., Ruf I., Moors T., Baumann K., Jagasia R., van de Berg W.D., Kremer T. // *Neurobiol. Disease*. 2019. V. 121. P. 205–213.
84. Pchelina S., Emelyanov A., Baydakova G., Andoskin P., Senkevich K., Nikolaev M., Miliukhina I., Yakimovskii A.,

- Timofeeva A., Fedotova E., et al. // *Neurosci. Lett.* 2017. V. 636. P. 70–76.
85. Guedes L.C., Chan R.B., Gomes M.A., Conceicao V.A., Machado R.B., Soares T., Xu Y., Gaspar P., Carrico J.A., Alcalay R.N., et al. // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2017. V. 44. P. 58–65.
86. Pchelina S., Baydakova G., Nikolaev M., Senkevich K., Emelyanov A., Kopytova A., Miliukhina I., Yakimovskii A., Timofeeva A., Berkovich O., et al. // *Mov. Disord.* 2018. V. 33. P. 1325–1330.
87. Kim H.J., Jeon B., Song J., Lee W.W., Park H., Shin C.W. // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2016. V. 23. P. 99–101.
88. Ortega R.A., Torres P.A., Swan M., Nichols W., Boschung S., Raymond D., Barrett M.J., Johannes B.A., Severt L., Shanker V., et al. // *J. Clin. Neurosci.* 2016. V. 28. P. 185–186.
89. Gegg M.E., Burke D., Heales S.J., Cooper J.M., Hardy J., Wood N.W., Schapira A.H. // *Ann. Neurol.* 2012. V. 72. P. 455–463.
90. Murphy K.E., Gysbers A.M., Abbott S.K., Tayebi N., Kim W.S., Sidransky E., Cooper A., Garner B., Halliday G.M. // *Brain.* 2014. V. 137. P. 834–848.
91. Parnetti L., Paciotti S., Eusebi P., Dardis A., Zampieri S., Chiasserini D., Tasegian A., Tambasco N., Bembi B., Calabresi P., et al. // *Mov. Disord.* 2017. V. 32. P. 1423–1431.
92. Rocha E.M., Smith G.A., Park E., Cao H., Brown E., Hallett P., Isacson O. // *Ann. Clin. Translational Neurol.* 2015. V. 2. P. 433–438.
93. Pchelina S.N., Nuzhnyi E.P., Emelyanov A.K., Boukina T.M., Usenko T.S., Nikolaev M.A., Salogub G.N., Yakimovskii A.F., Zakharova E.Y. // *Neurosci. Lett.* 2014. V. 583. P. 188–193.
94. Nuzhnyi E., Emelyanov A., Boukina T., Usenko T., Yakimovskii A., Zakharova E., Pchelina S. // *Mov. Disord.* 2015. V. 30. P. 989–991.
95. Senkevich K.A., Miliukhina I.V., Pchelina S.N. // *Zh. Nevrol. Psikiatr. Im S. S. Korsakova.* 2018. V. 118. P. 109–117.
96. Koros C., Stamelou M., Simitsi A., Beratis I., Papadimitriou D., Papagiannakis N., Fragkiadaki S., Kontaxopoulou D., Papageorgiou S.G., Stefanis L. // *Neurology.* 2018. V. 90. P. e864–e869.
97. Piredda R., Desmarais P., Masellis M., Gasca-Salas C. // *Eur. J. Neurol.* 2019. V. 27. P. 229–234.
98. Chiasserini D., Paciotti S., Eusebi P., Persichetti E., Tasegian A., Kurzawa-Akanbi M., Chinnery P.F., Morris C.M., Calabresi P., Parnetti L., et al. // *Mol. Neurodegeneration.* 2015. V. 10. P. 15.
99. Moors T.E., Paciotti S., Ingrassia A., Quadri M., Breedveld G., Tasegian A., Chiasserini D., Eusebi P., Duran-Pacheco G., Kremer T., et al. // *Mol. Neurobiol.* 2019. V. 56. P. 1344–1355.
100. Gegg M.E., Sweet L., Wang B.H., Shihabuddin L.S., Sardi S.P., Schapira A.H. // *Mov. Disord.* 2015. V. 30. P. 1085–1089.
101. Fernandes H.J., Hartfield E.M., Christian H.C., Emmanouilidou E., Zheng Y., Booth H., Bogetofte H., Lang C., Ryan B.J., Sardi S.P., et al. // *Stem Cell Repts.* 2016. V. 6. P. 342–356.
102. Rocha E.M., De Miranda B., Sanders L.H. // *Neurobiol. Dis.* 2018. V. 109. P. 249–257.
103. Grozdanov V., Bousset L., Hoffmeister M., Bliederhaeuser C., Meier C., Madiona K., Pieri L., Kiechle M., McLean P.J., Kassubek J., et al. // *Ann. Neurol.* 2019. V. 86. P. 593–606.
104. Lindestam Arlehamn C.S., Dhanwani R., Pham J., Kuan R., Frazier A., Rezende Dutra J., Phillips E., Mallal S., Roederer M., Marder K.S., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. P. 1875.
105. Chahine L.M., Qiang J., Ashbridge E., Minger J., Yearout D., Horn S., Colcher A., Hurtig H.I., Lee V.M., van Deerlin V.M., et al. // *JAMA Neurol.* 2013. V. 70. P. 852–858.
106. Miliukhina I.V., Usenko T.S., Senkevich K.A., Nikolaev M.A., Timofeeva A.A., Agapova E.A., Semenov A.V., Lubimova N.E., Totolyan A.A., Pchelina S.N. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2020. V. 168. P. 423–426.
107. Birkmayer W., Hornykiewicz O. // *Wien. Klin. Wochenschr.* 1961. V. 73. P. 787–788.
108. Bennett L.L., Mohan D. // *Ann. Pharmacother.* 2013. V. 47. P. 1182–1193.
109. Revel-Vilk S., Szer J., Mehta A., Zimran A. // *Br. J. Haematol.* 2018. V. 182. P. 467–480.
110. Shayman J.A. // *Expert. Rev. Endocrinol. Metab.* 2013. V. 8. P. 491–504.
111. Kuter D.J., Mehta A., Hollak C.E., Giraldo P., Hughes D., Belmatoug N., Brand M., Muller A., Schaaf B., Giorgino R., et al. // *Blood Cells Mol. Dis.* 2013. V. 51. P. 116–124.
112. Schiffmann R., Fitzgibbon E.J., Harris C., DeVile C., Davies E.H., Abel L., van Schaik I.N., Benko W., Timmons M., Ries M., et al. // *Ann. Neurol.* 2008. V. 64. P. 514–522.
113. Marshall J., Sun Y., Bangari D.S., Budman E., Park H., Nietupski J.B., Allaire A., Cromwell M.A., Wang B., Grabowski G.A., et al. // *Mol. Ther.* 2016. V. 24. P. 1019–1029.
114. Richter F., Fleming S.M., Watson M., Lemesre V., Pellegrino L., Ranes B., Zhu C., Mortazavi F., Mulligan C.K., Sioshansi P.C., et al. // *Neurotherapeutics.* 2014. V. 11. P. 840–856.
115. Maegawa G.H., Tropak M.B., Buttner J.D., Rigat B.A., Fuller M., Pandit D., Tang L., Kornhaber G.J., Hamuro Y., Clarke J.T., et al. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. P. 23502–23516.
116. Sawkar A.R., Cheng W.C., Beutler E., Wong C.H., Balch W.E., Kelly J.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. P. 15428–15433.
117. Bendikov-Bar I., Ron I., Filocamo M., Horowitz M. // *Blood Cells Mol. Dis.* 2011. V. 46. P. 4–10.
118. Bendikov-Bar I., Maor G., Filocamo M., Horowitz M. // *Blood Cells Mol. Dis.* 2013. V. 50. P. 141–145.
119. Mullin S., Smith L., Lee K., D'Souza G., Woodgate P., Elflein J., Hällqvist J., Toffoli M., Streeter A., Hosking J., et al. // *JAMA Neurol.* 2020. V. 77. P. 427–434.
120. Luan Z., Li L., Higaki K., Nanba E., Suzuki Y., Ohno K. // *Brain Dev.* 2013. V. 35. P. 317–322.
121. Sanders A., Hemmelgarn H., Melrose H.L., Hein L., Fuller M., Clarke L.A. // *Blood Cells Mol. Dis.* 2013. V. 51. P. 109–115.
122. Migdalska-Richards A., Ko W.K.D., Li Q., Bezard E., Schapira A.H.V. // *Synapse.* 2017. V. 71. P. e21967.
123. Magalhaes J., Gegg M.E., Migdalska-Richards A., Schapira A.H. // *Sci. Repts.* 2018. V. 8. P. 1385.
124. Ivanova M.M., Changsila E., Turgut A., Goker-Alpan O. // *Am. J. Translat. Res.* 2018. V. 10. P. 3750.
125. Kopytova A.E., Rychkov G.N., Nikolaev M.A., Baydakova G.V., Cheblokov A.A., Senkevich K.A., Bogdanova D.A., Bolshakova O.I., Miliukhina I.V., Bezrukikh V.A. et al. // *Parkinsonism Relat. Disord.* 2021. V. 84. P. 112–121.
126. Welsh N.J., Gewinner C.A., Mistry K., Koglin M., Cooke J., Butler M., Powney B., Roberts M., Staddon J.M., Schapira A.H.V. // *Haematologica.* 2019. V. 105. P. e206–e209.
127. Migdalska-Richards A., Daly L., Bezard E., Schapira A.H. // *Ann. Neurol.* 2016. V. 80. P. 766–775.
128. Silveira C.R.A., MacKinley J., Coleman K., Li Z., Finger E., Bartha R., Morrow S.A., Wells J., Borrie M., Tirona R.G., et al. // *BMC Neurol.* 2019. V. 19. P. 20.
129. Steet R.A., Chung S., Wustman B., Powe A., Do H., Kornfeld S.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2006. V. 103. P. 13813–13818.
130. Sun Y., Liou B., Xu Y.H., Quinn B., Zhang W., Hamler R., Setchell K.D., Grabowski G.A. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. P. 4275–4287.
131. Sanchez-Martinez A., Beavan M., Gegg M.E., Chau K.Y., Whitworth A.J., Schapira A.H. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 31380.
132. Cheblokov A.A., Rychkov G.N. // *J. Physics: Conf. Ser.* 2019. V. 1410. P. 012065.

УДК 578.9

Патогенез, диагностика и лечение гемостатических нарушений у пациентов с COVID-19

А. Ф. Халирахманов^{1,2}, К. Ф. Идрисова², Р. Ф. Гайфуллина^{1,2}, С. В. Зинченко²,
Р. И. Литвинов^{2,4}, А. З. Шарафеев³, А. П. Киясов², А. А. Ризванов^{2*}

¹Медико-санитарная часть ФГБОУ ВО «Казанский (Приволжский) федеральный университет», Казань, 420043 Россия

²Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

³Республиканская клиническая больница им. Ш.Ш. Эпендиева, Грозный, 364030 Россия

⁴Университет Пенсильвании, Филадельфия, Пенсильвания, 19104-6058 США

*E-mail: rizvanov@gmail.com

Поступила в редакцию 31.08.2020

Принята к печати 12.11.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11182

РЕФЕРАТ Новая коронавирусная инфекция, получившая название COVID-19, была впервые выявлена в декабре 2019 года в Ухане, Китай, и стала причиной значительной заболеваемости и смертности во многих странах, причем на момент написания этой статьи число инфицированных и умерших продолжает увеличиваться. Большинство пациентов с тяжелой формой заболевания страдают от пневмонии и дыхательной недостаточности, однако во многих случаях по мере развития болезнь приобретает генерализованный характер с прогрессирующим поражением многих органов и функциональных систем. Одним из наиболее опасных и прогностически неблагоприятных осложнений COVID-19 является развитие коагулопатии по типу декомпенсированной гиперкоагуляции, вплоть до диссеминированного внутрисосудистого свертывания крови. В подавляющем большинстве случаев наблюдаются локальные и диффузные макро- и микро-тромбозы, которые служат причиной полиорганной недостаточности и тромбоэмболических осложнений. Причины и патогенетические механизмы коагулопатии при COVID-19 ясны не до конца, но они связаны с системным воспалением, включая так называемый «цитокиновый шторм». За сравнительно короткое время распространения пандемии установлены лабораторные признаки угрожающих и текущих нарушений гемостаза, разрабатываются меры специфической профилактики и коррекции тромботических осложнений. В данном обзоре обобщены сведения о причинах коагулопатий, осложняющих COVID-19, а также о методах их ранней диагностики, профилактики и лечения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА коронавирус, коагулопатия, нарушения гемостаза, тромбоз, тромбоцитопения, антикоагулянты, цитокиновый шторм, D-димер, COVID-19, SARS-CoV-2.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ COVID-19 – (от англ. Corona Virus Disease 2019) – ранее коронавирусная инфекция 2019-nCoV; SARS-CoV-2 – (от англ. Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2) – тяжелый острый респираторный синдром; ДВС – диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови; IL – интерлейкин; G-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; MCP-1 – моноцитарный хемотаксический фактор-1; MIP-1A – хемокин; TNF-α – фактор некроза опухоли-α; IP10 – хемокин; АЧТВ – активированное частичное тромбопластиновое время; АТ – антитромбин; ПДФ – продукты деградации фибриногена/фибрина; ПТВ – протромбиновое время; МНО – международное нормализованное отношение; ТВ – тромбиновое время; НМГ – низкомолекулярный гепарин.

ВВЕДЕНИЕ

Коронавирусы (CoVs) – крупные, плеоморфные, несегментированные РНК-вирусы, широко распространены у млекопитающих, особенно у людей [1–3]. В настоящий момент обнаружено шесть типов коронавируса человека (HCoV-229E, -OC43, -NL63, -HKU1, MERS-CoV, SARS-CoV), которые могут вызывать пораже-

ние верхних дыхательных путей различной степени тяжести, включая формирование тяжелого острого респираторного синдрома (SARS) [3]. В конце 2019 года из эпителиальных клеток дыхательных путей человека был выделен новый коронавирус, который назвали коронавирусом, ассоциированным с тяжелым острым респираторным синдромом 2 (SARS-CoV-2) [4].

С того момента, когда новый тип пневмонии, определяемый как коронавирусная болезнь 2019 (COVID-19), начал широко распространяться в Китае и других странах, число пациентов во всем мире неуклонно возрастает, включая больных с тяжелой формой пневмонии [2]. COVID-19 может привести к критическому состоянию с острым респираторным дистресс-синдромом и полиорганной недостаточностью, причиной которых во многих случаях является системная коагулопатия [5]. Известно, что у пациентов с вирусной инфекцией может развиваться сепсис, который в 30–50% случаев вызывает диссеминированное внутрисосудистое свертывание крови (ДВС) [6]. ДВС-синдром – это приобретенный клиничко-биологический синдром, который характеризуется системной внутрисосудистой активацией свертывания крови, индуцируемой разными причинами, и закупоркой микроциркуляторного русла, вызывающего дисфункцию органов [7]. Клинические варианты ДВС-синдрома разнообразны, а его патогенез очень сложен и не до конца ясен. В частности, при ДВС-синдроме, осложняющем сепсис, происходит активация моноцитов и эндотелиальных клеток, что сопровождается выделением цитокинов, экспрессией тканевого фактора и секрецией фактора Виллебранда. Массивное тромбообразование приводит к расходованию фибриногена, антитромбина III и других факторов свертывания крови, а также к тромбоцитопении, что в совокупности обозначается термином «коагулопатия потребления» и может проявляться в виде геморрагического диатеза. На более поздних стадиях ДВС-синдрома активируется фибринолиз, направленный на реканализацию сосудов, который может усугубить кровоточивость. К типичным лабораторным признакам ДВС-синдрома относятся гипофибриногемия, тромбоцитопения, дефицит антитромбина III и пролонгированные клоттинговые тесты в сочетании с клинической картиной гемоциркуляторных расстройств. Характерно также повышение уровней D-димера и продуктов деградации фибрина (ПДФ) – маркеров отложения фибрина и вторичного фибринолиза [8]. Ряд исследований указывает на то, что ДВС-синдром характерен для COVID-19, особенно часто он наблюдается в случае летальных исходов, однако при сепсисе, в отличие от ДВС, геморрагический компонент отсутствует [8].

Между гемостатическими нарушениями и системным воспалительным ответом на вирусную инфекцию существует тесная взаимосвязь [9]. Клинические и лабораторные признаки тромботических состояний и их тяжесть прямо коррелируют с выработкой воспалительных цитокинов, таких, как IL-2, IL-6, IL-7, IL-10, G-CSF, IP10, MCP-1, MIP-1A и TNF- α , хотя причины и механизмы развития «цитокинового шторма» ни при COVID-19, ни при других вирусных

инфекциях понятны не до конца [10]. Связь между воспалением и тромбозом и способность этих двух процессов усугублять друг друга описаны при многих патологических состояниях [11, 12]. Физиологические про- и антикоагулянты, как и тромбоциты, обладают провоспалительными свойствами, не зависящими от их гемостатических функций [13–17]. Взаимная обусловленность тромботических осложнений и системной воспалительной реакции является одним из основных звеньев патогенеза COVID-19 [18–20].

В настоящем обзоре приведены данные об изменениях лабораторных показателей гемостаза у пациентов с COVID-19. Согласно опубликованным данным, рутинные лабораторные тесты позволяют выявить угрожающие и текущие нарушения гемостаза и выработать обоснованную и своевременную тактику профилактики и лечения нарушений гемостаза у пациентов с COVID-19. Все опубликованные на сегодняшний день данные по коагулопатиям при COVID-19 получены на сравнительно небольших группах пациентов. Результаты исследований, полученные в разгар пандемии, имеют предварительный характер и требуют тщательного ретроспективного анализа.

COVID-19 И НАРУШЕНИЯ ГЕМОКОАГУЛЯЦИИ

В исследовании Guan и соавт., которые представили данные о 1099 пациентах с лабораторно подтвержденной инфекцией COVID-19, показано, что уровень D-димера в крови пациентов с COVID-19 значительно превышает норму и сочетается с высоким уровнем C-реактивного белка. В тяжелых случаях отклонения лабораторных показателей (лейкопения, лимфопения, тромбоцитопения) были более выраженными, чем при легком течении заболевания [20].

Исследователи из Китайской клинической больницы обследовали 94 пациента с диагнозом COVID-19 и 40 человек контрольной группы в соответствии с «протоколом диагностики пневмонии при новой коронавирусной инфекции», в который входит проведение коагулограммы [21]. Коагулограмма включала следующие лабораторные показатели: активированное частичное тромбопластиновое время (АЧТВ), антитромбин (АТ), продукты деградации фибриногена/фибрина (ПДФ), фибриноген, протромбиновое время (ПТВ), МНО (международное нормализованное отношение), тромбиновое время (ТВ), D-димер. Затем пациентов с COVID-19 разделили на три группы: с обычным, тяжелым или критическим клиническим течением болезни. В результате существенных различий в значениях АЧТВ, ПТВ и МНО между тремя подгруппами и контрольной группой не было обнаружено. Значение антитромбина во всех трех группах пациентов было ниже, чем в контрольной группе, однако в подгруппах с COVID-19 разница

отсутствовала. Что касается D-димера, то у пациентов с тяжелым течением болезни его содержание в крови было значительно выше, чем в контрольной группе [21]. Анализ коагулограммы 183 пациентов с COVID-19 показал, что у пациентов с тяжелым течением заболевания, закончившимся летальным исходом, значения D-димера были в среднем почти в 3.5 раза выше нормы. Уровень ПДФ, значения ПТВ и АЧТВ также были выше, чем у выживших пациентов. Эти результаты позволили заключить, что параметры гемокоагуляции у умерших пациентов были сильно изменены по типу ДВС-синдрома [8]. Таким образом, чрезмерная активация свертывания крови приводит к развитию ДВС-синдрома, который является неблагоприятным прогностическим фактором при COVID-19 [22].

D-димер – продукт фибринолитического разрушения фибрина, прощитого фактором XIIIa, поэтому повышение его концентрации в крови используется в клинической лабораторной диагностике микро- и макротромбозов [23]. Обследование 191 пациента с COVID-19 показало, что значения D-димера были в среднем почти в 9 раз выше у пациентов с летальным исходом заболевания [24]. Проведен ретроспективный анализ клинических данных, лабораторных параметров и результатов компьютерной томографии грудной клетки 248 пациентов с COVID-19. Повышение уровня D-димера (≥ 0.5 мг/л) наблюдалось у 75% пациентов. У госпитализированных пациентов уровень D-димера значительно возрастал с увеличением тяжести течения COVID-19. У пациентов с умеренной тяжестью заболевания медианный уровень D-димера был примерно в 7 раз выше нормы и повышался до критических значений у тяжелых пациентов. Другие исследователи также выявили изменения в гемостазе, в частности, повышение уровня D-димера в крови пациентов с COVID-19 [25, 26]. Более высокие уровни D-димера определены у лиц с сопутствующими критическими заболеваниями (хроническая сердечная недостаточность, заболевания дыхательной системы, злокачественные новообразования и др.), следовательно, уровень D-димера может использоваться в качестве прогностического маркера летальности при COVID-19 [27].

Представлены клинические и лабораторные данные 41 пациента, госпитализированных с подтвержденным диагнозом COVID-19. Отмечены более высокие значения ПТВ и уровень D-димера у пациентов, нуждающихся в переводе в отделение интенсивной терапии [28].

Zhang и соавт. описали три случая COVID-19 с тяжелым течением пневмонии и коагулопатией. Все больные имели в анамнезе гипертоническую болезнь, двое – ишемическую болезнь сердца, один – острое

нарушение мозгового кровообращения. При осмотре наблюдались признаки ишемии в нижних конечностях с обеих сторон. Из лабораторных тестов отмечено повышение ПТВ, АЧТВ, уровня фибриногена и D-димера, лейкоцитоз и тромбоцитопения [29]. Присутствие в крови антифосфолипидных антител указывает на развитие антифосфолипидного синдрома, однако эти антитела могут временно вырабатываться у пациентов с различными инфекциями [30]. Присутствие этих антител может приводить к тромботическим осложнениям, которые у пациентов, находящихся в критическом состоянии, трудно отличить от других разновидностей диффузного микротромбоза, таких, как ДВС, гепарин-индуцированная тромбоцитопения и тромботическая микроангиопатия.

Таким образом, при COVID-19 наблюдаются выраженные изменения лабораторных показателей гемостаза; повышенный уровень D-димера (≥ 1 мг/мл) считается неблагоприятным прогностическим фактором [24, 31–33].

COVID-19 И ТРОМБОЦИТОПЕНИЯ

Метаанализ, проведенный Lipri и соавт., выявил снижение уровня тромбоцитов у пациентов с тяжелым течением COVID-19 (среднее значение 31×10^9 /л при 95% доверительном интервале от 29×10^9 до 35×10^9 /л), причем тромбоцитопения связана с пятикратным увеличением риска развития тяжелой формы заболевания [34]. Тромбоцитопения часто встречается у пациентов с критическим течением болезни и, как правило, сочетается с полиорганной патологией и коагулопатией, развивающейся по типу ДВС-синдрома [35]. Тромбоцитопения, которая считается фактором риска летального исхода, выявлена у 55% пациентов с тяжелым острым респираторным синдромом [36].

Тромбоцитопения при COVID-19, помимо распада тромбоцитов на тромбообразование, связана со способностью коронавируса поражать непосредственно элементы костного мозга, что приводит к аномальному гемопоэзу или запускает аутоиммунный ответ на гемопоэтические и стромальные клетки костного мозга [36, 37]. Уровень тромбоцитов при COVID-19 является простым и легкодоступным биомаркером, связанным с клинической картиной заболевания и риском летального исхода [38, 39]. Важно отметить, что низкое содержание тромбоцитов в крови коррелирует с высокими показателями тяжести заболевания и полиорганной дисфункции, такими, как новая упрощенная оценка острой физиологии (англ. SAPS II) II, а также как оценка острых физиологических расстройств и хронических нарушений состояния (англ. APACHE II) II [39].

ЦИТОКИНОВЫЙ ШТОРМ ПРИ COVID-19

Все больше данных свидетельствует о развитии цитокинового шторма при тяжелой форме COVID-19 [40] как реакции на системную воспалительную реакцию [9]. Воспаление – неотъемлемая часть эффективного иммунного ответа, без которого невозможна нейтрализация и элиминация инфекционного агента. Массивное образование воспалительных цитокинов сопутствует выраженному воспалению и приводит к высокой проницаемости кровеносных сосудов, полиорганной недостаточности и, возможно, к смерти при особенно высоких концентрациях цитокинов в крови [41]. Термин «цитокиновый шторм» применительно к инфекционным заболеваниям появился в начале 2000 года при изучении цитомегаловирусной инфекции [42], гемофагоцитарного лимфогистиоцитоза, связанного с вирусом Эпштейна–Барр [43], стрептококка группы А [44], вируса гриппа [45], хантавируса [46], вируса натуральной оспы [47] и тяжелого острого респираторного синдрома при инфекции, вызванной коронавирусом (SARS-CoV) [48].

Цитокины представляют собой разнообразную группу небольших белков, которые секретируются клетками с целью межклеточной коммуникации [49]. Сложную сеть цитокинового ответа рассматривают как серию перекрывающихся сетей, каждая из которых имеет свою собственную степень избыточности и альтернативный путь. Эта комбинация перекрытия и избыточности имеет важную роль для определения ключевых этапов реакции цитокинов на инфекцию и определения специфических цитокинов для терапевтического вмешательства.

Проведено немало исследований на людях и экспериментальных моделях, которые убедительно доказывают патогенную роль воспалительных цитокинов/хемокинов, происходящих из воспалительных моноцитов-макрофагов и нейтрофилов. Для характеристики влияния коронавируса на выработку цитокинов в острой фазе заболевания, используя специальные панели, определили уровни цитокинов плазмы (IL-1B, IL-1RA, IL-2, IL-4, IL-5, IL-6, IL-7, IL-8 (известный как CXCL8), IL-9, IL-10, IL-12p70, IL-13, IL-15, IL-17A, эотаксин (известный как CCL11), основной FGF2, G-CSF (CSF3), GM-CSF (CSF2), IFN- γ , IP10 (CXCL10), MCP-1 (CCL2), MIP-1A (CCL3), MIP-1B (CCL4), PDGFB, RANTES (CCL5), TNF- α и VEGFA) [28]. Установлено, что пациенты, находящиеся в реанимации, имели более высокие уровни IL-2, IL-7, IL-10, G-CSF, IP10, MCP-1, MIP-1A и TNF- α в плазме. Это позволяет предположить, что цитокиновый шторм связан с тяжестью заболевания [28]. Следовательно, терапевтические вмешательства, направленные на противовоспалительные цитокины, могут ослабить избыточные воспали-

тельные реакции. Также важно отметить, что высокие титры вируса на ранних и более поздних стадиях инфекции сильно коррелируют с тяжестью заболевания. Таким образом, стратегии, направленные на контроль вирусной нагрузки, а также ослабление воспалительного ответа, очень важны в тактике лечения и ведения пациентов. Поэтому необходимо больше исследований, направленных на выявление специфических сигнальных путей, которые опосредуют воспалительные реакции у пациентов, инфицированных коронавирусом [50].

ДРУГИЕ ГЕМАТОЛОГИЧЕСКИЕ ИЗМЕНЕНИЯ ПРИ COVID-19

Наиболее частые гематологические находки включают лимфоцитопению [51–53], нейтрофилию [54], эозинопению [55], легкую тромбоцитопению [53] и, реже, тромбоцитоз [34]. Количество лейкоцитов может быть нормальным, сниженным [28] или повышенным [24]. Согласно проведенному метаанализу [56], лейкоцитоз, лимфопения и тромбоцитопения связаны с более тяжелым течением заболевания и даже летальным исходом в случае заражения COVID-19. По мнению Terpos и соавт. в первые дни болезни, когда у пациентов проявляются неспецифические симптомы, количество лейкоцитов и абсолютное содержание лимфоцитов остаются нормальными или немного снижаются [57]. Позже, примерно на 7–14 день инфекции, болезнь начинает поражать такие органы с большей экспрессией рецептора SARS-CoV-2, ангиотензинпревращающего фермента 2 (ACE2) [58], как легкие, сердце и желудочно-кишечный тракт. На этой стадии заболевания наблюдаются более выраженные гематологические изменения, в частности значительное снижение количества лимфоцитов. Это более характерно для летального исхода. У выживших пациентов самый низкий уровень лимфоцитов выявлен примерно на 7-й день появления симптомов с последующим выздоровлением [24]. Таким образом, можно допустить, что динамика абсолютного количества лимфоцитов, т.е. их серийный подсчет, может быть предиктором клинического исхода заболевания. Анализ опубликованных данных показал, что из всех гематологических изменений лимфоцитопению можно выделить как один из самых частых признаков летального исхода. По показателям анализа крови можно рассчитать соотношения между его параметрами, интерпретация которых имеет большое клиническое значение. Таким образом, уже сообщалось, что пониженное соотношение количества лимфоцитов/лейкоцитов указывает на тяжелое заболевание и/или летальный исход [59]. Точно так же повышенное соотношение нейтрофилов/лимфоцитов и нейтрофилов/тромбоцитов может указывать на повреждение миокарда и повышенную

смертность [60]. Поэтому важно следить за гематологическими параметрами, чтобы попытаться оценить прогрессирование и прогноз COVID-19.

ПРОФИЛАКТИКА И ЛЕЧЕНИЕ КОАГУЛОПАТИИ COVID-19

Высокая частота тромботических осложнений обусловила интерес к тромбопрофилактике и антикоагулянтной терапии при COVID-19. В качестве патогенетического обоснования лечения используются данные о системной гиперкоагуляции вплоть до массивной тромбинемии и диффузного микротромбоза, сопровождающегося полиорганной недостаточностью. Таким образом, ингибирование образования и/или активности тромбина в крови потенциально может уменьшить риск и распространенность тромбозов и снизить летальность при COVID-19 [23, 37].

Самым распространенным методом профилактики и лечения тромбозов у пациентов с COVID-19 является применение низкомолекулярного гепарина (НМГ) [61]. НМГ следует назначать всем пациентам (включая некритических), которым требуется госпитализация по поводу COVID-19, при отсутствии противопоказаний (активное кровотечение и уровень тромбоцитов менее $25 \times 10^9/\text{л}$). Эффективность профилактической гепаринотерапии показана в исследовании на 449 пациентах с тяжелой формой COVID-19, из которых 99 получали гепарин (в основном НМГ) в профилактических дозах [62]. Хотя различий в 28-дневной смертности среди получавших и не получавших гепарин не было, однако у пациентов с более выраженными нарушениями гемостаза (при значениях индекса сепсис-индуцированной коагулопатии ≥ 4) антикоагулянтная терапия НМГ существенно уменьшала летальность (40 против 64%, $p = 0.029$). Гепаринотерапия снижала летальность у пациентов с повышенным в 6 раз и более уровнем D-димера (33 против 52%, $p = 0.017$) [62]. Кроме того, назначение НМГ уменьшало риск тромбоэмболии легочной артерии у критически больных пациентов.

При определении дозы НМГ следует учитывать возможное влияние других лекарств, которые могут принимать пациенты. Приблизительно 50% пациентов, которые умерли от COVID-19 в Италии, имели несколько сопутствующих заболеваний, таких, как мер-

цательная аритмия или ишемическая болезнь сердца, требующих антикоагулянтного или антиагрегантного лечения. Лечение таких пациентов представляет особенно сложную задачу из-за потенциального взаимодействия гепарина и других препаратов, например, новых оральных антикоагулянтов [63], которые хорошо зарекомендовали себя в профилактике и лечении венозной тромбоэмболии, и эти препараты также могут быть перспективными для снижения тромбообразования у пациентов с COVID-19 [41].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

У пациентов с COVID-19 часто развиваются нарушения гемостаза по типу гиперкоагуляции различной степени выраженности. Характерными лабораторными признаками этих нарушений являются тромбоцитопения, а также повышенные значения концентрации D-димера, фибриногена, удлинение ПТВ и АЧТВ, особенно характерные для пациентов с тяжелой формой COVID-19. Динамическое определение данных параметров гемостаза может отражать трансформацию клинического течения болезни в более тяжелый вариант. Наиболее выраженные изменения гемостаза при COVID-19 имеют неблагоприятное прогностическое значение. С учетом повышенного риска тромбоэмболических осложнений у пациентов с COVID-19 оправдано профилактическое и лечебное применение антикоагулянтов и, прежде всего, низкомолекулярных гепаринов. ●

Финансирование. Работа выполнена за счет средств субсидии, выделенной Казанскому федеральному университету для выполнения государственного задания № 0671-2020-0058 в сфере научной деятельности.

Работа выполнена в рамках Программы стратегического академического лидерства Казанского (Приволжского) федерального университета.

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания каких-либо исследований с участием людей или животных в качестве объектов.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Woo P.C.Y., Huang Y., Lau S.K.P., Yuen K.Y. // *Viruses*. 2010. V. 2. № 8. P. 1804–1820.
2. Cui J., Li F., Shi Z.L. // *Nat. Rev. Microbiol.* 2019. V. 17. № 3. P. 181–192.
3. Nikiforov V.V., Suranova T.G., Chernobrovkina T.Yu., Yankovskaya Y.D., Burova S.V. // *Russ. Arch. Internal Med.* 2020. V. 10. № 2. P. 87–93.
4. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., et al. // *N. Eng. J. Med.* 2020. V. 382. № 8. P. 727–733.
5. Mattiuzzi C., Lippi G. // *Ann. Tansl. Med.* 2020. V. 8. № 3. P. e48.
6. Costello R.A., Nehring S.M. // *Treasure Island, FL: Stat Pearls Publ.* 2020.
7. Taylor F.B., Toh C.H., Hoots K.W., Wada H., Levi M. // *Thromb. Haemostasis*. 2001. V. 86. № 5. P. 1327–1330.
8. Tang N., Li D., Wang X., Sun Z. // *J. Thromb. Haemost.* 2020. V. 18. № 4. P. 844–847.

9. Scharrer I. // *Front. Biosci.* 2018. V. 23. P. 1060–1081.
10. Sarzi-Puttini P., Giorgi V., Sirotti S., Marotto D., Ardizzone S., Rizzardini G., Antinori S., Galli M. // *Clin. Exp. Rheumatol.* 2020. V. 38. № 2. P. 337–342.
11. Iba T., Levy J.H. // *J. Thromb. Haemost.* 2018. V. 16. № 2. P. 231–241.
12. Jackson S.P., Darbousset R., Schoenwaelder S.M. // *Blood.* 2019. V. 133. № 9. P. 906–918.
13. Claushuis T.A., de Stoppelaar S.F., Stroot I., Roelofs J.J., Ottenhoff R., van der Poll T., van 't Veer C. // *J. Thromb. Haemost.* 2017. V. 15. № 4. P. 744–757.
14. Chen J., Li X., Li L., Zhang T., Zhang Q., Wu F., Wang D., Hu H., Tian C., Liao D., Zhao L. // *Cell Res.* 2019. V. 29. № 9. P. 711–724.
15. Burzynski L.C., Humphry M., Pyrrillou K., Wiggins K.A., Chan J.N., Figg N., Kitt L.L., Summers C., Tatham K.C., Martin P.B., et al. // *Immunity.* 2019. V. 50. № 4. P. 1033–1042.
16. Vardon-Bounes F., Ruiz S., Gratacap M.P., Garcia C., Payrastré B., Minville V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 14. P. e3494.
17. Assinger A., Schrottmaier W.C., Salzmann M., Rayes J. // *Front. Immunol.* 2019. V. 10. P. e1687.
18. Delvaeye M., Conway E.M. // *Blood.* 2009. V. 114. № 12. P. 2367–2374.
19. Giannis D., Ziogas I.A., Gianni P. // *J. Clin. Virol.* 2020. V. 127. P. e104362.
20. Guan W.J., Ni Z.Y., Hu Y., Liang W.H., Ou C.Q., He J.X., Liu L., Shan H., Lei C., Hui D.S.C., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 382. № 18. P. 1708–1720.
21. Han H., Yang L., Liu R., Liu F., Wu K.L., Li J., Liu X.H., Zhu C.L. // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2020. V. 58. № 7. P. 1116–1120.
22. Kawano N., Wada H., Uchiyama T., Kawasugi T., Madoiwa S., Takezako N., Suzuki K., Seki Y., Ikezoe T., Hattori T., Okamoto K. // *Thrombosis J.* 2020. V. 18. P. e2.
23. Schutte T., Thijs A., Smulders Y.M. // *Neth. J. Med.* 2016. V. 74. № 10. P. 443–448.
24. Zhou F., Yu T., Du R., Fan G., Liu Y., Liu Z., Xiang J., Wang Y., Song B., Gu X., et al. // *Lancet.* 2020. V. 395. № 10229. P. 1054–1062.
25. Chen N., Zhou M., Dong X., Qu J., Gong F., Han Y., Qiu Y., Wang J., Liu Y., Wei Y., et al. // *Lancet.* 2020. V. 395. № 10223. P. 507–513.
26. Wu J., Liu J., Zhao X., Liu C., Wang W., Wang D., Xu W., Zhang C., Yu J., Jiang B., Cao H., Li L. // *Clin. Infect. Dis.* 2020. V. 71. № 15. P. 706–712.
27. Yumeng Y., Cao J., Wang Q., Liu K., Luo Z., Yu K., Chen X., Hu B., Huang Z. // *Crit. Care Med.* 2020. V. 8. № 49. P. 1–11.
28. Huang C., Wang Y., Li X., Ren L., Zhao J., Hu Y., Zhang L., Fan G., Xu J., Gu X., et al. // *Lancet.* 2020. V. 395. № 10223. P. 497–506.
29. Zhang Y., Xiao M., Zhang S., Xia P., Cao W., Jiang W., Chen H., Ding X., Zhao H., Zhang H., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 382. № 17. P. e38.
30. Uthman I.W., Gharavi A.E. // *Semin. Arthritis Rheum.* 2002. V. 31. № 4. P. 256–263.
31. Querol-Ribelles J.M., Tenias J.M., Grau E., Querol-Borras J.M., Climent J.L., Gomez E., Martinez I. // *Chest.* 2004. V. 126. № 4. P. 1087–1092.
32. Fruchter O., Yigla M., Kramer M. R. // *Am. J. Med. Sci.* 2015. V. 349. № 1. P. 29–35.
33. Snijders D., Schoorl M., Schoorl M., Bartels P.C., van der Werf T.S., Bo-ersma W.G. // *Eur. J. Case Rep. Intern. Med.* 2012. V. 23. № 5. P. 436–441.
34. Lippi G., Mario P., Brandon M.H. // *Clin. Chim. Acta.* 2020. V. 506. P. 145–148.
35. Zarychanski R., Houston D. S. // *Hematol. Am. Soc. Hematol. Edu. Program.* 2017. V. 2017. № 1. P. 660–666.
36. Yang M., Ng M.H., Li C.K. // *Hematology.* 2005. V. 10. № 2. P. 101–105.
37. Jolicoeur P., Lamontagne L. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 1995. V. 380. P. 193–195.
38. Khurana D., Deoke S.A. // *Indian J. Crit. Care Med.* 2017. V. 21. № 12. P. 861–864.
39. Vanderschueren S., De Weerd A., Malbrain M., Vankerschaever D., Frans E., Wilmer A., Bobbaers H. // *Crit. Care Med.* 2000. V. 28. № 6. P. 1871–1876.
40. Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J. // *Lancet.* 2020. V. 395. № 10229. P. 1033–1034.
41. Jose R.J., Manuel A. // *Lancet Respir. Med.* 2020. V. 8. № 6. P. e46–e47.
42. Barry S.M., Johnson M.A., Janossy G. // *Bone Marrow Transplant.* 2000. V. 26. № 6. P. 591–597.
43. Imashuku S. // *Crit. Rev. Oncol. Hematol.* 2002. V. 44. № 3. P. 259–272.
44. Bisno A.L., Brito M.O., Collins C.M. // *Lancet Infect. Dis.* 2003. V. 3. № 4. P. 191–200.
45. Yokota S. // *Nihon Rinsho.* 2003. V. 61. № 11. P. 1953–1958.
46. Garanina E., Martynova E., Davidyuk Y., Kabwe E., Ivanov K., Titova A., Markelova M., Zhuravleva M., Cherepnev G., Shakirova V.G., et al. // *Viruses.* 2019. V. 11. № 7. P. e601.
47. Jahrling P.B., Hensley L.E., Martinez M.J., LeDuc J.W., Rubins K.H., Relman D.A., Huggins J.W. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2004. V. 101. № 42. P. 15196–15200.
48. Huang K.J., Su I.J., Theron M., Wu Y.C., Lai S.K., Liu C.C., Lei H.Y. // *J. Med. Virol.* 2005. V. 75. № 2. P. 185–194.
49. Tisoncik J.R., Korth M.J., Simmons C.P., Farrar J., Martin T.R., Katze M.G. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2012. V. 76. № 1. P. 16–32.
50. Channappanavar R., Perlman S. // *Semin. Immunopathol.* 2017. V. 39. P. 529–539.
51. Ruan Q., Yang K., Wang W., Jiang L., Song J.C. // *Intensive Care Med.* 2020. V. 46. № 5. P. 846–848.
52. Wang F., Nie J., Wang H., Zhao Q., Xiong Y., Deng L., Song S., Ma Z., Mo P., Zhang Y. // *J. Infect. Dis.* 2020. V. 221. № 11. P. 1762–1769.
53. Sun S., Cai X., Wang H., He G., Lin Y., Lu B., Chen C., Pan Y., Hu X. // *Clin. Chim. Acta.* 2020. V. 507. P. 174–180.
54. Qian G.Q., Yang N.B., Ding F., Ma A.H.Y., Wang Z.Y., Shen Y.F., Shi C.W., Lian X., Chu J.G., Chen L., et al. // *QJM: An International Journal of Medicine.* 2020. V. 113. № 7. P. 474–481. doi: 10.1093/qjmed/hcaa089
55. Liu F., Xu A., Zhang Y., Xuan W., Yan T., Pan K., Yu W., Zhang J. // *Int. J. Infect. Dis.* 2020. V. 95. P. 183–191.
56. Henry B.M., de Oliveira M.H.S., Benoit S., Plebani M., Lippi G. // *Clin. Chem. Lab. Med.* 2020. V. 58. № 7. P. 1021–1028.
57. Terpos E., Ntanasis-Stathopoulos I., Elalamy I., Kastritis E., Sergentanis T.N., Politou M., Psaltopoulou T., Gerotziafas G., Dimopoulos M.A. // *Am. J. Hematol.* 2020. V. 95. № 7. P. 834–847.
58. Zhou P., Yang X.L., Wang X.G., Hu B., Zhang L., Zhang W., Si H.R., Zhu Y., Li B., Huang C.L., et al. // *Nature.* 2020. V. 579. № 7798. P. 270–273.
59. Qin C., Zhou L., Hu Z., Zhang S., Yang S., Tao Y., Xie C., Ma K., Shang K., Wang W., et al. // *Clin. Infect. Dis.* 2020. V. 71. № 15. P. 762–768.
60. Guo T., Fan Y., Chen M., Wu X., Zhang L., He T., Wang H., Wan J., Wang X., Lu Z. // *JAMA Cardiol.* 2020. V. 5. № 7. P. 811–818.
61. Song J.C., Wang G., Zhang W., Zhang Y., Li W.Q., Zhou Z. // *Mil. Med. Res.* 2020. V. 7. P. e19.
62. Tang N., Bai H., Chen X., Gong J., Li D., Sun Z. // *J. Thromb. Haemost.* 2020. V. 18. № 5. P. 1094–1099.
63. Marietta M., Ageno W., Artoni A., De Candia E., Gresele P., Marchetti M., Marcucci R., Tripodi A. // *Blood Transfus.* 2020. V. 18. № 5. P. 167–169.

УДК 612.744.14

Молекулярные механизмы изменения мышечного тонуса в условиях космического полета и при его моделировании

Б. С. Шенкман^{1*}, А. К. Цатурян², И. М. Вихлянец³, И. Б. Козловская¹, А. И. Григорьев¹¹ГНЦ РФ – Институт медико-биологических проблем РАН, Москва, 123007 Россия²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский институт механики, Москва, 119192 Россия³Институт теоретической и экспериментальной биофизики РАН, Московская обл., Пущино, 142290 Россия

*E-mail: bshenkman@mail.ru

Поступила в редакцию 06.04.2020

Принята к печати 04.08.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.10953

РЕФЕРАТ В условиях как реальной (космический полет), так и моделируемой невесомости у человека наблюдается значительная потеря мышечной жесткости (атония) уже в первые дни воздействия. Этот феномен связывают с инактивацией медленных двигательных единиц и называют рефлекторной атонией. Однако в конце XX века появилось много данных о том, что даже изолированная мышца и изолированное волокно обладают функционально значимой жесткостью. Эта собственная жесткость мышцы (*intrinsic stiffness*) определяется как активным компонентом, т.е. способностью формировать некоторое количество актомиозиновых связей (поперечных мостиков) при растяжении и сокращении, так и молекулами структурных белков цитоскелета и внеклеточного матрикса, способными оказывать механическое сопротивление как при растяжении мышцы/волокна, так и при их сокращении. В обзоре рассмотрены основные изменения собственной мышечной жесткости в условиях гравитационной разгрузки. Проанализированы данные, полученные в экспериментах с использованием моделей «сухой» иммерсии (с участием добровольцев) и вывешивания задних конечностей (на лабораторных грызунах). Обсуждаются результаты и гипотезы, касающиеся возможного уменьшения вероятности образования поперечных мостиков в атрофирующейся мышце вследствие увеличения межфиламентного расстояния. Приведены данные, свидетельствующие о деградации ряда ключевых белков саркомерного цитоскелета (титина, небулина и др.) в условиях гравитационной разгрузки. Представлены возможные механизмы изменения структуры коллагена во внеклеточном матриксе постуральной мышцы и его роль в снижении собственной жесткости мышцы. Рассмотрены механизмы снижения собственной мышечной жесткости и роль этого снижения в процессе развития атрофических изменений мышц.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА скелетная мышца, гравитационная разгрузка, атония, вывешивание задних конечностей, «сухая» иммерсия, жесткость мышцы, собственная жесткость, пассивная жесткость, цитоскелет, белки саркомерного цитоскелета, титин, коллаген.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ППС – площадь поперечного сечения; Akt – протеинкиназа B; GSK3 β – киназа гликогенсинтазы 3 β ; HSP – белки теплового шока; 17-ААГ – 17-(аллиламино)-17-диметоксигельданамицин.

ВВЕДЕНИЕ

Загадочные механизмы поддержания и снижения мышечного тонуса всегда привлекали внимание физиологов. Под тонусом обычно понимают фоновое механическое напряжение мышцы, создающее биомеханическую основу для выполнения целенаправленных движений. Изменение тонуса можно оценивать по изменению жесткости мышцы. О рефлекторном управлении тонусом известно давно.

Спорным вопросом долгое время оставалось существование молекулярно-клеточных механизмов поддержания тонуса, присущих самой мышце.

При использовании тензометрических и виброметрических методов оценки поперечной жесткости мышц человека *in vivo* Козловская и соавт. [1], а также Григорьев и соавт. [2] показали, что в условиях как реальной (космический полет), так и моделируемой невесомости наблюдается значительная потеря

мышечной жесткости уже в первые дни воздействия. Этот феномен получил название гипогравитационной атонии. Такая потеря жесткости оказалась связанной, прежде всего, с изменениями работы двигательных единиц (ДЕ) мышц экстензоров, т.е. с инактивацией пула медленных ДЕ в условиях гравитационной разгрузки [3, 4] (рис. 1). Эти представления подтверждаются и рядом наблюдений, свидетельствующих о значительном снижении или полном прекращении электрической активности постуральной камбаловидной мышцы крысы при устранении опоры как в условиях наземного эксперимента с антиортостатическим вывешиванием задних конечностей, так и в реальной невесомости при полете по параболе Кеплера [5–8]. Поэтому можно считать, что потеря жесткости в значительной степени обусловлена инактивацией медленных мышечных волокон, поддерживающих фоновую механическую активность мышц даже в покое на Земле, что, в свою очередь, и отражается на жесткостных параметрах мышцы *in vivo*. Этот компонент жесткости можно назвать рефлекторным (рис. 2).

Существуют ли собственные периферические механизмы снижения жесткости мышцы при ее инактивации?

В конце XX века появилось много данных о том, что даже изолированная мышца и изолированное (и пермеабилезированное) волокно обладают функционально значимой жесткостью, которая постепенно утрачивается после прекращения сократительной активности. Эта собственная жесткость мышцы (*intrinsic stiffness*, рис. 2) определяется как активным компонентом, т.е. способностью формировать некоторое количество актомиозиновых связей (поперечных мостиков) при растяжении и сокращении, так и «параллельным упругим/эластичным компонентом», т.е. молекулами структурных белков цитоскелета и внеклеточного матрикса, способными оказывать механическое сопротивление как при растяжении мышцы/волокна, так и при их сокращении (рис. 3).

Жесткость – это приращение механического напряжения, т.е. растягивающей силы, отнесенной к площади поперечного сечения, в ответ на деформацию (относительное удлинение) мышечных волокон. Поскольку мышечная клетка, особенно активированная, проявляет не только упругие, но и вязкоупругие свойства, результат определения жесткости зависит от метода измерения. Различают динамическую, или мгновенную жесткость, которую можно измерить, прикладывая очень быструю деформацию, и статическую жесткость, которую характеризуют уровнем напряжения, установившегося через длительное время после окончания изменения длины. Используют ступенчатое, «пилообразное», или синусоидальное изменение длины мышцы. В первом случае дли-

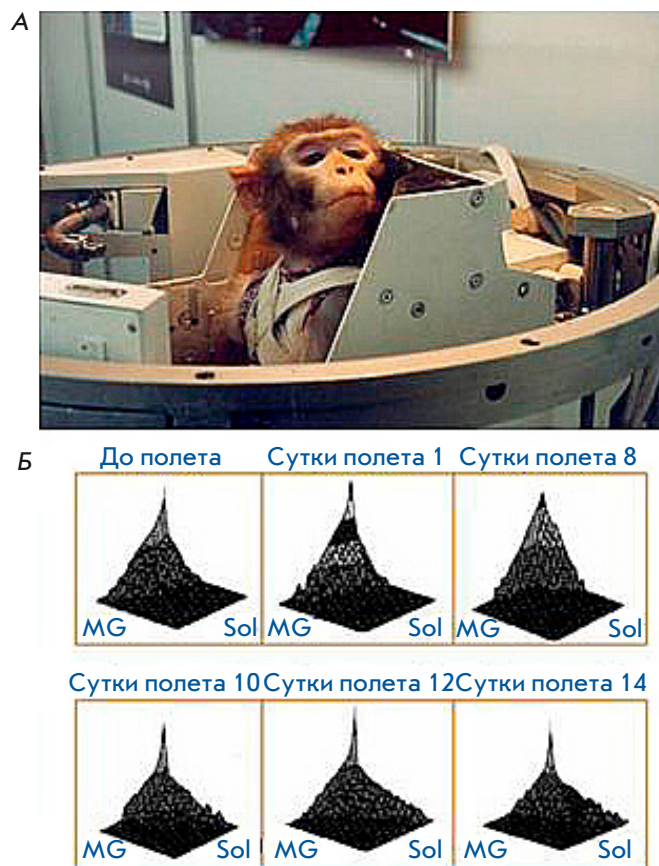


Рис. 1. Изменения порядка рекрутирования *m. gastrocnemius* (MG) и *m. soleus* (Sol) обезьян при выполнении задачи удержания груза в космическом полете. В камбаловидной мышце (*m. soleus*) до 95% волокон составляют медленные волокна. В икроножной мышце (*m. gastrocnemius*) число медленных волокон не превышает 40–50%, остальные волокна быстрые. Регистрация активности этих двух мышц при удержании рычага в капсуле биоспутника (А) обнаружила, что до полета это движение выполняется в основном *m. soleus* (Б). В полете же картина мышечной активности изменялась ото дня ко дню: активность *m. soleus* снижалась, а *m. gastrocnemius* возрастала, так что в конце полета заданное движение выполнялось почти исключительно *m. gastrocnemius*

ну мышцы меняют скачком, длительность которого в лучших экспериментальных установках составляет около 0.1 мс, что позволяет определить мгновенную жесткость. Во втором случае длину мышцы меняют по линейному закону, что позволяет непосредственно получать диаграмму деформация–напряжение. Синусоидальная, или гармоническая, деформация позволяет наилучшим образом использовать имеющееся оборудование для достижения максимального временного разрешения. Поскольку диаграмма растяжения мышцы имеет нелинейный характер, то даже для растяжений в единицы процентов раз-

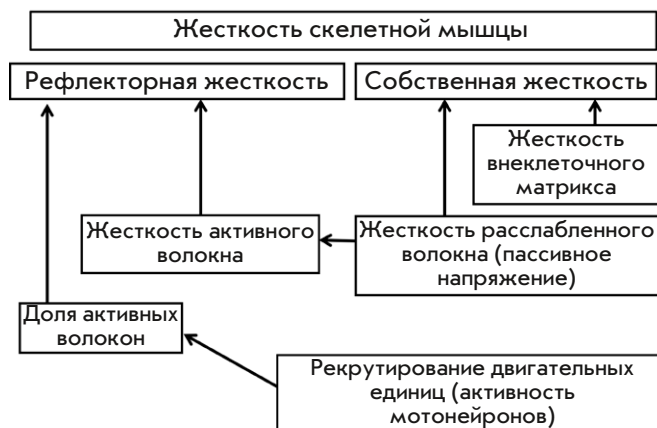


Рис. 2. Физиологическая классификация жесткостных свойств скелетных мышц

личают касательную и секущую, или хордовую жесткость. Активная жесткость интактной мышцы может быть обусловлена фоновой электрической импульсацией, а в изолированной мышце связана либо с наличием надпороговой концентрации ионов кальция, вызывающей частичную активацию тропонин-тропомиозиновой регуляторной системы, либо с дефектами этой системы, например, с частичной потерей тропониновых комплексов, в результате чего даже в отсутствие ионов кальция некоторые регуляторные единицы оказываются активированными. Устранить активный компонент жесткости можно добавлением блеббистатина – специфического блокатора миозина II, который свободно проникает в клетку через сарколемму [9], связывается с миозином и блокирует его переход в состояние прочного связывания с актином [10]. Аккуратно измерить активный компонент жесткости можно применяя достаточно быстрое растяжение со скоростями деформации по крайней мере в несколько длин мышцы в секунду. В противном случае жесткость оказывается недооцененной из-за релаксации напряжения. Поскольку пассивная жесткость не линейна, необходимо регистрировать всю кривую удлинение–напряжение (растягивающую силу, отнесенную к площади поперечного сечения).

В обзоре рассмотрены основные данные об изменении собственной мышечной жесткости в условиях гравитационной разгрузки, выражающейся, прежде всего, в глубокой инактивации ряда мышц. Речь пойдет о данных, полученных главным образом в условиях безопорности, т.е. в экспериментах с использованием моделей «сухой» иммерсии (с участием добровольцев) (рис. 4) и вывешивания задних конечностей (на лабораторных грызунах) (рис. 5). Будут также обсуждены гипотетические механизмы снижения собственной мышечной жесткости и роль этого снижения в процессе развития атрофических изменений мышц.

Основные гипотетические факторы собственной мышечной жесткости

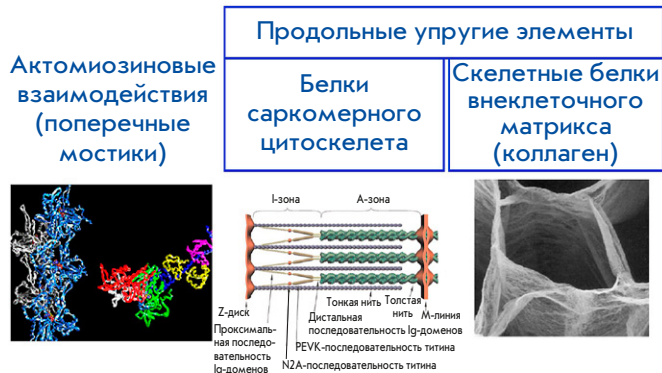


Рис. 3. Основные гипотетические факторы, ассоциированные с собственной жесткостью мышцы

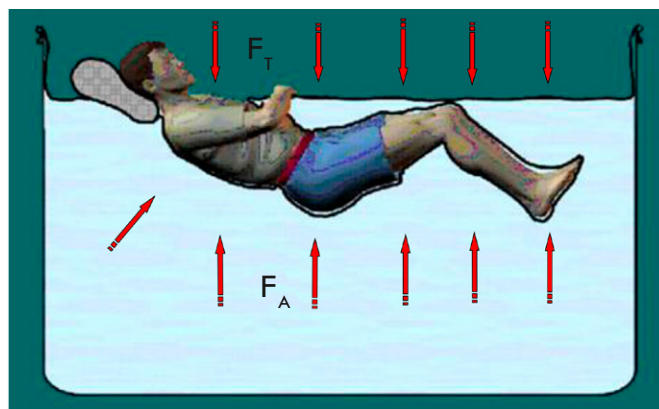


Рис. 4. Экспериментальная модель «сухая» иммерсия. При погружении в воду результирующая сила гидростатического давления (Архимедова сила – F_A) уравновешивает силу тяжести (F_T). Однако эта сила распределена по всей поверхности тела, поэтому давление на каждую единицу поверхности тела оказывается намного меньше, чем сила реакции опоры в положении стоя, сидя или лежа

Перед тем как перейти непосредственно к рассмотрению обсуждаемой проблемы, имеет смысл кратко охарактеризовать упомянутые экспериментальные подходы.

«Сухая» иммерсия – модель, разработанная в 70-е годы в России [11], предполагает полное погружение испытуемого в воду в открытой ванне. При этом поверхность тела испытуемого отделена от воды водонепроницаемой пленкой, свободно покрывающей поверхность воды и бортики ванны, а в воздушной среде остается только голова испытуемого (рис. 4).

Вывешивание задних конечностей [12, 13] остается одной из самых распространенных стандартных моделей микрогравитации на лабораторных грызунах. Животное подвешивается к потолку клетки либо за хвост, либо за кожу спины, либо с помощью

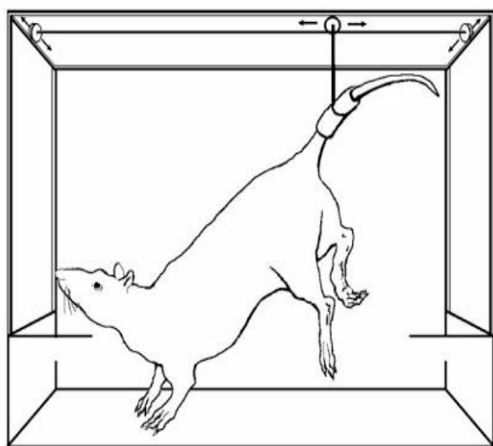


Рис. 5. Экспериментальная модель «вывешивание задних конечностей». При отрыве стопы животного от субстрата опорные афференты инактивируются, что приводит к состоянию опорной разгрузки

тканевого жилета так, чтобы передние конечности опирались на грунт, задние не касались его, находясь под углом 30–40 градусов от пола (рис. 5). При правильном использовании модели животное может свободно передвигаться по клетке. Уровень кортикостерона, указывающего на степень стрессированности животного, редко превышает уровень интактного грызуна виварного контроля [14].

ПАССИВНАЯ И АКТИВНАЯ ЖЕСТКОСТЬ ИЗОЛИРОВАННЫХ МЫШЦ И ВОЛОКОН ПРИ ГРАВИТАЦИОННОЙ РАЗГРУЗКЕ

К настоящему времени известно, что при гравитационной разгрузке происходит существенное снижение как пассивной, так и активной жесткости мышц и волокон. Так, в экспериментах группы Goubel показано, что пассивное напряжение (passive tension) постуральной *m. soleus* крысы значительно снижается после 3–4-недельного вывешивания [15]. Уже в первых работах эти авторы приписывали снижение «последовательного эластического компонента» как активным механизмам (поперечным мостикам), так и пассивным (по их мнению, преимущественно сухожильным) элементам. Однако снижение passive tension после 14-суточного вывешивания обнаружено и у одиночных пермеабилитированных волокон *m. soleus* [16]. Причем это снижение, как показало специальное исследование с устранением влияния актомиозиновых связей, может считаться преимущественно следствием снижения относительного содержания титина, эластичного белка цитоскелета. Временной ход изменений динамической жесткости полностью активированных мышечных волокон в условиях моделируемой гравитационной разгрузки (вывешивания) был исследован

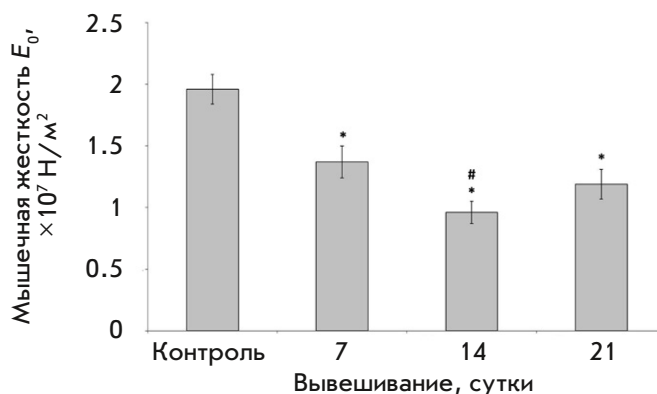


Рис. 6. Изменения динамического модуля упругости Юнга (показателя жесткости) полностью активированных пермеабилитированных волокон *m. soleus* крысы при вывешивании задних конечностей [17] в течение 7, 14 и 21 суток. * — достоверное отличие от группы виварного контроля ($p < 0.05$), # — достоверное отличие от группы 7-суточного вывешивания ($p < 0.05$)

McDonald и Fitts [17]. Показано, что снижение модуля Юнга уже после 7 суток разгрузки составило 30%, а после 2 недель вывешивания значение модуля Юнга было в половину меньше, чем у контрольных животных (рис. 6). Интересно, что после 3 недель его значение оставалось таким же, как и после 2 недель разгрузки. В лаборатории одного из авторов настоящего обзора методом атомной силовой микроскопии оценивали поперечную жесткость пермеабилитированных волокон *m. soleus* крысы при вывешивании. При исследовании этим методом сократительного аппарата (после устранения мембранных структур с помощью детергента) удалось установить, что поперечная жесткость миофибриллярного аппарата на участке от М-линии до Z-диска статистически значимо снижалась на 35% только на третий (но не на первый) день вывешивания. Далее интенсивность снижения была ниже, но к 12 суткам вывешивания поперечная жесткость была ниже уровня контроля на 68% [18]. Поперечная жесткость в зоне Z-диска уже на 3 суток вывешивания снизилась более чем в 2 раза и продолжала снижаться далее. Интересно, что при измерении поперечной жесткости сократительных структур волокна, активированного высокой концентрацией ионов Ca^{2+} (pCa 4.2), снижение жесткости после вывешивания было существенно более выраженным – почти двукратным на участке между Z-диском и М-линией после 3 суток воздействия, и более 63% после 12 суток. При этом следует отметить, что поскольку у интактного животного жесткость активированного волокна была почти в 2 раза больше, чем расслабленного волокна, то снижение жесткости активированного волокна, выраженной в абсолютных значениях, было существенно более глубоким. Аналогичные данные

получены в эксперименте с участием добровольцев на *m. soleus* человека после 7 суток «сухой» иммерсии [19]. При рассмотрении этих данных приходится учитывать ограниченные возможности метода атомной силовой микроскопии, который не позволяет оценивать сопротивление материала в продольном измерении, а также оценивать жесткость целого волокна, а тем более целой мышцы, так как глубина проникновения кантилевера ограничена.

Итак, известные к настоящему времени данные не ставят под сомнение снижение собственной (intrinsic) продольной и поперечной, динамической и статической, пассивной и активной жесткости мышцы, ее волокон и их компонентов при моделируемой гравитационной разгрузке млекопитающих. В то же время неясными остаются молекулярные механизмы, определяющие это снижение жесткости.

МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ФАКТОРЫ, ВЛИЯЮЩИЕ НА ЖЕСТКОСТЬ МЫШЦЫ: ПОПЕРЕЧНЫЕ МОСТИКИ

Известно, что пассивную жесткость мышцы в условиях растяжения определяют как поперечные мостики [20–22], так и цитоскелетные (титин, небулин, обскурин, миозинсвязывающий С-белок) и регуляторные белки, которые, во-первых, составляют пассивный параллельный упругий компонент мышцы [23, 24], а, во-вторых, влияют на вероятность образования поперечных мостиков [25–28].

На жесткость целой мышцы или пучков ее волокон влияют и компоненты межволоконного матрикса, в частности коллагеновые фибриллы [29]. Недавно было показано, что жесткость внеклеточного матрикса существенно больше, чем у изолированных волокон [30]. Интересно проследить, какое влияние на эти белки оказывает гравитационная разгрузка. Известно, что пассивная жесткость имеет более высокие значения у мышц с преобладанием волокон, экспрессирующих тяжелые цепи миозина медленного типа [15]. Поэтому следовало бы ожидать, что в условиях гравитационной разгрузки жесткость должна снизиться при прочих равных условиях вследствие изменения характера экспрессии изоформ тяжелых цепей миозина в сторону преобладания экспрессии быстрых изоформ [31, 32].

Понятно, что вероятность формирования поперечных мостиков выше, если в миофибрилярном аппарате поддерживается оптимальное межфиламентное расстояние (interfilament spacing). При уменьшении относительного количества нормально организованных актиновых филаментов (без нарушений структуры) межфиламентное расстояние должно увеличиваться, а вероятность образования поперечных мостиков снижаться. В работах группы Fitts и Riley показано, что после 14-суточного вывешивания крыс

[33], 17-суточной постельной гипокинезии и 17-суточного космического полета в камбаловидной мышце человека уменьшается количество актиновых филаментов и наблюдается укорочение некоторых из них [34–36]. Такие изменения сопровождаются снижением максимальной силы и мощности сокращения одиночных пермеабелизованных волокон, а также их кальциевой чувствительности. Обнаруженный феномен может иметь прямое отношение к снижению активной жесткости мышечных волокон. Причина таких изменений до сих пор не установлена. Ранее мы обнаружили снижение содержания белка тонких нитей небулина в *m. soleus* крыс после 7–14-суточного вывешивания [37, 38]. Не исключено, что причиной «выпадения» актиновых филаментов может быть снижение относительного содержания небулина. В то же время, как недавно установлено, в генетически атрофированной мышце уменьшается количество прочных и увеличивается количество слабых актомиозиновых связей при изометрическом сокращении (по данным ЭПР) [39]. В недавнем эксперименте с применением эффективного и специфического ингибитора миозина II блеббистатина нами показано, что на фоне вывешивания задних конечностей крысы блеббистатин оказывает одинаковое влияние на пассивную жесткость камбаловидной мышцы как взятой у интактного животного, так и у животного после 3 суток гравитационной разгрузки на фоне уже сниженной пассивной жесткости. Эти результаты заставляют предположить, что возможное изменение характеристик того небольшого числа поперечных мостиков, которые образуются в покоящейся мышце после гравитационной разгрузки, не влияет на ее пассивную жесткость [40]. Однако не исключено, что увеличение межмиофиламентного расстояния, уменьшение количества тонких филаментов и изменение характеристик поперечных мостиков в условиях разгрузки и гипогравитационной атрофии могут существенно сказываться на активной динамической жесткости. Этот вопрос остается важным для будущих исследований.

САРКОМЕРНЫЕ БЕЛКИ И МЫШЕЧНАЯ ЖЕСТКОСТЬ

Из белков саркомерного цитоскелета наибольший интерес вызывает титин, вклад которого в определение пассивной жесткости мышечных волокон признается очень существенным [23, 41]. Несколько доменов гигантской молекулы титина в большей или меньшей степени обладают свойствами пружины и могут сжиматься и растягиваться (рис. 7). Снижение относительного содержания титина в условиях антиортостатического вывешивания впервые обнаружено Christine Kasper в 2000 году [42]. Аналогичные данные получены в лаборатории Лилльского университета в 2002 году [16]. В том же году нами обнаружено

снижение содержания титина-1 (T1) и увеличение содержания его протеолитического фрагмента T2 в камбаловидной мышце крысы после 14-суточного вывешивания [43]. Если учитывать, что титин является одним из компонентов «параллельного упруго-эластического компонента», определяющего величину снижающейся при разгрузке пассивной жесткости волокна, то можно было ожидать либо снижения содержания этого белка, либо увеличения его эластичности (compliance) уже после 2–3 суток вывешивания (когда уже наблюдается снижение пассивной жесткости мышцы). Однако оказалось, что это не совсем так. Goto и соавт. не обнаружили изменений содержания коннектина (титина-1) после 3 суток вывешивания [44]. При этом оказалось, что после такого вывешивания упругий участок молекулы титина, расположенный между Z-дисксом и N2A-доменом (включая пружинный участок PEVK), не только не увеличивает свою эластичность, но теряет ее, проявляя менее эластичные свойства [44]. В последнее время эти данные получили объяснение в работе Nishikawa и соавт. [45], в которой показано, что при повышении уровня ионов кальция в волокне (а именно это и происходит при гравитационной разгрузке [46–48]) в районе домена N2A происходит жесткое сцепление молекулы титина со структурами тонкого филамента. В 2008 году нами в *m. soleus* крыс после 3 суток вывешивания также не обнаружено снижения содержания N2A-изоформы титина-1, характерной для скелетных мышц [49]. Значимое снижение содержания титина-1 зарегистрировано нами после 7 суток вывешивания [50]. Недавно в лаборатории одного из авторов настоящего обзора выявили статистически значимое увеличение экспрессии титина в камбаловидной мышце крысы в течение 3 суток экспозиции в условиях разгрузки (вывешивание задних конечностей) [51]. Не исключено, что такое увеличение экспрессии компенсирует распад части молекул титина, что и приводит к отсутствию видимых изменений его содержания. Интересно, что после 7 суток вывешивания уровень экспрессии титина не превышает контрольный [50], что позволяет зарегистрировать снижение содержания титина на этом временном интервале, вероятно, за счет его повышенного кальцийзависимого протеолиза.

Таким образом, есть большие основания считать, что деструкция титина и небулина при экспозиции животного более 3 суток в условиях моделируемой гравитационной разгрузки может внести существенный вклад в снижение пассивной жесткости мышцы. Однако вопрос о том, могут ли изменения в этих белках быть связаны с изменениями жесткостных свойств разгруженной мышцы в ранний период разгрузки (до 3 суток), остается открытым. Нельзя исключить того,

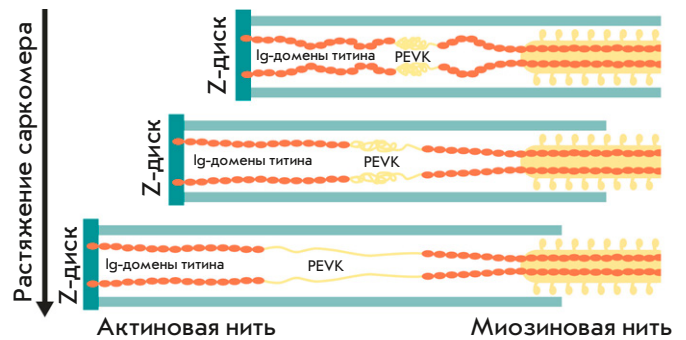


Рис. 7. Пружинные свойства (растяжимость) домена PEVK молекулы титина

что вклад в изменение жесткости молекулы титина и соответственно мышцы в целом в ранний период разгрузки может внести изменение степени фосфорилирования этого белка. Это предположение не лишено оснований. Известно, что фосфорилирование /дефосфорилирование PEVK- и N2B-последовательностей титина сердечной мышцы изменяют жесткостные свойства молекул, что приводит к изменению обусловленной титином пассивной жесткости кардиомиоцитов и мышцы в целом [52]. Эти изменения, в свою очередь, играют важную роль в регуляции сократительной активности миокарда. Известны данные о фосфорилировании титина скелетных мышц [53, 54]. Роль этой посттрансляционной модификации в изменении жесткостных свойств молекулы титина не ясна, но на основании данных об уменьшении уровня фосфорилирования PEVK-участка молекулы титина в *m. vastus lateralis* крыс после 15 мин физической нагрузки (бег на тредбане) высказано предположение о роли этих изменений в снижении обусловленной титином пассивной жесткости [54]. Обсуждается роль гипофосфорилирования титина в снижении жесткостных свойств его молекул и ухудшении сократительной способности диафрагмы крысы после 18 ч механической разгрузки (механической вентиляции легких), приведшей к атрофии этой мышцы [55–57]. В наших исследованиях обнаружено увеличение общего уровня фосфорилирования T1 и T2 в *m. gastrocnemius* мышцей после 30-суточного космического полета, что сопровождалось снижением содержания T1 [58]. Снижение содержания титина и небулина в условиях гравитационной разгрузки будет, несомненно, приводить к уменьшению пассивной жесткости, развиваемой молекулами титина при растяжении, и жесткости мышцы в целом. Однако при этом нельзя исключить как снижения, так и увеличения жесткостных свойств молекулы титина в зависимости от фосфорилирования разных участков его молекулы.

Нельзя исключить и гипотезу, связывающую процесс распада некоторых белков цитоскелета (предположительно влияющих на жесткость мышцы) с фос-

фосфорилированием специфических сайтов их молекул. Эта гипотеза получила недавно подтверждение в исследованиях механизмов распада десмина (межмиофибрилярного и межмиофиламентного цитоскелетного белка). В работе группы Cohen показано, что процесс убиквитинирования и кальпаинзависимой деполимеризации десмина запускается фосфорилированием молекулы десмина хорошо известной киназой GSK3 β [59]. Известно, что эта киназа может ингибироваться негативным фосфорилированием киназой Akt-1 [60] и NO-зависимой киназой гуанилатциклазного каскада [61]. Таким образом, фосфорилирование/дефосфорилирование десмина могут влиять как на содержание этого белка, так и на изменение собственной жесткости мышцы.

Большое значение для формирования поперечных мостиков имеет уровень фосфорилирования легких цепей миозина, прежде всего в волокнах быстрого типа. Фосфорилирование легких цепей миозина, осуществляемое киназой легких цепей, способствует формированию поперечных мостиков и увеличению кальциевой чувствительности пермеабилizированных волокон [62, 63]. Однако в начале этого века было показано, что, как это ни парадоксально, при моделируемой гравитационной разгрузке (модели вывешивания задних конечностей) уровень фосфорилирования легких цепей миозина в *m. soleus* крысы повышается, а не понижается [64]. Таким образом, повышение уровня фосфорилирования легких цепей миозина в условиях гравитационной разгрузки в некоторой степени может компенсировать падение мышечной жесткости, обусловленное увеличением межмиофиламентного расстояния, уменьшением количества тонких филаментов и снижением содержания эластичного белка саркомерного цитоскелета титина.

Важнейшую роль при формировании поперечных мостиков играет миозинсвязывающий С-белок. Будучи фосфорилированным (по трем сайтам) он выполняет каркасную (scaffold) роль при замыкании актомиозиновой связи [65]. Однако нам не удалось найти данных, описывающих состояние этого белка при разгрузке. То же самое можно сказать и о таком важном саркомерном белке, как обскурин.

Что касается телетонина, замыкающего в Z-диске соседние титиновые нити и поэтому играющего важную роль в поддержании структуры и целостности Z-диска, а также целостности титинового цитоскелета, то в работе группы Taillandier показано, что при вывешивании крыс наблюдается убиквитинирование и распад этого белка в *m. soleus* [66]. Интересно, что содержание этого белка существенно снижается уже после 3 суток вывешивания [40].

В лаборатории одного из авторов настоящего обзора обнаружено, что гравитационная разгрузка приво-

дит к деградации альфа-актинина-2 – характерного белка Z-диска [67]. Эта деградация становится статистически значимой только после 7 суток вывешивания. Интересно, что содержание альфа-актинина-3 в камбаловидной мышце крысы при вывешивании снижается на 20% уже после 3 суток экспозиции [40]. Не исключено, что уменьшение содержания альфа-актининов-2 и -3 может приводить в определенной степени к дезинтеграции Z-диска, что, в свою очередь, может обусловить нарушение стабильности межфиламентного расстояния и снизить вероятность формирования поперечных мостиков, и будет, очевидно, способствовать снижению активной жесткости мышцы. Следует также обратить внимание и на то, что альфа-актинины, как и телетонин, выполняют функцию «заякоривания» титина в Z-диске [68]. И их деструкция может привести к дезинтеграции всего саркомерного цитоскелета и снижению всех жесткостных характеристик мышечного волокна.

Коллаген

Пассивная жесткость внеклеточного матрикса и соединительной ткани скелетных мышц является важным компонентом жесткости целой мышцы. Эта жесткость существенно превышает пассивную жесткость мышечных волокон и имеет ярко выраженный нелинейный характер [30, 69, 70]. Основным фактором, определяющим механические свойства внеклеточного матрикса и соединительной ткани мышцы, – количество и свойства (количество гидроксипролиновых поперечных сшивок) коллагеновых фибрилл. В скелетной мышце локализованы несколько изоформ коллагена, однако наибольший вклад в механические свойства мышцы вносят коллагены I и III [71]. При этом коллаген III характеризуется меньшей жесткостью и большей эластичностью (рис. 8).

Вклад коллагена в пассивную жесткость целой мышцы несомненен, однако, насколько деструкция или пониженный синтез коллагена в условиях разгрузки влияют на снижение жесткостных параметров в настоящее время неясно. Несмотря на прогрессирующее увеличение объема соединительной ткани в условиях гравитационной разгрузки [72, 73], увеличения содержания коллагена в мышце в этих условиях не регистрируют [74]. Более того, после 7-суточного космического полета в камбаловидной, подошвенной и некоторых других мышцах задней конечности крысы наблюдали значительное снижение содержания коллагена [75]. Аналогичные данные получены при иммобилизации камбаловидной мышцы в укороченном состоянии [76]. При моделировании гравитационной разгрузки методом вывешивания задних конечностей крыс анализ содержания мРНК коллагенов типа I и III обнаруживает выраженное

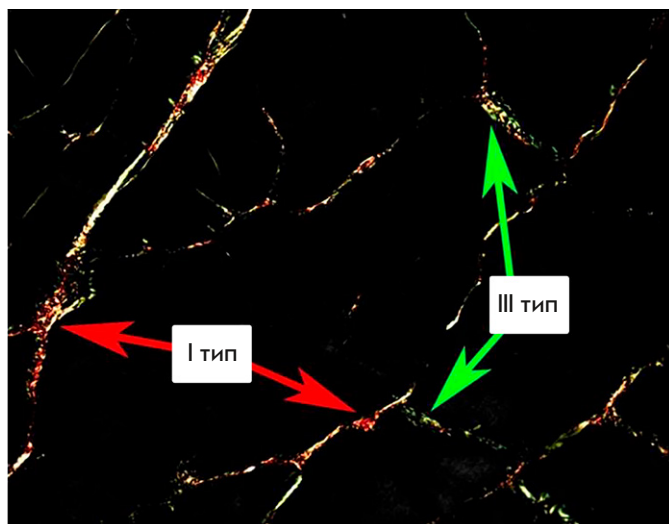


Рис. 8. Изоформы коллагена-I (красный) и коллагена-III (зеленый) на срезе камбаловидной мышцы человека. Окраска пикросириусом красным. Поляризационная микроскопия

снижение экспрессии на 3 сутки эксперимента [77], которое сменялось восстановлением до контрольного уровня к 7 суткам. В свою очередь, экспрессия мРНК коллагена III в камбаловидной мышце снижается после 7 суток вывешивания [78]. В то же время в преимущественно быстрой *m. gastrocnemius* выявлено значительное снижение экспрессии всех мышечных изоформ коллагена после 3-недельного вывешивания [79]. Однако определение экспрессии коллагена в *m. vastus lateralis* и *m. soleus* человека после 90-суточной постельной гипокинезии не выявило никаких достоверных изменений [80]. После 14-суточного вывешивания наблюдали интересный феномен: сдвиг соотношения экспрессии коллагена типа I (более жесткой изоформы) и коллагена типа III (более эластичной изоформы) в пользу коллагена типа III [81]. Каким образом этот феномен может влиять на жесткостные характеристики мышцы не установлено. Из сказанного понятно, что состояние коллагенов в постуральной мышце в условиях гравитационной разгрузки изучено недостаточно, поэтому трудно судить об их роли в процессе снижения пассивной жесткости мышцы при разгрузке.

Молекулярные механизмы снижения собственной жесткости мышцы

Итак, имеющиеся в настоящее время данные позволяют связывать собственную жесткость мышцы главным образом с состоянием белков саркомерного цитоскелета. Поэтому мы рассматриваем здесь те представления о механизмах снижения жесткости инактивированной мышцы, которые основаны на знаниях о распаде этих белков.

Известно, что деградация ряда цитоскелетных белков, в частности титина, осуществляется с помощью цистеиновых кальцийзависимых протеаз кальпаинов [82]. В этой работе Murphy показано, что обработка раствором μ -кальпаина препарата пермеабелизованного волокна приводила к резкой потере пассивного напряжения, т.е. жесткости. При этом наблюдался интенсивный распад титина. Роль кальпаинов в условиях гравитационной разгрузки интенсивно изучали в последние годы. Так, показано, что активность кальпаина (правда, измеренная в лизате на фоне супрафизиологической концентрации ионов кальция) значительно повышается в первые дни вывешивания, при этом наблюдается интенсивный распад его субстрата десмина [18, 83–85]. Интересно, что активация кальпаина сопряжена со структурными нарушениями Z-диска в мышечном волокне [86]. Нами обнаружено, что предотвращение избыточного накопления ионов кальция в мышечном волокне с помощью кальцийсвязывающего агента или блокатора дигидропиридиновых кальциевых каналов (нифедипина) приводит к снижению активности μ -кальпаина [85]. Интересно и то, что блокада кальциевых каналов приводит к снижению экспрессии мРНК μ -кальпаина, повышенной в условиях разгрузки [87].

Все эти данные свидетельствуют о высокой активности кальпаина в условиях разгрузки, что должно способствовать интенсивному распаду цитоскелетных и регуляторных белков саркомера и снижению жесткости мышцы. И действительно, применение специфического ингибитора кальпаина PD150606 позволило не только предотвратить распад белков цитоскелета, стабилизирующих титин (альфа-актинин-2 и телетонин), но и снижение пассивной жесткости камбаловидной мышцы [40].

Среди эндогенных ингибиторов кальпаина называют кальпастатин и оксид азота. У мышцей со сверхэкспрессией кальпастатинового гена отсутствовали атрофические изменения при вывешивании [88]. Однако у нормальных животных в условиях вывешивания экспрессия кальпастатина снижается [84]. В настоящее время, к сожалению, неизвестны физиологические, зависящие от уровня мышечной активности, механизмы, приводящие к изменению экспрессии кальпастатина. Другой эндогенный ингибитор кальпаина – оксид азота [89], продукция которого находится в зависимости от сократительной активности мышечного волокна [90]. В условиях разгрузки продукция оксида азота снижается [91]. При этом повышение уровня оксида азота в атрофирующейся мышце с помощью введения *L*-аргинина позволяет предотвратить распад ряда цитоскелетных белков и несколько уменьшить выраженность атрофии мышцы [91]. Недавно нами получены данные, свидетельствующие о предотвраще-

нии распада титина в условиях гравитационной разгрузки при введении *L*-аргинина [50]. Таким образом, можно предположить, что снижение уровня оксида азота в условиях гравитационной разгрузки является фактором, способствующим снижению жесткости мышцы в результате кальпаинзависимого распада белков цитоскелета.

Другая группа факторов, противодействующих протеолизу белков цитоскелета, – белки теплового шока (HSP), активирующие работу нейрональной NO-синтазы и обеспечивающие целостность титина [92, 93]. Дегградация сократительных белков может быть усилена при разрушении белков теплового шока HSP90 и 70, концентрация которых в мышцах обычно очень высока. Однако при гравитационной разгрузке на фоне атрофии их уровень падает на 50–70% [94, 95]. Некоторые авторы полагают, что сниженная экспрессия HSP в мышцах при разгрузке может иметь существенное значение для их атрофии. На фоне гравитационной разгрузки удалось резко увеличить уровень экспрессии белков HSP90 и HSP70 при использовании стимулятора 17-ААГ [96], который предотвращал увеличение содержания кальпаина и интенсификацию убиквитинирования белков. Активное взаимодействие HSP90 с нейрональной NO-синтазой, его протективное действие по отношению к молекуле титина позволяют предполагать, что снижение его экспрессии в условиях гравитационной разгрузки может иметь отношение к снижению жесткости мышцы.

Несмотря на то что большинство авторов согласны с тем, что белки внеклеточного матрикса, в частности изоформы коллагена, вносят существенный вклад в определение собственной пассивной жесткости мышцы, изменения этих белков при разгрузке изучены гораздо хуже, чем изменения белков саркомерного цитоскелета. Поэтому изучение механизмов регуляции экспрессии коллагенов в зависимости от сократительной активности мышцы находится в самом начале пути. Главное здесь – выяснение механизма функционально-зависимого ингибирования экспрессии коллагена фиброгенными клетками соединительной ткани межволоконного матрикса скелетной мышцы. При исследовании этого вопроса большой интерес представляет функция микроРНК-206 (miR-206). Недавно показали, что на фоне активации сателлитных клеток повышенная экспрессия и секреция miR-206 (в виде экзозом) приводит к ингибированию экспрессии коллагена в фиброгенных клетках соединительной ткани в межволоконном пространстве скелетной мышцы [97]. Интересно, что при вывешивании задних конечностей мышшей наблюдается увеличение содержания miR-206 в сыворотке крови [98]. Возможно, что снижение содержания коллагена при разгрузке связано с изменениями экспрессии и транспорта этого

вида микроРНК. Пока крайне мало сообщений об экспрессии и везикулярной секреции miR-206 на фоне гравитационной разгрузки. Будущие исследования покажут, какие механизмы в действительности регулируют содержание коллагена в мышце и его жесткость в условиях разгрузки.

РОЛЬ ОПОРНОЙ АФФЕРЕНТАЦИИ В ПОДДЕРЖАНИИ ЖЕСТКОСТНЫХ СВОЙСТВ ПОСТУРАЛЬНОЙ МЫШЦЫ

Прямое влияние опорной афферентации на двигательные функции человека было впервые показано в совместном советско-кубинском эксперименте на борту советского космического аппарата. В этом эксперименте применили механическую стимуляцию опорных зон стопы [99]. Впоследствии в экспериментах с «сухой» иммерсией использовали модифицированные устройства, позволяющие проводить длительные сеансы опорной стимуляции. В этих исследованиях, в частности, обнаружено, что опорная стимуляция на фоне иммерсии позволяет поддерживать нормальный уровень электрической активности и рефлекторной поперечной жесткости *m. soleus* [100].

В наших экспериментах применяли следующий режим стимуляции опорных зон стопы: ежедневное воздействие с давлением на стопу 40 кПа. Стимуляцию проводили в течение 6 ч по 20 мин в начале каждого часа в режимах естественной локомоции: медленной (75 шаг/мин) – 10 мин и быстрой (120 шаг/мин) – 10 мин. В *m. soleus* после 7-суточной иммерсии с применением опорной стимуляции не обнаружено значимого уменьшения ППС мышечных волокон медленного типа и сколько-нибудь заметных сдвигов в процентном соотношении волокон, экспрессирующих медленные и быстрые изоформы тяжелых цепей миозина [101]. Таким образом, развитие атрофии было предотвращено без применения интенсивных беговых или специальных резистивных нагрузок. С помощью опорной стимуляции удалось предотвратить снижение максимального изометрического напряжения и кальциевой чувствительности пермеабилizированных волокон [19, 101, 102]. Полученные результаты свидетельствуют о том, что мышечная активность, индуцированная стимуляцией опорных афферентов, позволяет избежать нарушений процессов формирования поперечных мостиков.

Что касается исследований поперечной жесткости миофибриллярного аппарата (атомная силовая микроскопия с предобработкой пермеабилizированных волокон Тритоном X-100), то в расслабленных волокнах после применения опорной стимуляции на фоне 7-суточной иммерсии достоверное снижение жесткости (на 30%) обнаружено только в плоскости Z-диска. Во всех остальных зонах саркомера поперечная жесткость не отличалась статистически зна-

чимо от предиммерсионных значений [19]. В активированных волокнах (при рСа 4.2) применение опорной стимуляции не позволило полностью предотвратить снижение жесткости, однако в разных зонах саркомера оно колебалось в пределах 15–25%. Таким образом, снижение жесткости активированного волокна было значительно менее выражено после опорной стимуляции по сравнению со значениями после пребывания в «чистой» иммерсии [19]. Вероятно, мышечная активность позволила сохранить почти неизменными показатели жесткости миофибрилярного аппарата как за счет предотвращения нарушений в формировании поперечных мостиков, так и за счет предотвращения распада белков саркомерного цитоскелета. Последнее предположение подкрепляется данными о содержании титина и небулина в *m. soleus* человека, полученными с применением опорной стимуляции на фоне пребывания в условиях «сухой» иммерсии. У испытуемых группы опорной стимуляции на фоне иммерсии содержание титина и небулина показывало лишь небольшую тенденцию к снижению, тогда как в группе «чистой» иммерсии снижение достигало 40% [101, 102]. Снижение содержания десмина также не наблюдали при действии опорной стимуляции. Так как распад упомянутых цитоскелетных белков обычно приписывают действию μ -кальпаина, то не исключено, что мышечная активность, индуцированная афферентной стимуляцией, инициирует эндогенный механизм ингибирования кальпаина. Такой механизм может быть связан с поддержанием высокой активности синтазы оксида азота, который известен как эндогенный ингибитор активности кальпаина (см. выше). В нашем исследовании механическая стимуляция опорных зон стопы позволила не только избежать снижения содержания синтазы оксида азота нейронального типа, но и несколько повысить ее содержание по сравнению с предиммерсионным уровнем [103]. Дальнейшие исследования покажут, насколько верны наши предположения о механизме, посредством которого опорная афферентация, обеспечивая постоянный (хотя и низкий) уровень активности постуральной *m. soleus*, позволяет поддерживать нормальное состояние цитоскелета и системы мобилизации актомиозинового мотора.

ЖЕСТКОСТЬ И РАЗВИТИЕ АТРОФИИ

Жесткость скелетных мышц является не только механической основой антигравитационной устойчивости организма млекопитающего, но и неотъемлемым компонентом системы механотрансдукции, т.е. процесса трансформации механической альтерации структур мышечного волокна в метаболический сигнал, контролирующий процессы экспрессии генов, синтеза и распада белка. В течение ряда лет

в многочисленных публикациях (например, [104]) обсуждался вопрос о возможной сигнальной роли титина. Однако долгое время экспериментальные данные, подтверждающие такие предположения, почти не публиковались. Единственным свидетельством сигнальной роли титина было перемещение в мышечное ядро E3-убиквитин-лигазы MuRF2, связанной с киназным участком M-домена молекулы титина, при денервации *m. gastrocnemius* [105]. Кроме того, этим же коллективом авторов показано увеличение АТФазной активности и фосфорилирования киназного центра титина при растяжении молекулы титина *in vitro* [106].

Вопросы о том, каким образом киназный домен титина, локализованный в области M-линии саркомера и участвующий в димеризации молекул титина, связанных с двумя соседними миозиновыми нитями, может служить механосенсором, и какой именно механический сигнал он воспринимает, оставались открытыми. Была высказана гипотеза о том, что этот домен может служить сенсором разупорядочивания миозиновых нитей, и именно нарушение структуры саркомера запускает синтез саркомерных белков [107]. Эта гипотеза основана на математической модели механики саркомера, в которой также учтен вклад некоторых внесаркомерных цитоскелетных белков M-линии, в первую очередь, обскурина. Предположение об участии обскурина в стабилизации толстых нитей в саркомерах получило позднее подтверждение в экспериментах с летательными мышцами дрозофил с нокаутом гена, кодирующего обскурин [108].

Недавно в экспериментах с денервированной полудиафрагмой мышцы сопоставляли сигнальные свойства мышц мышцей двух мутантных линий, различающихся повышенной и пониженной жесткостью молекулы титина. Денервационная атрофия в этом эксперименте преодолевалась с помощью механического растяжения мышцы, стимулирующего анаболические процессы. Оказалось, что анаболический эффект растяжения более выражен у мышцей с повышенной жесткостью титина [109]. Согласно этому сообщению, анаболический сигнал в этом случае передавался с помощью специального белка с «анкириновым повтором», связанного с титином. Этот белок освобождался от связи с титином и поступал в мышечные ядра при растяжении. Предполагается, что он мог стимулировать экспрессию генов, контролирующих анаболические процессы в волокне. Так механический сигнал мышечного растяжения мог трансформироваться в химический сигнал, стимулирующий синтез белка.

Основываясь на многочисленных данных об анаболических эффектах растяжения, эксцентрической

и в целом резистивной нагрузки, ряд авторов считают, что источником мышечной атрофии при гравитационной разгрузке является не прекращение сократительной активности волокна, а снижение «напряжения», т.е. нагрузочности, резистивности мышечного сокращения [11, 110]. Этот вывод подкрепляется, прежде всего, результатами экспериментов с непрерывной низкочастотной электростимуляцией на фоне вывешивания [110–112]. В этих экспериментах не удалось добиться даже частичного предотвращения атрофии камбаловидной мышцы. Интересно, что если использовать не непрерывную, а повторную электростимуляцию, то можно предотвратить не только снижение мышечной массы, но и снижение пассивной жесткости мышцы [113–115]. В исследованиях с 7-суточной иммерсией и механостимуляцией опорных афферентов нам удалось, не создавая дополнительного напряжения в камбаловидной мышце, добиться значительного снижения степени атрофии [6, 101]. В экспериментах с кратковременным (1–3 суток) вывешиванием задних конечностей крыс применение механостимуляции опорной поверхности стопы животного позволило полностью избежать повышения экспрессии протеолитических ферментов и частично предотвратить снижение интенсивности синтеза белка [116]. Поэтому можно предположить, что, по крайней мере, на начальном этапе разгрузки, сократительная активность, вызываемая активацией опорных афферентов, противодействуя распаду жесткой цитоскелетной сети и преодолевая ее «внутреннюю резистивность», позволяет частично или полностью предотвратить развитие мышечной атрофии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, известные к настоящему времени факты свидетельствуют о том, что

- собственная жесткость мышц конечностей человека и грызунов, поперечная и продольная, динамическая и статическая, закономерно снижается уже в течение первой недели экспозиции в условиях безопорности; наиболее интенсивно снижается жесткость зоны Z-диска;

- это снижение сопровождается снижением содержания белков саркомерного цитоскелета как гигантских – титина и небулина, так и белков Z-диска, стабилизирующих титиновые филаменты; при этом вклад изменений характера актомиозиновых взаимо-

действий в снижение жесткости при гравитационной разгрузке не представляется существенным;

- распад цитоскелетных белков осуществляется кальпаинами, представителями семейства кальций-зависимых цистеиновых протеаз, регуляция работы которых обусловлена работой синтазы оксида азота и некоторых белков теплового шока;

- активация мышечных сокращений в условиях работы механизма опорной афферентации приводит к снижению интенсивности распада цитоскелетных белков и поддержанию уровня жесткости мышцы, приближенного к нативному;

- собственная жесткость мышцы и работа белков цитоскелета являются необходимым условием предотвращения атрофии мышц при их бездействии.

Современное состояние вопроса о молекулярных механизмах снижения пассивной жесткости постральной мышцы в условиях моделируемой гравитационной разгрузки оставляет нерешенными ряд важнейших проблем:

- за счет изменения каких компонентов саркомера (поперечных мостиков, гигантских белков цитоскелета или минорных и регуляторных белков) происходит снижение жесткости изолированной мышцы на разных сроках пребывания животного в условиях гравитационной разгрузки;

- какие процессы приводят к распаду или инактивации саркомерных белков в условиях разгрузки;

- какую роль в этих процессах играет снижение мощности защитных механизмов;

- влияют ли белки межволоконного матрикса (прежде всего коллагены) на процессы снижения жесткости изолированной мышцы;

- каковы механизмы влияния белков цитоскелета на сигнальные механизмы регуляции анаболических процессов в волокне, и сказывается ли на работе этих механизмов снижение собственной жесткости мышцы.

Поиск ответов на эти вопросы – задачи будущих исследований. ●

*Работа поддержана Программой
фундаментальных исследований
ГНЦ РФ ИМБП РАН (госзадание) Тема 65.3.*

*Авторы выражают глубокую благодарность
М.В. Кушенко за помощь в подготовке рукописи
к печати.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kozlovskaya I., Dmitrieva I., Grigorieva L., Kirenskaya A., Kreydich Yr. // Stance and Motion. / Eds Gurfinkel V.S., Ioffe M.Ye., Massion J. N.Y.: Plenum Press, 1988. P. 37–48.
2. Григорьев А.И., Козловская И.Б., Шенкман Б.С. // Рос. физиол. журн. им. И.М. Сеченова. 2004. Т. 90. № 5. С. 508–521.
3. Киренская А.В., Козловская И.Б., Сирота М.Г. // Физиол. человека. 1986. Т. 12. № 1. С. 617–632.
4. Roy R.R., Hodgson J.A., Aragon J., Day M.K., Kozlovskaya I., Edgerton V.R. // J. Gravit. Physiol. 1996. V. 3. № 1. P. 11–15.
5. Alford E.K., Roy R.R., Hodgson J.A., Edgerton V.R. // Exp. Neurol. 1987. V. 96. № 3. P. 635–649.

6. Kawano F, Nomura T, Ishihara A., Nonaka I., Ohira Y. // *Neuroscience*. 2002. V. 114. № 4. P. 1133–1138.
7. Kawano F, Ishihara A., Stevens J.L., Wang X.D., Ohshima S., Horisaka M., Maeda Y., Nonaka I., Ohira Y. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2004. V. 287. № 1. P. 76–86.
8. De-Doncker L., Kasri M., Picquet F., Falempin M. // *J. Exp. Biol.* 2005. V. 208. № 24. P. 4585–4592.
9. Farman G.P., Tachampa K., Mateja R., Cazorla O., Lacampagne A., de Tombe P.P. // *Pflugers Arch.* 2008. V. 455. № 6. P. 995–1005.
10. Allingham J.S., Smith R., Rayment I. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2005. V. 12. № 4. P. 378–379.
11. Shulzhenko E.B., Vil-Vilyams I.F. // *Kosm. Biol. Aviakosm.* 1976. V. 10. P. 82–84.
12. Novikov V.E., Ilyin E.A. // *Aviat. Space Environ. Med.* 1981. V. 52. № 9. P. 551–553.
13. Morey-Holton E.R., Globus R.K. // *J. Appl. Physiol.* (1985). 2002. V. 92. № 4. P. 1367–1377.
14. Tyganov S.A., Mochalova E.P., Belova S.P., Sharlo K.A., Rozhkov S.V., Vilchinskaya N.A., Paramonova I.I., Mirzoev T.M., Shenkman B.S. // *Front. Physiol.* 2019. V. 10. Article #1252. doi: 10.3389/fphys.2019.01252
15. Canon F., Goubel F. // *Pflugers Arch.* 1995. V. 429. № 3. P. 332–337.
16. Toursel T., Stevens L., Granzier H., Mounier Y. // *J. Appl. Physiol.* (1985). 2002. V. 92. № 4. P. 1465–1472.
17. McDonald K.S., Fitts R.H. // *J. Appl. Physiol.* 1995. V. 79. № 5. P. 1796–1802.
18. Ogneva I.V. // *J. Appl. Physiol.* 2010. V. 109. P. 1702–1709.
19. Ogneva I.V., Ponomareva E.V., Altaeva E.G., Fokina N.M., Kurushin V.A., Kozlovskaya I.B., Shenkman B.S. // *Acta Astronaut.* 2011. V. 68. P. 1478–1485.
20. Granzier H.L., Wang K. // *Biophys. J.* 1993. V. 65. № 5. P. 2141–2159.
21. Campbell K.S., Lakie M. // *J. Physiol.* 1998. V. 510. № 3. P. 941–962.
22. Whitehead N.P., Weerakkody N.S., Gregory J.E., Morgan D.L., Proske U. // *J. Physiol.* 2001. V. 533. № 2. P. 593–604.
23. Granzier H.L., Irving T.C. // *Biophys. J.* 1995. V. 68. № 3. P. 1027–1044.
24. Irving T., Wu Y., Bekyarova T., Farman G.P., Fukuda N., Granzier H. // *Biophys. J.* 2011. V. 100. № 6. P. 1499–1508.
25. Muhle-Goll C., Habeck M., Cazorla O., Nilges M., Labeit S., Granzier H. // *J. Mol. Biol.* 2001. V. 313. № 2. P. 431–447.
26. Cazorla O., Vassort G., Garnier D., Le Guennec Y. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1999. V. 31. № 6. P. 1215–1227.
27. Kensler R.W., Harris S.P. // *Biophys. J.* 2008. V. 94. № 5. P. 1707–1718.
28. Ottenheijm C.A., Granzier H., Labeit S. // *Front. Physiol.* 2012. V. 3. P. 37.
29. Ducomps C., Mauriège P., Darche B., Combes S., Lebas F., Doutreloux J.P. // *Acta Physiol. Scand.* 2003. V. 178. № 3. P. 215–224.
30. Marcucci L., Bondi M., Randazzo G., Reggiani C., Natali A.N., Pavan P.G. // *PLoS One.* 2019. V. 14. № 1. P. e0224232.
31. Baldwin K.M., Haddad F., Pandorf C.E., Roy R.R., Edgerton V.R. // *Front. Physiol.* 2013. V. 4. P. 284.
32. Shenkman B.S. // *Acta Naturae.* 2016. V. 8. № 4 (31). P. 47–59.
33. Riley D.A., Bain L., Romatowski J.G., Fitts R.H. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2005. V. 288. № 2. P. 360–365.
34. Riley D.A., Bain J.L., Thompson J.L., Fitts R.H., Widrick J.J., Trappe S.W., Trappe T.A., Costill D.L. // *J. Appl. Physiol.* (1985). 2002. V. 92. № 2. P. 817–825.
35. Riley D.A., Bain J.L., Thompson J.L., Fitts R.H., Widrick J.J., Trappe S.W., Trappe T.A., Costill D.L. // *J. Appl. Physiol.* (1985). 2000. V. 88. № 2. P. 567–572.
36. Riley D.A., Bain J.L., Thompson J.L., Fitts R.H., Widrick J.J., Trappe S.W., Trappe T.A., Costill D.L. // *Muscle Nerve.* 1998. V. 21. № 10. P. 1280–1289.
37. Shenkman B.S., Litvinova K.S., Nemirovskaya T.L., Podlubnaya Z.A., Vikhlyantsev I.M., Kozlovskaya I.B. // *J. Gravit. Physiol.* 2004. V. 11. № 2. P. 111–114.
38. Подлубная З.А., Вихлянцев И.М., Мухина А.М., Немировская Т.Л., Шенкман Б.С. // *Биофизика.* 2004. Т. 49. № 3. С. 424–429.
39. Galazzo L., Nogara L., LoVerso F., Polimeno A., Blaauw B., Sandri M., Reggiani C., Carbonera D. // *Am. J. Physiol. Cell. Physiol.* 2019. V. 316. № 5. P. 722–730.
40. Petrova L.O., Tyganov S.A., Mirzoev T.M., Tsaturyan A.K., Kozlovskaya I.B., Shenkman B.S. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2018. V. 481. P. 205–207.
41. Linke W.A. // *Annu. Rev. Physiol.* 2018. № 80. P. 389–411.
42. Kasper C.E., Xun L. // *Biol. Res. Nurs.* 2000. V. 2. № 2. P. 107–115.
43. Shenkman B.S., Nemirovskaya T.L., Belozerova I.N., Vikhlyantsev I.M., Matveeva O.A., Staroverova K.S., Podlubnaya Z.A. // *J. Gravit. Physiol.* 2002. V. 9. № 1. P. 139–140.
44. Goto K., Okuyama R., Honda M., Uchida H., Akema T., Ohira Y., Yoshioka T. // *J. Appl. Physiol.* (1985). 2003. V. 94. № 3. P. 897–902.
45. Nishikawa K.C., Monroy J.A., Uyeno T.E., Yeo S.H., Pai D.K., Lindstedt S.L. // *Proc. Biol. Sci.* 2012. V. 279. № 1730. P. 981–990.
46. Ingalls C.P., Warren G.L., Armstrong R.B. // *J. Appl. Physiol.* 1999. V. 87. № 1. P. 386–390.
47. Ingalls C.P., Wenke J.C., Armstrong R.B. // *Aviat. Space Environ. Med.* 2001. V. 72. № 5. P. 471–476.
48. Shenkman B.S., Nemirovskaya T.L. // *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 2008. № 29. P. 221–230.
49. Пономарева Е.В., Кравцова В.В., Качаева Е.В., Алтаева Э.Г., Вихлянцев И.М., Подлубная З.А., Кривой И.И., Шенкман Б.С. // *Биофизика.* 2008. Т. 53. № 6. С. 1087–1094.
50. Ulanova A.D., Gritsyna Y.V., Salmov N.N., Lomonosova Y.N., Belova S.P., Nemirovskaya T.L., Shenkman B.S., Vikhlyantsev I.M. // *Front. Physiol.* 2019. V. 10. Article # 1221.
51. Уланова А.Д., Грицына Ю.В., Жалимов В.К., Бобылёва Л.Г., Белова С.П., Немировская Т.Л., Шенкман Б.С., Вихлянцев И.М. // *Биофизика.* 2019. Т. 64. № 5. С. 854–860.
52. Linke W.A., Hamdani N. // *Circ. Res.* 2014. V. 114. № 6. P. 1052–1068.
53. Krüger M., Linke W.A. // *J. Muscle Res. Cell. Motil.* 2006. V. 27. № 5–7. P. 435–444.
54. Müller A.E., Kreiner M., Kötter S., Lassak P., Bloch W., Suhr F., Krüger M. // *Front. Physiol.* 2014. № 5. P. 449.
55. Ottenheijm C.A., van Hees H.W., Heunks L.M., Granzier H. // *Am. J. Physiol. Lung Cell Mol. Physiol.* 2011. № 300. P. 161–166.
56. van Hees H.W., Schellekens W.J., Andrade Acuña G.L., Linkels M., Hafmans T., Ottenheijm C.A., Granzier H.L., Scheffer G.J., van der Hoeven J.G., Dekhuijzen P.N., Heunks L.M. // *Intensive Care Med.* 2012. № 38. P. 702–709.
57. van der Pijl R.J., Granzier H.L., Ottenheijm C.A. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2019. № 317. P. 167–176.
58. Ulanova A., Gritsyna Y., Vikhlyantsev I., Salmov N., Bobylev A., Abdusalamova Z., Rogachevsky V., Shenkman B., Podlubnaya Z. // *Biomed. Res. Int.* 2015. V. 2015. P. 104735.
59. Aweida D., Rudesky I., Volodin A., Shimko E., Cohen S. // *J. Cell. Biol.* 2018. V. 217. № 10. P. 3698–3714.
60. Harwood A.J. // *Cell.* 2015. № 105. P. 821–824.
61. Drenning J.A., Lira V.A., Simmons C.G., Soltow Q.A., Sellman J.E., Criswell D.S. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2008.

- № 294. P. 1088–1095.
62. Szczesna D., Zhao J., Jones M., Zhi G., Stull J., Potter J.D. // *J. Appl. Physiol.* (1985). 2002. V. 92. № 4. P. 1661–1670.
63. Ryder J.W., Lau K.S., Kamm K.E., Stull J.T. // *J. Biol. Chem.* 2007. V. 282. № 28. P. 20447–20454.
64. Bozzo C., Stevens L., Toniolo L., Mounier Y., Reggiani C. // *Am. J. Physiol. Cell Physiol.* 2003. V. 285. № 3. P. 575–583.
65. Ackermann M.A., Kontrogianni-Konstantopoulos A. // *Front. Physiol.* 2013. V. 4. P. 391.
66. Heng A.E., Ventadour S., Jarzaguet M., Pouch-Pélessier M.N., Guezennec C.Y., Bigard X., Attaix D., Taillandier D. // *Int. J. Biochem. Cell Biol.* 2008. V. 40. № 11. P. 2544–2552.
67. Мирзоев Т.М., Шенкман Б.С., Ушаков И.Б., Огнева И.В. // *ДАН.* 2012. Т. 44. № 2. С. 216–218.
68. Grison M., Merkel U., Kostan J., Djinić-Carugo K., Rief M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 5. P. 1015–1020.
69. Wood L.K., Kayurov E., Gumucio J.P., Mendias C.L., Claflin D.R., Brooks S.V. // *J. Appl. Physiol.* (1985). 2014. V. 117. № 4. P. 363–369.
70. Meyer L. // *J. Biomech.* 2011. V. 44. № 4. P. 771–773.
71. Kovanen V. // *Exerc. Sport Sci. Rev.* 2002. V. 30. № 1. P. 20–25.
72. Belozeroва I.N., Sherkman B.S., Mazin M.G., Leblanc A. // *J. Gravit. Physiol.* 2001. V. 8. № 1. P. 71–72.
73. Шенкман Б.С., Белозерова И.Н., Матвеева О.А., Мазин М.Г., Немировская Т.Л., Киселева Е.В., Козловская И.Б. // *Биол. мембраны.* 2003. V. 20. № 1. P. 77–86.
74. Matsumoto T., Ono T., Ishikura H., Aihara K., Sato Y., Tazaka A., Umei N., Tsumiyama W., Oki S. // *J. Phys. Ther. Sci.* 2017. № 29. P. 1192–1195.
75. Martin T.P. // *Cell Tissue Res.* 1988. № 254. P. 251–253.
76. Ahtikoski A.M., Koskinen O.A., Virtanen P., Kovanen V., Takala T.E.S. // *Acta Physiol. Scand.* 2001. № 172. P. 131–140.
77. Hirose T., Nakazato K., Song H., Ishii N. // *J. Appl. Physiol.* 2008. № 104. P. 170–177.
78. Heinemeier K.M., Olesen J.L., Haddad F., Schjerling P., Baldwin K.M., Kjaer M. // *J. Appl. Physiol.* 2009. № 106. P. 178–186.
79. Kaasik P., Riso E.M., Seene T. // *Int. J. Sports Med.* 2011. № 32. P. 247–253.
80. Nielsen R.O., Schjerling P., Tesch P., Stål P., Langberg H. // *Muscles, Ligaments Tendons J.* 2015. V. 5. № 4. P. 305–309.
81. Miller T.A., Lesniewski L.A., Muller-Delp J.M., Majors A.K., Scalise D., Delp M.D. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2001. № 281. P. 1710–1717.
82. Murphy R.M., Verburburg E., Lamb G.D. // *J. Physiol.* 2006. V. 576. № 2. P. 595–612.
83. Enns D.L., Belcastro A.N. // *Can. J. Physiol. Pharmacol.* 2006. № 84. P. 601–609.
84. Enns D.L., Raastad T., Ugelstad I., Belcastro A.N. // *Eur. J. Appl. Physiol.* 2007. V. 100. № 4. P. 445–455.
85. Алтаева Э.Г., Лысенко Л.А., Канцерова Н.П., Немова Н.Н., Шенкман Б.С. // *ДАН.* 2010. Т. 433. № 1. С. 138–141.
86. Ma X.W., Li Q., Xu P.T., Zhang L., Li H., Yu Z.B. // *Mol. Cell. Biochem.* 2011. V. 354. № 1–2. P. 171–180.
87. Белова С.П., Ломоносова Ю.Н., Шенкман Б.С., Немировская Т.Л. // *ДАН.* 2015. Т. 260. № 1. С. 98–101.
88. Tidball J.G., Spencer M.J. // *J. Physiol.* 2002. V. 545. № 3. P. 819–828.
89. Michetti M., Salamino F., Melloni E., Pontremoli S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1995. № 207. P. 1009–1014.
90. Sherkman B.S., Nemirovskaya T.L., Lomonosova Y.N. // *Front. Physiol.* 2015. № 6. P. 298.
91. Ломоносова Ю.Н., Каламжаров Г.Р., Бугрова А.Е., Шевченко Т.Ф., Карташкина Н.Л., Лысенко Е.А., Швеиц В.И., Немировская Т.Л. // *Биохимия.* 2011. Т. 6. № 5. С. 699–710.
92. Senf S.M., Dodd S.L., McClung J.M., Judge A.R. // *FASEB J.* 2008. V. 22. № 11. P. 3836–3845.
93. Voelkel T., Andresen C., Unger A., Just S., Rottbauer W., Linke W.A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2013. V. 1833. № 4. P. 812–822.
94. Ishihara A., Fujino H., Nagatomo F., Takeda I., Ohira Y. // *J. Physiol. Sci.* 2008. V. 8. № 6. P. 413–417.
95. Lawler J.M., Song W., Kwak H.B. // *Muscle Nerve.* 2006. № 33. P. 200–207.
96. Lomonosova Y.N., Sherkman B.S., Nemirovskaya T.L. // *FASEB J.* 2012. № 26. P. 4295–4301.
97. Fry C.S., Kirby T.J., Kosmac K., McCarthy J.J., Peterson C.A. // *Cell Stem Cell.* 2017. № 20. P. 1–14.
98. Wang F., Wang J., He J., Li W., Li J., Chen S., Zhang P., Liu H., Chen X. // *BioMed. Res. Internat.* 2017. V. 2017. P. 8361237.
99. Эрнандес-Корво Р., Козловская И.Б., Крейдич Ю.В., Мартинес-Фернандес С., Рахманов А.С., Фернандес-Пон Е., Миненко В.А. // *Космич. биол. авиакосмич. мед.* 1983. Т. 17. № 2. С. 37–44.
100. Sherkman B.S., Kozlovskaya I.B. // *Front. Physiol.* 2019. V. 10. Article # 187.
101. Sherkman B.S., Podlubnaya Z.A., Vikhlyantsev I.M., Litvinova K.S., Udaltsov S.N., Nemirovskaya T.L., Lemesheva Yu.S., Mukhina A.M., Kozlovskaya I.B. // *Biophysics.* 2004. № 49. P. 807–815.
102. Litvinova K.S., Vikhlyantsev I.M., Kozlovskaya I.B., Podlubnaya Z.A., Sherkman B.S. // *J. Gravit. Physiol.* 2004. № 11. P. 131–132.
103. Moukhina A.M., Sherkman B.S., Blottner D., Nemirovskaya T.L., Lemesheva Y.N., Püttmann B., Kozlovskaya I.B. // *J. Gravit. Physiol.* 2004. № 11. P. 137–138.
104. Kötter S., Andresen C., Krüger M. // *Biol. Chem.* 2014. V. 395. № 11. P. 1341–1352.
105. Lange S., Xiang F., Yakovenko A., Vihola A., Hackman P., Rostkova E., Kristensen J., Brandmeier B., Franzen G., Hedberg B., et al. // *Science.* 2005. V. 308. № 5728. P. 1599–1603.
106. Puchner E.M., Alexandrovich A., Kho A.L., Hensen U., Schäfer L.V., Brandmeier B., Gräter F., Grubmüller H., Gaub H.E., Gautel M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 36. P. 13385–13390.
107. Shabarchin A.A., Tsaturyan A.K. // *Biomech. Model. Mechanobiol.* 2010. V. 9. № 2. P. 163–175.
108. Katzemich A., Kreisko N., Alexandrovich A., Elliott C., Schock F., Leonard K., Sparrow J., Bullard B. // *J. Cell. Sci.* 2012. V. 125. P. 3367–3379.
109. van der Pijl R., Strom J., Conijn S., Lindqvist J., Labeit S., Granzier H., Ottenheijm C. // *J. Cachexia Sarcopenia Muscle.* 2018. V. 9. № 5. P. 947–961.
110. Falempin M., Mounier Y. // *Acta Astronaut.* 1998. № 42. P. 489–501.
111. Leterme D., Falempin M. // *Pflugers Arch.* 1994. V. 426. № 1–2. P. 155–160.
112. Dupont E., Cieniewski-Bernard C., Bastide B., Stevens L. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2011. V. 300. № 2. P. 408–417.
113. Canon F., Goubel F., Guezennec C.Y. // *Eur. J. Appl. Physiol.* 1998. № 77. P. 118–124.
114. Guo B.S., Cheung K.K., Yeung S.S., Zhang B.T., Yeung E.W. // *PLoS One.* 2012. V. 7. № 1. P. e30348.
115. Zhang B.T., Yeung S.S., Yue Liu, Wang H.H., Wan Y.M., Ling S.K., Zhang H.Y., Li Y.H., Yeung E.W. // *BMC Cell Biol.* 2010. V. 11. P. 87.
116. Tyganov S.A., Mochalova E.P., Belova S.P., Sharlo K.A., Rozhkov S.V., Vilchinskaya N.A., Paramonova I.I., Mirzoev T.M., Sherkman B.S. // *Front. Physiol.* 2019. V. 10. P. 1252.

УДК 616-006

Роль белков MCTS1 и DENR в регуляции механизмов, ассоциированных со злокачественным перерождением клеток

Е. Ю. Широкова^{1,2*}, В. С. Прасолов¹, П. В. Спирин¹¹Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия²Московский физико-технический институт (Национальный исследовательский университет), Долгопрудный, 141701 Россия

*E-mail: elena.j.shirokova@phystech.edu

Поступила в редакцию 01.09.2020

Принята к печати 28.09.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11181

РЕФЕРАТ Белки MCTS1 (Malignant T-cell-amplified sequence 1) и DENR (Density regulated re-initiation and release factor) участвуют в реинициации трансляции. В функциональном и структурном отношении комплекс этих белков является аналогом неканонического фактора инициации трансляции eIF2D. Считается, что повышенная экспрессия MCTS1 и DENR сопряжена с развитием ряда злокачественных заболеваний. Известно, что MCTS1 вовлечен в регуляцию клеточного цикла, апоптоза и механизмов иммунного надзора, тогда как роль DENR в развитии злокачественных заболеваний остается практически неизученной. Отдельные данные свидетельствуют о том, что уровень экспрессии DENR может иметь прогностическое значение при раке легкого, желудка, раке почки, а также гепатоцеллюлярной карциноме. Также известно, что этот белок может быть вовлечен в регуляцию циклических процессов, связанных со сменой дня и ночи. В обзоре рассмотрены данные об этих белках с целью определения возможности их применения как потенциальных прогностических и терапевтических мишеней при борьбе со злокачественными заболеваниями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА белки MCTS1 и DENR, злокачественное перерождение клеток, факторы инициации трансляции, сигнальные каскады, апоптоз, клеточный цикл.

ВВЕДЕНИЕ

Принято считать, что возникновение мутаций, ассоциированных со злокачественной трансформацией клеток, приводит к нарушению экспрессии значительного числа генов, белковые продукты которых вовлечены в регуляцию активности многих сигнальных каскадов. Эти каскады участвуют в механизмах, ответственных за дифференцировку, пролиферацию, чувствительность к апоптотическим сигналам, ростовым факторам и цитокинам.

Нарушения баланса сигнальных каскадов могут приводить к трансформации клеток с последующим формированием опухоли. Поиск генов-мишеней и кодируемых ими белков, вовлеченных в злокачественную трансформацию клеток, является одной из основных задач современной противоопухолевой биомедицины. В настоящее время появляется все больше данных, свидетельствующих о том, что к числу таких генов можно отнести гены MCTS1 и DENR.

ЭКСПРЕССИЯ MCTS1 И DENR

Ген MCTS1 (Malignant T-cell-amplified sequence 1), локализованный на длинном плече X-хромосомы (Xq22–24), впервые был описан в 1998 году, тогда же была предложена гипотеза о его вовлеченности в развитие злокачественных заболеваний, в частности, онкотрансформацию T-клеток [1]. Позже показали, что белок MCTS1 имеет в своей структуре РНК-связывающий домен PUA, характерный для некоторых белков, связывающих тРНК и рРНК [2]. Затем установили, что PUA-домен MCTS1 участвует во взаимодействии с кэп-связывающим комплексом, один из компонентов которого – белок DENR – содержит домен SUI1, отвечающий за инициацию трансляции [3–5].

В настоящий момент известно, что в норме оба белка экспрессируются практически во всех тканях, однако механизмы, в регуляции которых они участвуют, все еще не установлены. Предполагается,

что MCTS1 участвует в регуляции различных процессов, включая и регуляцию клеточного цикла, и индукцию апоптоза. Ген, кодирующий белок DENR (Density regulated re-initiation and release factor) локализован на длинном плече хромосомы 12 (12q24.31). Свое название DENR получил, когда обнаружили тесную корреляцию между его количеством и плотностью клеток в культуре [6]. В 3'-нетранслируемой области мРНК DENR находятся участки, богатые аденином и урацилом. Такие участки часто оказываются областями связывания некоторых белков, участвующих в «обороте» мРНК. В частности, с аденин/урацил-богатыми участками 3'-нетранслируемой области мРНК DENR может связываться рибонуклеопротеин AUF1, при этом снижение экспрессии AUF1 с помощью РНК-интерференции приводит к увеличению количества белка DENR в клетках [7–9].

Сравнительно недавно в ходе анализа данных рибосомного профайлинга клеток линии NIH3T3 с нокдауном DENR обнаружили, что этот белок может связываться с короткой открытой рамкой считывания (uORF) мРНК гена CLOCK, одного из ключевых регуляторов циркадных ритмов [10, 11]. На основании этого сделан вывод, что DENR также может входить в число белков, потенциально вовлеченных в регуляцию циклических колебаний биологических процессов, связанных со сменой дня и ночи. На лабораторных мышах показано, что белки DENR и MCTS1 участвуют в миграции нейронов при формировании мозга. При этом в нейтральных клетках пациентов с аутизмом и синдромом Аспергера обнаружены мутации гена DENR (p.C37Y и p.P121L соответственно), приводящие к синтезу аномальных форм белка [12].

MCTS1 И DENR И РЕГУЛЯЦИЯ ТРАНСЛЯЦИИ

Как уже упомянуто выше, наиболее подробно изучено участие белков MCTS1 и DENR в регуляции трансляции. Сравнительно недавно стало известно, что комплекс MCTS1–DENR имеет высокую степень гомологии с фактором инициации трансляции eIF2D [13]. Показано, что комплекс MCTS1–DENR играет важную роль в реинициации трансляции [14–18]. В эукариотических клетках реинициация трансляции может происходить, когда рибосома начинает трансляцию с короткой открытой рамки считывания (uORF), предшествующей основной. В этом случае происходит терминация трансляции с последующей ее реинициацией с основной рамки считывания [19]. Однако молекулярные механизмы, регулирующие реинициацию трансляции, пока недостаточно изучены. Известно, что в реинициации участвуют несколько факторов, в число которых входят так называемые канонические факторы инициации трансляции

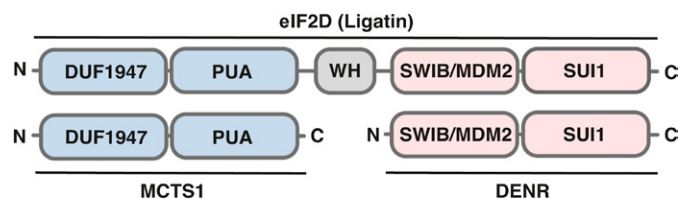


Рис. 1. Доменная организация DENR, MCTS1 и eIF2D. DUF1947 – домен, функция которого не установлена; PUA – РНК-связывающий домен; SWIB/MDM2 – области гомологии с одноименными белками – SWIB, вовлеченному в изменение структуры хроматина, и MDM2 – ингибитору p53; SUI1 – область белка, функционально сходная с фактором инициации трансляции eIF1; WH (winged helix) – ДНК-связывающий домен. Голубым выделены области гомологии с MCTS1, розовым – области гомологии DENR

eIF1, eIF2 и eIF3, которые остаются связанными с рибосомами после терминации на коротких uORF [20]. В дальнейшем установлено, что в механизм реинициации трансляции вовлечен eIF2D – более крупный белок с участком гомологии к MCTS1 в N-концевой области и к DENR – в C-концевой [14, 15].

На рис. 1 схематически показаны области гомологии данных белков.

На различных моделях, в том числе на клетках человека, показано, что DENR и MCTS1 участвуют в реинициации трансляции [18, 21]. При этом известно, что реинициация трансляции сопровождается образованием гетеродимерного комплекса MCTS1–DENR и его связыванием с тРНК [22]. Установлено, что гетеродимер MCTS1–DENR в процессе реинициации трансляции связывается с малой 40S субъединицей рибосомы при непосредственном участии MCTS1 и спирали h24 18S рРНК и взаимодействии C-концевого участка DENR с спиралью h44 18S рРНК. Считается, что в результате этого взаимодействия тРНК привлекается к Р-сайту 40S субъединицы рибосомы. С помощью рентгеноструктурного анализа C-концевого участка DENR установлена высокая степень гомологии этого белка и фактора инициации eIF1 [23], что также указывает на вовлеченность DENR в регуляцию трансляции.

MCTS1 В РЕГУЛЯЦИИ КЛЕТОЧНОГО ЦИКЛА И АКТИВНОСТИ CDK4/6

Белок MCTS1 участвует в регуляции клеточного цикла. Ранее было показано, что сверхэкспрессия MCTS1 увеличивает скорость пролиферации клеток NIH3T3, в частности, за счет ускорения прохождения фазы G1 клеточного цикла. При этом происходит стимуляция роста клеток [1]. Анализ роста клеток в полужидкой среде показал, что жизнеспособные

колонии способны образовывать только клетки со сверхэкспрессией *MCTS1* [1, 24, 25]. Показано, что эктопическая экспрессия гена *MCTS1* в зависимых от интерлейкина-2 (IL-2) Т-клетках линии EC155 человека приводит к снижению их чувствительности к сигналам апоптоза [24]. Прохождение клетками G1-фазы клеточного цикла осуществляется при участии циклинов D- и E-типа, а также циклинзависимых киназ (CDK). Циклины типа D образуют комплексы с CDK4 или CDK6 (рис. 2) [26–30]. Показано, что эктопическая экспрессия *MCTS1* в клетках NIH3T3 приводит к увеличению количества циклина D и эффективности образования комплексов циклин D/CDK4 и циклин D/CDK6 [24].

В нуклеотидной последовательности гена *MCTS1* обнаружен участок, имеющий ограниченную степень гомологии с последовательностью, кодирующей циклин H, а именно участок, отвечающий за белок-белковые взаимодействия [31]. Такая гомология между *MCTS1* и циклином H может косвенно указывать на участие белка *MCTS1* в регуляции клеточного цикла, а именно его митотической фазы.

МСТS1 И РЕГУЛЯЦИЯ АПОПТОЗА

Известно, что *MCTS1* вызывает снижение внутриклеточного уровня белков p53 и p21, что также может вносить вклад в злокачественное перерождение клеток и способствовать развитию опухоли [31]. Известно, что обработка клеток MCF-7 человека блеомицином, который вносит двухцепочечные разрывы в ДНК быстроделющихся клеток, приводит к увеличению экспрессии TP53 (p53). Показано, что эктопическая экспрессия *MCTS1* снижает уровень активации p53 в клетках, обработанных блеомицином, и, как следствие, эффективность апоптоза поврежденных клеток [31].

При этом клетки с эктопической экспрессией *MCTS1* содержат больше убиквитинированного p53 (Ub-p53) и фосфорилированного MDM2. Это говорит о том, что снижение количества p53, обусловленное высокой экспрессией *MCTS1*, может быть связано с MDM2-зависимой деградацией p53 в протеасомах [32]. Обработка таких клеток ингибитором протеасом MG132 приводила к повышению количества p53, что указывает на участие *MCTS1* в регуляции его стабильности [31].

С другой стороны, обработка клеток с эктопической экспрессией *MCTS1* блеомицином приводила к менее эффективному синтезу белка p21 – одного из основных мишеней p53, по сравнению с контрольными клетками. При подавлении экспрессии *MCTS1* с помощью siРНК наблюдалось повышение уровней экспрессии не только p53, но и p21 (рис. 3) [31]. Известно, что сигнальный каскад MEK/ERK

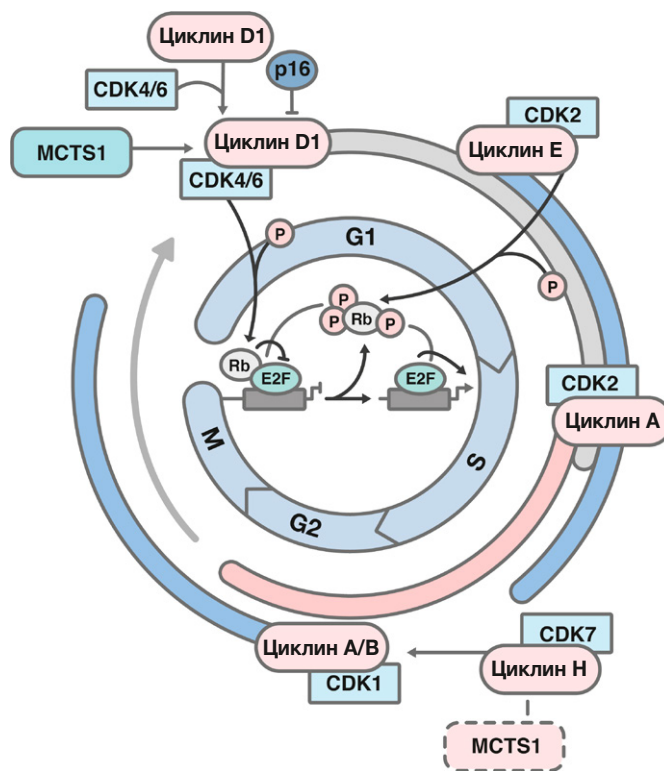


Рис. 2. Схема клеточного цикла. CDK – циклинзависимые киназы, участвуют в прохождении фаз клеточного цикла; фосфорилирование Rb (белок ретинобластомы) регулирует G1/S-переход клеточного цикла; E2F – фактор транскрипции; p16 (CDKN2A) – ингибитор CDK, замедляет переход клеток из фазы G1 в фазу S клеточного цикла; фазы клеточного цикла – G1 – пресинтетическая, S – синтетическая, G2 – постсинтетическая, M – митотическая

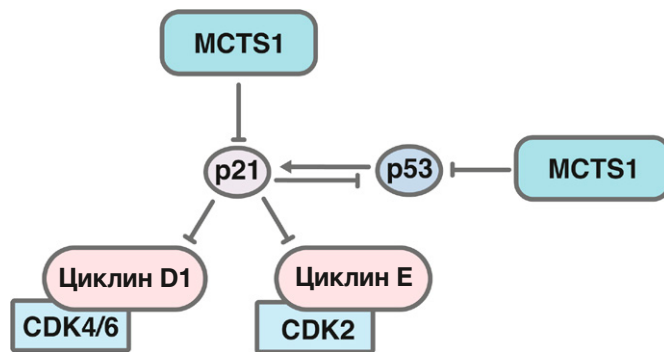


Рис. 3. Влияние *MCTS1* на проапоптотический белок p53 и его ингибитор p21. Образование комплексов циклина D1 с CDK4/6 и циклина E с CDK2 считается основным регулятором прохождения фазы G1 клеточного цикла

участвует в регуляции активности p53 и экспрессии p21 [33, 34]. Обнаружено, что MCTS1 усиливает фосфорилирование протеинкиназы ERK1/2 (pMAPK) [35], которая входит в один из основных сигнальных каскадов, вовлеченных в злокачественную трансформацию клеток, и ассоциирован с чувствительностью к химиотерапевтическим препаратам [36–39]. Подавление экспрессии MCTS1 (методом РНК-интерференции) в линиях клеток MCF-10A рака молочной железы и A549 рака легкого приводит к активации каспазы-3 и гибели этих клеток. При этом показано, что подавление экспрессии MCTS1 в ксенографтных опухолях рака легкого и рака молочной железы существенно подавляет развитие опухоли [35, 40].

СВЯЗЬ MCTS1 С ХРОМОСОМНОЙ НЕСТАБИЛЬНОСТЬЮ

В ходе выполнения цитогенетического анализа показано, что MCTS1 влияет на целостность генома. В частности, установлено, что облучение клеток линии MCF-7 со сверхэкспрессией MCTS1 приводит к увеличению числа хромосомных разрывов на 20%, образованию более крупных хромосом на 28% и сокращению расстояния между хроматидами на 62% по сравнению с контрольными образцами [31]. Таким образом, в клетках, экспрессирующих MCTS1, чаще возникают хромосомные aberrации.

Известно, что MCTS1 снижает чувствительность клеток к этопозиду, ингибитору топоизомеразы II. Чтобы сравнить чувствительность клеток, экспрессирующих MCTS1, к генотоксическому действию этопозиды, использовали метод ДНК-комет, который позволяет определить частоту двухцепочечных разрывов в ДНК и их репарации. Показано, что обработанные этопозидом клетки, сверхэкспрессирующие MCTS1, имели более короткий «хвост» ДНК-кометы, что говорит о более эффективном прохождении процессов репарации по сравнению с контрольными клетками с низким уровнем экспрессии MCTS1 [31]. Показано также, что снижение экспрессии MCTS1 может вызывать активацию протеолитического разрезания поли(ADP-рибоза)полимеразы (PARP) и снижение ее активности. PARP является одним из основных белков, отвечающих за репарацию ДНК, в том числе обусловленную действием химиотерапевтических препаратов [41]. Необходимо отметить, что ингибиторы PARP рассматриваются в качестве перспективных средств для борьбы с рядом злокачественных образований [42–44].

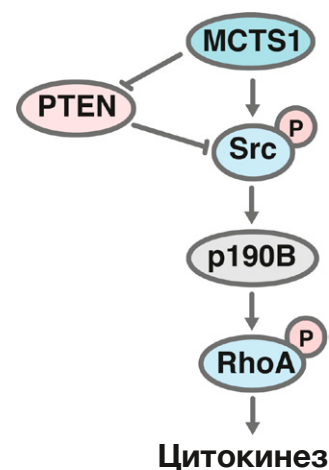
ВЛИЯНИЕ MCTS1 НА АКТ И СИГНАЛИНГ Src

Протеинфосфатаза PTEN – один из основных участников негативной регуляции сигнального ка-

скада АКТ (протеинкиназы В). Повреждение PTEN в результате мутаций или существенное снижение экспрессии этого белка может быть причиной злокачественной трансформации клеток [45–49]. Установлено, что эктопическая экспрессия MCTS1 в клетках перевиваемой линии рака молочной железы человека (MCF-10A) приводит к снижению уровня мРНК PTEN и количества синтезируемого белка PTEN [40]. Показано, что повышенная экспрессия MCTS1 сопровождается деградацией PTEN. MCTS1 стимулирует также взаимодействие белков Src и p190B, что приводит к образованию комплекса, ингибирующего RhoA (рис. 4), одного из основных факторов, регулирующих цитокинез [50].

Известно, что MCTS1 регулирует не только Src, но и сигнальный каскад Shc-Ras-ERK. Shc (трансформирующий белок 1 с доменом гомологии Src) представляет собой адапторный белок, участвующий в передаче сигнала при активации некоторых рецепторов [51], в частности рецептора эпидермального фактора роста (EGFR) [52], рецептора erbB-2 [53] и рецептора инсулина [54]. В клетках, как правило, присутствует несколько изоформ белка Shc. Избыток Shc ассоциирован с аномальной активацией сигнального каскада ERK [55], что, в свою очередь, существенно влияет на развитие и течение злокачественных заболеваний, в том числе на чувствительность злокачественных клеток к химиотерапевтическим препаратам. Показано, что подавление экспрессии MCTS1 с помощью РНК-интерференции в перевиваемых клетках рака молочной железы и легкого приводит к снижению количества изоформ p66, p52 и p46 белка Shc [35]. Непосредственное влияние MCTS1 на сигнальный путь, включающий Shc, может частично объяснять, каким образом повышение экспрессии MCTS1 связано с индукцией накопления циклина D1 и активацией фосфорилирования белка

Рис. 4. Влияние MCTS1 на PTEN/Src-сигналинг. PTEN – ингибитор сигнального каскада PI3K/AKT/mTOR; Src – протеинкиназа семейства Src-киназ, RhoA – малая GTP-аза семейства Ras



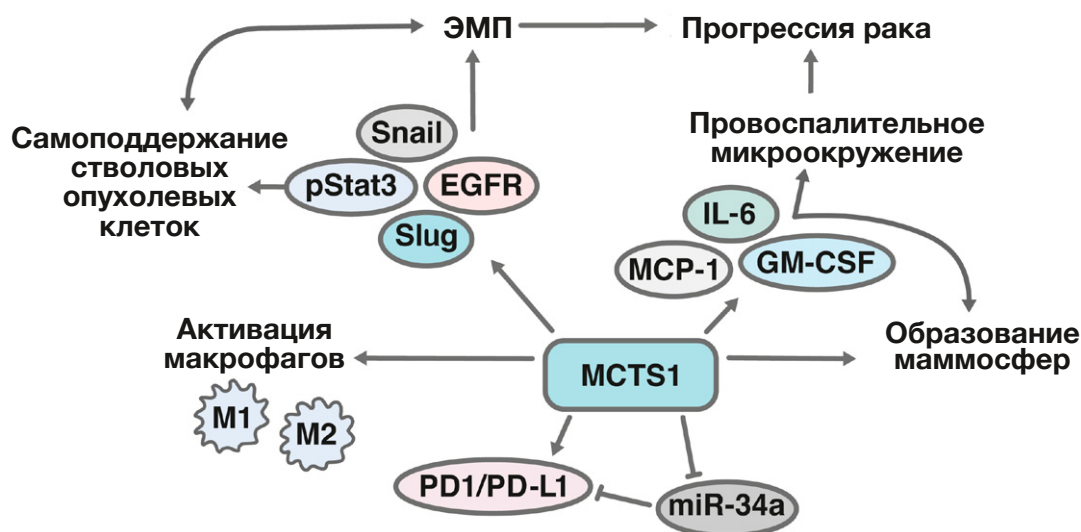


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая вклад MCTS1 в эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), реализацию механизма ухода опухолевых клеток от иммунного надзора и активацию провоспалительных факторов клетками опухоли. Snail, Slug – транскрипционные факторы, вовлеченные в ЭМП; EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; IL-6 – интерлейкин-6, MCP-1 – фактор хемотаксиса моноцитов, GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; M1 – классически активированные макрофаги, обеспечивающие продукцию провоспалительных цитокинов, M2 – макрофаги, отвечающие за реализацию противовоспалительных механизмов

Rb, что отражается на ускорении прохождения фазы G1 клеточного цикла (рис. 2).

РОЛЬ MCTS1 В СИГНАЛЬНОМ ПУТИ IL-6/IL-6R

Известно, что сигнальный путь IL-6/STAT3 участвует в регуляции самоподдержания стволовых клеток рака молочной железы [56]. Показано, что эктопическая экспрессия MCTS1 в линии клеток рака молочной железы человека (MDA-MB-231) стимулирует образование злокачественных опухолеподобных структур – маммосфер – при культивировании этих клеток в определенных условиях. Существенно, что увеличение экспрессии MCTS1 приводит к повышению уровней CD44 – маркера стволовых опухолевых клеток [57]. Обнаружено, что обработка клеток с эктопической экспрессией MCTS1 цитокином IL-6 приводит к еще более интенсивному образованию маммосфер, поэтому высказано предположение, что MCTS1 может быть вовлечен в регуляцию сигналинга IL-6 (рис. 5). Обработка клеток тоцилизумабом – моноклональным антителом, блокирующим рецептор IL-6, снижает интенсивность образования маммосфер в условиях индукции MCTS1, а также приводит к существенному снижению содержания клеток, несущих маркеры стволовых опухолевых клеток CD44+/CD24- до уровня, сопоставимого с контрольными образцами [57].

В ходе изучения связи MCTS1 и IL-6 с клиническим течением заболевания выявлена положительная корреляция между уровнями экспрессии этих белков у всех пациенток с трижды негативным раком молочной железы с дефицитом экспрессии рецептора эпидермального фактора роста (HER2), рецептора эстрогенов (ER) и рецептора прогестерона (PR). Более того, оказалось, что высокие уровни экспрессии MCTS1 и IL-6 коррелируют с риском развития метастазов [57].

Известно, что цитокины и факторы роста, продуцируемые клетками микроокружения опухоли, играют важную роль в прогрессии опухолей [58–60]. Установлено, что клетки трижды негативного рака молочной железы с повышенной экспрессией MCTS1 секретируют значительно больше провоспалительных цитокинов – IL-6, MCP-1 и GM-CSF, чем клетки с относительно более низким уровнем экспрессии данного гена [57].

MCTS1 И ИММУННЫЙ НАДЗОР ЗА ОПУХОЛЬЮ

При разработке подходов к иммунотерапии злокачественных заболеваний используют различные методы блокады иммунных контрольных точек, а именно рецепторов и лигандов, ответственных за регуляцию иммунного надзора [61]. Один из наиболее изучаемых в настоящее время механизмов основан на блокирова-

нии рецептора PD1 и его лиганда PD-L1. Повышенный уровень PD-L1 наблюдается при многих онкопатологиях. Считают, что аномально высокая экспрессия этого лиганда на поверхности злокачественных клеток связана с их уходом от иммунного надзора [62, 63]. Одобрено применение антител, нацеленных на PD1/PD-L1, при некоторых видах рака (меланома, немелкоклеточный рак легкого, лимфома Ходжкина, рак мочевого пузыря, почечно-клеточная карцинома, плоскоклеточный рак головы и шеи, рак молочной железы, карцинома из клеток Меркеля, гепатоцеллюлярная карцинома и рак желудка) [62]. Однако оказалось, что применение антител против PD1/PD-L1 эффективно только у части пациентов и не всегда позволяет добиться нужного результата. Известно, что в регуляции сигнального пути PD-L1 участвует микроРНК miR-34a [64, 65]. Показано, что повышение экспрессии miR-34a в раковых клетках вызывает выраженный противоопухолевый эффект [65].

MCTS1 способен индуцировать экспрессию PD-L1 и снижать при этом уровень miR-34a. Известно, что miR-34a может ингибировать эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП), индуцируемый при активации сигнального каскада TGF- β (трансформирующий фактор роста β) [66]. При этом miR-34a негативно влияет на экспрессию генов, кодирующих белки, участвующие в реализации ЭМП (Snail, Slug и ZEB1), а также белки, ассоциированные с поддержанием стволовых опухолевых клеток (BMI1, CD44, CD133, OLFM4, c-MYC) [67]. Помимо этого, miR-34a непосредственно участвует в регуляции активации макрофагов в микроокружении опухолей и тесно связана с иммунным ответом на опухолевые клетки. Все это позволяет предположить, что подавление MCTS1 и одновременная активация гена *miR-34a* можно рассматривать как перспективную стратегию терапии рака молочной железы.

РОЛЬ MCTS1 И DENR В РАЗВИТИИ ЗЛОКАЧЕСТВЕННЫХ ЗАБОЛЕВАНИЙ

Предположение о вовлеченности MCTS1 в онкотрансформацию лимфоидных клеток было высказано практически сразу после открытия данного гена. Это было связано с аномальной амплификацией MCTS1 в разных линиях злокачественных лимфоидных клеток. В нормальных лимфоидных тканях ген MCTS1 экспрессируется на низком уровне [67].

Повышение экспрессии MCTS1 выявлено в IL-2-независимых, но не в IL-2-зависимых T-клеточных линиях, включая IL-2-стимулированные лимфоциты периферической крови (PBL) [67]. Высокий уровень экспрессии MCTS1 обнаружен также в ряде трансформированных B-клеточных линий, полученных от пациентов с неходжкинской лимфомой [67].

Так, повышение уровня MCTS1 обнаружено в 41% образцов диффузной крупноклеточной B-клеточной лимфомы. Однако экспрессия MCTS1 не обнаружена в клетках хронического лимфолейкоза [67].

В дальнейшем показали, что повышение экспрессии MCTS1 характерно не только для злокачественных заболеваний лимфоидной природы.

С использованием метода Каплана-Мейера (kmplot.com) обнаружено, что высокая экспрессия MCTS1 в образцах опухолей при раке молочной железы связана с более низкой общей выживаемостью больных, чем больных с относительно более низким уровнем экспрессии MCTS1. Это характерно и для TP53-позитивных форм рака молочной железы, рака молочной железы без метастазов в лимфатические узлы, а также для HER2-отрицательного типа рака молочной железы и люминальных подтипов A и B рака молочной железы. Пациенты, в биоптатах которых выявлены относительно высокие уровни экспрессии MCTS1, имели более низкую безрецидивную выживаемость по сравнению с пациентами с низким уровнем MCTS1.

Повышенные уровни экспрессии MCTS1 выявлены также в образцах рака легкого. При этом высокие уровни экспрессии были характерны для всех четырех стадий заболевания [57].

В результате биоинформатического анализа транскриптома опухолевых клеток, полученных от пациентов с раком легкого, раком желудка, гепатоцеллюлярной карциномой и раком почки, показано, что низкие уровни экспрессии DENR коррелируют с более благоприятным течением заболевания и лучшим прогнозом [68]. Методом анализа обогащенности по функциональной принадлежности (GSEA) показано, что DENR может быть связан с регуляцией сигнальных каскадов, отвечающих за прохождение клеточного цикла, за репарацию ДНК и сплайсинг [68]. Анализ экспрессии DENR в метастазах рака легкого показал, что более высокая экспрессия этого гена характерна для метастазов в лимфатические узлы.

В диагностике злокачественных заболеваний широко используют определение онкомаркера альфа-фетопротеина в сыворотке крови. Повышенное количество альфа-фетопротеина обнаруживают в сыворотке крови при раке печени, молочной железы, желудка и иногда раке легкого [69, 70]. Также известно, что высокий уровень альфа-фетопротеина в сыворотке крови связан с плохим прогнозом у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой [71]. На основании биоинформатического анализа баз данных транскриптомов пациентов с различными онкологическими заболеваниями установлено, что высокий уровень экспрессии DENR в клетках опухоли

коррелирует с высоким содержанием альфа-фето-протеина в сыворотке крови [68].

Существенно, что более высокие уровни экспрессии *DENR* характерны для более поздних стадий прогрессии опухолей разного типа, включая гепатоцеллюлярную карциному, рак легкого, молочной железы, почки и прямой кишки. В одном из исследований отмечено, что относительно более высокие уровни экспрессии *DENR* могут указывать на повышенный риск развития глиомы у собак [72]. Это установлено на основе сравнительного анализа транскриптомов образцов головного мозга собак пород, предрасположенных к развитию глиомы, и пород, менее предрасположенных к данной группе заболеваний.

Приведенные выше сведения косвенно указывают на то, что *DENR* может быть связан с возникновением и развитием онкопатологий, а возможно, принимает непосредственное участие в развитии опухоли. Однако необходимо отметить, что большая часть ин-

формации, свидетельствующей в пользу этого предположения, получена путем биоинформатического анализа. При этом отсутствуют данные, указывающие на функциональное влияние этого белка на ростовые характеристики клеток и чувствительность к химиотерапевтическим препаратам. Необходимо также отметить, что в настоящий момент существует относительно небольшое количество данных, описывающих вовлеченность *DENR* в регуляцию экспрессии генов, участвующих в развитии злокачественных заболеваний.

Указанные факты свидетельствуют в пользу того, что белки *DENR* и *MCTS1* могут рассматриваться в качестве перспективных диагностических и терапевтических мишеней. ●

Работа выполнена при поддержке Российского фонда фундаментальных исследований (проект № 18-29-09151) и Российского научного фонда (грант № 21-14-00355).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Prośniak M., Dierov J., Okami K., Tilton B., Jameson B., Sawaya B.E., Gartenhaus R.B. // *Cancer Res.* 1998. V. 58. № 19. P. 4233–4237.
2. Hachem A., Nandi S. // *Translational Oncogenomics.* 2007. V. 2. P. 79–84.
3. Kasperaitis M.A.M., Voorma H.O., Thomas A.A.M. // *FEBS Lett.* 1995. V. 365. № 1. P. 47–50.
4. Yoon H.J., Donahue T.F. // *Mol. Cell. Biol.* 1992. V. 12. № 1. P. 248–260.
5. Reinert L.S., Shi B., Nandi S., Mazan-Mamczarz K., Vitolo M., Bachman K.E., He H., Gartenhaus R.B. // *Cancer Res.* 2006. V. 66. № 18. P. 8994–9001.
6. Deyo J.E., Chiao P.J., Tainsky M.A. // *DNA Cell. Biol.* 1998. V. 17. № 5. P. 437–447.
7. Vakilav S., Blume S.W., Grizzle W.E. // *Front. Oncol.* 2017. V. 7. P. 158.
8. Mazan-Mamczarz K., Hagner P.R., Dai B., Wood W.H., Zhang Y., Becker K.G., Liu Z., Gartenhaus R.B. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. № 19. P. 7730–7735.
9. Mazan-Mamczarz K., Gartenhaus R.B. // *Cancer Genomics-Proteomics.* 2007. V. 4. № 3. P. 233–239.
10. Castelo-Szekely V., Matos M.D., Tusup M., Pascolo S., Ule J., Gatfield D. // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № 10. P. 5193–5209.
11. Janich P., Arpat A.B., Castelo-Szekely V., Lopes M., Gatfield D. // *Genome Res.* 2015. V. 25. № 12. P. 1848–1859.
12. Haas M.A., Ngo L., Li S.S., Schleich S., Qu Z., Vanyai H.K., Cullen H.D., Cardona-Alberich A., Gladwyn-Ng I.E., Pagnamenta A.T., et al // *Cell Repts.* 2016. V. 15. № 10. P. 2251–2265.
13. Weisser M., Schäfer T., Leibundgut M., Böhringer D., Aylett C.H.S., Ban N. // *Mol. Cell.* 2017. V. 67. № 3. P. 447–456.
14. Dmitriev S.E., Terenin I.M., Andreev D.E., Ivanov P.A., Dunaevsky J.E., Merrick W.C., Shatsky I.N. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 35. P. 26779–26787.
15. Skabkin M.A., Skabkina O.V., Dhote V., Komar A.A., Hellen C.U.T., Pestova T.V. // *Genes Dev.* 2010. V. 24. № 16. P. 1787–1801.
16. Skabkin M.A., Skabkina O.V., Hellen C.U.T., Pestova T.V. // *Mol. Cell.* 2013. V. 51. № 2. P. 249–264.
17. Zinoviev A., Hellen C.U.T., Pestova T.V. // *Mol. Cell.* 2015. V. 57. № 6. P. 1059–1073.
18. Schleich S., Strassburger K., Janiesch P.C., Koledachkina T., Miller K.K., Haneke K., Cheng Y.-S., Kuchler K., Stoecklin G., Duncan K.E., et al. // *Nature.* 2014. V. 512. № 7513. P. 208–212.
19. Jackson R.J., Hellen C.U.T., Pestova T.V. // *Adv. Protein Chem. Struct. Biol. Acad. Press.* 2012. V. 86. P. 45–93.
20. Mohammad M.P., Pondělíčková V.M., Zeman J., Gunišová S., Valášek L.S. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № 5. P. 2658–2674.
21. Schleich S., Acevedo J.M., Hohenberg K.C., Teleman A.A. // *Sci. Repts.* 2017. V. 7. № 1. P. 1–11.
22. Ahmed Y.L., Schleich S., Bohlen J., Mandel N., Simon B., Sinning I., Teleman A.A. // *PLoS Biol.* 2018. V. 16. № 6. P. e2005160.
23. Lomakin I.B., De S., Wang J., Borkar A.N., Steitz T.A. // *Comp. Struct. Biotechnol. J.* 2020. V. 18. P. 696–704.
24. Dierov J., Prośniak M., Gallia G., Gartenhaus R.B. // *J. Cell. Biochem.* 1999. V. 74. № 4. P. 544–550.
25. Hsu H.L., Shi B., Gartenhaus R.B. // *Oncogene.* 2005. V. 24. № 31. P. 4956–4964.
26. Baldin V., Lukas J., Marcote M.J., Pagano M., Draetta G.F. // *Genes Dev.* 1993. V. 7. № 5. P. 812–821.
27. Draetta G.F. // *Curr. Opin. Cell Biol.* 1994. V. 6. № 6. P. 842–846.
28. Schafer K.A. // *Veterinary Pathol.* 1998. V. 35. P. 461–478.
29. Lovce H., Sewing A., Lucibello F.C., Müller R., Möröy T. // *Oncogene.* 1994. V. 9. № 1. P. 323.
30. Jiang W., Kahn S.M., Zhou P., Zhang Y.J., Cacace A.M., Infante A.S., Doi S., Santella R.M., Weinstein I.B. // *Oncogene.* 1993. V. 8. № 12. P. 3447–3457.
31. Hsu H.L., Choy C.O., Kasiappan R., Shih H.J., Sawyer J.R., Shu C.L., Chu K.L., Chen Y.R., Hsu H.F., Gartenhaus R.B. // *DNA Repair.* 2007. V. 6. № 9. P. 1319–1332.
32. Zhou B. P. Liao Y., Xia W., Spohn B., Lee M.H., Hung M.C. // *Nat. Cell Biol.* 2001. V. 3. № 3. P. 245–252.
33. Phelps M., Phillips A., Darley M., Blaydes J.P. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 17. P. 16651–16658.

34. Ostrakhovitch E.A., Cherian M.G. // *J. Cell. Biochem.* 2005. V. 95. № 6. P. 1120–1134.
35. Shih H.-J., Chen H.-H., Chen Y.-A., Wu M.-H., Liou G.-G., Chang W.-W., Chen L., Wang L.-H., Hsu H.-L. // *Oncotarget.* 2012. V. 3. № 11. P. 1401.
36. Spirin P.V., Lebedev T.D., Orlova N.N., Gornostaeva A.S., Prokofjeva M.M., Nikitenko N.A., Dmitriev S.E., Buzdin A.A., Borisov N.M., Aliper A.M., et al. // *Leukemia.* 2014. V. 28. № 11. P. 2222–2228.
37. Liu Q.H., Shi M.L., Sun C., Bai J., Zheng J.N. // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2015. V. 25. № 2. P. 192–197.
38. Spirin P., Lebedev T., Orlova N., Morozov A., Poymenova N., Dmitriev S.E., Buzdin A., Stocking C., Kovalchuk O., et al. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 34. P. 56991.
39. Salaroglio I.C., Mungo E., Gazzano E., Kopecka J., Riganti C. // *Internat. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 10. P. 2505.
40. Wu M.H., Chen Y.A., Chen H.H., Chang K.W., Chang I.S., Wang L.H., Hsu H.L. // *Oncogene.* 2014. V. 33. № 43. P. 5109–5120.
41. Javle M., Curtin N.J. // *British J. Cancer.* 2011. V. 105. № 8. P. 1114–1122.
42. Yi M., Dong B., Qin S., Chu Q., Wu K., Luo S. // *Exp. Hematol. Oncol.* 2019. V. 8. № 1. P. 29.
43. Chen A. // *Chinese J. Cancer.* 2011. V. 30. № 7. P. 463.
44. Farmer H., McCabe N., Lord C.J., Tutt A.N.J., Johnson D.A., Richardson T.B., Santarosa M., Dillon K.J., Hickson I., Knights C., et al. // *Nature.* 2005. V. 434. № 7035. P. 917–921.
45. Cantley L.C., Neel B.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1999. V. 96. № 8. P. 4240–4245.
46. Yin Y., Shen W.H. // *Oncogene.* 2008. V. 27. № 41. P. 5443–5453.
47. Simpson L., Parsons R. // *Exp. Cell Res.* 2001. V. 264. № 1. P. 29–41.
48. Lynch E.D., Ostermeyer E.A., Lee M.K., Arena J.F., Ji H., Dann J., Swisshelm K., Suchard D., MacLeod P.M., Kvinnsland S., et al. // *Am. J. Hum. Genet.* 1997. V. 61. № 6. P. 1254–1260.
49. Guigon C.J., Zhao L., Willingham M.C., Cheng S.Y. // *Oncogene.* 2009. V. 28. № 4. P. 509–517.
50. Chircop M. // *Small GTPases.* 2014. V. 5. № 2. P. e29770.
51. Ravichandran K.S. // *Oncogene.* 2001. V. 20. № 44. P. 6322–6330.
52. Pelicci G., Lanfrancone L., Grignani F., McGlade J., Cavallo F., Forni G., Nicoletti I., Grignani F., Pawson T., Pelicci P.G. // *Cell.* 1992. V. 70. № 1. P. 93–104.
53. Segatto O., Pelicci G., Giuli S., Digiesi G., Di Fiore P.P., McGlade J., Pawson T., Pelicci P.G. // *Oncogene.* 1993. V. 8. № 8. P. 2105–2112.
54. Pronk G.J., McGlade J., Pelicci G., Pawson T., Bos J.L. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 8. P. 5748–5753.
55. Honda H., Barrueto F.F., Gogusev J., Im D.D., Morin P.J. // *Reprod. Biol. Endocrinol.* 2008. V. 6. № 1. P. 59.
56. Peng D., Tanikawa T., Li W., Zhao L., Vatan L., Szeliga W., Wan S., Wei S., Wang Y., Liu Y., et al. // *Cancer Res.* 2016. V. 76. № 11. P. 3156–3165.
57. Weng Y.S., Tseng H.Y., Chen Y.A., Shen P.C., Haq A.T.A., Chen L.M., Tung Y.C., Hsu H.L. // *Mol. Cancer.* 2019. V. 18. № 1. P. 1–15.
58. Lu T., Sathe S.S., Swiatkowski S.M., Hampole C.V., Stark G.R. // *Oncogene.* 2004. V. 23. № 12. P. 2138–2145.
59. Kusmartsev S., Gabrilovich D.I. // *Cancer Metastasis Rev.* 2006. V. 25. № 3. P. 323–331.
60. Landskron G., De la Fuente M., Thuwajit P., Thuwajit C., Hermoso M.A. // *J. Immunol Res.* 2014. V. 2014. P. 1–19.
61. Korman A.J., Peggs K.S., Allison J.P. // *Adv. Immunol.* 2006. V. 90. P. 297–339.
62. Casey S.C., Tong L., Li Y., Do R., Walz S., Fitzgerald K.N., Gouw A.M., Baylot V., Gutgemann I., Eilers M., et al. // *Science.* 2016. V. 352. № 6282. P. 227–231.
63. Wu X., Gu Z., Chen Y., Chen B., Chen W., Weng L., Liu X. // *Comput. Struct. Biotechnol. J.* 2019. V. 17. P. 661–674.
64. Cortez M.A., Ivan C., Valdecanas D., Wang X., Peltier H.J., Ye Y., Araujo L., Carbone D.P., Shilo K., Giri D.K., et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* 2016. V. 108. № 1. P. djv303.
65. Wang X., Li J., Dong K., Lin F., Long M., Ouyang Y., Wei J., Chen X., Weng Y., He T., et al. // *Cell Signalling.* 2015. V. 27. № 3. P. 443–452.
66. Siemens H., Jackstadt R., Hüntten S., Kaller M., Menssen A., Götz U., Hermeking H. // *Cell Cycle.* 2011. V. 10. № 24. P. 4256–4271.
67. Shi B., Hsu H.L., Evens A.M., Gordon L.I., Gartenhaus R.B. // *Blood.* 2003. V. 102. № 1. P. 297–302.
68. Wang D., Wang L., Ren C., Zhang P., Wang M., Zhang S. // *Oncol. Lett.* 2019. V. 17. № 1. P. 141–148.
69. Chen W., Peng J., Ye J., Dai W., Li G., He Y. // *J. Cancer.* 2020. V. 11. № 2. P. 403.
70. Peng S.Y., Chen W.J., Lai P.L., Jeng Y.M., Sheu J.C., Hsu H.C. // *Internat. J. Cancer.* 2004. V. 112. № 1. P. 44–50.
71. Ryu T., Takami Y., Wada Y., Tateishi M., Matsushima H., Mikagi K., Saito H. // *J. Gastrointestinal Surgery.* 2017. V. 21. № 6. P. 957–966.
72. Truvé K., Dickinson P., Xiong A., York D., Jayashankar K., Pielberg G., Koltookian M., Murén E., Fuxelius H.-H., Weishaupt H., et al. // *PLoS Genet.* 2016. V. 12. № 5. P. e1006000.

УДК 57.056

На распутье: механизмы апоптоза и аутофагии в жизни и смерти клетки

В. Л. Шляпина¹, С. В. Юртаева², М. П. Рубцова³, О. А. Донцова^{1,3,4}¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия²НИИ Аджиномото-Генетика, Москва, 117545 Россия³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия⁴Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия

E-mail: mprubtsova@gmail.com

Поступила в редакцию 19.09.2020

Принята к печати 11.11.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11208

РЕФЕРАТ Апоптоз и аутофагия – это консервативные процессы, регулирующие выживание и гибель клеток в стрессовых условиях. Апоптоз направлен на удаление клеток из организма с минимальным повреждением окружающих тканей. Аутофагия способствует удалению поврежденных органелл, белковых агрегатов и клеточных патогенов, стимулируя выживание клеток. Сигнальные пути, участвующие в регуляции апоптоза и аутофагии, во многом перекрываются, приводя как к их конкуренции, так и к однонаправленному взаимодействию, что представляет особый интерес для их изучения в качестве потенциальных мишеней терапии опухолей, аутоиммунных и нейродегенеративных заболеваний. В настоящем обзоре проанализированы основные пути молекулярного взаимодействия аутофагии и апоптоза, что необходимо для понимания механизма поддержания баланса между гибелью и выживанием клеток в неблагоприятных условиях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА апоптоз, аутофагия, теломераза, сигнальные пути, регуляция.

ВВЕДЕНИЕ

Аутофагия – это процесс, который стимулируется внутриклеточными стрессами или стрессами окружающей среды. В результате образования аутофагосом и их слияния с лизосомами происходит направленное удаление поврежденных органелл, белковых агрегатов и внутриклеточных патогенов [1]. Изучение аутофагии приобрело огромное значение в последнее десятилетие, так как именно этот процесс участвует в регуляции метаболизма как клетки, так и организма. Нарушение регуляции аутофагии затрагивает основные метаболические функции клеток, что может приводить к развитию различных заболеваний [2]. В настоящее время получены достоверные доказательства того, что активация аутофагии при воздействии противоопухолевых препаратов может защищать раковые клетки от гибели, а снижение уровня аутофагии связано с развитием нейродегенеративных и аутоиммунных заболеваний и общим старением организма [3].

Апоптоз – эволюционно консервативный запрограммированный механизм гибели клеток, который позволяет проводить отбор клеток в ходе нормального развития эукариот и поддержания гомеостаза ор-

ганизма. При апоптозе в структуре клетки возникает ряд морфологических изменений, обусловленных протеканием ферментзависимых биохимических процессов, а также происходит выведение клеток из организма с минимальным повреждением окружающих тканей [4].

Низкий уровень гибели клеток, сопряженный с высоким уровнем пролиферации, может спровоцировать развитие таких заболеваний, как рак, тогда как чрезмерный уровень гибели клеток способствует возникновению таких заболеваний, как болезни Альцгеймера и Паркинсона, ревматоидный артрит [4]. С возрастом эффективность аутофагии снижается [5, 6], при этом наблюдается избыточная активация апоптоза [7], что ассоциировано со старением организма. В связи с этим актуальным представляется понимание молекулярных механизмов регулирования взаимодействия апоптоза и аутофагии, анализу которых посвящен настоящий обзор.

АПОПТОЗ

Апоптоз – это процесс контролируемой гибели клетки без выхода ее содержимого в окружающую среду, который называют запрограммированной гибелью

клеток [4]. Протекание этого процесса контролируют белки семейства Bcl-2, которые включают в себя как проапоптотические, так и антиапоптотические компоненты. Баланс этих компонентов определяет принятие решения о жизни или гибели клетки [8]. Стимуляция апоптоза приводит к активации прокаспаз – предшественников цистеин-аспарагиновых протеаз, известных как каспазы. Существуют две категории каспаз: инициаторные и эффекторные [9]. Специфические сигналы, свидетельствующие о повреждении клеток, стимулируют инициаторные каспазы (каспазы 8 и 9), которые активируются в результате автопротеолиза и гидролизуют предшественники эффекторных каспаз (каспазы 3, 6 и 7), обеспечивая их функционирование. Активация эффекторных каспаз инициирует каскад событий, которые приводят к разрушению ядерных белков и белков цитоскелета, сшивкам белков, экспрессии лигандов, узнаваемых фагоцитирующими клетками, образованию апоптотических телец и гибели клетки [10, 11]. В процессе апоптоза происходит фрагментация ДНК, которую осуществляют эндонуклеазы. Процесс апоптоза высоко консервативен у многоклеточных организмов и генетически контролируется [12]. Выделяют два механизма инициации апоптоза: внутренний и внешний. На *рис. 1* представлена схема механизмов апоптоза.

Внутренний механизм зависит от факторов, высвобождаемых из митохондрий [13], он включает в себя различные стимулы, которые действуют на несколько мишеней в клетке. Отсутствие цитокинов, гормонов и факторов роста приводит к активации внутриклеточных активаторов апоптоза семейства Bcl-2, таких, как PUMA (p53-усиливающий модулятор апоптоза), Noxa и BAX [4]. В нормальном состоянии эти белки обычно взаимодействуют с антиапоптотическими белками семейства Bcl-2. В условиях отсутствия сигналов к выживанию и пролиферации, а также при гипоксии, воздействии токсинов, радиации, активных форм кислорода и вирусов [14] происходит, как правило, накопление белка PUMA, избыток которого взаимодействует с проапоптотическими белками семейства Bcl-2, такими, как BAK и BAX. Транслокация последних в мембрану митохондрии приводит к открытию митохондриальной поры и релокализации проапоптотических белков, таких, как цитохром c, Smac/Diablo и HtrA2/Omi, в цитоплазму. Цитохром c – компонент дыхательной цепи митохондрий, попадая в цитоплазму, взаимодействует с Araf-1 (Apoptotic protease activating factor 1) и образует апоптосому [15], которая способствует активации инициаторной каспазы 9, запускающей каскад апоптотических реакций. Митохондриальные белки Smac/Diablo и HtrA2/Omi при попадании в цито-

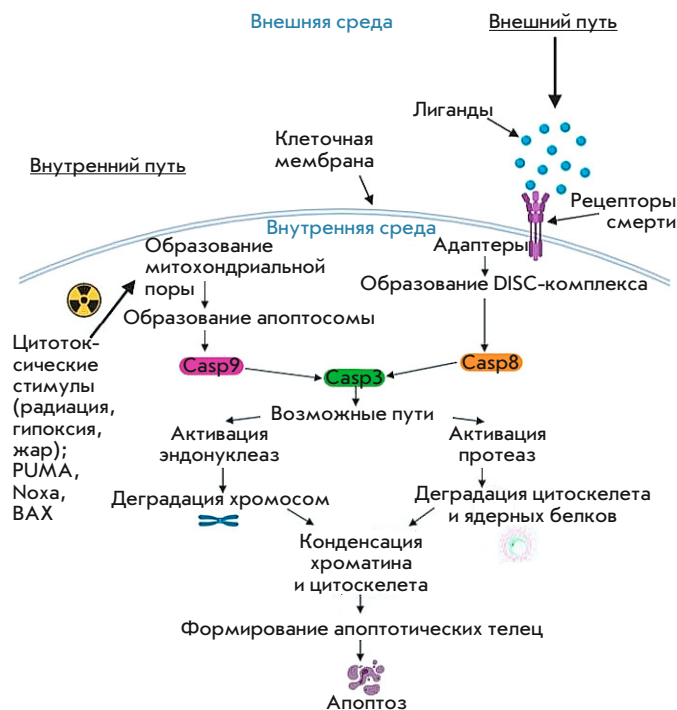


Рис. 1. Схема, иллюстрирующая внутренний и внешний механизмы активации апоптоза (по D'Arcy [4])

плазму взаимодействуют с ингибиторами апоптоза (белки IAP), что способствует высвобождению каспаз и их активации [4].

Внешний механизм активации апоптоза регулируется сигнальными каскадами, запускаемыми рецепторами смерти (DR-death receptor) [13]. Связывание лигандов смерти, секретируемых патрулирующими NK-клетками (Natural killer cells) или макрофагами, или заякоренных на поверхности лимфоцитов, с DR способствует взаимодействию его цитоплазматического домена, индуцирующего смерть клеток (DED – death effector domain), с мономерной прокаспазой 8 [16]. Образующийся при этом сигнальный комплекс DISC (Death-Inducing Signaling Complex) обеспечивает протеолитическую активацию каспазы 8. Процессированная каспаза индуцирует апоптоз, стимулируя активность эндонуклеаз и протеаз [4, 16].

Необходимо отметить ключевую роль транскрипционного фактора p53 в регуляции процесса апоптоза. p53 имеет короткое время жизни, а его количество в клетках млекопитающих остается низким в результате постоянного убиквитинирования и последующей дегградации. Однако в стрессовых условиях (повреждение ДНК, гипоксия, цитокины и др.) убиквитинирование p53 подавляется, он стабилизируется и накапливается в ядре. Активирующее фосфорилирование p53 обеспечивают различные киназы. В зависимости от условий это могут быть, например,

киназы, участвующие в контроле клеточного цикла (Chk – checkpoint kinases), сАМР-зависимая протеинкиназа А (РКА), регулятор липидного обмена, уровня глюкозы и гликогена; циклинзависимая киназа 7 (CDK7), участвующая в контроле клеточного цикла и регуляции транскрипционной активности РНК-полимеразы II; ДНК-зависимая протеинкиназа (DNA-РК), медиатор клеточного ответа на повреждения ДНК; а также киназы семейства MAPK (митоген-активируемые протеинкиназы), такие, как JNK (N-концевая киназа Jun). Фосфорилирование стимулирует олигомеризацию p53, в результате которой образуется тетрамер. Тетрамерный p53 активирует экспрессию генов, промоторные области которых содержат участки взаимодействия с p53 [17, 18], например, гены Fas-лигандов [19, 20], ген DR5, кодирующий рецептор смерти, взаимодействующий с цитокинами семейства факторов некроза опухоли TRAIL (TNF-ассоциированный апоптоз-индуцирующий лиганд). Участие p53 во внутреннем пути апоптоза связано с семейством белков Bcl-2, которые регулируют высвобождение цитохрома с из митохондрий. Ключевые проапоптотические гены семейства Bcl-2: BAX, Noxa, PUMA и BID являются мишенями p53 [21].

АУТОФАГИЯ

В процессе аутофагии различные клеточные компоненты или даже целые органеллы попадают в лизосомы, которые содержат ферменты, гидролизующие поглощенные компоненты [4]. Аутофагия стимулируется в ответ на различные воздействия, в том числе на недостаток АТФ и питательных ресурсов или сигналы, поступающие с поверхности поврежденных органелл или регулирующие дифференцировку клеток во время эмбриогенеза [22]. Процесс аутофагии лежит в основе функционирования адаптивного и врожденного иммунитета. Например, разрушение внутриклеточных патогенов и доставка антигенов в компартменты, содержащие МНС класса II, а также транспорт вирусных нуклеиновых кислот к Toll-подобным рецепторам происходят при участии аутофагосом [23]. Хотя аутофагия часто используется для рециркуляции клеточных компонентов, она может привести также к разрушению клетки. Таким образом, аутофагия связана с удалением стареющих клеток из тканей и разрушением опухолевых поражений [22]. Низкая эффективность аутофагии ассоциирована с развитием рака, а также, особенно в пожилом возрасте, с накоплением белковых агрегатов в нейронах и развитием нейродегенеративных состояний, включая болезнь Альцгеймера [24]. Активация аутофагии в быстро пролиферирующих клетках позволяет преодолевать дефицит внутриклеточных компонентов, необходимых для биосинтеза

[25]. Повышенный уровень аутофагии, часто наблюдаемый в раковых клетках, позволяет им более эффективно функционировать в условиях дефицита питательных веществ, а также способствует снижению чувствительности к цитотоксическим веществам [26].

В настоящее время выделяют три различные формы аутофагии – макроаутофагию, микроаутофагию и селективную аутофагию. При реализации макроаутофагии целые области клетки заключаются в двумембранные везикулы, называемые аутофагосомами. Аутофагосомы сливаются с лизосомами, превращаясь в аутофаголизосомы, содержимое которых деградирует под действием гидролитических ферментов [27]. На рис. 2 представлена общая схема образования аутолизосомы [4].

Пути регуляции аутофагии

На первых стадиях аутофагии комплекс ULK1, состоящий из киназы ULK1 (Unc-51 like autophagy activating kinase), белков ATG13 (autophagy related protein), FIP200 (focal adhesion kinase family interacting protein of 200 kDa) и ATG101, транслируется к сайтам инициации аутофагии и регулирует привлечение комплекса VPS34 (vacuolar protein sorting). VPS34, в состав которого входят фосфатидилинозитол-3-киназа I класса III (PI3K), VPS34, ATG14L, VPS15 и Beclin 1 (рис. 2), обеспечивая образование фосфатидилинозитол-3-фосфата (PI3P) в местах образования фагофора. PI3P служит сигналом для связывания ряда белков, которые формируют аутофагосому. Образовавшиеся фагофоры постепенно увеличиваются благодаря двум убиквитин-подобным конъюгирующим каскадам: ATG5-ATG12 и MAP-LC3/ATG8/LC3. Фагофор, по мере его удлинения, постепенно поглощает часть цитоплазмы, образуя двумембранную аутофагосому, путем слияния с самим собой. Наконец, слияние аутофагосомы с лизосомой приводит к образованию аутолизосомы, деградации содержимого, а полученные блоки макромолекул высвобождаются в цитозоль и могут повторно использоваться клеткой в качестве строительных блоков [28]. Центральным регулятором аутофагии считается киназа mTOR (mammalian target of rapamycin – мишень рапамицина млекопитающих). Подавление активности mTOR стимулирует образование комплекса ULK1 и активирует аутофагию.

Активация аутофагии внутренними или внешними стимулами подвержена многоступенчатой регуляции, в которую вовлечены основные клеточные сигнальные каскады. Наиболее изучены такие модуляторы аутофагии, как киназы PI3K, АКТ, АМРК, которые регулируют пролиферацию, метаболизм и выживание клеток. Активация

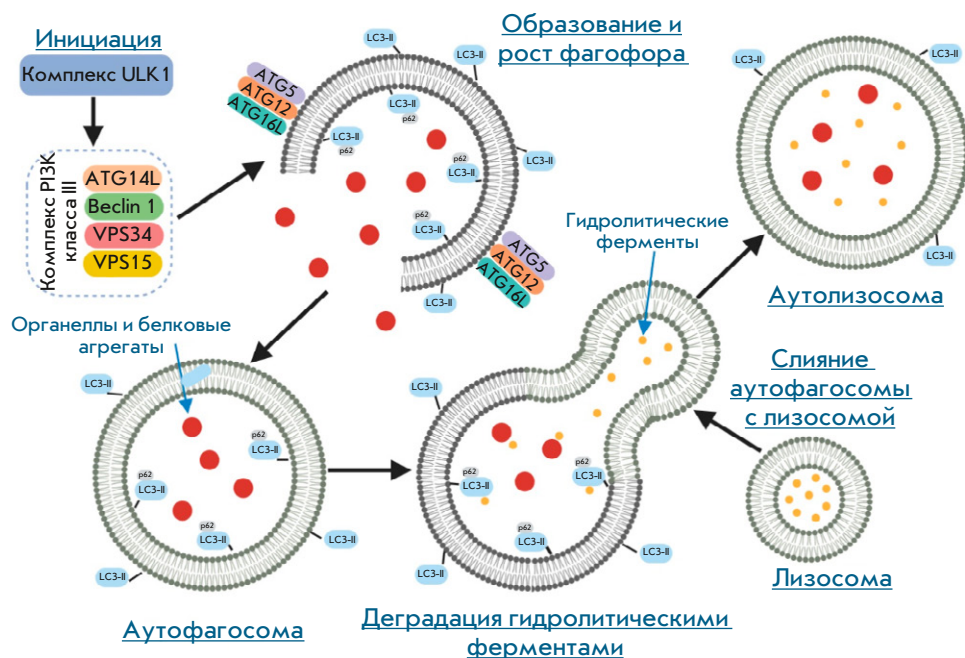


Рис. 2. Общая схема образования аутофаголизосомы (по D'Arcy [4]). Активация комплексов ULK1 и PI3K класса III стимулирует образование аутофагофора. Комплекс, состоящий из ATG5, ATG12 и ATG16L, вместе с LC3-II стимулирует удлинение фагофора и необходим для формирования аутофагосомы. Белок p62 взаимодействует с LC3-II и с белками, направляемыми на деградацию при помощи убиквитинирования, и поглощается аутофагосомой. Ферменты лизосомы гидролизуют содержимое аутофагосомы после их слияния

PI3K/АКТ/mTOR-опосредованного сигнального пути подавляет, как правило, аутофагию [29]. Модуляцию этого сигнального каскада обеспечивают PTEN (фосфатаза и гомолог тензина), инсулин, Sirt1, 5'-АМР-активируемая протеинкиназа (АМРК), митоген-активируемая протеинкиназа p38 (p38-МАРК) и p53. Стимуляции аутофагии способствует активация МАРК сигнального пути Ras/Raf/ERK, регулирующего функционирование N-JNK-киназ, вовлеченных в модуляцию пролиферации, дифференцировки, воспаления и апоптоза. Активирующие мутации в онкогенах *Ras* или *B-Raf* часто ассоциированы с онкотрансформацией клеток, а JNK регулируют апоптоз, обеспечивая посттрансляционное фосфорилирование Bcl-2 [30, 31].

На рис. 3 приведена схема механизмов, регулирующих аутофагию.

АУТОФАГИЯ И АПОПТОЗ: МОЛЕКУЛЯРНЫЕ ВЗАИМОДЕЙСТВИЯ

Как аутофагия, так и апоптоз играют важную роль в процессах развития, поддержания гомеостаза тканей и в патогенезе многих заболеваний. К настоящему времени накапливается все больше данных о том, что основные молекулярные компоненты сигнальных путей аутофагии и апоптоза находятся в сложных перекрестных взаимоотношениях и нередко индуцируются сходными стимулами. Например, экспериментально показано, что как апоптоз, так и аутофагия активируются в ответ на метаболический стресс [32] или воздействие активных форм кислорода [33]. Интересные данные о взаимодействии аутофагии

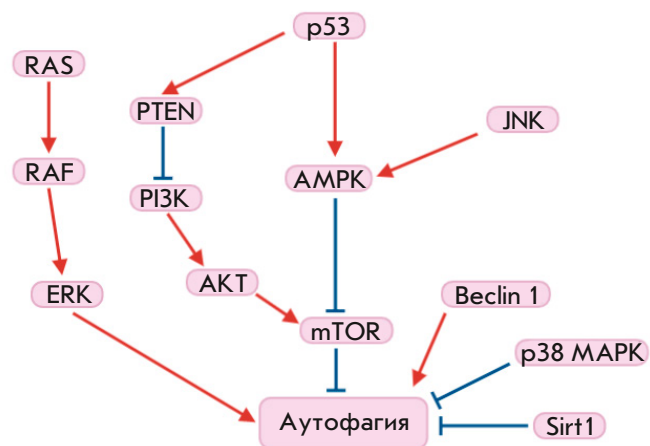


Рис. 3. Схема регуляторных механизмов аутофагии (по Jiang [1])

и апоптоза получены при анализе молекулярных механизмов стресса эндоплазматического ретикулума. Адаптивным ответом клеток на нарушение гомеостаза кальция или функций эндоплазматического ретикулума является усиление аутофагии и апоптотической гибели клеток [34].

Можно выделить несколько основных вариантов функциональных взаимодействий между апоптозом и аутофагией. В случае «партнерских отношений» апоптоз и аутофагия действуют в едином направлении, приводя к гибели клеток. В случае «антагонистических отношений» апоптоз и аутофагия представляют собой процессы, имеющие разные цели. Аутофагия в данном случае не приводит к гибели клеток и, кроме того, снижает эффективность апоп-

тоза, создавая условия, благоприятствующие выживанию клеток. В случае «активирующих отношений» аутофагия способствует реализации апоптотической программы, обеспечивая выполнение определенных этапов, но сама не приводит к смерти клетки [35].

Таким образом, аутофагия и апоптоз могут взаимодействовать, противодействовать или способствовать друг другу, по-разному влияя на судьбу клетки. При этом можно выделить несколько основных молекулярных путей, которые обеспечивают сложные функциональные взаимодействия между процессами аутофагии и апоптоза.

Beclin 1 в регуляции выбора между аутофагией и апоптозом

Важным компонентом преаутофагосомы является белок Beclin 1, играющий регуляторную роль в выборе механизма ответа на стресс. Семейство белков Bcl-2 (Bcl-2, Bcl-xL и Mcl-1) включает хорошо известные антиапоптотические медиаторы, роль которых в подавлении аутофагии продолжает исследоваться. Цитопротекторная функция белков Bcl-2 обусловлена их способностью взаимодействовать с BAX и BAK и предотвращать таким образом апоптоз [36]. Белок Beclin 1 содержит ВНЗ-домен, гомологичный доменам Bcl-2. Этот белок определяет судьбу клетки в условиях стресса, модулируя взаимодействие процессов аутофагии и апоптоза. Beclin 1 рекрутирует ключевые аутофагические белки в преаутофагосомную структуру [4]. ВНЗ-домен Beclin 1 отвечает за взаимодействие с антиапоптотическими членами семейства Bcl-2 (рис. 4), что мешает сборке преаутофагосомной структуры и приводит к ингибированию аутофагии [36]. При стрессе, вызванном голоданием, киназа JNK фосфорилирует Bcl-2, что способствует диссоциации комплекса Bcl-2–Beclin 1 и появлению возможности последующей сборки преаутофагосомной структуры и протекания

аутофагии [37]. Длительная активация JNK-каскада и фосфорилирование Bcl-2 приводят к апоптозу в связи с активацией каспазы 3 [36]. Показано, что такие киназы, как ассоциированная с гибелью клеток протеинкиназа DAPK, Rho-ассоциированная киназа 1 (ROCK1), участвующая в регуляции пролиферации клеток, воспаления и адгезии [38, 39], а также МК2 и МК3, служащие субстратами p38 MAPK [40], осуществляют ингибирующее фосфорилирование ВНЗ-домена Beclin 1 и блокируют сборку преаутофагосомы. Стимулирующий эффект оказывает киназа Mst1, регулятор функционирования эффекторных Т-клеток и дифференцировки регуляторных Т-клеток. Фосфорилирование ВНЗ-домена Beclin 1 киназой Mst1 способствует взаимодействию Bcl-2–Beclin 1 [38], предотвращая таким образом сборку комплекса PI3K класса III, что приводит к ингибированию аутофагии. Схема образования активного комплекса PI3K класса III приведена на рис. 4.

Сигнальные пути с участием киназы mTOR

Одной из точек молекулярного взаимодействия путей аутофагии и апоптоза является киназа mTOR – серин/треониновая киназа из семейства фосфатидилинозитолкиназ, которая играет важную роль в регуляции процессов роста и старения. Активность киназы mTOR меняется в зависимости от внешних и внутренних факторов: наличия/отсутствия питательных веществ, АТФ, факторов роста, факторов стресса [1].

Известно, что mTOR входит в состав двух комплексов: mTORC1, состоящего из mTOR, mLST8, DEPTOR, RAPTOR и PRAS40, и mTORC2, состоящего из mTOR, mLST8, DEPTOR, RICTOR, mSIN1 и PROTOR. mTORC1, фосфорилируя киназу рибосомного белка S6 (p70 S6K1) и белок, связывающий фактор инициации трансляции 4E (4EВP1), стимулирует биосинтез белка. mTORC1 осуществляет регу-

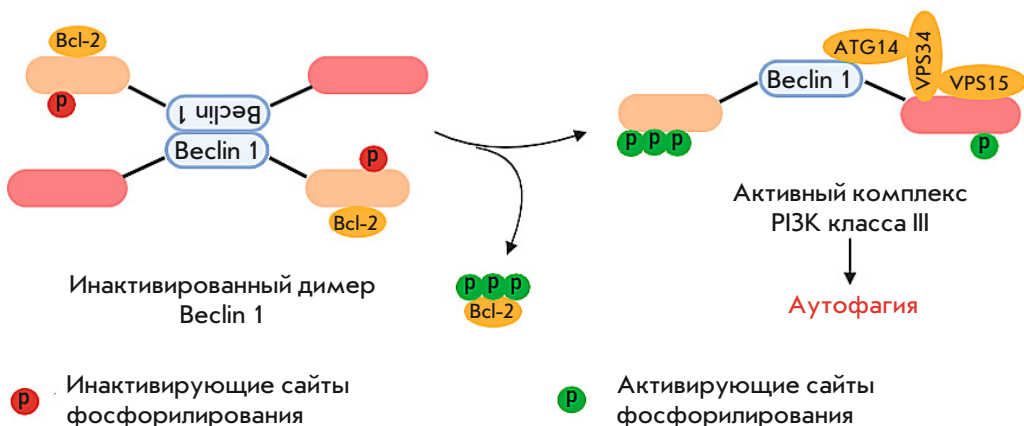


Рис. 4. Схема превращения неактивированного комплекса Bcl-2–Beclin 1 в активный PI3K-комплекс (по Menon [41])

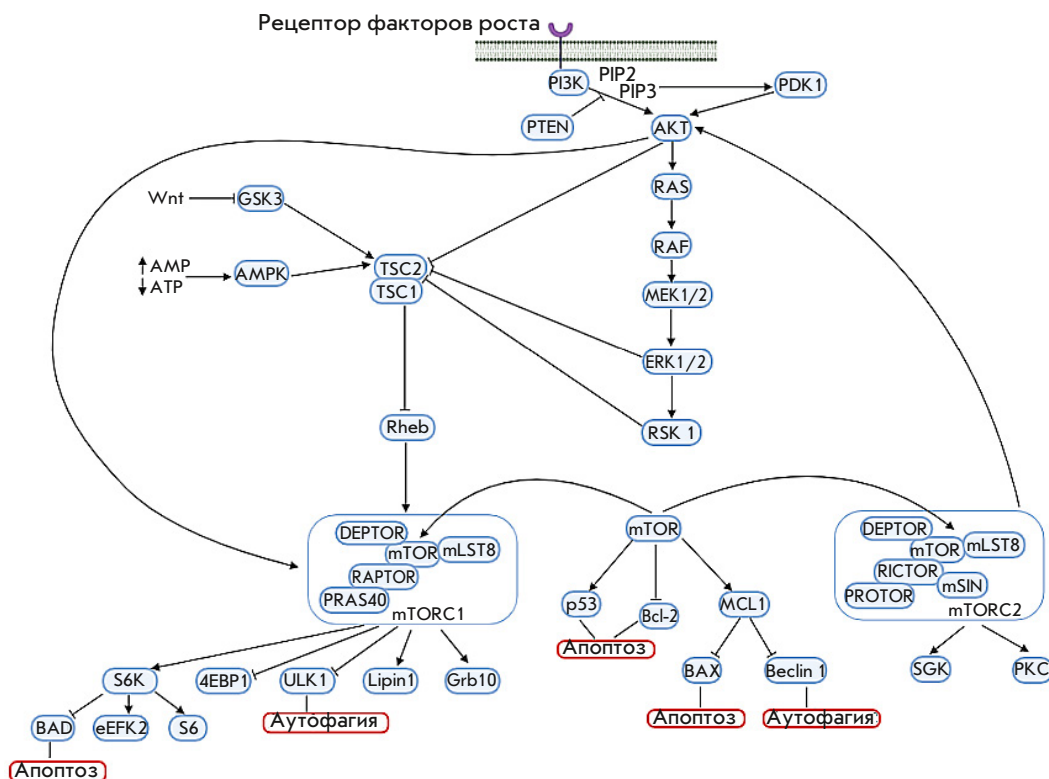


Рис. 5. Схема, иллюстрирующая пути взаимодействия аутофагии и апоптоза с участием mTOR (по [35, 42, 48, 49])

ляторное фосфорилирование ULK1, ингибирующее аутофагию, а также участвует в метаболизме липидов, модифицируя фосфатазу Lipin1. Комплекс mTORC2 был открыт сравнительно недавно. mTORC2 активируется в ответ на воздействие факторов роста, а его субстратами являются киназа AKT, киназы, регулируемые сывороткой и глюкокортикоидами (SGK), и протеинкиназа C (PKC) – компонент регуляторного каскада, активируемого G-белок-связанными рецепторами факторов роста [42].

Активность mTOR регулируется небольшим GTP-связывающим белком Rheb. Связывая GTP, Rheb активирует mTOR, а гидролиз GTP, стимулируемый комплексом TSC1/TSC2 (tuberous sclerosis), приводит к инактивации Rheb и mTOR соответственно. Ингибирование аутофагии в результате регуляторного фосфорилирования TSC1/TSC2 осуществляют различные факторы. Например, AKT, MAP-киназы, регулируемые внеклеточными сигналами киназы (ERK), киназа p90 рибосомного белка S6 (RSK), осуществляя инактивирующее фосфорилирование Ser939 TSC2, ингибируют аутофагию, а AMPK, фосфорилирующая Ser1387 TSC2, стимулирует аутофагию [35].

Снижение уровня питательных веществ или энергии в клетке, а также воздействие стресса приводят к ингибированию активности mTOR и, как следствие, к индукции аутофагии [1]. Однако длительное голода-

ние приводит к реактивации mTOR, а следовательно, к подавлению аутофагии [43].

Наряду с этим mTOR оказывает плеiotропное действие и на процесс апоптоза, в том числе через белки p53, Bcl-2 и Bcl-2 [44]. Взаимодействие Bcl-2 с Beclin 1 приводит к подавлению аутофагии и к предотвращению регуляции экспрессии генов проапоптотических белков белком p53 [45]. Показано, что MCL1, один из белков семейства Bcl-2, действует как своеобразный «датчик» стресса, который одновременно контролирует и аутофагию, и апоптоз в нейронах [46, 47].

На рис. 5 приведена схема путей взаимодействия аутофагии и апоптоза с участием mTOR.

Сигнальный путь с участием p38 MAPK

p38 MAPK играет важную роль в регуляции апоптоза, клеточного цикла, процессов роста и дифференцировки и служит мишенью для ряда лекарственных препаратов (таких, как циклофосфамид, оксалиплатин). Однако при определенных условиях p38 MAPK также может опосредовать устойчивость к апоптозу (посредством активации COX-2 и др.) [50]. Сигнальные пути, регулируемые p38 MAPK, активируются в ответ на воздействие широкого спектра стимулов, таких, как митогенные факторы (например, факторы роста или цитокины), а также на сигналы внешней среды и генотоксический стресс. После

воздействия этих стимулов p38 MAPK активируется вышестоящими киназами MKK3 и MKK6. Иногда p38 также может фосфорилироваться с помощью киназы MKK4, которая хорошо известна как активатор JNK [51].

Помимо апоптоза, p38 MAPK может участвовать и в регуляции аутофагии в ответ на действие химиотерапевтических агентов [52]. Молекулярные механизмы взаимодействия p38 и аутофагии остаются в основном неизвестными. Известно, что p38 MAPK, фосфорилируя Atg5, способна ингибировать аутофагию, вызванную недостатком питательных веществ [53]. Кроме того, p38 MAPK может негативно регулировать как макроаутофагию во время роста клеток в нормальной среде, содержащей аминокислоты и сыворотку (базальная аутофагия) [54], так и аутофагию, вызванную недостатком питательных веществ [55, 56]. Активация передачи сигналов p38 MAPK также индуцирует аутофагию для поддержания выживания клеток посредством фосфорилирования киназы GSK3 β из семейства серин-треониновых киназ, которая участвует в регуляции энергетического обмена [57].

Есть мнение, что p38 MAPK является основным фактором поддержания баланса между p53-зависимым апоптозом и аутофагией в условиях генотоксического стресса, вызванного 5-фторурацилом [58].

В то же время получены противоположные данные о потенциальной роли p38 MAPK в процессах аутофагии и апоптоза. Активные формы кислорода могут вызывать окислительный стресс, который способствует усилению аутофагии и снижению апоптоза [59]. Обнаружено, что MAPK играет жизненно важную роль в переходе от аутофагии к апоптозу в клетках рака толстой кишки человека, обработанных MS-275, ингибитором гистондеацетилаз. При высоком уровне экспрессии p38 наблюдается активация аутофагии, тогда как низкий уровень экспрессии этого гена индуцирует апоптоз. Таким образом, сигнальный путь p38 MAPK может играть критическую роль в выборе одного из двух клеточных процессов, запускаемых при генотоксическом стрессе, вызванном действием химиопрепаратов [50].

Сигнальный путь JNK

Киназа JNK, известная также как активируемая стрессом протеинкиназа (SAPK) семейства MAPK, первоначально активируется в ответ на различные стрессовые сигналы и участвует во многих клеточных событиях, включая апоптоз и аутофагию. В условиях генотоксического стресса JNK является положительным регулятором как апоптоза, так и аутофагии [50].

JNK регулирует апоптоз посредством двух различных механизмов. С одной стороны, она способствует фосфорилированию c-Jun и фактора транскрипции ATF2, что приводит к активации фактора транскрипции AP-1 (activator protein 1) и экспрессии генов, связанных с сигнальным путем, регулируемым рецепторами смерти Fas. Связывание лиганда FasL с рецептором Fas может опосредовать активацию каспазы 8, которая процессирует эффекторную каспазу 3, инициируя апоптоз. С другой стороны, JNK обеспечивает фосфорилирование антиапоптотических белков Bcl-2/Bcl-xL, что приводит к изменению потенциала митохондриальной мембраны и способствует высвобождению цитохрома c, активации каспаз 9 и 3 и индукции апоптоза [60].

Фосфорилирование Bcl-2/Bcl-xL стимулирует аутофагию в результате диссоциации комплекса Beclin 1-Bcl-2/Bcl-xL [61]. С другой стороны, JNK активирует модулятор аутофагии DRAM (damage-regulated autophagy modulator). DRAM является мишенью p53, а его индукция в условиях генотоксического стресса [62] стимулирует аутофагию, блокируя слияние аутофагосом с лизосомами, в состав которых он входит [63, 64].

В целом, результаты проведенных к настоящему времени исследований указывают на значительное совпадение или взаимную зависимость внутриклеточных сигнальных механизмов, вовлеченных в регуляцию как апоптоза, так и аутофагии, опосредованных JNK. Однако вопрос о том, каким образом JNK может контролировать баланс апоптоза и аутофагии в ответ на генотоксический и окислительный стресс, остается открытым [50].

На рис. 6 приведена схема роли сигнальных путей JNK и p38 MAPK в регуляции аутофагии и апоптоза.

АУТОФАГИЯ, АПОПТОЗ В СТАРЕНИИ

Старение организма – сложный процесс, охватывающий нарушение и снижение функций многих систем как на уровне целого организма, так и на клеточном уровне [65]. Все эти процессы приводят в конечном итоге к гибели организма и возникновению большого числа заболеваний, включая метаболический синдром, нейродегенеративные заболевания и рак [6]. Старение клеток сопровождается укорочением теломера [66, 67], а также снижением эффективности протекания аутофагии [5, 6] и избыточной активацией апоптоза [7], однако механизмы этих событий остаются не до конца изученными.

Удлинение теломер может осуществляться специализированным комплексом – теломеразой. В состав этого комплекса входят обратная транскриптаза (TERT), теломеразная РНК (TERC) и дополнительные белки, участвующие в сборке фермента и регу-

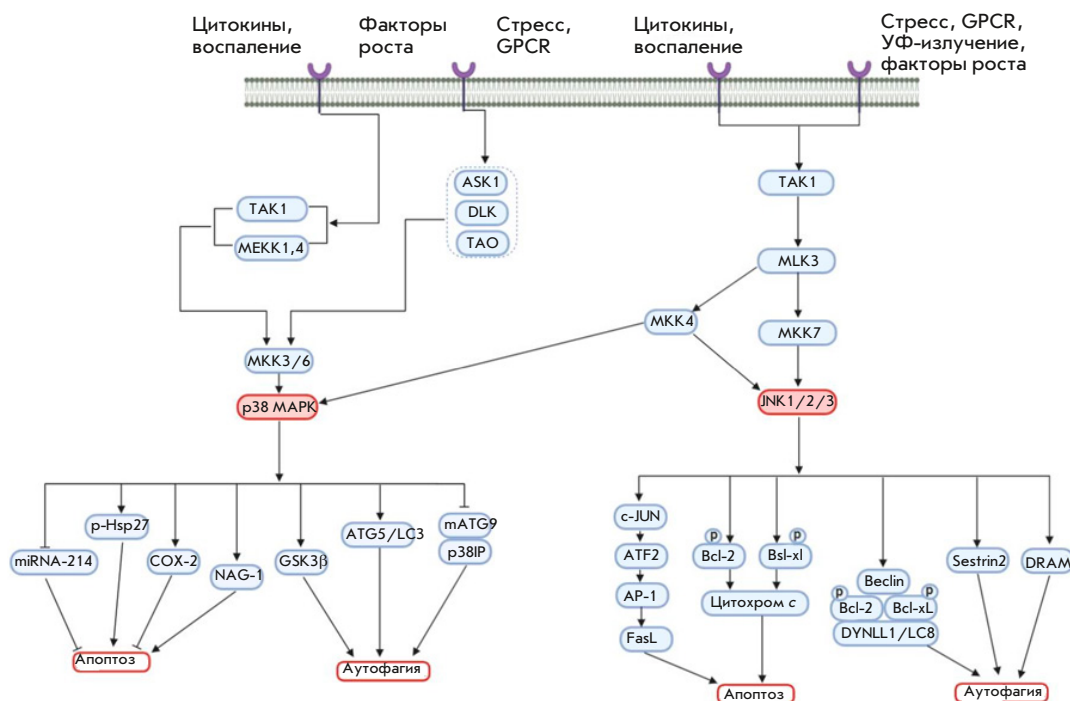


Рис. 6. Схема сигнальных путей p38 MAPK и JNK, отражающая их роль в регуляции процессов аутофагии и апоптоза (по [50])

лирующие его функционирование. Комплекс активен в клетках, характеризующихся высокой скоростью пролиферации, таких, как клетки костного мозга, активированные лимфоциты, гаметы и раковые клетки, в то время как в большинстве соматических клеток теломераза находится в неактивном состоянии [66]. Экспрессия гена *TERC* в клетках, не поддерживающих теломеразную активность, позволяет предполагать, что теломеразная РНК выполняет какие-то дополнительные функции, не связанные с теломеразной активностью и удлинением теломер. В условиях стресса TERT переходит из ядра в митохондрии и способствует защите клеток [68]. Повышенная экспрессия генов компонентов теломеразы стимулирует экспрессию гена гексокиназы 2 и активирует аутофагию в результате ингибирования mTOR [69, 70]. Делеция гена *mTERC* у мышей приводит к активации mTOR и постоянно повышенному уровню фосфорилирования S6K1. Ингибирование mTORC1 рапамицином снижает продолжительность жизни таких мышей, но не мышей дикого типа [71].

В результате транскрипции гена теломеразной РНК человека образуется удлинённый предшественник [72], содержащий открытую рамку считывания, которая кодирует белок hTERP [73]. Повышенное содержание белка hTERP защищает клетки в условиях индукции апоптоза, а мутации hTERP влияют на процессинг белка LC3, одного из основных участников формирования аутофагосомы [72–74]. hTERP может участвовать в регуляции молекулярных вза-

имодействий между аутофагией и апоптозом, а также в адаптации клеток к стрессовым условиям [73]. Молекулярные механизмы влияния компонентов теломеразы на аутофагию продолжают активно изучаться.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, аутофагия и апоптоз находятся в сложных функциональных отношениях, которые в разных тканях и в разных условиях могут варьировать от кооперации до антагонизма. В основе этого поддержания баланса между аутофагией и апоптозом лежит сложная система взаимодействий большого числа сигнальных путей, осуществляемых как с участием ключевых белков аутофагии и апоптоза (Beclin 1, каспазы, p53 и др.), так и полифункциональных регуляторных молекул (например, mTOR, p38 MAPK или JNK). В то же время необходимо отметить, что клинические и экспериментальные данные о соотношении аутофагии и апоптоза в нормальных тканях, а также при различных патологических состояниях, включая злокачественные опухоли, во многом противоречивы, а проблема баланса между апоптозом и аутофагией нуждается в дальнейшем изучении. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РФФ (№ 19-14-00065 «Котранскрипционный процессинг и транспорт теломеразной РНК человека в регуляции функционирования теломеразы»).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jiang G., Tan Y., Wang H., Peng L., Chen H., Meng X., Li L. // *Mol. Cancer*. 2019. V. 18. № 1. P. 1–22.
2. Saha S., Panigrahi D.P., Patil S., Bhutia S.K. // *Biomed. Pharmacother*. 2018. V. 104. № 4. P. 485–495.
3. Song X., Lee D.-H., Dilly A.-K., Lee Y.-S., Choudry A.H., Kwon Y.T., Bartlett D.L., Lee Y.J. // *Mol. Cancer Res*. 2019. V. 16. № 7. P. 1077–1091.
4. D'Arcy M. // *Cell Biol. Int*. 2019. V. 28. № 6. P. 582–592.
5. Nakamura S., Yoshimori T. // *Korean Soc. Mol. Cell. Biol*. 2018. V. 41. № 1. P. 65–72.
6. Cheon S.Y., Kim H., Rubinsztein D.C., Lee J.E. // *Exp. Neurobiol*. 2019. V. 28. № 6. P. 643–657.
7. Nalobin D., Alipkina S., Gaidamaka A., Glukhov A., Khuchua Z. // *Cells*. 2020. V. 9. № 2. P. 1–12.
8. Singh R., Letai A., Sarosiek K. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol*. 2019. V. 20. № 3. P. 175–193.
9. Susan E. // *Toxicol. Pathol*. 2007. V. 35. № 4. P. 496–516.
10. Poon I.K.H., Lucas C.D., Rossi A.G., Ravichandran K.S. // *Nat. Rev. Immunol*. 2014. V. 14. № 3. P. 166–180.
11. Martinvalet D., Zhu P., Lieberman J. // *Immunity*. 2005. V. 22. № 3. P. 355–370.
12. Lockshin R.A., Zakeri Z. // *Int. J. Biochem. Cell Biol*. 2004. V. 36. № 12. P. 2405–2419.
13. Ioney F.H., Krammer P.H. // *Nat. Rev. Cancer*. 2002. V. 2. № 4. P. 277–288.
14. Brenner D., Mak T.W. // *Curr. Opin. Cell Biol*. 2009. V. 21. № 6. P. 871–877.
15. Cain K., Bratton S.B., Cohen G.M. // *Biochimie*. 2002. V. 84. № 2–3. P. 203–214.
16. Kim J.H., Lee S.Y., Oh S.Y., Han S.I., Park H.G., Yoo M.-A., Kang H.S. // *Oncol. Rep*. 2004. V. 12. № 6. P. 1233–1238.
17. Amaral J.D., Xavier J.M., Steer C.J., Rodrigues C.M. // *Discov. Med*. 2010. V. 9. № 45. P. 145–152.
18. Wei J., Zaika E., Zaika A. // *J. Nucleic Acids*. 2012. № 687359. P. 1–19.
19. Sharp A.N., Heazell A.E.P., Crocker I.P., Mor G. // *Am. J. Reprod. Immunol*. 2010. V. 64. № 3. P. 159–169.
20. Meley D., Spiller D.G., White M.R.H., McDowell H., Pizer B., Sée V. // *Cell Death Dis*. 2010. V. 1. № 5. P. 1–11.
21. Zhang X.P., Liu F., Wang W. // *J. Biol. Chem*. 2010. V. 285. № 41. P. 31571–31580.
22. Mizushima N., Levine B., Cuervo A.M., Klionsky D.J. // *Nature*. 2008. V. 451. № 7182. P. 1069–1075.
23. Levine B., Deretic V. // *Nat. Rev. Immunol*. 2007. V. 7. № 10. P. 767–777.
24. Nixon R.A., Yang D. // *Neurobiol. Dis*. 2011. V. 43. № 1. P. 38–45.
25. Mizushima N., Levine B., Cuervo A.M., Klionsky D.J. // *Nature*. 2008. V. 451. № 7182. P. 1069–1075.
26. Yun C.W., Lee S.H. // *Int. J. Mol. Sci*. 2018. V. 19. № 11. P. 1–18.
27. Cuervo A.M. // *Mol. Cell. Biochem*. 2004. № 263. P. 55–72.
28. Feng Y., He D., Yao Z., Klionsky D.J. // *Nat. Publ. Gr*. 2013. V. 24. № 1. P. 24–41.
29. Zhou Z.-W., Li X.-X., He Z., Pan S., Yang T., Zhou Q., Tan J., Wang D., Zhou S. // *Drug Des. Devel. Ther*. 2015. V. 9. № 3. P. 1511–1554.
30. Samatar A.A., Poulidakos P.I. // *Nat. Publ. Gr*. 2014. V. 13. № 12. P. 928–942.
31. Yang J., Yao S. // *Int. J. Mol. Sci*. 2015. V. 16. № 10. P. 25744–25758.
32. Liang J., Shao S.H., Xu Z., Hennessy B., Ding Z., Larrea M., Kondo S., Dumont D.J., Gutterman J.U., Walker C.L., et al. // *Nat. Cell Biol*. 2007. V. 9. № 2. P. 218–224.
33. Poillet-Perez L., Despouy G., Delage-Mourroux R., Boyer-Guittaut M. // *Redox Biol*. 2015. V. 4. № 4. P. 184–192.
34. Ding W., Ni H., Gao W., Hou Y., Melan M.A., Chen X., Stolz D.B., Shao Z., Yin X. // *J. Biol. Chem*. 2007. V. 282. № 7. P. 4702–4710.
35. Eisenberg-Lerner A., Bialik S., Simon H., Kimchi A. // *Cell Death Differ*. 2009. V. 16. № 7. P. 966–975.
36. Marquez R.T., Xu L. // *Am. J. Cancer Res*. 2012. V. 2. № 2. P. 214–221.
37. Dou Y., Jiang X., Xie H., He J., Xiao S. // *J. Ovarian Res*. 2019. V. 12. № 1. P. 1–11.
38. Lee E.F., Smith N.A., Soares da Costa T.P., Meftahi N., Yao S., Harris T.J., Tran S., Pettikiriachchi A., Perugini M.A., Keizer D.W., et al. // *Autophagy*. 2019. V. 15. № 5. P. 785–795.
39. Julian L., Olson M.F. // *Landes Biosci*. 2014. V. 5. № 7. P. 1–12.
40. Wei Y., An Z., Zou Z., Sumpter R., Su M., Zang X., Sinha S., Gaestel M., Levine B. // *Elife*. 2015. V. 2015. № 4. P. 1–25.
41. Menon M.B., Dhamija S. // *Front. Cell Dev. Biol*. 2018. V. 6. № 10. P. 1–9.
42. Hung C.M., Garcia-Haro L., Sparks C.A., Guertin D.A. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol*. 2012. V. 4. № 12. P. 1–17.
43. Yu L., McPhee C.K., Zheng L., Mardones G.A., Rong Y., Peng J., Mi N., Zhao Y., Liu Z., Wan F., et al. // *Nature*. 2010. V. 465. № 6. P. 942–947.
44. Nikolettou V., Markaki M., Palikaras K., Tavernarakis N. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1833. № 12. P. 3448–3459.
45. Warren C.F.A., Wong-Brown M.W., Bowden N.A. // *Cell Death Dis*. 2019. V. 10. № 3. P. 177–189.
46. Zou Y., Liu W., Zhang J., Xiang D. // *Mol. Med. Rep*. 2016. V. 14. № 1. P. 1033–1039.
47. Robinson E.J., Aguiar S.P., Kouwenhoven W.M., Starmans D.S., von Oerthel L., Smidt M.P., van der Heide L.P. // *Cell Death Discov*. 2018. V. 4. № 1. P. 107–120.
48. Germain M., Nguyen A.P., Grand J.N. Le, Arbour N., Vanderluit J.L., Park D.S., Opferman J.T., Slack R.S. // *EMBO J*. 2010. V. 30. № 2. P. 395–407.
49. Castedo M., Ferri K.F., Kroemer G. // *Cell Death Differ*. 2002. V. 9. № 2. P. 99–100.
50. Sui X., Kong N., Ye L., Han W., Zhou J., Zhang Q., He C. // *Cancer Lett*. 2014. V. 344. № 2. P. 174–179.
51. Brancho D., Tanaka N., Jaeschke A., Ventura J.J., Kelkar N., Tanaka Y., Kyuuma M., Takeshita T., Flavell R.A., Davis R.J. // *Genes Dev*. 2003. V. 17. № 16. P. 1969–1978.
52. Thyagarajan A., Jedinak A., Nguyen H., Terry C., Baldrige L.A., Jiang J., Sliva D. // *Nutr. Cancer*. 2013. V. 62. № 5. P. 630–640.
53. Keil E., Höcker R., Schuster M., Essmann F., Ueffing N., Hoffman B., Liebermann D.A., Pfeffer K., Schulze-Osthoff K., Schmitz I. // *Cell Death Differ*. 2013. V. 20. № 2. P. 321–332.
54. Musiwaro P., Smith M., Manifava M., Walker S.A., Ktistakis N.T. // *Autophagy*. 2013. V. 9. № 9. P. 1407–1417.
55. Webber J.L., Tooze S.A. // *EMBO J*. 2010. V. 29. № 1. P. 27–40.
56. Webber J.L. // *Autophagy*. 2010. V. 6. № 2. P. 292–293.
57. Choi C.H., Lee B.H., Ahn S.G., Oh S.H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun*. 2012. V. 418. № 4. P. 759–764.
58. Cruz-morcillo M.A. De, Sánchez-prieto R. // *Autophagy*. 2012. V. 8. № 1. P. 135–137.
59. Lv X., Tan J., Liu D., Wu P., Cui X. // *J. Hear. Lung Transplant*. 2012. V. 31. № 6. P. 655–662.
60. Tang R., Kong F., Fan B., Liu X., You H., Zhang P., Zheng K. // *World J. Gastroenterol*. 2012. V. 18. № 13. P. 1485–1495.
61. Zhou F., Yang Y. // *FEBS J*. 2011. V. 278. № 3. P. 403–413.
62. Crighton D., Wilkinson S., O'Prey J., Syed N., Smith P., Harrison P.R., Gasco M., Garrone O., Crook T., Ryan K.M. //

- Cell. 2006. V. 126. № 1. P. 121–134.
63. Mrschtik M., O'Prey J., Lao L.Y., Long J.S., Beaumatin F., Strachan D., O'Prey M., Skommer J., Ryan K.M. // *Cell Death Differ.* 2015. V. 22. № 10. P. 1714–1726.
64. Lorin S., Pierron G., Ryan K.M., Codogno P., Djavaheri-Mergny M. // *Autophagy.* 2010. V. 6. № 1. P. 153–154.
65. Hansen M., Rubinsztein D.C., Walker D.W. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2018. V. 19. № 9. P. 579–593.
66. Tsoukalas D., Fragkiadaki P., Docea A.O., Alegakis A.K., Sarandi E., Thanasoula M., Spandidos D.A., Tsatsakis A., Razgonova M.P., Calina D. // *Mol. Med. Rep.* 2019. V. 20. № 4. P. 3701–3708.
67. El Maï M., Marzullo M., de Castro I.P., Ferreira M.G. // *Elife.* 2020. V. 9. № 54935. P. 1–26.
68. Chiodi I., Mondello C. // *Front. Oncol.* 2012. V. 2. № 9. P. 1–6.
69. Roh J. Il, Kim Y., Oh J., Kim Y., Lee J., Lee J., Chun K.H., Lee H.W. // *PLoS One.* 2018. V. 13. № 2. P. 1–14.
70. Ali M., Devkota S., Roh J. I., Lee J., Lee H.W. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016. V. 478. № 3. P. 1198–1204.
71. Ferrara-Romeo I., Martinez P., Saraswati S., Whittemore K., Graña-Castro O., Thelma Poluha L., Serrano R., Hernandez-Encinas E., Blanco-Aparicio C., Maria Flores J., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 1–17.
72. Rubtsova M.P., Vasilkova D.P., Moshareva M.A., Malyavko A.N., Meerson M.B., Zatsepin T.S., Naraykina Y.V., Beletsky A.V., Ravin N.V., Dontsova O.A. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 1–10.
73. Rubtsova M., Naraykina Y., Vasilkova D., Meerson M., Zvereva M., Prassolov V., Lazarev V., Manuvera V., Kovalchuk S., Anikanov N., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. № 17. P. 8966–8977.
74. Rubtsova M.P., Vasilkova D.P., Naraykina Y.V., Dontsova O.A. // *Acta Naturae.* 2016. V. 8. № 4. P. 14–22.

УДК 578.242/.44+578.282

Исследование эффективности новых ингибиторов вирусного канала M2 (R)-6-(1-адамантил)-1,3-оксазинан-2-она и (R)-6-(1-адамантил)-пиперидин-2,4-диона в отношении штамма вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 на модели гриппозной пневмонии мышей

Е. А. Глубокова¹, И. А. Ленева¹, Н. П. Карташова¹, И. Н. Фалынскова¹, Р. М. Тихов², Н. Ю. Кузнецов^{2*}

¹Научно-исследовательский институт вакцин и сывороток им. И.И. Мечникова, Москва, 105064 Россия

²Институт элементоорганических соединений им. А.Н. Несмеянова РАН, Москва, 119991 Россия

*E-mail: eaglubokova@yandex.ru, nkuznff@ineos.ac.ru

Поступила в редакцию 17.06.2020

Принята к печати 12.10.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11020

РЕФЕРАТ Всемирная организация здравоохранения для борьбы с гриппозной инфекцией в дополнение к вакцинации рекомендует применение препаратов прямого вирусспецифического действия, одним из которых является римантадин. Однако у всех циркулирующих штаммов вируса гриппа А выявлена резистентность к римантадину, поэтому актуален поиск аналогов этого препарата, эффективных в отношении резистентных к римантадину вирусов гриппа. В представленной работе эффективность двух адамантильных азагетероциклических производных римантадина изучена на модели гриппозной пневмонии мышей, индуцированной римантадин-резистентным вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1). Мыши BALB/c, инфицированные вирусом, получали препараты перорально в дозах 15 и 20 мг/кг/день в течение 5 дней (первую дозу давали за 4 ч до инфицирования). Эффективность препаратов оценивали по выживаемости животных, продолжительности жизни, уменьшению потери массы и титра вируса в легких. Лечение обоими соединениями в указанных дозах обеспечивало защиту 60–100% животных, увеличивало среднюю продолжительность жизни, снижало потерю веса и ингибировало размножение вируса в легких по сравнению с группой вирусного контроля. Оба соединения были более эффективными, чем римантадин в аналогичных дозах и схеме. Изучение чувствительности вирусов, выделенных из легких животных, получавших перорально в течение 5 дней соединения, в культуре клеток MDCK, не выявило возникновения резистентности.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА вирус гриппа, противовирусные препараты, римантадин, модели гриппозной пневмонии мышей.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ СПЖ – средняя продолжительность жизни; ТЦИД₅₀ – тканевая цитопатогенная доза, вызывающая гибель 50% клеток монослоя; МЛД – мышьяная летальная доза; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; MEM – Minimum Essential Medium (среда Игла); MDCK – Madin–Darby canine kidney (клетки почки собак Madin Darby); ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; ИФА – иммуноферментный анализ; ДМСО – диметилсульфоксид; РМТ – римантадин, пндм (pdm) – пандемический.

ВВЕДЕНИЕ

Грипп – это высококонтагиозное респираторное вирусное заболевание человека и многих видов млекопитающих и птиц. Несмотря на доступность различных вакцин и противовирусных препаратов, вирусы гриппа вызывают ежегодные эпидемии по всему миру [1]. Ежегодно от гриппа и его осложнений умирают до 650000 человек, при этом только в США до 40000 [2]. На протяжении последних 10–15 лет ежегодно регистрируется от 27.3 до 47.2 млн случаев ОРВИ, причем удельный вес гриппа в структуре ОРВИ в зависимости от интенсивности эпидемий колеблется от 25 до 60%. Особое беспокойство вызывают пандемии гриппа, которые обычно возникают каждые 20–30 лет. Помимо непосредственного влияния на здоровье населения, особенно из групп риска [2], инфекция оказывает колоссальный негативный экономический эффект, что показала современная пандемия COVID-19. Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) считает вакцинацию основной стратегией борьбы с гриппом. Однако из-за высокой и непредсказуемой изменчивости поверхностных белков вируса состав вакцины постоянно меняется в зависимости от антигенной структуры циркулирующих штаммов вирусов гриппа. Поэтому ВОЗ в дополнение к вакцинации рекомендует этиотропные препараты прямого вирусспецифического действия, что особенно актуально при пандемии, вызванной

новыми штаммами вируса гриппа А. В настоящее время во всем мире одобрены два класса синтетических низкомолекулярных препаратов [1, 3, 4]: **блокаторы канала М2** – аминокатамантаны – амантадин и римантадин (рис. 1); **ингибиторы нейраминидазы** – озельтамивир, занамивир, перамивир, ланинамивир (только в Японии) (рис. 1). Адамантановые блокаторы канала М2 относятся к первому поколению противовирусных препаратов, эффективных в отношении вируса гриппа типа А. Хотя эти препараты успешно использовали в течение более 30 лет [3, 4], с 2006 года их применение не рекомендовано из-за развития лекарственной резистентности к ним у большинства циркулирующих штаммов [5]. Возникновение резистентности отмечено как в результате эволюционных изменений вируса гриппа, так и непосредственно в процессе лечения римантадином и амантадином. Быстрое (через 1–2 пассажа) возникновение резистентных к этим препаратам штаммов показано в многочисленных экспериментах на животных и в культуре клеток, а развитие резистентности в человеческой популяции может происходить уже через 2–4 дня после начала лечения [6]. Генетическая основа резистентности обусловлена мутациями в гене 7 во второй рамке считывания, кодирующей белок М2, и связана с заменой аминокислот в позициях L26, V27, A30, S31 и G34 [7]. Мутация S31N (серин – аспарагин) – наиболее распространенная причина

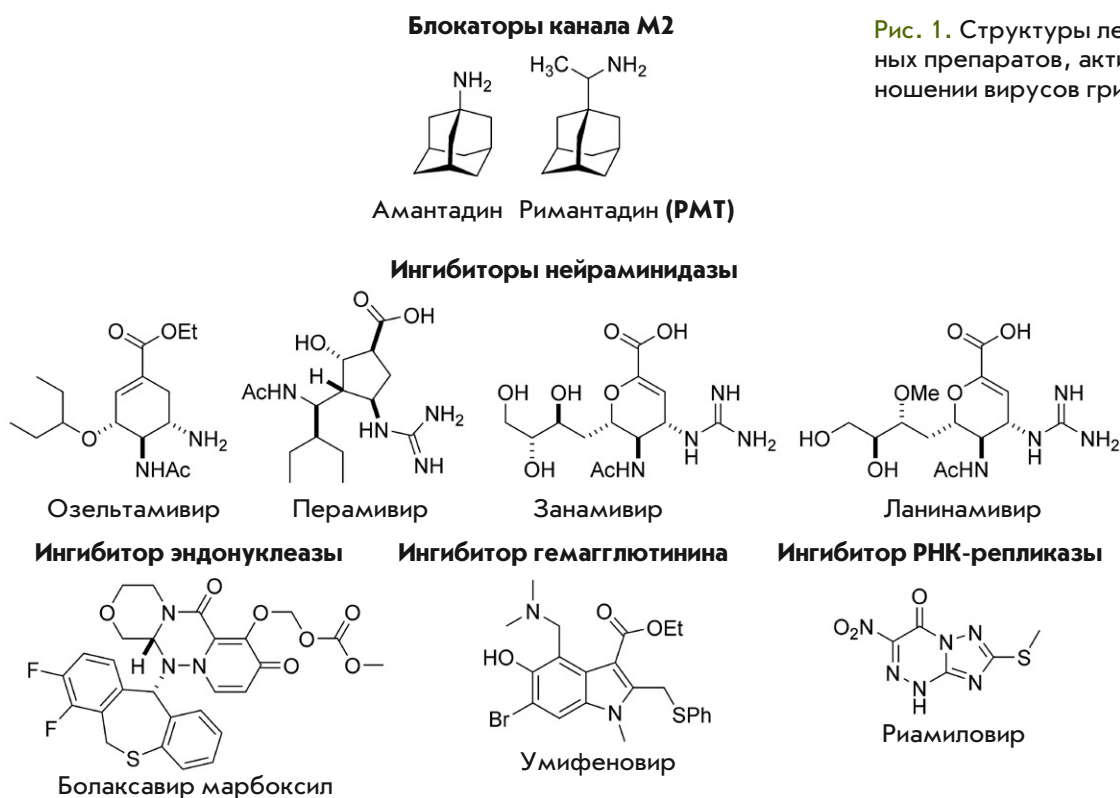


Рис. 1. Структуры лекарственных препаратов, активных в отношении вирусов гриппа

резистентности штаммов вируса гриппа А человека, птиц и свиней [8]. Тем не менее уникальный и громадный опыт успешного клинического применения препаратов адамантанового ряда, показавший их высокую эффективность, оставляет эти препараты в арсенале средств противовирусной терапии на случай возникновения вирусов, чувствительных к ним, но резистентных к другим противогриппозным препаратам, в частности к ингибиторам нейраминидазы. Следует отметить, что возникновение резистентности к озельтамивиру отмечается регулярно, но особенно масштабно это проявилось в период сезонного гриппа в 2008–2009 годах, когда практически все циркулирующие штаммы H1N1 имели мутацию N275Y в гене нейраминидазы [9], сохранив чувствительность к адамантанам.

В результате исследований, направленных на преодоление существующей резистентности вирусов гриппа к препаратам двух первых классов, получен ингибитор эндонуклеазы балоксавир марбоксил, обладающий высокой эффективностью в отношении различных штаммов вируса гриппа А и В (одобрен в Японии, проходит последнюю стадию испытаний в США) [10–12]. Кроме того, в России и Китае одобрен препарат умифеновир («Арбидол») – ингибитор процесса фузии, индуцируемой гемагглютинином [13, 14], а также риамилловир («Триазавирин», Россия) – ингибитор РНК-репликазы (рис. 1).

Несмотря на то что в разработке и клинической практике находится целый ряд соединений, способных противостоять резистентным штаммам, наличие

набора комплементарных противовирусных средств с разным механизмом действия представляет надежный способ защиты от возникновения пандемии [15]. К сожалению, на сегодняшний день отсутствуют одобренные эффективные блокаторы канала с мутацией S31N. Недавно было показано, что экспериментальные M2-ингибиторы достаточно устойчивы к развитию резистентности [16], а подавляющее большинство возникающих штаммов с соответствующими мутациями [16, 17] не сохраняется в популяции, что позволяет полагать, что разработка таких ингибиторов перспективна.

Ранее мы разработали удобный метод синтеза новых энантиомерно чистых адамантильных производных 1,3-оксазинов и пиперидинов 3–7 из соответствующих энантиомерных гомоаллиламинов 1 (схема 1). Ключевыми стадиями процесса были реакции циклобромокарбамирания (1 в 2 и 3), дегидробромирования под действием *t*BuOK (2 в 4) и енолат-изоцианатная перегруппировка (4 в 5). Последние две реакции в случае бромидов 3 проводятся в «одной колбе». Дикетон 5 далее постадийно восстанавливали в 4-гидроксилактам (6) и 4-гидроксипиперидин (7). Оказалось, что соединения 3–7 ингибируют *in vitro* репликацию пандемических штаммов H1N1 А/Калифорния/7/2009 и А/ИВ–Оренбург/29–L/2016 [18]. Оба штамма содержат мутацию S31N, ответственную за резистентность к римантадину/амантадину. Среди пар энантиомеров, (*R*)-изомеры (асимметрический центр при адамантильной группе) 3–5, 7 наиболее эффективно ингибировали репликацию

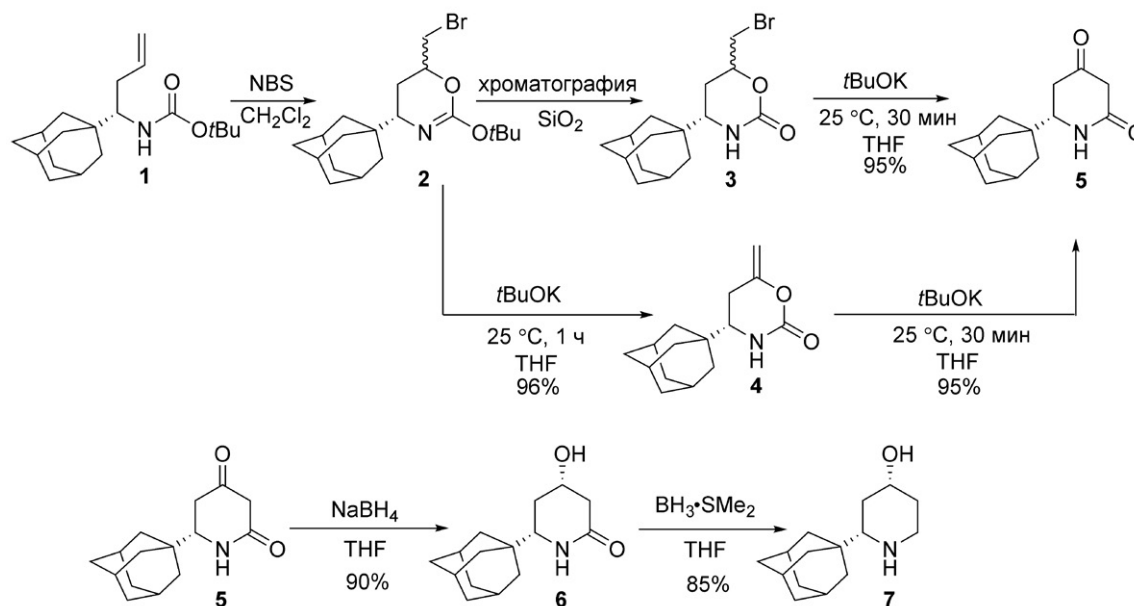


Схема 1. Структуры новых производных адамантана, активных в отношении римантадин-резистентных штаммов вируса гриппа H1N1

Таблица 1. Подавление репликации вируса гриппа А ингибиторами **3–7** *in vitro*

Штамм вируса	ИК ₅₀ (ингибирующая концентрация), мкМ			
	3	4	5	7
А/Калифорния/7/2009 (H1N1)	11.3	8.1	20.6	18.4
А/IV–Оренбург/29–L/2016 (H1N1)	20.1	7.7	27.1	17.7

вируса *in vitro* (схема 1, табл. 1). Поскольку ингибирующая активность соединений оказалась высокой, в следующей серии опытов была изучена их эффективность *in vivo*.

Соединение **3** исключено из исследований из-за его низкой растворимости в водных растворах, а соединение **7** в диастереомерно чистом виде оказалось достаточно сложным для синтеза. Таким образом, были выбраны адамантильные производные 1,3-оксазинан-2-она (**4**) и пиперидин-2,4-диона (**5**), синтез которых был прост, а растворимость приемлема. Активность соединений оценивали на модели гриппозной пневмонии мышей, индуцированной резистентным к римантадину вирусом гриппа А/Калифорния/04/09 (H1N1).

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Препараты и их приготовление

(R)-Изомеры соединений **4** и **5** синтезированы из соответствующего (R)-N-Вос-производного адамантильного гомоаллиламина **1**, согласно описанным методикам [18]. В экспериментах использовали свежеприготовленные растворы соединений **4**, **5** и римантадина (**РМТ**) в 50% водном ДМСО. Исследуемые растворы вводили мышам перорально в объеме 200 мкл. Животные получали соединения **4**, **5** и **РМТ** в дозах 15 и 20 мг/кг/день.

Клетки и вирусы

В исследованиях использовали штамм вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1), полученный от ВОЗ и адаптированный к мышам путем трех пассажей через легкие. Гриппозную инфекцию у животных моделировали, используя наработанный вирус, выращенный в аллантоисной полости 9-дневных куриных эмбрионов в течение 48 ч при 37°C по общепринятой методике [19].

Животные

Мышей BALB/c (самки весом 12–14 г) получали из питомника «Андреевка» (Московская обл.). Содержание животных соответствовало правилам

по устройству, оборудованию и содержанию экспериментально-биологических клиник. Животных кормили брикетированными кормами в соответствии с утвержденными нормами. Проведение экспериментов утверждено Биоэтическим Комитетом по работе с животными НИИВС им. И.И. Мечникова.

Определение эффективности препаратов на модели вирусной пневмонии мышей

Животных разбивали на группы и помещали в клетки (по 8–13 особей). В день начала эксперимента мышей взвешивали. Мышей инфицировали интраназально под легким наркозом. В первой серии опытов использовали высокую дозу заражения МЛД₅₀, соответствующую 4.5 lg ТЦИД₅₀. Во второй серии экспериментов использовали низкую дозу МЛД₅₀, соответствующую 4.0 lg ТЦИД₅₀. Соединения **4**, **5** и контрольный препарат **РМТ** вводили в объеме 200 мкл перорально за 4 ч до и после инфекции и далее в течение 5 дней 2 раза в день. Параллельно животным контрольной группы, инфицированным вирусом гриппа и не получавшим лечения, вводили фосфатно-солевой буфер (ФСБ) (опыт I) или 50% раствор ДМСО (опыт II). За животными наблюдали в течение 16 дней. Мышей, имеющих признаки тяжелого течения инфекции и потерявших 30% первоначального веса, гуманно умерщвляли. Эффективность соединений на модели вирусной пневмонии мышей оценивали по следующим критериям: выживаемость, увеличение средней продолжительности жизни, уменьшение снижения веса и титра вируса в легких животных, получавших лечение, по сравнению с контрольной группой. Среднюю продолжительность жизни (СПЖ) высчитывали по формуле:

$$СПЖ = \sum f(d-1)/n,$$

где *f* – число мышей, умерших на день *d*, *n* – количество мышей в группе. Для выживших мышей *d* ограничено 21 днем. Уменьшение или увеличение веса рассчитывали для каждой мыши отдельно и выражали в процентах. За 100% принимали вес животного перед инфицированием. Для всех мышей одной группы определяли среднее значение потери или увеличения веса. На 4 день после инфицирования вирусом гриппа забивали по три мыши из каждой группы и в стерильных условиях извлекали легкие. После промывки в растворе стерильного 0.01 М ФСБ легкие гомогенизировали и ресуспендировали в 1 мл холодного ФСБ. После отделения клеточного дебриса центрифугированием (2000 *g*, 10 мин) супернатант использовали для определения инфекционного титра вируса в культуре клеток MDCK общепринятым ме-

тодом. Титр вируса в легких рассчитывали как среднее значение $\lg \text{ТЦИД}_{50}/\text{мл} \pm \text{SD}$.

Статистическую обработку проводили с использованием порангового критерия Мантеля–Кокса в программе Statistica 8.0, $p < 0.05$ рассматривали как статистически значимое отличие от контроля.

Изучение противовирусной активности препаратов в культуре клеток MDCK

Сток-растворы образцов и **РМТ** (1 мг/мл) готовили в ДМСО. Полученные растворы разводили до концентрации 0.5, 1.0, 2.5, 5.0, 7.5 и 10 мкг/мл культуральной средой MEM. Для определения противовирусной активности соединений клетки MDCK рассаживали в 96-луночные планшеты фирмы Costar и выращивали до полного монослоя. Перед началом исследований клетки промывали средой MEM, добавляли соединения **4**, **5** и **РМТ** в указанных концентрациях и инкубировали в течение 2 ч при 37°C. По окончании инкубации во все лунки, исключая контрольные, добавляли выделенный вирус. Далее планшеты инкубировали в течение 24 ч в атмосфере 5% CO₂ при 37°C и фиксировали 80% ацетоном на ФСБ. Противовирусную активность препаратов определяли по уровню экспрессии вирусных антигенов с помощью иммуноферментного анализа (ИФА). Для каждой опытной точки использовали четыре лунки планшета, а каждое значение представляли как среднее арифметическое, вычисленное из трех независимых опытов.

Нуклеотидный анализ гена белка М

Молекулярный маркер резистентности к препаратам адамантанового ряда идентифицировали с помощью секвенирования гена M2 вируса гриппа А/Калифорния/04/2009пндм (H1N1), которым заражали животных. Суммарную РНК выделяли с помощью набора для экстракции нуклеиновых кислот RIBO-prep (AmpliSens, CRIE, Россия). Обратную транскрипцию РНК проводили с использованием набора реагентов REVERTA-L (AmpliSens, CRIE) и праймера 5agcaaaagcagg. Вирусную кДНК амплифицировали с использованием следующих праймеров: M 1F agcaaaagcaggtagatgtt; M 1027R agtagaacaaggtagttt, на Tercyc Thermocycler («ДНК-Технология», Россия). Реакции секвенирования перекрывающихся продуктов ПЦР проводили с использованием тех же праймеров, что и для амплификации, с помощью набора ABI PRISM Big Dye™ v. 3.1 согласно инструкциям производителя на автоматическом ДНК-анализаторе ABI-3100 PRISM™ (Applied Biosystems, США). Последовательности анализировали с помощью пакета программ Lasergene версия 10.1 (DNASTAR Inc, США).

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Определение эффективности соединений 4 и 5 в дозе 20 мг/кг/день на модели гриппозной пневмонии мышей, индуцированной высокой дозой римантадин-резистентного вируса гриппа А/Калифорния/04/2009

Предварительные эксперименты показали, что введение интактным мышам изучаемых соединений в дозах до 60 мг/кг/день по схемам, используемым в дальнейшем, не привело к потере веса и гибели ни одного животного. Для изучения эффективности соединений **4**, **5** в сравнении с **РМТ** в качестве оптимальной дозы мы выбрали 20 мг/кг [3]. Гибель животных контрольной группы, зараженных вирусом гриппа и не получавших лечения, наблюдалась начиная с 7 дня и к 9 дню достигала 100%, СПЖ животных данной группы составила 5.1 дня. Снижение массы тела в контрольной группе начиналось со 2 дня после заражения вирусом и достигало максимального значения (18%) к 5 дню. Эффективность лечения соединениями **4** и **5** была одинаковой – они обеспечивали защиту 60% животных на 15-й день наблюдения. Это лечение было более эффективным, чем применение **РМТ** в этой же дозе, который обеспечивал защиту 40% животных. Средняя продолжительность жизни мышей составила 10.1 дня при применении **РМТ** и более 12 дней в случае **4** и **5**. Кроме того, в группах, получавших соединения **4** и **5**, а также **РМТ**, снижение веса было менее значительным, чем в группе вирусного контроля (рис. 2 и 3, табл. 2).

Определение эффективности соединений 4 и 5 в дозах 15 и 20 мг/кг/день на модели гриппозной пневмонии мышей, индуцированной низкой дозой римантадин-резистентного вируса гриппа А/Калифорния/04/2009

В последующих экспериментах для выявления разницы в активности соединений **4** и **5** дозу вируса уменьшили, а также выбрали две дозы: 20 и 15 мг/кг/день.

В контрольной группе гибель зараженных вирусом гриппа мышей, не получавших лечения, к 16 дню наблюдения достигла 90%, а СПЖ в этой группе составила 10 дней (рис. 4, табл. 3). Эффективность обоих соединений напрямую зависела от их дозы. Пероральное применение соединения **4** в дозе 15 мг/кг/день не влияло статистически значимо на выживаемость: смертность в этих группах составила 50% (рис. 4, табл. 3). Увеличение дозы до 20 мг/кг/день приводило к значимому снижению смертности до 20%. Более эффективным было соединение **5**: при лечении этим соединением в дозе 15 мг/кг/день смертность составляла 30%, а доза

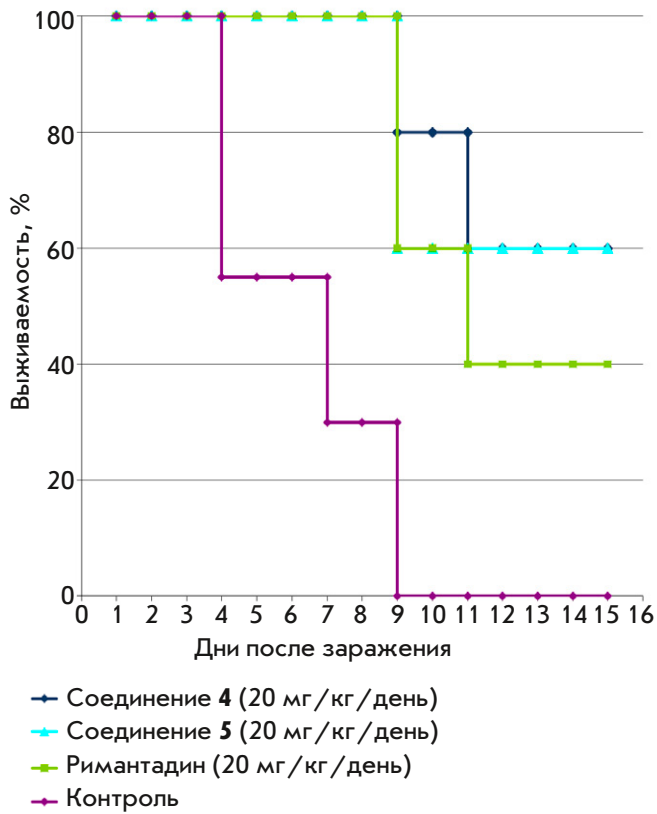


Рис. 2. Выживаемость мышей при лечении соединениями 4, 5 на модели гриппозной пневмонии, индуцированной высокой дозой вируса

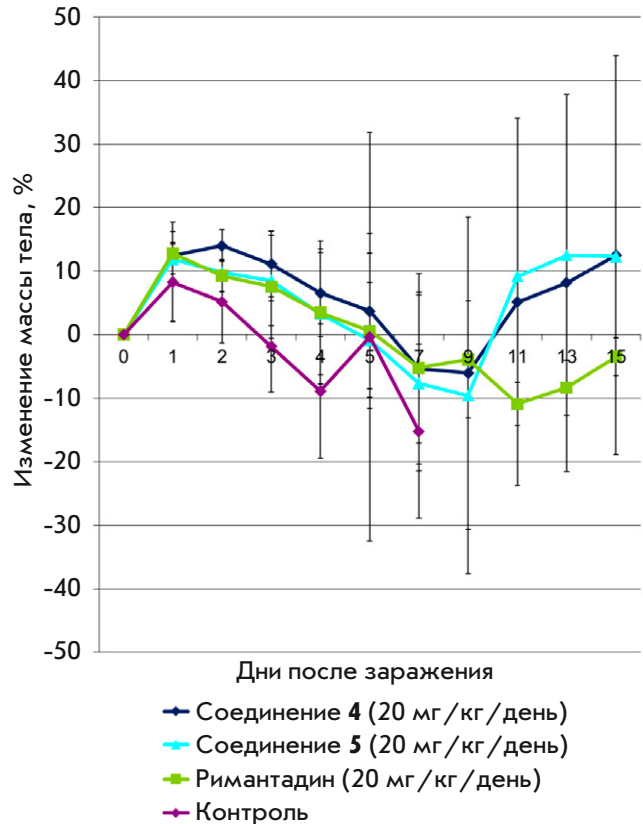


Рис. 3. Изменение массы тела мышей при лечении соединениями 4, 5 на модели гриппозной пневмонии, индуцированной высокой дозой вируса

20 мг/кг/день полностью защищала животных от гибели.

В контрольной группе мышей снижение массы тела наблюдалось начиная с 3 дня после заражения вирусом, достигая к 11 дню в среднем по группе 11%. Данные по выживаемости подтверждены важнейшим критерием тяжести заболевания – потерей веса. В группах, получавших соединение 5 в обеих дозах и соединение 4 в дозе 20 мг/кг/день, не отмечено снижения массы тела мышей (рис. 5). При лечении препаратом сравнения РМТ в дозе 20 мг/кг/день смертность (30%) и потеря веса были выше, чем при лечении соединениями 4 и 5 в такой же дозе, что коррелировало с выживаемостью.

Во второй серии опытов мы наблюдали большую выживаемость животных при использовании всех препаратов в аналогичных дозах по сравнению с первой серией опытов. Это связано с уменьшением дозы вируса, так как эффективность противовирусного препарата обратно пропорциональна дозе заражения, а также с тем, что группы для первичного скрининга соединений в первом эксперименте содержали меньше животных. Кроме того, во второй серии экспериментов наблюдали увеличение эффективности

Таблица 2. Эффективность 4, 5 и РМТ (перорально) на модели гриппозной пневмонии у мышей, инфицированных высокой дозой вируса гриппа А/Калифорния/04/2009

Доза, мг/кг	Выживаемость		Защита от смертности, %	СПЖ, дни
	выжившие/общее количество	Смертность, %		
Соединение 4				
20	3/5 ^a	40	60	12.6
Соединение 5				
20	3/5 ^b	40	60	12.2
РМТ				
20	2/5 ^b	60	40	10.1
Вирусный контроль				
	0/10	100		5.1

^a – (p = 0.003198); ^b – (p = 0.003198);

^a – (p = 0.031863).

соединений при увеличении их дозы. Полученные данные свидетельствуют о вирусспецифическом эффекте изучаемых препаратов.

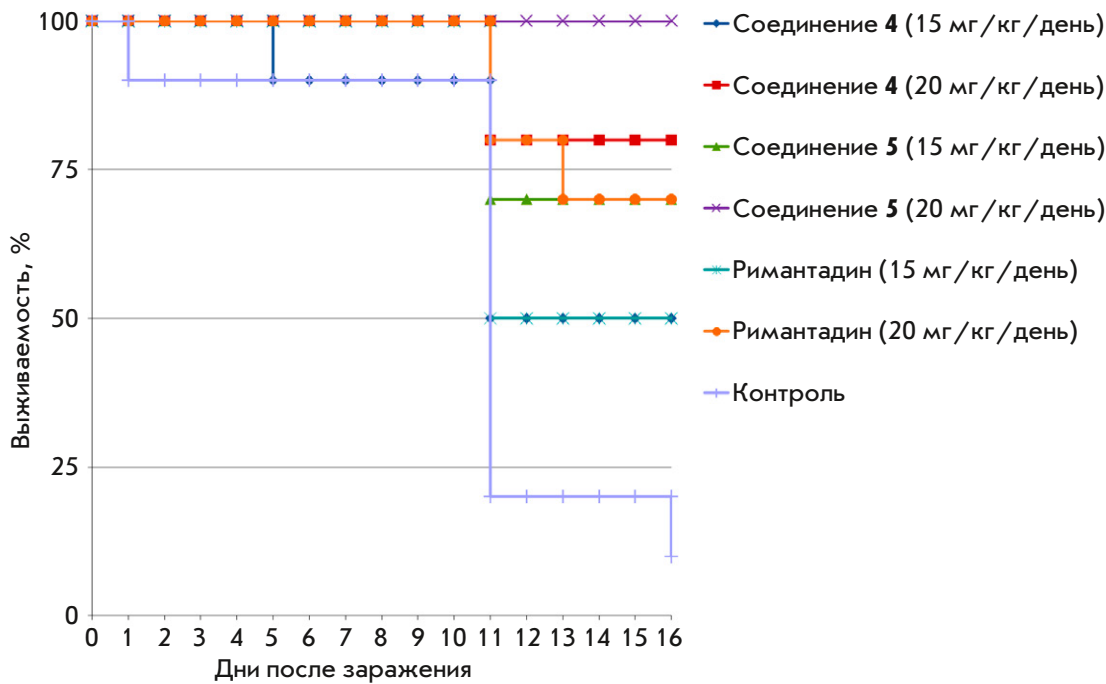


Рис. 4. Выживаемость мышей в модели гриппозной пневмонии, индуцированной низкой дозой вируса

Таблица 3. Эффективность соединений адамантанового ряда на модели гриппозной пневмонии у мышей, инфицированных низкой дозой римаптадин-резистентного вируса гриппа А/Калифорния/04/2009

Доза, мг/кг/день	Выживаемость		Защита от смертности, %	СПЖ, дни	Титр вируса, lg ТЦИД ₅₀
	выжившие/общее количество	смертность, %			
Соединение 4					
15	5/10 ^a	50	40	12.4	4.5±0.5
20	8/10 ^b	20	70	14	1.16±1.6
Соединение 5					
15	7/10 ^b	30	60	13.5	2.5±2.3
20	10/10 ^c	0	100	>16	2.6±2.3
РМТ					
20	7/10 ^a	30	60	13.7	1.3±0.3
Вирусный контроль					
-	1/9	90	-	10	6.1±0.3

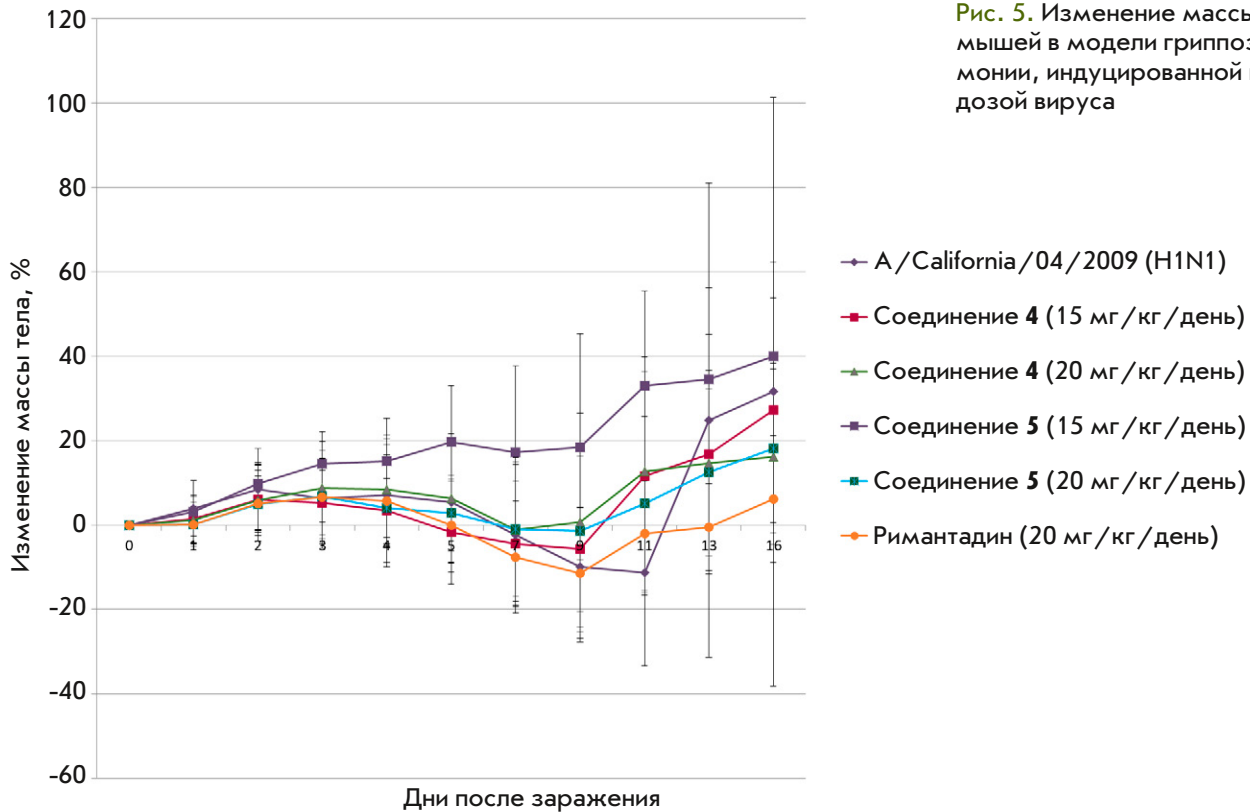
^a – (p = 0.075134); ^b – (p = 0.001106); ^c – (p = 0.007137); ^r – (p = 0.000000168); ^a – (p = 0.007137).

Влияние РМТ и соединений 4, 5 на титр вируса в легких мышей, инфицированных римаптадин-резистентным вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009

Данные об увеличении выживаемости подтверждены вирусологическим методом. Титр вируса отражает размножение вируса в легких – высокое значение титра вируса соответствует более тяжелым патологическим изменениям в легких. Наибольшим титр вируса (6.1 ± 0.3 lg ТЦИД₅₀) был в легких мышей контрольной группы, не получавшей лечения. Наименьшее подавление титра вируса в легких наблюдалось при лечении соединением 4 в дозе

15 мг/кг/день (4.5 ± 0.5 lg ТЦИД₅₀). Увеличение дозы соединения 4 до 20 мг/кг/день, а также лечение соединением 5 в обеих дозах значительно ингибировало размножение вируса, снижая титр вируса на 2.4–4.9 lg ТЦИД₅₀, что соответствует клиническим параметрам эффективности лечения этими соединениями. Важно отметить значительное подавление размножения вируса в легких при применении РМТ. Несмотря на то что в обеих сериях экспериментов смертность при лечении РМТ в дозе 20 мг/кг/день была выше, чем в случае соединений 4 и 5 в этой же дозе, она была статистически значимо ниже, чем в группе инфицированных нелеченных животных.

Рис. 5. Изменение массы тела мышей в модели гриппозной пневмонии, индуцированной низкой дозой вируса



Ранее мы показали отсутствие активности **РМТ** в культуре клеток в отношении римантадин-резистентного вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1). Поэтому данные об обнаружении активности **РМТ**, хотя и сниженной, в опытах на животных были несколько неожиданными для нас. Однако данные, полученные *in vivo*, более адекватно характеризуют противовирусную активность, поскольку учитывают особенности биологической доступности, токсичности, фармакокинетики соединений непосредственно в организме. Часто концентрации препаратов в плазме крови могут значительно превышать концентрации, необходимые для подавления противовирусной активности в опытах *in vitro*. Это может объяснять сниженную, но тем не менее выраженную эффективность препаратов в отношении резистентных к ним вирусов. Это подтверждается данными, полученными при изучении эффективности озельтамивира у хорьков [20]. В этих исследованиях озельтамивир был эффективным не только в отношении чувствительного к озельтамивиру вируса гриппа H1N1, но и озельтамивир-резистентного вируса с мутацией H274Y, хотя и в меньшей степени. Эти данные совпадают также с результатами клинических исследований, в которых показана эффективность озельтамивира во время эпидемического сезона 2008–2009 при циркуляции озельта-

мивир-резистентного штамма H1N1 (H274Y). Однако эта эффективность была ниже эффективности родственного ингибитора нейраминидазы занамивира, к которому чувствителен этот штамм [21]. Кроме того, показана эффективность **РМТ** при сезонном гриппе с циркуляцией римантадин-резистентного вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1), однако эффективность такого лечения была ниже, чем при применении озельтамивира [22].

Секвенирование адаптированного к мышам римантадин-резистентного вируса гриппа А/Калифорния/04/2009

Известно, что мутация S31N в белке M2 вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1) считается молекулярно-генетическим маркером резистентности к препаратам адамантанового ряда. Хотя нами показано, что применение аналогов **РМТ** более эффективно, чем **РМТ** в соответствующих дозах, тем не менее **РМТ** также эффективно снижал смертность, потерю веса и размножение вируса в легких животных на модели гриппозной пневмонии, индуцированной вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1), резистентным к **РМТ**. Исходный вирус гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1) не вызывает гибель животных, поэтому был использован вирус, адаптированный к мышам путем пассирования в лег-

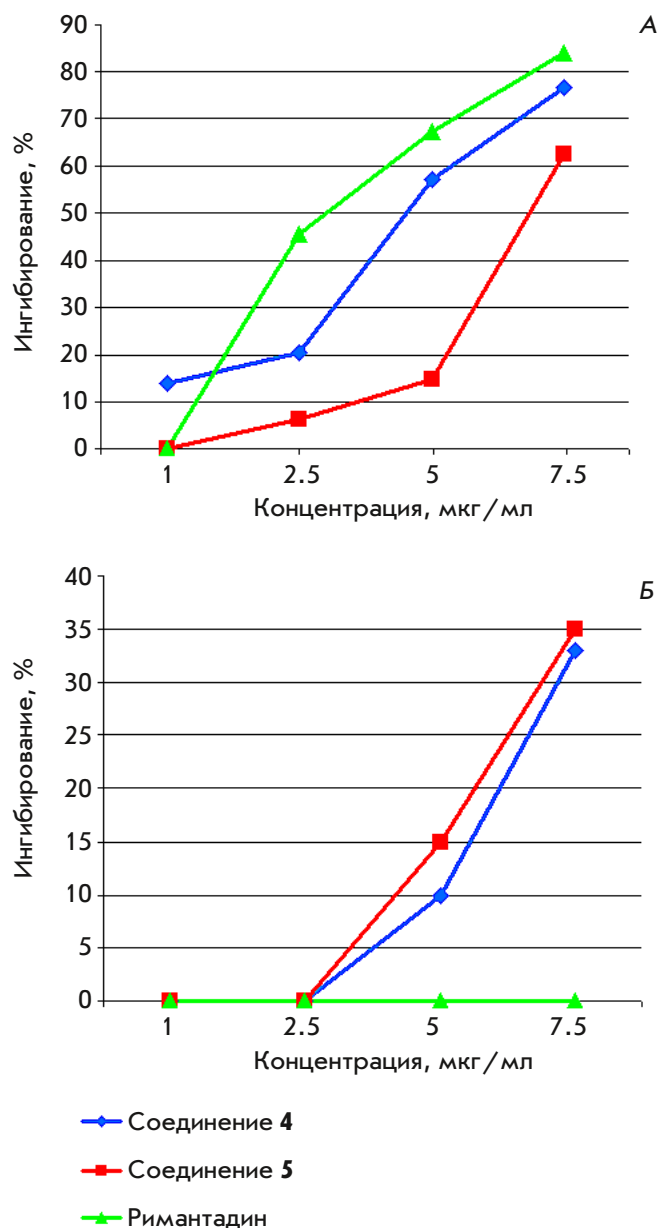


Рис. 6. Противовирусная активность соединений 4, 5 и РМТ в культуре клеток MDCK в отношении вируса гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2) (А) и вирусов гриппа А/Калифорния/04/09 (H1N1), полученных из легких леченных животных (Б)

ких. Полученные данные об эффективности РМТ позволили предположить, что мутация, ответственная за резистентность к РМТ, могла быть утрачена в процессе адаптации. С целью проверки этого предположения проведено секвенирование гена 7 (кодирует белок М2), адаптированного к мышам вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1). Показало, что белок М2 использованного нами адаптированного к мышам вируса гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1) со-

держит мутацию S31N, ответственную за резистентность к препаратам адамантанового ряда.

Изучение возможности возникновения резистентности к соединениям 4 и 5 на фоне их приема

Известно, что появление устойчивых к препаратам адамантанового ряда штаммов в культуре клеток и в организме животных происходит через 2–3 пассажа, в человеческой популяции такие штаммы могут появляться уже через 2–4 дня после начала лечения [4–6]. В следующей серии экспериментов изучена возможность возникновения резистентности к соединениям 4 и 5 на фоне их приема. Мы выделили вирусы из легких мышей на 4 день приема как обоих соединений, так и РМТ, и изучили их чувствительность к этим соединениям в культуре клеток. В качестве сравнения использовался вирус гриппа А/Аичи/2/68 (H3N2), чувствительный к РМТ (рис. 6). Видно, что как соединения 4, 5, так и РМТ обладали активностью в отношении данного вируса. В то же время вирусы, выделенные из легких мышей, зараженных римантадин-резистентным вирусом гриппа А/Калифорния/04/2009 (H1N1), получавших 4 и 5, оставались чувствительными к этим соединениям, что говорит об отсутствии развития резистентности после их неоднократного применения. При этом вирус, выделенный из легких животных, леченных РМТ, оставался резистентным к нему. Таким образом, нами не обнаружено возникновения резистентности к соединениям 4 и 5 на фоне их приема, в отличие от РМТ.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На модели гриппозной пневмонии мышей изучена противовирусная активность (R)-изомеров 6-(1-адамантил)-1,3-оксазинан-2-она (4) и 6-(1-адамантил)-пиперидин-2,4-диона (5), синтезированных в препаративных количествах согласно разработанному ранее методу. Изучение эффективности обоих соединений в дозах 15 и 20 мг/кг/день значительно снижало смертность животных, потерю веса, размножение вируса в легких и увеличивало продолжительность жизни. В проведенных экспериментах соединения 4 и 5 были более эффективными, чем римантадин, применяемый в тех же дозах и по такой же схеме. Пероральное лечение данными соединениями в течение 5 дней не приводило к возникновению резистентности. Эти соединения высокоселективно подавляют репродукцию вируса гриппа А, в том числе штаммов, резистентных к римантадину. Схема синтеза этих производных адамантана проста и содержит синтетически и экономически доступные соединения, а направленная модификация структуры

адамантильного (гидроксिलирование) и гетероциклического (замещение в положении 4 соединений **4** и **5**) фрагментов этих соединений должна способствовать дальнейшему усилению противовирусной активности. Учитывая сказанное, можно считать, что эти соединения перспективны для разработки нового средства против вируса гриппа А. ●

Н.Ю.К. благодарит за поддержку данного исследования Министерство науки и высшего образования Российской Федерации. Авторы благодарят Г.Д. Коломникову (ИНЭОС РАН) за ценную помощь в организации исследовательской работы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Webster R.G., Monto A.S., Braciale T.J., Lamb R.A. Textbook of Influenza, 2nd Ed. New York: Wiley, 2013. 520 p.
- [https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-\(seasonal\)](https://www.who.int/en/news-room/fact-sheets/detail/influenza-(seasonal))
- Zlydnikov D.M., Kubar O.I., Kovaleva T.P., Kamforin L.E. // Infect. Dis. 1981. V. 3. № 3. P. 408–421.
- Belshe R.B., Burk B., Newman F., Cerruti R.L., Sim I.S. // Infect. Dis. 1989. V. 159. № 3. P. 430–435.
- Bright R.A., Shay D., Bresee J., Klimov A., Cox N., Ortiz J. // MMWR Morb Mortal Wkly Rep. 2006. V. 55. № 2. P. 44–46.
- Hayden F.G., Hay A.J. // Genetic diversity of RNA viruses. Berlin, Heidelberg: Springer, 1992. V. 176. P. 119–130.
- Belshe R.B., Smith M.H., Hall C.B., Betts R., Hay A.J. // Virol. 1988. V. 62. № 5. P. 1508–1512.
- Dong G., Peng C., Luo J., Wang C., Han L., Wu B., Ji G., He H. // PLoS One. 2015. V. 10. № 3. e0119115.
- Yen H.-L. // Antimicrobial Drug Resistance. Springer, Cham. 2017. V. 1. P. 491–501.
- Shaw M.L. // ACS Infectious Diseases. 2017. V. 3. № 10. P. 691–694.
- Koszalka P., Tilmanis D., Hurt A.C. // Influenza Other Respiratory Viruses. 2017. V. 11. № 3. P. 240–246.
- Amarelle L., Lecuona E., Sznajder J.I. // Arch. Bronconeumol. 2017. V. 53. № 1. P. 19–26.
- Leneva I.A., Russell R.J., Boriskin Y.S., Hay A.J. // Antiviral Res. 2009. V. 81. № 2. P. 132–140.
- Liu M.-Y., Wang S., Yao W.-F., Wu H.-Z., Meng S.-N., Wei M.-J. // Clin. Ther. 2009. V. 31. № 4. P. 784–792.
- Ma C., Zhang J., Wang J. // Mol. Pharmacol. 2016. V. 90. № 3. P. 188–198.
- Musharrafieh R., Ma C., Wang J. // Antiviral Res. 2018. V. 153. P. 10–22.
- Musharrafieh R., Lagarias P.I., Ma C., Tan G.S., Kolocouris A., Wang J. // Mol. Pharmacol. 2019. V. 96. № 2. P. 148–157.
- Kuznetsov N.Yu., Tikhov R.M., Godovikov I.A., Medvedev M.G., Lyssenko K.A., Burtseva E.I., Kirillova E.S., Bubnov Yu.N. // Org. Biomol. Chem. 2017. V. 15. № 15. P. 3152–3157.
- Миронов А.Н., Бунятян Н.Д., Васильев А.Н., Верстакова О.Л., Журавлева М.В., Лепахин В.К., Коробов Н.В., Меркулов В.А., Орехов С.Н., Сакаев И.В. и др. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
- Oh Ding // 5th isirv-AVG Conference Prevention and Treatment of RVI: Antivirals, Traditional Therapies and Host-Directed Interventions. 2017. Shanghai, China.
- Жданов К.В., Захаренко С.М., Львов Н.И., Мальцев О.В. // Военно-медицинский журн. 2016. Т. 337. № 2. С. 3.
- Kawai N., Ikematsu H., Hirotsu N., Maeda T., Kawashima T., Tanaka O., Yamauchi S., Kawamura K., Matsuura S., Nishimura M., et al. // Clin. Infect. Dis. 2009. V. 49. № 12. P. 1828–1835.

UDC 57.091 + 57.092

Forces for Folding

C. Crane-Robinson

Biophysics Laboratories, School of Biology, University of Portsmouth, PO1 2DT, UK

E-mail: colyn.crane-robinson@port.ac.uk

Received January 12, 2021; in final form, March 04, 2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11336

ABSTRACT Understanding the nature of the forces driving the folding of proteins, nucleic acids and the formation of their complexes absolutely requires thermodynamic data, in addition to structural information. In practical terms, this means the use of super-sensitive scanning and titration calorimeters for experimental determination of the heats (enthalpies) characterising these processes. Peter Privalov was both an experimental thermodynamicist and a calorimeter designer/manufacturer who followed and propagated this credo. The sum total of his many publications, every one of which addresses a fundamental question, is his lasting epitaph.

KEYWORDS thermodynamics, calorimeters, enthalpy, protein folding, hydration.

INTRODUCTION

The first views of the folded globin chains, with a heme group nestling among the many helices, as shown by Perutz and Kendrew in the late '50s, was a wonder to behold. Pauling's α -helix was celebrated beyond expectations. The question as to how a tetramer of such globules fulfilled its functions remained to be elucidated – and Perutz spent the rest of his life doing just that – but the structural underpinnings were very apparent. But not quite to everyone's full satisfaction, however. Peter Privalov immediately asked himself: "what are the forces that stabilise these helices and drive their folding to generate this complex but exquisite bundle"? Another question was posed by Oleg Ptitsyn: "by what route, i.e. pathway, does the disordered chain convert to the folded globule"? So, new issues were raised, moreover from new directions.

EXPOSITION

Peter Privalov was the quintessential experimental scientist who realised that the only way to define the forces responsible was to make thermodynamic measurements, which meant determining the heats of protein folding. At the dilute protein concentrations for which intermolecular effects can be neglected, such heats are extremely small, best arrived at by measuring the heat capacity changes of the solution as the protein undergoes thermal denaturation. So he devised (one could say 'invented') a calorimeter of two identical compartments that measured the heat capacity of the protein solution in one, relative to plain buffer in the other as their temperature was raised. The differential scanning calorimeter was thus born [1, 2].

The indicative protein used was lysozyme, and its calorimetric heat of unfolding was measured [3]. The heat input required (by convention a *positive* enthalpy) could be explained by the breaking of H-bonds and van der Waals close contacts, and the rise in the concomitant entropy, a result of the increased conformational freedom of the polypeptide chain. That much seemed clear, but a simpler approach to a determination of the thermodynamic parameters of melting is possible; it is called the van't Hoff (vH) plot. The sigmoidal melting transition of proteins suggests some degree of cooperativity, and if passage through the transition is plotted against the inverse temperature, this yields the apparent enthalpy and entropy involved: so, why the necessity for a sensitive calorimeter? Unfortunately, the thermodynamic parameters derived from a vH plot indicate nothing about the degree of cooperativity and can be positively misleading. But when the calorimetric enthalpy of lysozyme denaturation was compared with the vH value, they turned out to be actually the same! The correct value from the vH plot meant that the denaturation transition involves *only* two states, which must be the fully folded form and the fully denatured form of the chain. So, lysozyme denaturation is a fully cooperative process in which no other thermodynamically relevant states participate, proving its unfolding to be a genuine "all or nothing" process. The physical description of such a two-state transition is illustrated by the state of the protein in the middle of the unfolding transition: half the sample is still fully folded, and the other half completely unfolded; i.e., it is *not* a homogeneous sample of half-folded macromolecules. Demonstration

of protein folding as such a highly cooperative process was a revelatory discovery at that time.

Privalov then turned to larger proteins, such as pepsinogen, and found that the calorimetrically measured melting enthalpy was about twice that obtained from the vH plot [4]. It followed that native pepsinogen, although apparently a unified single fold, in fact consists of two quasi-independent sub-domains, each with its hydrophobic core. Differential scanning calorimetry might have seemed a somewhat obscure methodology in the 1970s and not of prime importance, but Privalov's observations were direct support for his conviction that solving the 3D structures of proteins was not sufficient for understanding the nature of the forces driving their formation and providing the stability of their native folds: only thermodynamic studies could do that.

Peter Privalov was the quintessential experimental scientist, a thermo-dynamicist extraordinary, who sadly died in Baltimore on December 20th 2020.

His scientific career started in his native Georgia at the Institute of Physics in Tbilisi, doing his Ph.D. under the supervision of its director, the low-temperature physicist Elveter Andronikashvili. His first super-sensitive calorimeter for measuring temperature-induced heat capacity changes in dilute solutions appeared in 1964 [1]. Even at that time, however, he was not quite a lone wolf: Julian Sturtevant was already making calorimetric measurements [5] and was much admired by Privalov, who frequently spoke and wrote very warmly of his influence [6]. In 1967, Privalov was recruited as one of 6 team leaders at the founding of the Institute of Protein Research in Pouchchino (a research town 60 miles south of Moscow) – to which Ptitsyn was also recruited. He finally assembled a team to develop a 'school of bio-thermodynamics', an essential prerequisite, as he saw it, for taking the subject forward. It also provided the opportunity for instrument development and, before long, the commercial manufacture of a scanning calorimeter (DASM-1). This instrument was unique and consequently sold widely even in Western countries. Export of sophisticated scientific equipment from the USSR at that time was very rare and in stark contrast to the high level of imports such as NMR spectrometers, ultracentrifuges and the like. For this achievement, Privalov won a State Prize in 1978.

The single defining principle of his 'School' was to understand the forces controlling the formation, stability, and interactions of biological macromolecules: take a pure sample of the object in question and subject it to a thorough experimental calorimetric analysis. Then, do your best to interpret the results obtained: don't start with a theoretical analysis, as this might lead to strong convictions as to the expected result and

be very prejudicial to performing appropriate experiments. Meaning: theory should follow an experiment, not lead it!

One cause of Privalov's wariness regarding theoretical descriptions of the driving forces was uncertainty as to how the role of the solvating water was modeled. The significance of hydration was exemplified by noting the large increase in heat capacity (ΔC_p) of proteins when they denature and expose the hydrophobic residues of the core to water – the explanation for which was the changed state of the hydrating water molecules. Privalov was always at pains to point out the importance of knowing ΔC_p , a quantity that determines the temperature dependence of all the thermodynamic parameters. The role of water very often drove his thinking: in 1979, he published a seminal paper [7] explaining how hydration of the collagen triple helix leads to the temperature dependence of its stability and flexibility.

The dissolution of the Soviet Union as a political entity in 1991 soon led to the collapse of its scientific enterprise and a large-scale exodus of researchers. Privalov was no exception, but unlike the contract posts given to the majority, he was offered a tenured professorship at a top U.S. research university (Johns Hopkins) that he took up in 1992. Despite such a dramatic change of circumstances, he never wavered in his commitment to understanding the basic principles of macromolecular stability: he did not resort to 'opportunistic science' and go with the prevailing winds so as to attract funding. Only fundamental questions were asked, and the experiments designed to answer them were then conducted. Nor did he stop developing DSC instrumentation: calorimeters with capillary cells made from gold were constructed. The idea for this metal came to Privalov (he reported) as he sat in the dentist's chair having a gold crown fitted: what an ideal material, very high thermal conductivity, chemically inert and very malleable. Such instruments were then commercialized in the U.S. Several spectacular scientific achievements from the Hopkins Lab come to mind, such as the 'cold denaturation' of proteins [8], accompanied by heat release, and the energetics of folding of an individual α -helix [9]. To these must be added his experimental determination of the entropy associated with forming a dimeric protein from two separate monomers – the so-called translational entropy – that he determined to be much less than predicted; in fact, about one order of magnitude lower than proposed by theoreticians [10, 11].

Privalov's realization that precision is essential in the measurement of thermodynamic quantities meant that he was not always an easy-going task-master: he expected results of maximum precision and very small tolerance for errors – a challenging requirement. But

those results were trustworthy, and the data could be relied upon. Although demanding, Privalov most certainly did not lack a sense of humour. On a visit to a thermodynamics conference organised by the UK Institute of Physics in Salford, the birthplace of James Joule: we bemoaned the fact that whilst our data were always expressed in joules, many participants were still using calories. “Ah yes”, Privalov remarked, “but remember that Joule himself used calories”!

When the 21st century dawned, Privalov was very successfully installed at Hopkins and had switched from individual proteins to DNA and its interactions with the binding domains (DBDs) of transcription factors. Measurements of binding enthalpies were confounded by concomitant refolding of DBDs: Privalov’s important contribution was to demonstrate how a combination of DSC with titration calorimetry can overcome this problem and thereby define the forces giving rise to the fully folded complexes revealed by crystallography [12]. In recent years, the DNA duplex itself became the object of study, joining many other researchers in a popular topic – but a field in the firm grip of the conviction that duplex melting is not accompanied by any change in heat capacity: so, DNA energetics are temperature independent. However, using careful measurements with several short duplexes, Privalov showed this not to be the case, once again the hydrating water playing a critical role [13].

Privalov never let up on his determination to understand the basis of all the forces involved in macromolecular folding and stability, most recently the contribution of hydrogen bonding. Experiments to determine

the energetics of formation of the DNA duplex led to the conclusion that the contribution of H-bonds is not enthalpic but comes from the entropy increase resulting from the release of the water molecules bound to the bases in the disordered state of the oligonucleotides [14]. If that is the case, then what can be said about the formation of the H-bonds in α -helices? Is that also an essentially entropic process? In fact, Privalov’s article discussing this last, very fundamental point is currently in press [15].

CONCLUSIONS

Science is a conversation: its participants tell each other about their results, and the building rises from their combined efforts. Privalov was both diligent and masterful in presenting his results: firstly, in writing many individual articles, followed by several, very extensive reviews of his work on proteins [16, 17], then on protein/DNA interactions [18], and finally in 2012 publishing a whole book “Microcalorimetry of Macromolecules” that splendidly sums up his complete oeuvre [19]. There is so much to be admired in all that Privalov achieved: the sum total of his publications is his epitaph. We have lost a great experimentalist of the highest stature, devoted to basic science, and we are all much the poorer for it.

ACKNOWLEDGEMENT

An abbreviated obituary of Peter Privalov (having some overlap with the present article) has appeared in the Newsletter of the U.S. Biophysical Society. ●

REFERENCES

1. Privalov P.L., Monaselidze D.R., Mrevlishvili G.M., Magaldadze V.A. // *J. Exp. Theor. Phys.* 1964. V. 47. P. 2073–2076.
2. Privalov P.L. // *FEBS Lett.* 1974. V. 40. P. S140–S153.
3. Pfeil W., Privalov P.L. // *Biophys. Chem.* 1976. V. 4. P. 23–32.
4. Privalov P.L., Mateo P.L., Khechinashvili N.N., Stepanov V.M., Revina L.P. // *J. Mol. Biol.* 1981. V. 152. P. 445–464.
5. Sturtevant J.M., Geidushek E.P. // *J. Am. Chem. Soc.* 1958. V. 80. P. 2911.
6. Privalov P.L. // *Biophys. Chem.* 2007. V. 126. P. 13–15.
7. Privalov P.L., Tiktopulo E.I., Tischenko V.M. // *J. Mol. Biol.* 1979. V. 127. P. 203–216.
8. Privalov P.L. // *Crit. Rev. Biochem. Mol. Biol.* 1990. V. 25. P. 281–305.
9. Taylor J.W., Greenfield N.J., Wu B., Privalov P.L. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 291. P. 965–976.
10. Tamura A., Privalov P.L. // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 273. P. 1048–1060.
11. Privalov P.L., Crane-Robinson C. // *Biophys. J.* 2018. V. 114. P. 15–20.
12. Privalov P.L., Jelesarov I., Read C.M., Dragan A.I., Crane-Robinson C. // *J. Mol. Biol.* 1999. V. 294. P. 997–1013.
13. Vaitiekunas P., Crane-Robinson C., Privalov P.L. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. P. 8577–8589.
14. Privalov P.L., Crane-Robinson C. // *Eur. Biophys. J.* 2020. V. 49. P. 315–321.
15. Dragan A.I., Crane-Robinson C., Privalov P.L. // *Eur. Biophys. J.* 2021. In Press. doi.org/10.1007/s00249-021-01520-w
16. Privalov P.L. // *Adv. Protein Chem.* 1979. V. 33. P. 167–241.
17. Makhatadze G.I., Privalov P.L. // *Advan. Protein Chem.* 1995. V. 47. P. 307–425.
18. Privalov P.L., Dragan A.I., Crane-Robinson C., Breslauer K.J., Remeta D.P., Minetti C.A.S.A. // *J. Mol. Biol.* 2007. V. 365. P. 1–9.
19. Privalov P.L. *Microcalorimetry of macromolecules: The physical basis of biological structures.* New Jersey: Wiley, 2012.

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 все необходимые файлы следует загрузить на сайт www.actanaturae.ru:

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

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

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

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

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

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

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

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

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

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

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

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

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

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

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

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

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

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

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

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

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

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

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

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

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

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

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

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