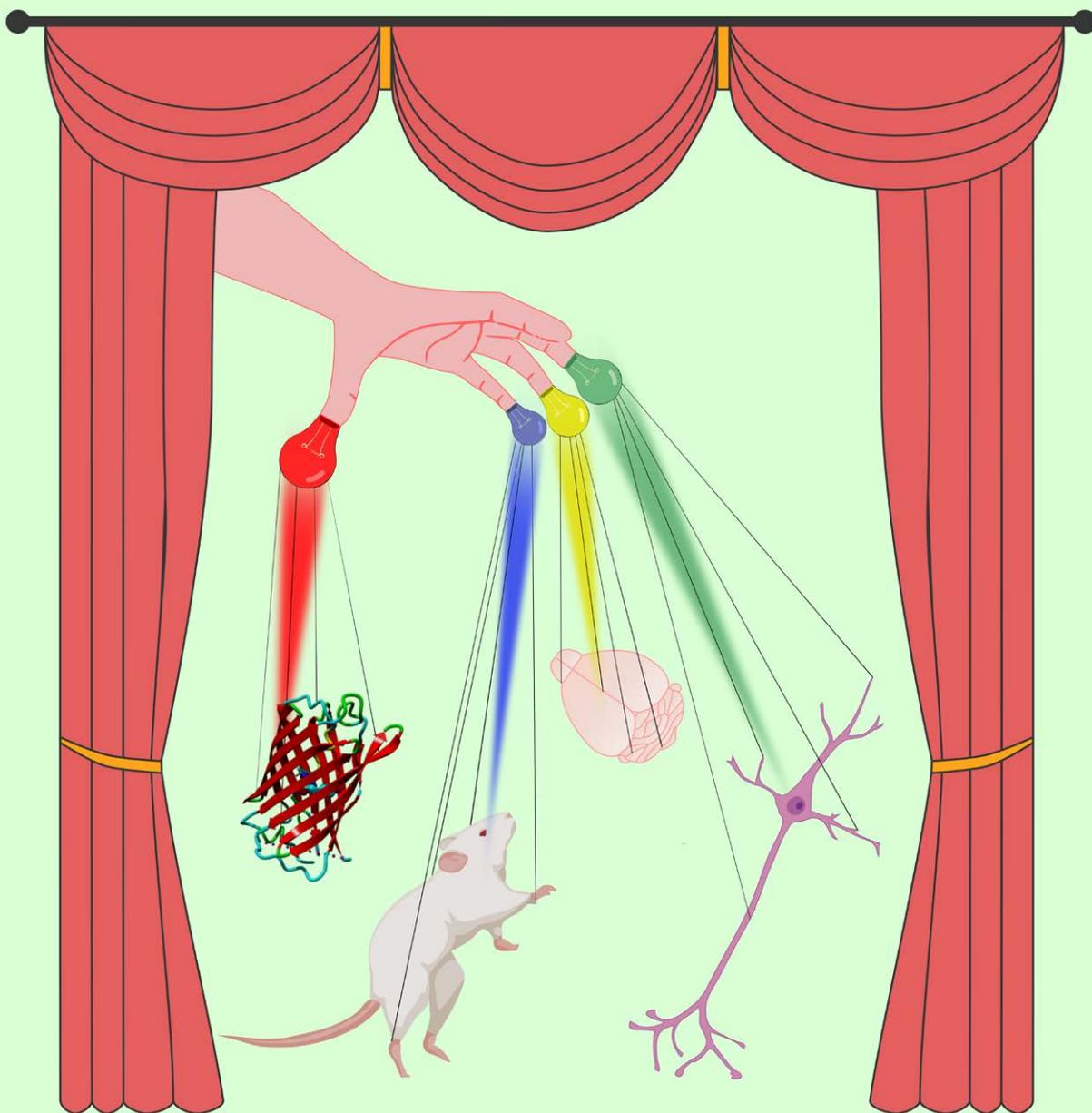


Acta Naturae

Молекулярные инструменты направленного контроля электрической активности нервных клеток



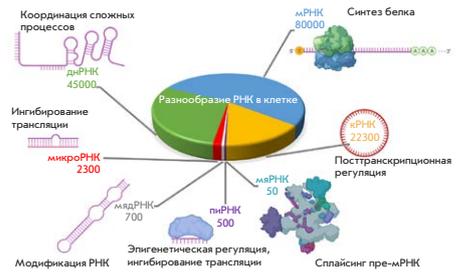
**СЕРДЕЧНО-СОСУДИСТЫЕ
ЭФФЕКТЫ ТОКСИНОВ ЗМЕИНОГО ЯДА:
КАРДИОТОКСИЧНОСТЬ И КАРДИОПРОТЕКЦИЯ**
СТР. 4

**ТАРГЕТИНГ ВНЕКЛЕТОЧНЫХ
ВЕЗИКУЛ К ДЕНДРИТНЫМ
КЛЕТКАМ И МАКРОФАГАМ**
СТР. 114

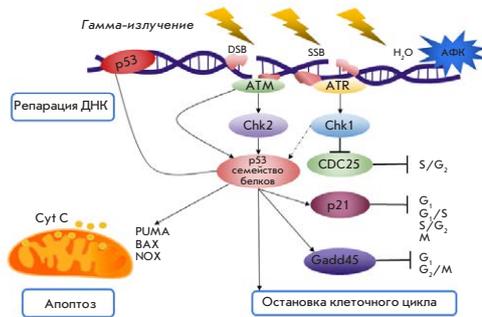
Некодирующие РНК в патогенезе глиальных опухолей

Т. Ф. Коваленко, Т. Д. Ларионова, Н. В. Антипова, М. И. Шахпаронов, М. С. Павлюков

Глиобластома – одна из наиболее агрессивных опухолей головного мозга, характеризующаяся чрезвычайно плохим прогнозом и почти 100% частотой возникновения рецидивов. В обзоре рассмотрены длинные некодирующие РНК, кольцевые РНК, а также микроРНК, РНК, взаимодействующие с PIWI, малые ядерные и малые ядрышковые РНК. Приведена классификация этих РНК, описана их роль в различных сигнальных путях и физиологических процессах. Приведены примеры онкогенных и онкосупрессорных некодирующих РНК каждого класса в контексте их участия в патогенезе глиом и глиобластом. Рассмотрены возможности применения некодирующих РНК в качестве диагностических маркеров и средств терапии глиобластом.



Функции различных типов нкРНК в клетке



Механизмы ответа на ионизирующее излучение с участием белков семейства р53

Белки семейства р53 в ответе опухолевых клеток на ионизирующее излучение: развитие проблемы

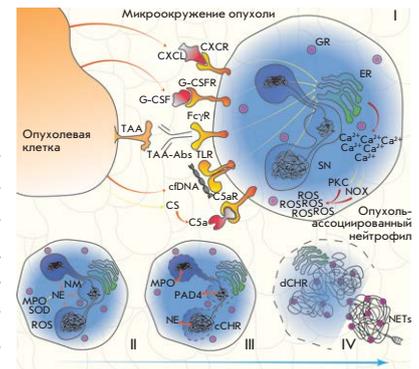
О. А. Кучур, Д. О. Кузьмина, М. С. Духинова, А. А. Штиль

В ответ на ионизирующее излучение в опухолевых клетках активируются механизмы выживания, что снижает эффективность лечения. В становлении радиорезистентности ключевую роль играют р53, р63 и р73, составляющие семейство белков-регуляторов многочисленных путей передачи внутриклеточных сигналов. В обзоре анализируются р53-зависимые и -независимые механизмы преодоления устойчивости опухолевых клеток к лучевому воздействию.

Внеклеточные ловушки нейтрофилов (NET): перспективы таргетной терапии

Д. В. Волков, Г. В. Тец, Ю. П. Рубцов, А. В. Степанов, А. Г. Габиев

Противоопухолевая терапия, в том числе адоптивная иммунотерапия, неизбежно сталкивается с мощным противодействием со стороны прогрессирующей опухоли. Установлено, что на развитие опухоли и ее способность к метастазированию прямо влияют внеклеточные ловушки нейтрофилов (neutrophil extracellular traps, NET), образующиеся в результате ответа на опухолевые стимулы. Кроме того, ядерная ДНК нейтрофилов – главный компонент NET – создает пространственную преграду для взаимодействия CAR-T с опухолевыми клетками. Для повышения эффективности действия CAR-T путем снижения влияния NET крайне перспективным представляется использование эукариотической ДНКазы I. Рассмотрена роль NET в опухолевом микроокружении и различные подходы к снижению влияния NET на опухоль.

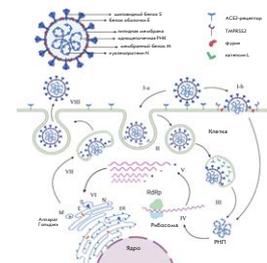


Сигнальный путь NOX-зависимого нетоза

Генетическое разнообразие и эволюция биологических свойств коронавируса SARS-CoV-2 в условиях глобального распространения

А. А. Никонова, Е. Б. Файзулов, А. В. Грачева, И. Ю. Исаков, В. В. Зверев

В обзоре представлена общая характеристика SARS-CoV-2 и вызываемого им заболевания, генетическое разнообразие вируса и его взаимосвязь с биологическими свойствами SARS-CoV-2, такими, как вирулентность и контагиозность.



Строение вириона и основные этапы цикла репродукции SARS-CoV-2

Acta Naturae

ТОМ 13, № 3 (50), ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ 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 сентября 2021 г.
Тираж 25 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

- А. С. Аверин, Ю. Н. Уткин
**Сердечно-сосудистые эффекты токсинов
змеиного яда: кардиотоксичность и кардио-
протекция. 4**
- Д. В. Волков, Г. В. Тец, Ю. П. Рубцов,
А. В. Степанов, А. Г. Габибов
**Внеклеточные ловушки нейтрофилов (NET):
перспективы таргетной терапии. 15**
- Д. А. Гвоздев, Е. Г. Максимов,
М. Г. Страховская, В. З. Пащенко,
А. Б. Рубин
**Гибридные конструкции
фотосенсибилизаторов с люминесцентными
наночастицами: дизайн комплексов 24**
- Т. Ф. Коваленко, Т. Д. Ларионова,
Н. В. Антипова, М. И. Шахпаронов,
М. С. Павлюков
**Некодирующие РНК в патогенезе
глиальных опухолей 38**

СОДЕРЖАНИЕ

Д. В. Колесов, Е. Л. Соколинская,
К. А. Лукьянов, А. М. Богданов
**Молекулярные инструменты
направленного контроля электрической
активности нервных клеток. Часть I** 52

О. А. Кучур, Д. О. Кузьмина,
М. С. Духинова, А. А. Штиль
**Белки семейства р53 в ответе опухолевых
клеток на ионизирующее излучение:
развитие проблемы** 65

А. А. Никонова, Е. Б. Файзулов,
А. В. Грачева, И. Ю. Исаков, В. В. Зверев
**Генетическое разнообразие и эволюция
биологических свойств коронавируса
SARS-CoV-2 в условиях глобального
распространения** 77

Л. А. Ромодин
**Хемилюминесценция в исследовании
свободнорадикальных реакций. Часть 1** 90

Sidney Altman, Carlos Angele-Martinez
**Inactivating Gene Expression with Antisense
Modified Oligonucleotides** 101

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

А. Р. Ким, Е. Н. Павлова, В. Е. Блохин,
В. В. Богданов, М. В. Угрюмов
**Провокационный тест с монойодтирозином
на экспериментальной модели болезни
Паркинсона** 106

А. А. Колачева, М. В. Угрюмов
**Модель деградации дофаминергических
аксонов nigростриатной системы мышей
для тестирования нейропротекторов** 110

Л. А. Овчинникова, И. Н. Филимонова,
М. Ю. Захарова, Д. С. Балабашин,
Т. К. Алиев, Я. А. Ломакин, А. Г. Габибов
**Таргетинг внеклеточных везикул
к дендритным клеткам и макрофагам** 114

А. А. Попов, К. Е. Орищенко,
К. Н. Науменко, А. Н. Евдокимов,
И. О. Петрусева, О. И. Лаврик
**Метод оценки эффективности работы
системы эксцизионной репарации
нуклеотидов *ex vivo*** 122

Рецензия на учебник «Иммунология» 126

Правила для авторов 129

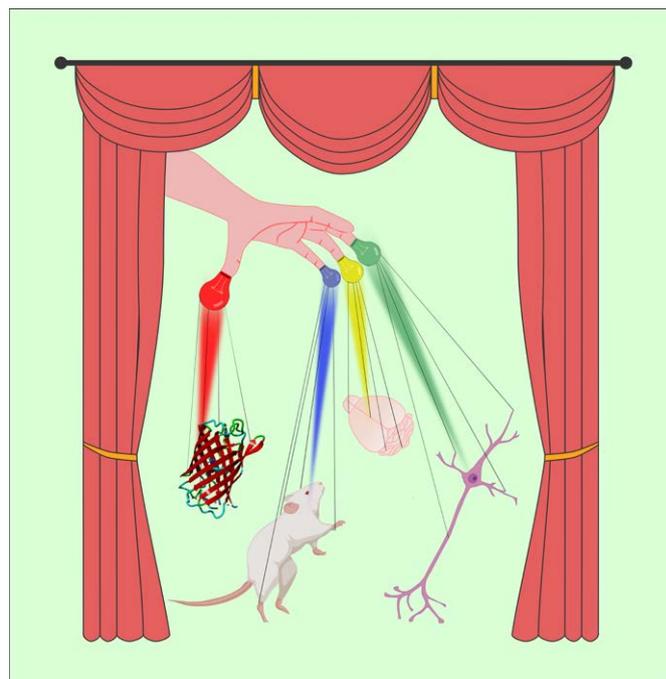


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью Колесов и др.)

УДК 615.919; 577.112

Сердечно-сосудистые эффекты токсинов змеиного яда: кардиотоксичность и кардиопротекция

А. С. Аверин¹, Ю. Н. Уткин²¹Институт биофизики клетки РАН – обособленное подразделение ФИЦ ПНЦБИ РАН, Пущино
Московской обл., 142290 Россия²Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова
РАН, Москва, 117997 Россия

*E-mail: averinas82@gmail.com

Поступила в редакцию 09.03.2021

Принята к печати 13.04.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11375

РЕФЕРАТ Яды змей, представляющие собой сложные смеси пептидов и белков, действуют на различные жизненно важные системы организма. Одной из основных мишеней токсических компонентов ядов змей является сердечно-сосудистая система. Присутствующие в ядах белки и пептиды могут действовать разнонаправленно, проявляя как кардиотоксические, так и кардиопротекторные эффекты. Основные классы таких соединений – кардиотоксины кобр, фосфолипазы А₂, натрийуретические и брадикинин-потенцирующие пептиды. Имеется еще группа белков, которые могут усиливать ангиогенез и включают, например, эндотелиальные факторы роста сосудов, обладающие гипотензивным и кардиопротекторным эффектом. Белки и пептиды ядов, проявляющие кардиотропные и вазоактивные эффекты, рассматривают в качестве перспективной основы для создания новых лекарственных препаратов, способных предотвращать или замедлять развитие патологических процессов при сердечно-сосудистых заболеваниях, являющихся в настоящее время основной причиной смерти во всем мире. В частности, брадикинин-потенцирующий пептид из яда змеи *Bothrops jararaca* был первым соединением змеиного яда, на основе которого созданы гипотензивные препараты каптоприл и эналаприл, широко применяемые в настоящее время. В представленном обзоре рассмотрено современное состояние исследования компонентов змеиных ядов, воздействующих на сердечно-сосудистую систему, проанализированы механизмы физиологического действия этих токсинов и перспективы их медицинского применения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА брадикинин-потенцирующие пептиды, змеиный яд, кардиопротекторы, кардиотоксины, натрийуретические пептиды, сердечно-сосудистая система.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АПФ – ангиотензинпревращающий фермент; АР – адренорецептор; БПП – брадикинин-потенцирующий пептид; КТ – кардиотоксин; НП – натрийуретический пептид; РНП – рецептор НП; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания; ССС – сердечно-сосудистая система; ТПТ – трехпетельный токсин; ФЛА₂ – фосфолипаза А₂; ЭФРС – эндотелиальный фактор роста сосудов; ANP – предсердный НП; BNP – мозговой НП; CNP – НП С-типа; SRTX – сарафотоксин; VEGFR – рецептор фактора роста эндотелия сосудов.

ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) – обширная группа заболеваний сердца и сосудов различной этиологии, приводящих к нарушению нормальных функций различных органов, а в тяжелых случаях к летальным исходам, являются огромным бременем для здравоохранения и экономики во всем мире. По оценкам ВОЗ, ежегодно от болезней сердца умирают более 17 млн человек. Считается, что к 2030 году это число превысит 23 млн. Главными причинами смерти являются инсульт и ишемическая болезнь

сердца, которые составляют 31% от всех смертельных случаев. В России этот процент достигает 57%. В настоящее время существует большое количество препаратов самого разнообразного механизма действия, применяемых при ССЗ. Однако все они обладают определенными побочными эффектами. Так, например, антиагреганты и антикоагулянты могут вызывать осложнения со стороны желудочно-кишечного тракта и внутричерепные кровотечения. Среди побочных эффектов ингибиторов ангиотензинпревращающего фермента наиболее часто встречаются

артериальная гипотония, приступообразный непродуктивный сухой кашель, ангионевротический отек верхних дыхательных путей, а также холестаза, гиперкалиемия, протеинурия, нарушение функции почек. Применение β -адреноблокаторов может сопровождаться развитием целого ряда побочных эффектов как кардиальных (ухудшение насосной функции сердца, брадикардия и т.д.), так и экстракардиальных (сонливость, депрессия, бронхоспазм и др.). Кроме того, значительную проблему представляет недостаточная эффективность лекарственной терапии целого ряда ССЗ, особенно сильно проявляющаяся в случае нескольких патологий у одного пациента. Например, серьезным вызовом для современной медицины является хроническая сердечная недостаточность, которая встречается все чаще и при этом во многих случаях плохо поддается коррекции. Все это диктует необходимость поиска более эффективных лекарственных соединений с принципиально новым механизмом действия, лишенных недостатков, присущих имеющимся препаратам.

ЯДЫ ЗМЕЙ – СОСТАВ И СВОЙСТВА

Яды змей представляют собой сложные смеси соединений с высокой биологической активностью и, как правило, с высокой избирательностью действия. Эти соединения способны оказывать воздействие на различные системы организма, однако основными мишенями являются нервная и сердечно-сосудистая системы (ССС). В зависимости от того, какая система поражается сильнее, яды змей делят на нейротоксические и гемотоксические. Нейротоксические яды характерны для змей семейства Elapidae, включающего кобр, крайтов, мамб, коралловых и некоторых других змей, и содержат в основном токсины неферментативной природы, блокирующие проведение нервных импульсов. Гемотоксическими ядами обладают в основном змеи семейства Viperidae, включающего гадюк, щитомордников, гремух и некоторых других змей. В состав гемотоксических ядов входят в основном ферменты, вызывающие коагулопатию. И те и другие яды могут содержать токсины, воздействующие на ССС, при этом в состав яда одной особи могут входить до нескольких сотен различных пептидно-белковых компонентов. Белки и пептиды, содержащиеся в ядах змей и воздействующие на ССС, могут действовать разнонаправленно, вызывая как кардиотоксические, так и кардиопротекторные эффекты. Эти соединения относятся к разным семействам токсинов и взаимодействуют в организме с различными биологическими мишенями. Отравление ядами змей связано с рядом сердечно-сосудистых эффектов, включая гипотензию, инфаркт миокарда, остановку сердца, гипертензию,

бради- или тахикардию и фибрилляцию предсердий [1]. Учитывая множественность эффектов, можно полагать, что змеиный яд является богатым источником веществ, влияющих на ССС. Такие соединения, обладающие различными видами биологической активности, могут иметь значительную фармакологическую ценность и представлять перспективную основу для разработки новых лекарственных средств.

Следует отметить, что змеиные яды содержат большое число пептидов и белков, воздействующих на ферментные системы и форменные элементы крови. Однако в данном обзоре мы рассматриваем только токсины, непосредственно воздействующие на ССС.

Змеиные токсины, действующие на ССС

Как уже отмечалось, яды змей содержат целый ряд соединений, воздействующих на ССС. По химической природе это могут быть низкомолекулярные органические соединения (например, аденозин), пептиды и белки. Такие компоненты змеиного яда включают, в частности, брадикинин-потенцирующие пептиды (БПП), натрийуретические пептиды (НП), сарафотоксины, трехпетельные токсины (ТПТ), включая кардиотоксины кобр (КТ), фосфолипазы А₂ (ФЛА₂) и факторы роста эндотелия сосудов (ФРЭС) [2] (таблица). Эти токсины действуют на сердечную мышцу, гладкие мышцы сосудов и сосудистое русло капилляров.

Пептидные токсины

Брадикинин-потенцирующие пептиды (БПП). БПП состоят из 5–14 а.о. и содержат богатый остатками пролина участок [2, 22] (рис. 1А). В организме БПП ингибируют ангиотензинпревращающий фермент (АПФ), который расщепляет ангиотензин I, превращая его в ангиотензин II, являющийся сильнодействующим сосудосуживающим и гипертензивным средством. Блокируя образование ангиотензина II, БПП снижают кровяное давление. Более того, АПФ также способен расщеплять брадикинин, обладающий гипотензивной активностью, а ингибирование фермента усиливает действие брадикинина и приводит к вазодилатации и снижению сердечного выброса [3]. Первый в своем классе гипотензивный лекарственный препарат – ингибитор АПФ каптоприл (рис. 1Б) разработан на основе БПП тепротиды из яда обыкновенной жарараки *Bothrops jararaca*.

Следует отметить, что АПФ – двухдоменный фермент. Генерация сильнодействующего вазоконстриктора ангиотензина II происходит в основном за счет действия С-домена АПФ. Оба гомологичных домена гидролизуют брадикинин, при этом С-домен несколько более эффективен [23]. В клинике обычно используют ингибиторы АПФ, включая каптоприл,

Токсины змеиных ядов, воздействующие на ССС

Токсин	Молекулярная масса, кДа	Основная биологическая мишень	Влияние на ССС
Брадикинин-потенцирующие пептиды	1.5–2.0	Ангиотензин-превращающий фермент	Снижение артериального давления за счет уменьшения концентрации ангиотензина II и увеличения концентрации брадикинина [3]
Натрийуретические пептиды	2.5–5.5	Рецепторы натрийуретических пептидов А-, В- и С-типа	Снижение артериального давления вследствие понижения сосудистого сопротивления (за счет уменьшения поступления ионов кальция в мышечные клетки) и снижения объема циркулирующей крови (за счет повышения объема выделяемой мочи) [4–6]
Сарафотоксины	2.3–2.7	Рецепторы эндотелина типа А (ЕТ _А) и В (ЕТ _В)	Увеличение вазоконстрикции с последующим сужением бронхов и повышением сопротивления дыхательных путей, а также повышение гидростатического давления микрососудов в легких, приводящее к их отеку. Дисфункция различных отделов сердца, преимущественно левого желудочка [7, 8]
Трехпетельные токсины	6.2–8.0	Мембрана клеток, адренорецепторы, холинорецепторы	Подавление сократимости и необратимая контрактура миокарда; снижение кровяного давления; кардиопротекция [9–11]
Белки, богатые остатками цистеина (CRISP)	23–25	Потенциалзависимые ионные каналы	Ингибирование или активация сокращения гладкой мускулатуры аорты [12, 13].
Альтернагин-С	21.7	Интегрин $\alpha 2\beta 1$ и рецептор VEGFR-2	Усиление сердечной деятельности; защита кардиомиоцитов от отрицательного инотропизма, вызванного гипоксией/реоксигенацией [14, 15]
Эндотелиальные факторы роста сосудов	24–26	Рецепторные тирозинкиназы VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3	Кардиопротекторное действие; уменьшение реперфузионного повреждения сердца и размера инфаркта [16, 17]
Фосфолипазы А2	13–14	Клеточная мембрана, белковые рецепторы секретируемых ФЛА2	Кардиотоксичность; контрактура миокарда, релаксация сосудов [18–21]

BPP-9a, Тепротид [*Bothrops jararaca*] **ZWPRQIPP**
BPP-12b [*Bothrops jararaca*] **ZWGRPPGPPIPP**
BPP-10c [*Bothrops jararaca*] **ZNWRHPQIPP**
R-BPP [*Azemiops feae*] **ZRPPGVYYP**
Y-BPP [*Azemiops feae*] **ZYLPPHPYYP**
BPPB [*Agkistrodon blomhofii*] **ZGLPPRPKIPP**
BPPC [*Agkistrodon blomhofii*] **ZGLPPGPPIPP**
BPP-XIe [*Bothrops jajaracussu*] **ZARPPHPIPP**

А

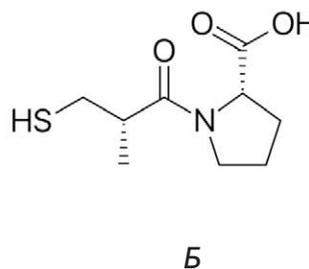


Рис. 1. Аминокислотные последовательности БПП (А) и структура каптоприла (Б). Z – остаток пироглутаминовой кислоты

неселективные по отношению к доменам. Однако они могут вызывать такой побочный эффект, как опасный для жизни ангионевротический отек, связанный с системным накоплением брадикинина из-за ингибирования обоих доменов АПФ. Следовательно, разработка домен-специфичного ингибитора является крайне необходимой. Избирательность действия на определенный домен обнаружена у некоторых БПП. Так, декапептид Vj-BPP-10c (рис. 1) в 400 раз более селективен для активного сайта в С-домене ($K_i = 0.5$ нМ), чем для N-домена ($K_i = 200$ нМ) [24]. Противоположный результат по-

лучен для Vj-BPP-12b (рис. 1), более селективного для N-домена ($K_i = 5$ нМ) и в 30 раз менее эффективного в С-домене [25]. Обнаруженные нами в яде гадюки *Azemiops feae* БПП R-BPP и Y-BPP (рис. 1) [26] больше похожи на пептиды, проявляющие специфичность к С-домену АПФ, и могут рассматриваться как основа для разработки препаратов, селективных к С-домену, которые могут структурно отличаться от каптоприла.

Помимо ингибирования АПФ, некоторые БПП кинетически модулируют активность аргининосукцината синтазы *in vitro* и *in vivo*, что в итоге вызыва-

ет выработку оксида азота (NO) в эндотелиальных клетках и снижение артериального давления [27]. Модуляция аргининосукцинатсинтазы приводит не только к стимуляции выработки оксида азота, но и усиливает синтез протекторных молекул, таких, как полиамины (спермин, спермидин и путресцин) и агматин, который, как показано в одной из наших работ, может приводить к положительному инотропному эффекту даже в условиях пониженной активности Ca^{2+} -АТФ-азы саркоплазматического ретикулама [28], что характерно для сердечной недостаточности [29]. Недавно показано, что один из БПП защищает клетки нейробластомы SH-SY5Y от окислительного стресса, вызванного пероксидом водорода [30]. Следует отметить, что реперфузия после инфаркта вызывает развитие окислительного стресса, что приводит к тяжелой сердечной дисфункции. Следовательно, биологически активные соединения, уменьшающие окислительный стресс, можно рассматривать как многообещающую терапевтическую стратегию при сердечных заболеваниях. Вполне возможно, что БПП могут выступать в роли таких соединений. Кроме того, БПП обладают прямым действием на компоненты сердечно-сосудистой системы. Так, показано, что в некоторых случаях отсутствует корреляция между величиной угнетения АПФ и гипотензивным эффектом [31], а БПП яда кобры *Naja haje haje* дозозависимо снижает сократимость предсердий крысы [32]. Обнаружено также, что БПП Vj-PRO-5a может вызывать вазодилатацию, взаимодействуя с мускариновыми холинорецепторами M1 и рецепторами брадикинина VK_{B_2} и запуская синтез NO эндотелием [33]. Имеются данные о том, что БПП могут усиливать эффект брадикинина, увеличивая чувствительность его рецепторов, однако механизм такого действия не выяснен [34]. Таким образом, за общим гипотензивным действием БПП стоит множество физиологических механизмов как центральных, так и реализуемых на периферии.

Натрийуретические пептиды. Ряд пептидов змеиного яда имитирует эффекты эндогенных пептидов. К таким соединениям относятся, в частности, натрийуретические пептиды (НП). НП содержат примерно от 20 до 50 а.о. и имеют в своей основе консервативную аминокислотную последовательность из 17 а.о., ограниченную дисульфидной связью (рис. 2). Существуют три изоформы НП млекопитающих, а именно предсердные НП – ANP, мозговые НП – BNP, НП С-типа – CNP. К НП также относится уродилатин, который представляет собой удлиненный ANP, полученный из предшественника с использованием альтернативной системы процессинга. Кроме того, иногда различают НП D-типа (DNP)

и желудочковые (ventricular) НП (VNP). DNP – это уникальный НП, выделенный только из яда узкоголовой мамбы *Dendroaspis angusticeps*. В настоящее время экспрессия VNP подтверждена лишь в сердце примитивных костистых рыб [35]. Предсердные НП являются ключевыми гормонами в регуляции гомеостаза давление–объем. Эти пептиды взаимодействуют с мембранно-связанными рецепторами НП (РНП) в сердце, сосудистой сети и почках, снижая кровяное давление и объем циркуляции. Эффекты НП могут быть достаточно многообразными: так у мышей эндогенные BNP и CNP увеличивают частоту сердечных сокращений [36], в то время как в миокарде крысы CNP вызывает снижение сократимости [37]. Общее свойство НП – способность вызывать увеличение продукции NO и активировать протеинкиназу G, в значительной части случаев этим и опосредуется их вазорелаксанта́ный эффект [4, 38], хотя некоторые НП могут вызывать расслабление и на препаратах аорты, лишенных эндотелия [38, 39]. Таким образом, НП вызывают целый спектр физиологических эффектов, которые потенциально можно использовать для коррекции ССЗ. Например, внутривенная инфузия НП улучшает гемодинамический статус у пациентов с сердечной недостаточностью, но иногда сопровождается тяжелой гипотонией, что требует создания аналогов НП, не обладающих этим побочным действием.

НП обнаружены в ядах змей различных видов, включая узкоголовую мамбу *D. angusticeps* [40], гремучих змей *C. atrox*, *C. oreganus abyssus* [4] и др. [41, 42] (рис. 2). Их действие приводит к расслаблению сосудов и снижению сократимости миокарда [4, 6]. НП ядов представляют интерес в качестве основы для создания НП с более длительным периодом полураспада и улучшенной избирательностью в отношении сосудов и почек [43]. В этой связи НП змеиного яда рассматривают в качестве хорошей основы для конструирования НП с терапевтическим потенциалом. К настоящему времени на основе НП ядов разработано несколько аналогов с перспективой клинического использования, из них наиболее удачным оказался цендеритид [5]. Цендеритид представляет собой химерный пептид, состоящий из НП С-типа человека, соединенного с С-концевым фрагментом НП из яда узкоголовой мамбы *D. angusticeps* (рис. 2). Цендеритид был разработан для совместной активации двух рецепторов НП, в частности гуанилилциклаз рGC-A и рGC-B, с целью улучшения функции почек, но без клинически значимой гипотензии. Показано, что цендеритид хорошо переносился здоровыми добровольцами без побочных эффектов и активировал сGMP, что соответствовало активации рецептора НП. Выявлено минимальное сниже-

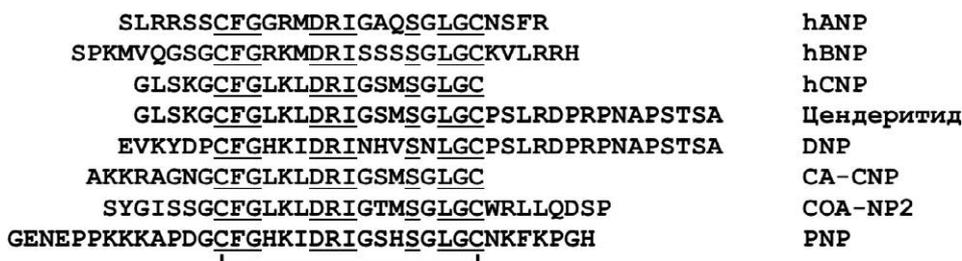


Рис. 2. Аминокислотные последовательности НП. Идентичные аминокислотные остатки подчеркнуты. Дисульфидная связь показана линией, соединяющей остатки цистеина. hANP и hBNP – атриальный и мозговой НП человека соответственно. hCNP – НП С-типа человека. DNP – НП из яда мамбы *Dendroaspis angusticeps* (UniProtKB – P28374), CA-CNP – НП С-типа из яда *Crotalus atrox* (P0CV87), COA-NP2 – из яда *C. oreganus abyssus* (B3EWY2), PNP – НП из яда змеи *Pseudocerastes persicus* (P82972)

ние артериального давления наряду с натрийурезом и диурезом. Предварительные эксперименты на пациентах с сердечной недостаточностью показали хорошую переносимость и отсутствие побочных эффектов. Цендеритид имеет определенные перспективы для широкого применения в клинике при сердечной недостаточности.

Сарафотоксины. Сарафотоксины (SRTX) – короткие пептидные токсины, обнаруженные в ядах змей рода *Atractaspis*, проявляющие сильные сосудосуживающие свойства. Эти пептиды, имеющие высокую степень идентичности с эндотелинами, распознают рецепторы эндотелина и связываются с ними. Сарафотоксины из яда *Atractaspis engaddensis* содержат 21 а.о. с двумя дисульфидными связями (рис. 3), токсины других видов змей имеют удлиненный С-концевой фрагмент. Они стимулируют рецепторы эндотелина и увеличивают вазоконстрикцию, за которой следует дисфункция левого желудочка, бронхоспазм и увеличение сопротивления дыхательных путей. SRTX-B связывается с рецепторами эндотелина с высоким сродством, он вызывает остановку сердца и смерть мышей в течение нескольких минут после внутривенного введения.

В формировании сократительного ответа сосудов на сарафотоксины преобладающую роль играет вход внеклеточного кальция через кальциевые каналы L-типа, относительно небольшую роль играют внутриклеточные запасы, высвобождающиеся через риаодиновые и IP-3-каналы [8].

Эффект SRTX-C может быть разнонаправленным, так на интактных папиллярных мышцах правого желудочка кролика регистрируется небольшой отрицательный инотропный эффект, в то время, как при удалении эндотелия, ингибировании сигнальных каскадов оксида азота или простагландинов наблюдается мощный рост сократимости [44]. В миокарде человека SRTX-C вызывал рост сокра-

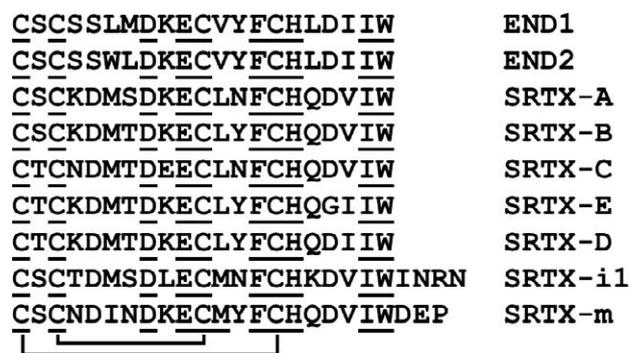


Рис. 3. Аминокислотные последовательности эндотелинов и сарафотоксинов. Дисульфидные связи показаны в виде линий, соединяющих остатки цистеина. END1 (UniProtKB – P05305) и END2 (P20800) – эндотелины 1 и 2 человека, соответственно. SRTX-A (UniProtKB – P13208), SRTX-B (P13208), SRTX-C (P13208), SRTX-E (P13208) и SRTX-D (P13211) – сарафотоксины А, В, С, Е и D из яда *A. engaddensis*, соответственно. SRTX-i1 (P0DJK0) – сарафотоксин i1 из яда *A. irregularis*; SRTX-m (Q6RY98) – сарафотоксин m из яда *A. microlepidota microlepidota*

тимости, сопряженный с проявлением аритмии, наиболее выраженный в правом предсердии по сравнению с другими типами миокардиальной ткани [45]. Интракоронарное введение SRTX-C приводило к снижению сердечного выброса и замедлению временных параметров сокращения сердца у свиней [46]. При этом, если классические короткие сарафотоксины *A. engaddensis* вызывают нарушения в работе левого желудочка, то SRTX-m из яда *A. microlepidota microlepidota* [47] приводит к нарушению функции правого желудочка [7].

В научных исследованиях сарафотоксины используются для мечения рецепторов эндотелина и создания моделей вазоспазма [48].

Белковые токсины, не обладающие ферментативной активностью

Трехпетельные токсины. Трехпетельные токсины (ТПТ) образуют одно из наиболее обширных семейств токсинов змеиных ядов. ТПТ состоят из 57–82 а.о.; структурно молекулы ТПТ представлены тремя β -структурными петлями, отходящими от компактного гидрофобного ядра, которое стабилизировано четырьмя консервативными дисульфидными связями. Биологические свойства ТПТ весьма разнообразны, в том числе целый ряд ТПТ оказывает воздействие на ССС [11].

Цитотоксины, называемые также кардиотоксинами (КТ), представляют собой ТПТ, состоящие примерно из 60 а.о. и содержащие четыре дисульфидные связи (рис. 4). Общим свойством цитотоксинов является их прямое взаимодействие с мембраной, в результате которого образуется ионная пора, что вызывает деполяризацию клетки и ее гибель. Наиболее ярко это проявляется в сердце и именно с этим связано альтернативное название данной группы – кардиотоксины. Несмотря на то что КТ очень сходны по аминокислотной последовательности [49], их биологическая активность может значительно отличаться [50, 51]. В большинстве исследований показано, что КТ начинают действовать в концентрации менее 1 мкМ, вызывая первоначально рост сокращения, сменяющийся угнетением с одновременным повышением напряжения покоя [9, 52, 53]. Сравнение различных типов ткани миокарда показало, что воздействие КТ на ткань желудочка более выражено, чем на предсердия [54, 55]. Как правило, развившаяся в результате этого воздействия контрактура необратима и приводит к клеточной смерти [10, 53, 56–58]. Первоначальная деполяризация клетки вызывает увеличение внутриклеточной концентрации кальция

за счет внутри- и внеклеточных источников [53]. Роль отдельных кальцийтранспортирующих механизмов в реализации эффектов КТ может меняться в зависимости от особенностей миокарда. Так, в неонатальных кардиомиоцитах крысы L-ток является ведущим механизмом увеличения уровня внутриклеточного кальция [57], в то время как во взрослых кардиомиоцитах [53] и в миокарде морской свинки [10] блокирование данного механизма не предотвращало развитие контрактуры. Следует отметить, что эффект КТ зависит от концентрации внеклеточного кальция, высокие концентрации которого (около 10 мМ) блокируют эффекты КТ [10, 53, 57]. В результате воздействия КТ происходит длительное увеличение внутриклеточной концентрации кальция, при этом внутри клетки активируются пептидазы и кардиомиоцит теряет свою структуру [53, 57], что вызывает цепь патологических процессов, ведущих к гибели клетки [53] по механизму некроза [58].

В кровеносных сосудах, как и в других типах мышечной ткани, КТ вызывают контрактуру, причем на кольцах аорты, предсокращенных фенилэфрином, можно наблюдать транзистентный релаксационный эффект, вызванный активацией клеток эндотелия [59]. В сократительном ответе принимают участие как вход внеклеточного кальция [59], так и выброс из внутриклеточных депо [60]. Эффекты КТ как на гладкомышечных, так и на эндотелиальных клетках предотвращаются высокими концентрациями кальция [61, 62].

Несмотря на то что КТ являются высокотоксичными соединениями и от них сложно ожидать положительного влияния на сердце и сосуды, тем не менее, описаны КТ (фракция 1 *N. naja siamensis*), дающие положительный инотропный ответ и в дозе до 100 мкг/мл не вызывающие контрактуры [10], что может

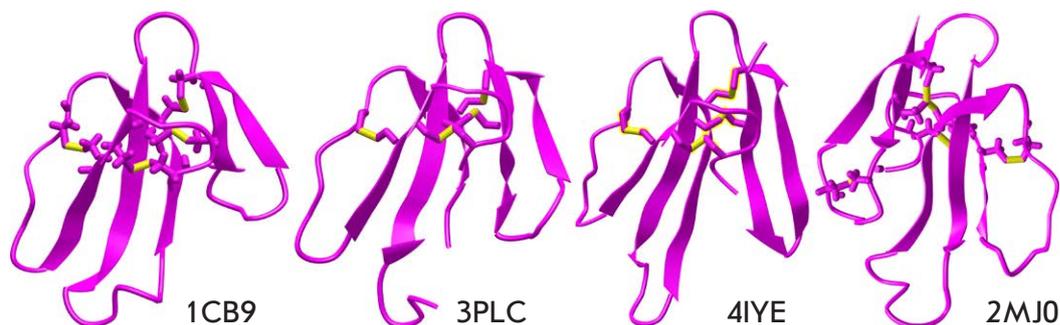


Рис. 4. Пространственные структуры некоторых трехпетельных токсинов. Кардиотоксин II *N. oxiana* (код PDB – 1CB9), β -кардиотоксин *Ophiophagus hannah* (3PLC), адренотоксин ρ -Da1a *D. angusticeps* (4IYE), слабый токсин WTX *N. kaouthia* (2MJ0). Структуры кардиотоксина II и токсина WTX установлены методом ЯМР, структуры β -кардиотоксина и адренотоксина – с помощью рентгеноструктурного анализа. Дисульфидные связи выделены желтым

быть полезным при патологии миокарда, сопровождающейся снижением насосной функции сердца. В настоящее время в качестве лекарственных препаратов, обладающих положительным инотропным эффектом, применяют только сердечные гликозиды, которые по данным исследования DIG дают особенно хороший эффект у пациентов с хронической сердечной недостаточностью со сниженной фракцией выброса левого желудочка [63]. Таким образом, исследование новых соединений, обладающих кардиотоническим эффектом, остается актуальной задачей. Однако данные об исследованиях КТ с таким профилем действия на моделях патологического миокарда, например на крысах SHR, у которых снижена сократимость сердца, отсутствуют. Также КТ могут быть полезными при исследовании механизмов дистрофической кальцификации сосудов [64]. В этом случае КТ используется в качестве методического подхода для запуска каскада патологических событий, на фоне которых можно изучать вазопротекторные механизмы.

К группе ТПТ относятся также кардиотоксин-подобные белки ядов змей [65], взаимодействующие с различными типами адренорецепторов (АР), широко представленными в сердечно-сосудистой системе. Так, из яда узкоголовой мамбы *D. angusticeps* выделен ряд токсинов, специфически взаимодействующих с разными подтипами адренорецепторов: ρ -Da1a (рис. 4) блокирует избирательно АР подтипа $\alpha 1A$ [66, 67], а ρ -Da1b блокирует все три подтипа $\alpha 2$ АР [68, 69]. Так называемые мускариновые токсины МТ1 и МТ2 обратимо связываются с $\alpha 1$ АР [70]. Из яда черной мамбы *D. polylepis* выделены токсины МТ β и СМ-3, сходные с ρ -Da1a, которые, однако, с большим сродством взаимодействуют с β - и δ -подтипами $\alpha 1$ АР [71].

Из яда королевской кобры *Ophiophagus hannah* выделен β -кардиотоксин (рис. 4), способный блокировать $\beta 1$ и $\beta 2$ АР [72]. Это приводит к снижению частоты сердечных сокращений *in vivo* и *in vitro* без заметной цитотоксичности, что может быть связано с неспособностью β -кардиотоксина к прямому взаимодействию с мембраной в силу определенных особенностей строения [73]. Позднее было показано наличие цитотоксического эффекта на культуре гладкомышечных клеток и его отсутствие на скелетных клетках и сердечных миоцитах [74]. Интересно, что в последнем исследовании обнаружили прямой отрицательный инотропный и лизитропный эффекты, при этом внутриклеточная концентрация кальция в систоле практически не менялась. Эти данные могут свидетельствовать о наличии прямых, не связанных с активацией АР, механизмов действия β -кардиотоксина, а также о способности АР менять

чувствительность миофиламентов к ионам кальция. Присутствие в группе ТПТ соединений, с высокой специфичностью взаимодействующих с отдельными подтипами АР, может иметь большое значение в фармакологических исследованиях, поскольку каждый из трех подтипов играет свою роль в патологиях ССС и их коррекции. Так, блокирование β АР является одним из основных направлений терапии при различных формах гипертонической болезни и хронической сердечной недостаточности [75, 76]; активацию АР $\alpha 1$ можно рассматривать как компенсаторный путь при десенсибилизации пути АР β [77–79]; а активацию $\alpha 2$ – как кардиопротекторный путь, предотвращающий адренергическую перегрузку сердца [80, 81] и, как показано в работах с нашим участием, блокирующий возникновение аритмий и Са-перегрузок в кардиомиоцитах [82, 83].

Одну из групп ТПТ составляют так называемые необычные (non-conventional) токсины, содержащие дополнительную дисульфидную связь в N-концевом фрагменте и, как правило, характеризующиеся низкой токсичностью. Интересно, что один из представителей этой группы – токсин WTX – при внутривенном введении снижал артериальное давление у крыс [84], воздействуя на холинергическую передачу.

Еще группа ТПТ представлена токсинами, влияющими на функционирование различных ионных каналов и рецепторов, которые присутствуют в ССС. Однако, поскольку данные о действии этих токсинов на ССС отсутствуют, в нашем обзоре они не обсуждаются.

Токсины других типов. Известен еще ряд токсинов, воздействующих на ССС и не обладающих ферментативной активностью, к которым, в частности, относятся токсины семейства CRISP (Cysteine-Rich Secretory Proteins), представляющие собой белки с молекулярной массой 23–25 кДа и содержащие восемь дисульфидных связей. Так, абломин из яда *A. blomhoffi* и некоторые подобные токсины блокировали сокращение гладкой мускулатуры артерий крысы, вызванное высокой концентрацией ионов калия. Предполагается, что абломин ингибирует потенциалзависимый вход внеклеточного кальция, вызывающий сокращение сосудов [13]. Натрин яда *N. atra* вызывает сократительную реакцию в лишенной эндотелия грудной аорте мышей [85]. Дальнейшие эксперименты показали, что натрин может блокировать активируемые кальцием калиевые каналы с высокой проводимостью $ВК_{Ca}$, которые играют значительную роль в регуляции тонуса сосудов. Помимо этого, натрин может блокировать скелетную изоформу риадинового рецептора [86] и потенциал-управляемые калиевые каналы $K_v 1.3$ [87].

Весьма интересное действие на ССС оказывает белок альтернагин-С, выделенный из яда ботропса *Rhinocerophis alternatus* [88]. Этот белок способен индуцировать экспрессию фактора роста эндотелия сосудов, пролиферацию и миграцию эндотелиальных клеток, усиливать ангиогенез и увеличивать жизнеспособность миобластов. Следовательно, этот пептид может играть решающую роль в механизмах регенерации тканей. Исследование влияния альтернагина-С на сердечную функцию *in vitro* пресноводных рыб показало, что белок усиливает сердечную деятельность, способствуя значительному увеличению силы сокращения, скорости сокращения и расслабления с одновременным уменьшением значений времени до пикового напряжения и улучшению насосной способности [14]. Альтернагин-С улучшает сердечную функцию, увеличивая эффективность транспорта ионов кальция, что приводит к положительному инотропизму и хронотропизму [14]. Следовательно, этот белок может улучшить регуляцию сердечного выброса, что указывает на возможность его применения в терапии сердечной сократительной дисфункции. Изучено также влияние альтернагина-С на гипоксию/реоксигенацию в изолированных полосках желудочка сердца рыбы, а также на морфологические изменения и плотность кровеносных сосудов [15]. Обработка альтернагином-С обеспечивала защиту кардиомиоцитов от отрицательного инотропизма, вызванного гипоксией/реоксигенацией. Этот белок также стимулировал ангиогенез и улучшал связь между возбуждением и сокращением в условиях гипоксии. Эти результаты указывают на новую терапевтическую стратегию лечения заболеваний, связанных с ишемией.

Ряд белков змеиного яда имитируют эффекты эндогенных факторов, регулирующих физиологические функции организма. Что касается ССС, интерес представляет группа белков, которые могут усиливать ангиогенез и увеличивают проницаемость сосудов; таких, как, например, эндотелиальные факторы роста сосудов (ЭФРС), обладающие гипотензивным [17] и кардиопротекторным эффектом [16]. В качестве рецепторов ЭФРС выступают три рецепторные тирозинкиназы, известные как VEGFR-1, VEGFR-2 и VEGFR-3. VEGFR-1 и VEGFR-2 находятся в основном на эндотелиальных клетках сосудов и опосредуют несколько основных ангиогенных активностей, таких, как пролиферация эндотелиальных клеток. Реперфузионное повреждение сердца включает в числе различных механизмов коронарную эндотелиальную дисфункцию. ЭФРС активирует эндотелиальные клетки и оказывает кардиопротекторное действие. В ядах змей присутствуют белки, вызывающие в эндотелиальных клетках ЭФРС-подобные

эффекты. Выделен и охарактеризован ряд таких белков [16], взаимодействующих с рецепторами ЭФРС. При этом некоторые белки змей избирательно взаимодействовали с VEGFR-2, например ваммин из *V. ammodytes*, другие проявляли избирательность к VEGFR-1, как ЭФРС из *T. flavoviridis* [89]. Обнаружено, что белок из *V. lebetina*, подобно ЭФРС, при реперфузии в значительной степени уменьшал реперфузионное повреждение и размер инфаркта за счет стимуляции рецепторов VEGFR-2 [16]. Однако его активность была несколько меньше, чем у ЭФРС. Вполне возможно, что в ядах змей имеются белки с такой же, как у ЭФРС, кардиопротекторной активностью, но лишенные присущих им побочных эффектов.

Белковые токсины – ферменты

Из множества ферментов, присутствующих в змеиных ядах, к настоящему времени только для фосфолипаз А₂ (ФЛА₂) показано прямое воздействие на ССС. ФЛА₂ яда змей относится к классу секретлируемых липолитических ферментов, гидролизующих эфирную связь глицерофосфолипидов в положении Sn₂ с образованием лизофосфолипидов и свободных жирных кислот [90], которые служат источником для синтеза вторичных посредников, участвующих в физиологических процессах клеток. Однако действие продуктов липолиза не является определяющим для кардиотоксичности [91], скорее, ведущую роль играют повреждения клеточной мембраны [92]. Помимо этого, часть физиологических эффектов опосредуется через взаимодействие с белками-рецепторами секретлируемых ФЛА₂ [93]. ФЛА₂ змеиного яда способны снижать кровяное давление за счет выработки арахидоновой кислоты, предшественника метаболитов циклооксигеназ (простагландинов или простаглицлинов). Следует отметить, что при системном введении высоких доз ФЛА₂ могут наблюдаться нарушения в структуре ткани миокарда [21, 94] и ее функционировании, такие, как брадикардия и атриовентрикулярная (предсердно-желудочковая) блокада [95, 96]. Интересно, что часть кардиотоксических эффектов, наблюдаемых в исследованиях на животных *in vivo*, обусловлена нарушением состава внутренней среды организма [97, 98]. ФЛА₂, полученные из яда разных змей, могут существенно отличаться по своей кардиотоксичности: так ФЛА₂ *O. hannah* и *N. nigricollis* вызывают нарушение внутриклеточных структур и контрактуру [94, 96, 99], в отличие от ФЛА₂ из яда *N. naja atra*, не обладающей кардиотоксичностью [99]. Инотропный эффект может быть разнонаправленным, как правило, после короткого роста сократимость снижается, сопровождаясь увеличением напряжения по-

коя, которое может перейти в контрактуру [20, 21, 99]. Воздействуя на сосуды, ФЛА2 обычно оказывают вазорелаксанта́нный эффект, который не зависит от эндотелия и частично опосредуется повышением cGMP в гладкомышечных клетках [18, 19]. Эффекты ФЛА2 можно в значительной степени ослабить суррамином [100] и блокатором фосфолипазной активности *n*-бромфенацилбромидом [21, 97]. Как в случае КТ, эффекты ФЛА2 можно блокировать высокой концентрацией ионов кальция, в то время как блокаторы кальциевых каналов малоэффективны [19, 96]. В миокарде ФЛА2 и КТ вызывают контрактуру, тогда как в сосудах ФЛА2 вызывает релаксацию.

ПЕРСПЕКТИВЫ ЗМЕИНЫХ ТОКСИНОВ ДЛЯ СОЗДАНИЯ ЛЕКАРСТВЕННЫХ ПРЕПАРАТОВ И ВОЗМОЖНЫЕ ПРОБЛЕМЫ

Токсины змеиных ядов с высокой эффективностью и избирательностью воздействуют на различные системы живых организмов, включая ССС, что делает их весьма привлекательными в качестве основы для конструирования лекарственных препаратов. Основные недостатки токсинов – высокая токсичность и необратимость действия, т.е. невозможность возвращения системы, на которую они подействовали, к исходному состоянию. Из представленных выше данных следует, что существует множество кардиотропных или вазоактивных змеиных токсинов, обладающих высокой активностью по отношению к ССС, которые в перспективе могут быть использованы в качестве основы для создания новых лекарственных препаратов. Некоторые из этих белков и пептидов уже показали себя высокоселективными инструментами при изучении физиологических процессов. Другие использовались в качестве зондов потенциальных терапевтических мишеней или в качестве основы при разработке терапевтических агентов.

Нами уже рассмотрен гипотензивный препарат каптоприл (рис. 1), созданный на основе структуры брадикинин-потенцирующего пептида южноамериканской жарараки. Еще один препарат на основе этого пептида – эналаприл ((S)-1-[N-[1-(этоксикарбонил)-3-фенилпропил]-L-аланил]-L-пролин), широко применяемый в настоящее время при гипертонии.

В качестве примера препарата с перспективой применения в медицине можно привести цендеритид, полученный присоединением 15 а.о. С-концевой части натрийуретического пептида, выделенного из яда *D. angusticeps*, к полноразмерному натрийуретическому пептиду С-типа человека. Его можно будет применять при сердечной недостаточности. Цендеритид уже прошел первую и вторую стадии клинических исследований, правда на небольшом количестве участников, и показал свою перспективность для поддержания функции левого желудочка при инфаркте миокарда.

Хорошие перспективы имеются у альтернагина-С и его аналогов, а также у аналогов эндотелиальных факторов роста сосудов из ядов змей для создания препаратов, предотвращающих реперфузионные повреждения. Однако предстоит установить активность *in vivo* этих белков и выяснить их устойчивость в организме. К настоящему времени отсутствуют какие-либо данные о клинических исследованиях этих белков.

В заключение следует отметить, что, несмотря на имеющиеся недостатки, ряд пептидов и белков змеиных ядов, воздействующих на ССС, имеет хорошие перспективы в качестве основы для создания новых лекарственных препаратов. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-14-50134.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kakumanu R., Kemp-Harper B.K., Silva A., Kuruppu S., Isbister G.K., Hodgson W.C. // *Sci. Repts.* 2019. V. 9. № 1. P. 20231.
- Péterfi O., Boda F., Szabó Z., Ferencz E., Bába L. // *Molecules.* 2019. V. 24. № 15. P. 2778.
- Morais K.L.P., Ianzer D., Miranda J.R.R., Melo R.L., Guerreiro J.R., Santos R.A.S., Ulrich H., Lameu C. // *Peptides.* 2013. V. 48. P. 124–133.
- Da Silva S.L., Dias-Junior C.A., Baldasso P.A., Damico D.C.S., Carvalho B.M.A., Garanto A., Acosta G., Oliveira E., Albericio F., Soares A.M., et al. // *Peptides.* 2012. V. 36. № 2. P. 206–212.
- Ichiki T., Dzhojashvili N., Burnett J.C. // *Internat. J. Cardiol.* 2019. V. 281. P. 166–171.
- Park S.-A., Kim T.-G., Han M.-K., Ha K.-C., Kim S.-Z., Kwak Y.-G. // *Exp. Mol. Med.* 2012. V. 44. № 6. P. 363–368.
- Mahjoub Y., Malaquin S., Mourier G., Lorne E., Abou Arab O., Massy Z.A., Dupont H., Ducancel F. // *PLoS One.* 2015. V. 10. № 7. P. e0132864.
- Watanabe C., Hirano K., Kanaide H. // *British J. Pharmacol.* 1993. V. 108. № 1. P. 30–37.
- Averin A.S., Astashev M.E., Andreeva T.V., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // *Doklady. Biochem. Biophys.* 2019. V. 487. № 1. P. 282–286.
- Harvey A.L., Marshall R.J., Karlsson E. // *Toxicol. Official J. Internat. Soc. Toxinol.* 1982. V. 20. № 2. P. 379–396.
- Kini R.M., Koh C.Y. // *Biochem. Pharmacol.* 2020. V. 181. P. 114105.
- Wang C.-H., Wu W.-G. // *FEBS Lett.* 2005. V. 579. № 14. P. 3169–3174.
- Yamazaki Y., Koike H., Sugiyama Y., Motoyoshi K., Wada T., Hishinuma S., Mita M., Morita T. // *Eur. J. Biochem.* 2002.

- V. 269. № 11. P. 2708–2715.
14. Monteiro D.A., Kalinin A.L., Selistre-de-Araujo H.S., Vasconcelos E.S., Rantin F.T. // *Toxicon: Official J. Internat. Soc. Toxinol.* 2016. V. 110. P. 1–11.
 15. Monteiro D.A., Kalinin A.L., Selistre-de-Araújo H.S., Nogueira L.A.N., Beletti M.E., Fernandes M.N., Rantin F.T. // *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.: CBP.* 2019. V. 215. P. 67–75.
 16. Messadi E., Aloui Z., Belaidi E., Vincent M.-P., Couture-Lepetit E., Waeckel L., Decorps J., Bouby N., Gasmí A., Karoui H., et al. // *J. Cardiovasc. Pharmacol.* 2014. V. 63. № 3. P. 274–281.
 17. Takahashi H., Hattori S., Iwamatsu A., Takizawa H., Shibuya M. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 44. P. 46304–46314.
 18. Bing R.J., Saeed M. // *Mol. Cell. Biochem.* 1987. V. 78. № 1. P. 81–88.
 19. Huang H.-C., Lee C.Y. // *Eur. J. Pharmacol.* 1985. V. 118. № 1–2. P. 139–146.
 20. Karabuva S., Lukšić B., Brizić I., Latinović Z., Leonardi A., Križaj I. // *Toxicon: Official J. Internat. Soc. Toxinol.* 2017. V. 139. P. 94–100.
 21. Rodrigues M.A.P., Dias L., Rennó A.L., Sousa N.C., Smaal A., da Silva D.A., Hyslop S. // *Toxicology.* 2014. V. 323. P. 109–124.
 22. Sciani J.M., Pimenta D.C. // *J. Venom. Anim. Toxins Including Trop. Dis.* 2017. V. 23. P. 45.
 23. Sturrock E.D., Lubbe L., Cozier G.E., Schwager S.L.U., Arowolo A.T., Arendse L.B., Belcher E., Acharya K.R. // *Biochem. J.* 2019. V. 476. № 10. P. 1553–1570.
 24. Cotton J., Hayashi M.A.F., Cuniasso P., Vazeux G., Ianzer D., de Camargo A.C.M., Dive V. // *Biochemistry.* 2002. V. 41. № 19. P. 6065–6071.
 25. Hayashi M.A.F., Murbach A.F., Ianzer D., Portaro F.C.V., Prezoto B.C., Fernandes B.L., Silveira P.F., Silva C.A., Pires R.S., Britto L.R.G., et al. // *J. Neurochem.* 2003. V. 85. № 4. P. 969–977.
 26. Babenko V.V., Ziganshin R.H., Weise C., Dyachenko I., Shaykhutdinova E., Murashev AN., Zhmak M., Starkov V., Hoang A.N., Tsetlin V., et al. // *Biomedicines.* 2020. V. 8. № 8. P. 249.
 27. Camargo A.C.M., Ianzer D., Guerreiro J.R., Serrano S.M.T. // *Toxicon: Official J. Internat. Soc. Toxinol.* 2012. V. 59. № 4. P. 516–523.
 28. Nakipova O.V., Averin A.S., Tarlachkov S.V., Kokoz Y.M. // *Doklady Biol. Sci.* 2013. V. 451. P. 203–208.
 29. Zhihao L., Jingyu N., Lan L., Michael S., Rui G., Xiyun B., Xiaozhi L., Guanwei F. // *Heart Failure Rev.* 2020. V. 25. № 3. P. 523–535.
 30. Querobino S.M., Ribeiro C.A.J., Alberto-Silva C. // *Peptides.* 2018. V. 103. P. 90–97.
 31. Ianzer D., Santos R.A.S., Etelvino G.M., Xavier C.H., de Almeida Santos J., Mendes E.P., Machado L.T., Prezoto B.C., Dive V., de Camargo A.C.M. // *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics.* 2007. V. 322. № 2. P. 795–805.
 32. El-Saadani M.A.M., El-Sayed M.F. // *Comp. Biochem. Physiol. Toxicol. Pharmacol.: CBP.* 2003. V. 136. № 4. P. 387–395.
 33. Morais K.L.P., Hayashi M.A.F., Bruni F.M., Lopes-Ferreira M., Camargo A.C.M., Ulrich H., Lameu C. // *Biochem. Pharmacol.* 2011. V. 81. № 6. P. 736–742.
 34. Mueller S., Paegelow I., Reissmann S. // *Signal Transduction.* 2006. V. 6. № 1. P. 5–18.
 35. Meems L.M.G., Burnett J.C. // *JACC. Basic Translat. Sci.* 2016. V. 1. № 7. P. 557–567.
 36. Springer J., Azer J., Hua R., Robbins C., Adamczyk A., McBoyle S., Bissell M.B., Rose R.A. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2012. V. 52. № 5. P. 1122–1134.
 37. Brusq J.M., Mayoux E., Guigui L., Kirilovsky J. // *Brit. J. Pharmacol.* 1999. V. 128. № 1. P. 206–212.
 38. Fry B.G., Wickramaratana J.C., Lemme S., Beuve A., Garbers D., Hodgson W.C., Alewood P. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 327. № 4. P. 1011–1015.
 39. Chen B.-Y., Chen J.-K., Zhu M.-Z., Zhang D.-L., Sun J.-S., Pei J.-M., Feng H.-S., Zhu X.-X., Jin J., Yu J. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 5. P. e20477.
 40. Schweitz H., Vigne P., Moinier D., Frelin C., Lazdunski M. // *J. Biol. Chem.* 1992. V. 267. № 20. P. 13928–13932.
 41. Soares M.R., Oliveira-Carvalho A.L., Wermelinger L.S., Zingali R.B., Ho P.L., Junqueira-de-Azevedo I.L.M., Diniz M.R.V. // *Toxicon: Official J. Internat. Soc. Toxinol.* 2005. V. 46. № 1. P. 31–38.
 42. Amininasab M., Elmi M.M., Endlich N., Endlich K., Parekh N., Naderi-Manesh H., Schaller J., Mostafavi H., Sattler M., Sarbolouki M.N., et al. // *FEBS Lett.* 2004. V. 557. V. 1–3. P. 104–108.
 43. Sridharan S., Kini R.M., Richards A.M. // *Pharmacol. Res.* 2020. V. 155. P. 104687.
 44. Leite-Moreira A.F., Brás-Silva C. // *Am. J. Physiol. Heart Circulatory Physiol.* 2004. V. 287. № 3. P. H1194–H1199.
 45. Burrell K.M., Molenaar P., Dawson P.J., Kaumann A.J. // *J. Pharmacol. Exp. Therapeutics.* 2000. V. 292. № 1. P. 449–459.
 46. Konrad D., Oldner A., Wanecek M., Rudehill A., Weitzberg E., Biber B., Johansson G., Häggmark S., Haney M. // *Am. J. Physiol. Heart Circulatory Physiol.* 2005. V. 289. № 4. H1702–H1709.
 47. Hayashi M.A.F., Ligny-Lemaire C., Wollberg Z., Wery M., Galat A., Ogawa T., Muller B.H., Lamthanh H., Doljansky Y., Bdolah A., et al. // *Peptides.* 2004. V. 25. № 8. P. 1243–1251.
 48. Skovsted G.F., Kruse L.S., Berchtold L.A., Grell A.-S., Warfvinge K., Edvinsson L. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 3. P. e0174119.
 49. Dufton M.J., Hider R.C. // *Pharmacol. Therapeutics.* 1988. V. 36. № 1. P. 1–40.
 50. Jang J.Y., Krishnaswamy T., Kumar S., Jayaraman G., Yang P.W., Yu C. // *Biochemistry.* 1997. V. 36. № 48. P. 14635–14641.
 51. Jayaraman G., Kumar T.K., Tsai C.C., Srisailam S., Chou S.H., Ho C.L., Yu C. // *Protein Sci.: Publ. Protein Soc.* 2000. V. 9. № 4. P. 637–646.
 52. Huang S.J., Wu C.K., Sun J.J. // *Zhongguo Yao Li Xue Bao = Acta Pharmacologica Sinica.* 1991. V. 12. № 2. P. 125–131.
 53. Wang H.X., Lau S.Y., Huang S.J., Kwan C.Y., Wong T.M. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 1997. V. 29. № 10. P. 2759–2770.
 54. Loots J.M., Meij H.S., Meyer B.J. // *British J. Pharmacol.* 1973. V. 47. № 3. P. 576–585.
 55. Sun J.J., Walker M.J. // *Toxicon: Official J. Internat. Soc. Toxinol.* 1986. V. 24. № 3. P. 233–245.
 56. Debnath A., Saha A., Gomes A., Biswas S., Chakrabarti P., Giri B., Biswas A.K., Gupta S.D., Gomes A. // *Toxicon: Official J. Internat. Soc. Toxinol.* 2010. V. 56. № 4. P. 569–579.
 57. Tzeng W.F., Chen Y.H. // *Biochem. J.* 1988. V. 256. № 1. P. 89–95.
 58. Wang C.-H., Monette R., Lee S.-C., Morley P., Wu W.-G. // *Toxicon: Official J. Internat. Soc. Toxinol.* 2005. V. 46. № 4. P. 430–440.
 59. Ho K.H., Kwan C.Y., Huang S.J., Bourreau J.P. // *Zhongguo Yao Li Xue Bao = Acta Pharmacologica Sinica.* 1998. V. 19. № 3. P. 197–202.
 60. Chen K.M., Guan Y.Y., Sun J.J. // *Zhongguo Yao Li Xue Bao = Acta Pharmacologica Sinica.* 1993. V. 14. № 6. P. 500–504.
 61. Kwan C.Y., Kwan T.K., Huang S.J. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2002. V. 29. № 9. P. 823–828.
 62. Ou Y.J., Leung Y.M., Huang S.J., Kwan C.Y. // *Biochim.*

- Biophys. Acta. 1997. V. 1330. № 1. P. 29–38.
63. Perry G., Brown E., Thornton R., Shiva T., Hubbard J., Reddy K.R., Doherty J.E., Cardello F.P., Fast A., Radford M.J. // *N. Engl. J. Med.* 1997. V. 336. № 8. P. 525–533.
64. Zhao Y., Urganus A.L., Spevak L., Shrestha S., Doty S.B., Boskey A.L., Pachman L.M. // *Calcified Tissue Internat.* 2009. V. 85. № 3. P. 267–275.
65. Blanchet G., Collet G., Mourier G., Gilles N., Fruchart-Gaillard C., Marcon E., Servent D. // *Biochimie.* 2014. V. 103. P. 109–117.
66. Palea S., Maiga A., Guilloteau V., Rekek M., Guérard M., Rouget C., Rischmann P., Botto H., Camparo P., Lluel P., et al. // *British J. Pharmacol.* 2013. V. 168. № 3. P. 618–631.
67. Quinton L., Girard E., Maiga A., Rekek M., Lluel P., Masuyer G., Larregola M., Marquer C., Ciolek J., Magnin T., et al. // *British J. Pharmacol.* 2010. V. 159. № 2. P. 316–325.
68. Maïga A., Mourier G., Quinton L., Rouget C., Gales C., Denis C., Lluel P., Sénard J.-M., Palea S., Servent D., et al. // *Toxicon: Official J. Internat. Soc. Toxinol.* 2012. V. 59. № 4. P. 487–496.
69. Rouget C., Quinton L., Maïga A., Gales C., Masuyer G., Malosse C., Chamot-Rooke J., Thai R., Mourier G., de Pauw E., et al. // *British J. Pharmacol.* 2010. V. 161. № 6. P. 1361–1374.
70. Harvey A.L., Kornisiuk E., Bradley K.N., Cerveñansky C., Durán R., Adrover M., Sánchez G., Jerusalinsky D. // *Neurochem. Res.* 2002. V. 27. № 11. P. 1543–1554.
71. Blanchet G., Upert G., Mourier G., Gilquin B., Gilles N., Servent D. // *Toxicon: Official J. Internat. Soc. Toxinol.* 2013. V. 75. P. 160–167.
72. Rajagopalan N., Pung Y.F., Zhu Y.Z., Wong P.T.H., Kumar P.P., Kini R.M. // *FASEB J.: Official Publ. Fed. Am. Sci. Exp. Biol.* 2007. V. 21. № 13. P. 3685–3695.
73. Roy A., Qingxiang S., Alex C., Rajagopalan N., Jobichen C., Sivaraman J., Kini R.M. // *Protein Sci.: Publ. Protein Soc.* 2019. V. 28. № 5. P. 952–963.
74. Lertwanakarn T., Suntravat M., Sanchez E.E., Boonhoh W., Solaro R.J., Wolska B.M., Martin J.L., de Tombe P.P., Tachampa K. // *J. Venom. Anim. Toxins Incl. Trop. Dis.* 2020. V. 26. P. e20200005.
75. Perros F., de Man F.S., Bogaard H.J., Antigny F., Simonneau G., Bonnet S., Provencher S., Galiè N., Humbert M. // *Circulation. Heart Failure.* 2017. V. 10. № 4. P. e003703.
76. Wiysonge C.S., Bradley H.A., Volmink J., Mayosi B.M., Opie L.H. // *Cochrane Database Systematic Rev.* 2017. V. 1. № 1. P. CD002003.
77. Nozdrachyov A.D., Tsirkin V.I., Korotaeva Y.V. // *Ros. Fiziol. Zh. im. I.M. Sechenova.* 2016. V. 102. № 2. P. 130–145.
78. Nozdrachyov A.D., Tsirkin V.I., Korotaeva Y.V. // *Ros. Fiziol. Zh. im. I.M. Sechenova.* 2016. V. 102. № 3. P. 262–275.
79. O'Connell T.D., Jensen B.C., Baker A.J., Simpson P.C. // *Pharmacol. Rev.* 2014. V. 66. № 1. P. 308–333.
80. Alekseev A.E., Park S., Pimenov O.Y., Reyes S., Terzic A. // *Pharmacol. Therapeutics.* 2019. V. 197. P. 179–190.
81. Bao N., Tang B. // *Mediators Inflamm.* 2020. P. 6136105.
82. Averin A.S., Nakipova O.V., Kosarsky L.S., Pimenov O.Y., Galimova M.H., Nenov M.N., Berejnov A.V., Alekseev A.E. // *Biophysics.* 2019. V. 64. № 5. P. 793–798.
83. Kokoz Y.M., Evdokimovskii E.V., Maltsev A.V., Nenov M.N., Nakipova O.V., Averin A.S., Pimenov O.Y., Teplov I.Y., Berezhnov A.V., Reyes S., et al. // *J. Mol. Cell. Cardiol.* 2016. V. 100. P. 9–20.
84. Ogay A.Y., Rzhovsky D.I., Murashev A.N., Tsetlin V.I., Utkin Y.N. // *Toxicon: Official J. Internat. Soc. Toxinol.* 2005. V. 45. № 1. P. 93–99.
85. Wang J., Shen B., Guo M., Lou X., Duan Y., Cheng X. P., Teng M., Niu L., Liu Q., Huang Q., et al. // *Biochemistry.* 2005. V. 44. № 30. P. 10145–10152.
86. Zhou Q., Wang Q.-L., Meng X., Shu Y., Jiang T., Wagenknecht T., Yin C.-C., Sui S.-F., Liu Z. // *Biophys. J.* 2008. V. 95. № 9. P. 4289–4299.
87. Wang F., Li H., Liu M.-N., Song H., Han H.-M., Wang Q.-L., Yin C.-C., Zhou Y.-C., Qi Z., Shu Y.-Y., et al. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2006. V. 351. № 2. P. 443–448.
88. Souza D.H., Iemma M.R., Ferreira L.L., Faria J.P., Oliva M.L., Zingali R.B., Niewiarowski S., Selistre-de-Araujo H.S. // *Arch. Biochem. Biophys.* 2000. V. 384. № 2. P. 341–350.
89. Yamazaki Y., Matsunaga Y., Tokunaga Y., Obayashi S., Saito M., Morita T. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 15. P. 9885–9891.
90. Arni R.K., Ward R.J. // *Toxicon: Official J. Internat. Soc. Toxinol.* 1996. V. 34. № 8. P. 827–841.
91. Barrington P.L., Yang C.C., Rosenberg P. // *Life Sci.* 1984. V. 35. № 9. P. 987–995.
92. Gutiérrez J.M., Ownby C.L. // *Toxicon: Official J. Internat. Soc. Toxinol.* 2003. V. 42. № 8. P. 915–931.
93. Gasanov S.E., Dagda R.K., Rael E.D. // *J. Clin. Toxicol.* 2014. V. 4. № 1. P. 1000181.
94. Huang M.Z., Gopalakrishnakone P. // *Toxicon: Official J. Internat. Soc. Toxinol.* 1996. V. 34. № 2. P. 201–211.
95. Evangelista I.L., Martins A.M.C., Nascimento N.R.F., Havt A., Evangelista J.S.A.M., de Norões T.B.S., Toyama M.H., Diz-Filho E.B., de Oliveira Toyama D., Fonteles M.C., et al. // *Toxicon: Official J. Internat. Soc. Toxinol.* 2010. V. 55. № 6. P. 1061–1070.
96. Huang M.Z., Wang Q.C., Liu G.F. // *Toxicon: Official J. Internat. Soc. Toxinol.* 1993. V. 31. № 5. P. 627–635.
97. Dias L., Rodrigues M.A.P., Rennó A.L., Stroka A., Inoue B.R., Panunto P.C., Melgarejo A.R., Hyslop S. // *Toxicon: Official J. Internat. Soc. Toxinol.* 2016. V. 123. P. 1–14.
98. Lee C.Y., Lin W.W., Chen Y.M., Lee S.Y. // *Acta Physiol. Pharmacol. Latinoamericana: Organo de la Asociacion Latinoamericana de Ciencias Fisiologicas y de la Asociacion Latinoamericana de Farmacologia.* 1989. V. 39. № 4. P. 383–391.
99. Fletcher J.E., Yang C.C., Rosenberg P. // *Toxicol. Appl. Pharmacol.* 1982. V. 66. № 1. P. 39–54.
100. Sifuentes D.N., El-Kik C.Z., Ricardo H.D., Tomaz M.A., Strauch M.A., Calil-Elias S., Arruda E.Z., Schwartz E.F., Melo P.A. // *Toxicon: Official J. Internat. Soc. Toxinol.* 2008. V. 51. № 1. P. 28–36.

УДК 571.27

Внеклеточные ловушки нейтрофилов (NET): перспективы таргетной терапии

Д. В. Волков¹, Г. В. Тец², Ю. П. Рубцов¹, А. В. Степанов^{1*}, А. Г. Габибов¹¹Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова РАН, Москва, 117997 Россия²Первый Санкт-Петербургский государственный медицинский университет им. академика И.П. Павлова, Санкт-Петербург, 197022 Россия

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

Поступила в редакцию 29.06.2021

Принята к печати 06.09.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11503

РЕФЕРАТ Противоопухолевая терапия, в том числе адоптивная иммунотерапия, неизбежно сталкивается с мощным противодействием со стороны прогрессирующей опухоли. Если гематологические злокачественные новообразования к настоящему моменту поддаются терапии с помощью CAR-T-лимфоцитов (T-cells, modified by chimeric antigen receptor), то солидные опухоли значительно более устойчивы к этому виду терапии. Согласно последним исследованиям, ведущая роль в ускользании солидных опухолей от цитотоксической активности иммунных клеток принадлежит опухолевому микроокружению, в состав которого входят несколько типов клеток, в том числе нейтрофилы, самые многочисленные клетки иммунной системы. Установлено, что на развитие опухоли и ее способность к метастазированию прямо влияют внеклеточные ловушки нейтрофилов (neutrophil extracellular traps, NET), образующиеся в результате ответа на опухолевые стимулы. Кроме того, ядерная ДНК нейтрофилов – главный компонент NET – создает пространственную преграду для взаимодействия CAR-T с опухолевыми клетками. В этой связи для повышения эффективности действия CAR-T путем снижения влияния NET крайне перспективным представляется использование эукариотической ДНКазы I. Нами рассмотрена роль NET в опухолевом микроокружении и различные подходы к снижению влияния NET на опухоль.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА онкологические заболевания, микроокружение опухоли, нейтрофилы, нетоз.

ВВЕДЕНИЕ

Злокачественные солидные опухоли образуют, в отличие от гематологических, замкнутую структуру, состоящую из нескольких слоев. Злокачественные клетки, находящиеся в центре опухоли и несущие на поверхности рецепторы адгезии, соединены между собой туннельными контактами и взаимодействуют друг с другом с помощью аутокринных и паракринных сигналов, передаваемых с помощью растворимых факторов и внеклеточного матрикса. Ближе к периферии опухоли расположен слой, формирующий другую нишу, в состав которой входят сосуды, опухоль-ассоциированные фибробласты и стромальные клетки, получающие сигналы через рецепторы адгезии и растворимые факторы. Еще дальше от центра опухоли находится замыкающий слой, куда доходят сигналы стимуляции или ингибирования от опухолевых клеток. Этот слой включает новообразованные сосуды, внутриопухолевые лимфатические узлы, иммунные клетки, опухоль-ассоциированные фибробласты, внеклеточный матрикс и нервные окончания. Самым наружным считается

проксимальный по отношению к нормальной ткани слой, где располагаются лимфатические и кровеносные сосуды, иммунные клетки и проксимальные лимфоидные элементы. К дополнительным уровням организации клеток, которые влияют на развитие опухоли, относятся метастатические очаги. Границей опухолевого микроокружения принято считать так называемый замыкающий слой. Сложная морфологическая структура опухолевого новообразования требует разработки таргетной терапии, основанной на понимании механизмов проникновения терапевтических агентов непосредственно к трансформированным клеткам [1–5].

Значительную часть опухолевого микроокружения (tumor microenvironment, TME) составляют иммунные клетки хозяина, среди которых наиболее многочисленной группой являются нейтрофилы. Воспалительные процессы возникают в области опухолевого роста, а сигналы, выделяемые опухолевыми и опухоль-ассоциированными клетками, привлекают нейтрофилы, которые превращаются в опухоль-ассоциированные нейтрофилы (tumor-associated

neutrophils, TAN). Они принадлежат к супрессорным клеткам миелоидного ряда (myeloid derived suppressor cells, MDSC). MDSC возникают не только в опухолях, но при онкологических заболеваниях именно они препятствуют развитию полноценной защитной противоопухолевой реакции. TAN получают, в том числе и сигналы гибели (суицида), что провоцирует специфический для них вид клеточной смерти, сопровождающийся высвобождением большого количества геномной ДНК, связанных с ней белков и ферментов, которые образуют NET. Состав NET варьирует в зависимости от типа начального стимула/комбинации стимулов. Неизменной частью NET является сетка хромосомной ДНК. Это привело к мысли о том, что для эффективного разрушения NET можно применять ДНКазы. Действительно, последние исследования показывают, что введение ДНКазы I экспериментальным мышам замедляет рост первичной опухоли, ингибирует метастатический потенциал опухолевых клеток и увеличивает продолжительность жизни животных. Многообещающие результаты, полученные при введении очищенной ДНКазы I мышам, стимулировали создание новых способов доставки ДНКазы I в организм.

ОБРАЗОВАНИЕ NET И ИХ СОСТАВ

Внеклеточные ловушки нейтрофилов были открыты как один из защитных механизмов действия нейтрофилов при бактериальных инфекциях [6]. Выбрасываемые NET задерживают распространение и убивают патогенных микробов в кровотоке [6, 7]. Позднее NET обнаружили и в биоптатах опухолей различного типа. При этом наличие NET коррелировало с неблагоприятным прогнозом [8–11]. Это открытие привело к интенсивному исследованию роли NET в онкогенезе.

В наиболее изученном пути, ведущем к выбросу NET (рис. 1), передача сигналов киназой, регулируемой внеклеточными сигналами (extracellular signal-regulated kinase, ERK), приводит к активации NADPH-оксидазы (NADPH oxidase, NOX) (рис. 1, I) и продукции супероксидных радикалов, которые превращаются в пероксид водорода с помощью супероксиддисмутазы (рис. 1, II) [12]. Миелопероксидаза (MPO) превращает пероксид водорода в хлорноватистую кислоту, активируя эластазу нейтрофилов (neutrophil elastase, NE) (рис. 1, II). NE отвечает за деградацию цитоскелета и ядерной мембраны, позволяя ядерному содержимому смешаться с цитоплазмой (рис. 1, II) [13]. Превращение остатков аргинина в составе гистонов в цитруллины (цитруллинизация), катализируемое активированной белок-аргининдезиминой (protein arginine deiminase, PAD), и протеолитическое расщепление MPO и NE

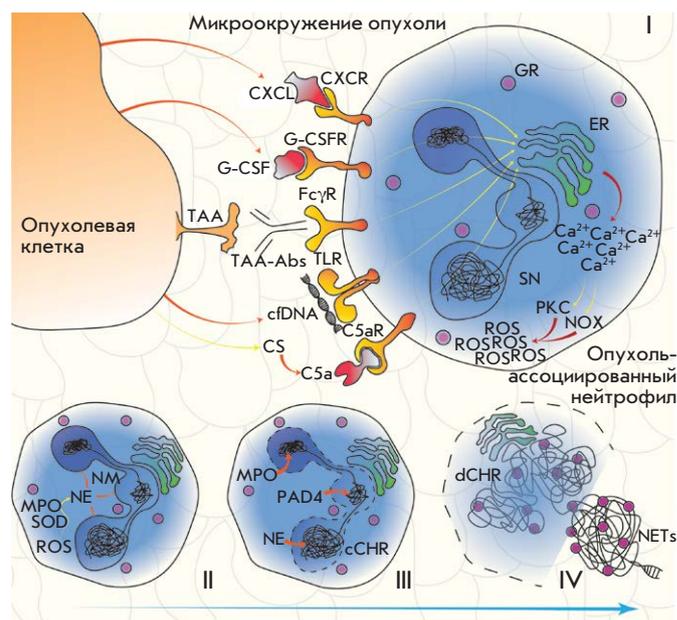


Рис. 1. Сигнальный путь NOX-зависимого нетоза. Различные стимулы, связанные с опухолью, вызывают повышение цитоплазматической концентрации Ca^{2+} в TAN, что служит для активации PKC и NOX и приводит к внутриклеточной продукции ROS (I). При воздействии SOD и MPO ROS превращаются в HClO и активируется NE (II). NE способствует деградации NM, а затем PAD4, MPO и NE обеспечивают деконденсацию хроматина и его смешивание с цитоплазматическими гранулами (III), а затем полученная смесь в виде NET выбрасывается во внеклеточное пространство во время нетоза (IV). Сокращения: TAA – опухоль-ассоциированный антиген, cfDNA – внеклеточная ДНК, TAA-Abs – антитела против TAA, FcγR – рецептор константного фрагмента IgG, TLR – Toll-подобный рецептор, CXCL – цитокин семейства CXС, CXCR – рецептор CXCL, ER – эндоплазматический ретикулум, GR – гранула, G-CSF – гранулоцитарный колониестимулирующий фактор, G-CSFR – рецептор G-CSF, CS – система комплемента, C5a – компонент комплемента 5a, C5aR – рецептор C5a, SN – сегментированное ядро, NM – ядерная мембрана, NE – эластаза нейтрофилов, MPO – миелопероксидаза, SOD – супероксиддисмутаза, ROS – активные формы кислорода, PKC – протеинкиназа C, NOX – NADPH-оксидаза, cCHR – конденсированный хроматин, PAD4 – белок-аргининдезиминаза 4, dCHR – деконденсированный хроматин, NET – внеклеточные ловушки нейтрофилов

приводят к деконденсации хроматина (рис. 1, III) [14]. Волокна хроматина связываются с гранулами и цитоплазматическими белками, а затем выбрасываются из клетки (рис. 1, IV).

Производство активных форм кислорода (reactive oxygen species, ROS) – ключевое событие не-

тоза (рис. 1, I). Дыхательная цепь митохондрий и NOX независимо вносят вклад в образование ROS. Несколько различных рецепторов запускают образование NET, активируя NOX, при классическом «суицидальном» нетозе [15] (рис. 1, I). Точно так же форбол-12-миристан-13-ацетат (PMA), имитируя диацилглицерин, активирует протеинкиназу C (PKC) [16] и передачу сигналов ERK, что аналогично индукции NET патогенными бактериями и грибами. Примечательно, что варианты применения PMA для индукции нетоза у нейтрофилов в культуре могут существенно различаться [17].

NOX-независимый путь нетоза основан на продукции ROS митохондриями, чему способствуют щелочные значения pH, которые увеличивают приток Ca^{2+} [18]. Ca^{2+} в свою очередь активирует один из типов калиевых каналов малой проводимости SK3 (small conductance calcium-activated potassium channels, SK), что критично для NOX-независимого нетоза [19]. Активация PAD4 и цитруллинирование гистонов ярко выражены при NOX-независимом нетозе. Ионифоры кальция, такие, как иономицин и A23187 (Calcimycin), активируют PKC- ζ и затем PAD4 [16], что вызывает NOX-независимый нетоз. В некоторых условиях NOX-независимое высвобождение ядерной и митохондриальной ДНК происходит из живых нейтрофилов. Показано, что рибонуклеопротеидные иммунные комплексы, действуя на нормальные нейтрофилы или иммуносупрессорные нейтрофилы низкой плотности, индуцируют выработку митохондриальных ROS и выделение NET, содержащих митохондриальную ДНК, из живых клеток [20]. При сепсисе активированные тромбоциты прикрепляются к нейтрофилам и вызывают экструзию NET из живых клеток [21].

Несмотря на различную роль продукции ROS и активности ферментов в индукции нетоза, различные пути активации приводят к образованию NET, наделенных сходной бактерицидной активностью [22].

Помимо ионифоров и PMA существует еще более 10 веществ-индукторов нетоза, которые можно использовать *in vitro* для анализа данного процесса [10]. Протеомный анализ индуцированных различными стимулами NET обнаружил в их составе 330 белков, 74 присутствовали вне зависимости от способа индукции нетоза, представляя пул обязательных компонентов, который характеризует NET любого типа [23, 24].

РОЛЬ NET В ОПУХОЛЕВЫХ ПРОЦЕССАХ

Данные о связи NET с развитием рака стимулировали интенсивное изучение функций этих структур в разных типах опухолей. Вскоре появились сообщения о прямом влиянии NET на пролиферацию опу-

холевых клеток через протеазы или активирующие сигналы [25–28].

Опухолевые клетки – одна из причин нетоза

Показано, что опухолевые клетки способны индуцировать нетоз *in vivo* и *in vitro* [11], а также выявлена связь TAN с образованием NET [11, 29–31]. К примеру, *in vitro* установлено, что линия клеток рака поджелудочной железы (AsPC-1) индуцирует образование NET [32], и основная роль в нетозе приписывается внеклеточным белкам этой линии. В той же работе показано, что NET усиливают эндогенный тромбиновый потенциал нормальной плазмы и индуцируют миграцию, инвазию и ангиогенез раковых клеток [32]. Внеклеточные РНК карциномы легких Льюиса вызывают образование NET, согласно данным другого исследования *in vitro* [33].

Нейтрофилы мышей с хроническим миелолейкозом, раком молочной железы и легких более склонны к нетозу, чем нейтрофилы здоровых животных. Высокая склонность нейтрофилов к образованию NET при этих патологиях коррелирует с системным действием опухолей на организм [34, 35].

Рекрутирование нейтрофилов кондиционированной средой от гипоксических раковых клеток наблюдали *in vitro*. Миграция клеток была опосредована высокими уровнями хемокинов и HMGB1, также способных генерировать NET в TME [31]. Недавно Tohme и соавт. [31] показали, что NET способствуют росту опухолевых клеток за счет усиления их митохондриальных функций. Более того, имплантированные под кожу контрольных мышей опухоли росли быстрее, чем у животных с нокаутом гена PAD4 (PAD4-KO). Число метастазов в печени мышей с дефицитом PAD4 было меньше, чем у животных контрольной группы. Внутривентриальное введение рекомбинантной ДНКазы I мышам без нокаута PAD4 также приводило к снижению числа метастазов. Иммунофлуоресцентное окрашивание срезов опухолей PAD4-KO выявило очень низкую инфильтрацию нейтрофилов по сравнению с контролем. В целом, эти данные подчеркивают центральную роль рекрутирования нейтрофилов и образования NET в росте и прогрессии опухоли. Park и соавт. [11] также обнаружили тесную связь между метастатическими опухолевыми клетками, привлечением нейтрофилов и образованием NET. Установлено, что метастатические клетки рака молочной железы провоцируют нетоз, который поддерживает метастазы за счет NET. Цитокин CXCL1 опосредует рекрутирование нейтрофилов в опухоли мышей, которым ортотопически подсаживали клетки рака молочной железы – 4T1 (образуют метастазы) и 4T07 (не образуют метастазы). В первичных опухолях 4T1 обнаружено больше

нейтрофилов, чем в 4T07. Уменьшение же CXCL1 в клетках 4T1 снизило инфильтрацию опухоли нейтрофилами. Путем иммунофлуоресцентного окрашивания срезов ткани легкого показано, что образование NET происходит сразу после инъекции клеток 4T1 в хвостовую вену. Более того, метастатические клетки выделяли гранулоцитарный колониестимулирующий фактор (granulocyte colony-stimulating factor, G-CSF), который вызывал вокруг них нетоз, а антитела, блокирующие G-CSF, сильно снижали образование NET [11].

NET вовлечены в нарушение кровообращения

У трансгенных мышей линий RIP1-Tag2 (спонтанная инсулинома) и MMTV-PyMT (рак молочной железы) обнаружены изменения кровеносных сосудов и усиленная инфильтрация нейтрофилов в сердце и почках, напоминающие системные повреждения у онкологических больных. Кроме того, в почках таких животных обнаружены тромбоцитарно-нейтрофильные комплексы, свидетельствующие о формировании NET. Причем эти комплексы отсутствовали у всех проанализированных здоровых мышей [36]. Ранее показали, что тромбоциты побуждают нейтрофилы высвобождать NET, тем самым способствуя уничтожению бактерий [21]. Olsson и соавт. выяснили, что накопление NET в сосудах связано с активацией провоспалительных молекул адгезии ICAM-1, VCAM-1 и E-селектина, а также провоспалительных цитокинов IL-1b, IL-6 и хемокина CXCL1. Введение ДНКазы I для разрушения NET восстановило перфузию в почках и сердце до уровня у здоровых мышей, а также предотвратило закупорку кровеносной сети этих органов. Результаты исследования убедительно свидетельствуют о том, что NET опосредуют негативные побочные эффекты опухолей на дистальные органы, нарушая в них функцию сосудов и усиливая воспаление [36].

NET и тромбоциты играют ключевую роль в гиперкоагуляции крови при раке поджелудочной железы (pancreatic adenocarcinoma, PA), что приводит к повышенному риску венозной тромбоэмболии и тромбоза, ассоциированного с раком, в ортотопической модели PA у мышей C57BL/6 и у пациентов [37]. Berger-Achituv и соавт. [8] обнаружили TAN в диагностических биопсиях детей с саркомой Юинга. В двух образцах NET продуцировались за счет TAN. Метастазы и ранний рецидив после высоких доз химиотерапии, наблюдаемые у этих пациентов, указывают на возможную роль NET в прогрессировании саркомы Юинга [8]. Важную роль NET при онкологических заболеваниях подчеркивает также их связь с изменением свертывания крови у пациентов с опухолями. NET стимулируют

тромбоз, связанный с раком, – симптом, который сопутствует очень плохому прогнозу [26, 38]. Уровни циркулирующих NET измеряли и у пациентов с гепатоцеллюлярной карциномой (ГЦК), оценивая уровень соответствующих маркеров (комплексов ДНК-гистоны, двухцепочечной ДНК, NE). Аналогичным образом измеряли содержание маркеров активации контактной фазы (фактор XIIa и высокомолекулярный кининоген). NET и маркеры активации контактной фазы у пациентов с ГЦК были выше, чем у здоровых доноров [39]. Обнаружена корреляция между высокими уровнями маркеров NET и гиперкоагуляцией у пациентов со злокачественными образованиями поджелудочной железы [32]. Более того, на поздних стадиях заболевания уровни цитруллинированного гистона H3 (histone H3 citrullinated, H3-cit) в плазме пациентов были выше, чем у здоровых доноров, а в нейтрофилах было повышено содержание H3-cit. Кроме того, уровень H3-cit в плазме онкологических больных действительно коррелирует с уровнями NE, MPO, интерлейкинов-6 и -8 – активаторов нетоза [40, 41].

Повышенное содержание NET коррелирует с наличием опухолевого процесса

Спонтанная неоплазия кишечника у мышей коррелирует с накоплением иммуносупрессорных проонкогенных нейтрофилов низкой плотности с фенотипом N2, активацией рецептора комплемента C3a и образованием NET [42].

Обнаружена положительная корреляция между повышенным уровнем NET в плазме и различными опухолевыми процессами, например, NET найдены в тканях легких, периферической крови и мокроте пациентов с раком легкого [33]. У пациентов с колоректальным раком уровни NET, продуцируемых нейтрофилами после стимуляции *in vitro*, были значительно выше, чем в контрольной группе, и были связаны с плохим клиническим исходом [10]. NET выявлены при раке молочной железы, а также в метастатических поражениях легкого, причем наиболее высоким их содержание (%) было у пациентов с трижды негативным раком молочной железы [11]. Обнаружено также увеличение количества TAN и NET в гистопатологических образцах метастазов в печень пациентов с колоректальным раком [41] по сравнению с тканью печени здоровых доноров. Кроме того, высокие уровни цитруллинированных гистонов в опухолях указывают на нетоз. Предоперационные уровни MPO-ДНК, надежного маркера системного нетоза [41], в сыворотке пациентов были выше, чем у здоровых индивидов, и ассоциировались с неудовлетворительным прогнозом. Таким образом, уровни MPO-ДНК в сыворотке мож-

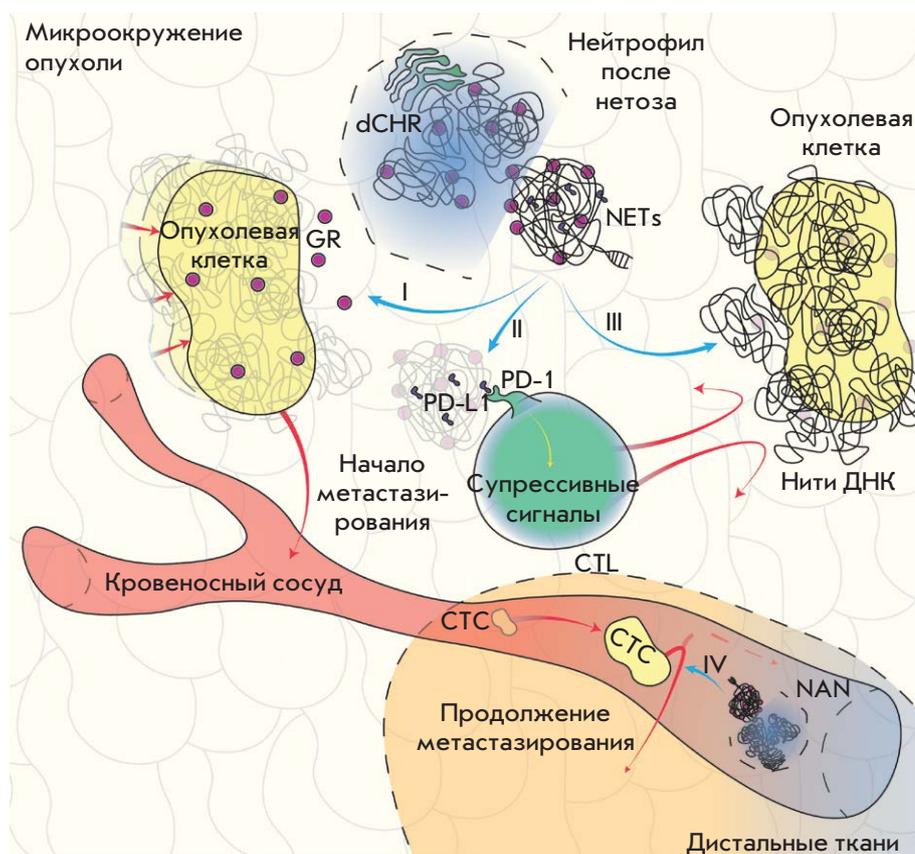


Рис. 2. Комплексное влияние NET на опухолевые клетки и компоненты ТМЕ. Гранулы NET содержат ферменты, которые активируют опухолевые клетки, меняя их фенотип на метастатический (I); NET, а также супрессорные молекулы (PD-L1), которые, взаимодействуя с цитотоксическими клетками, вызывают супрессию их активности (II); нити ДНК, основной компонент NET, окутывают опухолевые клетки, создавая стерическое препятствие для взаимодействия с цитотоксическими клетками (III); опухолевые клетки выходят из микроокружения в кровеносные сосуды, и в дистальных тканях за счет NET происходит захват этих циркулирующих клеток, что поддерживает метастазирование (IV). dCHR – деконденсированный хроматин, NET – внеклеточные ловушки нейтрофилов, GR – гранула, PD-L1 – лиганд программируемой гибели 1, PD-1 – рецептор PD-L1, CTL – цитотоксическая клетка, CTC – циркулирующая опухолевая клетка, NAN – нейтрофил после нетоза

но рассматривать как возможный прогностический маркер [31].

NET и опухолевые клетки прикрепляются друг к другу

Помимо локальных опухолевых и системных эффектов, NET могут способствовать метастазированию, захватывая циркулирующие опухолевые клетки (circulating tumor cells, CTC) (рис. 2, IV) [43]. У мышей с внутрибрюшинным сепсисом, имитирующих послеоперационное воспаление, наблюдали адгезию раковых клеток к NET и усиленную экспрессию интегрина бета-1 как в опухолевых клетках, так и в NET, что, по-видимому, можно считать ключевым фактором адгезии CTC к NET. Обработка ДНКазой I нарушала данный процесс [44]. В мышинных моделях нетоз и захват CTC легких вызывали микрометастазы в печень [45]. Наконец, NET способствовали развитию и прогрессии метастазов в печень после хирургического вмешательства [41]. Показана способность различных линий раковых клеток (HT1080, U-87MG, H1975, DU 145, PC-3 и A-431) прикрепляться *in vitro* к NET, полученным из нейтрофил-подобных клеток, через поверхностные интегринны $\alpha_5\beta_1$, $\alpha_v\beta_3$ и $\alpha_v\beta_5$ [46].

Избыток циклического пептида RGD ингибировал адгезию опухолевых клеток к NET до уровня, наблюдаемого при гидролизе NET ДНКазой I.

NET провоцируют метастазирование

Помимо всех ранее описанных функций, NET «пробуждают» спящие опухолевые клетки (рис. 2, I). Недавно установили участие NET в рецидивировании опухоли [47]. Хроническое воспаление легких, вызванное табачным дымом или назальным введением липополисахарида – активатора нетоза, способствовало активации спящих опухолевых клеток и формированию метастазов. NET связывались с внеклеточным матриксом и провоцировали расщепление и ремоделирование ламинина с образованием нового поверхностного эпитопа, который инициировал пролиферацию покоящихся клеток, посредством активации интегрина и передачи сигналов через киназы FAK / ERK / MLCK / YAP. При этом разрушение NET ДНКазой I *in vitro* и *in vivo* подавляло метастазирование. Оценена способность изолированных NET изменять фенотип клеток рака молочной железы человека на прометастатический [47]. NET изменяют типичную морфологию клеток MCF7 с эпи-

телиальной на мезенхимальную, при которой усиливаются миграционные свойства опухоли с такими типичными признаками эпителиально-мезенхимального перехода (epithelial-mesenchymal transition, EMT), как повышение уровня N-кадгерина и фибронектина. Уровень E-кадгерина при этом снижался. Примечательно, что NET положительно регулируют экспрессию генов нескольких факторов, связанных с провоспалительными и прометастатическими свойствами. Сопоставление данных, представленных в атласе генома рака, с результатами секвенирования РНК в образцах рака молочной железы выявило значительную корреляцию между экспрессией проопухолевых генов и экспрессией генов, продукты которых участвуют во взаимодействии с нейтрофилами. Следовательно, в клетках рака молочной железы человека NET управляют прометастатическим фенотипом посредством активации программы EMT.

NET препятствуют деятельности цитотоксических клеток

Еще одна важная функция NET – способность «скрывать» опухолевые клетки от цитотоксических иммунных клеток. Недавно показали, что хемокины группы CXCL, выделяемые опухолевыми клетками, провоцируют нетоз у TAN [48]. Образующиеся NET обволакивают опухоль, используя нити ДНК, и образуют физическое препятствие для взаимодействия T- и NK-клеток с опухолями (рис. 2, III). Кроме того, как обнаружено недавно, NET могут содержать супрессорные молекулы (например, PD-L1) и негативно влиять на активность цитотоксических лимфоцитов (рис. 2, II) [49]. Особую роль в исследовании NET должны занять работы по терапии онкопатологий с помощью перепрограммированных T-клеток с индуцированной цитолитической активностью. Все более реальной становится CAR-T-терапия гематологических опухолей человека с использованием подходов персонализированной медицины [50, 51]. Вместе с тем, возможности CAR-T-терапии солидных опухолей весьма ограничены [52]. Вполне вероятно, что в этом случае NET могут быть важной мишенью, обеспечивающей преодоление барьеров на пути к эффективной CAR-T-терапии.

МЕТОДЫ ДЕТЕКЦИИ И ВОЗДЕЙСТВИЯ НА NET

На основании последних исследований NET можно назвать многообещающей терапевтической мишенью при онкологических заболеваниях. Судя по важной роли NET в увеличении метастатического потенциала злокачественных клеток, ингибирование образования и активности NET в опухолях может сделать прогноз выживаемости пациентов более оптимистичным [11].

Маркеры NET

Для проведения клинического скрининга NET необходимо иметь стандартизованный протокол определения референтных уровней нетоза. Однако метод, обладающий 100% надежностью, еще не описан. Простейшие средства обнаружения NET *in vivo* включают количественное определение таких связанных с NET веществ, как циркулирующая внеклеточная ДНК, H3-cit, NE и MPO, в крови. Например, с помощью простого анализа окрашивания нуклеиновой кислоты в образцах сыворотки пациентов с колоректальным раком и раком молочной железы определено количество свободно циркулирующей ДНК [53, 54]. Хотя известно, что количество циркулирующей ДНК коррелирует с размером опухоли молочной железы и ее злокачественностью [55], метод измерения нетоза путем прямого окрашивания ДНК недостаточно специфичен. Повышенное количество внеклеточной ДНК (cell-free DNA, cfDNA) в сыворотке больных раком может быть связано и с другими факторами, такими, как апоптотические и некротические клетки, микроорганизмы, проникающие в системный кровоток при повышении проницаемости стенки кишечника [56]. Измерение циркулирующих конъюгатов MPO-ДНК более специфично для образования NET, чем оценка только внеклеточной ДНК [57]. H3-cit возникает в результате PAD4-опосредованного цитруллинирования во время образования NET и представляет собой наиболее специфичный маркер циркулирующих NET [58]. Кроме того, H3-cit может иметь прогностическое значение, поскольку высокое содержание H3-cit в плазме является значимым показателем повышенной смертности пациентов с поздней стадией рака [40]. Другие же маркеры NET, включая NE и MPO, не имеют строгой корреляции с онкологическими патологиями, поскольку могут высвобождаться в ходе дегрануляции нейтрофилов без образования NET. Таким образом, на сегодняшний день самым надежным индикатором нетоза является H3-cit.

NET как терапевтическая мишень

Согласно приведенным в обзоре Jorch и Kubes [59] данным, подавляющее большинство экспериментальных и клинических исследований NET проведено при неопухолевых патологиях, таких, как аутоиммунные, легочные заболевания или осложнения аутоиммунных состояний. Особый интерес в изучении роли NET вызывают аутоиммунные патологии, характеризующиеся высоким уровнем антител к ДНК [60–64]. Так при системной красной волчанке (СКВ) сывороточная ДНКазы I важна для гидролиза хроматина NET. Более того, у некоторых пациентов с СКВ дисфункция ДНКазы I вызывает тяжелые по-

вреждения почек, что подчеркивает важность баланса между формированием и деградацией NET [65]. Обнаружение связей между NET и ДНКазой I, а также NET с развитием опухолей стимулировало исследования, направленные на выяснение возможности использования ДНКазы I в терапии онкологических заболеваний. Для этого рекомбинантную ДНКазу I вводили мышам, в организме которых развивались опухоли. Введение активного фермента таким животным негативно влияло на рост новообразований. Например, лечение ДНКазой I снизило вызванные образованием NET нарушения кровообращения и перфузии внутренних органов в моделях рака молочной железы [36]. Более того, в мышинной модели внутрибрюшинного сепсиса, имитирующего послеоперационную воспалительную среду, ДНКаза I нарушает взаимодействие NET и циркулирующих опухолевых клеток *in vivo* [44]. Системное введение ДНКазы I также уменьшает число метастазов у мышей, моделирующих метастатический рак легкого [45], а наночастицы, покрытые ДНКазой I, оказывают даже более сильный эффект за счет стабилизации фермента. Наночастицы ДНКазы I гидролизуют NET *in vitro* и блокировали образование метастазов рака молочной железы в легкие *in vivo*, хотя не влияли на рост первичной опухоли [11, 66]. Недавно разработан новый способ увеличения активности ДНКазы I в плазме. С этой целью использовали опосредованный вектором на основе аденоассоциированного вируса перенос гена ДНКазы I в гепатоциты [67]. Однократная внутривенная инъекция вирусных частиц привела к подавлению развития метастазов в мышинной модели колоректального рака и способствовала увеличению числа CD8⁺ Т-клеток в опухолях [68, 69]. Эти обнадеживающие результаты на животных являются основанием для клинических исследований по использованию ДНКазы I в качестве противоопухолевого препарата.

Применение ингибиторов молекул, участвующих в нетозе и препятствующих образованию NET, которые уже используют при неопухолевых патологиях, логично расширить на онкологических больных после клинического тестирования. В спектр этих препаратов входят ингибиторы NE, используемые при хронической обструктивной болезни легких, и ингибиторы PAD4. Эти соединения могут улучшить клинический исход больных раком [25] даже несмотря на то, что коммерчески доступные ингибиторы PAD4, например, Cl-амидин, имеют короткий период полураспада в сыворотке крови [70]. В качестве альтернативного ингибитора образования NET предложено применять простагландин E₂ (PGE₂), который через рецепторы EP₂ или EP₄ негативно влияет на нетоз как у мышей, так и у пациентов, кото-

рым трансплантировали гемопоэтические стволовые клетки [71]. Показано также, что PGE₂ ингибирует образование NET, индуцированное как раковыми клетками, так и PMA, вероятно, за счет повышения концентрации внутриклеточного cAMP и снижения концентрации внутриклеточного Ca²⁺, необходимого для образования NET, а также, что антитромбин значительно снижает образование NET, вызванное опухолевыми клетками [72]. Кроме перечисленных ингибиторов нетоза, ингибитор NET хлорохин снижает агрегацию тромбоцитов в крови, уровень циркулирующего тканевого фактора (фактора свертывания III) и уменьшает гиперкоагуляцию у мышей с опухолью. Аналогичные эффекты выявлены у пациентов со злокачественными новообразованиями [37].

К сожалению, до сих пор еще только ведутся клинические испытания, и не определен оптимальный способ воздействия на NET (NCT03781531, NCT04177576, NCT04294589, NCT01491230, NCT01533779).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Уникальная роль NET в онкогенезе, включающая способность инициировать неопластическую трансформацию, ускорять рост опухоли и метастазирование, а также повышать устойчивость к противоопухолевой терапии, делает их перспективной терапевтической мишенью. Появляется все больше исследований, направленных на применение различных подходов к разрушению NET в онкологии, в том числе использование ДНКазы I. Использование ДНКазы I подразумевает, что деградации будет подвергаться не только NET, но и внеклеточная ДНК, что должно обеспечить более эффективное ингибирование опухолевого процесса. Оптимальный способ борьбы с NET пока не определен, а будущие исследования должны быть сосредоточены на изучении регуляции нетоза и баланса между образованием и разрушением NET, чтобы воздействовать на NET, не нарушая функций иммунной системы. К тому же существуют данные, согласно которым в качестве элемента, препятствующего онкотерапии, следует рассматривать не только NET, но и плотные межклеточные контакты, которые поддерживают целостность солидных эпителиальных опухолей и препятствуют проникновению объемных агентов, в том числе Т-клеток и НК-клеток, в глубь опухоли. В областях межклеточного контакта эпителиальных клеток функционирует белок десмоглеин 2, который обеспечивает структурное сцепление соседних клеток [73]. Разработаны рекомбинантные белки, названные «открывателями контактов», которые связывают десмоглеин 2, вызывая временное и специфическое открытие плотных контактов, что позволяет различ-

ным терапевтическим средствам проникать в опухоли [74, 75]. Возможно, совместное использование ДНКазы I и «открывателей контактов» могло бы увеличить эффективность противоопухолевой терапии, поскольку способствовало бы эффективному про-

никновению агентов, в том числе цитотоксических клеток, в глубь злокачественного новообразования. ●

*Работа выполнена при поддержке МОН РФ
(грант № 075-15-2020-773).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Stepanov A.V., Belogurov A.A.J., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Balabashin D.S., et al. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 6. P. e20991.
- Ukrainskaya V.M., Rubtsov Y.P., Knorre V.D., Maschan M.A., Gabibov A.G., Stepanov A.V. // *Acta Naturae*. 2019. V. 11. № 4. P. 33–41.
- Guryev E.L., Volodina N.O., Shilyagina N.Y., Gudkov S.V., Balalaeva I.V., Volovetskiy A.B., Lyubeshkin A.V., Sen' A.V., Ermilov S.A., Vodeneev V.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. № 39. P. 9690–9695.
- Ukrainskaya V.M., Stepanov A.V., Glagoleva I.S., Knorre V.D., Belogurov A.A.J., Gabibov A.G. // *Acta Naturae*. 2017. V. 9. № 3. P. 55–63.
- Sokolova E., Proshkina G., Kutova O., Shilova O., Ryabova A., Schulga A., Stremovskiy O., Zdobnova T., Balalaeva I., Deyev S. // *J. Control. Release*. 2016. V. 233. P. 48–56.
- Brinkmann V., Reichard U., Goosmann C., Fauler B., Uhlemann Y., Weiss D.S., Weinrauch Y., Zychlinsky A. // *Science* (80-). 2004. V. 303. № 5663. P. 1532–1535.
- Branzk N., Lubojemska A., Hardison S.E., Wang Q., Gutierrez M.G., Brown G.D., Papayannopoulos V. // *Nat. Immunol.* 2014. V. 15. № 11. P. 1017–1025.
- Berger-Achituv S., Brinkmann V., Abu-Abed U., Kühn L., Ben-Ezra J., Elhasid R., Zychlinsky A. // *Front. Immunol.* 2013. V. 4. P. 48.
- Oklu R., Sheth R.A., Wong K.H.K., Jahromi A.H., Albadawi H. // *Cardiovasc. Diagn. Ther.* 2017. V. 7. Suppl. 3. P. S140–S149.
- Richardson J.J.R., Hendrickse C., Gao-Smith F., Thickett D.R. // *Int. J. Inflamm.* 2017. V. 2017. P. 4915062.
- Park J., Wysocki R.W., Amoozgar Z., Maiorino L., Fein M.R., Jorns J., Schott A.F., Kinugasa-Katayama Y., Lee Y., Won N.H., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2016. V. 8. № 361. P. 138.
- Delgado-Rizo V., Martínez-Guzmán M., Iñiguez-Gutierrez L., García-Orozco A., Alvarado-Navarro A., Fafutis-Morris M. // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. P. 81.
- Papayannopoulos V., Metzler K.D., Hakkim A., Zychlinsky A. // *J. Cell Biol.* 2010. V. 191. № 3. P. 677–691.
- Wang Y., Li M., Stadler S., Correll S., Li P., Wang D., Hayama R., Leonelli L., Han H., Grigoryev S.A., et al. // *J. Cell Biol.* 2009. V. 184. № 2. P. 205–213.
- Yang H., Biermann M.H., Brauner J.M., Liu Y., Zhao Y., Herrmann M. // *Front. Immunol.* 2016. V. 7. P. 302.
- Radic M., Neeli I. // *Front. Immunol.* 2013. V. 4. P. 38.
- Hoppenbrouwers T., Autar A.S.A., Sultan A.R., Abraham T.E., van Cappellen W.A., Houtsmuller A.B., van Wamel W.J.B., van Beusekom H.M.M., van Neck J.W., de Maat M.P.M. // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 5. P. e0176472.
- Naffah de Souza C., Breda L.C.D., Khan M.A., Almeida S.R. de, Câmara N.O.S., Swezey N., Palaniyar N. // *Front. Immunol.* 2018. V. 8. P. 1849.
- Douda D.N., Khan M.A., Grasmann H., Palaniyar N. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 9. P. 2817–2822.
- Lood C., Blanco L.P., Purmalek M.M., Carmona-Rivera C., De Ravin S.S., Smith C.K., Malech H.L., Ledbetter J.A., Elkon K.B., Kaplan M.J. // *Nat. Med.* 2016. V. 22. № 2. P. 146–153.
- Clark S.R., Ma A.C., Tavener S.A., McDonald B., Goodarzi Z., Kelly M.M., Patel K.D., Chakrabarti S., McAvoy E., Sinclair G.D., et al. // *Nat. Med.* 2007. V. 13. № 4. P. 463–469.
- Kenny E.F., Herzig A., Krüger R., Muth A., Mondal S., Thompson P.R., Brinkmann V., von Bernuth H., Zychlinsky A. // *Elife*. 2017. V. 6. P. e24437.
- Urban C.F., Ermert D., Schmid M., Abu-Abed U., Goosmann C., Nacken W., Brinkmann V., Jungblut P.R., Zychlinsky A. // *PLoS Pathog.* 2009. V. 5. № 10. P. e1000639.
- Fadini G.P., Menegazzo L., Rigato M., Scattolini V., Poncina N., Bruttocao A., Ciciliot S., Mammano F., Ciubotaru C.D., Brocco E., et al. // *Diabetes*. 2016. V. 65. № 4. P. 1061–1071.
- Brinkmann V. // *J. Innate Immun.* 2018. V. 10. № 5–6. P. 414–421.
- Cools-Lartigue J., Spicer J., Najmeh S., Ferri L. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2014. V. 71. № 21. P. 4179–4194.
- Sangaletti S., Tripodo C., Vitali C., Portararo P., Guarnotta C., Casalini P., Cappetti B., Miotti S., Pincioli P., Fuligni F., et al. // *Cancer Discov.* 2014. V. 4. № 1. P. 110–129.
- Homa-Mlak I., Majdan A., Mlak R., Małeczka-Massalska T. // *Postepy Hig. Med. Dosw. (Online)*. 2016. V. 70. P. 887–895.
- Masucci M.T., Minopoli M., Carriero M.V. // *Front. Oncol.* 2019. V. 9. P. 1146.
- Powell D.R., Huttenlocher A. // *Trends Immunol.* 2016. V. 37. № 1. P. 41–52.
- Yazdani H.O., Roy E., Comerci A.J., van der Windt D.J., Zhang H., Huang H., Loughran P., Shiva S., Geller D.A., Bartlett D.L., et al. // *Cancer Res.* 2019. V. 79. № 21. P. 5626–5639.
- Jung H.S., Gu J., Kim J.-E., Nam Y., Song J.W., Kim H.K. // *PLoS One*. 2019. V. 14. № 4. P. e0216055.
- Li Y., Yang Y., Gan T., Zhou J., Hu F., Hao N., Yuan B., Chen Y., Zhang M. // *Int. J. Oncol.* 2019. V. 55. № 1. P. 69–80.
- Demers M., Krause D.S., Schatzberg D., Martinod K., Voorhees J.R., Fuchs T.A., Scadden D.T., Wagner D.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 32. P. 13076–13081.
- Demers M., Wagner D.D. // *Oncoimmunology*. 2013. V. 2. № 2. P. e22946.
- Cedervall J., Zhang Y., Huang H., Zhang L., Femel J., Dimberg A., Olsson A.-K. // *Cancer Res.* 2015. V. 75. № 13. P. 2653–2662.
- Boone B.A., Murthy P., Miller-Ocuin J., Doerfler W.R., Ellis J.T., Liang X., Ross M.A., Wallace C.T., Sperry J.L., Lotze M.T., et al. // *BMC Cancer*. 2018. V. 18. № 1. P. 678.
- Demers M., Wagner D.D. // *Semin. Thromb. Hemost.* 2014. V. 40. № 3. P. 277–283.
- Seo J. Do, Gu J.-Y., Jung H.S., Kim Y.J., Kim H.K. // *Clin. Appl. Thromb.* 2019. V. 25. P. 1076029618825310.
- Thålin C., Lundström S., Seignez C., Daleskog M., Lundström A., Henriksson P., Helleday T., Phillipson M., Wallén H., Demers M. // *PLoS One*. 2018. V. 13. № 1. P. e0191231.
- Tohme S., Yazdani H.O., Al-Khafaji A.B., Chidi A.P., Loughran P., Mowen K., Wang Y., Simmons R.L., Huang H., Tsung A. // *Cancer Res.* 2016. V. 76. № 6. P. 1367–1380.
- Guglietta S., Chiavelli A., Zagato E., Krieg C., Gandini S.,

- Ravenda P.S., Bazolli B., Lu B., Penna G., Rescigno M. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. № 1. P. 11037.
43. Szczerba B.M., Castro-Giner F., Vetter M., Krol I., Gkoutela S., Landin J., Scheidmann M.C., Donato C., Scherrer R., Singer J., et al. // *Nature*. 2019. V. 566. № 7745. P. 553–557.
44. Najmeh S., Cools-Lartigue J., Rayes R.F., Gowing S., Vourtzoumis P., Bourdeau F., Giannias B., Berube J., Rousseau S., Ferri L.E., et al. // *Int. J. Cancer*. 2017. V. 140. № 10. P. 2321–2330.
45. Cools-Lartigue J., Spicer J., McDonald B., Gowing S., Chow S., Giannias B., Bourdeau F., Kubes P., Ferri L. // *J. Clin. Invest.* 2013. V. 123. № 8. P. 3446–3458.
46. Monti M., De Rosa V., Iommelli F., Carriero M.V., Terlizzi C., Camerlingo R., Belli S., Fonti R., Di Minno G., Del Vecchio S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2018. V. 19. № 8. P. 2350.
47. Martins-Cardoso K., Almeida V.H., Bagri K.M., Rossi M.I., Mermelstein C.S., König S., Monteiro R.Q. // *Cancers (Basel)*. 2020. V. 12. № 6. P. 1542.
48. Teijeira Á., Garasa S., Gato M., Alfaro C., Migueliz I., Cirella A., de Andrea C., Ochoa M.C., Otano I., Etxeberria I., et al. // *Immunity*. 2020. V. 52. № 5. P. 856–871.
49. Zhang H., van der Windt D.J., Ren J., Tsung A., Huang H. // *J. Immunol.* 2019. V. 202. № 1. P. 135.
50. Stepanov A.V., Markov O.V., Chernikov I.V., Gladkikh D.V., Zhang H., Jones T., Sen'kova A.V., Chernolovskaya E.L., Zenkova M.A., Kalinin R.S., et al. // *Sci. Adv.* 2018. V. 4. № 11. P. 4580.
51. Huang J., Alexey S., Li J., Jones T., Grande G., Douthit L., Xie J., Chen D., Wu X., Michael M., et al. // *Leukemia*. 2019. V. 33. № 9. P. 2315–2319.
52. Kalinin R.S., Petukhov A.V., Knorre V.D., Maschan M.A., Stepanov A.V., Gabibov A.G. // *Acta Naturae*. 2018. V. 10. № 2. P. 16–23.
53. Agassi R., Czeiger D., Shaked G., Avriel A., Sheynin J., Lavrenkov K., Ariad S., Douvdevani A. // *Am. J. Clin. Pathol.* 2015. V. 143. № 1. P. 18–24.
54. Czeiger D., Shaked G., Eini H., Vered I., Belochitski O., Avriel A., Ariad S., Douvdevani A. // *Am. J. Clin. Pathol.* 2011. V. 135. № 2. P. 264–270.
55. Kohler C., Radpour R., Barekati Z., Asadollahi R., Bitzer J., Wight E., Bürki N., Diesch C., Holzgreve W., Zhong X.Y. // *Mol. Cancer*. 2009. V. 8. № 1. P. 105.
56. Bronkhorst A.J., Ungerer V., Diehl F., Anker P., Dor Y., Fleischhacker M., Gahan P.B., Hui L., Holdenrieder S., Thierry A.R. // *Hum. Genet.* 2021. V. 140. № 4. P. 565–578.
57. Yoo D., Floyd M., Winn M., Moskowitz S.M., Rada B. // *Immunol. Lett.* 2014. V. 160. № 2. P. 186–194.
58. Mauracher L.-M., Posch F., Martinod K., Grilz E., Däullary T., Hell L., Brostjan C., Zielinski C., Ay C., Wagner D.D., et al. // *J. Thromb. Haemost.* 2018. V. 16. № 3. P. 508–518.
59. Jorch S.K., Kubes P. // *Nat. Med.* 2017. V. 23. № 3. P. 279–287.
60. Gabibov A.G., Ponomarenko N.A., Tretyak E.B., Paltsev M.A., Suchkov S.V. // *Autoimmun. Rev.* 2006. V. 5. № 5. P. 324–330.
61. Belogurov A.J., Kozyr A., Ponomarenko N., Gabibov A. // *Bioessays*. 2009. V. 31. № 11. P. 1161–1171.
62. Durova O.M., Vorobiev I.I., Smirnov I.V., Reshetnyak A.V., Telegin G.B., Shamborant O.G., Orlova N.A., Genkin D.D., Bacon A., Ponomarenko N.A., et al. // *Mol. Immunol.* 2009. V. 47. № 1. P. 87–95.
63. Gololobov G.V., Mikhalap S.V., Starov A.V., Kolesnikov A.F., Gabibov A.G. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 1994. V. 47. № 2–3. P. 305.
64. Kozyr A.V., Kolesnikov A.V., Zelenova N.A., Sashchenko L.P., Mikhalap S.V., Bulina M.E., Ignatova A.N., Favorov P.V., Gabibov A.G. // *Appl. Biochem. Biotechnol.* 2000. V. 83. № 1–3. P. 255–268.
65. Hakkim A., Fürnrohr B.G., Amann K., Laube B., Abed U.A., Brinkmann V., Herrmann M., Voll R.E., Zychlinsky A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2010. V. 107. № 21. P. 9813–9818.
66. Hollmén M., Karaman S., Schwager S., Lisibach A., Christiansen A.J., Maksimow M., Varga Z., Jalkanen S., Detmar M. // *Oncoimmunology*. 2016. V. 5. № 3. P. 1115177.
67. Xia Y., He J., Zhang H., Wang H., Tetz G., Maguire C.A., Wang Y., Onuma A., Genkin D., Tetz V., et al. // *Mol. Oncol.* 2020. V. 14. № 11. P. 2920–2935.
68. Alcazar-Leyva S., Ceron E., Masso F., Montano L.F., Gorocica P., Alvarado-Vasquez N. // *Med. Sci. Monit.* 2009. V. 15. № 2. P. 51–55.
69. Alekseeva L.A., Sen'kova A.V., Zenkova M.A., Mironova N.L. // *Mol. Ther. – Nucl. Acids*. 2020. V. 20. P. 50–61.
70. Knight J.S., Subramanian V., O'Dell A.A., Yalavarthi S., Zhao W., Smith C.K., Hodgins J.B., Thompson P.R., Kaplan M.J. // *Ann. Rheum. Dis.* 2015. V. 74. № 12. P. 2199–2206.
71. Domingo-Gonzalez R., Martínez-Colón G.J., Smith A.J., Smith C.K., Ballinger M.N., Xia M., Murray S., Kaplan M.J., Yanik G.A., Moore B.B. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2015. V. 193. № 2. P. 186–197.
72. Shishikura K., Horiuchi T., Sakata N., Trinh D.-A., Shirakawa R., Kimura T., Asada Y., Horiuchi H. // *Br. J. Pharmacol.* 2016. V. 173. № 2. P. 319–331.
73. Shilova O., Shilov E., Lieber A., Deyev S. // *J. Control. Release*. 2018. V. 286. P. 125–136.
74. Pitner R., Kim J., Davis-Bergthold J., Turner C., Stermann E., Adams J., Carter L., Ahlgren J., Fender P., Lieber A., et al. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 1–13.
75. Choi I.-K., Strauss R., Richter M., Yun C.-O., Lieber A. // *Front. Oncol.* 2013. V. 3. P. 193.

УДК 53.06

Гибридные конструкции фотосенсибилизаторов с люминесцентными наночастицами: дизайн комплексов

Д. А. Гвоздев*, Е. Г. Максимов, М. Г. Страховская, В. З. Пашенко, А. Б. Рубин

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

*E-mail: danil131054@mail.ru

Поступила в редакцию 23.03.2021

Принята к печати 14.05.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11379

РЕФЕРАТ Увеличение эффективности фотодинамического действия красителей, применяемых в фотодинамической терапии, является важным направлением современной биомедицины. Можно выделить два основных подхода к повышению эффективности фотосенсибилизаторов – направленную доставку к наиболее уязвимой мишени, а также увеличение поглощательной способности молекулы. Оба подхода можно реализовать путем создания конъюгатов красителей с наночастицами. В данном обзоре мы сосредоточимся на особенностях второго подхода, когда наночастицы выполняют функцию светосборщика и безызлучательно передают энергию электронного возбуждения молекуле фотосенсибилизатора. В качестве примера мы рассмотрим гибридные комплексы фотосенсибилизатор–квантовая точка с переносом энергии согласно индуктивно-резонансному механизму. На основе анализа опубликованных данных предложен принцип оптимизации дизайна гибридных комплексов, описаны параметры, влияющие на эффективность переноса энергии и генерации активных форм кислорода в таких системах.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА FRET, фотосенсибилизатор, люминесцентная наночастица, фотодинамическая терапия. **СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АФК – активные формы кислорода; ГК – гибридный комплекс; ЛНЧ – люминесцентная наночастица; КТ – полупроводниковая квантовая точка; ФДТ – фотодинамическая терапия; ФС – фотосенсибилизатор; Фц – фталоцианин.

ОГЛАВЛЕНИЕ

Введение

1. Компоненты гибридного комплекса
 - 1.1. Тетрапиррольные фотосенсибилизаторы второго поколения
 - 1.2. Коллоидные квантовые точки
2. Механизмы комплексообразования
 - 2.1. Электростатическое взаимодействие
 - 2.2. Неспецифическая сорбция
 - 2.3. Ковалентное связывание
3. Оптимизация дизайна гибридных комплексов
 - 3.1. Эффективность переноса энергии
 - 3.2. Фотодинамические свойства фотосенсибилизатора
4. Выводы и дальнейшие перспективы

ВВЕДЕНИЕ

Тераностика, сочетающая фотодинамическую терапию (ФДТ) и флуоресцентную диагностику, является перспективным направлением современной медици-

ны, использующим свет для выявления и ликвидации опухолей, других нежелательных образований, очагов микробного и грибкового заражения кожи и слизистых [1, 2]. Фотодинамические реакции осуществляются молекулами красителя, способными поглощать квант света, переходить в долгоживущее триплетное состояние и в процессе его дезактивации продуцировать активные формы кислорода (АФК) и свободные радикалы. АФК обладают высокой окислительной активностью и могут использоваться для нарушения функциональности отдельных биомолекул и жизнедеятельности целых клеток. Такие красители получили название фотосенсибилизаторов (ФС). Как правило, это сложные гетероциклические соединения, обладающие рядом полос поглощения в видимой области спектра. В настоящее время осуществляется масштабный поиск высокоэффективных ФС с целью использования явления фотосенсибилизации для лечения онкологических и инфекционных заболеваний. Ряд синтетических

ФС уже успешно применяется в клинике для борьбы с некоторыми видами рака, в стоматологии и т.д. [3].

Один из главных критериев отбора красителей для ФДТ – значительная поглощательная способность ФС в красной и ближней инфракрасной областях спектра, поскольку глубина проникновения света этого диапазона в биологические ткани считается наибольшей. Далеко не всегда выполнение этого критерия возможно только за счет модификации структуры молекулы ФС и потому требует привлечения дополнительных светосборщиков. Поглотив свет нужного спектрального диапазона, светосборщик передаст энергию на ФС и тем самым усилит его фотодинамическое действие.

Основным механизмом передачи энергии в таких гибридных комплексах (ГК) считается безызлучательный (Ферстеровский резонансный перенос энергии, FRET). Соответственно, к антенне также предъявляется ряд требований. В частности, условие резонанса накладывает определенные ограничения на спектральные характеристики донора и акцептора энергии. Учитывая, что спектральные свойства компонентов ГК в значительной степени зависят от их структурных свойств, которые к тому же могут изменяться при образовании комплекса, мы получаем сложную многокомпонентную систему, оптимизация дизайна которой представляет одну из самых актуальных задач прикладной биофизики.

В настоящее время люминесцентные наночастицы (ЛНЧ) наиболее популярны как светосборщики для молекул ФС [4]. Это объясняется тем, что наночастицы можно использовать одновременно и как антенну, и как диагностический маркер, и как платформу для направленной доставки. Двум последним аспектам применения наночастиц посвящено достаточное количество обзоров [5–7]; тогда как фундаментальным проблемам использования наночастиц в качестве светосборщика уделяется меньше внимания [8–10].

Среди ЛНЧ наибольшее распространение в фотобиологии получили апконверсионные [11, 12], кремниевые [13] и углеродные [14, 15] наночастицы. Несмотря на проблематичность биосовместимости [16], существует большое количество работ, посвященных применению полупроводниковых наночастиц (квантовых точек, КТ) в качестве доноров энергии для ФС. Вопрос взаимосвязи спектральных и структурных свойств для КТ решен наиболее полно, что позволяет детально исследовать перенос энергии в ГК с их участием.

В обзоре рассмотрены особенности дизайна ГК на основе КТ и ФС с учетом механизма образования комплекса, стехиометрии комплекса и строения компонентов ГК, а также влияние этих параметров

на эффективность переноса энергии и генерации АФК в комплексах. Показано, что с увеличением соотношения компонентов комплекса ФС:ЛНЧ, несмотря на усиление переноса энергии, фотодинамические свойства ФС снижаются вследствие высокой локальной концентрации на поверхности наночастиц. Усиление люминесцентных свойств КТ за счет защитных оболочек может привести к уменьшению эффективности переноса энергии в ГК из-за увеличения расстояния между донором и акцептором энергии. На основе полученных закономерностей предложена методика, позволяющая целенаправленно синтезировать высокоэффективные ГК, имея целью максимальное усиление генерации активных форм кислорода фотосенсибилизатором в составе ГК. Выводы, сформулированные в работе, в значительной степени справедливы по отношению к ГК на основе ЛНЧ всех типов.

1. КОМПОНЕНТЫ ГИБРИДНОГО КОМПЛЕКСА

1.1. Тетрапиррольные фотосенсибилизаторы второго поколения

Высокоэффективный с точки зрения выхода АФК фотосенсибилизатор должен обладать следующими характеристиками. Во-первых, энергия его триплетного состояния должна быть достаточной для осуществления фотодинамической реакции с участием молекулярного кислорода; отбор ведется в направлении увеличения выхода триплетного состояния и его длительности. Во-вторых, ФС должен находиться в мономерном состоянии, поскольку агрегаты ФС не так эффективно генерируют АФК. В-третьих, ФС должен обладать большой поглощательной способностью, желательно в области «оптического окна» биологических тканей.

Очевидно, что фотодинамические свойства определяются строением молекулы ФС. Мы рассмотрим взаимосвязь структурных и фотофизических свойств ФС на примере красителей тетрапиррольной природы, наиболее распространенных ФС второго поколения.

Родоначальником тетрапиррольного ряда является порфин. Спектр поглощения порфина состоит из интенсивной полосы $Soret$ на границе УФ- и видимой области, а также четырех низкоинтенсивных узких полос в видимой области (Q_I-Q_{IV} ; нумерация начинается с длинноволновой). Существует несколько основных способов модификации структуры молекулы порфина, позволяющих получить ФС с высокой фотодинамической активностью (рис. 1А):

А) последовательное гидрирование двух двойных связей, которые формально не входят в сопряженную систему, вызывает смещение полосы Q_I в длин-

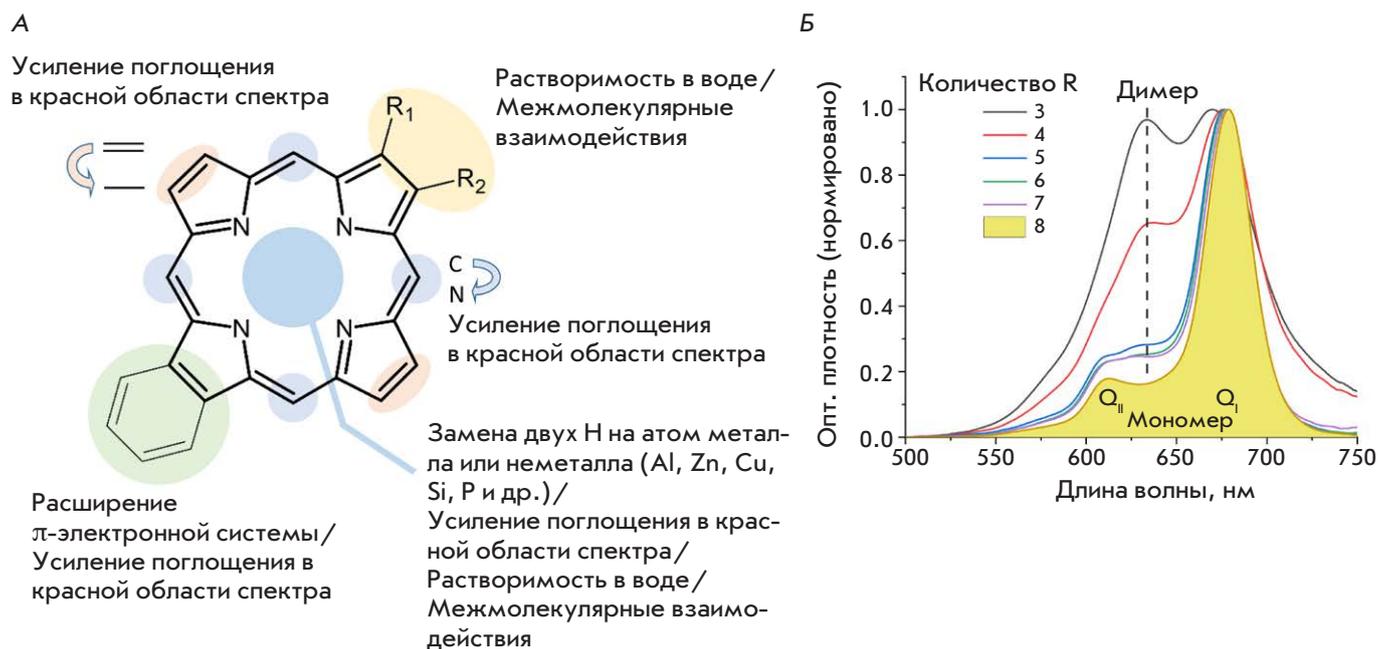


Рис. 1. А – структура молекулы порфина и возможные способы ее модификации. Б – спектры поглощения фталоцианинов цинка, модифицированных различным количеством холиновых групп R

новолновую область спектра (батохромный сдвиг) и увеличение ее интенсивности более чем на порядок. Гидрирование дает начало классам дигидропорфиринов (хлоринов) и тетрагидропорфиринов (бактериохлоринов);

Б) замена углерода в метинных группах СН на атом азота (тетразапорфирины) или включение бензольных колец в макроцикл молекулы красителя (тетрабензопорфирины) приводит к увеличению интенсивности полос Q_1 и Q_{III} , а также к их батохромному сдвигу. Наибольший эффект наблюдается при совмещении этих двух подходов, т.е. в классе тетразатетрабензопорфиринов или фталоцианинов (Фц);

В) координация макроциклом молекулы порфина различных элементов за счет неподеленных электронных пар центральных атомов азота. Для порфиринов наиболее типичны комплексы с двухвалентными металлами. Образование металлокомплекса приводит к вырождению четырех полос поглощения в видимой области спектра в две, интенсивность которых значительно увеличивается. Такая ситуация характерна для всех красителей порфиринового ряда, не имеющих гидрированных пиррольных колец. При встраивании атома металла в макроцикл Фц наблюдается незначительный батохромный сдвиг полос Q_1 и Q_{III} , причем величина батохромного сдвига возрастает с увеличением порядкового номера металла [17].

Модификация структуры порфиринов также изменяет характеристики возбужденного триплетного состояния. Так, при переходе от порфиринов к хлоринам выход возбужденного триплетного состояния несколько уменьшается [18]. Тяжелые и парамагнитные атомы металлов в составе Фц увеличивают вероятность синглет-триплетного перехода, поэтому такие Фц обладают высоким выходом возбужденного триплетного состояния [19]. Кроме того, увеличивается вероятность безызлучательной дезактивации в основное состояние за счет вовлечения *d*-оболочек металла в систему сопряжения [20]; соотношение между константами этих процессов определяется природой металла и боковых заместителей [21].

Растворимость ФС тетрапиррольного ряда в воде осуществляется путем включения на периферии макроцикла боковых заместителей. Обычно это низкомолекулярные лиганды, придающие молекуле полярность и/или заряд [22]. Максимальное количество боковых заместителей, которые могут быть введены в молекулу тетрапиррола, определяется количеством мест связывания на пиррольных (бензольных в случае бензопорфиринов) кольцах и равно восьми как для орто-, так и для мета-замещения [23]. Для кремниевых ФС (или комплексов ФС с трехвалентными металлами) доступно введение аксиальных лигандов [24]. Боковые заместители существенно влияют на оптические и фотофизические свойства ФС [17, 25, 26]. Широкий выбор заместителей с опре-

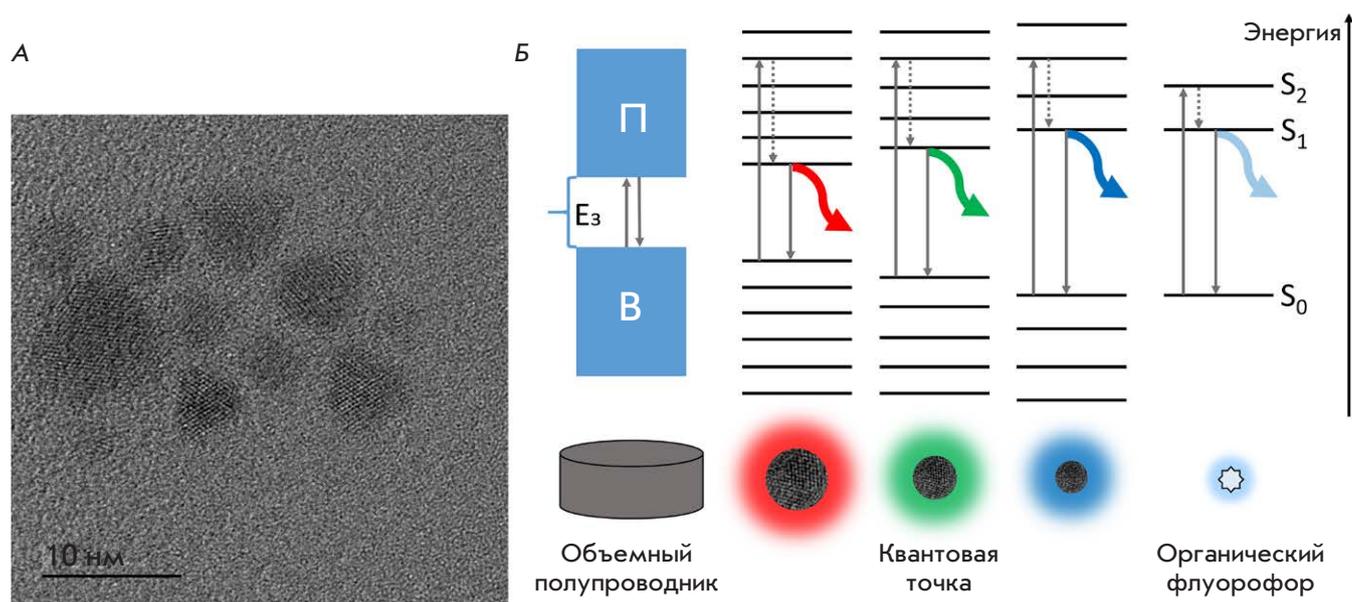


Рис. 2. А – электронная микрофотография наночастиц CdSe/ZnS. Б – энергетические спектры объемного и наноразмерного полупроводника в сравнении с энергетическим спектром органического флуорофора. П – зона проводимости, В – зона валентности, E_z – запрещенная зона, S_0 , S_1 и S_2 – основной, первый и второй возбужденный электронный уровень соответственно. Вертикальные стрелки обозначают электронные переходы, пунктирные стрелки – переход на нижний возбужденный уровень, сопровождающийся тепловой диссипацией энергии

деленными свойствами, а также возможность варьирования степени замещения позволяют создавать замещенные ФС для различных областей промышленности (катализаторы, сенсоры, элементы солнечных батарей) и медицины.

Несмотря на то что химическая модификация молекул ФС делает их более водорастворимыми, гидрофобная природа макроцикла определяет вероятность агрегации данных молекул в водных растворах. Доказано существование нескольких типов агрегатов тетрапирролов [27]. Агрегаты Н-типа (олигомерные) и D-типа (димерные) имеют узкую полосу поглощения в видимой области, смещенную в синюю область спектра по сравнению с полосой поглощения мономерной формы (рис. 1Б). Молекулы тетрапиррола в таких агрегатах образуют структуру типа «сэндвич»; агрегаты не флуоресцируют, так как возбужденное состояние дезактивируется безызлучательно за счет внутримолекулярной конверсии. Агрегаты J-типа (полимерные) имеют широкую полосу поглощения, смещенную в красную область спектра по сравнению с полосой поглощения мономерной формы; агрегаты образованы молекулами ФС, взаимодействующими торцевыми частями. Возможно одновременное существование молекул порфиринов в обеих формах (равновесие мономер/агрегат) во всех типах агрегатов, а также переходы между этими состояниями [28–30]. Агрегация может вызываться изменением ряда параметров внешней среды (рН и ионная сила раствора)

[31, 32], увеличением концентрации ФС [33], а также инициироваться образованием комплекса тетрапирролов с молекулами другой природы [34]. Вероятность агрегации также зависит от наличия и природы центрального атома металла в макроцикле ФС.

1.2. Коллоидные квантовые точки

Квантовые точки объединяют физические и химические свойства молекул с оптоэлектронными свойствами полупроводников. КТ представляет собой люминесцирующий полупроводниковый нанокристалл, характерные размеры которого находятся в диапазоне 3–10 нм (рис. 2А). Известно, что вследствие квантово-размерных эффектов свойства наноматериалов качественно отличаются от свойств объемного аналога [35]. Если размер объекта не превышает Борковский радиус экситона, характерный для данного материала, то носитель заряда внутри объекта оказывается в трехмерной потенциальной яме [36]. Это приводит к модификации энергетического спектра (рис. 2Б). Классический спектр полупроводника с валентной зоной, запрещенной зоной и зоной проводимости преобразуется в набор дискретных энергетических уровней с характерным зазором $h^2/8\pi^2mr^2$, где h – постоянная Планка, m – эффективная масса носителя заряда, а r – радиус КТ. Между этими уровнями возможны переходы электрона, сопровождающиеся поглощением или излучением кванта света в видимом диапазоне длин волн.

За счет поглощенной энергии электрон переходит на высокоэнергетический уровень, так что в кристалле КТ образуется экситон – электрон-«дырочная» пара. Дезактивация возбужденного состояния осуществляется путем рекомбинации экситона с излучением избыточной энергии и в виде кванта света.

Поскольку зазор между энергетическими уровнями КТ зависит от размера частицы, то при увеличении радиуса кристалла спектр люминесценции КТ испытывает батохромный сдвиг. Таким образом, варьируя размер кристалла, можно подобрать КТ с необходимыми спектральными свойствами для конкретных исследовательских задач.

Квантовые точки поглощают свет в широком диапазоне длин волн с коэффициентами молярной экстинкции порядка 10^5 – 10^6 л/моль·см. Это вызвало большой интерес к КТ как перспективным люминесцентным меткам для биологических исследований. Однако для успешного применения в биологии необходимо преодолеть два существенных недостатка КТ: низкий квантовый выход люминесценции (ϕ) и гидрофобность полупроводникового материала.

Основная причина низких значений ϕ – дефекты кристаллической решетки на поверхности нанокристалла, которые играют роль «ловушек» (англ. trap states) для носителя заряда [36]. Локализация носителя заряда в такой «ловушке» препятствует излучательной рекомбинации экситона. Говорят, что КТ переходит в так называемое «выключенное» состояние, которое у отдельного кристалла может составлять до 100 с [37].

Впервые количество дефектов на поверхности КТ снизили в 1990 году с помощью покрытия нанокристалла CdSe защитной оболочкой из ZnS [38]. Далее мы будем называть люминесцирующую центральную часть многослойной КТ ее ядром. Сульфид цинка также является полупроводником, но более широкозонным, что создает потенциальный барьер для носителя заряда и способствует локализации экситона в ядре КТ. Кроме того, защитная оболочка представляет собой физический барьер между ядром КТ и окружающей средой, что делает оптические свойства КТ менее чувствительными к химическим реакциям на ее поверхности. К 1996 году развитие методов покрытия ядра КТ защитной оболочкой обеспечило появление образцов относительно монодисперсных нанокристаллов с $\phi \sim 50\%$ [39]; современные методы синтеза КТ позволяют получить образцы нанокристаллов с $\phi \sim 80$ – 90% [40]. Нужно отметить, что величина ϕ нелинейно зависит от толщины защитной оболочки КТ: показано, что защитная оболочка, состоящая более чем из трех слоев ZnS, вызывает тушение люминесценции КТ с ядром CdSe [41]. Есть мнение, что с увеличением количества атомных

слоев в оболочке увеличивается вероятность образования собственных дефектов [42].

Кроме того, применение КТ в биологических исследованиях предполагает перевод гидрофобных нанокристаллов в водную фазу. Обычно для этого используют методы заместительной химии, когда молекулы-прекурсоры, покрывающие КТ в процессе их синтеза, заменяют на амфифильные лиганды с необходимыми свойствами.

Адсорбироваться на поверхность нанокристалла могут любые молекулы с нуклеофильными группами. Органическая оболочка может быть многослойной: на слой низкомолекулярных гидрофобных лигандов дополнительно адсорбируют амфифильный полимер, который и определяет поверхностные свойства КТ. Помимо водорастворимости, органическая оболочка в значительной степени обеспечивает пассивацию дефектов кристаллической решетки [43]. Однако органические лиганды могут покрывать не всю поверхность КТ, поэтому некоторые дефекты кристаллической решетки сохраняются [36]. Кроме того, лиганды могут служить причиной образования новых энергетических уровней: известно, что тиолы тушат люминесценцию КТ из CdSe вследствие появления энергетического уровня, лежащего ниже первого возбужденного уровня КТ [36].

Длительность люминесценции КТ составляет, как правило, 5–20 нс, что вполне достаточно для осуществления эффективного переноса энергии. Кинетика затухания люминесценции КТ характеризуется двумя-тремя временными компонентами. На данный момент отсутствует ясное понимание причин комплексности кинетики затухания люминесценции КТ [35]. Наиболее распространенная гипотеза связывает каждую временную компоненту с эмиссией из определенного энергетического состояния. Об этом свидетельствует сложная структура экситонного пика поглощения КТ [44]. В простейшем случае (биэкспоненциальная зависимость) быстрая компонента соответствует излучательной рекомбинации экситона, а более медленная – излучению, опосредованному дефектами кристаллической решетки [45, 46]. В этой модели спектр люминесценции КТ состоит из двух взаимно перекрывающихся полос, которые не всегда могут быть разделены. Вклад медленной компоненты падает с уменьшением температуры [45] и квантового выхода люминесценции [40]. В таком случае кинетика затухания люминесценции идеальных КТ без дефектов представляла бы собой моноэкспоненту; действительно, в некоторых образцах КТ обнаружена всего одна временная компонента [37, 47]. Чем больше различных дефектов в кристаллах (особенно у КТ со структурой ядро/оболочка), тем больше временных компонент в кинетике затухания люминесценции [39].

Альтернативной причиной появления нескольких временных компонент в кинетике затухания люминесценции КТ может быть полидисперсность частиц по размеру. Увеличение размера КТ приводит не только к батохромному сдвигу спектра люминесценции, но и к соответствующему сдвигу экситонной полосы в спектре поглощения [48], к уменьшению длительности люминесценции [49] и куполообразному по характеру изменению величины ϕ [50]. Следовательно, в образце, содержащем несколько фракций КТ разного размера, будет наблюдаться уширенный спектр люминесценции, являющийся суперпозицией спектров от разных фракций КТ, которые обладают собственными значениями квантового выхода и длительности люминесценции. Как правило, из-за сложности интерпретации временных компонент, в качестве длительности люминесценции КТ используют средневзвешенную величину по всем компонентам.

2. МЕХАНИЗМЫ КОМПЛЕКСООБРАЗОВАНИЯ

Создать гибридные комплексы ЛНЧ–ФС в водном растворе можно за счет следующих типов взаимодействий: электростатического, ковалентного или группы взаимодействий, объединяемых под понятием сорбции (рис. 3). При образовании связей любого из этих типов наблюдаются изменения спектральных свойств ФС; свойства ЛНЧ изменяются крайне редко и не связаны с самим процессом сборки ГК [51–53].

2.1. Электростатическое взаимодействие

ГК часто образуются при смешивании водных растворов ЛНЧ и ФС за счет электростатического притяжения разноименно заряженных компонентов (рис. 3, 1.1–1.2). Изменения спектральных свойств ФС в таком случае должны определяться возмущением электронной плотности и могут различаться по своему характеру в зависимости от природы и стехиометрического отношения компонентов ГК. Опубликованы сведения о следующих эффектах комплексообразования:

- 1) батохромный сдвиг спектров поглощения и/или флуоресценции ФС [54–59],
- 2) гипсохромный сдвиг спектров поглощения и флуоресценции ФС [52, 60–62],
- 3) гипохромизм [52, 56, 57, 60],
- 4) уменьшение квантового выхода флуоресценции [60, 62],
- 5) увеличение [60, 63] квантового выхода триплетного состояния,
- 6) увеличение [60, 62] времени жизни триплетного состояния.

Увеличение выхода триплетных состояний ФС обычно объясняют так называемым «эффек-

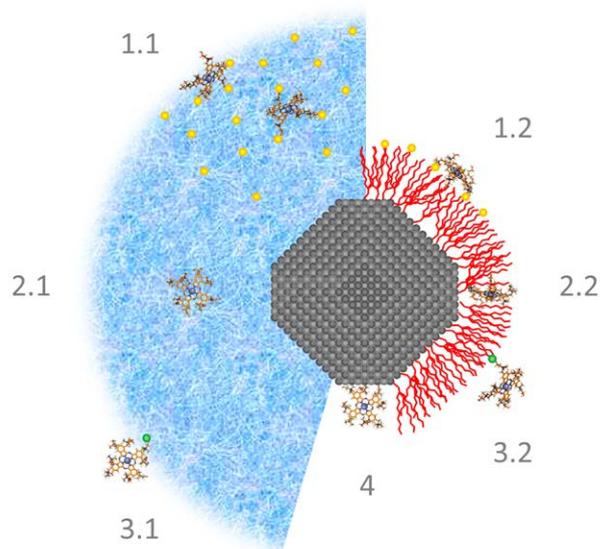


Рис. 3. Наиболее распространенные способы образования гибридного комплекса квантовая точка–фотосенсибилизатор. 1.1–1.2 – электростатическое взаимодействие, 2.1–2.2 – абсорбция и адсорбция, соответственно, 3.1–3.2 – ковалентное взаимодействие, 4 – координирование. Серым цветом показано кристаллическое ядро КТ, синим – полимерная оболочка, красным – оболочка из низкомолекулярных лигандов. Оранжевой точкой обозначены заряженные функциональные группы на полимере/лиганде, зеленой – ковалентная связь

том тяжелого атома». Эффект заключается в том, что в присутствии атомов тяжелых металлов (Cd, Te) увеличивается вероятность внутримолекулярной конверсии ФС в триплетное состояние, что приводит также к уменьшению квантового выхода флуоресценции ФС. В отдельных случаях при образовании ГК ион кадмия из КТ может встраиваться в макроцикл безметалльного ФС [62, 64]. Отмечено [65], что величина изменений оптических свойств ФС возрастает с увеличением размера кристалла КТ. Наличие защитной оболочки из сульфида цинка должно снижать влияние атомов тяжелых металлов в ядре КТ на свойства ФС.

2.2. Неспецифическая сорбция

ГК, образованные за счет электростатического притяжения разноименно заряженных наночастиц и фотосенсибилизаторов, не требуют сложных протоколов приготовления и являются достаточно устойчивыми. Однако замечено, что смешивание одноименно заряженных компонентов в некоторых случаях также приводит к образованию ГК [66–70]. Следовательно, в самосборке ГК могут участвовать

взаимодействия, отличные от электростатических, которые мы будем далее объединять под термином «сорбция».

В зависимости от строения органической оболочки КТ возможны два варианта сорбции ФС. Если поверхность КТ покрыта слоем низкомолекулярных лигандов, то молекулы ФС за счет периферических [64] или аксиальных [71–73] гидрофобных заместителей встраиваются в этот монослой. В таком случае речь идет о поверхностном связывании (адсорбции, *рис. 3, 2.2*). Взаимодействие такого рода ослабевает с ростом разветвленности заместителя [73]. Интересно, что эффективность переноса энергии сначала увеличивается с длиной заместителя в результате более прочного взаимодействия, однако далее снижается, если длина заместителя начинает превышать длину низкомолекулярного лиганда на поверхности КТ [72].

Частный случай адсорбции – прямое взаимодействие молекулы ФС с кристаллом КТ (*рис. 3, 4*). Можно считать доказанным образование координационной связи между третичным атомом азота в составе молекулы ФС и атомами кристаллической решетки CdSe/ZnS КТ в толуоле [74–78]. При этом необходим плотный контакт между ФС и кристаллом КТ, чему может препятствовать внешняя органическая оболочка наночастицы. В то же время образование координационной связи не должно сопровождаться обязательным вытеснением органических лигандов молекулой ФС, поскольку адсорбция может происходить на лишенных лигандов участках поверхности наночастицы. Молекула порфирина, очевидно, может адсорбироваться на КТ как плоскостью макроцикла с участием всех боковых пиридиловых колец, так и торцом с участием одного-двух пиридиловых заместителей. Об этом говорит повышение эффективности переноса энергии W в ГК с увеличением количества пиридиловых заместителей в молекуле порфирина с 1 до 4, но величина W оказывается сравнимой у монопиридилпорфирина и бипиридилпорфирина с противоположным расположением пиридиловых колец.

При образовании ГК наблюдали гипсохромное смещение спектра флуоресценции порфирина, а также увеличение длительности его флуоресценции [79]. По мнению авторов, выраженность эффектов уменьшалась с увеличением концентрации порфирина в растворе из-за увеличения доли молекул порфирина, не связанных с КТ. Кроме того, при образовании ГК наблюдали батохромное смещение полосы S_{0r} , которое, возможно, вызвано изменением структуры π -системы электронов при координации атома азота пиридила на атом цинка КТ, или более высокой диэлектрической проницаемостью среды вблизи по-

верхности наночастицы по сравнению с раствором толуола.

Возможность координационного взаимодействия предложена для объяснения образования ГК между отрицательно заряженной квантовой точкой из CdTe (покрытие из 3-меркаптопропионовой кислоты) и тетрасульфоталлоцианином алюминия, также несущим отрицательный заряд [80]. Предполагается, что молекула ФС координируется атомом алюминия на карбоксильную группу КТ. Идея была распространена на КТ из CdTe, покрытые тиогликолевой кислотой [81, 82].

Особый интерес представляют комплексы ФС с ЛНЧ, покрытыми полимерной оболочкой [70, 83–90]. Считается, что молекулы ФС в таких комплексах могут встраиваться в объем полимера, поэтому в данном случае речь идет об абсорбции (*рис. 3, 2.1*). Этот вывод сделан на том основании, что гидродинамический радиус ЛНЧ (вместе с полимерной оболочкой) превышает расстояние между донором и акцептором, необходимое для наблюдающегося эффективно переноса энергии по механизму FRET.

При образовании ГК за счет сорбции отмечали разнонаправленные изменения спектральных свойств ФС в зависимости от типа молекулы ФС [78, 85, 87, 89, 91, 92] или отсутствие каких-либо изменений, что связывают с адсорбцией, когда встраивание минимально [64]. При сорбции может наблюдаться агрегация молекул ФС [93].

Как правило, триплетный выход ФС растет при сорбции на ЛНЧ [67, 92] (однако не всегда [68]; в [91] наблюдали уменьшение времени жизни триплетного состояния ФС). Это может быть связано с тем, что при встраивании молекулы ФС внутрь органической оболочки КТ уменьшается вероятность тушения триплетного состояния ФС кислородом [78].

2.3. Ковалентное связывание

Комплексы наночастиц и ФС, полученные на основе ковалентного взаимодействия, имеют ряд преимуществ перед ГК, стабилизированными иными типами взаимодействий (*рис. 3, 3.1–3.2*). Во-первых, взаимодействие осуществляется между конкретными функциональными группами ФС и органической оболочки КТ, поэтому известна точная локализация ФС в ГК. Это позволяет предсказать некоторые фотофизические свойства ГК. Во-вторых, такой ГК потенциально более стабилен в присутствии биологических объектов и сред. Все это обусловило большой интерес к ковалентно сшитым ФС и наночастицам [53, 65, 94–100].

Образование ковалентной связи легко контролировать по появлению соответствующих линий в спектрах комбинационного рассеяния или в спектрах

поглощения в ИК-области [65, 94, 96]. В то же время при использовании распространенных методов сшивки сложно контролировать соотношение ФС:ЛНЧ в конечном продукте. Кроме того, в случае сшивки через amino- и карбоксильную группы возможно образование ГК электростатически взаимодействующих компонентов, которое сложно предотвратить. По этим причинам в ряде работ не удалось сравнить свойства ковалентно сшитого ГК и его электростатически стабилизированного аналога [94, 96, 98].

Более значимая проблема состоит в том, что линкер, образующийся между молекулой ФС и поверхностью ЛНЧ, дополнительно увеличивает расстояние между ними. Это отрицательно сказывается на эффективности переноса энергии, которая быстро снижается при увеличении расстояния между донором и акцептором энергии. Из рис. 3 видно, что при использовании полимерной оболочки влияние этого эффекта может быть критическим.

В большинстве работ изменения спектральных характеристик ФС при образовании ГК одинаковы для ковалентного и электростатического способов связывания: гипсохромный сдвиг спектра поглощения ФС и гипохромизм [94, 95, 97] или батохромный сдвиг спектра поглощения ФС и гипохромизм [98]. Отмечается отсутствие изменений спектральных свойств ФС при образовании ковалентной связи [96].

3. ОПТИМИЗАЦИЯ ДИЗАЙНА ГИБРИДНЫХ КОМПЛЕКСОВ

Создание гибридных комплексов на основе ЛНЧ подразумевает увеличение эффективности генерации АФК фотосенсибилизатором при возбуждении в тех областях спектра, где сам ФС обладает низкой поглощательной способностью. Поскольку такое усиление фотодинамических свойств ФС достигается за счет безызлучательного переноса энергии, оптимизацию дизайна ГК в первую очередь связывают с оптимизацией переноса энергии по механизму FRET. Однако нужно отметить, что набор свойств ГК, способствующих эффективному переносу энергии, вообще говоря, может не совпадать с набором свойств ГК, способствующим усилению фотодинамической активности ФС в составе ГК. По этой причине мы рассмотрим два указанных аспекта оптимизации ГК отдельно.

3.1. Эффективность переноса энергии

Так как перенос энергии приводит к увеличению скорости дезактивации возбужденного состояния донора энергии, степень тушения люминесценции ЛНЧ является основным критерием, позволяющим количественно оценить эффективность переноса.

Рассмотрим наиболее простую систему квантовая точка–тетрапиррольный ФС, стабилизирован-

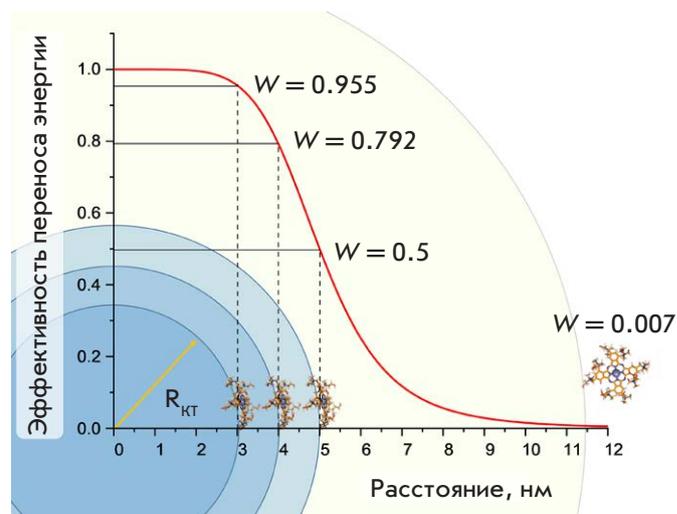


Рис. 4. Зависимость эффективности переноса энергии W в ГК от размера $R_{КТ}$ ядра квантовой точки (при условии возможности образования координационной связи непосредственно между молекулой ФС и ядром КТ). Значение радиуса Ферстера (R_0) выбрано равным 5 нм. Показан пример ГК с ковалентно пришитым к полимерной оболочке КТ фотосенсибилизатором (общий радиус КТ 11.5 нм)

ную за счет координации ФС на поверхность нанокристалла. Предметом оптимизации будет перенос энергии, способствующий увеличению поглощательной способности ФС в сине-зеленой области спектра. Согласно теории безызлучательного индуктивно-резонансного переноса энергии, эффективность этого процесса (W) может быть увеличена за счет:

- А) увеличения интеграла перекрытия (J) спектров люминесценции ЛНЧ и поглощения ФС;
- Б) увеличения квантового выхода люминесценции ЛНЧ;
- В) уменьшения расстояния ЛНЧ–ФС;
- Г) увеличения коэффициента молярной экстинкции молекулы ФС;
- Д) увеличения стехиометрического отношения ФС:ЛНЧ.

Увеличить величину J можно путем смещения спектра люминесценции КТ в более длинноволновую область ближе к спектру поглощения ФС. Поскольку положение спектра люминесценции КТ легко задается в процессе их синтеза, при фиксированном положении спектра поглощения ФС легко подобрать КТ, обеспечивающую максимальное значение величины J . Однако батохромный сдвиг спектра люминесценции КТ происходит за счет увеличения размера частицы, что приводит к увеличению расстояния КТ–ФС и уменьшению эффективности переноса энергии W (рис. 4). Как правило, это сопровождается уменьшением квантового выхода

люминесценции КТ, что также должно отрицательно сказаться на величине W . Хотя квантовый выход люминесценции КТ можно увеличить за счет наращивания оболочки из более широкозонного полупроводника, такая модификация приведет не только к увеличению выхода люминесценции, но и к дополнительному росту размера кристалла и, соответственно, увеличению расстояния донор-акцептор энергии. Альтернативный способ заключается в подборе материалов кристаллической решетки ядра КТ. Наличие же на КТ органической оболочки, с одной стороны, экранирует поверхность кристалла от молекул растворителя, поэтому выход люминесценции КТ должен увеличиться; с другой стороны, в зависимости от природы молекул органической оболочки на поверхности кристалла могут образоваться дополнительные дефекты, и квантовый выход люминесценции уменьшится.

Возможно увеличение величины J за счет гипсохромного смещения спектра поглощения ФС, так как в этом случае для создания ГК можно использовать КТ меньшего размера. Действительно, уменьшение размера КТ приведет к увеличению квантового выхода люминесценции КТ и уменьшению расстояния КТ-ФС, что увеличит значение W . Однако применение подобной стратегии означает, что красная область спектра не будет использоваться для генерации АФК. Кроме того, в предельном случае смещения спектров в синюю область отпадает необходимость использования КТ, так как многие безметалльные ФС очень хорошо поглощают синий свет за счет полосы S_{0e} .

Таким образом, сложные системы на основе КТ обладают рядом параметров, которые нельзя оптимизировать одновременно вследствие их взаимоисключающего влияния друг на друга. Следовательно, добиться наибольшей эффективности переноса энергии можно только за счет компромиссных значений параметров ФС и КТ.

Однозначно увеличивает величину W изменение только двух параметров – увеличение коэффициента молярной экстинкции ФС и стехиометрического отношения ФС:ЛНЧ.

Коэффициент молярной экстинкции ФС в видимой области спектра обычно увеличивают путем введения в макроцикл атома металла. Поскольку при образовании металлокомплекса существенно увеличивается время жизни триплетного состояния ФС, то это дополнительно способствует усилению фотодинамической активности ФС. Альтернативные пути увеличения коэффициента молярной экстинкции ФС – замена углерода на азот в метинных мостиках макроцикла, увеличение ароматичности макроцикла за счет бензольных колец и гидрирование двой-

ных связей – приводят еще и к дополнительному батохромному смещению спектра поглощения ФС. Следовательно, для сохранения максимальной величины интеграла перекрытия J необходимо дополнительно сдвинуть спектр люминесценции КТ в длинноволновую область. Эффекты, вызванные таким смещением, могут привести к уменьшению эффективности переноса энергии в ГК.

Стехиометрическое отношение ФС:ЛНЧ можно увеличивать до некоего предельного значения, которое зависит от способа комплексообразования. Если ГК стабилизирован за счет ковалентной сшивки, то $[ФС:ЛНЧ]_{max}$ определяется количеством функциональных групп на органической оболочке КТ (т.е. их плотностью и площадью поверхности КТ). Если ГК стабилизирован за счет электростатических взаимодействий, то $[ФС:ЛНЧ]_{max}$ определяется количеством заряженных групп на органической оболочке КТ, а также количеством заряженных групп на молекуле ФС. Уже здесь появляется неоднозначность: чем больше зарядов на ФС, тем прочнее взаимодействие, но в то же время на поверхности КТ поместится меньше молекул ФС.

Если ГК стабилизирован за счет сорбционных взаимодействий, то $[ФС:ЛНЧ]_{max}$ определяется площадью поверхности ЛНЧ, а также гидрофильно-гидрофобным балансом молекулы ФС. В случае объемной полимерной оболочки наночастицы $[ФС:ЛНЧ]_{max}$ будет намного больше, чем при использовании монослоя из низкомолекулярных лигандов; однако дополнительные молекулы ФС будут находиться достаточно далеко от центра КТ, так что эффективность переноса энергии на эти молекулы ФС будет минимальной. На рис. 4 представлена ситуация, где ФС ковалентно пришит к полимерной оболочке КТ; видно, что при общем радиусе наночастицы 11.5 нм и величине $R_0 = 5$ нм эффективность переноса энергии на данную молекулу ФС составит не более 0.7%.

Теоретически, к росту эффективности переноса энергии может привести увеличение значения фактора χ^2 , описывающего взаимную ориентацию в пространстве дипольных моментов переходов донора и акцептора. Значения χ^2 могут изменяться в пределах от 0 до 4. В растворах, где вследствие вращательной диффузии ориентация молекул случайна, χ^2 принимают равным 2/3. Так поступают и в случае ГК, поскольку большая часть КТ не обладает анизотропией люминесценции. Тем не менее, в общем случае ориентация моментов переходов в ГК может отличаться от случайной. Предполагается, что исследование анизотропии флуоресценции ФС и ЛНЧ может помочь оценить возможные взаимные ориентации дипольных моментов переходов и тем самым уточнить значение χ^2 [101].

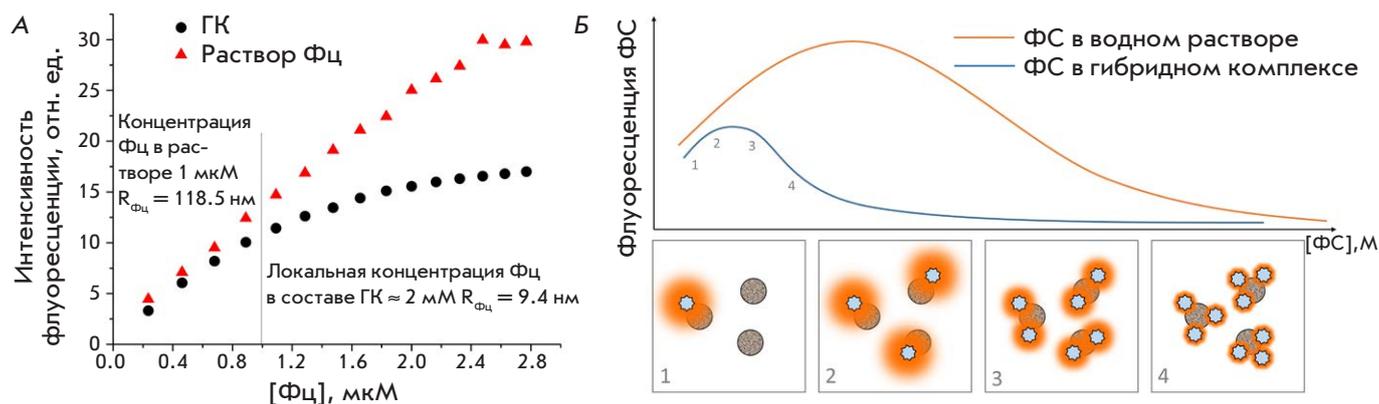


Рис. 5. А – концентрационное изменение интенсивности флуоресценции алюминиевого Фц в водном растворе и в электростатически стабилизированном комплексе с покрытой полимером КТ. $R_{\text{Фц}}$ – расстояние между двумя молекулами Фц в среде (вода в случае однокомпонентного раствора Фц и полимерная оболочка КТ в случае раствора ГК). Длина волны возбуждения флуоресценции 655 нм. Б – зависимость интенсивности флуоресценции Фс в воде и в ГК от концентрации Фс (концентрация ЛНЧ постоянна). 1–4 – схематичное изображение ГК различной стехиометрии и интенсивности флуоресценции Фс в таких ГК

3.2. Фотодинамические свойства фотосенсибилизатора

Успешный акт переноса энергии вызывает переход молекулы ФС в возбужденное состояние. Следствием переноса энергии может быть увеличение выхода АФК или увеличение интенсивности флуоресценции ФС. Увеличение поглощательной способности ФС, выражающееся в виде роста интенсивности его сенсibilизированной флуоресценции, может использоваться для расчета эффективности переноса энергии W [58, 75, 82]. Однако более корректным считается использование спектральных характеристик донора энергии для расчета величины W , так как усиление фотодинамических свойств ФС в ГК сильно зависит от стехиометрического отношения ФС:ЛНЧ.

Известно, что в разбавленном растворе при увеличении концентрации ФС интенсивность его флуоресценции сначала линейно возрастает, однако в достаточно концентрированных растворах сначала выходит на плато, а затем снижается (рис. 5) [102]. Этот эффект можно назвать самотушением флуоресценции ФС. К самотушению флуоресценции ФС может приводить агрегация ФС и эффекты внутреннего фильтра. Агрегация ФС рассмотрена в разделе 1.1. Эффекты внутреннего фильтра заключаются в экранировании возбуждающего света слоями раствора ФС, которые находятся ближе к передней стенке кюветы (1), и перепоглощении флуоресценции (2). Последнее возможно, так как тетрапиррольные ФС обладают небольшим стоксовым сдвигом (~ 10 нм), так что спектры поглощения и флуоресценции ФС в значительной мере перекрываются. Помимо куполообразной зависимости интенсивности флуоресценции ФС от его концентрации, это явление приводит

к bathochromному сдвигу спектра флуоресценции ФС и увеличению регистрируемой длительности флуоресценции ФС [103].

Тушение флуоресценции ФС в присутствии наночастиц является широко распространенным эффектом [55, 104–106]. Концентрационная зависимость интенсивности флуоресценции ФС в ГК с полупроводниковыми наночастицами также носит куполообразный характер [59, 70, 71, 87], однако самотушение начинается при намного меньшей концентрации ФС по сравнению с ФС в однокомпонентном растворе (рис. 5А). Действительно, максимальное значение величины ФС:ЛНЧ в ГК может превышать 1000, так что при образовании комплекса локальная концентрация ФС может достигать единиц мМ [90].

Увеличение соотношения ФС:ЛНЧ может привести к агрегации ФС в органической оболочке ЛНЧ. Такой эффект наблюдается при любом типе взаимодействия ФС с ЛНЧ, кроме ковалентной сшивки. Любой ФС в растворе находится в состоянии динамического равновесия мономер–агрегаты, которое может быть сдвинуто в сторону образования агрегатов. Вероятность этого процесса зависит как от структурных свойств молекулы ФС (тип атома металла, природа и число периферических заместителей), так и от особенностей строения органической оболочки ЛНЧ. Так, нами показано, что цинковые и алюминиевые Фц, несмотря на наличие восьми периферийных карбоксильных групп, агрегируют при связывании с апконверсионными ЛНЧ, покрытыми полимерной оболочкой с концевыми аминогруппами, причем цинковые Фц подвергаются агрегации при более низких концентрациях, чем алюминиевые Фц [107]. При этом агрегаты ФС продолжают акцеп-

тировать энергию электронного возбуждения ЛНЧ, причем эффективность этого процесса возрастает за счет большего перекрытия спектра поглощения агрегатов со спектром люминесценции ЛНЧ.

Кроме того, концентрирование ФС из раствора на поверхность ЛНЧ приводит к «просветлению» раствора в области поглощения ФС. В таком случае, фотодинамическая активность ФС в ГК дополнительно снижается вследствие экранирования части молекул ФС.

Представим, что количество молекул ФС на поверхности ЛНЧ может бесконечно возрастать без увеличения среднего расстояния ФС–ЛНЧ, равного радиусу Ферстера R_0 . Согласно теории Ферстера, при $\text{ФС:ЛНЧ} = x = 1$ на расстоянии R_0 эффективность переноса энергии W равна 50%. При $x = 10$ значение $W = 91\%$; при $x = 100$ значение $W = 99\%$; при $x = 1000$ значение $W = 99.9\%$. Видно, что наибольший прирост величины W наблюдается при увеличении ФС:ЛНЧ от 1 до 10, что намного меньше характерных величин $[\text{ФС:ЛНЧ}]_{\text{max}}$. Можно сказать, что с увеличением количества молекул ФС в составе ГК абсолютная эффективность переноса энергии W возрастает, в то время как удельная эффективность W (в перерасчете на одну молекулу ФС) снижается.

Следовательно, чем больше молекул ФС находится в комплексе с ЛНЧ, тем меньше каждая из них получает дополнительной энергии и потому усиление фотодинамических свойств ФС стремится к нулю, а фотодинамическая активность ФС в составе ГК при больших отношениях ФС:ЛНЧ оказывается ниже активности свободного ФС вследствие эффектов самотушения.

Наконец, использование некоторых типов оболочек ЛНЧ может привести к тому, что АФК, образовавшиеся в результате реакции ФС с молекулярным кислородом внутри органической оболочки ЛНЧ, не смогут эффективно повреждать мишени в окружающем ГК растворе, так как диффузия в оболочке ЛНЧ затруднена. В таком случае наиболее вероятной мишенью окисления окажется непосредственно молекула ФС. Действительно, в электростатически стабилизированных ГК на основе фталоцианинов алюминия и КТ, покрытых полимерной оболочкой, мы наблюдали быстрое выцветание красителя как при селективном освещении ФЦ, так и при возбуждении КТ с последующим переносом энергии [108]. В результате измеряемое количество АФК оказывается меньше реального. Хотя такое расчетное значение концентрации АФК является по сути «кажущимся», именно оно соответствует эффективной концентрации АФК, способных проявлять фотодинамическую активность вне гибридного комплекса.

Таким образом, увеличение эффективности переноса энергии в ГК за счет увеличения величины ФС:ЛНЧ в известной степени противоречит идее усиления фотодинамической активности ФС.

Нужно отметить, что результатом взаимодействия ФС и ЛНЧ может стать перенос электрона. Это явление наблюдается достаточно редко и легко обнаруживается по сильным изменениям спектральных свойств ФС вследствие образования анион-радикалов и других производных [63, 109]. Кроме того, перенос электрона означает переход КТ в «выключенное» состояние, когда уместна модель классического статического тушения. В таком случае происходит тушение интенсивности люминесценции КТ без изменения ее длительности. К сожалению, длительность люминесценции ЛНЧ оценивали лишь в некоторых работах, и отсутствие такой оценки может привести к неверной интерпретации результатов эксперимента [52, 56].

ВЫВОДЫ И ДАЛЬНЕЙШИЕ ПЕРСПЕКТИВЫ

Все выявленные функциональные связи между структурными и спектральными свойствами ФС и ЛНЧ, способными оказать влияние на эффективность работы ЛНЧ в качестве светосборщика, и усиление фотодинамической активности ФС в составе ГК можно свести в единую схему, представленную на рис. 6. Видно, что все главные характеристики ФС и ЛНЧ взаимосвязаны между собой, поэтому полный набор параметров, оптимизированный по наибольшему выходу АФК, должен представлять собой некий компромисс.

Поиск этого компромисса представляет первоочередную задачу для ФДТ на пути создания ФС третьего поколения. Однако полученные данные, несмотря на внушительное количество работ, посвященных ГК, слишком обрывочны и разнородны, что не позволяет провести глобальный анализ и подобрать требуемый набор характеристик ГК. Это возможно только при комплексном подходе, когда все связи, показанные на рис. 6, можно будет выявить как количественные зависимости. Поскольку большинство из указанных параметров связаны известными формулами теории FRET, затруднение возникает только на этапе выявления связи структурных и фотофизических характеристик компонентов ГК. В первую очередь, это касается ЛНЧ, поскольку взаимосвязь структурных и спектральных свойств тетрапиррольных ФС изучена более полно.

Однако для оптимизации дизайна ГК недостаточно обладать информацией о свойствах каждого компонента. Такие явления, как агрегация ФС, статическое тушение люминесценции ЛНЧ в результате образования дефектов поверхности нанокристалла

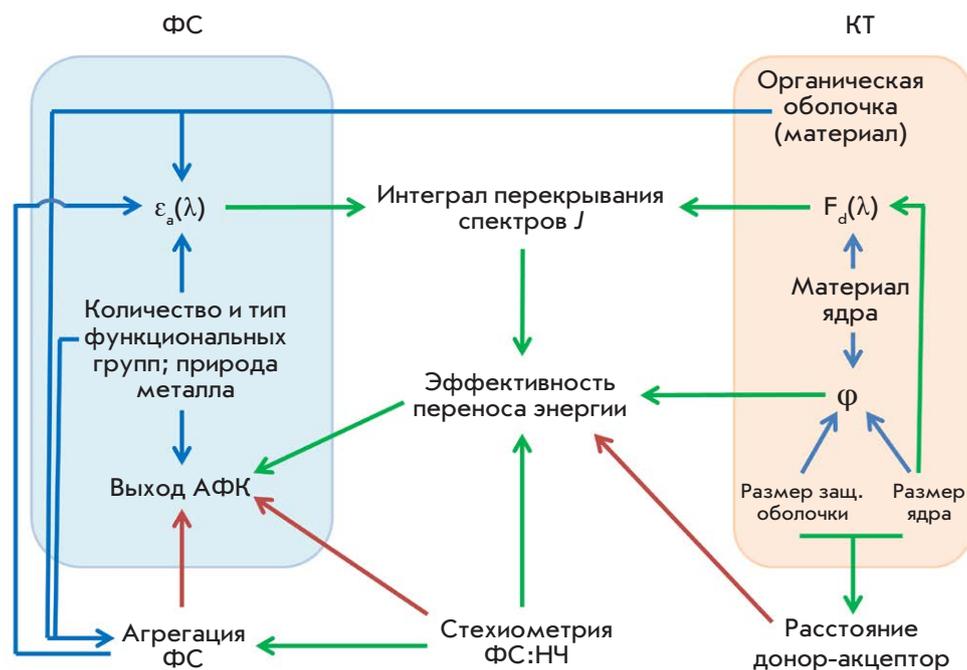


Рис. 6. Схема функциональных связей между параметрами структуры молекул ФС / КТ и их фотофизическими свойствами, а также влиянием этих свойств на выход активных форм кислорода через параметры переноса энергии по механизму FRET. $F_d(\lambda)$ – спектр люминесценции КТ, $\epsilon_a(\lambda)$ – спектр поглощения ФС, ϕ – квантовый выход люминесценции. Зеленые стрелки обозначают положительную корреляцию между параметрами, красные – отрицательную корреляцию, синие – наличие корреляции сложного типа

с участием ФС, могут быть количественно изучены только при образовании ГК. Также нужно отметить, что возмущение электронной плотности в молекуле ФС при образовании ГК (даже при отсутствии описанных выше эффектов агрегации и тушения) оказывает некоторое влияние на фотофизические свойства ФС и тем самым косвенно влияет на эффективность переноса энергии и усиление выхода АФК. Отсутствие учета любого из описанных выше параметров приводит к тому, что даже при наличии ФС и ЛНЧ с оптимальными для FRET спектральными характеристиками далеко не всегда удастся получить ГК, в котором наблюдается усиление флуоресценции ФС или скорости генерации им АФК [87, 98, 104–106]. Обычно это приводит к отказу от механизма FRET в качестве модели для описания взаимодействий наночастицы и ФС [51, 56, 91, 93, 110].

Вероятно, в результате оптимизации дизайна ГК можно найти несколько вариантов комплексов, значительно отличающихся набором внутренних характеристик, но имеющих сопоставимые значения выхода АФК (или сопоставимых по эффективности использования определенных областей спектра для генерации АФК). Поскольку усиление фотодинамических характеристик ФС возможно только при низких значениях ФС:ЛНЧ, когда люминесценция ЛНЧ потушена не полностью, то люминесценцию ЛНЧ можно использовать в диагностических целях.

Очевидно, такие ГК могут применяться для решения конкретных задач ФДТ и флуоресцентной диагностики в зависимости от свойств объекта-мишени. В связи с этим необходимо сказать, что направления оптимизации дизайна ГК рассмотрены нами исключительно в аспекте усиления выхода АФК. На самом деле итоговая фотодинамическая активность будет зависеть не только от поглощательной способности ГК и выхода АФК, но и от эффективности взаимодействия ГК с клетками, механизма интернализации, стабильности ГК в присутствии компонентов крови при введении препарата на основе ГК в кровеносную систему. Весьма вероятно, что подходы к оптимизации ГК с целью увеличения эффективности направленной доставки значительно повлияют на итоговый набор параметров ГК. Следовательно, схема, представленная на рис. 6, должна быть расширена с учетом всех аспектов функциональной активности ГК как фотосенсибилизатора третьего поколения. Составление полной схемы такого рода позволит вывести оценку перспективы использования ГК с переносом энергии в ФДТ на качественно новый уровень и потому является главной задачей современной медицинской биофизики. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-70042.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bissonnette L., Bergeron M.G. // *Expert Rev. Mol. Diagn.* 2006. V. 6. № 3. P. 433–450.
2. Kelkar S.S., Reineke T.M. // *Bioconjug. Chem.* 2011. V. 22. № 10. P. 1879–1903.
3. Frochot C., Mordon S. // *J. Porphyr. Phthalocyanines*. 2019. V. 23. № 04–05. P. 347–357.
4. Lucky S.S., Soo K.C., Zhang Y. // *Chem. Rev.* 2015. V. 115. № 4. P. 1990–2042.
5. Sobolev A.S. // *Acta Naturae*. 2020. V. 12. № 4. P. 47–56.
6. Sokolov A.V., Kostin N.N., Ovchinnikova L.A., Lomakin Y.A., Kudriaeva A.A., Shemyakin M.M., Ovchinnikov Yu.A. // *Acta Naturae*. 2019. V. 11. № 2. P. 28–41.
7. Zdobnova T.A., Lebedenko E.N., Deyev S.M. // *Acta Naturae*. 2011. V. 3. № 1. P. 29–47.
8. Wang X., Valiev R.R., Ohulchanskyi T.Y., Ågren H., Yang C., Chen G. // *Chem. Soc. Rev.* 2017. V. 46. № 14. P. 4150–4167.
9. Martynenko I.V., Litvin A.P., Purcell-Milton F., Baranov A.V., Fedorov A.V., Gun'ko Y.K. // *J. Mater. Chem. B. Royal Soc. Chem.* 2017. V. 5. № 33. P. 6701–6727.
10. Algar W.R., Krull U.J. // *Anal. Bioanal. Chem.* 2008. V. 391. № 5. P. 1609–1618.
11. 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. Nat. Publ. Group*. 2016. V. 6. P. 35103.
12. Su Q., Feng W., Yang D., Li F. // *Acc. Chem. Res.* 2017. V. 50. № 1. P. 32–40.
13. Couleaud P., Morosini V., Frochot C., Richeter S., Raehm L., Durand J.-O. // *Nanoscale*. 2010. V. 2. № 7. P. 1083–1095.
14. Li Y., Bai G., Zeng S., Hao J. // *ACS Appl. Mater. Interfaces*. 2019. V. 11. № 5. P. 4737–4744.
15. Gao G., Guo Q., Zhi J. // *Small*. 2019. V. 15. № 48. P. 1902238.
16. Filali S., Pirot F., Miossec P. // *Trends Biotechnol.* 2020. V. 38. № 2. P. 163–177.
17. Гуринович Г.П., Севченко А.И., Соловьев К.Н. // *Успехи физических наук*. 1963. Т. 79. № 2. С. 173–234.
18. Bautista-Sanchez A., Kasselouri A., Desroches M.C., Blais J., Maillard P., de Oliveira D.M., Tedesco A.C., Prognon P., Delaire J. // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2005. V. 81. № 3. P. 154–162.
19. Idowu M., Nyokong T. // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2008. V. 200. № 2–3. P. 396–401.
20. Gonçalves P.J., De Boni L., Borissevitch I.E., Zílio S.C. // *J. Phys. Chem. A*. 2008. V. 112. № 29. P. 6522–6526.
21. Ogunsipe A., Nyokong T. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2005. V. 4. № 7. P. 510–516.
22. Kuznetsova N.A., Gretsova N.S., Derkacheva V.M., Mikhalenko S.A., Solov'eva L.I., Yuzhakova O.A., Kaliya O.L., Luk'yanets E.A. // *Russ. J. Gen. Chem.* 2002. V. 72. № 2. P. 300–306.
23. Çakır D., Göksel M., Çakır V., Durmuş M., Biyiklioglu Z., Kantekin H. // *Dalt. Trans.* 2015. V. 44. № 20. P. 9646–9658.
24. Oleinick N.L., Antunez A.R., Clay M.E., Rihter B.D., Kenney M.E. // *Photochem. Photobiol.* 1993. V. 57. № 2. P. 242–247.
25. Bonnett R., Charlamides A.A., Land E.J., Sinclair R.S., Tait D., Truscott T.G. // *J. Chem. Soc. Faraday Trans. 1 Phys. Chem. Condens. Phases*. 1980. V. 76. P. 852–859.
26. Wróbel D., Boguta A. // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2002. V. 150. № 1–3. P. 67–76.
27. Kadish K.M., Smith K.M., Guillard R. *The Porphyrin Handbook*. San Diego: Acad. Press, 2003.
28. Gonçalves P.J., Corrêa D.S., Franzen P.L., De Boni L., Almeida L.M., Mendonça C.R., Borissevitch I.E., Zílio S.C. // *Spectrochim. Acta – Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2013. V. 112. P. 309–317.
29. Maiti N.C., Mazumdar S., Periasamy N. // *J. Phys. Chem. B*. 1998. V. 102. № 9. P. 1528–1538.
30. Gandini S.C.M., Yushmanov V.E., Borissevitch I.E., Tabak M. // *Langmuir*. 1999. V. 15. № 9. P. 6233–6243.
31. Kaliya O.L., Kuznetsova N.A., Bulgakov R.A., Solovyova L.I., Shevchenko E.N., Slivka L.K., Lukyanets E.A. // *Macroheterocycles*. 2016. V. 9. № 2. P. 186–192.
32. Suchan A., Nackiewicz J., Hnatejko Z., Waclawek W., Lis S. // *CHEMIK*. 2014. V. 68. № 4. P. 369–376.
33. Suchan A., Nackiewicz J., Hnatejko Z., Waclawek W., Lis S. // *Dye. Pigment*. 2009. V. 80. № 2. P. 239–244.
34. Gandini S.C.M., Yushmanov V.E., Perussi J.R., Tabak M., Borissevitch I.E. // *J. Inorg. Biochem.* 1999. V. 73. № 1–2. P. 35–40.
35. Олейников В.А., Суханова А.В., Набиев И.Р. // *Рос. нанотехнологии*. 2007. Т. 2. № 1–2. С. 160–173.
36. Kim J.Y., Voznyy O., Zhitomirsky D., Sargent E.H. // *Adv. Mater.* 2013. № 25. P. 4986–5010.
37. Lane L.A., Smith A.M., Lian T., Nie S. // *J. Phys. Chem. B*. 2014. V. 118. № 49. P. 14140–14147.
38. Kortan A.R., Opila R.L., Bawendi M.G., Steigerwald M.L., Carroll P.J., Brus L.E. // *J. Am. Chem. Soc.* 1990. V. 112. № 4. P. 1327–1332.
39. Hines M.A., Guyot-Sionnest P. // *J. Phys. Chem.* 1996. V. 100. № 2. P. 468–471.
40. Wang X., Qu L., Zhang J., Peng X., Xiao M. // *Nano Lett.* 2003. V. 3. № 8. P. 1103–1106.
41. Grabolle M., Ziegler J., Merkulov A., Nann T., Resch-Genger U. // *Ann. N. Y. Acad. Sci.* 2008. V. 1130. P. 235–241.
42. Dabbousi B.O., Rodriguez-Viejo J., Mikulec F.V., Heine J.R., Mattoussi H., Ober R., Jensen K.F., Bawendi M.G. // *J. Phys. Chem. B*. 1997. V. 101. № 46. P. 9463–9475.
43. Hohng S., Ha T. // *J. Am. Chem. Soc.* 2004. V. 126. № 5. P. 1324–1325.
44. Kapitonov A.M., Stupak A.P., Gaponenko S.V., Petrov E.P., Rogach A.L., Eychmüller A. // *J. Phys. Chem. B*. 1999. V. 103. № 46. P. 10109–10113.
45. Bawendi M.G., Carroll P.J., Wilson W.L., Brus L.E. // *J. Chem. Phys.* 1992. V. 96. № 2. P. 946–954.
46. An L., Chao K., Zeng Q., Han X., Yuan Z., Xie F., Fu X., An W. // *J. Nanosci. Nanotechnol.* 2013. V. 13. P. 1368–1371.
47. Wuister S.F., Swart I., van Driel F., Hickey S.G., Donega C. De Mello // *Nano Lett.* 2003. V. 3. № 4. P. 503–507.
48. Yu W.W., Qu L., Guo W., Peng X. // *Chem. Mater.* 2003. V. 15. № 14. P. 2854–2860.
49. Hong M., Guo-Hong M., Wen-Jun W., Xue-Xi G., Hong-Liang M. // *Chinese Phys. B*. 2008. V. 17. № 4. P. 1280.
50. Qu L., Peng X. // *J. Am. Chem. Soc.* 2002. V. 124. № 9. P. 2049–2055.
51. Zhang X., Liu Z., Ma L., Hossu M., Chen W. // *Nanotechnology*. 2011. V. 22. P. 195501.
52. Moeno S., Idowu M., Nyokong T. // *Inorganica Chim. Acta*. 2008. V. 361. № 9–10. P. 2950–2956.
53. Adegoke O., Khene S., Nyokong T. // *J. Fluoresc.* 2013. V. 23. № 5. P. 963–974.
54. Viana O.S., Ribeiro M.S., Rodas A.C.D., Rebouças J.S., Fontes A., Santos B.S. // *Molecules*. 2015. V. 20. № 5. P. 8893–8912.
55. Rotomskis R., Valanciunaite J., Skripka A., Steponkiene S., Spogis G., Bagdonas S., Streckyte G. // *Lith. J. Phys.* 2013. V. 53. № 1. P. 57–68.
56. Keane P.M., Gallagher S.A., Magno L.M., Leising M.J., Clark I.P., Greeham G.M., Towrie M., Gun'ko Y.K., Kelly J.M., Quinn S.J. // *Dalt. Trans.* 2012. V. 41. № 42. P. 13159.
57. Vaishnavi E., Renganathan R. // *Analyst*. 2014. V. 139. № 1.

- P. 225–234.
58. Martynenko I.V., Kuznetsova V.A., Orlova A.O., Kanaev P.A., Maslov V.G., Loudon A., Zaharov V., Parfenov P., Gun'ko Y.K., Baranov A.V., et al. // *Nanotechnology*. IOP Publ. 2015. V. 26. № 5. P. 055102.
 59. Martynenko I.V., Kuznetsova V.A., Orlova A.O., Kanaev P.A., Gromova Y., Maslov V.G., Baranov A.V., Fedorov A. // *Proc. SPIE*. 2014. V. 9126. P. 91263C.
 60. Idowu M., Chen J.Y., Nyokong T. // *New J. Chem.* 2008. V. 32. № 2. P. 290–296.
 61. Duong H.D., Rhee J.I. // *Chem. Phys. Lett.* 2011. V. 501. № 4–6. P. 496–501.
 62. Ahmed G.H., Aly S.M., Usman A., Eita M.S., Melnikov V.A., Mohammed O.F. // *Chem. Commun. Royal Soc. Chem.* 2015. V. 51. № 38. P. 8010–8013.
 63. Moeno S., Nyokong T. // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2009. V. 201. № 2–3. P. 228–236.
 64. Chambrier I., Banerjee C., Remiro-Buenamañana S., Chao Y., Cammidge A.N., Bochmann M. // *Inorg. Chem.* 2015. V. 54. № 15. P. 7368–7380.
 65. Tshangana C., Nyokong T. // *Spectrochim. Acta – Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2015. V. 151. P. 397–404.
 66. Moeno S., Antunes E., Khene S., Litwinski C., Nyokong T. // *Dalt. Trans.* 2010. V. 39. P. 3460–3471.
 67. Moeno S., Antunes E., Nyokong T. // *J. Photochem. Photobiol. A Chem. Elsevier B.V.*, 2011. V. 218. № 1. P. 101–110.
 68. Moeno S., Nyokong T. // *Polyhedron*. 2008. V. 27. № 8. P. 1953–1958.
 69. Jhonsi M.A., Renganathan R. // *J. Colloid Interface Sci.* 2010. V. 344. № 2. P. 596–602.
 70. Skripka A., Dapkute D., Valanciunaite J., Karabanovas V., Rotomskis R. // *Nanomaterials*. 2019. V. 9. № 1. P. 9.
 71. Dayal S., Królicki R., Lou Y., Qiu X., Berlin J.C., Kenney M.E., Burda C. // *Appl. Phys. B Lasers Opt.* 2006. V. 84. № 1–2. P. 309–315.
 72. Dayal S., Lou Y., Samia A.C.S., Berlin J.C., Kenney M.E., Burda C. // *J. Am. Chem. Soc.* 2006. V. 128. P. 13974–13975.
 73. Dayal S., Li J., Li Y.S., Wu H., Samia A.C.S., Kenney M.E., Burda C. // *Photochem. Photobiol.* 2008. V. 84. № 1. P. 243–249.
 74. Zenkevich E., Cichos F., Shulga A., Petrov E.P., Blaudeck T., von Borczyskowski C. // *J. Phys. Chem. B*. 2005. V. 109. P. 8679–8692.
 75. Zenkevich E.I., Sagun E.I., Knyukshto V.N., Stasheuski A.S., Galievsky V.A., Stupak A.P., Blaudeck T., von Borczyskowski C. // *J. Phys. Chem. C*. 2011. V. 115. № 44. P. 21535–21545.
 76. Zenkevich E.I., Stupak A.P., Goehler C., Krasselt C., von Borczyskowski C. // *ACS Nano*. 2015. V. 9. № 3. P. 2886–2903.
 77. Blaudeck T., Zenkevich E.I., Abdel-Mottaleb M., Szwaykowska K., Kowerko D., Cichos F., von Borczyskowski C. // *Chem-PhysChem*. 2012. V. 13. № 4. P. 959–972.
 78. Lemon C.M., Karnas E., Bawendi M.G., Nocera D.G. // *Inorg. Chem.* 2013. V. 52. № 18. P. 10394–10406.
 79. Zenkevich E.I., Blaudeck T., Shulga A.M., Cichos F., von Borczyskowski C. // *J. Lumin.* 2007. V. 122–123. № 1–2. P. 784–788.
 80. Ma J., Chen J.Y., Idowu M., Nyokong T. // *J. Phys. Chem. B*. 2008. V. 112. № 15. P. 4465–4469.
 81. Orlova A.O., Martynenko I.V., Maslov V.G., Fedorov A.V., Gun'ko Y.K., Baranov A.V. // *J. Phys. Chem. C*. 2013. V. 117. № 44. P. 23425–23431.
 82. Orlova A.O., Gubanova M.S., Maslov V.G., Vinogradova G.N., Baranov A.V., Fedorov A.V., Gouanko I. // *Opt. Spectrosc.* 2010. V. 108. № 6. P. 927–933.
 83. Narband N., Mubarak M., Ready D., Parkin I.P., Nair S.P., Green M.A., Beeby A., Wilson M. // *Nanotechnology*. 2008. V. 19. P. 445102.
 84. Valanciunaite J., Skripka A., Streckyte G., Rotomskis R. // *Laser Appl. Life Sci.* 2010. V. 7376. P. 737607.
 85. Valanciunaite J., Skripka A., Araminaite R., Kalantojus K., Streckyte G., Rotomskis R. // *Chemija*. 2011. V. 22. № 4. P. 181–187.
 86. Borissevitch I.E., Parra G.G., Zagidullin V.E., Lukashev E.P., Knox P.P., Paschenko V.Z., Rubin A.B. // *J. Lumin.* 2013. V. 134. P. 83–87.
 87. Skripka A., Valanciunaite J., Dauderis G., Poderys V., Kubiliute R., Rotomskis R. // *J. Biomed. Opt.* 2013. V. 18. № 7. P. 78002.
 88. Kurabayashi T., Funaki N., Fukuda T., Akiyama S., Suzuki M. // *Anal. Sci.* 2014. V. 30. № 5. P. 545–550.
 89. Yaghini E., Giuntini F., Eggleston I.M., Suhling K., Seifalian A.M., MacRobert A.J. // *Small*. 2014. V. 10. № 4. P. 782–792.
 90. Gvozdev D.A., Maksimov E.G., Strakhovskaya M.G., Moiseyevich A.M., Ramonova A.A., Moiseyevich M.M., Goryachev S.N., Paschenko V.Z., Rubin A.B. // *J. Photochem. Photobiol. B Biol.* 2018. V. 187. P. 170–179.
 91. Suchánek J., Lang K., Novakova V., Zimcik P., Zelinger Z., Kubát P. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2013. V. 12. № 5. P. 743.
 92. Tekdaş D.A., Durmuş M., Yanik H., Ahsen V. // *Spectrochim. Acta – Part A Mol. Biomol. Spectrosc.* 2012. V. 93. P. 313–320.
 93. Arvani M., Virkki K., Abou-Chahine F., Efimov A., Schramm A., Tkachenko N.V., Lupo D. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2016. V. 18. № 39. P. 27414–27421.
 94. Britton J., Antunes E., Nyokong T. // *Inorg. Chem. Commun.* 2009. V. 12. № 9. P. 828–831.
 95. Britton J., Antunes E., Nyokong T. // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2010. V. 210. № 1. P. 1–7.
 96. Chidawanyika W., Litwinski C., Antunes E., Nyokong T. // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2010. V. 212. № 1. P. 27–35.
 97. D'Souza S., Antunes E., Litwinski C., Nyokong T. // *J. Photochem. Photobiol. A Chem.* 2011. V. 220. № 1. P. 11–19.
 98. D'Souza S., Antunes E., Nyokong T. // *Inorganica Chim. Acta*. 2011. V. 367. № 1. P. 173–181.
 99. Charron G., Stuchinskaya T., Edwards D.R., Russell D.A., Nann T. // *J. Phys. Chem. C*. 2012. V. 116. № 16. P. 9334–9342.
 100. Tsolekile N., Ncapayi V., Obiyenwa G.K., Matoetoe M., Songca S., Oluwafemi O.S. // *Int. J. Nanomedicine*. 2019. V. 14. P. 7065–7078.
 101. Lakowicz J.R. *Principles of fluorescence spectroscopy*. 3rd ed. Springer US, 2006. P. 449.
 102. Ghosh M., Nath S., Hajra A., Sinha S. // *J. Lumin.* 2013. V. 141. P. 87–92.
 103. Dhami S., de Mello A.J., Rumbles G., Bishop S.M., Phillips D., Beeby A. // *Photochem. Photobiol.* 1995. V. 61. № 4. P. 341–346.
 104. Visheratina A.K., Martynenko I.V., Orlova A.O., Maslov V.G., Fedorov A.V., Baranov A.V., Gun'ko Y.K. // *J. Opt. Technol.* 2014. V. 81. № 8. P. 444–448.
 105. Rakovich A., Savateeva D., Rakovich T., Donegan J.F., Rakovich Y.P., Kelly V., Lesnyak V., Eychmüller A. // *Nanoscale Res. Lett.* 2010. V. 5. № 4. P. 753–760.
 106. Dadadzhyanov D.R., Martynenko I.V., Orlova A.O., Maslov V.G., Fedorov A.V., Baranov A.V. // *Opt. Spectrosc.* 2015. V. 119. № 5. P. 738–743.
 107. Gvozdev D.A., Lukashev E.P., Gorokhov V.V., Pashchenko V.Z. // *Biochem.* 2019. V. 84. № 8. P. 911–922.
 108. Gvozdev D.A., Maksimov E.G., Paschenko V.Z. // *Moscow Univ. Biol. Sci. Bull.* 2020. V. 75. № 1. P. 7–12.
 109. Aly S.M., Ahmed G.H., Shaheen B.S., Sun J., Mohammed O.F. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2015. V. 6. № 5. P. 791–795.
 110. Tsay J.M., Trzoss M., Shi L., Kong X., Selke M., Jung E., Weiss S. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 129. № 21. P. 6865–6871.

УДК 577.218

Некодирующие РНК в патогенезе глиальных опухолей

Т. Ф. Коваленко[#], Т. Д. Ларионова[#], Н. В. Антипова, М. И. Шахпаронов, М. С. Павлюков*

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

[#]Равный вклад.

*E-mail: marat.pav@mail.ru

Поступила в редакцию 26.11.2020

Принята к печати 15.03.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11270

РЕФЕРАТ Глиобластома – одна из наиболее агрессивных опухолей головного мозга, характеризующаяся чрезвычайно плохим прогнозом и почти 100% частотой возникновения рецидивов. В химиотерапии глиобластомы широко используется лишь темозоломид – алкилирующий ДНК агент, который повышает среднюю выживаемость больных с 12 до 14 месяцев. Высокоселективные соединения, действующие на конкретные белки и хорошо зарекомендовавшие себя при других типах рака, оказались неэффективными при GBM. Таким образом, очевидна острая необходимость в разработке принципиально новых методов, которые помогут добиться долгожданного прогресса в лечении GBM. Один из таких подходов предполагает воздействие на некодирующие РНК, которые характеризуются высочайшей многофункциональностью и часто служат своеобразными интеграторами, координируя работу сразу нескольких сигнальных путей в клетке. Воздействие на некодирующие РНК потенциально может привести к значительно более масштабным изменениям в клетке, чем ингибирование отдельных белков. В нашем обзоре рассмотрены длинные некодирующие РНК, кольцевые РНК, а также микроРНК, РНК, взаимодействующие с PIWI, малые ядерные и малые ядрышковые РНК. Приведена классификация этих РНК, описана их роль в различных сигнальных путях и физиологических процессах. Приведены примеры онкогенных и онкосупрессорных некодирующих РНК каждого класса в контексте их участия в патогенезе глиом и глиобластом. Рассмотрены возможности применения некодирующих РНК в качестве диагностических маркеров и средств терапии глиобластом.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА глиома, глиобластома, длинные некодирующие РНК, микроРНК, пиРНК, малые ядрышковые РНК, малые ядерные РНК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ГЭБ – гематоэнцефалический барьер; днРНК – длинная некодирующая РНК; кРНК – кольцевая РНК; кэРНК – конкурирующая эндогенная РНК; мнРНК – малая некодирующая РНК; мяРНК – малая ядерная РНК; мядРНК – малая ядрышковая РНК; нкРНК – некодирующая РНК; пиРНК – РНК, взаимодействующая с PIWI; GBM – глиобластома, TMZ – темозоломид.

ВВЕДЕНИЕ

Глиомы – гетерогенная группа первичных опухолей головного мозга, наиболее агрессивной из которых является астроцитомы IV стадии, называемая глиобластомой (GBM) [1]. За последние 20 лет лечение пациентов с GBM почти не изменилось. В первую очередь проводят максимальное хирургическое удаление опухоли, а затем курс радиотерапии, которую часто дополняют химиотерапией с помощью ДНК-алкилирующего агента темозоломида (TMZ). Однако, несмотря на комплексную терапию, средняя выживаемость пациентов с GBM крайне низка в сравнении с другими видами опухолей. Так, 5-летняя выживаемость больных составляет 4–5%, а 2-летняя – около 26–33%.

В настоящий момент основными прогностическими маркерами глиом, широко используемыми в кли-

нической практике, являются мутация в гене *IDH* и уровень метилирования промотора гена *MGMT*. Мутация *IDH*^{R132H}, найденная примерно в половине образцов глиом, приводит к изменению метаболизма и гиперметилированию гистонов, что, как ни странно, значительно увеличивает выживаемость пациентов [2]. Метилирование промотора *MGMT*, выявляемое ~ в 40% образцов GBM, коррелирует с чувствительностью к TMZ и также предполагает благоприятный прогноз для больных, получающих лучевую и химиотерапию [3]. Лабораторные исследования и анализ баз данных секвенирования генома и транскриптома позволили выявить и другие маркеры, связанные с выживаемостью пациентов, а также подразделить глиобластомы на фенотипические группы, отличающиеся степенью агрессивности заболевания и чувствительности к терапии [4]. Однако ни один из этих

подходов пока не нашел своего клинического применения.

В течение последних десятилетий ведется интенсивный поиск новых препаратов для лечения глиобластомы. В частности, активно изучают низкомолекулярные соединения, ингибирующие такие рецепторные тирозинкиназы, как EGFR (дакомитиниб; фаза II клинических испытаний) и PDGFR (сунитиниб; фаза II/III), а также эпигенетические белки-регуляторы, например HDAC6 (панобиностат; фаза II). Однако, несмотря на то, что схожие препараты высоко эффективны при различных типах рака, достичь значительных положительных результатов в случае глиобластомы пока не удалось [5, 6]. Помимо низкомолекулярных соединений, для лечения GBM в ряде стран одобрено гуманизированное моноклональное антитело против фактора роста эндотелия сосудов А (VEGFA), получившее название бевацизумаб. Однако позднее было показано, что бевацизумаб в сочетании со стандартной терапией не способен значимо увеличивать выживаемость пациентов [7]. Другим перспективным методом лечения GBM считается введение иммунных клеток с прямой противоопухолевой активностью. Некоторые варианты иммунотерапии в настоящее время находятся на разных стадиях клинических испытаний [8], но ни один из них еще не применяется активно в клинике.

Весьма перспективной мишенью для разработки новых методов терапии глиобластомы считаются разнообразные классы некодирующих РНК (нкРНК), которые часто выполняют крайне важные функции в регуляции жизнедеятельности опухолевых клеток. Очевидную проблему в создании таких лекарств представляет необходимость использования соединений, способных к специфичному взаимодействию с определенной последовательностью нуклеиновых кислот. Это значительно увеличивает минимальный размер молекулы лекарственного препарата и затрудняет ее прохождение через клеточную мембрану. В нашем обзоре мы постарались систематизировать данные о некодирующих РНК, участвующих в патогенезе глиом, и рассмотреть связанные с ними терапевтические стратегии.

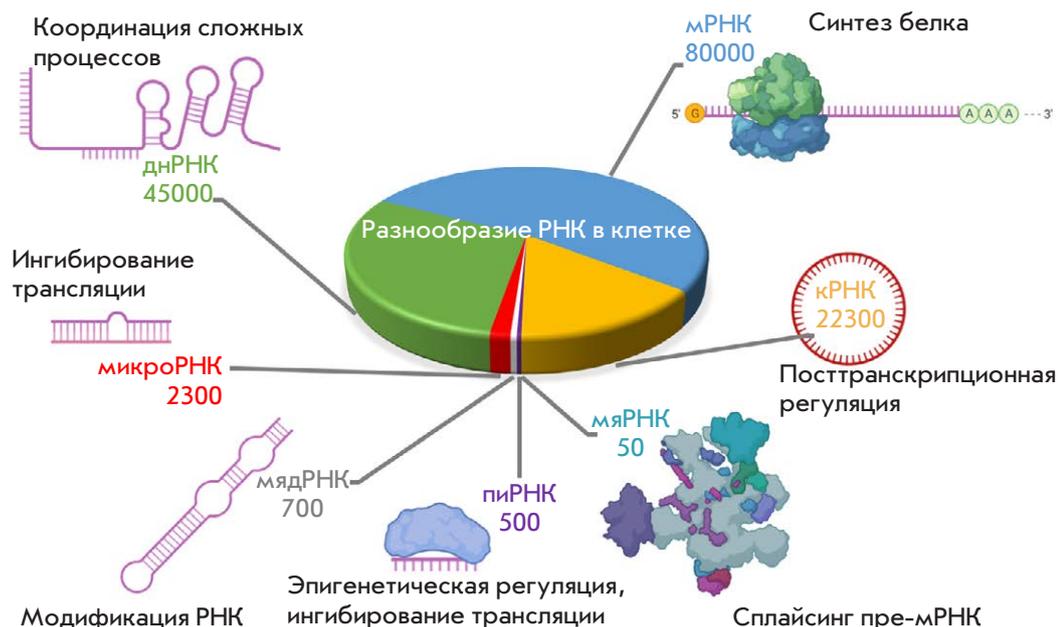
За последние два десятилетия все более очевидной становится важная роль некодирующих транскриптов как в естественных физиологических процессах, так и в развитии заболеваний, в том числе онкологических [9]. Выявлено участие нкРНК и в патогенезе злокачественных глиальных опухолей. Многие нкРНК обладают проонкогенными свойствами. Их уровень в тканях злокачественных опухолей значительно выше, чем в нормальных тканях головного мозга. Во многих случаях наблюдается корреляция экспрессии соответствующей нкРНК со

стадией заболевания и (или) фенотипом опухоли [10, 11]. Известны нкРНК, ассоциированные с пронеурально-мезенхимальным переходом, пролиферацией опухолевых стволовых клеток, а также нкРНК, способствующие адаптации опухоли к условиям гипоксии [11–13]. Кроме того, есть данные о том, что онкогенные нкРНК могут не только синтезироваться в опухолевых клетках, но и передаваться другим клеткам в составе экзосом и микровезикул, что может способствовать дальнейшей прогрессии заболевания [14]. В то же время описано множество нкРНК, выполняющих онкосупрессорные функции [15–18]. Таким образом, информация об экспрессии многих нкРНК теоретически может являться важным прогностическим фактором для пациентов. С другой стороны, понимание механизма влияния нкРНК на ключевые процессы в клетке может открыть дорогу к разработке новых средств для лечения злокачественных глиальных опухолей. В нашем обзоре подробно рассмотрены длинные некодирующие РНК (днРНК), кольцевые РНК (кРНК), микроРНК, а также РНК, взаимодействующие с РИWI (пиРНК), малые ядерные и малые ядрышковые РНК (мяРНК и мядРНК соответственно) в контексте их влияния на развитие злокачественных глиальных опухолей человека (*рисунок*). Мы не будем касаться транспортных и рибосомных РНК, роль которых не является целью настоящего обзора.

1. ДЛИННЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК

1.1. Биосинтез, классификация, локализация, функции днРНК

К днРНК относятся нетранслируемые РНК длиной 200 нуклеотидов и более. В настоящее время у человека по разным оценкам выявлено от 15000 до 50000 днРНК [9, 25]. Большинство таких РНК образуется с участием РНК-полимеразы II, однако некоторые днРНК могут транскрибироваться с помощью РНК-полимеразы III [26]. Существуют две причины, по которым эти РНК не транслируются. Во-первых, в их последовательностях обычно отсутствуют открытые рамки считывания длиной более 300 нуклеотидов; во-вторых, эти РНК могут содержать различные инактивирующие мутации, делающие трансляцию невозможной [27, 28]. Следует отметить, что в последние годы появилась информация о том, что некоторые днРНК содержат короткие рамки считывания и способны транслироваться с образованием пептидов, функция которых в большинстве случаев не выяснена [29]. Подобно мРНК, днРНК могут быть кэпированы и полиаденилированы. В то же время известны днРНК (например, lincROR), которые не содержат указанных модификаций [27]. Многие днРНК



Функции различных типов нкРНК в клетке. Диаграмма в центре и цифры указывают приблизительное количество различных нкРНК, экспрессирующихся в клетках человека и относящихся к одному из упомянутых типов [19–24]. Надписи указывают основную функцию данной группы нкРНК

(NEAT1, GAS5, MALAT1) могут подвергаться сплайсингу, в том числе альтернативному, с образованием нескольких изоформ (данные GenBank). Некоторые днРНК (MALAT1, GAS5) широко экспрессируются в большинстве тканей человека, в то время как другие (CRNDE, HOTAIR) присутствуют только в клетках определенного типа (данные GenBank). Также известны днРНК (H19), которые транскрибируются только на стадии эмбрионального развития, а повышение их уровня в тканях взрослого человека свидетельствует о возникновении патологических состояний [30].

Существует несколько критериев, используемых для классификации днРНК: расположение соответствующего гена, размеры, внутриклеточная локализация и функции. Далее приведена классификация, основанная на локализации гена днРНК в геноме [9]. Согласно этой классификации выделяют 1) *межгенные днРНК*, последовательности которых не перекрываются с последовательностями белоккодирующих генов; 2) *антисмысловые* – транскрибируются в противоположном направлении по отношению к белоккодирующим генам; частично или полностью перекрываются с последовательностями генов; 3) *двунаправленные или дивергентные* – их транскрипция инициируется вблизи промотора гена и происходит в противоположном направлении; 4) *интронные* (смысловые и антисмысловые) – последовательности которых ограничены интронами генов; 5) *днРНК псевдогенов*, представляющие собой транскрипты копий генов, утративших свой кодирующий потенциал в результате инактивирующих мутаций; 6) *теломерные и субтеломерные днРНК* – транскрибируются с теломерных участков хромосом и содержат теломерные

последовательности; 7) *центромерные* – транскрибируются с центромерных участков, включают центромерные повторы; 8) *промотор-ассоциированные* и 9) *энхансерные днРНК* – экспрессируются в обоих направлениях с этих регуляторных элементов генома [9].

днРНК могут локализоваться как в клеточном ядре, так и в цитоплазме [9]. Цитоплазматические днРНК могут выступать в роли «ловушек» регуляторных микроРНК, а также различных белков, препятствуя их действию на соответствующие мишени [31, 32]. Связываясь с другими РНК в цитоплазме клетки, днРНК могут обеспечивать их стабильность [33]. Некоторые днРНК служат предшественниками регуляторных микроРНК [34]. Ядерные днРНК способны регулировать экспрессию генов, привлекая к их промоторам белки, участвующие в ремоделировании хроматина, а также различные активирующие или репрессорные комплексы. Наконец, благодаря своим размерам, днРНК могут служить каркасом для сборки макромолекулярных белковых комплексов [35]. Кроме того, днРНК могут стабилизировать хромосомные петли, обеспечивая взаимодействие между энхансерами и промоторами генов [36]. Некоторые днРНК выполняют структурообразующие функции, участвуя в формировании и поддержании определенных ядерных структур [37]. Показано также, что ряд днРНК играет важную роль в установлении геномного импринтинга и инактивации X-хромосомы [9].

Описано множество днРНК, которые можно рассматривать в качестве прогностических маркеров при злокачественных глиальных опухолях. Одни из них выполняют проонкогенные функции, другие

Таблица 1. Роль днРНК и кРНК в патогенезе злокачественных глиальных опухолей

Название	Тип нкРНК	Роль	Молекулярный механизм действия	Ссылка
днРНК				
H19	Межгенная	Онкоген	Предшественник miR-675; кэРНК для микроРНК Let-7.	[34, 40]
HOTAIR	Антисмысловая	Онкоген	Ремонтирует хроматин-ремоделлирующие комплексы PRC2 и CoREST; является кэРНК для ряда микроРНК (пример – miR-326).	[35, 41]
CRNDE	Дивергентная	Онкоген	Ремонтирует хроматин-ремоделлирующие комплексы PRC2 и CoREST; кэРНК для многих микроРНК, например, miR-186.	[42, 43]
XIST	Межгенная	Онкоген	кэРНК для многих микроРНК, например, miR-152.	[44]
NEAT1	Межгенная	Онкоген	кэРНК для многих микроРНК (например, miR-107); привлекает EZH2 к промоторам генов <i>AXIN2</i> , <i>ICAT</i> и <i>GSK3B</i> .	[45, 46]
PVT1	Межгенная	Онкоген	кэРНК для ряда микроРНК (пример – miR-128-3p); взаимодействует с EZH2.	[47, 48]
CASC2	Дивергентная	Онкосупрессор	кэРНК для miR-21.	[49]
GAS5	Дивергентная	Онкосупрессор	кэРНК для miR-222.	[50]
PTENP1	днРНК псевдогена	Онкосупрессор	кэРНК для множества микроРНК, регулирующих экспрессию гена <i>PTEN</i> .	[15, 31]
lincROR	Межгенная	Разное	кэРНК для miR-145.	[51]
MEG3	Межгенная	Разное	Способствует стабилизации p53; выступает в роли «ловушки» miR-19a.	[52, 53]
NEAT2/MALAT1	Межгенная	Разное	кэРНК для многих микроРНК (пример – miR-384).	[54]
HOTTIP	Антисмысловая	Разное	кэРНК для miR-101.	[55]
кРНК				
circHIPK3	Экзонная	Онкоген	кэРНК для некоторых микроРНК (пример – miR-654).	[56]
circPVT1	Экзонинтронная	Онкоген	кэРНК для miR-199a-5p.	[57]
circCFH	Экзонная	Онкоген	кэРНК для miR-149.	[58]
circTTBK2	Экзонная	Онкоген	кэРНК для некоторых микроРНК (например, miR-761).	[59]
circSMARCA5	Экзонная	Онкосупрессор	Взаимодействует с фактором сплайсинга SRSF1, препятствуя образованию онкогенных транскриптов.	[60]
circFBXW7	Экзонная	Онкосупрессор	Кодирует белок, способствующий убиквитинзависимой деградации c-Мус.	[16]
circSHPRH	Экзонная	Онкосупрессор	Кодирует белок, защищающий белок SHP2 от убиквитинзависимой деградации.	[17]
circPINT	Экзонная	Онкосупрессор	Кодирует пептид, увеличивающий сродство комплекса PAF1c к генам-мишеням.	[18]
circITCH	Экзонная	Онкосупрессор	кэРНК в отношении miR-214.	[61]

действуют как онкосупрессоры. Однако данные в отношении многих транскриптов весьма противоречивы. В некоторых работах имеются указания на то, что одна и та же днРНК может выполнять роль онкогена при глиобластомах и онкосупрессора при менее злокачественных формах глиом. Это справедливо, например, для lincROR [38, 39]. В качестве примера мы подробно рассмотрим несколько днРНК, играющих различные роли в прогрессии GBM, остальные днРНК, функции которых исследованы в клетках глиобластомы, приведены в табл. 1.

1.2. Онкогенные днРНК

Интересным примером онкогенной днРНК, хорошо исследованной в глиобластомах, является NEAT1 (Nuclear Enriched Abundant Transcript 1, или nuclear

paraspeckle assembly transcript 1). Не содержащий интронов ген *NEAT1* расположен на хромосоме 11q13.1. Обнаружен полноразмерный неполиаденилированный транскрипт NEAT1 (22743 нуклеотида), а также укороченная полиаденилированная днРНК длиной 3735 нуклеотидов (данные GenBank). NEAT1 необходима для формирования ядерных параспеклов [37] – окруженных хроматином рибонуклеопротеиновых телец размером 0.3–3 мкм [62]. Важным посттранскрипционным регулятором NEAT1 является проонкогенный белок SRSF1, который взаимодействует с этой днРНК и повышает ее стабильность [63].

Содержание NEAT1 в глиобластомах более чем в 2 раза превышает содержание в менее агрессивных типах глиом. Кроме того, уровень этой днРНК в стволовых клетках глиобластомы (CD133⁺) в 2 раза

выше, чем в более дифференцированной и менее агрессивной популяции CD133⁺ клеток GBM [45]. Свое онкогенное действие в глиомах NEAT1 чаще всего реализует, связываясь с различными микроРНК, например, miR-107 [45]. Помимо этого, NEAT1 привлекает EZH2 к промоторам генов *AXIN2*, *ICAT*, *GSK3B*, что способствует триметилированию гистона H3K27 и, как следствие, понижению уровня экспрессии указанных генов [46]. Этот пример выявляет общую для днРНК особенность – способность активировать различные сигнальные пути, которые в конечном итоге приводят к одинаковым изменениям фенотипа клеток и таким образом усиливают друг друга.

1.3. Онкосупрессорные днРНК

Одной из днРНК, супрессирующих развитие глиобластомы, является GAS5 (Grow Arrest-Specific 5). Ген *GAS5*, локализованный на хромосоме 1q25.1, частично перекрывается с 5'-концевой последовательностью гена *ZBTB37*, который транскрибируется в противоположном направлении. Описано 15 изоформ днРНК *GAS5*, которые различаются по длине и количеству экзонов. Полноразмерный неполиадезиллированный транскрипт (725 нуклеотидов) состоит из 13 экзонов. Более короткие изоформы содержат 9–12 экзонов (данные GenBank). *GAS5* взаимодействует с ДНК-связывающей областью рецепторов стероидных гормонов (глюкокортикостероидов, минералкортикоидов, андрогенов, прогестерона), препятствуя их влиянию на гены-мишени [64]. Опыты *in vitro* показали, что в глиомах днРНК *GAS5* выполняет онкосупрессорные функции. Например, Zhao X. и соавт. в 2015 г. обнаружили, что *GAS5* ингибирует рост клеток линий U87 и U251, связывая онкогенную miR-222 [50]. Кроме того, сверхэкспрессия *GAS5* повышает чувствительность клеток U87 к цисплатину [65]. Клинические исследования также показывают, что повышенный уровень *GAS5* коррелирует с более благоприятным прогнозом как при глиобластомах, так и при менее злокачественных формах глиом [66].

1.4. днРНК, обладающие двойственным эффектом на клетки глиом

Помимо днРНК, выполняющих строго онкогенную или онкосупрессорную роль, существует несколько днРНК, функции которых зависят от контекста. Одна из таких днРНК – NEAT2/MALAT1 (Metastasis Associated Lung Adenocarcinoma Transcript 1). Ген *MALAT1*, локализованный на хромосоме 11q13, экспрессируется в различных тканях организма человека, в том числе в головном мозге. Описаны три близких по размеру (около 8000 нуклеотидов) варианта днРНК *MALAT1*, которые образуются в результате сплайсинга и различаются количеством экзонов

(данные GenBank). Во время процессинга *MALAT1* от 3'-конца первичного транскрипта отщепляется небольшой фрагмент, который транспортируется в цитоплазму. Зрелая днРНК *MALAT1* размером около 7000 нуклеотидов остается преимущественно в ядре и локализуется в ядерных спеклах [67]. *MALAT1* не имеет поли-А-последовательности, однако она весьма стабильна, так как формирует на 3'-конце особую триплексную структуру. *MALAT1* ассоциируется с факторами сплайсинга *SRSF1*, *SRSF2* и *SRSF3*, участвуя, таким образом, в процессинге мРНК. Кроме того, *MALAT1* регулирует экспрессию генов на уровне транскрипции. Например, эта днРНК может связываться с метилированным белком Pc2 (Polycomb 2 protein), облегчая его взаимодействие с транскрипционным фактором E2F и коактиваторами транскрипции [67]. В то же время онкогенная роль *MALAT1* при онкологических заболеваниях в основном связана со способностью этой днРНК влиять на уровень тех или иных микроРНК, в том числе, например, miR-384 [54]. Метаанализ, проведенный в 2018 г. Zhou Q. и соавт., показал, что повышенный уровень *MALAT1* коррелирует с неблагоприятным прогнозом при глиомах [68]. Опыты *in vitro* показали, что подавление экспрессии *MALAT1* снижало устойчивость клеток к темозоломиду, а также уменьшало пролиферацию, миграцию, инвазию и стимулировало апоптоз [69]. В противоположность этому, Han Y. и соавт. обнаружили, что в глиомах уровень *MALAT1* снижен в 1.5 раза по сравнению с нормальным мозгом. Кроме того, сверхэкспрессия *MALAT1* снижает пролиферацию клеток U87 и U251 [70]. Установлено также, что *MALAT1* образует комплекс с РНК-связывающим белком HuR и привлекает его ко второму экзону гена *CD133*, важнейшему маркеру стволовых клеток глиобластомы. В результате этого экспрессия *CD133* блокируется на уровне транскрипции [71]. Таким образом, *MALAT1* участвует в тонкой регуляции фенотипа клеток глиобластомы, а изменения количества этой РНК как в одну, так и в другую сторону оказывают негативное воздействие на клетки.

2. КОЛЬЦЕВЫЕ РНК

2.1. Общая характеристика, биосинтез, классификация, функции

К кРНК относятся транскрипты, у которых 5'- и 3'-концы молекулы соединены фосфодиэфирной связью с образованием кольцевой структуры. Формированию кРНК способствуют инвертированные повторы, содержащиеся в их предшественниках [72, 73]. кРНК образуются из РНК-предшественников в результате так называемого обратного сплайсинга. Если в случае канонического сплайсинга 5'-концевой

донорный сайт соединяется с 3'-концевым акцепторным сайтом, то при обратном сплайсинге 3'-донорный сайт взаимодействует с 5'-акцепторным сайтом, в результате чего образуется ковалентно замкнутый кольцевой транскрипт. Имеются данные, что обратный сплайсинг (как и обычный) осуществляется с помощью канонического сплайсосомного аппарата [73]. В ряде случаев с одной и той же последовательности могут транскрибироваться как линейная, так и кольцевая РНК [47, 57]. В зависимости от происхождения и структуры выделяют: 1) экзонные кРНК (экРНК); 2) экзон-интронные (эикРНК); 3) интронные (икРНК); 4) межгенные (мгкРНК). В первом случае кРНК образуются из мРНК белоккодирующих генов. В результате такая РНК может иметь тот же состав экзонов, что и мРНК, однако в кРНК 5'-конец первого экзона соединяется с 3'-концом последнего. В случае эикРНК кольцевые транскрипты содержат часть последовательностей интронов РНК-предшественников. икРНК и мгкРНК образуются при транскрипции интронных и межгенных последовательностей соответственно [72]. Кольцевые РНК не полиаденилированы и не кэпированы. Они обладают большей стабильностью по сравнению с линейными днРНК, что делает их более перспективными диагностическими маркерами и терапевтическими агентами [72]. Важно отметить, что транскрипция линейных и кольцевых РНК одного и того же гена может происходить независимо друг от друга, как это показано, например, для днРНК PVT1 и circPVT1 [47, 57].

Подобно днРНК, кРНК могут взаимодействовать с другими РНК, ДНК и белками и выполнять в клетке разнообразные функции. Многие кРНК содержат сайты связывания различных микроРНК и выступают в качестве «губки», сорбируя на себя эти молекулы [56–59, 61]. Кольцевые транскрипты могут также конкурировать с мРНК белоккодирующих генов за факторы сплайсинга, снижая эффективность процессинга мРНК. Ряд кРНК служит адапторами, привлекая различные белки и тем самым обеспечивая их взаимодействие друг с другом. Кроме того, кРНК могут локализоваться на промоторах генов, регулируя их транскрипцию [73]. Несмотря на то что кРНК не кэпированы, некоторые из них содержат короткие рамки считывания и транслируются с образованием небольших белков и пептидов [16–18]. Нуклеотидные последовательности таких кРНК включают специфические IRES-элементы, необходимые для взаимодействия с рибосомами и факторами инициации трансляции [73].

Участие кРНК в патогенезе злокачественных глиальных опухолей выявлено относительно недавно. Тем не менее, на данный момент опубликовано уже несколько работ, в которых обнаружены кольцевые

транскрипты, дифференциально экспрессирующиеся при глиомах и глиобластомах. В настоящее время эти транскрипты активно изучаются, при этом многие из них можно рассматривать как потенциальные диагностические маркеры. Ниже будут перечислены некоторые кРНК, играющие проонкогенную или онкосупрессорную роль в патогенезе злокачественных глиальных опухолей. Более полный список кРНК с известными функциями в глиомах приведен в табл. 1.

2.2. Проонкогенные кРНК

Одна из проонкогенных кРНК – circHIPK3. Ген HIPK3 (Homeodomain Interacting Proteinkinase 3) локализован на хромосоме 11p13 (данные GenBank). Известно несколько кРНК, образующихся в результате неканонического сплайсинга первичного линейного транскрипта гена HIPK3. В тканях человека наиболее распространен кольцевой транскрипт длиной 1099 нуклеотидов, включающий только второй экзон гена HIPK3 (данные CircBase). Этот транскрипт усиливает пролиферацию клеток и является «ловушкой» нескольких миРНК. В 2018 г. Jin P. и соавт. показали, что уровень circHIPK3 в глиомах в 1.5–5 раз выше, чем в соответствующей нормальной ткани головного мозга тех же пациентов. Кроме того, повышенный уровень circHIPK3 почти в 2 раза снижает среднюю продолжительность жизни пациентов [56]. Подавление этой кРНК в опытах *in vitro* приводит к уменьшению пролиферации клеток U87 и U251. Обнаружено, что circHIPK3 служит «губкой» для miR-654, которая, в свою очередь, регулирует уровень проонкогенного белка IGF2BP3 [56].

2.3. Онкосупрессорные кРНК

Примером онкосупрессорной кРНК является circSMARCA5. Белоккодирующий ген SMARCA5 локализован на хромосоме 4 (4q31.21). CircSMARCA5 размером 269 нуклеотидов включает экзоны 15 и 16 (данные CircBase). Эта кРНК транскрибируется на высоком уровне в головном мозге человека и выполняет онкопротекторные функции. Показано, что снижение уровня SMARCA5 коррелирует с неблагоприятным прогнозом у пациентов с глиобластомами [60]. Сверхэкспрессия SMARCA5 способствует уменьшению миграции клеток U87MG. кРНК SMARCA5 содержит сайты связывания фактора сплайсинга SRSF1, который играет проонкогенную роль при многих онкологических заболеваниях, в том числе при глиобластомах. Взаимодействуя с SRSF1, SMARCA5 препятствует его участию в альтернативном сплайсинге и образованию онкогенных транскриптов. В частности, под влиянием этой кРНК уменьшается соотношение онкогенной и антионкогенной изоформ VEGFA [60].

3. МАЛЫЕ НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК

Малые некодирующие РНК (мнРНК) – небольшие молекулы длиной 18–200 нуклеотидов. К настоящему моменту обнаружено несколько типов мнРНК, а именно: тРНК, микроРНК, малые интерферирующие РНК (минРНК), малые ядерные РНК (мяРНК), малые ядрышковые РНК (мядРНК), компоненты теломеразной РНК (ТЕРС), РНК, взаимодействующие с PIWI (пиРНК), малые энхансерные РНК (мэРНК) и Y-РНК [74]. Этот список продолжает пополняться. мнРНК, кооперируясь с другими внутриклеточными молекулами, участвуют в регуляции экспрессии генов на всех уровнях: котранскрипционном, посттранскрипционном, трансляционном, эпигенетическом. Нарушения в их количестве или функциях ведут к изменениям внутриклеточных процессов и развитию различных заболеваний, среди которых не только онкологические, но и нейродегенеративные, сердечно-сосудистые и др. [75]. Изменение уровня синтезируемых клеткой мнРНК происходит по нескольким причинам. Во-первых, из-за мутаций в генах самих мнРНК [76], во-вторых, из-за мутаций и нарушений функций ферментов биогенеза мнРНК (например, Dicer и Drosha в случае микроРНК) [77]. Возможны также нарушения эпигенетического, транскрипционного или посттранскрипционного контроля экспрессии как самих мнРНК, так и процессирующих их ферментов [77]. В этом разделе мы рассмотрим типы мнРНК, которые принимают участие в патогенезе злокачественных глиальных опухолей. Краткая характеристика этих мнРНК приведена в табл. 2.

3.1. микроРНК

микроРНК – это короткие РНК длиной около 22 нуклеотидов, которые осуществляют посттранскрипционную регуляцию экспрессии генов. Последовательности, кодирующие микроРНК, в большинстве случаев находятся внутри интронов, хотя иногда встречаются и экзонные микроРНК. Транскрипцию микроРНК осуществляет РНК-полимераза II, которая транскрибирует и ген-хозяин [78]. После многостадийного процессинга, подробно описанного во многих обзорах [78], микроРНК, входящая в состав комплекса RISC, участвует в распознавании мРНК генов-мишеней. Важным условием для выбора мРНК-мишени служит наличие в ней области, комплементарной так называемой «ключевой последовательности» в микроРНК (англ. *Seed sequence*), которая представляет собой участок из шести (со 2-го по 7-й) нуклеотидов на 5'-конце молекулы мРНК [79]. Такие комплементарные области чаще всего встречаются в 3'-нетранслируемых областях мРНК, т.е. вне белоккодирующей части. Комплементарность (полная или частичная) обеспечивает связывание мРНК-мишени с RISC-комплексом, который или вызывает распад мРНК, или репрессирует ее трансляцию. В первом случае белок GW182 обеспечивает удаление полиА-хвоста или 5'-кэпа с молекулы мРНК [80], что приводит к образованию нефункционального продукта, который деградируется 5'-3'-экзорибонуклеазой 1 (XRN1) [79]. Единое мнение о репрессии трансляции в настоящий момент отсутствует, но большая часть исследований указывает на то, что RISC вызывает дис-

Таблица 2. Основные характеристики мнРНК, участвующих в патогенезе глиобластом

Характеристика	микроРНК	пиРНК	мядРНК	мяРНК
Длина	~ 22 нуклеотида	~ 24–30 нуклеотидов	~ 60–300 нуклеотидов	~ 80–350 нуклеотидов (в среднем около 150 нуклеотидов)
Локализация в геноме	В интронных областях белоккодирующих генов, иногда в экзонах	В PIWI-кластерах	В интронах белоккодирующих генов, в полицистронных кластерах мядРНК	Гены мяРНК
Предшественники	Двухцепочечная шпильчатая РНК	Одноцепочечная РНК	Одноцепочечная РНК	Одноцепочечная РНК
РНК-полимераза, осуществляющая транскрипцию	РНК-полимераза II	РНК-полимераза II	РНК-полимераза II	РНК-полимераза II; для U6 – РНК-полимераза III
Механизм процессинга	Двухступенчатое расщепление белками Drosha и Dicer	5'- и 3'-экзонуклеазное укорачивание, затем расщепление белком Zucchini	Сплайсинг пре-мРНК, раскрытие структуры лассо, затем ее 5'- и 3'-экзонуклеазное укорачивание	Кэпирование и модификация 3'-конца молекулы
Классы белков, связывающихся с РНК	Argonaute	PIWI	5.5 K, NOP56, NOP58 и фирилларин	Сплайсосомные белки
Функции	Регуляция экспрессии белоккодирующих генов	Сайленсинг транспозонов	Посттранскрипционные модификации других типов клеточных РНК	Сплайсинг пре-мРНК

Таблица 3. мнРНК, связанные с развитием глиобластом

микроРНК	Роль	Гены-мишени	Функция	Ссылка
микроРНК				
let-7	Онкосупрессор	NRAS, KRAS, CCND1	Снижает пролиферацию, инвазию, усиливает апоптоз и чувствительность к цисплатину	[84]
miR-7	Онкосупрессор	EGFR, FAK, PI3K, RAF1	Снижает инвазию и миграцию	[84]
miR-17	Онкосупрессор	PTEN, MDM2, CCND1, AKT1	Снижение миграции и жизнеспособности клеток	[84, 85]
miR-21	Онкоген	ANP32A, SMARCA4, RECK, TIMP3, IGFBP3	Усиление пролиферации, инвазии, химиорезистентности	[86, 87]
miR-24	Онкоген	ST7L, SOX7	Усиливает пролиферацию, миграцию	[88]
miR-221/222	Онкоген	PTEN, PUMA, MGMT	Усиливает пролиферацию, инвазию, устойчивость к терапии	[84]
miR-326	Онкосупрессор	NOTCH1, NOTCH2	Снижает жизнеспособность клеток	[84, 89]
miR-451	Онкосупрессор	CAB39, LKB1, AMPK, PI3K, AKT	Ингибирует пролиферацию	[84, 90]
пиРНК				
piR-30188	Онкосупрессор	днРНК OIP5-AS1	Снижает пролиферацию, миграцию и инвазию клеток глиомы и стимулирует апоптоз	[91]
piR-8041	Онкосупрессор	MAP3K76, RASSF1	Останавливает клеточный цикл, снижает пролиферацию	[92]
piR-DQ593109	Онкосупрессор	Деградирует miR-330-5p	Ослабление плотных межклеточных контактов	[93]
piR-598	Онкосупрессор	BAX, GOS2, JUN	Усиливает апоптоз, снижает пролиферацию	[94]
мядРНК				
SNORD44	Онкосупрессор	CASP3, CASP8, CASP9	Вызывает апоптоз клеток, снижает пролиферацию и инвазивность	[95]
SNORD47	Онкосупрессор	CCNB1, CDK1, CDC25C, CTNNB1, CDH2, VIM, MMP2, MMP9, CDH1	Ингибирует пролиферацию, увеличивает выживаемость пациентов	[96]
SNORD76	Онкосупрессор	CCNA1, CCNB1	Ингибирует рост и пролиферацию клеток глиом	[97]
мяРНК				
U1	Онкоген	Мутация в U1 инактивирует <i>PTCH1</i> и активирует <i>GLI2</i> и <i>CCND2</i>	Повышение экспрессии онкогенов, инактивация генов-супрессоров опухолей	[98]

социацию факторов инициации трансляции eIF4A1 и eIF4A1p с мРНК-мишени, блокируя сканирование мРНК рибосомой и образование иницирующего трансляцию комплекса eIF4F [81]. Оба описанных механизма сайленсинга генов взаимосвязаны, однако, согласно данным рибосомного профилирования, 66–90% сайленсинга генов вызвано именно деградацией мРНК [82]. При этом, по существующим оценкам, микроРНК участвуют в регуляции экспрессии примерно 30% генов человека [83]. Обычно воздействие одной микроРНК на экспрессию гена оказывается достаточно слабым, поэтому, как правило, микроРНК образуют масштабные сети внутриклеточных молекулярных взаимодействий, проявляя синергию. В качестве примера мы подробно опишем несколько микроРНК, играющих различные роли в прогрессии GBM (в табл. 3 приведены микроРНК, функции которых изучены в клетках глиобластомы).

3.1.1. Онкогенные микроРНК. На сегодняшний день опубликованы результаты многочисленных исследований, описывающих роль онкогенных микроРНК в патогенезе глиом [94, 95]. Как правило, мишенями этих микроРНК служат гены-супрессоры опухолей, а нарушения в уровнях экспрессии микроРНК приводят к неконтролируемой пролиферации клеток, усилению их миграции, инвазии, индукции ангиогенеза и блокировке апоптоза. Одна из наиболее хорошо изученных онкогенных микроРНК – miR-21, уровень которой повышен при многих типах рака, а в глиомах коррелирует со стадией заболевания [10]. Эта микроРНК регулирует многие внутриклеточные процессы, благоприятствующие развитию глиом [86]. В число мишеней miR-21 входят гены, способствующие апоптозу (*PDCD4*, *LRRFIP1*) [99, 100], а также онкосупрессорные гены, блокирующие инвазию (*RECK* и *TIMP3*) [101] и пролиферацию (*IGFBP3*)

[87]. Кроме того, miR-21 может влиять на поведение клеток микроглии, подготавливая благоприятные условия для роста опухоли. miR-21 обнаружены в везикулах, секретлируемых клетками глиом [14]. Везикулы, попадая в клетки микроглии, вызывали снижение экспрессии генов-мишеней miR-21: *Vmpr2*, *Btg2*, *Kbtbd2*, *Pdcd4*, *Pten* и *Rhob*. Некоторые из перечисленных генов вовлечены в пролиферацию и дифференцировку клеток. Соответственно, их ингибирование с помощью везикулярной miR-21 приводило к усилению пролиферации клеток микроглии, что, по предположению авторов [14], может существенно влиять на формирование микроокружения опухоли и способствовать ее прогрессии.

Интересно, что появляется все больше данных о важной роли именно экзогенных (попадающих из соседних клеток) молекул микроРНК. Так, онкогенные микроРНК могут перемещаться между клетками глиомы и их микроокружением (астроцитами, олигодендроцитами, эндотелиальными клетками, микроглией/макрофагами), участвуя в межклеточной коммуникации, что способствует прогрессии опухоли [14]. Совместное культивирование астроцитов с клетками глиомы вызывает в астроцитах повышение уровней 9 микроРНК (miR-4519, miR-5096, miR-3178 и др.), при этом две микроРНК – miR-5096 и miR-4519 – напрямую попадают из клеток глиомы в астроциты через щелевые контакты [102]. Описан перенос микроРНК и в обратном направлении: miR-19a переносится с помощью везикул от астроцитов к опухолевым клеткам и ингибирует в них активность PTEN, что вызывает рост метастазов. Кроме того, при гипоксии экзосомы, выделяемые клетками глиом, индуцируют поляризацию макрофагов M2 и оказывают иммуносупрессивное действие, способствуя пролиферации, миграции и инвазии глиомы *in vitro* и *in vivo*. Этот эффект связывается с присутствием в экзосомах miR-1246 [103].

3.1.2. Онкосупрессорные микроРНК. Известно большое количество онкосупрессорных микроРНК [84]. Например, miR-7 ингибирует передачу сигнала через рецептор EGF, участвующий в пути протеинкиназы Akt. Однако в глиобластомах экспрессия miR-7 подавляется (по сравнению с нормальными тканями ее количество снижено более чем в 6 раз), что позволяет пути Akt быть постоянно активированным, увеличивая жизнеспособность и пролиферацию опухолевых клеток [104]. Также показано, что экзогенное введение проапоптотической miR-218 подавляет экспрессию циклинзависимой киназы 6 (CDK6), снижает пролиферацию и приводит к гибели клеток глиом за счет апоптоза [105]. Другая мишень miR-218 – белок ESOX (EGFR-coamplified and overexpressed protein), регулирующий транскрипционную активность NF-κB.

Сверхэкспрессия miR-218 в клетках глиом позволяет сдерживать активность NF-κB посредством ESOX, вызывая апоптоз и замедляя пролиферацию [106].

3.2. РНК, взаимодействующие с PIWI (пиРНК)

РНК, взаимодействующие с PIWI (пиРНК) – некодирующие РНК длиной около 24–35 нуклеотидов, первоначально обнаруженные в гонадах дрозофил. Эти РНК получили свое название благодаря связыванию с белками семейства PIWI (P-element-induced wimpy testis) [107, 108]. Геномными источниками пиРНК являются так называемые кластеры пиРНК, которые в основном располагаются в межгенных или некодирующих областях [109]. Образование пиРНК в клетке может происходить по двум механизмам: по пути первичного процессинга или по механизму «пинг-понг», в результате которого амплифицируются вторичные пиРНК. Эти механизмы подробно описаны в обзорах [110, 111]. Показано участие пиРНК в патогенезе различных заболеваний, в том числе злокачественных новообразований [112, 113]. Согласно данным профилирования, в нормальных тканях мозга и в GBM экспрессируются около 350 пиРНК, при этом некоторые пиРНК характерны только для GBM [92].

3.2.1. Онкогенные пиРНК. Несмотря на то что в последние годы пиРНК активно изучают в различных типах злокачественных опухолей, однако публикаций, посвященных пиРНК в глиомах, не так много, а публикации, раскрывающие онкогенную роль пиРНК в развитии глиальных опухолей, на данный момент отсутствуют.

3.2.2. Онкосупрессорные пиРНК. На основании анализа баз данных установлено, что однонуклеотидные полиморфизмы в генах piR-2799, piR-18913, piR-598, piR-11714, piR-3266 связаны с повышенным риском возникновения глиом, причем варианты piR-598 сильнее других коррелируют со степенью риска. Транскриптомное профилирование клеток, трансфицированных piR-598 дикого типа, указывает на то, что эта пиРНК влияет на экспрессию 518 генов, участвующих в гибели/выживании клеток глиомы. Присутствие piR-598 приводило к снижению экспрессии большинства из обнаруженных генов (71.2%). Один из генов, экспрессия которых существенно снижалась, – ген онкогенного транскрипционного фактора Jun. Параллельно с этим, piR-598 вызывает повышение уровня проапоптотических белков BAX и GOS2. Изучение влияния piR-598 на рост клеток глиомы *in vitro* показало, что сверхэкспрессия piR-598 дикого типа снижает пролиферацию клеток и образование колоний, а сверхэкспрессия мутантной piR-598, наоборот, повышает, что хорошо согласуется с данны-

ми транскриптомного анализа [94]. Однако точные механизмы, лежащие в основе этих процессов, пока не ясны и требуют дальнейшего изучения. Другие онкосупрессорные пиРНК представлены в *табл. 3*.

3.3. Малые ядрышковые РНК

Малые ядрышковые РНК (мядРНК) локализуются в ядрышке и имеют длину 60–300 нуклеотидов. У человека мядРНК располагаются в интронных областях генов, кодирующих белки или днРНК, и вырезаются из них в ходе сплайсинга [114]. мядРНК выполняют несколько функций, из которых наиболее известно участие в процессинге и созревании других типов клеточных РНК. В соответствии с этим выделяют три класса мядРНК: C/D box мядРНК (осуществляют 2'-О-метилирование рРНК), H/ACA box мядРНК (осуществляют псевдоуридинирование нуклеотидов РНК) и малые РНК, ассоциированные с тельцами Кахала (ткРНК, относятся к классу box C/D–H/ACA РНК, осуществляют 2'-О-метилирование и псевдоуридинирование сплайсосомных U1, U2, U4 и U5 мяРНК) [114]. мядРНК описывают и как онкосупрессоры, и как онкогены. Известно, что мядРНК участвуют в пролиферации, апоптозе, метастазировании, а также в приобретении опухолевыми клетками лекарственной устойчивости, при этом механизмы действия этих РНК различны [115].

3.3.1. Онкогенные мядРНК. Онкогенные мядРНК, участвующие в развитии глиом, на настоящий момент не описаны.

3.3.2. Онкосупрессорные мядРНК. SNORD47 – одна из онкосупрессорных мядРНК, количество которой в глиомах в 2 раза ниже, чем в нормальных тканях мозга. Сравнение глиом различной степени злокачественности показало, что значительное снижение количества SNORD47 характерно для большинства глиом III–IV степени (выявлено в 71.4% исследованных образцов). В соответствии с этим, выживаемость пациентов с более высокой экспрессией SNORD47 в тканях глиомы лучше, чем пациентов с более низкой экспрессией SNORD47. Сверхэкспрессия SNORD47 приводила к ингибированию пролиферации клеток за счет остановки клеточного цикла в фазе G2. Вероятно, это происходит за счет снижения экспрессии таких важных регуляторов клеточного цикла, как циклин B1, CDK1 и CDC25C, β-катенин и фосфо-β-катенин. Одновременно с этим снижаются количества N-кадгерина, виментина, металлопротеиназ-2 и -9, увеличивается количество E-кадгерина, указывая на то, что SNORD47 препятствует пронеуронально-мезенхимальной трансформации клеток глиом. Кроме того, сверхэкспрессия SNORD47 повышает чувстви-

тельность клеток глиомы к темозоломиду [96]. Еще одна онкосупрессорная мядРНК – SNORD44, количество которой, а также количество транскрипта ее гена-хозяина, днРНК GAS5, в клетках глиомы снижены в 2–3 раза по сравнению с нормальным мозгом. При сверхэкспрессии SNORD44 повышаются уровни каспаз-3, -8 и -9, что вызывает апоптоз клеток. Кроме того, пролиферация и инвазивность клеток, трансфицированных SNORD44, заметно снижаются [116], однако точные молекулярные механизмы этого процесса неизвестны. Другие примеры онкосупрессорных мядРНК приведены в *табл. 3*.

3.4. Малые ядерные РНК

Малые ядерные РНК (мяРНК) состоят примерно из 150 нуклеотидов. мяРНК U6 и U6^{ATAC} синтезируются РНК-полимеразой III, а все другие – РНК-полимеразой II [117, 118]. Во время созревания мяРНК проходят многочисленные этапы процессинга и фолдинга, а также связываются с различными белками, образуя функциональные мяРП. Зрелые мяРП реимпортируются в ядро и направляются в тельца Кахала для выполнения своих функций. Подробно биогенез мяРНК рассмотрен в обзоре [119].

Основная функция мяРНК – участие в процессинге пре-мРНК. мяРНК входят в состав сплайсосомы: U1, U2, U4, U5, U6 являются компонентами основной сплайсосомы, а U5, U11, U12, U4^{ATAC}, U6^{ATAC} – компонентами минорной сплайсосомы. U7 и U8 имеют внесплайсосомные функции: U7 принимает участие в процессинге пре-мРНК гистонов [120], а U8 необходима для созревания рРНК [121]. Участие мяРНК в сплайсинге подробно описано ранее [122, 123]. Нормальная работа всех компонентов аппарата сплайсинга крайне важна для протекания многих биологических процессов, поэтому не удивительно, что нарушения сплайсинга наблюдаются при многих заболеваниях, в том числе при глиобластоме [124].

3.4.1. Онкогенные мяРНК. Мутации в мяРНК обнаруживаются в различных типах рака [125], в том числе и в опухолях головного мозга. Так мутации в третьем нуклеотиде области связывания 5'-сайта сплайсинга в U1 обнаружены в клетках медуллобластомы. В результате альтернативного сплайсинга в мутантных по U1 клетках медуллобластомы инактивируются опухолесупрессорные гены (*PTCH1*) и активируются онкогены (*GLI2* и *CCND2*) [98]. Показано также, что везикулы, секретлируемые апоптотическими клетками глиобластомы, содержат компоненты сплайсосомы, среди которых U2, U4, U6 мяРНК. Экзогенные компоненты сплайсосомы изменяют в клетках-реципиентах сплайсинг пре-мРНК и делают опухоль более агрессивной и устойчивой к терапии [126].

3.4.2. Онкосупрессорные мРНК. На сегодняшний день получены данные об онкосупрессорных функциях белковых факторов сплайсинга, однако ничего не известно об онкосупрессорной функции мРНК при глиомах.

4. НЕКОДИРУЮЩИЕ РНК В ТЕРАПИИ И ДИАГНОСТИКЕ ОПУХОЛЕЙ ГОЛОВНОГО МОЗГА

В течение длительного времени в качестве мишеней для противоопухолевой терапии, а также маркеров злокачественных новообразований рассматривали белковые молекулы. Однако участие некодирующей части генома в жизнедеятельности клетки, обнаруженное в последние десятилетия, позволило по-новому взглянуть на механизмы развития онкологических заболеваний. С каждым годом появляется все больше сообщений о нкРНК, которые могут использоваться или как мишени для противоопухолевой терапии, или в качестве прогностических маркеров [127, 128]. Более того, на основе нкРНК уже созданы лекарства, эффективные при некоторых болезнях [129].

Так, многие мнРНК обнаруживаются в физиологических жидкостях пациентов с глиомами: в плазме и сыворотке крови или в спинномозговой жидкости. Как правило, мнРНК находятся в экзосомах, что оберегает их от деградаци и позволяет проникать через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [130]. По этой причине мнРНК могут служить хорошими биомаркерами для неинвазивной диагностики. Например, количество miR-221 повышено в 2–11 раз в образцах тканей глиом и в плазме крови, полученных от пациентов. Причем их содержание увеличивается по мере повышения степени злокачественности опухоли. Это позволяет рассматривать miR-221 в качестве потенциального диагностического маркера глиальных опухолей [131]. Аналогичные результаты получены и для miR-21 [132, 133]. Помимо мнРНК в качестве потенциальных биомаркеров могут выступать и другие виды мнРНК. Например, комбинация miR-320/miR-574-3p/RNU6-1 или только RNU6-1, выделенные из экзосом сыворотки крови, специфичны для больных глиобластомой [134].

В настоящее время разрабатываются новые стратегии терапии онкологических заболеваний, основанные на использовании антисмысловых олигонуклеотидов, мишенями которых служат различные РНК, в том числе днРНК [135, 136]. Однако наличие ГЭБ существенно снижает биодоступность подобных терапевтических агентов глиальных опухолей головного мозга. Более перспективным представляется использование в терапии GBM низкомолекулярных соединений, которые с высокой специфичностью связываются с определенными последовательностями (или определенными структурными мотивами) днРНК. Например, соединения AC1NOD4Q и AC1Q3QWB связываются

с участком, расположенным в 5'-концевой области онкогенной днРНК HOTAIR и нарушают ее взаимодействие с EZH2, каталитической субъединицей комплекса ремоделирования хроматина. Эти вещества существенно снижают миграцию и инвазию, а также подавляют пронейронально-мезенхимальный переход клеток глиобластомы [137–139]. Также найдены соединения, взаимодействующие со специфической триплексной структурой, расположенной на 3'-конце днРНК MALAT1. Эти низкомолекулярные вещества способны снижать уровень MALAT1, а также уменьшать рост опухоли в экспериментах на мышинной модели рака молочной железы [140].

РНК-комплексы, содержащие мРНК, служат перспективной терапевтической мишенью. Показано, что активность U2-мРНК необходима стволовым клеткам глиобластомы для выживания и прохождения митоза. Пладиенолид B, входящий в группу макролидов, ингибирует активность SF3b-субкомплекса, нарушая нормальное взаимодействие мРНК U2 с пре-мРНК, что приводит к нарушению сплайсинга и гибели опухолевых клеток [141]. Аналогичное действие оказывают два других противоопухолевых вещества – сплайсестатин A и E7107 [142, 143]. Эти соединения нарушают сплайсинг мРНК таких регуляторов клеточного цикла, как циклин A2 и киназа Aurora A [144], останавливая пролиферацию опухолевых клеток [145]. Кроме того, нарушения сплайсинга приводят к появлению «неправильных» форм белков, что также может приводить к гибели опухолевой клетки [142]. Активно разрабатываются новые препараты, действие которых направлено на подавление сплайсинга. Так, соединение H3B-8800 проходит первую фазу клинических испытаний, и, как ожидается, станет первым на сегодняшний день противоопухолевым препаратом, ингибирующим сплайсинг [146].

Другой потенциальной мишенью для разработки новых методов терапии могут стать пиРНК. Большую проблему терапии опухолей головного мозга представляет доставка лекарственных средств. Наличие ГЭБ делает невозможным доставку в опухоль большинства соединений в достаточных концентрациях. Однако недавно Shen S. и соавт. показали, что повысить уровень проницаемости ГЭБ можно, если ингибировать комплекс PIWIL1/piR-DQ593109 в клетках эндотелия опухолевых сосудов при глиомах [147]. Этот комплекс играет важную роль в деградаци онкогенной днРНК MEG3, которая, в свою очередь, регулирует образование плотных межклеточных контактов. Нокаун PIWIL1/piR-DQ593109 влечет за собой увеличение количества MEG3, которое в итоге приводит к увеличению проницаемости капилляров, питающих опухоль. Такой подход можно использовать для создания новых схем лечения глиом.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Исследования последних десятилетий не оставили сомнений в том, что функции РНК не ограничиваются кодированием белков. Благодаря сложной структуре и способности к высоко специфичным комплементарным взаимодействиям с большим количеством разнообразных молекул, нкРНК могут играть роль мастер-регуляторов важнейших внутриклеточных процессов. Кроме того, выявлено ключевое участие нкРНК в межклеточной коммуникации. Поэтому не удивительно, что все больше ученых исследуют роль этих молекул в онкологических заболеваниях, а также возможность их использования в качестве

мишени для разработки новых противоопухолевых препаратов. К сожалению, в настоящее время создание лекарства, ингибирующего конкретную нкРНК, представляет значительно большие трудности, чем разработка новых низкомолекулярных ингибиторов белков. Однако при столь агрессивных онкологических заболеваниях, как глиобластома, именно такие подходы могут привести к долгожданному прогрессу в лечении пациентов. ●

Работа выполнена при поддержке гранта РФФИ № 20-14-50306 и гранта РНФ № 19-44-02027.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Ostrom Q.T., Gittleman H., Truitt G., Boscica A., Kruchko C., Barnholtz-Sloan J.S. // *Neuro Oncol.* 2018. V. 20. P. iv1–iv86.
- Aquilanti E., Miller J., Santagata S., Cahill D.P., Brastianos P.K. // *Neuro Oncol.* 2018. V. 20. P. vii17–vii26.
- Kitange G.J., Carlson B.L., Schroeder M.A., Grogan P.T., Lamont J.D., Decker P.A., Wu W., James C.D., Sarkaria J.N. // *Neuro Oncol.* 2009. V. 11. № 3. P. 281–291.
- Phillips H.S., Kharbanda S., Chen R., Forrest W.F., Soriano R.H., Wu T.D., Misra A., Nigro J.M., Colman H., Soroceanu L., et al. // *Cancer Cell.* 2006. V. 9. № 3. P. 157–173.
- Sepúlveda-Sánchez J.M., Vaz M.Á., Balañá C., Gil-Gil M., Reynés G., Gallego Ó., Martínez-García M., Vicente E., Quindós M., Luque R., et al. // *Neuro Oncol.* 2017. V. 19. № 11. P. 1522–1531.
- Lee E.Q., Reardon D.A., Schiff D., Drappatz J., Muzikansky A., Grimm S.A., Norden A.D., Nayak L., Beroukhim R., Rinne M.L., et al. // *Neuro Oncol.* 2015. V. 17. № 6. P. 862–867.
- Castro B.A., Aghi M.K. // *Neurosurg. Focus.* 2014. V. 37. № 6. P. E9.
- Weenink B., French P.J., SillevsSmitt P.A.E., Debets R., Geurts M. // *Cancers (Basel).* 2020. V. 12. № 3. P. 751.
- Rao M.R.S. *Long non-coding RNA biology.* Singapore: Springer Nature, 2017. 323 p.
- Li C., Sun J., Xiang Q., Liang Y., Zhao N., Zhang Z., Liu Q., Cui Y. // *J. Neurooncol.* 2016. V. 130. P. 11–17.
- Guardia G.D.A., Correa B.R., Araujo P.R., Qiao M., Burns S., Penalva L.O.F., Galante P.A.F. // *NPJ Genom. Med.* 2020. V. 5. P. 2.
- Li W., Jiang P., Sun X., Xu S., Ma X., Zhan R. // *Cell Mol. Neurobiol.* 2016. V. 36. № 8. P. 1219–1227.
- Muz B., de la Puente P., Azab F., Azab A.K. // *Hypoxia (Auckl)* 2015. V. 3. P. 83–92.
- Abels E.R., Maas S.L.N., Nieland L., Wei Z., Cheah P.S., Tai E., Kolsteeg C.J., Dusoswa S.A., Ting D.T., Hickman S., et al. // *Cell Rep.* 2019. V. 28. № 12. P. 3105–3119.
- Hu S., Xu L., Li L., Luo D., Zhao H., Li D., Peng B. // *Onco Targets Ther.* 2019. V. 12. P. 147–156.
- Yang Y., Gao X., Zhang M., Yan S., Sun C., Xiao F., Huang N., Yang X., Zhao K., Zhou H., et al. // *J. Natl. Cancer Inst.* 2018. V. 110. № 3. P. 304–315.
- Zhang M., Huang N., Yang X., Luo J., Yan S., Xiao F., Chen W., Gao X., Zhao K., Zhou H., et al. // *Oncogene.* 2018. V. 37. № 13. P. 1805–1814.
- Zhang M., Zhao K., Xu X., Yang Y., Yan S., Wei P., Liu H., Xu J., Xiao F., Zhou H., et al. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 4475.
- Jorjani H., Kehr S., Jedlinski D.J., Gumienny R., Hertel J., Stadler P.F., Zavolan M., Gruber A.R. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 11. P. 5068–5082.
- Yu Y., Xiao J., Hann S.S. // *Cancer Manag. Res.* 2019. V. 11. P. 5895–5909.
- Alles J., Fehlmann T., Fischer U., Backes C., Galata V., Minet M., Hart M., Abu-Halima M., Grässer F.A., Lenhof H.P., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2019. V. 47. № 7. P. 3353–3364.
- Xu T., Wu J., Han P., Zhao Z., Song X. // *BMC Genomics.* 2017. V. 18. (Suppl 6). P. 680.
- Kosmyna B., Gupta V., Query C. // *bioRxiv.* 2020. P. 01.24.917260.
- Ruan X., Li P., Chen Y., Shi Y., Pirooznia M., Seifuddin F., Suemizu H., Ohnishi Y., Yoneda N., Nishiwaki M., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 45.
- Jalali S., Gandhi S., Scaria V. // *Hum. Genomics.* 2016. V. 10. № 1. P. 35.
- Massone S., Ciarlo E., Vella S., Nizzari M., Florio T., Russo C., Cancedda R., Pagano A. // *Biochim. Biophys. Acta.* 2012. V. 1823. № 7. P. 1170–1177.
- Loewer S., Cabili M.N., Guttman M., Loh Y.H., Thomas K., Park I.H., Garber M., Curran M., Onder T., Agarwal S., et al. // *Nat. Genet.* 2010. V. 42. № 12. P. 1113–1117.
- Dahia P.L., FitzGerald M.G., Zhang X., Marsh D.J., Zheng Z., Pietsch T., von Deimling A., Haluska F.G., Haber D.A., Eng C. // *Oncogene.* 1998. V. 16. № 18. P. 2403–2406.
- Ruiz-Orera J., Messeguer X., Subirana J.A., Alba M.M. // *Elife.* 2014. P. e03523.
- Yoshimura H., Matsuda Y., Yamamoto M., Kamiya S., Ishiwata T. // *Front. Biosci. (Landmark Ed).* 2018. V. 23. P. 614–625.
- Poliseno L., Salmena L., Zhang J., Carver B., Haveman W.J., Pandolfi P.P. // *Nature.* 2010. V. 465. № 7301. P. 1033–1038.
- Bier A., Oviedo-landaverde I., Zhao J., Mamane Y., Kandouz M., Batist G. // *Mol. Cancer Ther.* 2009. V. 8. № 4. P. 786–793.
- Bier A., Oviedo-landaverde I., Zhao J., Mamane Y., Kandouz M., Batist G. // *Mol. Cancer Ther.* 2009. V. 8. № 4. P. 786–793.
- Cai X., Cullen B.R. // *RNA.* 2007. V. 13. № 3. P. 313–316.
- Tsai M.C., Manor O., Wan Y., Mosammaparast N., Wang J.K., Lan F., Shi Y., Segal E., Chang H.Y. // *Science.* 2010. V. 329. № 5992. P. 689–693.
- Lai F., Orom U.A., Cesaroni M., Beringer M., Taatjes D.J., Blobel G.A., Shiekhattar R. // *Nature.* 2013. V. 494. № 7438. P. 497–501.
- Yamazaki T., Hirose T. // *Front. Biosci. (Elite Ed).* 2015. V. 7. P. 1–41.
- Feng S., Yao J., Chen Y., Geng P., Zhang H., Ma X., Zhao J.,

- Yu X. // *J. Mol. Neurosci.* 2015. V. 56. № 3. P. 623–630.
39. Toraih E.A., El-Wazir A., Hussein M.H., Khashana M.S., Matter A., Fawzy M.S., Hosny S. // *Int. J. Biol. Markers.* 2019. V. 34. № 1. P. 69–79.
40. Kallen A.N., Zhou X.B., Xu J., Qiao C., Ma J., Yan L., Lu L., Liu C., Yi J.S., Zhang H., et al. // *Mol. Cell.* 2013. V. 52. № 1. P. 101–112.
41. Ke J., Yao Y.L., Zheng J., Wang P., Liu Y.H., Ma J., Li Z., Liu X.B., Li Z.Q., Wang Z.H., et al. // *Oncotarget.* 2015. V. 6. № 26. P. 21934–21949.
42. Ellis B.C., Molloy P.L., Graham L.D. // *Front. Genet.* 2012. № 3. P. 270.
43. Zheng J., Li X.D., Wang P., Liu X.B., Xue Y.X., Hu Y., Li Z., Li Z.Q., Wang Z.H., Liu Y.H. // *Oncotarget.* 2015. V. 6. № 28. P. 25339–25355.
44. Yao Y., Ma J., Xue Y., Wang P., Li Z., Liu J., Chen L., Xi Z., Teng H., Wang Z., et al. // *Cancer Lett.* 2015. V. 359. № 1. P. 75–86.
45. Yang X., Xiao Z., Du X., Huang L., Du G. // *Oncol. Rep.* 2017. V. 37. № 1. P. 555–562.
46. Chen Q., Cai J., Wang Q., Wang Y., Liu M., Yang J., Zhou J., Kang C., Li M., Jiang C. // *Clin. Cancer Res.* 2018. V. 24. № 3. P. 684–695.
47. Fu C., Li D., Zhang X., Liu N., Chi G., Jin X. // *Neurotherapeutics.* 2018. V. 15. № 4. P. 1139–1157.
48. Wang A., Wang H., Yang X. // *Biosci. Rep.* 2017. V. 37. № 6. P. BSR20170871.
49. Wang P., Liu Y.H., Yao Y.L., Li Z., Li Z.Q., Ma J., Xue Y.X. // *Cell Signal.* 2015. V. 27. № 2. P. 275–282.
50. Zhao X., Wang P., Liu J., Zheng J., Liu Y., Chen J., Xue Y. // *Mol. Ther.* 2015. V. 23. № 12. P. 1899–1911.
51. Wang Y., Xu Z., Jiang J., Xu C., Kang J., Xiao L., Wu M., Xiong J., Guo X., Liu H. // *Dev. Cell.* 2013. V. 25. № 1. P. 69–80.
52. Uroda T., Anastasakou E., Rossi A., Teulon J.M., Pellequer J.L., Annibale P., Pessey O., Inga A., Chillón I., Marcia M. // *Mol. Cell.* 2019. V. 75. № 5. P. 982–995.
53. Qin N., Tong G.F., Sun L.W., Xu X.L. // *Oncol. Res.* 2017. V. 25. № 9. P. 1471–1478.
54. Ma R., Zhang B.W., Zhang Z.B., Deng Q.J. // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2020. V. 24. № 5. P. 2601–2615.
55. Zhang S., Wang W., Liu G., Xie S., Li Q., Li Y., Lin Z. // *Biomed. Pharmacother.* 2017. № 95. P. 711–720.
56. Jin P., Huang Y., Zhu P., Zou Y., Shao T., Wang O. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2018. V. 503. № 3. P. 1570–1574.
57. Chi G., Yang F., Xu D., Liu W. // *Artif. Cells Nanomed. Biotechnol.* 2020. V. 48. № 1. P. 188–196.
58. Bian A., Wang Y., Liu J., Wang X., Liu D., Jiang J., Ding L., Hui X. // *Med. Sci. Monit.* 2018. V. 24. P. 5704–5712.
59. Zhang H.Y., Zhang B.W., Zhang Z.B., Deng Q.J. // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2020. V. 24. № 5. P. 2585–2600.
60. Barbagallo D., Caponnetto A., Brex D., Mirabella F., Barbagallo C., Lauretta G., Morrone A., Certo F., Broggi G., Caltabiano R., et al. // *Cancers (Basel).* 2019. V. 11. № 2. P. E194.
61. Li F., Ma K., Sun M., Shi S. // *Am. J. Transl. Res.* 2018. V. 10. № 5. P. 1373–1386.
62. Chen Y., Belmont A.S. // *Curr. Opin. Genet. Dev.* 2019. V. 55. P. 91–99.
63. Zhou X., Li X., Yu L., Wang R., Hua D., Shi C., Sun C., Luo W., Rao C., Jiang Z., et al. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2019. № 113. P. 75–86.
64. Kino T., Hurt D.E., Ichijo T., Nader N., Chrousos G.P. // *Sci. Signal.* 2010. V. 3. № 107. P. ra8.
65. Huo J.F., Chen X.B. // *J. Cell Biochem.* 2019. V. 120. № 4. P. 6127–6136.
66. Shen J., Hodges T.R., Song R., Gong Y., Calin G.A., Heimberger A.B., Zhao H. // *Mol. Carcinog.* 2018. V. 57. № 1. P. 137–141.
67. Zhang X., Hamblin M.H., Yin K.J. // *RNA Biol.* 2017. V. 14. № 12. P. 1705–1714.
68. Zhou Q., Liu J., Quan J., Liu W., Tan H., Li W. // *Gene.* 2018. № 668. P. 77–86.
69. Xiang J., Guo S., Jiang S., Xu Y., Li J., Li L., Xiang J. // *J. Korean Med. Sci.* 2016. V. 31. № 5. P. 688–694.
70. Han Y., Wu Z., Wu T., Huang Y., Cheng Z., Li X., Sun T., Xie X., Zhou Y., Du Z. // *Cell Death Dis.* 2016. V. 7. № 3. P. e2123.
71. Latorre E., Carelli S., Raimondi I., D’Agostino V., Castiglioni I., Zucal C., Moro G., Luciani A., Ghilardi G., Monti E., et al. // *Cancer Res.* 2016. V. 76. № 9. P. 2626–2636.
72. Chen B., Huang S. // *Cancer Lett.* 2018. V. 418. P. 41–50.
73. Li X., Yang L., Chen L.L. // *Mol. Cell.* 2018. V. 71. № 3. P. 428–442.
74. Zhang P., Wu W., Chen Q., Chen M. // *J. Integr. Bioinform.* 2019. V. 16. № 3. P. 20190027.
75. Deogharia M., Majumder M. // *Biology (Basel).* 2018. V. 8. № 1. P. 1.
76. Calin G.A., Dumitru C.D., Shimizu M., Bichi R., Zupo S., Noch E., Aldler H., Rattan S., Keating M., Rai K., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2002. V. 99. № 24. P. 15524–15529.
77. Adams B.D., Kasinski A.L., Slack F.J. // *Curr. Biol.* 2014. V. 24. № 16. P. 762–776.
78. Macfarlane L.A., Murphy P.R. // *Curr. Genom.* 2010. V. 11. № 7. P. 537–561.
79. Braun J.E., Truffault V., Boland A., Huntzinger E., Chang C.T., Haas G., Weichenrieder O., Coles M., Izaurralde E. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2012. V. 19. № 12. P. 1324–1331.
80. Liu J., Rivas F.V., Wohlschlegel J., Yates J.R. 3rd, Parker R., Hannon G.J. // *Nat. Cell Biol.* 2005. V. 7. P. 1261–1266.
81. Meijer H.A., Kong Y.W., Lu W.T., Wilczynska A., Spriggs R.V., Robinson S.W., Godfrey J.D., Willis A.E., Bushell M. // *Science.* 2012. V. 340. P. 82–85.
82. Guo H., Ingolia N.T., Weissman J.S., Bartel D.P. // *Nature.* 2010. V. 466. P. 835–840.
83. Lewis B.P., Burge C.B., Bartel D.P. // *Cell.* 2005. V. 120. № 1. P. 15–20.
84. Shea A., Harish V., Afzal Z., Chijioke J., Kedir H., Dusmatova S., Roy A., Ramalinga M., Harris B., Blacato J., et al. // *Cancer Med.* 2016. V. 5. № 8. P. 1917–1946.
85. Sun G., SiMa G., Wu C., Fan Y., Tan Y., Wang Z., Cheng G., Li J. // *PLoS One.* 2018. V. 13. № 1. P. e0190515.
86. Papagiannakopoulos T., Shapiro A., Kosik K.S. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. № 19. P. 8164–8172.
87. Yang C.H., Yue J., Pfeffer S.R., Fan M., Paulus E., Hosni-Ahmed A., Sims M., Qayyum S., Davidoff A.M., Handorf C.R., et al. // *J. Biol. Chem.* 2014. V. 289. P. 25079–25087.
88. Xiuju C., Zhen W., Yanchao S. // *Open Med. (Wars.)* 2016. V. 11. № 1. P. 133–137.
89. Kefas B., Comeau L., Floyd D.H., Seleverstov O., Godlewski J., Schmittgen T., Jiang J., di Pierro C.G., Li Y., Chiocca E.A., et al. // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 48. P. 15161–15168.
90. Tian Y., Nan Y., Han L., Zhang A., Wang G., Jia Z., Hao J., Pu P., Zhong Y., Kang C. // *Int. J. Oncol.* 2012. V. 40. № 4. P. 1105–1112.
91. Liu X., Zheng J., Xue Y., Yu H., Gong W., Wang P., Li Z., Liu Y. // *Theranostics.* 2018. V. 8. № 4. P. 1084.
92. Jacobs D.I., Qin Q., Fu A., Chen Z., Zhou J., Zhu Y. // *Oncotarget.* 2018. V. 9. P. 37616–37626.
93. Shen S., Yu H., Liu X., Liu Y., Zheng J., Wang P., Gong W., Chen J., Zhao L., Xue Y. // *Mol. Ther. Nucl. Acid.* 2018. V. 10. P. 412–425.

94. Jacobs D.I., Qin Q., Lerro M.C., Fu A., Dubrow R., Claus E.B., DeWan A.T., Wang G., Lin H., Zhu Y. // *Cancer Epidemiol. Biomarkers Prev.* 2016. V. 25. № 7. P. 1073–1080.
95. Xia X.-R., Li W.-C., Yu Z.-T., Li J., Peng C.-Y., Jin L., Yuan G.-L. // *Histochem. Cell Biol.* 2020. V. 153. P. 257–269.
96. Xu B., Ye M.H., Lv S.G., Wang Q.X., Wu M.J., Xiao B., Kang C.S., Zhu X.G. // *Oncotarget.* 2017. V. 8. № 27. P. 43953–43966.
97. Chen L., Han L., Wei J., Zhang K., Shi Z., Duan R., Li S., Zhou X., Pu P., Zhang J., Kang C. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 8588.
98. Suzuki H., Kumar S.A., Shuai S. // *Nature.* 2019. V. 574. № 7780. P. 707–711.
99. Gaur A.B., Holbeck S.L., Colburn N.H., Israel M.A. // *Oncol.* 2011. V. 13. P. 580–590.
100. Li Y., Li W., Yang Y., Lu Y., He C., Hu G., Liu H., Chen J., He J., Yu H. // *Brain Res.* 2009. V. 1286. P. 13–18.
101. Gabriely G., Wurdinger T., Kesari S., Esau C.C., Burchard J., Linsley P.S., Krichevsky A.M. // *Mol. Cell. Biol.* 2008. V. 28. P. 5369–5380.
102. Hong X., Sin W.C., Harris A.L., Naus C.C. // *Oncotarget.* 2015. V. 6. № 17. P. 15566–15577.
103. Qian M., Wang S., Guo X., Wang J., Zhang Z., Qiu W., Gao X., Chen Z., Xu J., Zhao R., et al. // *Oncogene.* 2020. V. 39. P. 428–442.
104. Kefas B., Godlewski J., Comeau L., Li Y., Abounader R., Hawkinson M., Lee J., Fine H., Chiocca E.A., Lawler S., et al. // *Cancer Res.* 2008. V. 68. № 10. P. 3566–3572.
105. Jun G.J., Zhong G.G., Ming Z.S. // *Oncol. Lett.* 2015. V. 9. № 6. P. 2743–2749.
106. Xia H., Yan Y., Hu M., Wang Y., Wang Y., Dai Y., Chen J., Di G., Chen X., Jiang X. // *Neuro Oncol.* 2013. V. 15. № 4. P. 413–422.
107. Saito K., Nishida K.M., Mori T., Kawamura Y., Miyoshi K., Nagami T., Siomi H., Siomi M.C. // *Genes Dev.* 2006. V. 20. P. 2214–2222.
108. Aravin A.A. // *Nature.* 2006. V. 442. P. 203–207.
109. Yamanaka S., Siomi M.C., Siomi H. // *Mob. DNA.* 2014. V. 5. P. 22.
110. Weick E.M., Miska E.A. // *Development.* 2014. V. 141. № 18. P. 3458–3471.
111. Ozata D.M., Gainetdinov I., Zoch A., O'Carroll D., Zamore P.D. // *Nat. Rev. Genet.* 2019. V. 20. № 2. P. 89–108.
112. Weng W., Li H., Goel A. // *Biochim. Biophys. Acta Rev. Cancer.* 2019. V. 1871. № 1. P. 160–169.
113. Cheng Y., Wang Q., Jiang W., Bian Y., Zhou Y., Gou A., Zhang W., Fu K., Shi W. // *Aging (Albany NY).* 2019. V. 11. № 21. P. 9932–9946.
114. Kufel J., Grzechnik P. // *Trends Genet.* 2019. V. 35. № 2. P. 104–117.
115. Liu Y., Dou M., Song X., Dong Y., Liu S., Liu H., Tao J., Li W., Yin X., Xu W. // *Mol. Cancer.* 2019. V. 18. № 1. P. 123.
116. Xia X.R., Li W.C., Yu Z.T., Li J., Peng C.Y., Jin L., Yuan G.L. // *Histochem. Cell Biol.* 2020. V. 153. № 4. P. 257–269.
117. Reddy R., Henning D., Das G., Harless M., Wright D. // *J. Biol. Chem.* 1987. V. 262. P. 75–81.
118. Huang Y., Maraja R.J. // *Nucl. Acids Res.* 2001. V. 29. P. 2675–2690.
119. Fischer U., Englbrecht C., Chari A. // *Wiley Interdiscip. Rev. RNA.* 2011. V. 2. № 5. P. 718–731.
120. Godfrey A.C., Kupsco J.M., Burch B.D., Zimmerman R.M., Dominski Z., Marzluff W.F., Duronio R.J. // *RNA.* 2006. V. 12. № 3. P. 396–409.
121. Peculis B.A., Steitz J.A. // *Cell.* 1993. V. 73. № 6. P. 1233–1245.
122. Wilkinson M.E., Charenton C., Nagai K. // *Annu. Rev. Biochem.* 2020. V. 89. P. 359–388.
123. Fica S.M., Nagai K. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2017. V. 24. № 10. P. 791–799.
124. Bielli P., Pagliarini V., Pieraccioli M., Caggiano C., Sette C. // *Cells.* 2019. V. 9. № 1. P. 10.
125. Shuai S., Suzuki H., Diaz-Navarro A., Nadeu F., Kumar S.A., Gutierrez-Fernandez A., Delgado J., Pinyol M., López-Otín C., Puente X.S., et al. // *Nature.* 2019. V. 574. № 7780. P. 712–716.
126. Pavlyukov M.S., Yu H., Bastola S., Minata M., Shender V.O., Lee Y., Zhang S., Wang J., Komarova S., Wang J. // *Cancer Cell.* 2018. V. 34. № 1. P. 119–135.e10.
127. Rasool M., Malik A., Zahid S., Basit Ashraf M.A., Qazi M.H., Asif M., Zaheer A., Arshad M., Raza A., Jamal M.S. // *Noncoding RNA Res.* 2016. V. 1. № 1. P. 69–76.
128. Hanna J., Hossain G.S., Kocerha J. // *Front. Genet.* 2019. V. 10. P. 478.
129. Adams D., Gonzalez-Duarte A., O'Riordan W.D., Yang C.C., Ueda M., Kristen A.V., Tournev I., Schmidt H.H., Coelho T., Berk J.L., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2018. V. 379. № 1. P. 11–21.
130. Cheng J., Meng J., Zhu L., Peng Y. // *Mol. Cancer.* 2020. V. 19. № 1. P. 66.
131. Yang J.K., Yang J.P., Tong J., Jing S.Y., Fan B., Wang F., Sun G.Z., Jiao B.H. // *J. Neurooncol.* 2017. V. 131. № 2. P. 255–265.
132. Shi R., Wang P.Y., Li X.Y., Chen J.X., Li Y., Zhang X.Z., Zhang C.G., Jiang T., Li W.B., Ding W., et al. // *Oncotarget.* 2015. V. 6. № 29. P. 26971–26981.
133. Akers J.C., Ramakrishnan V., Kim R., Skog J., Nakano I., Pingle S., Kalinina J., Hua W., Kesari S., Mao Y., et al. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 10. P. e78115.
134. Manterola L., Guruceaga E., Gállego Pérez-Larraya J., González-Huarriz M., Jauregui P., Tejada S., Diez-Valle R., Segura V., Samprón N., Barrena C., et al. // *Neuro Oncol.* 2014. V. 16. № 4. P. 520–527.
135. Springfeld C., Jäger D., Büchler M.W., Strobel O., Hackert T., Palmer D.H., Neoptolemos J.P. // *Presse Med.* 2019. V. 48 (3 Pt 2). P. e159–e174.
136. Valencia-Serna J., Aliabadi H.M., Manfrin A., Mohseni M., Jiang X., Uludag H. // *Eur. J. Pharm. Biopharm.* 2018. V. 130. P. 66–70.
137. Ren Y., Wang Y.F., Zhang J., Wang Q.X., Han L., Mei M., Kang C.S. // *Clin. Epigenetics.* 2019. V. 11. № 1. P. 29.
138. Li Y., Ren Y., Wang Y., Tan Y., Wang Q., Cai J., Zhou J., Yang C., Zhao K., Yi K., et al. // *Theranostics.* 2019. V. 9. № 16. P. 4608–4623.
139. Shi J., Lv S., Wu M., Wang X., Deng Y., Li Y., Li K., Zhao H., Zhu X., Ye M. // *Clin. Transl. Med.* 2020. V. 1. P. 182–198.
140. Abulwerdi F.A., Xu W., Ageeli A.A., Yonkunas M.J., Arun G., Nam H., Schneekloth J.S.Jr., Dayie T.K., Spector D., Baird N., et al. // *ACS Chem. Biol.* 2019. V. 14. № 2. P. 223–235.
141. Kotake Y., Sagane K., Owa T., Mimori-Kiyosue Y., Shimizu H., Uesugi M., Ishihama Y., Iwata M., Mizui Y. // *Nat. Chem. Biol.* 2007. V. 3. № 9. P. 570–575.
142. Kaida D., Motoyoshi H., Tashiro E., Nojima T., Hagiwara M., Ishigami K., Watanabe H., Kitahara T., Yoshida T., Nakajima H., et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2007. V. 3. № 9. P. 576–583.
143. Folco E.G., Coil K.E., Reed R. // *Genes Dev.* 2011. V. 25. № 5. P. 440–444.
144. Corrionero A., Miñana B., Valcárcel J. // *Genes Dev.* 2011. V. 25. № 5. P. 445–459.
145. Roybal G.A., Jurica M.S. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. № 19. P. 6664–6672.
146. Steensma D.P., Wermke M., Klimek V.M., Greenberg P.L., Font P., Komrokji R.S., Yang J., Brunner A.M., Carraway H.E., Ades L., et al. // *Blood.* 2019. V. 134. P. 673.
147. Shen S., Yu H., Liu X., Liu Y., Zheng J., Wang P., Gong W., Chen J., Zhao L., Xue Y. // *Mol. Ther. Nucl. Acids.* 2018. V. 10. P. 412–425.

УДК 577.25

Молекулярные инструменты направленного контроля электрической активности нервных клеток. Часть I

Д. В. Колесов, Е. Л. Соколинская, К. А. Лукьянов, А. М. Богданов*

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

*E-mail: noobissat@ya.ru

Поступила в редакцию 24.08.2020

Принята к печати 14.05.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11414

РЕФЕРАТ Проблема специфического воздействия на биохимические процессы в клетке остается актуальной для современной биологической науки. Конечной целью такого воздействия на электровозбудимые клетки является управление электрической активностью: возбуждение с последующей генерацией потенциала действия или торможение с угнетением волны возбуждения. Особую значимость технологии управления активностью электровозбудимых клеток приобретают в контексте решения крупнейшей фундаментальной задачи – изучения функционирования нервной системы высших многоклеточных организмов. В текущий момент, когда нейробиология отказывается от редукционистского подхода в пользу прямого изучения сложных нейрональных систем, малоинвазивные методы стимуляции активности мозговых структур становятся основой технического арсенала этой науки. В настоящем обзоре мы описываем три группы подходов, основанных на доставке в нервную ткань чувствительных к внешним стимулам генетически кодируемых молекул. Эти подходы – оптогенетика (ей посвящена первая часть работы), хемогенетика и термогенетика (описаны во второй части обзора) – отличаются не только природой стимулов и структурой соответствующих эффекторных белков, но и своеобразием экспериментального применения. Последнее обстоятельство заставляет рассматривать их не как конкурирующие, а, скорее, как взаимодополняющие технологии.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА оптогенетика, хемогенетика, термогенетика, потенциал действия, мембранный потенциал, нейроинтерфейс, ионные каналы, каналный родопсин, хеморецепторы, GPCR, стимуляция активности нейронов, возбуждение нейронов, торможение нейронов.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АФК – активные формы кислорода; ИК – инфракрасный; AAV – аденоассоциированный вирус (Adeno-Associated Virus); BLUF – sensors of Blue Light Using Flavin adenine dinucleotide; ChR – каналный родопсин (Channel Rhodopsin); CIB1 – Cryptochrome Interacting BHLH 1; COP1 – coat protein complex 1; DBS – глубокая стимуляция мозга (Deep Brain Stimulation); GFP – зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein); LOV – Light-Oxygen-Voltage; PhoCl – фоторасщепляемый (Photo Cleavable); PHR – Photolyase Homology Related domain; PICCORO – P1xD Complex dependent CONTROL of transcription; PIF – Phytochrome-Interacting Factor; UVR8 – UV-B resistance 8 protein.

ВВЕДЕНИЕ

Расшифровка принципов функционирования нервной системы высших многоклеточных – крупнейшая фундаментальная проблема. Традиционным подходом к ее решению многие десятилетия был редукционизм, т.е. экстраполяция результатов наблюдений в простых модельных системах на сложнейшие нейрональные ансамбли, не поддающиеся прямому анализу (такие, как головной мозг млекопитающих). Многочисленные недостатки этого пути, а также по-

явление революционных технологий визуализации и стимуляции клеточных процессов подтолкнули нейробиологов к прямому изучению всех уровней организации нервной системы и сложных биологических феноменов, связанных с ее функционированием.

Сегодня важное место в арсенале нейронаук занимают малоинвазивные методы селективной стимуляции активности нервных клеток и мозговых структур. Здесь мы описываем главные из них –

оптогенетику (первая часть обзора), хемогенетику и термогенетику (вторая часть), – делая акцент на природе, физико-химических свойствах и принципах разработки эффекторных молекул, опосредующих клеточную стимуляцию и задействованных в биохимических и нейробиологических экспериментах. Также мы остановимся на молекулярных механизмах, лежащих в основе функционирования этих генетически кодируемых инструментов.

В обзоре уделено внимание ключевым характеристикам описываемых подходов (пространственному и временному разрешению, токсичности, инвазивности и пр.), проведен сравнительный анализ этих характеристик применительно к актуальным задачам современной нейробиологии, обсуждаются перспективы совершенствования инструментов нейростимуляции.

ОПТОГЕНЕТИКА

Оптогенетика – это группа методов, в которых облучение светом видимой части спектра используют для контроля функциональной активности клеток посредством светочувствительных белков, гены которых вносятся в биологическую систему заранее (для детального обзора см. [1–7]). Свет – не только основной источник первичной энергии анаболических процессов для всей биоты, но и важнейший физический стимул, играющий ключевую роль в физиологии и биохимии организмов всех царств живого. В ходе эволюции сформировался богатый репертуар светочувствительных молекул, различающихся по своим физическим и биохимическим свойствам, структуре и функциям [8–14]. Это обстоятельство создает предпосылки для применения в оптогенетике широкого спектра генетически кодируемых эффекторных молекул для воздействия на самые разнообразные биохимические мишени [2, 3, 7].

До разработки оптогенетических инструментов для воздействия светом на клеточную физиологию использовали химические соединения, имеющие фотолабильные связи. Фотоэффекторы такого типа, включающие фотоактивируемые аминокислоты, олигонуклеотиды и соединения для светозависимого высвобождения других молекул, активно разрабатываются и применяются до сих пор, развиваясь независимо от генетически кодируемых инструментов [15–17].

Оптогенетика в молекулярной биологии

В молекулярной биологии оптогенетический подход применяется прежде всего для контроля и управления белок-белковыми взаимодействиями [2, 18, 19]. Эффекторными молекулами здесь служат природные белки или отдельные домены, олигомерное со-

стояние которых или взаимодействие с другими белками изменяется при поглощении света, например, фитохромы, бактериофитохромы и криптохромы.

Фитохромы – растительные фоторецепторы, несущие ковалентно связанный тетрапиррольный хромофор, чувствительный в красной области спектра [18, 20]. Оптогенетическое применение этих белков основано в первую очередь на природном светозависимом обратимом взаимодействии фитохрома PhyV с транскрипционными факторами PIF3 и PIF6, а наиболее яркими примерами служат системы оптического контроля активности фактора транскрипции Gal4 [21] и активации белкового сплайсинга [22] в клетках дрожжей, быстрой обратимой транслокации активаторов GTP-аз семейства Rho на плазматическую мембрану клеток млекопитающих [23]. Криптохромы – FAD-содержащие, чувствительные в сине-фиолетовой спектральной области фоторецепторы, найденные во всех клеточных формах жизни, также способны к фотодимеризации с белками-партнерами. В частности, феномен фотодимеризации растительного криптохрома CRY2 с транскрипционным фактором CIB1 [24–27] использовали для демонстрации светозависимой рекомбинации ДНК [28] и управления эпигенетическим статусом хроматина [29] в клетках млекопитающих. Описано также применение CRY/CIB-системы для управления транскрипцией в дрожжах [30] и контроля активности метаболизма фосфоинозиотида в клетках COS-7 с высоким пространственным разрешением [31]. На основе светочувствительных PHR-доменов CRY2 разработаны инструменты управления выбросом внутриклеточного кальция [32], в том числе, функционирующие в индивидуальных T-клетках *in vivo* [33].

Трехмерная укладка некоторых фотобелков способна существенно изменяться в ответ на поглощение света [2, 18, 19]. В оптогенетике это свойство используется для воздействия на молекулярные мишени. Ярким примером здесь служат белки LOV (Light-Oxygen-Voltage), крупного семейства светочувствительных флавопротеинов, обнаруженных в клетках растений, грибов и бактерий [34–36]. На основе LOV-доменов созданы десятки оптогенетических методик [2, 18], например, управление генной экспрессией [37, 38], модуляция ферментативной активности [39] и сигналинга с участием циклических нуклеотидов [40], регулирование редактирования генома [41], фотосенсибилизация [42].

Флавопротеины семейства BLUF (sensors of Blue Light Using Flavin adenine dinucleotide), имеющие в основном бактериальное происхождение, подвергаются подобно LOV-доменам фотоактивации, сопровождаемой структурными перестройками [43–47].

Среди оптогенетических применений этих флавопротеинов – система активации транскрипции PICCOLO [48], фотоактивация аденилатциклаз [49, 50] и гуанилатциклаз [51].

Отдельную группу оптогенетических эффектов образуют фоторецепторы UVR8, поглощающие в УФ-диапазоне за счет собственных остатков триптофана и задействованные в фотопротекторных реакциях у растений [52]. В растительных клетках гомодимеры UVR8 диссоциируют под действием ультрафиолета, а мономеры связываются с Е3-убиквитинлигазой COP1 [52–56]. Описано применение этого белка для направленной регуляции транскрипции [19, 57, 58] и управления внутриклеточным транспортом белков и их секрецией [59]. В оптогенетическом контроле транскрипции находят применение и прокариотические белки семейства ксантопсинов [60, 61], несущие ковалентно связанный хромофор на основе *n*-кумаровой кислоты и обладающие необычным фотоциклом [62].

Обратимое светоиндуцируемое взаимодействие бактериального фитохрома BphP1 и его нативного белка-партнера PpsR2 легло в основу еще одной платформы для оптогенетических экспериментов на основе бактериальных белков [63]. К уникальным характеристикам системы BphP1–PpsR2 относятся ее активация в диапазоне волн ближнего ИК-излучения (740–780 нм), способность использовать в качестве хромофора эндогенный биливердин эукариот, включая млекопитающих, а также спектральная совместимость с оптогенетическими системами на основе синего света [63]. Дальнейшее изучение системы привело к созданию ее модернизированного варианта, где в качестве партнера BphP1 вместо нативного PpsR2 используется белок Q-PAS, полученный методами генной инженерии [64]. Система на основе Q-PAS не имеет ограничений, вызванных такими свойствами белка PpsR2, как крупный размер, мультидоменная структура и склонность к олигомеризации [64].

Систему на основе бактериального фитохрома BphP1 также использовали для оптогенетического контроля активности рецепторных тирозинкиназ [65]. С этой целью каталитический домен тропомизоиновых киназ TrkA и TrkB, присутствующих на клеточной мембране в форме инактивированных димеров, слили с фоточувствительным кором BphP1. Димеризация BphP1 под воздействием дальнекрасного (640–680 нм) и ближнего инфракрасного (740–780 нм) излучения активировала киназный димер и позволяла обратимо модулировать активность фермента при помощи света [65].

Белки семейства зеленого флуоресцентного белка (Green Fluorescent Protein, GFP) широко применя-

ются как полностью генетически кодируемые флуоресцентные метки. Вместе с тем, известно несколько примеров использования GFP-подобных белков в оптогенетике. Так, обнаружено, что у обратимо фотопереключаемого белка Dronpa одновременно с изменением флуоресцентных свойств изменяется олигомерное состояние – он мономеризуется после облучения синим светом [66]. Это свойство использовали для светозависимого включения активности целевых белков (например, протеинкиназ), фланкированных с N- и C-концов мономерами Dronpa и неактивных в темноте из-за стерического блокирования димером флуоресцентного белка [66, 67]. Другой пример – создание фоторазрезаемого белка на основе mMaple [68], который характеризуется необратимой фотоконверсией из зеленого в красное флуоресцентное состояние. Хотя эта фотоконверсия сопровождается разрывом полипептидной цепи перед хромофором, две части белка остаются прочно связанными за счет множества нековалентных взаимодействий. Получен [69] пермутированный вариант mMaple, названный PhoCl (**Ph**oto **C**leavable), который спонтанно диссоциирует на две части после воздействия светом 405 нм. PhoCl использовали для создания белков со светоиндуцируемой активностью: рекомбиназы Cre, транскрипционного фактора Gal4, вирусной протеазы HCVp, а также фоторасщепляемого кадгерина, для изучения передачи механического натяжения между клетками [69, 70].

Отдельным направлением оптогенетики является использование фототоксичных белков, т.е. белков, которые под действием света производят существенные количества активных форм кислорода (АФК) [71, 72]. Наибольшую популярность получили фототоксичные белки KillerRed (GFP-подобный красный флуоресцентный белок) и miniSOG (флавинсвязывающий белок на основе LOV-домена), а также их мутированные варианты [42, 73–75]. К преимуществам таких генетически кодируемых фотосенсибилизаторов (по сравнению с обычными – химическими) относится возможность направить их в любые клеточные компартменты и субкомпартменты с помощью белковых сигналов локализации, а на уровне организма – в целевые клеточные популяции с помощью тканеспецифических или индуцируемых промоторов. Локальная продукция АФК позволяет направленно влиять на биологические системы, например, инактивировать целевые белки [73, 76], запускать различные пути клеточной гибели [77–79], вносить повреждения в геномную ДНК [80], уничтожать целевые клетки в модельных организмах [81–83].

В конструировании оптогенетических систем широко применяется белковая инженерия [2, 18], что позволяет не только встраивать молекулы эф-

фактора в контекст целевых внутриклеточных взаимодействий, но и адаптировать их функционирование к выполнению конкретной экспериментальной задачи. Подобную адаптацию можно проиллюстрировать на примере *optobody* – оптогенетически активируемого внутриклеточного антитела (Intracellular antibody, *iB*), построенного на основе модифицированных LOV-доменов (а именно, так называемых Magnets – химерных вариантов фоторецептора Vivid, способных к светозависимой гетеродимеризации [84]) и фрагментов наноантитела к GFP [85]. Составной оптогенетический инструмент на основе рекомбинантных *iBs* был использован для обратимой регуляции активности эндогенных белков в клетках млекопитающих [86]. Направляя эффекторы двух оптогенетических систем (VphP1-Q-PAS, чувствительной к ближнему ИК-излучению, и LOV, активируемой синим светом) с помощью флуоресцентно меченного *iB*, можно воздействовать на функционирование эндогенного актина и GTP-азы RAS [86].

Выделяют две группы оптогенетических манипуляций по их молекулярному механизму: аллостерические, где светочувствительный домен влияет на ферментативную активность или доступ к сайту связывания субстрата, и димеризационные, т.е. связанные со светозависимым изменением олигомерного статуса эффекторных доменов, влияющим на активность целевых белков в составе химерной молекулы. Возможны и комбинации двух подходов [18]. Как мы проиллюстрировали выше, такое косвенное участие оптических эффекторов применяется в широком спектре модельных систем, однако оно не характерно для нейробиологической оптогенетики. Для контроля активности электровозбудимых клеток используют эффекторные молекулы, оказывающие прямое воздействие на физиологический статус клеток.

Оптогенетика в нейробиологии

Активность электровозбудимых клеток тесно связана с электрическим потенциалом на их плазматической мембране [87]. Он создается, в частности, благодаря функционированию управляемых потенциалом селективных ионных каналов, т.е. каналов, пропускающих определенные ионы при определенном уровне поляризации мембраны [87]. Благодаря наличию трансмембранного градиента ионов, к которым потенциал-зависимые каналы селективны (в первую очередь, Na^+ , K^+ , Cl^-), происходит кратковременный сдвиг мембранного потенциала, называемый потенциалом действия. При деполяризации мембраны ниже порогового уровня или при ее гиперполяризации возникающий ток быстро затухает или интегрируется с другими ионными токами, что может, в за-

висимости от направления интегрируемых токов, инициировать или наоборот препятствовать возникновению нового потенциала действия. Таким образом, путем изменения величин трансмембранных ионных токов и соотношения количеств ионов внутри и снаружи клетки можно управлять функциональной активностью клеток, используя различные ионные транспортеры.

Первое сообщение об активации нейронов светом датируется 1971 годом, когда обнаружили, что лазерное излучение способно неспецифически возбуждать нервные клетки в тканях моллюска аплизии [88]. Способность генетически кодируемых эффекторных молекул влиять на трансмембранные ионные токи при активации светом впервые наблюдали при гетерологической экспрессии бактериородопсина в ооцитах *Xenopus laevis* [89]. В этой же системе показана индукция фототоков при экспрессии канального родопсина 1 (channelopsin-1) [90], ретинолсодержащего протонного канала из зеленой одноклеточной водоросли *Chlamydomonas reinhardtii*. Примечательно, что этот фоторецептор, обладающий высокой гомологией с бактериородопсинами, играет роль в фототаксисе клеток водоросли [91]. Позже была осуществлена функциональная экспрессия канального родопсина 2 (ChR2) из *C. reinhardtii* в клетках млекопитающих, описана его активность как светозависимого катионного канала, способного деполяризовать клеточную мембрану [92]. Один из первых примеров применения оптогенетического инструмента для стимуляции нейронов связан с экспрессией родопсина из *Drosophila* в первичной культуре нейронов крысы [93]. В этом случае, однако, минимальный набор трансгенов, обеспечивающий функционирование эффектора, составлял три кодирующие последовательности (собственно родопсин, аррестин-2 и α -субъединица G-белка), латентность электрических ответов – от сотен миллисекунд до секунд, а сам эксперимент требовал добавления к клеткам раствора ретиналя. Наконец, почти одновременно в четырех работах показано управление нейрональной активностью с помощью однокомпонентных оптогенетических эффекторов на основе канального родопсина 2 (ChR2) [94–97]. С методологической точки зрения эти работы являются фундаментом современной нейробиологической оптогенетики. Примечательно, что эффективность канального родопсина позволила уже в ранних экспериментах использовать сложные модельные системы, в частности, управлять поведением нематоды *Caenorhabditis elegans* [96] и частично восстанавливать зрительную чувствительность трансгенных мышей с дегенеративными нарушениями сетчатки [97]. В этих пионерских работах описано высокое пространственное

и временное разрешение активации: сообщается о стимуляции в миллисекундной временной шкале [94] или с частотами до 20 Гц [96], а также о возможности прицельного воздействия на тонкие субклеточные структуры нейронов.

Эффекторные молекулы

Итак, важнейшим классом эффекторных молекул в оптогенетике электровозбудимых клеток служат родопсины [1, 3, 98, 99] (разнообразие родопсинов проиллюстрировано на *рис. 1*). Эти светочувствительные трансмембранные белки несут хромофорную группу на основе ретиналя, которая в форме протонированного основания Шиффа ковалентно (через остаток лизина) пришта к седьмой трансмембранной спирали белкового остова [100, 101]. Родопсины образуют два независимых семейства – микробные родопсины (или родопсины типа 1) и родопсины животных (или родопсины типа 2). Несмотря на структурное сходство, представители родопсинов этих двух типов характеризуются чрезвычайно низкой гомологией аминокислотных последовательностей, возникнув, по-видимому независимо, в результате конвергентной эволюции [102]. Родопсины типа 2 известны прежде всего как зрительные пигменты, специфически экспрессирующиеся в клетках (палочках) сетчатки животных, однако белки этого семейства вовлечены и в другие физиологические процессы как связанные, так и не связанные с фоторецепцией [100, 102]. Механизм трансдукции сигнала при фоторецепции является важной отличительной особенностью родопсинов типа 2. Так, зрительный (палочковый) родопсин вовлекает в свой функциональный цикл как минимум три цитоплазматических белка: G-белок трансдуцин, родопсинкиназу и аррестин. Это обстоятельство затрудняет использование родопсинов животных в гетерологических системах и тем самым снижает их ценность как оптогенетических эффекторов. Микробные родопсины обнаружены в археях, бактериях, эукариотических микроорганизмах (водорослях и грибах) и даже в составе гигантских вирусов [100–105]. Молекулы этого семейства выполняют широкий спектр функций, связанных со светочувствительностью: светозависимая ферментативная активность, фоторецепция, транспорт ионов [100, 103, 106]. Родопсины, участвующие в транспорте ионов, в свою очередь, подразделяются по принципу функционирования на ионные помпы и каналы. Именно ионотранспортирующие родопсины, способные создавать токи в клеточной мембране и изменять ее поляризацию, применяются в оптогенетике в качестве эффекторов (*рис. 1*). Среди микробных родопсинов дикого типа к ним относятся бактериородопсины, протон-

ные помпы, выкачивающие эти катионы из клетки; галородопсины, хлоридные помпы, закачивающие Cl^- в клетку, и каналные родопсины – катионно-селективные каналы, проводящие через мембрану ионы H^+ , Na^+ , K^+ и Ca^{2+} [3, 107, 108]. Белки первых двух групп при фотоактивации (зеленым и желтым светом соответственно) вызывают гиперполяризацию мембраны, что в случае электровозбудимых клеток приводит к угнетению потенциала действия, выступая тем самым в роли ингибиторных эффекторов [107] (*рис. 1*). Канальные родопсины, поглощая синий свет, напротив, деполяризуют мембрану и способствуют возбуждению нервных клеток. Разрешение пространственной структуры канальных родопсинов [109] позволило применить принципы рационального дизайна при разработке химерных вариантов этих белков и изменить селективность ионной поры с катионной на анионную [110, 111], расширив репертуар оптогенетических ингибиторов. Чуть позже были обнаружены и природные каналные родопсины, проводящие хлорид-анион [112]. Помимо отмеченных выше ингибиторных канальных родопсинов, методами белковой инженерии разработана целая палитра искусственных вариантов канальных родопсинов, оптимизированных для решения частных оптогенетических задач. Сюда относятся «быстрые» каналные родопсины (например, ChETA, ChIEF, Chronos), позволяющие, в частности, производить высокочастотную (до 200 Гц) стимуляцию нейронов [1, 113–115], так называемые step-function-опсины [116], характеризующиеся существенно увеличенным временем инактивации и позволяющие при малой продолжительности светового стимула сравнительно долго поддерживать соответствующий трансмембранный ток (существуют варианты как вызывающие деполяризацию мембраны [117], так и ингибиторные, гиперполяризующие [110]).

Канальные родопсины дикого типа активируются синим светом, который плохо проникает в толщу биологической ткани и может быть токсичным для нейронов. Кроме того, синим светом возбуждается большинство существующих флуоресцентных индикаторов катионов кальция, которые могут использоваться совместно с оптогенетическими инструментами. В этой связи был разработан ряд спектрально оптимизированных вариантов канальных родопсинов с максимумами поглощения, сдвинутыми в красную область (к ним относятся VChR1, C1V1, Chrimson, ReaChR и др.) [1, 114, 117–120] (*рис. 1*). Родопсины с искусственно измененной катионной проницаемостью представлены, в частности, таким вариантом, как CatCh (calcium-translocating channelrhodopsin), предпочтительно проводящим ионы Ca^{2+} и востребованным в исследованиях, посвященных кальциево-

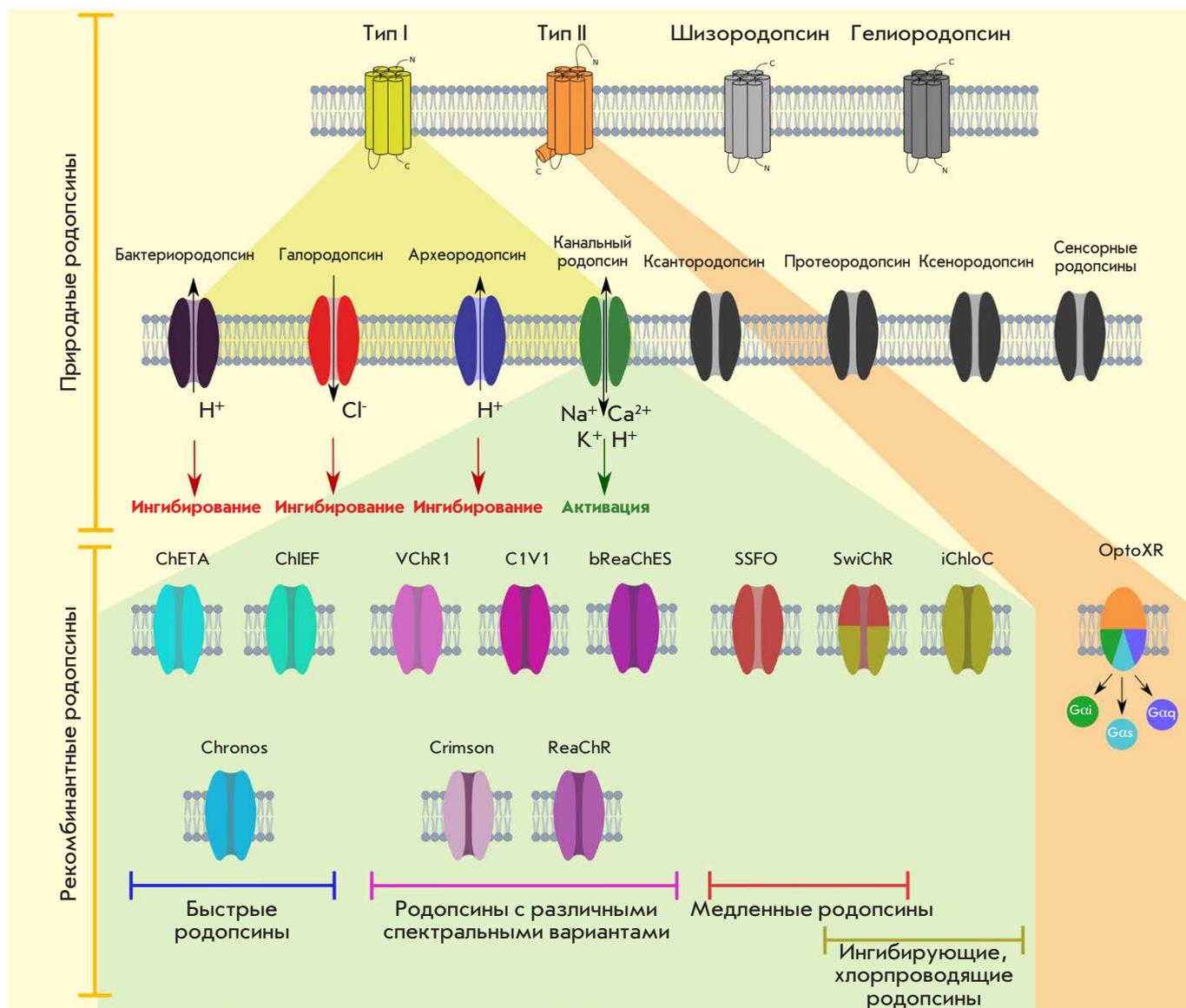


Рис. 1. Разнообразие родопсинов и их использование в оптогенетике. В верхнем ряду – четыре крупнейших семейства природных родопсинов. Во втором ряду сверху – основные группы микробных родопсинов. Ниже – химерные каналные родопсины (слева) и производные родопсинов высших многоклеточных животных (справа), оптимизированные для выполнения специальных оптогенетических задач. В двух верхних рядах серым цветом показаны семейства/типы родопсинов, пока не нашедшие применения в оптогенетике; спектральными цветами – задействованные в оптогенетике. Для химерных молекул введена цветовая дифференциация в связи с их функциональными особенностями (расшифровка цветовой легенды в нижней части рисунка)

му сигналингу [121]. Кроме того, у морских бактерий открыты уникальные родопсины, функционирующие как Na^+ -помпы [122], на основе которых удалось создать селективные переносчики катионов калия, рубидия и цезия [123, 124]. Недавно был предложен изящный метод генно-инженерной модификации мутанта ChR2, приводящий к инверсии топологии встройки этого белка в клеточную мембрану и изме-

нению эффекта его фотоактивации с активирующего на ингибирующий [125, 126].

Последние несколько лет были насыщены открытиями новых групп и даже целых семейств родопсинов, которые могут рассматриваться как перспективные оптогенетические инструменты. Так, каналные родопсины *Gt_CCR1-4* жгутиковой одноклеточной водоросли *Guillardia theta*, представляю-

щие собой светочувствительные катионные каналы, оказались структурно ближе к родопсинам галоархей, чем к «классическому» ChR2 [106, 127, 128]. Недавно показали, что *Gt_CCR4*, имеющий схожую с ChR2 кинетику активации/инактивации, обладает существенно большей светочувствительностью, а также большей селективностью в отношении катионов натрия [106, 129]. В 2018 году методами функциональной метагеномики открыли совершенно новое семейство родопсинов – гелиородопсины [103]. Эти белки, как и родопсины типа 1, связывающие ретиналь в стереоконформации *all-trans*, широко распространены и обнаруживаются в археях, бактериях, микроводорослях и их вирусах. Данные о пространственной структуре гелиородопсинов [130, 131] подтверждают их структурное родство с бактериородопсинами и необычную, «перевернутую» относительно других родопсинов, ориентацию в мембране (с цитоплазматическим N- и внеклеточным C-концом, *рис. 1*). Биологическая функция этих пигментов пока неизвестна, однако неспособность гелиородопсинов к переносу ионов и их сравнительно медленный (в секундной шкале) фотоцикл свидетельствуют в пользу их фоторецепторной роли [103]. Наличие структурных данных высокого разрешения позволяет надеяться, что гелиородопсины в ближайшем будущем станут объектом белковой инженерии, направленной, в том числе, на оптимизацию их молекул для нужд оптогенетики. Потенциальными оптогенетическими активаторами могут стать представители двух семейств светозависимых протонных помп – ксенородопсины [132] и шизородопсины [133]. Интересно, что белки обоих семейств закачивают протоны внутрь клетки, что отличает их от ранее описанных бактерио- и археородопсинов, осуществляющих транспорт H^+ в обратном направлении.

Наконец, самобытный класс оптогенетических инструментов составляют химерные светочувствительные G-белок-сопряженные рецепторы (Opto GPCRs), например, optoXR. Эти молекулы построены на основе родопсинов типа 2 (зрительные родопсины животных), в которых внутриклеточные петли родопсина заменены петлями, например, из адренергического или дофаминового рецепторов [134, 135]. В этом случае фотостимуляция родопсина может инициировать в клетках различные внутриклеточные сигнальные каскады в зависимости от типа рецептора-«донора» внутриклеточных петельных участков (*рис. 1*) [136–139]. Подробнее о работах, связанных с Opto GPCR, можно узнать из специализированных обзоров [5].

Биофизические свойства родопсинов, применяемых в оптогенетике, детально изучены [100, 140, 141]. Так, разрешены трехмерные структуры канальных родопсинов из *C. reinhardtii* [109, 142], а фотоцикл

микробных родопсинов исследован не только методами времязрешенной спектроскопии [100], но и времязрешенного рентгеноструктурного анализа [143, 144] (подробное их описание выходит за рамки настоящего обзора). Стоит, однако, упомянуть два факта, принципиальных для оптогенетического применения микробных родопсинов: (i) все родопсины типа 1 используют в качестве хромофора ретиналь в форме *all-trans*-стереоизомера. Успешное развитие так называемой однокомпонентной (т.е. использующей эффектор, кодируемый одним трансгеном) оптогенетики во многом предопределяется наличием в нервных тканях позвоночных достаточного количества эндогенного ретиналя, исключаящим добавление этого кофактора извне [145]; (ii) в ходе фотоцикла ретиналь фотоизомеризуется в *13-cis*-конформацию и затем, оставаясь ковалентно связанным с белковым остовом, спонтанно возвращается в прежнее *all-trans*-состояние [108]. Отсутствие в этом процессе стадии диссоциации определяет возможность многократного задействования эффекторной молекулы, а его протекание во временной шкале 10–20 мс – высокое временное разрешение оптической стимуляции.

Оптогенетический эксперимент

Согласно свидетельствам ключевых исследователей, участвовавших в развитии методов нейробиологической оптогенетики, примерно 5 первых лет ее развития были посвящены разработке и отладке методик оптогенетического эксперимента [3]. Помимо выбора удачных фотоэффекторных молекул (см. предыдущий раздел), важную роль здесь играет доставка трансгена в целевую модельную систему и конструктивные особенности постановки эксперимента. Здесь мы кратко остановимся на этих аспектах.

В самом общем виде стратегии доставки и реализации генетического материала родопсиновых эффекторов могут быть сведены либо к транзientной экспрессии в специфических популяциях нервных клеток с помощью вирусных векторов, несущих гены родопсинов [3], либо к стабильной экспрессии этих генов в мозгу трансгенных животных [3, 146–148]. В первом случае, как правило, вирусные частицы вводят в мозг животного. Если в ранних оптогенетических работах предпочтение отдавалось ретровирусным векторам, то сейчас чаще всего применяют высокие титры аденоассоциированных вирусов (AAV), последовательности геномов которых зачастую оптимизированы для обеспечения высокого уровня экспрессии в специфических типах клеток мозга [1]. В последние несколько лет для так называемой ретроградной (т.е. направленной к телам пресинаптических нейронов) таргетной экспрессии родопсинов используют модифицированные вирусы

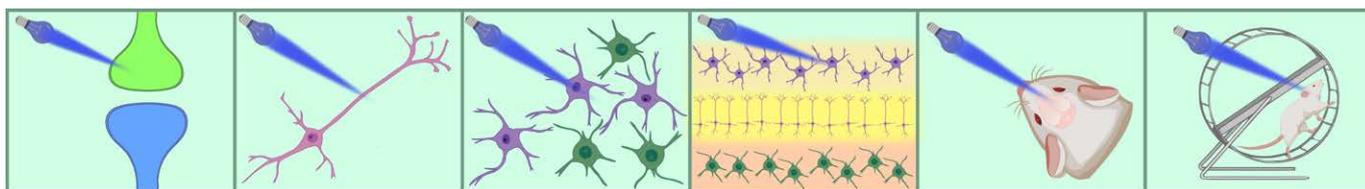


Рис. 2. Применение оптогенетики на разных уровнях организации нервной системы. Схематически показана фотоактивация родопсинов (слева направо): в синаптической терминали аксона, в единичном нейроне *in cellulo*, в нейрональной популяции *in cellulo*, в срезе нервной ткани *ex vivo*, в мозгу живой и свободнодвижущейся мыши *in vivo*. Адаптировано из [159]

бешенства [149, 150]. С целью увеличения селективности «мечения» при гетерологической экспрессии родопсинов используют промоторы, специфичные для определенного типа клеток [1, 3] (например, промотор гипокретина (Hcrt) [151]). В экспериментах на живых срезах мозга эмбрионов трансген можно доставлять с помощью электропорации *in utero*, а в организме трансгенных животных родопсин экспрессируется с рождения. Увеличение специфичности оптогенетической стимуляции, эффективное как при транзиторной, так и при стабильной экспрессии родопсинов, может обеспечиваться генетическими манипуляциями с использованием сайт-специфической рекомбинации [1, 3]. Так, рекомбиназы типа Cre или Flp, которые могут быть доставлены в мозг отдельным вектором или стабильно экспрессироваться в клетках трансгенных животных, позволяют с высокой селективностью включать/выключать экспрессию гена фотоэфектора в исследуемых клеточных популяциях [152].

Тканевая и клеточная специфичность оптогенетики применительно к стимуляции интактного мозга экспериментальных животных обеспечивается сочетанием генетического подхода (специфичной таргетированной экспрессии) и аппаратных решений для прецизионного оптического воздействия. Так, «подача» света в головной мозг обеспечивается при помощи оптоволоконного кабеля, закрепленного на черепе животного, через имплантированную оптическую канюлю. Фиброоптический нейроинтерфейс – одно из ключевых технологических решений, обеспечивающих успех оптогенетического подхода [151, 153, 154]. Наиболее актуальная разработка в области нейроинтерфейсов для свободно движущихся животных – автономные беспроводные имплантаты [155–157].

Важным аспектом экспериментов по оптическому манипулированию нейрональной активностью является контроль результатов стимуляции на уровне отдельных клеток и клеточных популяций. Наряду с классическими подходами к прямому мониторингу электрической активности (например, patch-clamp),

часто ограниченно применимыми при стимуляции интактного мозга, здесь могут использоваться флуоресцентные методы, такие, как визуализация генетически кодируемых индикаторов кальция и мембранного потенциала [1, 3]. Некоторые авторы относят к оптогенетическим инструментам не только фотоэфекторные молекулы, но и флуоресцентные индикаторы для нейробиологии [158, 159]. Получила развитие концепция совмещения оптической стимуляции и мониторинга нейрональной активности в рамках одного эксперимента, или полностью оптическая электрофизиология (all-optical electrophysiology) [4, 158, 160].

Современное применение

Уникальная особенность оптогенетического подхода – его универсальная применимость в модельных системах разной сложности (рис. 2). Этот подход используется в изучении всех уровней организации нервной системы: на культуре нейронов *in cellulo*, на живых срезах мозга *ex vivo*, *in vivo* на целом мозге (в том числе бодрствующих свободнодвижущихся млекопитающих) [159, 161]. Молекулы, опосредующие оптическую стимуляцию, могут быть доставлены в большинство высокоспециализированных типов клеток нервной системы и в их субклеточные компартменты, а функциональные параметры, которые отслеживаются по результатам оптогенетической стимуляции, варьируют от электрической активности единичной возбудимой клетки до влияния на высшие поведенческие функции млекопитающих, обучение, память и т.д.

Оптогенетические инструменты позволили нейробиологам контролировать активность нейронов и клеток нейроглии с высоким временным и пространственным разрешением. Это преимущество метода особенно важно при изучении физиологии тканей *in vivo* и поведения животных. Разрешение, свойственное оптогенетическим инструментам, не могло быть достигнуто ранее при использовании других нейробиологических методов, например, при глубокой стимуляции мозга (deep brain stimulation, DBS) или пу-

тем введения различных препаратов. Появление оптогенетических методов в арсенале нейробиологов способствовало значительному прогрессу в понимании формирования и функционирования нейронных сетей и сигнальных путей в мозгу млекопитающих [1, 3, 162]. Оно дало возможность выявить причинно-следственные связи между клеточной активностью и функциональным ответом, в частности, в экспериментах по изучению связи между активностью нейронных сетей и спецификой поведения животных [163], получить новую информацию о различных поведенческих паттернах в норме и при патологии [164, 165].

Мелкие грызуны (мыши и крысы) – главный модельный объект нейробиологических исследований, в которые вовлечены инструменты оптогенетики. Опубликованы сотни работ, посвященных изучению нейрональных ансамблей, сетей, ритмической деятельности мозга, передачи, запоминания и хранения информации в мозгу, обучения, синаптической пластичности, нейрогенеза, регуляции двигательной активности, голода и жажды, сна и бодрствования, органов чувств, биологических ритмов, дыхательной деятельности, социального поведения этих животных [1, 3, 6, 148, 164, 166, 167]. Вовлечен оптогенетический арсенал и в изучение нейробиологии рыб [168], птиц [169], приматов [170, 171]. Разумеется, огромный интерес представляет применение микробных родопсинов в медицине и изучении физиологии высшей нервной деятельности человека. Здесь можно выделить несколько тесно перекликающихся направлений исследований: это изучение механизмов нейродегенеративных заболеваний (болезни Альцгеймера [172, 173] и Паркинсона [174, 175], эпилепсии [176] и др.), психических нарушений и болезней сердца на моделях животных и нейронов человека, поиск подходов к диагностике этих патологий на основании полученных данных и скрининг химических веществ, потенциально пригодных для их терапии [3, 158]. Наконец, разрабатываются подходы к непосредственному терапевтическому применению оптогенетического инструментария. В настоящий момент в США проводятся два клинических исследования в области генной терапии восстановления зрения с помощью канальных родопсинов [177]. В ближайшей перспективе – лечение эпилепсии [176] и нарушений слуха [178].

Ограничения метода

Парадоксально, но именно необычайная широта охвата и эффективность оптогенетического подхода заставляют исследователей уделять существенное внимание его недостаткам и ограничениям. Речь в данном случае идет не об абстрактных изъянах ме-

тодики, которую могут воспроизвести всего несколько лабораторий в мире, а об инструменте, ставшем *de facto* стандартом для десятков научных направлений.

Здесь мы приведем перечень наиболее значимых проблем однокомпонентной оптогенетики:

- Экспрессия микробных родопсинов с ограничениями применима при работе с беспозвоночными. Как уже упомянуто, нейроны млекопитающих содержат достаточное количество ретиналя для включения в состав гетерологически экспрессируемых родопсинов, но в таких моделях, как *Drosophila* или *Caenorhabditis*, требуется как минимум добавление ретиналя в рацион экспериментальных животных [3].

- Спектральный репертуар микробных родопсинов (во всяком случае, если отдельно рассматривать активирующие и ингибирующие молекулы) достаточно беден. Даже у новых вариантов канальных родопсинов с максимумами поглощения, смещенными в красную область, велико спектральное перекрывание с пигментами дикого типа. И хотя потенциально использование нескольких эффекторов с отличающимися профилями активации позволяет селективно возбуждать отдельные популяции нейронов в мозгу [179], на практике эта возможность применяется редко.

- Сверхэкспрессия микробных родопсинов в нервной ткани может негативно сказываться на физиологии нейронов [180], а их активация синим светом потенциально фототоксична.

- Несомненное ограничение метода представляет необходимость использования сложных волоконно-оптических устройств, закрепляемых на черепе животных. Методики облучения тканей мозга без специального интерфейса [181, 182] оказались менее эффективными и пока не получили широкого распространения [3].

- Наконец, интенсивность оптогенетической стимуляции (как возбуждения, так и торможения нейронов) не всегда можно точно контролировать, и она может выходить за физиологические пределы. Проблема осложняется неоднородностью экспрессии эффектора и распределения световой энергии в ткани мозга, а в глубине ткани прецизионная стимуляция и вовсе невозможна [159].

Во II части обзора мы познакомим читателя с альтернативными подходами к специфической нейро-стимуляции – термогенетикой и хемогенетикой. ●

Работа поддержана Российским фондом фундаментальных исследований (РФФИ) в рамках научного проекта № 19-14-50116.

Acknowledgments: The reported study was funded by RFBR, project number 19-14-50116.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Kim C.K., Adhikari A., Deisseroth K. // *Nat. Rev. Neurosci.* 2017. V. 18. № 4. P. 222–235.
2. Losi A., Gardner K.H., Möglich A. // *Chem. Rev.* 2018. V. 118. № 21. P. 10659–10709.
3. Deisseroth K. // *Nat. Neurosci.* 2015. V. 18. № 9. P. 1213–1225.
4. Cohen A.E. // *Biophys. J.* 2016. V. 110. № 5. P. 997–1003.
5. Lesca E. // *J. Membr. Biol.* 2020. V. 253. № 2. P. 81–86.
6. Prestori F., Montagna I., D'Angelo E., Mapelli L. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 7. P. 2494.
7. Tischer D., Weiner O.D. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2014. V. 15. № 8. P. 551–558.
8. Fraikin G.Y., Strakhovskaya M.G., Rubin A.B. // *Biochemistry (Moscow)*. 2013. V. 78. № 11. P. 1238–1253.
9. Nowicka B., Kruk J. // *Microbiol. Res.* 2016. V. 186–187. P. 99–118.
10. Hohmann-Marriott M.F., Blankenship R.E. // *Annu. Rev. Plant Biol.* 2011. V. 62. P. 515–548.
11. Tisch D., Schmoll M. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2010. V. 85. № 5. P. 1259–1277.
12. Cronin T.W., Johnsen S. // *Integr. Comp. Biol.* 2016. V. 56. № 5. P. 758–763.
13. Besharse J.C., McMahon D.G. // *J. Biol. Rhythms.* 2016. V. 31. № 3. P. 223–243.
14. Palczewski K. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 3. P. 1612–1619.
15. Gardner L., Deiters A. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2012. V. 16. № 3–4. P. 292–299.
16. Feng Z., Zhang W., Xu J., Gauron C., Ducos B., Vriz S., Volovitch M., Jullien L., Weiss S., Bensimon D. // *Rep. Prog. Phys.* 2013. V. 76. № 7. P. 072601.
17. Li J., Wang L., Tian J., Zhou Z., Li J., Yang H. // *Chem. Soc. Rev.* 2020. V. 49. № 5. P. 1545–1568.
18. Kim B., Lin M.Z. // *Biochem. Soc. Trans.* 2013. V. 41. № 5. P. 1183–1188.
19. Pathak G.P., Vrana J.D., Tucker C.L. // *Biol. Cell.* 2013. V. 105. № 2. P. 59–72.
20. Riggsbee C.W., Deiters A. // *Trends Biotechnol.* 2010. V. 28. № 9. P. 468–475.
21. Shimizu-Sato S., Huq E., Tepperman J.M., Quail P.H. // *Nat. Biotechnol.* 2002. V. 20. № 10. P. 1041–1044.
22. Tyszkiewicz A.B., Muir T.W. // *Nat. Methods.* 2008. V. 5. № 4. P. 303–305.
23. Levskaia A., Weiner O.D., Lim W.A., Voigt C.A. // *Nature.* 2009. V. 461. № 7266. P. 997–1001.
24. Liu H., Yu X., Li K., Klejnot J., Yang H., Lisiero D., Lin C. // *Science.* 2008. V. 322. № 5907. P. 1535–1539.
25. Shao K., Zhang X., Li X., Hao Y., Huang X., Ma M., Zhang M., Yu F., Liu H., Zhang P. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020. V. 27. № 5. P. 480–488.
26. Ma L., Wang X., Guan Z., Wang L., Wang Y., Zheng L., Gong Z., Shen C., Wang J., Zhang D., et al. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020. V. 27. № 5. P. 472–479.
27. Wang Q., Lin C. // *Nat. Struct. Mol. Biol.* 2020. V. 27. № 5. P. 401–403.
28. Kennedy M.J., Hughes R.M., Peteya L.A., Schwartz J.W., Ehlers M.D., Tucker C.L. // *Nat. Methods.* 2010. V. 7. № 12. P. 973–975.
29. Konermann S., Brigham M.D., Trevino A., Hsu P.D., Heidenreich M., Cong L., Platt R.J., Scott D.A., Church G.M., Zhang F. // *Nature.* 2013. V. 500. № 7463. P. 472–476.
30. Hughes R.M., Bolger S., Tapadia H., Tucker C.L. // *Methods.* 2012. V. 58. № 4. P. 385–391.
31. Idevall-Hagren O., Dickson E.J., Hille B., Toomre D.K., De Camilli P. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2012. V. 109. № 35. P. E2316–E2323.
32. Kyung T., Lee S., Kim J.E., Cho T., Park H., Jeong Y.-M., Kim D., Shin A., Kim S., Baek J., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. № 10. P. 1092–1096.
33. Bohineust A., Garcia Z., Corre B., Lemaître F., Bousso P. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 1143.
34. Huala E., Oeller P.W., Liscum E., Han I.S., Larsen E., Briggs W.R. // *Science.* 1997. V. 278. № 5346. P. 2120–2123.
35. Christie J.M., Reymond P., Powell G.K., Bernasconi P., Raibekas A.A., Liscum E., Briggs W.R. // *Science.* 1998. V. 282. № 5394. P. 1698–1701.
36. Glantz S.T., Carpenter E.J., Melkonian M., Gardner K.H., Boyden E.S., Wong G.K.-S., Chow B.Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 11. P. E1442–E1451.
37. Strickland D., Moffat K., Sosnick T.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 31. P. 10709–10714.
38. Motta-Mena L.B., Reade A., Mallory M.J., Glantz S., Weiner O.D., Lynch K.W., Gardner K.H. // *Nat. Chem. Biol.* 2014. V. 10. № 3. P. 196–202.
39. Lee J., Natarajan M., Nashine V.C., Socolich M., Vo T., Russ W.P., Benkovic S.J., Ranganathan R. // *Science.* 2008. V. 322. № 5900. P. 438–442.
40. Jansen V., Jikeli J.F., Wachten D. // *Curr. Opin. Biotechnol.* 2017. V. 48. P. 15–20.
41. Richter F., Fonfara I., Bouazza B., Schumacher C.H., Bratovič M., Charpentier E., Möglich A. // *Nucleic Acids Res.* 2016. V. 44. № 20. P. 10003–10014.
42. Shu X., Lev-Ram V., Deerinck T.J., Qi Y., Ramko E.B., Davidson M.W., Jin Y., Ellisman M.H., Tsien R.Y. // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. № 4. P. e1001041.
43. Gauden M., Yeremenko S., Laan W., van Stokkum I.H.M., Ihalainen J.A., van Grondelle R., Hellingwerf K.J., Kennis J.T.M. // *Biochemistry.* 2005. V. 44. № 10. P. 3653–3662.
44. Domratcheva T., Hartmann E., Schlichting I., Kottke T. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 22669.
45. Domratcheva T., Grigorenko B.L., Schlichting I., Nemukhin A.V. // *Biophys. J.* 2008. V. 94. № 10. P. 3872–3879.
46. Stelling A.L., Ronayne K.L., Nappa J., Tonge P.J., Meech S.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2007. V. 129. № 50. P. 15556–15564.
47. Gauden M., Grinstead J.S., Laan W., van Stokkum I.H.M., Avila-Perez M., Toh K.C., Boelens R., Kaptein R., van Grondelle R., Hellingwerf K.J., et al. // *Biochemistry.* 2007. V. 46. № 25. P. 7405–7415.
48. Masuda S., Nakatani Y., Ren S., Tanaka M. // *ACS Chem. Biol.* 2013. V. 8. № 12. P. 2649–2653.
49. Iseki M., Matsunaga S., Murakami A., Ohno K., Shiga K., Yoshida K., Sugai M., Takahashi T., Hori T., Watanabe M. // *Nature.* 2002. V. 415. № 6875. P. 1047–1051.
50. Schröder-Lang S., Schwärzel M., Seifert R., Strünker T., Kateriya S., Looser J., Watanabe M., Kaupp U.B., Hegemann P., Nagel G. // *Nat. Methods.* 2007. V. 4. № 1. P. 39–42.
51. Barends T.R.M., Hartmann E., Griese J.J., Beilich T., Kirienko N.V., Ryjenkov D.A., Reinstein J., Shoeman R.L., Gomelsky M., Schlichting I. // *Nature.* 2009. V. 459. № 7249. P. 1015–1018.
52. Brown B.A., Cloix C., Jiang G.H., Kaiserli E., Herzyk P., Kliebenstein D.J., Jenkins G.I. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. № 50. P. 18225–18230.
53. Favory J.-J., Stec A., Gruber H., Rizzini L., Oravec A., Funk M., Albert A., Cloix C., Jenkins G.I., Oakeley E.J., et al. // *EMBO J.* 2009. V. 28. № 5. P. 591–601.
54. Rizzini L., Favory J.-J., Cloix C., Faggionato D., O'Hara A., Kaiserli E., Baumeister R., Schäfer E., Nagy F., Jenkins G.I., et al. // *Science.* 2011. V. 332. № 6025. P. 103–106.

55. Christie J.M., Arvai A.S., Baxter K.J., Heilmann M., Pratt A.J., O'Hara A., Kelly S.M., Hothorn M., Smith B.O., Hitomi K., et al. // *Science*. 2012. V. 335. № 6075. P. 1492–1496.
56. Wu D., Hu Q., Yan Z., Chen W., Yan C., Huang X., Zhang J., Yang P., Deng H., Wang J., et al. // *Nature*. 2012. V. 484. № 7393. P. 214–219.
57. Crefcoeur R.P., Yin R., Ulm R., Halazonetis T.D. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 1779.
58. Müller K., Engesser R., Schulz S., Steinberg T., Tomakidi P., Weber C.C., Ulm R., Timmer J., Zurbriggen M.D., Weber W. // *Nucl. Acids Res.* 2013. V. 41. № 12. P. e124.
59. Chen D., Gibson E.S., Kennedy M.J. // *J. Cell Biol.* 2013. V. 201. № 4. P. 631–640.
60. Morgan S.-A., Al-Abdul-Wahid S., Woolley G.A. // *J. Mol. Biol.* 2010. V. 399. № 1. P. 94–112.
61. Fan H.Y., Morgan S.-A., Brechun K.E., Chen Y.-Y., Jaikaran A.S.I., Woolley G.A. // *Biochemistry*. 2011. V. 50. № 7. P. 1226–1237.
62. Genick U.K., Borgstahl G.E., Ng K., Ren Z., Pradervand C., Burke P.M., Srajer V., Teng T.Y., Schildkamp W., McRee D.E., et al. // *Science*. 1997. V. 275. № 5305. P. 1471–1475.
63. Kaberniuk A.A., Shemetov A.A., Verkhusha V.V. // *Nat. Methods*. 2016. V. 13. № 7. P. 591–597.
64. Redchuk T.A., Omelina E.S., Chernov K.G., Verkhusha V.V. // *Nat. Chem. Biol.* 2017. V. 13. № 6. P. 633–639.
65. Leopold A.V., Chernov K.G., Shemetov A.A., Verkhusha V.V. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 1129.
66. Zhou X.X., Chung H.K., Lam A.J., Lin M.Z. // *Science*. 2012. V. 338. № 6108. P. 810–814.
67. Zhou X.X., Fan L.Z., Li P., Shen K., Lin M.Z. // *Science*. 2017. V. 355. № 6327. P. 836–842.
68. McEvoy A.L., Hoi H., Bates M., Platonova E., Cranfill P.J., Baird M.A., Davidson M.W., Ewers H., Liphardt J., Campbell R.E. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 12. P. e51314.
69. Zhang W., Lohman A.W., Zhuravlova Y., Lu X., Wiens M.D., Hoi H., Yaganoglu S., Mohr M.A., Kitova E.N., Klassen J.S., et al. // *Nat. Methods*. 2017. V. 14. № 4. P. 391–394.
70. Endo M., Iwawaki T., Yoshimura H., Ozawa T. // *ACS Chem. Biol.* 2019. V. 14. № 10. P. 2206–2214.
71. Lukyanov K.A., Serebrovskaya E.O., Lukyanov S., Chudakov D.M. // *Photochem. Photobiol. Sci.* 2010. V. 9. № 10. P. 1301–1306.
72. Jiang H.N., Li Y., Cui Z.J. // *Front. Physiol.* 2017. V. 8. P. 191.
73. Bulina M.E., Chudakov D.M., Britanova O.V., Yanushevich Y.G., Staroverov D.B., Chepurnykh T.V., Merzlyak E.M., Shkrob M.A., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. № 1. P. 95–99.
74. Takemoto K., Matsuda T., Sakai N., Fu D., Noda M., Uchiyama S., Kotera I., Arai Y., Horiuchi M., Fukui K., et al. // *Sci. Rep.* 2013. V. 3. P. 2629.
75. Westberg M., Bregnhøj M., Etzerodt M., Ogilby P.R. // *J. Phys. Chem. B*. 2017. V. 121. № 40. P. 9366–9371.
76. Lin J.Y., Sann S.B., Zhou K., Nabavi S., Proulx C.D., Malinow R., Jin Y., Tsien R.Y. // *Neuron*. 2013. V. 79. № 2. P. 241–253.
77. Ryumina A.P., Serebrovskaya E.O., Shirmanova M.V., Snopova L.B., Kuznetsova M.M., Turchin I.V., Ignatova N.I., Klementieva N.V., Fradkov A.F., Shakhov B.E., et al. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2013. V. 1830. № 11. P. 5059–5067.
78. Wang B., van Veldhoven P.P., Brees C., Rubio N., Nordgren M., Apanasets O., Kunze M., Baes M., Agostinis P., Franssen M. // *Free Radic. Biol. Med.* 2013. V. 65. P. 882–894.
79. Serebrovskaya E.O., Ryumina A.P., Boulina M.E., Shirmanova M.V., Zagaynova E.V., Bogdanova E.A., Lukyanov S.A., Lukyanov K.A. // *J. Biomed. Opt.* 2014. V. 19. № 7. P. 071403.
80. Petrova N.V., Luzhin A., Serebrovskaya E.O., Ryumina A.P., Velichko A.K., Razin S.V., Kantidze O.L. // *Aging (Albany, NY)*. 2016. V. 8. № 10. P. 2449–2462.
81. Del Bene F., Wyart C., Robles E., Tran A., Looger L., Scott E.K., Isacoff E.Y., Baier H. // *Science*. 2010. V. 330. № 6004. P. 669–673.
82. Williams D.C., Bejjani R.El, Ramirez P.M., Coakley S., Kim S.A., Lee H., Wen Q., Samuel A., Lu H., Hilliard M.A., et al. // *Cell Rep.* 2013. V. 5. № 2. P. 553–563.
83. Young L.E.A., Shoben C., Ricci K., Williams D.C. // *J. Neurogenet.* 2019. V. 33. № 1. P. 1–9.
84. Kawano F., Suzuki H., Furuya A., Sato M. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 6256.
85. Yu D., Lee H., Hong J., Jung H., Jo Y., Oh B.-H., Park B.O., Heo W.D. // *Nat. Methods*. 2019. V. 16. № 11. P. 1095–1100.
86. Redchuk T.A., Karasev M.M., Verkhusha P.V., Donnelly S.K., Hülsemann M., Virtanen J., Moore H.M., Vartiainen M.K., Hodgson L., Verkhusha V.V. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 605.
87. Alberts B., Johnson A., Lewis J., Raff M., Roberts K., Walter P. *Molecular biology of the cell*. Sixth ed. New York: Garland Science, 2015. 1464 p.
88. Fork R.L. // *Science*. 1971. V. 171. № 3974. P. 907–908.
89. Nagel G., Möckel B., Büldt G., Bamberg E. // *FEBS Lett.* 1995. V. 377. № 2. P. 263–266.
90. Nagel G., Ollig D., Fuhrmann M., Kateriya S., Musti A.M., Bamberg E., Hegemann P. // *Science*. 2002. V. 296. № 5577. P. 2395–2398.
91. Harz H., Hegemann P. // *Nature*. 1991. V. 351. № 6326. P. 489–491.
92. Nagel G., Szellas T., Huhn W., Kateriya S., Adeishvili N., Berthold P., Ollig D., Hegemann P., Bamberg E. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. № 24. P. 13940–13945.
93. Zemelman B.V., Lee G.A., Ng M., Miesenböck G. // *Neuron*. 2002. V. 33. № 1. P. 15–22.
94. Boyden E.S., Zhang F., Bamberg E., Nagel G., Deisseroth K. // *Nat. Neurosci.* 2005. V. 8. № 9. P. 1263–1268.
95. Li X., Gutierrez D.V., Hanson M.G., Han J., Mark M.D., Chiel H., Hegemann P., Landmesser L.T., Herlitze S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2005. V. 102. № 49. P. 17816–17821.
96. Nagel G., Brauner M., Liewald J.F., Adeishvili N., Bamberg E., Gottschalk A. // *Curr. Biol.* 2005. V. 15. № 24. P. 2279–2284.
97. Bi A., Cui J., Ma Y.-P., Olshevskaya E., Pu M., Dizhoor A.M., Pan Z.-H. // *Neuron*. 2006. V. 50. № 1. P. 23–33.
98. Knöpfel T., Lin M.Z., Levskaya A., Tian L., Lin J.Y., Boyden E.S. // *J. Neurosci.* 2010. V. 30. № 45. P. 14998–15004.
99. Rein M.L., Deussing J.M. // *Mol. Genet. Genomics*. 2012. V. 287. № 2. P. 95–109.
100. Ernst O.P., Lodowski D.T., Elstner M., Hegemann P., Brown L.S., Kandori H. // *Chem. Rev.* 2014. V. 114. № 1. P. 126–163.
101. Govorunova E.G., Sineshchekov O.A., Li H., Spudich J.L. // *Annu. Rev. Biochem.* 2017. V. 86. P. 845–872.
102. Spudich J.L., Yang C.S., Jung K.H., Spudich E.N. // *Annu. Rev. Cell Dev. Biol.* 2000. V. 16. P. 365–392.
103. Pushkarev A., Inoue K., Larom S., Flores-Urbe J., Singh M., Konno M., Tomida S., Ito S., Nakamura R., Tsunoda S.P., et al. // *Nature*. 2018. V. 558. № 7711. P. 595–599.
104. Yutin N., Koonin E.V. // *Biol. Direct*. 2012. V. 7. P. 34.
105. Filosof A., Béjà O. // *Environ. Microbiol. Rep.* 2013. V. 5. № 3. P. 475–482.
106. Hososhima S., Shigemura S., Kandori H., Tsunoda S.P. // *Biophys. Rev.* 2020. V. 12. № 2. P. 453–459.
107. Chow B.Y., Han X., Dobry A.S., Qian X., Chuong A.S., Li M., Henninger M.A., Belfort G.M., Lin Y., Monahan P.E., et al. // *Nature*. 2010. V. 463. № 7277. P. 98–102.

108. Zhang F, Vierock J, Yizhar O, Fenno L.E., Tsunoda S., Kianianmomeni A., Prigge M., Berndt A., Cushman J., Polle J., et al. // *Cell*. 2011. V. 147. № 7. P. 1446–1457.
109. Kato H.E., Zhang F, Yizhar O, Ramakrishnan C., Nishizawa T., Hirata K., Ito J., Aita Y., Tsukazaki T., Hayashi S., et al. // *Nature*. 2012. V. 482. № 7385. P. 369–374.
110. Berndt A., Lee S.Y., Ramakrishnan C., Deisseroth K. // *Science*. 2014. V. 344. № 6182. P. 420–424.
111. Wietek J., Wiegert J.S., Adeishvili N., Schneider F., Watanabe H., Tsunoda S.P., Vogt A., Elstner M., Oertner T.G., Hegemann P. // *Science*. 2014. V. 344. № 6182. P. 409–412.
112. Govorunova E.G., Sineshchekov O.A., Janz R., Liu X., Spudich J.L. // *Science*. 2015. V. 349. № 6248. P. 647–650.
113. Gunaydin L.A., Yizhar O, Berndt A., Sohal V.S., Deisseroth K., Hegemann P. // *Nat. Neurosci.* 2010. V. 13. № 3. P. 387–392.
114. Klapoetke N.C., Murata Y., Kim S.S., Pulver S.R., Birdsey-Benson A., Cho Y.K., Morimoto T.K., Chuong A.S., Carpenter E.J., Tian Z., et al. // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. № 3. P. 338–346.
115. Berndt A., Schoenenberger P., Mattis J., Tye K.M., Deisseroth K., Hegemann P., Oertner T.G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. № 18. P. 7595–7600.
116. Berndt A., Yizhar O, Gunaydin L.A., Hegemann P., Deisseroth K. // *Nat. Neurosci.* 2009. V. 12. № 2. P. 229–234.
117. Yizhar O, Fenno L.E., Prigge M., Schneider F., Davidson T.J., O’Shea D.J., Sohal V.S., Goshen I., Finkelstein J., Paz J.T., et al. // *Nature*. 2011. V. 477. № 7363. P. 171–178.
118. Zhang F, Prigge M., Beyrière F., Tsunoda S.P., Mattis J., Yizhar O, Hegemann P., Deisseroth K. // *Nat. Neurosci.* 2008. V. 11. № 6. P. 631–633.
119. Lin J.Y., Knutsen P.M., Muller A., Kleinfeld D., Tsien R.Y. // *Nat. Neurosci.* 2013. V. 16. № 10. P. 1499–1508.
120. Rajasethupathy P., Sankaran S., Marshel J.H., Kim C.K., Ferenczi E., Lee S.Y., Berndt A., Ramakrishnan C., Jaffe A., Lo M., et al. // *Nature*. 2015. V. 526. № 7575. P. 653–659.
121. Kleinlogel S., Feldbauer K., Dempski R.E., Fotis H., Wood P.G., Bamann C., Bamberg E. // *Nat. Neurosci.* 2011. V. 14. № 4. P. 513–518.
122. Inoue K., Ono H., Abe-Yoshizumi R., Yoshizawa S., Ito H., Kogure K., Kandori H. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. P. 1678.
123. Kato H.E., Inoue K., Abe-Yoshizumi R., Kato Y., Ono H., Konno M., Hososhima S., Ishizuka T., Hoque M.R., Kunitomo H., et al. // *Nature*. 2015. V. 521. № 7550. P. 48–53.
124. Konno M., Kato Y., Kato H.E., Inoue K., Nureki O., Kandori H. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2016. V. 7. № 1. P. 51–55.
125. Brown J., Behnam R., Coddington L., Tervo D.G.R., Martin K., Proskurin M., Kuleshova E., Park J., Phillips J., Bergs A.C.F., et al. // *Cell*. 2018. V. 175. № 4. P. 1131–1140.e11.
126. Gao K. // *Nat. Methods*. 2018. V. 15. № 12. P. 1003.
127. Govorunova E.G., Sineshchekov O.A., Spudich J.L. // *Biophys. J.* 2016. V. 110. № 11. P. 2302–2304.
128. Yamauchi Y., Konno M., Ito S., Tsunoda S.P., Inoue K., Kandori H. // *Biophys. Physicobiol.* 2017. V. 14. P. 57–66.
129. Shigemura S., Hososhima S., Kandori H., Tsunoda S.P. // *Appl. Sci.* 2019. V. 9. № 17. P. 3440.
130. Shihoya W., Inoue K., Singh M., Konno M., Hososhima S., Yamashita K., Ikeda K., Higuchi A., Izume T., Okazaki S., et al. // *Nature*. 2019. V. 574. № 7776. P. 132–136.
131. Kovalev K., Volkov D., Astashkin R., Alekseev A., Gushchin I., Haro-Moreno J.M., Chizhov I., Siletsky S., Mamedov M., Rogachev A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. V. 117. № 8. P. 4131–4141.
132. Inoue K., Ito S., Kato Y., Nomura Y., Shibata M., Uchihashi T., Tsunoda S.P., Kandori H. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 13415.
133. Inoue K., Tsunoda S.P., Singh M., Tomida S., Hososhima S., Konno M., Nakamura R., Watanabe H., Bulzu P.-A., Banciu H.L., et al. // *Sci. Adv.* 2020. V. 6. № 15. P. eaaz2441.
134. Kim J.-M., Hwa J., Garriga P., Reeves P.J., RajBhandary U.L., Khorana H.G. // *Biochemistry*. 2005. V. 44. № 7. P. 2284–2292.
135. Airan R.D., Thompson K.R., Fenno L.E., Bernstein H., Deisseroth K. // *Nature*. 2009. V. 458. № 7241. P. 1025–1029.
136. Siuda E.R., Copits B.A., Schmidt M.J., Baird M.A., Al-Hasani R., Planer W.J., Funderburk S.C., McCall J.G., Gereau R.W., Bruchas M.R. // *Neuron*. 2015. V. 86. № 4. P. 923–935.
137. Gunaydin L.A., Grosenick L., Finkelstein J.C., Kauvar I.V., Fenno L.E., Adhikari A., Lammel S., Mirzabekov J.J., Airan R.D., Zalocusky K.A., et al. // *Cell*. 2014. V. 157. № 7. P. 1535–1551.
138. Oh E., Maejima T., Liu C., Deneris E., Herlitze S. // *J. Biol. Chem.* 2010. V. 285. № 40. P. 30825–30836.
139. van Wyk M., Pielecka-Fortuna J., Löwel S., Kleinlogel S. // *PLoS Biol.* 2015. V. 13. № 5. P. e1002143.
140. Kandori H. // *Biophys. Rev.* 2020. V. 12. № 2. P. 355–361.
141. Deisseroth K., Hegemann P. // *Science*. 2017. V. 357. № 6356. P. eaan5544.
142. Volkov O., Kovalev K., Polovinkin V., Borshchevskiy V., Bamann C., Astashkin R., Marin E., Popov A., Balandin T., Willbold D., et al. // *Science*. 2017. V. 358. № 6366. P. eaan8862.
143. Nango E., Royant A., Kubo M., Nakane T., Wickstrand C., Kimura T., Tanaka T., Tono K., Song C., Tanaka R., et al. // *Science*. 2016. V. 354. № 6319. P. 1552–1557.
144. Nogly P., Weinert T., James D., Carbajo S., Ozerov D., Furrer A., Gashi D., Borin V., Skopintsev P., Jaeger K., et al. // *Science*. 2018. V. 361. № 6398. P. eaat0094.
145. Zhang F, Wang L.-P., Boyden E.S., Deisseroth K. // *Nat. Methods*. 2006. V. 3. № 10. P. 785–792.
146. Wang H., Peca J., Matsuzaki M., Matsuzaki K., Noguchi J., Qiu L., Wang D., Zhang F, Boyden E., Deisseroth K., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 19. P. 8143–8148.
147. Arenkiel B.R., Peca J., Davison I.G., Feliciano C., Deisseroth K., Augustine G.J., Ehlers M.D., Feng G. // *Neuron*. 2007. V. 54. № 2. P. 205–218.
148. Häggglund M., Borgius L., Dougherty K.J., Kiehn O. // *Nat. Neurosci.* 2010. V. 13. № 2. P. 246–252.
149. Lammel S., Lim B.K., Ran C., Huang K.W., Betley M.J., Tye K.M., Deisseroth K., Malenka R.C. // *Nature*. 2012. V. 491. № 7423. P. 212–217.
150. Reardon T.R., Murray A.J., Turi G.F., Wirblich C., Croce K.R., Schnell M.J., Jessell T.M., Losonczy A. // *Neuron*. 2016. V. 89. № 4. P. 711–724.
151. Adamantidis A.R., Zhang F, Aravanis A.M., Deisseroth K., de Lecea L. // *Nature*. 2007. V. 450. № 7168. P. 420–424.
152. Fenno L.E., Mattis J., Ramakrishnan C., Hyun M., Lee S.Y., He M., Tucciarone J., Selimbeyoglu A., Berndt A., Grosenick L., et al. // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. № 7. P. 763–772.
153. Aravanis A.M., Wang L.-P., Zhang F, Meltzer L.A., Mogri M.Z., Schneider M.B., Deisseroth K. // *J. Neural Eng.* 2007. V. 4. № 3. P. S143–156.
154. Warden M.R., Cardin J.A., Deisseroth K. // *Annu. Rev. Biomed. Eng.* 2014. V. 16. P. 103–129.
155. Montgomery K.L., Yeh A.J., Ho J.S., Tsao V., Mohan Iyer S., Grosenick L., Ferenczi E.A., Tanabe Y., Deisseroth K., Delp S.L., et al. // *Nat. Methods*. 2015. V. 12. № 10. P. 969–974.
156. Goncalves S.B., Ribeiro J.F., Silva A.F., Costa R.M., Correia J.H. // *J. Neural Eng.* 2017. V. 14. № 4. P. 041001.
157. Park S., Brenner D.S., Shin G., Morgan C.D., Copits B.A., Chung H.U., Pullen M.Y., Noh K.N., Davidson S., Oh S.J., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. № 12. P. 1280–1286.
158. Song C., Knöpfel T. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2016. V. 15.

- № 2. P. 97–109.
159. Häusser M. // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. № 10. P. 1012–1014.
160. Hochbaum D.R., Zhao Y., Farhi S.L., Klapoetke N., Werley C.A., Kapoor V., Zou P., Kralj J.M., Maclaurin D., Smedemark-Margulies N., et al. // *Nat. Methods*. 2014. V. 11. № 8. P. 825–833.
161. Deisseroth K. // *Nat. Methods*. 2011. V. 8. № 1. P. 26–29.
162. Sizemore R.J., Seeger-Armbruster S., Hughes S.M., Parr-Brownlie L.C. // *J. Neurophysiol.* 2016. V. 115. № 4. P. 2124–2146.
163. Bernstein J.G., Boyden E.S. // *Trends Cogn. Sci.* 2011. V. 15. № 12. P. 592–600.
164. Kravitz A.V., Freeze B.S., Parker P.R.L., Kay K., Thwin M.T., Deisseroth K., Kreitzer A.C. // *Nature*. 2010. V. 466. № 7306. P. 622–626.
165. Aquili L., Liu A.W., Shindou M., Shindou T., Wickens J.R. // *Learn. Mem.* 2014. V. 21. № 4. P. 223–231.
166. Mager T., Lopez de la Morena D., Senn V., Schlotte J., D Errico A., Feldbauer K., Wrobel C., Jung S., Bodensiek K., Rankovic V., et al. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 1750.
167. Proville R.D., Spolidoro M., Guyon N., Dugué G.P., Selimi F., Isope P., Popa D., Léna C. // *Nat. Neurosci.* 2014. V. 17. № 9. P. 1233–1239.
168. Thiele T.R., Donovan J.C., Baier H. // *Neuron*. 2014. V. 83. № 3. P. 679–691.
169. Roberts T.F., Gobes S.M.H., Murugan M., Ölveczky B.P., Mooney R. // *Nat. Neurosci.* 2012. V. 15. № 10. P. 1454–1459.
170. Lu Y., Truccolo W., Wagner F.B., Vargas-Irwin C.E., Ozden I., Zimmermann J.B., May T., Agha N.S., Wang J., Nurmikko A.V. // *J. Neurophysiol.* 2015. V. 113. № 10. P. 3574–3587.
171. Galvan A., Stauffer W.R., Acker L., El-Shamayleh Y., Inoue K.-I., Ohayon S., Schmid M.C. // *J. Neurosci.* 2017. V. 37. № 45. P. 10894–10903.
172. Yamamoto K., Tanei Z.-I., Hashimoto T., Wakabayashi T., Okuno H., Naka Y., Yizhar O., Fenno L.E., Fukayama M., Bitto H., et al. // *Cell Rep.* 2015. V. 11. № 6. P. 859–865.
173. Suberbielle E., Sanchez P.E., Kravitz A.V., Wang X., Ho K., Eilertson K., Devidze N., Kreitzer A.C., Mucke L. // *Nat. Neurosci.* 2013. V. 16. № 5. P. 613–621.
174. Gradinaru V., Mogri M., Thompson K.R., Henderson J.M., Deisseroth K. // *Science*. 2009. V. 324. № 5925. P. 354–359.
175. Steinbeck J.A., Choi S.J., Mrejeru A., Ganat Y., Deisseroth K., Sulzer D., Mosharov E.V., Studer L. // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. № 2. P. 204–209.
176. Walker M.C., Kullmann D.M. // *Neuropharmacology*. 2020. V. 168. P. 107751.
177. Shen Y., Campbell R.E., Côté D.C., Paquet M.-E. // *Front. Neural Circuits*. 2020. V. 14. P. 41.
178. DiGuiseppe J., Zuo J. // *Neurosci. Lett.* 2019. V. 701. P. 175–179.
179. Han X., Boyden E.S. // *PLoS One*. 2007. V. 2. № 3. P. e299.
180. Miyashita T., Shao Y.R., Chung J., Pourzia O., Feldman D.E. // *Front. Neural Circuits*. 2013. V. 7. P. 8.
181. Gradinaru V., Thompson K.R., Zhang F., Mogri M., Kay K., Schneider M.B., Deisseroth K. // *J. Neurosci.* 2007. V. 27. № 52. P. 14231–14238.
182. Huber D., Petreanu L., Ghitani N., Ranade S., Hromádka T., Mainen Z., Svoboda K. // *Nature*. 2008. V. 451. № 7174. P. 61–64.

УДК 577.214

Белки семейства р53 в ответе опухолевых клеток на ионизирующее излучение: развитие проблемы

О. А. Кучур^{1*}, Д. О. Кузьмина¹, М. С. Духинова¹, А. А. Штиль^{1,2}¹Национальный исследовательский университет ИТМО, Санкт-Петербург, 191002 Россия²Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина, Москва, 115478 Россия

*E-mail: kuchur@scamt-itmo.ru

Поступила в редакцию 27.10.2020

Принята к печати 24.12.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.11247

РЕФЕРАТ В ответ на терапевтическое ионизирующее излучение в опухолевых клетках активируются механизмы выживания, что снижает эффективность лечения. В становлении радиорезистентности ключевую роль играют р53, р63 и р73, составляющие семейство белков-регуляторов многочисленных путей передачи внутриклеточных сигналов. В обзоре анализируются р53-зависимые и -независимые механизмы преодоления устойчивости опухолевых клеток к лучевому воздействию.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА белки семейства р53, гибель клеток, радиорезистентность, лучевая терапия, злокачественные опухоли.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход; NF-κB – ядерный фактор каппа В; CDK – циклинзависимая киназа; TAp63/73 – изоформы р63/р73 с N-концевым доменом трансактивации (ТА); ΔNp63/73 – изоформы р63/р73 с делецией N-концевого домена трансактивации.

ВВЕДЕНИЕ

Ионизирующее излучение – от первоначального применения фотонов до современных источников частиц (протоны, электроны, нейтроны, атомы углерода) – важнейший метод терапии опухолей. Его эффективность подтверждается на протяжении более полувека. Вместе с тем, нерешенной остается проблема устойчивости опухолевых клеток к ионизирующему воздействию – первичная и приобретенная в процессе лечения. Как и лекарственная резистентность, устойчивость к лучевому воздействию является неблагоприятным прогностическим фактором для эффективности терапии. Причины устойчивости к лучевым воздействиям многообразны. В настоящем обзоре проанализированы молекулярные механизмы, формирующие комплексный ответ опухолевых клеток на терапевтическое облучение гамма-фотонами. Важно, чтобы ответ приводил к гибели клеток, а не к «ускользанию», результатом которого могут стать выживание клеток и формирование рецидивной радиоустойчивой опухоли.

Первичной причиной повреждения опухолевых клеток после ионизирующего излучения считают генотоксический эффект – нарушение структуры и функций ДНК. Этот эффект может вызываться прямым разрушением молекулярных связей вслед-

ствие ионизации атомов в ДНК или происходить опосредованно – в результате радиолиза воды. В последнем случае взаимодействие энергии излучения с молекулами воды формирует реакционноспособные радикалы, вызывающие одно- или двухцепочечные разрывы ДНК. При этом может изменяться экспрессия генов, продукты которых регулируют гомеостаз [1–3]. Таким образом, биологический результат облучения реализуется через регуляцию транскрипции генов. Именно пластичность – общее свойство живых систем, особенно выраженное в опухолевых клетках, – позволяет перестроить (перепрограммировать) транскрипционный аппарат для приспособления к стрессовому воздействию. Закономерно, что первичным и важнейшим сенсором, регулирующим ответ клетки на лучевое повреждение ДНК, оказывается транскрипционный белок р53 [4, 5] – прототип семейства, в которое входят р63 и р73. Белки этого семейства регулируют ответ клеток на облучение, определяя баланс выживаемости и гибели [6–8].

Исследования семейства р53 начинаются с 1979 года, когда независимыми группами был открыт белок, образующий комплекс с известным, ассоциированным с опухолями белком – большим Т-антигеном полиомавируса SV40 [9]. Новый белок рассматривали как вспомогательный для малигнизации кле-

ток вирусом SV40 и экспрессии t- (small) и T- (large) антигенов вируса в клетках хозяина. Тогда же была получена сыворотка, содержащая неизученный фактор с молекулярной массой 53–54 кДа [10]. Наступила эра p53: открывались все новые и новые функции этого белка, среди которых были регуляция клеточного цикла и баланса выживания–гибели клеток, контроль возникновения и прогрессии опухолей. Из рядового регулятора клеточной трансформации p53 и опосредуемые им процессы стали одной из главных тем современной молекулярной онкобиологии [11]. Проблема не теряет актуальность и сейчас: новые механизмы ответа опухолевых клеток на ионизирующее излучение и, главным образом, механизмы радиорезистентности невозможно исследовать вне значимости семейства p53.

Решена ли проблема за десятилетия исследований? Что остается неясным в обширном круге вопросов о роли семейства p53 как главного молекулярного механизма в реакциях клеток на ионизирующее излучение? В настоящем обзоре проанализированы сведения о белках семейства p53 как регуляторах (сенсорах) терапевтических фотонов. Эти механизмы определяют судьбу облученной клетки – гибель или радиостойчивость.

СТРУКТУРА И ФУНКЦИИ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА p53

Белок p53 (393 а.о.) состоит из пяти доменов, главные из которых – домены активации, связывания ДНК и тетрамеризации [12, 13]. Экспрессия гена p53 и активность белка p53 регулируются различными стрессовыми сигналами, основным (но не единственным) из которых является повреждение ДНК. После одного или двухцепочечных разрывов в ДНК, образовавшихся вследствие лучевого воздействия на клетки, протеинкиназы АТМ и АТР активируют транскрипционную компетентность p53 посредством фосфорилирования по остатку серина в положении 15 [14, 15].

Два других белка семейства – p63 и p73 – имеют схожие с p53 домены. Все три белка регулируют транскрипцию в виде гомотетрамеров [16, 17]. Активация p73 происходит при ионизирующем излучении, воздействии ДНК-повреждающих лекарственных соединений и препаратов, нарушающих динамику микротрубочек через пути, регулируемые тирозинкиназой c-Abl [18]. Судя по всему, существует кооперация между c-Abl и активацией апоптоза белком p73 [19]. Об особенностях функций p63 известно гораздо меньше. Отмечено, что этот белок также может активироваться в ответ на УФ- и гамма-облучение и опосредует апоптоз даже при инактивированном p53 [20], а усиление экспрессии p63 в некоторых типах опухолей снижает чувствительность клеток к ионизирующему излучению [21].

Учитывая высокую степень структурного сходства белков семейства, полноразмерные p73 и p63 могут связываться и активировать транскрипцию большинства p53-зависимых промоторов [22].

МУТАЦИИ И ИЗОФОРМЫ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА p53 В ОПУХОЛЕВЫХ КЛЕТКАХ

Нарушения функций белков семейства p53 могут возникать в результате мутаций генов TP53, TP63, TP73 или генов, продукты которых участвуют в модификации этих белков, например, протеинкиназ, фосфорилирующих p53 (Cdc2, JNK1, протеинкиназа С) [23]. Ген p53 кодирует девять изоформ белка (p53, p53β, p53γ, Δ133p53, Δ133p53β, Δ133p53γ, Δ40p53, Δ40p53β и Δ40p53γ); это разнообразие определяется альтернативным сплайсингом мРНК, альтернативным использованием промотора или сайтов инициации трансляции [24]. Анализ биоптатов 29346 опухолей различной тканевой принадлежности показал, что большинство из них несут мутантный p53 (рис. 1). Большая часть нарушений функций p53 в опухолевых клетках происходит из-за миссенс- и/или точечных мутаций; встречаются также делеции и ошибки сплайсинга [25]. Около 15% мутаций p53 это мутации сдвига рамки считывания или нонсенс-мутации [26]. В большинстве опухолей мутации TP53 приходятся на экзоны 5–8, кодирующие ДНК-связывающий домен. Вследствие этого 80% миссенс-мутаций p53 связано с проонкогенной функцией [27, 28].

Основное отличие большинства мутантных форм от p53 дикого типа, время полужизни которого в покоящихся клетках не превышает 5–10 мин, – повышенная стабильность из-за нарушения отрицательной обратной связи с E3-лигазой Mdm2 и связывания с Hsp90 и Hsc70, что стабилизирует p53 и приводит к его накоплению в клетках [29, 30]. Важно, что мутантный p53 способен образовывать олигомерные комплексы с p53 дикого типа. Это связывание может инактивировать нормальный белок и объясняет, почему мутантный p53 способен трансформировать клетки в присутствии белка дикого типа [31].

Известно широкое разнообразие изоформ двух других белков семейства: гены p63 и p73 имеют внутренний промотор в интроне 3 и, благодаря альтернативному сплайсингу, экспрессируют 6 и 35 вариантов мРНК соответственно. Ген p63 локализован в области 3q27-ter; с него экспрессируются три С-концевые изоформы – α, β, γ, образующиеся в результате альтернативного сплайсинга. Ген p73 расположен в локусе 1p36; его альтернативно сплайсированные транскрипты кодируют С-концевые изоформы α–η [32]. мРНК p63 и p73 могут транскрибироваться с дистального и внутреннего (в интроне 3) промоторов. Дистальный промотор регулирует

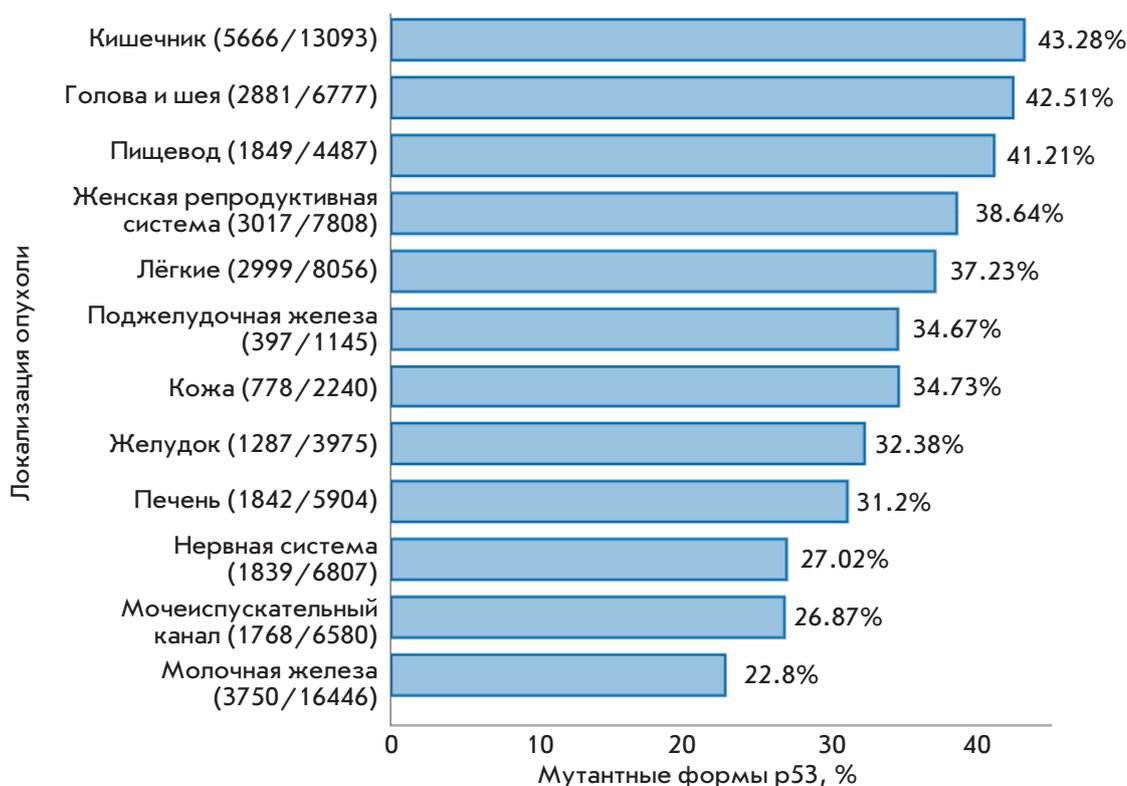


Рис. 1. Распространенность мутантных форм p53 в опухолях на основании секвенирования ДНК (IARCTP53 Database, 2019). По оси X — количество биоптатов с выявленными мутациями, по оси Y — количество проанализированных биоптатов

экспрессию *TAp63* и *TAp73* (трансактиваационные домены имеют гомологию с *p53*), тогда как с внутреннего промотора транскрибируются изоформы $\Delta Np63$ и $\Delta Np73$ — укороченные по N-концу (ΔN) белки с свойствами, противоположными свойствам изоформ *p63*/*TAp73* [33]. Эти результаты свидетельствуют о необычайном разнообразии семейства; не удивительно, что рассматриваемая проблема не только не теряет актуальность, но приобретает новые уровни сложности.

ОТВЕТЫ НА ТЕРАПЕВТИЧЕСКОЕ ИОНИЗИРУЮЩЕЕ ИЗЛУЧЕНИЕ

Белок p53

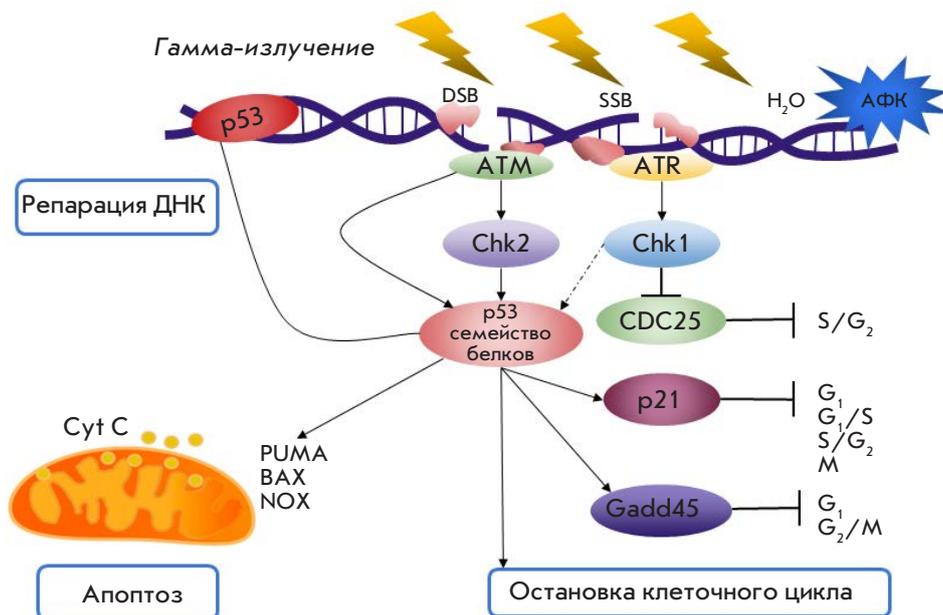
Как сказано выше, p53 активируется в ответ на стрессовые воздействия, главным образом, на повреждения ДНК, вызванные окислительным стрессом, ионизирующим излучением и др. С участием повреждения молекулы ДНК связываются белки, активирующие протеинкиназы ATM (мутирована при атаксии-телеангиэктазии) и ATR (ATM-и Rad3-связанная) [34]. Последние, в свою очередь, активируют протеинкиназы «контрольных точек» (checkpoints) Chk1 и Chk2, фосфорилирующие p53 по остаткам Ser15. Активация p53 приводит к индукции его функционального антагониста Mdm2. Связывание Mdm2 с N-концом p53 способствует моноубиквитинированию p53 и ядерному экспорту

или полиубиквитинированию и гидролизу p53 в протеасоме [35, 36]. На рис. 2 представлена обобщенная схема внутриклеточных ответов на ионизирующее излучение с участием белков семейства p53.

«Выбор» между выживанием или гибелью клетки регулируется посттрансляционными модификациями p53 и его изоформ, белками-партнерами и набором активируемых генов [37]. Белок p53 активирует транскрипцию *p21^{Cip1/Waf1}* — блокатора фазы G_1 , ингибирующего связывание циклинов A и B с протеинкиназами CDK1 и CDK2 [38, 39]. О роли p53 в регуляции S-фазы известно недостаточно. В S-фазе Chk2 фосфорилирует фосфатазу CDC25A, что приводит к ее деградации и остановке клеточного цикла [40]. p53 может задерживать прохождение G_2/M благодаря репрессии промоторов генов *CDC2* и циклина B [41].

В ответ на лучевое воздействие p53 может стимулировать апоптоз через индукцию проапоптотических (Bax) и репрессию антиапоптотических (Bcl-2) белков, а также активацию или ингибирование других таргетных генов, участвующих в регуляции клеточного цикла. Известно, что низкие дозы излучения индуцируют p21 и Hdm2 — гомолог Mdm2, а высокие дозы увеличивают соотношение Bax:Bcl-2, способствуя апоптозу [42]. Радиорезистентность обусловлена действием антиапоптотических белков (сверхэкспрессией семейства Bcl-2), потерей компонентов апоптотического сигналинга или ингибированием генов, кодирующих каспазы.

Рис. 2. Механизмы ответа на ионизирующее излучение с участием белков семейства p53



Эффективность репарации повреждений ДНК в ответ на облучение зависит от гистологического происхождения клеток и фазы клеточного цикла. Наиболее чувствительны фазы G_2 и митоз. Важно, что p53 может играть двойную роль в ответе на лучевое воздействие. В одних случаях повышение p53 увеличивает чувствительность к облучению, в других показана корреляция между повышением p53 и радиорезистентностью [43]. При слабых стрессовых воздействиях p53 может выступать фактором выживания, так как способствует репарации повреждений ДНК, поэтому нокаут p53 в клетках аденокарциномы кишечника (линия НСТ116) приводит к повышению чувствительности клеток к облучению и «митотической катастрофе» – aberrантной сегрегации хромосом, завершающейся гибелью. Существенное увеличение количества клеток, подвергающихся митотической катастрофе, наблюдали также в облученных клетках фибросаркомы человека НТ1080 после инактивации p53 доминантно-негативным мутантом [44].

Транскрипционные факторы Slug и Snail регулируют эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) и инвазию опухолевых клеток в подлежащие ткани [45]. Группа исследователей из Национального университета Сеула обнаружила, что p53 индуцирует деградацию Slug и Snail посредством Mdm2-опосредованного убиквитинирования [46]. Важно, что активность Snail зависит от статуса p53. Так, мутантные формы p53 вызывают сверхэкспрессию Snail и Slug, что имеет отношение к приобретению радиорезистентности клетками рака яичников: эти белки усиливают выживаемость клеток-предшественников за счет активации пути SCF/c-Kit [47].

Polo-подобная серин-треониновая протеинкиназа 3 (PLK3) – один из компонентов регуляторных сигналов, опосредуемых p53. PLK3 взаимодействует с p53, Chk2 и CDC25 в ответ на повреждения ДНК. p53 может связываться с промотором PLK3 и индуцировать экспрессию ее гена, после чего происходит задержка в фазе G_2/M и остановка клеточного цикла. Другой ген, регулируемый p53 – GPX1, кодирует антиоксидантный белок глутатионпероксидазу. После облучения клетки накапливают высокоактивные свободные радикалы кислорода. Благодаря индукции GPX1 и быстрому катаболизму H_2O_2 , p53 может защищать клетки от окислительного повреждения, сопровождающего лучевое воздействие [48, 49]. Здесь проявляется двойственность роли p53 при лучевых воздействиях: в одних случаях этот белок защищает клетки, в других – способствует их гибели.

Halaclic и соавт. выявили, что в клетках аденокарциномы кишки с нефункционирующим p53 активность теломеразы после облучения снижена, а в исходной изогенной линии (p53^{+/+}) повышена. Обратный эффект наблюдали у каталитической субъединицы теломеразы – TERT. После облучения активность TERT снижается при усилении индукции p53, при этом в клетках p53^{-/-} активность TERT повышена. В то время как активность теломеразы не изменяется при облучении, в клетках с нормально функционирующим p53 наблюдается ускоренное старение. Таким образом, в облученных клетках активность теломеразы и остановка клеточного цикла в G_1 регулируются в зависимости от статуса p53 [50].

Не менее важные особенности регуляции клеточного цикла показаны на клетках соединительной ткани. Так, эмбриональные фибробласты мыши (MEF

p53^{+/+}) накапливались в фазе G₁ после облучения (5 Гр) – в них активировался p53-зависимый промотор гена p21. Однако облученные клетки с нокаутом p53 не подвергались апоптозу, а останавливались в премитозе [51]. В клетках p53^{-/-} p21 и Cdc25 регулировали p53-независимую остановку в G₂ [52].

Белки p63 и p73

Роль p73 в ответе клеток на ионизирующее излучение исследована более детально, чем роль p63. Обнаружено, что экспрессия p73 при радиочувствительном раке шейки матки выше, чем при радиорезистентном. p73 является положительным регулятором транскрипции p21 при облучении и, вероятно, может выполнять роль белка p53 в регуляции контрольных точек клеточного цикла. Таким образом, p73 участвует в регуляции радиочувствительности [53].

Повышенная экспрессия p73, индуцированная облучением, активирует транскрипцию p53-зависимых генов *Bax*, *Mdm2* и *GADD45*, способствуя апоптозу или остановке клеточного цикла и ингибируя пролиферацию. Предполагают, что p73 может индуцироваться при облучении и выполнять некоторые функции p53 в опухолевых клетках с нарушением экспрессии или активности p53. Кроме того, в облученных клетках рака молочной железы и легкого экспрессия p73 подавляется активацией p53 [54–56]. Недавно показано, что нутлин – низкомолекулярный разобщитель взаимодействия p53-Mdm2 – может вызывать апоптоз в p53-негативных клетках через активацию p73 при облучении. Эти результаты обосновывают использование нутлина в терапии опухолей с нефункционирующим p53 [57].

Противоопухолевый препарат цисплатин и ионизирующее излучение вызывают фосфорилирование Tyr99 в p73 и накопление этого белка. Эта посттрансляционная модификация происходит благодаря взаимодействию p73 с тирозинкиназой Abl и способствует апоптотической активности p73. Кроме того, показана возможность ацетилирования p73 белком p300 при действии цисплатина. Полученные данные указывают на важность p73 в ответе клеток на сочетание химио- и радиотерапии [58].

Полногеномный поиск ассоциаций (GWAS) в клетках с нокаутом p63 и p73 показал, что эти белки регулируют транскрипцию генов *BRCA2*, *Rad51*, *Rad50* и *Mre11*, продукты которых принимают участие в репарации одно- и двухцепочечных разрывов ДНК. Этот механизм может определять выживание опухоли. Интересно, что изоформы ΔNp63 и ΔNp73 являются более сильными трансаktиваторами перечисленных генов, чем изоформы TA. Анализ мутаций генов p63/p73 может иметь важное значение для выбора стратегий лучевой терапии [59].

Таким образом, регуляция мутантных форм семейства p53 происходит через множество путей, в некоторых случаях неочевидных. Белки этого семейства опосредуют каскады, регулирующие становление радиоустойчивых фенотипов или гибель облученных клеток. Использование комбинаций препаратов платины и ингибиторов mTOR или иных блокаторов внутриклеточных сигналов открывает возможности модуляции белков семейства p53 и усиления ответа на ионизирующее излучение.

РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТЬ, ОПОСРЕДОВАННАЯ БЕЛКАМИ СЕМЕЙСТВА p53

Изучение роли p53 в радиорезистентности опухолевых клеток началось с работы Lee J.M. и Bernstein A., которые использовали трансгенных мышей с мутациями p53^{Pro193} и p53^{Val135} и показали, что экспрессия обоих мутантных вариантов гена p53 значительно увеличивает устойчивость гемопоэтических клеток к гамма-излучению. Это выявило связь мутаций p53 с радиорезистентностью [60]. Позднее исследовали радиочувствительность линий фибробластов эмбриона крысы (REF), трансфицированных мутантной формой p53 (*Mtp53^{Pro193}*) отдельно или в комбинации с онкогенами *H-Ras* и *E7*. Результаты опытов с трансфекцией p53^{Pro193} подтвердили полученные ранее данные о повышении радиоустойчивости клеток. Котрансфекция мутантных генов p53 и *H-Ras* или трансфекция p53^{Pro193}, *H-Ras* и *E7* приводила к появлению клонов с еще более высокой радиорезистентностью и сверхэкспрессией мутантного p53 [61].

Линии клеток аденокарциномы яичников SKOV-3 и CaOV-3 становились радиорезистентными при сверхэкспрессии мутантного p53; при этом облучение не приводило к активации и накоплению мутантной формы p53. Оказалось, что регулируемая p53 экспрессия *Bcl-2* в этих линиях связана с устойчивостью к гамма-излучению, а также с чувствительностью к цисплатину. Вероятно, мутации p53, вызывающие повышение количества белка и радиорезистентность, связаны с большей стабильностью p53 и блокированием клеточного цикла; у клеток появляется время на репарацию повреждений ДНК [62].

На клетках меланомы показано, что Chk2/hCds1-независимый сигнальный путь повреждения ДНК, дефосфорилирующий Ser376 в C-концевой области p53, приводит к повышенной активности p53 при облучении. В клетках с функционирующим p53 фосфорилирование Ser376 не регулируется повреждением ДНК, и радиорезистентность не возникает. Напротив, дефекты вышележащих механизмов активации p53 в ответ на повреждение ДНК, например, мутации Chk2/hCds1, не позволяющие фосфорилировать Ser376 p53 при облучении, связаны со становлением

радиорезистентности меланомы. Это же свойство наблюдалось у мутанта p53, не способного взаимодействовать с белком 14-3-3 [43].

В кооперации с p53 ядерный белок Ki-67, экспрессирующийся в пролиферирующих клетках и не функционирующий в покоящихся (G_0) клетках, также служит предиктором радиорезистентности. В образцах плоскоклеточного рака головы и шеи уровень экспрессии p53 коррелирует с отсутствием ответа опухолей на лучевую терапию. Сочетание накопления p53 и низкого уровня Ki-67 связано с рецидивами опухолей у пациентов с ранними стадиями заболевания. Таким образом, p53 и Ki-67 могут играть ключевую роль в выборе стратегий радиотерапии пациентов с опухолями головы и шеи [63]. Множественные мутации, включающие изменения в p53-зависимых проапоптотических белках Bcl-2, PUMA и Bax, усиливают радио- и химиорезистентность [64].

Активность тирозинкиназы фокальных контактов ФАК повышена при различных опухолях. В линии клеток плоскоклеточного рака кожи с нокаутом ФАК облучение подавляет транскрипцию p21 и других генов-мишеней p53, опосредующих остановку клеточного цикла и репарацию повреждений. Подавление активации p53 и p21 способствовало радиосенсибилизации клеток; этого не наблюдалось при интактной ФАК [65]. Эксперименты по ингибированию ФАК в p53-негативных клетках рака легкого показали обнадеживающие результаты: наблюдалось значительное снижение миграции и инвазии *in vitro*, а также тенденция к повышению выживаемости *in vivo* [66]. Вероятно, перспективной может оказаться модуляция активности ФАК в комбинации с облучением.

Сверхэкспрессия и накопление p53 в клетках рака эндометрия обусловлены, в частности, тем, что мутантный p53 рефрактерен к убиквитин-опосредованной протеасомной деградации. При одновременном накоплении p53 и фосфатазы PTEN клетки эндометрия становятся нечувствительными к лучевой терапии, что сопряжено с прогрессированием заболевания [67].

Поскольку ионизирующее излучение вызывает окислительный стресс [68], в лучевом повреждении митохондрий участвуют АФК. Активация митохондриального Bnip3 – проапоптотического белка семейства Bcl-2, регулирующего генерацию АФК в облученных клетках и митофагию, не происходила в клетках с нефункционирующим p53. Так, p53 выступает как ключевой механизм в регуляции Bnip3; отсутствие функционирующего p53 может влиять на выживаемость опухолевых клеток при облучении за счет поддержания целостности митохондрии [69]. Статус p53 оказывается важным биомаркером прогнозирования терапевтической ценности препаратов, мишенями которых служат митохондриальные белки.

О роли p63 и p73 в формировании фенотипов радиорезистентности известно недостаточно. Поскольку в определенных случаях белки этого семейства заменяют или дополняют друг друга, можно предположить, что p63 и p73 также могут регулировать устойчивость к облучению с использованием механизмов, схожих с p53. Действительно, группой Moergel [21] исследован p63 в образцах плоскоклеточного рака слизистой оболочки полости рта. Экспрессия трансактивационной формы TAp63 до лечения служит маркером радиорезистентности; высокие уровни TAp63 ассоциированы с низкой эффективностью лечения и неблагоприятным прогнозом [70, 71]. Эти результаты подтверждаются исследованиями биоптатов плоскоклеточного рака головы и шеи, полученных от 33 пациентов, в опухолях которых экспрессия p63, повышенная до лечения, также рассматривается как предиктор радиорезистентности, но требует изучения на большей когорте пациентов [21].

Изучена также экспрессия изоформы $\Delta Np63\alpha$ при облучении линий плоскоклеточного рака гортани, головы и шеи (PCI-I-1, PCI-13, SCC-68 и SCC-4) и первичных кератиноцитов слизистой оболочки полости рта. Во всех линиях уровень экспрессии $\Delta Np63\alpha$ зависел от дозы облучения. Нокадаун $\Delta Np63$ с помощью малой интерферирующей РНК (siRNA) приводил к усилению чувствительности к облучению [72]. Однако отмечен и обратный эффект: экспрессия TAp73 и каспазы 7 в клетках колоректального рака после облучения коррелировала с радиочувствительностью. Далее с помощью микроРНК miR-622 блокировали ген Rb1. Потеря Rb1 ингибировала образование комплекса Rb-E2F1-P/CAF, что приводило к снижению TAp73 и каспазы 7; клетки приобретали радиорезистентность [73].

Известно также, что в некоторых случаях при облучении клеток p63/p73 связываются с мутантной формой p53 и не могут активировать проапоптотические гены, вследствие чего клетки выживают. Для повышения активности p63/p73 используют ингибиторы мутантных форм p53, сверхэкспрессию p63/p73 или нарушение физического взаимодействия между белками семейства с помощью пептидомиметиков или низкомолекулярных соединений (см. ниже) [74, 75].

ПУТИ ПРЕОДОЛЕНИЯ РАДИОРЕЗИСТЕНТНОСТИ ПРИ МОДУЛЯЦИИ БЕЛКОВ СЕМЕЙСТВА p53

Модуляция p53

Основные подходы к модуляции p53 для радиосенсибилизирующего эффекта включают (рис. 3):

1. Низкомолекулярные стабилизаторы p53 [76];

2. Модуляторы шаперонов/стабилизаторы дикого и мутантного p53 [77];

3. Регуляторы E3-убиквитинлигаз;

4. Модуляторы компонентов p53 сигнального пути (например, CDK, Vcl-2) [78].

Один из примеров низкомолекулярных стабилизаторов – стиктиновая кислота (stictic acid), которая восстанавливает функции p53, связываясь с мутантной формой [79]. Подобным действием обладают и соединения на основе карбазола. Так, РК083 связывается с мутантной формой p53^{Y220C} и восстанавливает его транскрипционную активность, приводя к апоптозу [36, 80, 81]. Аналоги хиназолина (2-стирил-4-аминохиназолин, CP-31398) [82–84] реактивируют p53. Алкилирующие агенты участвуют в восстановлении структуры белка p53, непосредственно связываясь и модифицируя мутантные формы [85]. В число таких p53-восстанавливающих агентов входят PRIMA-1 и его более эффективный аналог PRIMA-1Met (APR-246). В клетках эти соединения превращаются в активное соединение метиленихинуклидинон (MQ) – акцептор Михаэля, ковалентно связывающийся с остатками цистеина в ДНК-связывающем домене p53. Cys277 важен для MQ-опосредованной термостабилизации мутантов p53^{R273H}, тогда как Cys124 необходим для APR-246-опосредованного функционального восстановления мутантного p53^{R175H} в опухолевых клетках и нормализации активности белка дикого типа. Эти исследования особенно важны

для рационального дизайна молекул, действие которых направлено на p53 [86–88].

Активность p53 может регулироваться и опосредованно, через стабилизаторы нормальной или мутантных форм. Blanden и соавт. показали, что низкомолекулярное соединение ZMC1 (NSC319726) действует как металлошаперон и восстанавливает функции p53^{R175H} [89, 90]. В случае стабилизации мутантных проонкогенных форм p53 посредством Hsp90 для сенсibilизации клетки к химио- и радиотерапии необходимо подавить активность этого шаперона. С этой целью используют ингибиторы Hsp90 (Ganetespib и Geldanamycin), что позволяет подавлять пролиферацию опухолевых клеток с мутантным p53. AUY922 и другие «кандидаты» в лекарственные средства дестабилизируют мутантный белок путем подавления шаперона [91–94]. Один из представителей класса статинов – церивастатин – ингибирует мевалонатный путь. Это соединение через ингибирование HMG-CoA-редуктазы (фермент синтеза мевалоновой кислоты) уменьшает активность гистондеацетилазы HDAC6, что приводит к диссоциации комплекса Hsp90 с мутантным p53 [95]. Исходя из этого можно предположить, что дестабилизация мутантного p53 и восстановление функций p53 повысят чувствительность клеток к облучению.

Разрабатываются соединения, регулирующие взаимодействие E3-лигаз и p53. Среди многочисленных разобщителей взаимодействия Mdm2-p53 обще-

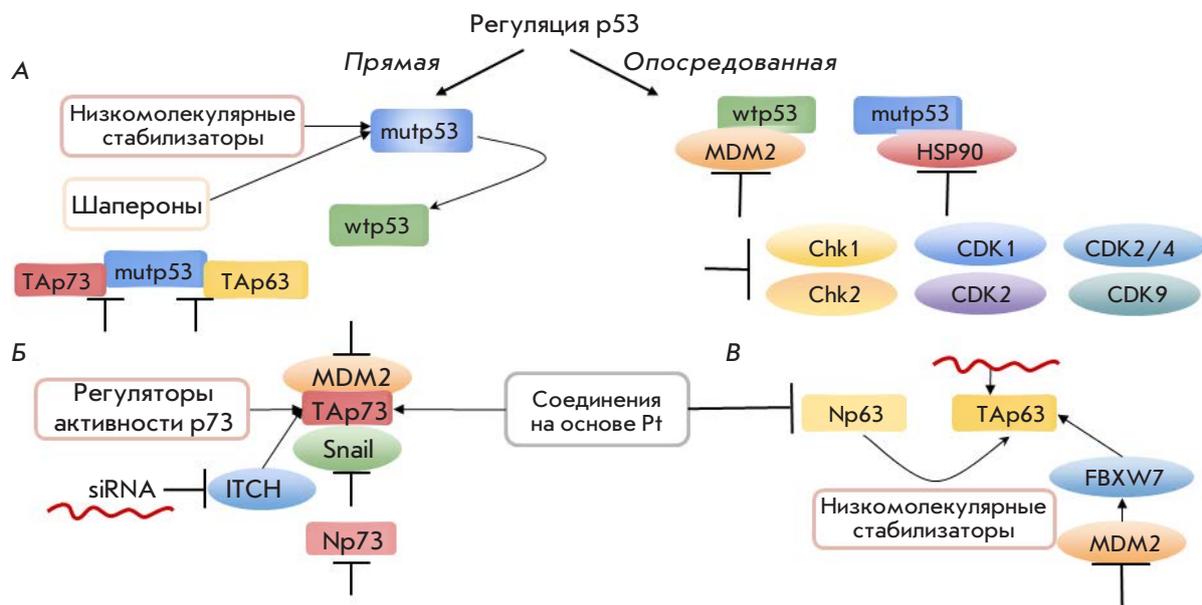


Рис. 3. Способы повышения чувствительности опухолевых клеток к ионизирующему излучению при модуляции белков семейства p53. А – модуляция p53 посредством низкомолекулярных стабилизирующих молекул и шаперонов. Б – регуляция p73 при действии на белки семейства Snail и E3-убиквитинлигазы (MDM2, ITCH). В – воздействие на изоформы p63 через Pt-содержащие соединения, низкомолекулярные стабилизаторы и активность убиквитинлигаз (MDM2, FBXW7). Объяснения в тексте

признанным является семейство *цис*-имидазолинов (нутлинов). AMG-232 проходит клинические испытания [96]. Высокий терапевтический потенциал имеют и антрахиноны, активирующие p53 через подавление Mdm2 [97, 98]. Разнообразие ингибиторов Mdm2 велико и включает генистеины, куркумины, гинзенозиды, SP141 и двойные ингибиторы NFAT1-Mdm2. Так, куркумин – природное соединение с антиоксидантными свойствами – может стабилизировать p53 через формирование стабильного комплекса p53 с (NAD(P)H:хинон-оксидоредуктазой 1 [99], а генистеин способен усиливать гибель клеток через p53-зависимый апоптоз [100–102]. В качестве привлекательной мишени для терапии рассматривают USP14 – активатор сигнасомы COPS5, который усиливает активность E3-лигазы, и подбирают для нее ингибиторы, например IU1 и AP15 [103].

Модуляция p53 может происходить косвенно, посредством регуляции компонентов сигнального пути p53. Одной из многообещающих стратегий может стать воздействие на циклинзависимые киназы – регуляторы клеточного цикла и транскрипции [104]. При использовании росковитина – ингибитора CDK1 и CDK2 – удалось вызвать апоптоз клеток с мутантным p53 [105, 106]. Химические ингибиторы mTOR (mammalian target of rapamycin), циклинзависимых протеинкиназ CDK1, CDK7, CDK9 и поли(ADP-рибозо)полимеразы (PARP) также влияют на функции p53. Росковитин и флавопиридол увеличивают уровень p53 в клетках, снижая транскрипцию *Mdm2*, вероятно, за счет ингибирования CDK7 или CDK9 – компонентов общего транскрипционного аппарата [107]. Влияние ингибиторов CDK флавопиридола, THZ1 или YKL-1-116, на транскрипцию *Mdm2* и индукцию p53 исследовали с использованием репортера Mdm2:T2A-GFP и оценили его трансактивацию в клетках рака молочной железы (линия MCF-7). Флавопиридол и росковитин увеличивали трансактивацию p53 вследствие истощения Mdm2. Хотя в этих ситуациях p53, вероятно, неактивен (поскольку транскрипция в присутствии ингибитора транскрипционных протеинкиназ нарушена или отсутствует), при удалении ингибиторов CDK7 и CDK9 (THZ1 и YKL-1-116 соответственно) p53 активирует мишени DR5, Fas, p21 и усиливает противоопухолевый эффект облучения [108, 109].

Действие динациклиба (ингибитор CDK1, CDK2, CDK5, CDK9 и CDK12) также приводило к переключению на p53-зависимый апоптоз [110, 111]. Кроме того, AT7519 (ингибитор CDK1, CDK2, CDK4, CDK6 и CDK9) и SNS-032 (ингибитор CDK2, CDK7 и CDK9) повышают чувствительность к облучению через активацию p53 и подавление Chk1 [112]. Соединение YM155 влияет на регуляцию клеточного цикла че-

рез Chk1 с Chk2, стабилизируя p53 и p21 [113]. Тиазольное производное хинона RO-3306 – ингибитор CCNB1/Cdk1 – вызывает p53-опосредованный апоптоз клеток нейробластомы при интактном p53 [114]. Лютеолин, который приводит к деградации Mdm2, способен ингибировать циклин D1 и CDK2/4, тем самым повышая уровень p53 в клетке [115]. Таким образом, перспективна комбинация ингибиторов CDK с лучевой терапией. На *рис. 4* представлены формулы перечисленных ингибиторов CDK.

Наряду с химиотерапевтическими препаратами в терапии опухолей используют также генно-терапевтические средства и комплексное воздействие на клеточный метаболизм, что может восстанавливать или обходить нарушения функций мутантного p53 через регуляцию метаболизма опухолевых клеток. В клетках с неизменным p53 АТФ синтезируется путем окислительного фосфорилирования. Потеря же нормальных функций p53 приводит к зависимости клетки от гликолиза; клетки получают возможность выживать в условиях гипоксии. Недавние результаты свидетельствуют о том, что с помощью ингибитора гликолиза можно повысить чувствительность опухоли к радиотерапии [116].

Изменение активности p73 и p63

Повысить чувствительность к химио- и радиотерапии можно посредством p53 и воздействием на другие белки семейства. Так, при некоторых режимах химиотерапии наблюдается увеличение экспрессии p73 [117]. Соединения на основе платины (цисплатин, оксалиплатин и др.) помогают преодолеть лекарственную устойчивость, повышая активность белка TAp73 и индуцируя апоптоз опухолевых клеток [118]. В дополнение к этому цисплатин подавляет проонкогенную форму $\Delta Np63\alpha$, что может приводить к подавлению роста опухоли [119, 120], и, предположительно, повышать ее радиочувствительность.

p53-подобные стратегии можно применить и к p73, и p63 (регулировать активность E3-лигаз). E3-лигаза ITCH негативно регулирует p73, ее нокаут с помощью сочетания наночастиц и siRNA повышал стабилизацию p73 в клетках, мутантных по p53 [121]. Соединения, которые регулируют непосредственно активность p53, могут оказаться эффективными в случае p63 и p73. Куркумин – стабилизатор p53 – активирует экспрессию p73 [99, 122].

Посредством активации AMP-активируемой протеинкиназы AMPK метформин влияет на все три белка семейства p53: повышает количество p53 и p73, при этом снижает уровень проонкогенной формы p63 ($\Delta Np63\alpha$) [123, 124]. Продигозин положительно влияет на экспрессию p53, активируя его репортер путем индукции p73 и снижения онкогенного $\Delta Np73$, супрес-

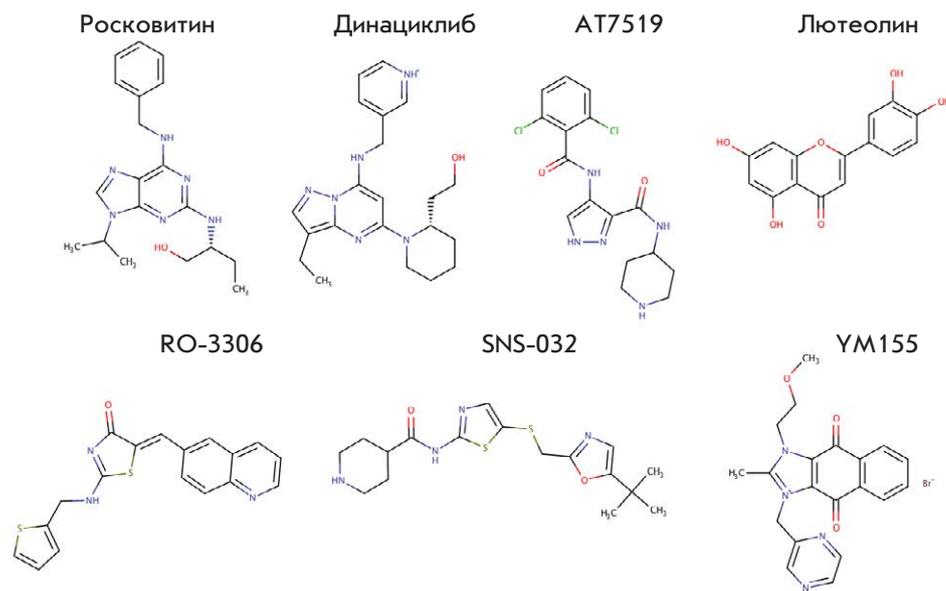


Рис. 4. Терапевтически перспективные ингибиторы циклинзависимых протеинкиназ, модулирующие активность p53

сора гена p53 [125], а соединение NSC59984 приводит к дестабилизации мутантного p53 и его деградации, при этом вызывается p73-зависимый апоптоз [126].

Помимо регуляторов, действующих на все белки семейства, предложены агенты, селективные в отношении отдельных белков. *Abrus agglutinin* (AGG) – растительный лектин, ингибирующий трансляцию, – приводит к индукции p73 [127]. Индуцированный лектином p73 подавляет экспрессию Snail и ингибирует ЭМП в клетках плоскоклеточного рака гортани. Примечательно, что AGG способствует перемещению Snail из ядра в цитоплазму и запускает его деградацию посредством убиквитинирования. Таким образом, AGG стимулирует p73 и супрессирует EGF-индуцированный ЭМП и инвазивность, ингибируя путь ERK/Snail [128]. Протопорфирин IX (PpIX), метаболит аминолевулиновой кислоты, применяемый в фотодинамической терапии рака, стабилизирует TAr73 и активирует TAr73-зависимый апоптоз в опухолевых клетках, лишенных p53. Активация TAr73 осуществляется через нарушение взаимодействий TAr73/MDM2, TAr73/MDMX и ингибирование деградации TAr73 с помощью убиквитин-лигазы ITCH [129]. Подобными свойствами обладает и 1-карбальдегид-3,4-диметоксисантон, который стабилизирует TAr73, ингибируя его связывания с Mdm2 [130]. Диаллилдисульфид (DADS) увеличивает чувствительность к ионизирующему излучению, повышая уровень TAr73 и понижая уровень изоформы ΔNp73. Опосредованный DADS баланс TAr73/ΔNp73 связан с радиочувствительностью клеток рака шейки матки [131].

Опубликованы результаты использования микроРНК для модуляции p63 [132]. miR-130b активирует

противоопухолевую изоформу p63 (TAr63), связываясь непосредственно с белком [133]. Важно уделить особое внимание изучению ответа p63 на облучение и приобретение p63-опосредованной радиорезистентности, а также подбору таргетных препаратов к соответствующему гену/белку для создания новых методов терапии, особенно для пациентов с кросс-резистентностью к химиопрепаратам.

Важной и малоизученной представляется проблема разработки способов таргетной доставки на основе липосом и наночастиц. Мезопористые наночастицы UCNPs(BTZ)@ mSiO₂-H₂A/p53, которые, помимо кДНК p53, содержат ингибитор протеасом бортезомиб, повышали чувствительность клеток к этому препарату и вызывали более выраженный апоптоз в сравнении с контрольными клетками без наночастиц [134]. В клетки могут быть доставлены не только фрагменты генов, но и антагонисты E3-лигаз p53 Mdm2 и MdmX в составе наночастиц золота [135]. Также низкомолекулярные соединения VIP116 и PM2, ингибирующие взаимодействия p53-Mdm2 и p53-Mdm4, доставленные в липодисках – наноразмерных двухслойных структурах, стабилизированных в плоские круглые формы липидами, связанными с полиэтиленгликолем, значительно снижали жизнеспособность опухолевых клеток [136]. Подобный подход может быть применен для усиления гибели опухолевых клеток при ионизирующем излучении.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ. НОВЫЕ ПОДХОДЫ К ИЗВЕСТНОЙ ПРОБЛЕМЕ

Несмотря на десятилетия исследований, значение p53 как молекулярной мишени и прогностического

маркера в лучевой терапии остается противоречивым. Ситуация осложняется вариабельностью р53-зависимых ответов при облучении разных опухолей, даже линий клеток одной тканевой принадлежности [137]. Тем не менее, р53 отмечен как информативный генетический маркер прогноза острой токсичности или ответа на лучевую терапию нативных опухолей [138]. С помощью анализа экспрессии р53 и ряда других генов удалось предсказать величину поглощенной дозы, при которой развивается тот ли иной ответ опухоли [139, 140]. Успехом применения терапии с воздействием на р53 может считаться гендидин (Ad-p53) – рекомбинантный аденовирус, сконструированный для экспрессии р53 дикого типа в опухоли, где этот белок мутирован. Ad-p53 применяется в клинике и хорошо сочетается с радиотерапией, особенно при раке молочной и поджелудочной желез, шейки матки и яичников [141].

Информация о применении р63 и р73 в радиоонкологии в настоящее время ограничена эксперимен-

тальными данными и гипотезами о практическом использовании [142]. Этот пробел необходимо восполнить, поскольку анализ семейства р53 в целом дает более детальную – и более сложную – картину регуляции ответа на облучение.

Остается нерешенной проблема р53-негативных опухолей. Одним из путей, позволяющих обойти нефункционирующие р53-зависимые механизмы, является использование наноструктурированных частиц серебра, способных вызвать митохондриальный стресс и апоптоз независимо от р53 [143]; предстоит установить, можно ли комбинировать такие материалы с облучением [144]. Наконец, обоснованными следует считать воздействия на р63 и р73, если их функции сохранены в р53-негативных опухолях [145]. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-34-90046.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Seidlitz A., Combs S.E., Debus J., Baumann M. // Oxford Textbook of Oncology. 2016. P. 173.
- Snyder A.R., Morgan W.F. // Cancer Metastasis Rev. 2004. V. 23. № 3–4. P. 259–268.
- Finnberg N., Wambi C., Ware J.H., Kennedy A.R. // Cancer Biol. Ther. 2008. V. 7. № 12. P. 2023–2033.
- McIlwrath A.J., Vasey P.A., Ross G.M., Brown R. // Cancer Res. 1994. V. 54. № 14. P. 3718–3722.
- Mallya S.M., Sikpi M.O. // Mutat. Res. 1999. V. 434. № 2. P. 119–132.
- Moergel M., Abt E., Stockinger M., Kunkel M. // Oral Oncol. 2010. V. 46. № 9. P. 667–671.
- Akervall J., Nandalur S., Zhang J., Qian C.N., Goldstein N., Gyllerup P., Resau J. // Eur. J. Cancer. 2014. V. 50. № 3. P. 570–581.
- Dietz S., Rother K., Bamberger C., Schmale H., Mössner J., Engeland K. // FEBS Lett. 2002. V. 525. № 1–3. P. 93–99.
- Lane D.P., Crawford L.V. // Nature. 1979. V. 278. № 5701. P. 261–263.
- Linzer D.I., Levine A.J. // Cell. 1979. V. 17. № 1. P. 43–52.
- Ryan K.M., Phillips A.C., Vousden K.H. // Curr. Opin. Cell Biol. 2001. V. 13. № 3. P. 332–337.
- Joerger A.C., Fersht A.R. // CSH Perspect. Biol. 2010. V. 2. № 6. P. a000919.
- Sullivan K.D., Galbraith M.D., Andrysiak Z., Espinosa J.M. // Cell Death Differ. 2018. V. 25. № 1. P. 133–143.
- May P., May E. // Oncogene. 1999. V. 18. № 53. P. 7621–7636.
- Tibbetts R.S., Brumbaugh K.M., Williams J.M., Sarkaria J.N., Cliby W.A., Shieh S.Y., Abraham R.T. // Genes Dev. 1999. V. 13. № 2. P. 152–157.
- Harms K.L., Chen X. // Cell Death Differ. 2006. V. 13. № 6. P. 890–897.
- Joerger A.C., Rajagopalan S., Natan E., Veprintsev D.B., Robinson C.V., Fersht A.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 42. P. 17705–17710.
- Yang A., McKeon F. // Nat. Rev. Mol. 2000. V. 1. № 3. P. 199–207.
- Wang X., Zeng L., Wang J., Chau J.F.L., Lai K.P., Jia D., He L. // Cell Death Differ. 2011. V. 18. № 1. P. 5–15.
- Johnson J., Liu Y., Lawson S., Kulesz-Martin M. // Proc. Am. Assoc. Cancer Res. 2005. V. 46. P. 5691.
- Thurfjell N., Coates P.J., Vojtesek B., Benham-Motlagh P., Eisold M., Nylander K. // Int. J. Mol. Med. 2005. V. 16. № 6. P. 1065–1070.
- Dötsch V., Bernassola F., Coutandin D., Candi E., Melino G. // CSH Perspect. Biol. 2010. V. 2. № 9. a004887.
- Harris C.C. // J. Natl. Cancer Inst. 1996. V. 88. № 20. P. 1442–1455.
- Bourdon J.C. // Br. J. Cancer. 2007. V. 97. № 3. P. 277–282.
- Allred D.C., Clark G.M., Elledge R., Fuqua S.A., Brown R.W., Chamness G.C., McGuire W.L. // J. Natl. Cancer Inst. 1993. V. 85. № 3. P. 200–206.
- Freed-Pastor W.A., Prives C. // Genes Dev. 2012. V. 26. № 12. P. 1268–1286.
- Garcia C.A., Ahmadian A., Gharizadeh B., Lundeberg J., Ronaghi M., Nyrén P. // Gene. 2000. V. 253. № 2. P. 249–257.
- Hartmann A., Blaszyk H., McGovern R.M., Schroeder J.J., Cunningham J., De Vries E.M., Sommer S.S. // Oncogene. 1995. V. 10. № 4. P. 681–688.
- Quinlan D.C., Davidson A.G., Summers C.L., Warden H.E., Doshi H.M. // Cancer Res. 1992. V. 52. № 17. P. 4828–4831.
- Yue X., Zhao Y., Xu Y., Zheng M., Feng Z., Hu W. // J. Mol. Biol. 2017. V. 429. № 11. P. 1595–1606.
- Davidoff A.M., Humphrey P.A., Iglehart J.D., Marks J.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1991. V. 88. № 11. P. 5006–5010.
- Inoue K., Fry E.A. Mutant p53 and MDM2 in Cancer. Dordrecht, Heidelberg, New York, London: Springer, 2014. P. 17–40.
- Bénard J., Douc-Rasy S., Ahomadegbe J.C. // Hum. Mutat. 2003. V. 21. № 3. P. 182–191.
- Maréchal A., Zou L. // CSH Perspect. Biol. 2013. V. 5. № 9. P. 012716.
- Gajjar M., Candeias M.M., Malbert-Colas L., Mazars A., Fujita J., Olivares-Illana V., Fahraeus R. // Cancer Cell. 2012. V. 21. № 1. P. 25–35.
- Joerger A.C., Fersht A.R. // Annu. Rev. Biochem. 2016. V. 85. P. 375–404.

37. Saito S.I., Goodarzi A.A., Higashimoto Y., Noda Y., Lees-Miller S.P., Appella E., Anderson C.W. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 15. P. 12491–12494.
38. Cmielova J., Rezáčová M. // *J. Cell. Biochem.* 2011. V. 112. № 12. P. 3502.
39. Kreis N.N., Sanhaji M., Rieger M.A., Louwen F., Yuan J. // *Oncogene*. 2014. V. 33. № 50. P. 5716–5728.
40. Jinno S., Suto K., Nagata A., Igarashi M., Kanaoka Y., Nojima H., Okayama H. // *EMBO J.* 1994. V. 13. № 7. P. 1549–1556.
41. Fei P., El-Deiry W.S. // *Oncogene*. 2003. V. 22. № 37. P. 5774–5783.
42. Latonen L., Yoichi T., Marikki L. // *Oncogene*. 2001. V. 20. № 46. P. 6784–6793.
43. Palazzo J.P., Kafka N.J., Grasso L., Chakrani F., Hanau C., Cuesta K.H., Mercer W.E. // *Hum. Pathol.* 1997. V. 28. № 10. P. 1189–1195.
44. Gudkov A.V., Komarova E.A. // *Nat. Rev. Cancer*. 2003. V. 3. № 2. P. 117–129.
45. Muller P.A., Vousden K.H., Norman J.C. // *J. Cell. Biol.* 2011. V. 192. № 2. P. 209–218.
46. Lim S.O., Kim H., Jung G. // *FEBS Lett.* 2010. V. 584. № 11. P. 2231–2236.
47. Kurrey N.K., Jalgaonkar S.P., Joglekar A.V., Ghanate A.D., Chaskar P.D., Doiphode R.Y., Bapat S.A. // *Stem Cells*. 2009. V. 27. № 9. P. 2059–2068.
48. Jen K.Y., Cheung V.G. // *Cancer Res.* 2005. V. 65. № 17. P. 7666–7673.
49. Budanov A.V. *Mutant p53 and MDM2 in Cancer*. Dordrecht, Heidelberg, New York, London: Springer, 2014. P. 337–358.
50. Halacli S.O., Canpinar H., Cimen E., Sunguroglu A. // *Oncol. Lett.* 2013. V. 6. № 3. P. 807–810.
51. Pohl F., Grosse J., Grimm D., Brockhoff G., Westphal K., Moosbauer J., Schoenberger J. // *Thyroid*. 2010. V. 20. № 2. P. 159–166.
52. Attardi L.D. // *Mutat. Res.* 2005. V. 569. № 1–2. P. 145–157.
53. Liu S.S., Leung R.C.Y., Chan K.Y.K., Chiu P.M., Cheung A.N.Y., Tam K.F., Ngan H.Y.S. // *Clin. Cancer Res.* 2004. V. 10. № 10. P. 3309–3316.
54. Wakatsuki M., Ohno T., Iwakawa M., Ishikawa H., Noda S., Ohta T., Nakano T. // *Int. J. Radiat. Oncol. Biol. Phys.* 2008. V. 70. № 4. P. 1189–1194.
55. Lin K.W., Nam S.Y., Toh W.H., Dulloo I., Sabapathy K. // *Neoplasia*. 2004. V. 6. № 5. P. 546–557.
56. Ramadan S., Terrinoni A., Catani M.V., Sayan A.E., Knight R.A., Mueller M., Candi E. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 331. № 3. P. 713–717.
57. Impicciatore G., Sancilio S., Miscia S., Di Pietro R. // *Curr. Pharm. Des.* 2010. V. 16. № 12. P. 1427–1442.
58. Adamovich Y., Adler J., Meltser V., Reuven N., Shaul Y. // *Cell Death Differ.* 2014. V. 21. № 9. P. 1451–1459.
59. Lin Y.L., Sengupta S., Gurdziel K., Bell G.W., Jacks T., Flores E.R. // *PLoS Genet.* 2009. V. 5. № 10. e1000680.
60. Lee J.M., Bernstein A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1993. V. 90. № 12. P. 5742–5746.
61. Bristow R.G., Jang A., Peacock J., Chung S., Benchimol S., Hill R.P. // *Oncogene*. 1994. V. 9. № 6. P. 1527–1536.
62. Concin N., Zeillinger C., Stimpfel M., Schiebel I., Tong D., Wolff U., Zeillinger R. // *Cancer Lett.* 2000. V. 150. № 2. P. 191–199.
63. Couture C., Raybaud-Diogenè H., Têtu B., Bairati I., Murry D., Allard J., Fortin A. // *Cancer*. 2002. V. 94. № 3. P. 713–722.
64. Perri F., Pacelli R., Della Vittoria Scarpato G., Cella L., Giuliano M., Caponigro F., Pepe S. // *Head. Neck.* 2015. V. 37. № 5. P. 763–770.
65. Graham K., Moran-Jones K., Sansom O.J., Brunton V.G., Frame M.C. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 12. e27806
66. Dragoj M., Bankovic J., Sereti E., Stojanov S.J., Dimas K., Pesic M., Stankovic T. // *Invest. New Drugs*. 2017. V. 35. № 6. P. 718–732.
67. Akiyama A., Minaguchi T., Fujieda K., Hosokawa Y., Nishida K., Shikama A., Satoh T. // *Oncol. Lett.* 2019. V. 18. № 6. P. 5952–5958.
68. Yoshida T., Goto S., Kawakatsu M., Urata Y., Li T.S. // *Free Radic. Res.* 2012. V. 46. № 2. P. 147–153.
69. Chang H.W., Kim M.R., Lee H.J., Lee H.M., Kim G.C., Lee Y.S., Lee J.C. // *Oncogene*. 2019. V. 38. № 19. P. 3729–3742.
70. Somerville T.D., Xu Y., Miyabayashi K., Tiriac H., Cleary C.R., Maia-Silva D., Vakoc C.R. // *Cell Rep.* 2018. V. 25. № 7. P. 1741–1755.
71. Ding R., Cai X., Xu F., Wang H., Zhang B. // *Die Pharmazie*. 2017. V. 72. № 7. P. 414–418.
72. Moergel M., Goldschmitt J., Stockinger M., Kunkel M. // *Clin. Oral Investig.* 2014. V. 18. № 4. P. 1259–1268.
73. Ma W., Yu J., Qi X., Liang L., Zhang Y., Ding Y., Ding Y. // *Oncotarget*. 2015. V. 6. № 18. P. 15984.
74. Li Y., Prives C. // *Oncogene*. 2007. V. 26. № 15. P. 2220–2225.
75. Johnson J.L., Lagowski J.P., Sundberg A., Lawson S., Liu Y., Kulesz-Martin M. // *Proc. Amer. Assoc. Cancer Res.* 2006. V. 47. P. 5183.
76. Doveston R.G., Kuusk A., Andrei S.A., Leysen S., Cao Q., Castaldi M.P., Ottmann C. // *FEBS Lett.* 2017. V. 591. № 16. P. 2449–2457.
77. Li C., Xiao Z.X. // *BioMed Res. Int.* 2014. V. 14. P. 1–9.
78. Chen B., Wen P., Hu G., Gao Y., Qi X., Zhu K., Zhao G. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2020. V. 8. P. 408.
79. Wassman C.D., Baronio R., Demir Ö., Wallentine B.D., Chen C.K., Hall L.V., Chamberlin A.R. // *Nat. Commun.* 2013. V. 4. № 1. P. 1–9.
80. Bauer M.R., Krämer A., Settanni G., Jones R.N., Ni X., Khan T.R., Joerger A.C. // *ACS Chem. Biol.* 2020. V. 15. № 3. P. 657–668.
81. Synnott N.C., O'Connell D., Crown J., Duffy M.J. // *Breast Cancer Res. Treat.* 2020. V. 179. № 1. P. 47–56.
82. Wang H., Liao P., Zeng S.X., Lu H. // *Cancer Biol. Ther.* 2020. V. 21. № 3. P. 269–277.
83. Liu L., Yu Z.Y., Yu T.T., Cui S.H., Yang L., Chang H., Ren C.C. // *J. Cell. Physiol.* 2020. V. 235. № 11. P. 8768–8778.
84. Wei X.W., Yuan J.M., Huang W.Y., Chen N.Y., Li X.J., Pan C.X., Su G.F. // *Eur. J. Med. Chem.* 2020. V. 186. P. 111851.
85. Loh S.N. // *Biomolecules*. 2020. V. 10. № 2. P. 303.
86. Zhang Q., Bykov V.J., Wiman K.G., Zawacka-Pankau J. // *Cell Death Dis.* 2018. V. 9. № 5. P. 1–12.
87. Duffy M.J., Synnott N.C., McGowan P.M., Crown J., O'Connor D., Gallagher W.M. // *Cancer Treat. Rev.* 2014. V. 40. № 10. P. 1153–1160.
88. Ramraj S.K., Elayapillai S.P., Pelikan R.C., Zhao Y.D., Isingizwe Z.R., Kennedy A.L., Benbrook D.M. // *Int. J. Cancer*. 2020. V. 147. № 4. P. 1086–1097.
89. Blanden A.R., Yu X., Wolfe A.J., Gilleran J.A., Augeri D.J., O'Dell R.S., Carpizo D.R. // *Mol. Pharmacol.* 2015. V. 87. № 5. P. 825–831.
90. Garufi A., D'Orazi V., Crispini A., D'Orazi G. // *Int. J. Oncol.* 2015. V. 47. № 4. P. 1241–1248.
91. Li D., Yallowitz A., Ozog L., Marchenko N. // *Cell Death Dis.* 2014. V. 5. № 4. P. e1194–e1194.
92. Alexandrova E.M., Yallowitz A.R., Li D., Xu S., Schulz R., Proia D.A., Moll U.M. // *Nature*. 2015. V. 523. № 7560. P. 352–356.
93. McLaughlin M., Barker H.E., Khan A.A., Pedersen M., Dillon M., Mansfield D.C., Nutting C.M. // *BMC Cancer*. 2017. V. 17.

- № 1. P. 86.
94. Mantovani F, Collavin L., Del Sal G. // *Cell Death Differ.* 2019. V. 26. № 2. P. 199–212.
95. Ingallina E., Sorrentino G., Bertolio R., Lisek K., Zannini A., Azzolin L., Rosato A. // *Nat. Cell Biol.* 2018. V. 20. № 1. P. 28–35.
96. Gluck W.L., Gounder M.M., Frank R., Eskens F., Blay J.Y., Cassier P.A., Siegel D. // *Invest. New Drugs.* 2020. V. 38. № 3. P. 831–843.
97. Anifowose A., Yuan Z., Yang X., Pan Z., Zheng Y., Zhang Z., Wang B. // *Bioorganic Med. Chem. Lett.* 2020. V. 30. № 2. P. 126786.
98. Anifowose A., Agbowuro A.A., Tripathi R., Lu W., Tan C., Yang X., Wang B. // *Med. Chem. Res.* 2020. V. 29. P. 1199–1210.
99. Patiño-Morales C.C., Soto-Reyes E., Arechaga-Ocampo E., Ortiz-Sánchez E., Antonio-Véjar V., Pedraza-Chaverri J., García-Carrancá A. // *Redox Biol.* 2020. V. 28. P. 101320.
100. Morris S.M., Chen J.J., Domon O.E., McGarrity L.J., Bishop M.E., Manjanatha M.G., Casciano D.A. // *Mutation Res./Fund. Mol. Mech. Mutagenesis.* 1998. V. 405. № 1. P. 41–56.
101. Wang W., Zafar A., Rajaei M., Zhang R. // *Cells.* 2020. V. 9. № 5. P. 1176.
102. Rasafar N., Barzegar A., Aghdam E.M. // *Life Sci.* 2020. V. 245. P. 117358.
103. Ma Y.S., Wang X.F., Zhang Y.J., Luo P., Long H.D., Li L., Chang Z.Y. // *Mol. Ther. Oncolytics.* 2020. V. 16. P. 147–157.
104. Lee B., Sandhu S., McArthur G. // *Curr. Opin. Oncol.* 2015. V. 27. № 2. P. 141–150.
105. Jabbour-Leung N.A., Chen X., Bui T., Jiang Y., Yang D., Vijayaraghavan S., Keyomarsi K. // *Mol. Cancer Ther.* 2016. V. 15. № 4. P. 593–607.
106. Gary C., Hajek M., Biktasova A., Bellinger G., Yarbrough W.G., Issaeva N. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 25. P. 38598.
107. Stewart-Ornstein J., Lahav G. // *Sci. Signal.* 2017. V. 10. № 476. P. 1–10.
108. Bagashev A., Fan S., Mukerjee R., Paolo Claudio P., Chab-rashvili T., Leng R.P., Sawaya B.E. // *Cell Cycle.* 2013. V. 12. № 10. P. 1569–1577.
109. Kalan S., Amat R., Schachter M.M., Kwiatkowski N., Abraham B.J., Liang Y., Gray N.S. // *Cell Rep.* 2017. V. 21. № 2. P. 467–481.
110. Mita M.M., Mita A.C., Moseley J.L., Poon J., Small K.A., Jou Y.M., Sankhala K.K. // *Br. J. Cancer.* 2017. V. 117. № 9. P. 1258–1268.
111. Desai B.M., Villanueva J., Nguyen T.T.K., Lioni M., Xiao M., Kong J., Smalley K.S. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 3. P. e59588.
112. Kang M., Kim W., Jo H.R., Shin Y.J., Kim M.H., Jeong J.H. // *Int. J. Oncol.* 2018. V. 53. № 2. P. 703–712.
113. Sim M.Y., Go M.L., Yuen J.S.P. // *Life Sci.* 2018. V. 203. P. 282–290.
114. Schwermer M., Lee S., Köster J., van Maerken T., Stephan H., Eggert A., Schramm A. // *Oncotarget.* 2015. V. 6. № 17. P. 15425.
115. Ambasta R.K., Gupta R., Kumar D., Bhattacharya S., Sarkar A., Kumar P. // *Brief. Funct. Genom.* 2019. V. 18. № 4. P. 230–239.
116. Wilkie M.D., Anaam E.A., Lau A.S., Rubbi C.P., Jones T.M., Boyd M.T., Vlatković N. // *Cancer Lett.* 2020. V. 478. P. 107–121.
117. Naseer F., Saleem M. // *Oncol. Rev.* 2019. V. 13(2). № 421. P. 83–87.
118. Tonino S.H., Mulkens C.E., van Laar J., Derks I.A., Suo G., Croon-de Boer F., Kater A.P. // *Leuk. Lymphoma.* 2015. V. 56. № 8. P. 2439–2447.
119. Fomenkov A., Zangen R., Huang Y.P., Osada M., Guo Z., Fomenkov T., Ratovitski E.A. // *Cell Cycle.* 2004. V. 3. № 10. P. 1285–1295.
120. Deyoung M.P., Ellisen L.W. // *Oncogene.* 2017. V. 26. № 36. P. 5169–5183.
121. Meng J., Tagalakis A.D., Hart S.L. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 1–12.
122. Huang L., Li A., Liao G., Yang F., Yang J., Chen X., Jiang X. // *Oncol. Lett.* 2020. V. 14. № 1. P. 1080–1088.
123. Yudhani R.D., Astuti I., Mustofa M., Indarto D., Muthmainah M. // *APJCP.* 2019. V. 20. № 6. P. 1667.
124. Yi Y., Zhang W., Yi J., Xiao Z.X. // *J. Cancer.* 2019. V. 10. № 11. P. 2434.
125. Prabhu V.V., Hong B., Allen J.E., Zhang S., Lulla A.R., Dicker D.T., El-Deiry W.S. // *Cancer Res.* 2016. V. 76. № 7. P. 1989–1999.
126. Zhang S., Zhou L., Hong B., van den Heuvel A.P.J., Prabhu V.V., Warfel N.A., El-Deiry W.S. // *Cancer Res.* 2015. V. 75. № 18. P. 3842–3852.
127. Sinha N., Panda P.K., Naik P.P., Das D.N., Mukhopadhyay S., Maiti T.K., Sethi G. // *Mol. Carcinog.* 2017. V. 56. № 11. P. 2400–2413.
128. Sinha N., Meher B.R., Naik P.P., Panda P.K., Mukhapadhyay S., Maiti T.K., Bhutia S.K. // *Phytomedicine.* 2019. V. 55. P. 179–190.
129. Sznarkowska A., Kostecka A., Kawiak A., Acedo P., Lion M., Inga A., Zawacka-Pankau J. // *Cell Div.* 2018. V. 13. № 1. P. 1–12.
130. Gomes S., Raimundo L., Soares J., Loureiro J.B., Leão M., Ramos H., Chlapek P. // *Cancer Lett.* 2019. V. 446. P. 90–102.
131. Di C., Sun C., Li H., Si J., Zhang H., Han L., Gan L. // *Cell Cycle.* 2015. V. 14. № 23. P. 3725–3733.
132. Novelli F., Lena A.M., Panatta E., Nasser W., Shalom-Feuerstein R., Candi E., Melino G. // *Cell Death Dis.* 2016. V. 7. № 5. P. e2227.
133. Gunaratne P.H., Pan Y., Rao A.K., Lin C., Hernandez-Herrera A., Liang K., Kim S.S. // *Cancer.* 2019. V. 125. № 14. P. 2409–2422.
134. Rong J., Li P., Ge Y., Chen H., Wu J., Zhang R., Zhang Y. // *Colloids Surf. B.* 2020. V. 186. P. 110674.
135. He W., Yan J., Li Y., Yan S., Wang S., Hou P., Lu W. // *J. Control. Release.* 2020. V. 325. P. 293–303.
136. Lundsten S., Hernández V.A., Gedda L., Sarén T., Brown C J., Lane D.P., Nestor M. // *Nanomaterials.* 2020. V. 10. № 4. P. 783.
137. Viktorsson K., De Petris L., Lewensohn R. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 331. № 3. P. 868–880.
138. Mayer C., Popanda O., Greve B., Fritz E., Illig T., Eckardt-Schupp F., Schmezer P. // *Cancer Lett.* 2011. V. 302. № 1. P. 20–28.
139. Paul S., Barker C.A., Turner H.C., McLane A., Wolden S.L., Amundson S.A. // *Radiat. Res.* 2011. V. 175. № 3. P. 257–265.
140. Akiyoshi T., Kobunai T., Watanabe T. // *Surg. Today.* 2011. V. 42. № 8. P. 713–719.
141. Zhang W.W., Li L., Li D., Liu J., Li X., Li W., Hu A. // *Hum. Gene Ther.* 2018. V. 29. № 2. P. 160–179.
142. Orth M., Lauber K., Niyazi M., Friedl A.A., Li M., Maihöfer C., Belka C. // *Radiat. Environ. Biophys.* 2014. V. 53. № 1. P. 1–29.
143. Kovács D., Igaz N., Keskeny C., Bélteky P., Tóth T., Gáspár R., Kiricsi M. // *Sci. Rep.* 2016. V. 6. P. 27902.
144. Swanner J., Mims J., Carroll D.L., Akman S.A., Furdui C.M., Torti S.V., Singh R.N. // *Int. J. Nanomedicine.* 2016. V. 10. P. 3937.
145. Merkel O., Taylor N., Prutsch N., Staber P.B., Moriggl R., Turner S.D., Kenner L. // *Mutat. Res. Rev. Mutat. Res.* 2017. V. 773. P. 1–13.

УДК 578.287

Генетическое разнообразие и эволюция биологических свойств коронавируса SARS-CoV-2 в условиях глобального распространения

А. А. Никонова*, Е. Б. Файзулов, А. В. Грачева, И. Ю. Исаков, В. В. Зверев

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

*E-mail: aa.nikonova@nrcii.ru

Поступила в редакцию 19.01.2021

Принята к печати 13.04.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11337

РЕФЕРАТ Новая коронавирусная инфекция (COVID-19) представляет серьезную угрозу для глобального здравоохранения. С начала пандемии число пациентов с подтвержденной инфекцией в мире превысило 117 млн, из них более 2.6 млн скончались. Несмотря на беспрецедентные ответные меры общественного здравоохранения, направленные на сдерживание распространения заболевания, ряд стран столкнулся с кризисом в отделениях интенсивной терапии. В настоящее время предпринимаются большие усилия по мониторингу генетической изменчивости этиологического агента COVID-19 – коронавируса SARS-CoV-2. Секвенирование сотен тысяч геномов вирусов, выделенных в разных регионах мира, позволяет изучать эволюцию SARS-CoV-2 и отслеживать его географическое распространение с течением времени. Понимание эволюции SARS-CoV-2 необходимо не только для ретроспективного анализа причин появления и закономерностей распространения новой коронавирусной инфекции, но и для создания терапевтических и профилактических средств против COVID-19. В этом обзоре представлена общая характеристика SARS-CoV-2 и вызываемого им заболевания, а также проанализированы источники, описывающие генетическое разнообразие вируса и его взаимосвязь с биологическими свойствами SARS-CoV-2, такими, как вирулентность и контагиозность.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА коронавирусы, SARS-CoV-2, патогенность, вирулентность, контагиозность, эволюция вирусов, вирусный геном.

ВВЕДЕНИЕ

После появления первых случаев заражения в китайском Ухане в декабре 2019 года новая коронавирусная инфекция COVID-19, вызванная SARS-CoV-2, распространилась во всех странах земного шара и стала первой в истории человечества пандемией, вызванной коронавирусом [1]. По состоянию на март 2021 года COVID-19 диагностирован более чем у 117 млн человек в мире и стал причиной более 2.6 млн смертей [2]. В настоящее время профилактические вакцины доступны не во всех странах и не всем слоям населения, поэтому карантин, социальное дистанцирование и особые санитарные меры предосторожности остаются важнейшими мерами предотвращения распространения инфекции.

В связи с быстрым и широким распространением нового коронавируса неизбежна его дивергенция, появление штаммов с различными биологическими свойствами, наиболее значимым из которых является вирулентность. О фенотипическом разнообразии коронавируса SARS-CoV-2, учитывая короткий пери-

од его изучения, известно очень мало. К сожалению, при описании геномных последовательностей информация о пациенте скудна и ограничивается возрастом и полом, тогда как информация о тяжести, особенностях и исходе заболевания зачастую отсутствует.

Одной из актуальных задач фундаментальной и медицинской вирусологии остается определение природы патогенности и вирулентности вирусов, в том числе животного происхождения. Несмотря на прогресс, достигнутый в понимании эволюции вирусов, вопрос об эволюции вирулентности, возникшей в результате межвидовой передачи, остается дискуссионным. Становится ли вирус более или менее вирулентным в новом хозяине? Каким образом уровень вирулентности модулируется под влиянием естественного отбора и почему? Существуют ли закономерности эволюции вирулентности вирусов в новом хозяине, позволяющие прогнозировать направление этого процесса? Упрощенная интерпретация эволюции вирулентности заключается в том, что естественный отбор будет оптимизировать уровень

вирулентности таким образом, чтобы повысить эффективность передачи вируса, характеризующуюся базовым репродуктивным числом (R_0) [3]. Адаптация вируса в новом хозяине формируется сложным набором взаимодействий факторов хозяина-возбудителя. Согласно современным представлениям, при межвидовой передаче первоначальная вирулентность вируса может варьироваться от отсутствия патогенности (бессимптомное носительство) до высокой патогенности, причем прогнозировать направление изменения вирулентности крайне сложно. Встреча человечества с высоковирулентным пандемическим вирусом животного происхождения происходит не очень часто – 1 раз за несколько десятилетий, однако последствия этого тяжелейшие и имеют глобальное значение. В связи с этим крайне важно понимать и прогнозировать, как будут эволюционировать биологические свойства коронавируса SARS-CoV-2. Целью обзора является анализ результатов научных исследований, посвященных поиску взаимосвязи генетических изменений вируса SARS-CoV-2 с его биологическими свойствами, включая патогенность, вирулентность и контагиозность.

Под *патогенностью* вируса понимается его способность вызывать заболевание. Термин «вирулентность» в зависимости от контекста может иметь различные значения. В настоящем обзоре под *вирулентностью* вируса подразумевается мера его патогенности, т.е. способность вызывать более или менее тяжелые заболевания; при этом степень вирулентности определяется коэффициентом летальности. *Контагиозность* (трансмиссивность) вируса – это его способность передаваться от больных организмов здоровым. Мерой контагиозности являются взаимосвязанные показатели: индекс контагиозности (доля лиц из числа восприимчивых, которые заболели после контакта с источником возбудителя) и базовое репродуктивное число R_0 (среднее количество лиц, напрямую инфицированных больных в течение всего заразного периода при условии попадания его в полностью восприимчивую популяцию).

ОБЩАЯ ХАРАКТЕРИСТИКА SARS-CoV-2

Пандемический SARS-CoV-2, наряду с вирусом SARS-CoV, относится к семейству Coronaviridae, подсемейству Orthocoronavirinae, роду *Betacoronavirus*, подроду *Sarbecovirus*, виду *Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus* [4]. Следует отметить, что вместе с перечисленными патогенами к подроду *Sarbecovirus* относятся также коронавирусы, выделенные от летучих мышей, в частности, подковоносов (род *Rhinolophus*) [5]. Установлено, что последовательность генома SARS-CoV-2 на 96.2 и 93.3% совпадает с геномом коронавирусов летучих

мышей RaTG13 [6] и RmYN02 [7] соответственно. Степень сходства нуклеотидных последовательностей и эволюционный анализ лежат в основе гипотезы о том, что именно летучие мыши являются природным резервуаром SARS-CoV-2, который через неизвестных промежуточных хозяев попал в человеческую популяцию [8, 9]. Кроме того, показано, что сходство с геномом коронавирусов, выделенных от панголинов, составляет 85.5–92.4% [10], с геномом SARS-CoV – 80% [6] и MERS-CoV, принадлежащего к подроду *Merbecovirus*, – 50% [11]. Однако степень гомологии генома сильно варьирует в зависимости от генов, а также геномных локусов [5]. При этом основные различия между этими вирусами наблюдаются в последовательности *ORF1a* и гена, кодирующего шиповидный белок S, который играет ключевую роль при взаимодействии вируса с клеткой [12]. Эти особенности организации генома могут быть следствием межвирусной рекомбинации [13].

SARS-CoV-2 представлен вирионами плеоморфной (обычно сферической) формы со средним диаметром 108 ± 8 нм в диапазоне от 84 до 126 нм [14]. На поверхности вирусных частиц расположены выступающие шипы длиной примерно 9–12 нм, что придает вирусу форму короны. Морфология вирионов SARS-CoV-2 имеет сходство с другими представителями семейства Coronaviridae, включая SARS-CoV и MERS-CoV [15].

Геном SARS-CoV-2 представлен несегментированной одноцепочечной РНК позитивной полярности размером 29.9 т.н. и состоит из шести основных открытых рамок считывания (ORF) (рис. 1). Трансляция кодируемой вирусом РНК-зависимой РНК-полимеразы (репликазы) необходима для инициации репликации вируса в клетке и синтеза субгеномных вирусных РНК, которые в свою очередь служат матрицей для синтеза структурных и вспомогательных белков вируса [16]. Размер *ORF1ab*, которая кодирует репликазу, составляет 2/3 от размера всего вирусного генома. За ней следуют гены шиповидного белка (*S*), *ORF3a*, белка оболочки (*E*), белка мембраны (*M*), *ORF6*, *ORF7a*, *ORF7b*, *ORF8*, нуклеокапсида (*N*) и *ORF10*. Кроме того, Nelson и соавт. доказали, что SARS-CoV-2 содержит новый перекрывающийся ген (OLG – overlapping gene) *ORF3d* [17], который имеется и у коронавирусов, выделенных от панголинов в районе Гуанси на юге Китая, но не обнаружен у других коронавирусов, выделенных от панголинов и летучих мышей.

Шиповидный белок S коронавирусов SARS-CoV и SARS-CoV-2 инициирует слияние оболочки вируса с плазматической мембраной клетки-хозяина, а ангиотензинпревращающий фермент 2 (ACE2) служит клеточным рецептором для прикрепления вируса.

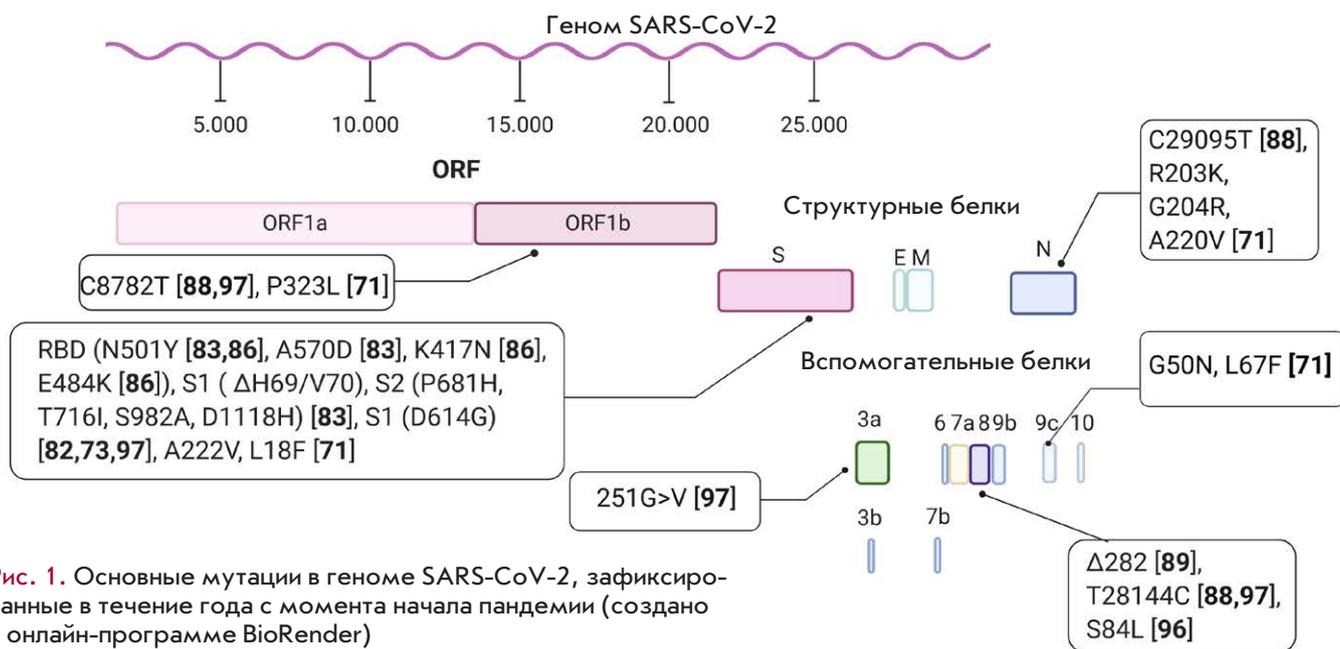


Рис. 1. Основные мутации в геноме SARS-CoV-2, зафиксированные в течение года с момента начала пандемии (создано в онлайн-программе BioRender)

Рецептором MERS-CoV является hDPP4 (дипептидилпептидаза 4, или CD26 человека) [18]. В S-белке выделяют два домена: S1 и S2. Домен S1 опосредует связывание с ACE2, а S2 – последующее слияние вирусной оболочки с клеточной мембраной [19]. Рецепторсвязывающий домен (RBD) – это ключевой функциональный компонент S1, который отвечает за связывание SARS-CoV-2 с ACE2 [20]. Кроме того, RBD SARS-CoV содержит коровый мотив и рецепторсвязывающий мотив (RBM), который опосредует контакты с ACE2. На поверхности ACE2 расположены две точки, которые SARS-CoV-2 использует для прикрепления [21]. Стадия адсорбции и проникновения SARS-CoV-2 в клетку зависит не только от ACE2-рецептора, но и от трансмембранной сериновой протеазы TMPRSS2 и пропротеинконвертазы фуринов, функция которых состоит в праймировании S-белка SARS-CoV-2 [22, 23]. Таким образом, SARS-CoV-2 может проникать в клетку двумя различными способами (рис. 2): через позднюю эндосому, где S-белок расщепляется катепсинами, или через клеточную мембрану, или через раннюю эндосому, используя трипсиноподобные протеазы для расщепления S-белка [23, 24].

Белок E формирует ионные каналы и регулирует сборку вирионов [25]. Белок M также участвует в сборке вирусных частиц [26], тогда как белок N формирует с вирусной РНК рибонуклеопротеиновый комплекс и выполняет несколько функций, таких, как усиление транскрипции вирусного генома и взаимодействие с вирусным мембранным белком во время сборки вириона [27].

Рецептор клеток-мишеней, который вирус использует для проникновения в клетку, является

фактором, определяющим, какие органы и ткани чувствительны к заражению. Рецептор ACE2 экспрессируется на поверхности эпителиальных клеток альвеол, трахеи, бронхов, бронхиальных желез, а также на альвеолярных макрофагах. Кроме того, ACE2 присутствует на слизистых оболочках, таких, как роговица глаза, бокаловидные и ресничные клетки в носовой полости [28], которые, судя по всему, служат входными воротами инфекции. Патогенетический механизм COVID-19 заключается в том, что вирус проникает в клетку, используя рецептор ACE2, и высвобождает одноцепочечную вирусную РНК, которая соединяется с рибосомой клетки-мишени и инициирует синтез РНК-репликазы, которая в свою очередь воспроизводит копии геномной и субгеномной РНК, а также фрагменты РНК, служащие матрицей для синтеза белков вирусной оболочки. Молекулы геномных вирусных РНК положительной полярности вместе со структурными вирусными белками формируют новые вирионы SARS-CoV-2, которые высвобождаются из клетки и инфицируют интактные клетки-мишени (рис. 2) [29].

МНОГООБРАЗИЕ КЛИНИЧЕСКИХ ПРОЯВЛЕНИЙ COVID-19

Характер заболевания, вызванного SARS-CoV-2, может существенно различаться [30]. Наблюдается большая вариабельность клинических проявлений COVID-19 даже среди близких контактов инфицированного и членов одной семьи [30]. Спектр симптоматики при COVID-19 колеблется от легкой и умеренной формы до критической и фатальной [31–33].

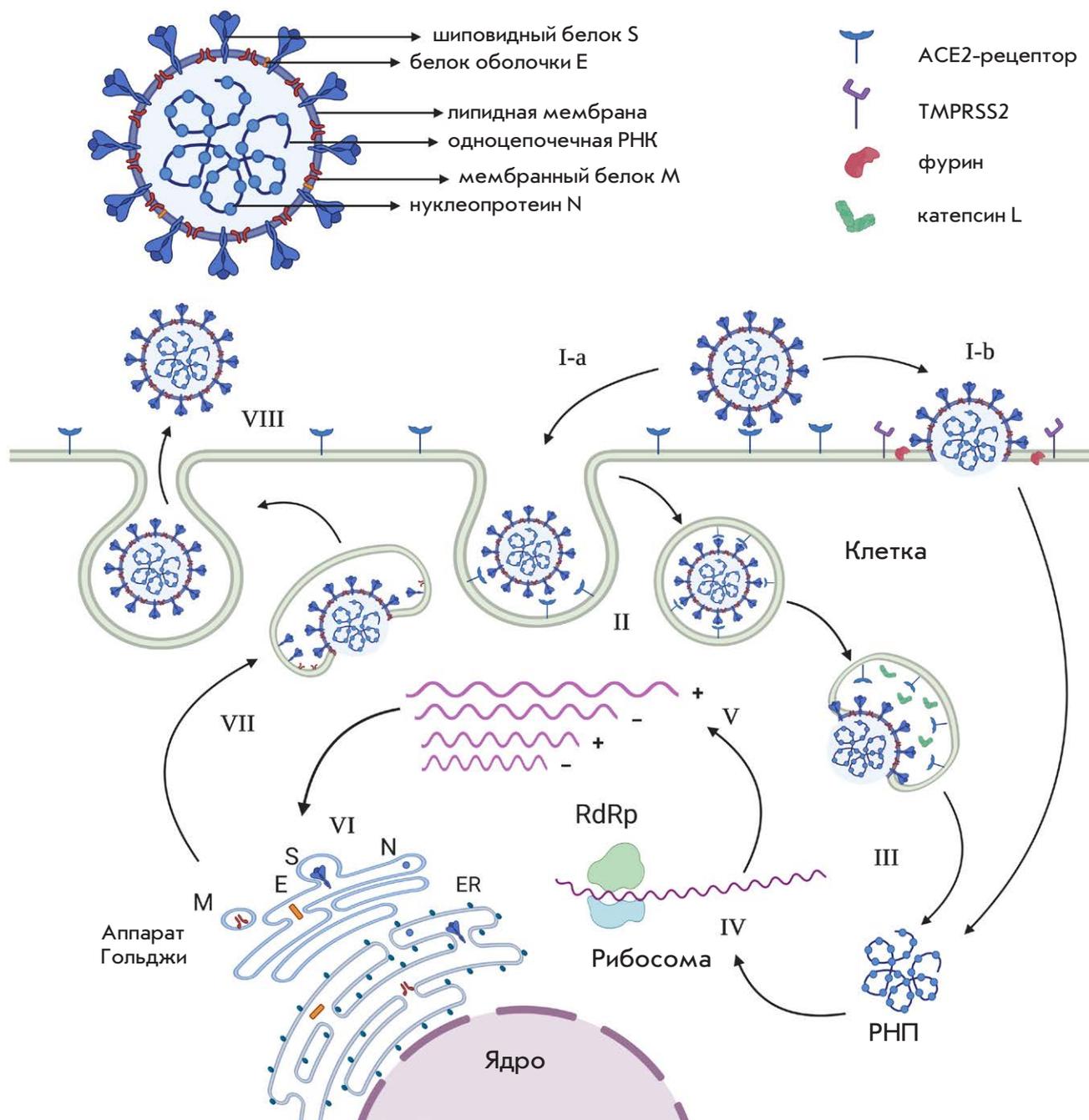


Рис. 2. Строение вириона и основные этапы цикла репродукции SARS-CoV-2 (создано в онлайн-программе BioRender)

- I. Адсорбция вируса. После адсорбции вирус может проникнуть в клетку двумя путями: через эндосому (I-a) или путем слияния с плазматической мембраной (I-b)
- II. Рецептор-опосредованный эндоцитоз
- III. Разделение вируса в результате слияния оболочки вируса с мембраной эндосомы. Высвобождение рибонуклеопротеидного комплекса (РНП)
- IV. Трансляция вирусного генома. Синтез вирусных белков, ответственных за репликацию и транскрипцию генома, включая РНК-зависимую РНК-полимеразу (RdRp)
- V. Репликация и транскрипция вирусного генома
- VI. Синтез вирусных белков на эндоплазматической сети (ЭПС)
- VII. Сборка и транспорт вириона к мембране клетки
- VIII. Выход из клетки путем экзоцитоза

Также часто фиксируются случаи бессимптомного течения заболевания. Установлено, что доля случаев бессимптомного носительства достигает 40–50%, при этом инфицированный человек является источником заражения на протяжении более 14 дней [34]. Кроме того, бессимптомное течение инфекции может быть ассоциировано с субклиническими нарушениями в легких, которые выявляются при проведении компьютерной томографии [34]. Таким образом, SARS-CoV-2 обладает повышенной вирулентностью с тактическим преимуществом – способностью поддерживать передачу от человека к человеку даже при бессимптомном носительстве [35], что позволяет вирусу быстро распространяться.

Согласно докладу Китайского центра по контролю и профилактике заболеваний [36], при анализе 44500 подтвержденных случаев инфекции с оценкой тяжести заболевания установлено, что умеренная форма течения COVID-19 (без пневмонии или со слабо выраженной пневмонией) наблюдается в 81% случаев. Тяжелая форма (с одышкой, гипоксией или >50% поражением легких) зарегистрирована в 14% случаев. Заболевание в критической форме (с дыхательной недостаточностью, шоком или полиорганной дисфункцией) наблюдается в 5% случаев. При этом общий уровень летальности составил 2.3% (среди некритических случаев не зарегистрировано ни одного случая смерти).

Заболевание COVID-19 в тяжелой форме может наблюдаться у практически здоровых людей любого возраста, но встречается преимущественно у лиц старше 65 лет и/или с сопутствующими заболеваниями (сердечно-сосудистые заболевания, сахарный диабет, гипертония, хронические заболевания легких и почек, рак, ожирение, курение) [32, 36, 37], тогда как у большинства молодых взрослых инфекция протекает в легкой форме без осложнений.

Описано несколько осложнений, вызванных COVID-19. Среди них острый респираторный дистресс-синдром – тип дыхательной недостаточности, при которой необходимо проводить реанимационные действия, включая искусственную вентиляцию легких. В такой помощи нуждаются от 12 до 24% госпитализированных пациентов [38, 39]. Также выявляют сердечно-сосудистые [40], тромбоэмболические осложнения [41], воспалительные реакции [42], суперинфекции [43].

Дети наименее подвержены инфицированию вирусом – в общей структуре случаев COVID-19 доля детей варьирует от 1 до 6.3% [44, 45]. Согласно докладу Китайского центра по контролю и профилактике заболеваний, из 72314 случаев заболевания, зарегистрированных по состоянию на 11 февраля 2020 года, только 2% составляли лица в возрасте до 19 лет [36].

У детей с COVID-19 также описан мультисистемный воспалительный синдром с клиническими признаками, сходными с болезнью Кавасаки и синдромом токсического шока [46]. Мониторинг детской заболеваемости, проведенный Мескиной, показал, что доля бессимптомных форм COVID-19 у детей составляет 62%, в том числе у новорожденных – 73.1%, с низкой частотой тяжелых форм – 0.38% [45].

ГЕНЕТИЧЕСКАЯ ДЕТЕРМИНАЦИЯ БИОЛОГИЧЕСКИХ СВОЙСТВ SARS-CoV-2

Открытым остается вопрос о причинах таких разнообразных клинических проявлений COVID-19 у разных категорий населения. Можно предположить, что это разнообразие зависит от определенных генетических профилей организма-хозяина. В соответствии с этой гипотезой генетическую основу восприимчивости к инфекции можно объяснить полиморфизмом функциональных рецепторов, необходимых для проникновения вируса в клетки-мишени. В частности, наблюдаемая при COVID-19 полиорганная дисфункция, включая фатальные повреждения легких и миокарда, может быть связана с функциональными характеристиками рецепторов ACE2 в популяции [47–49]. Так, Ноу и соавт. на основе анализа ~ 81000 геномов человека исследовали восприимчивость к COVID-19, обусловленную полиморфизмом генов ACE2 и TMPRSS2 (двух ключевых факторов хозяина SARS-CoV-2). Обнаружено, что полиморфизмы (р.) ACE2 (такие, как р.Arg514Gly в африканской/афроамериканской популяции) связаны с сердечно-сосудистыми и легочными заболеваниями вследствие изменения взаимодействий ангиотензиногена и ACE2. Уникальные, но распространенные полиморфизмы (включая р.Val160Met (rs12329760)) в TMPRSS2 потенциально могут быть причиной дифференциальной генетической восприимчивости к COVID-19 [50].

При помощи полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) проанализировано 8582968 однонуклеотидных полиморфизмов (SNP) от 1980 пациентов с тяжелой формой COVID-19 из итальянского и испанского эпицентров пандемии в Европе. Исследование не выявило значимых ассоциаций тяжелой формы заболевания с одним геном, скорее с мультигенным кластером на хромосоме 3 (гены SLC6A20, LZTFL1, CCR9, FYCO1, CXCR6 и XCR1) [51].

Используя методы NGS, китайские ученые проанализировали генетические профили 332 пациентов с различной степенью тяжести COVID-19. Результаты полногеномного поиска ассоциаций (GWAS) свидетельствуют о том, что наиболее значимый локус, связанный с тяжестью заболевания, находится в TMM189-UBE2V1, который участвует

в сигнальном пути интерлейкина-1 (IL-1). Частота миссенс-вариантов p.Val197Met гена *TMPRSS2*, влияющих на стабильность белка, у пациентов с тяжелой формой инфекции ниже, чем при легком течении заболевания и в общей популяции. Кроме того, установлено, что аллели HLA-A*11:01, B*51:01 и C*14:02 значительно предрасполагают к тяжелому течению COVID-19 [52].

Селективность в отношении генетических профилей организма-хозяина (как фактор вирулентности SARS-CoV-2) может быть одной из особенностей вируса. У вируса гриппа, ставшего причиной глобальной пандемии в 1918 году, такое свойство не описано. Это может быть связано с тем, что в начале XX века уровень техники и знаний не позволял провести исследований на эту тему. Опубликованы данные о восприимчивости к ВИЧ-1, генетически детерминированной вариациями хемокиновых рецепторов хозяина [53]. Эти данные дают основание полагать, что такая избирательность может определять вирулентность и тканевую специфичность и других вирусов, включая SARS-CoV-2.

В исследованиях, направленных на изучение молекулярных механизмов патогенности и контагиозности коронавируса, наибольшее внимание уделяется детерминантам тропизма коронавируса к клеткам дыхательных путей человека, основанного на рецептор-опосредованном проникновении вируса в клетку. Эти детерминанты находятся в поверхностном S-белке коронавируса. Распространено мнение, что именно мутации в эпитопах белка S, ответственных за связывание с вирусными рецепторами, определяют эффективность межвидовой передачи и адаптации вируса к новому хозяину [54]. Экспериментально обоснована способность коронавируса летучих мышей, S-белок которых модифицирован методами обратной генетики, преодолевать видовой барьер (инфицировать клетки человека) [55]. Однако на сегодняшний день отсутствует экспериментальное подтверждение того, что только один S-белок SARS-CoV-2 опосредует контагиозность или высокую вирулентность вируса у человека. Ранее на примере высокопатогенного вируса гриппа А птиц H5N1 доказали, что способность распознавать вирусные рецепторы клеток эпителия дыхательных путей млекопитающих может достигаться введением в гемагглютинин (HA) от двух до четырех аминокислотных замен, важных для связывания HA с α -2,6-сиаловыми рецепторами [56, 57]. Тем не менее только этих мутаций оказалось недостаточно для того, чтобы вирус приобрел контагиозность и высокую вирулентность для хорьков [56, 57]. Это свидетельствует о том, что дополнительные детерминанты контагиозности и вирулентности вероятно закоди-

рованы во «внутренних генах» вируса. Патогенность вируса опосредована не только его способностью эффективно проникать в клетки-мишени, но и множеством других вирусных факторов. Примером тому служат вакцинные штаммы, входящие в состав живых аттенуированных вакцин. По данным Klimov и соавт. [58], детерминантами аттенуации холодаадаптированного вакцинного штамма вируса гриппа A/Leningrad/134/47/17 являются мутации в генах белков полимеразного комплекса (PB1, PB2, PA, NP), M-белка и неструктурного белка NS2, но не поверхностных белков нейраминидазы N и гемагглютинаина H. Более 10 примеров изменения вирулентности разных вирусов млекопитающих, обусловленных лишь одной или двумя аминокислотными заменами, приведено в обзоре [3]. Подавляющее большинство этих примеров касается РНК-содержащих вирусов (вирусы гриппа А и В, энтеровирусы, вирус Эбола, ВИЧ, вирус лихорадки Западного Нила, вирус болезни Ньюкасла, вирус репродуктивно-респираторного синдрома свиней и др.).

Вирусы, относящиеся к одному биологическому виду, могут значительно различаться вирулентностью, что связано с дивергенцией в ходе эволюции. Смертность при заражении сезонными вирусами гриппа А (вид *Influenza A virus* семейства Orthomyxoviridae) серотипов H3N2, H1N1 составляет 0.04–1.0%, тогда как смертность от заболеваний, вызванных отдельными штаммами вируса птичьего гриппа А, в том числе H5N1, H7N7, H9N2, H7N3 и H7N9, достигала 60% [59, 60]. Коронавирусы человека не являются исключением. Так называемые сезонные коронавирусы (HCoV-NL63, -229E, -OC43, -HKU1) ассоциированы в основном с легкими и среднетяжелыми формами ОРВИ, тогда как коронавирусы животного происхождения – SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 – с развитием тяжелого острого респираторного синдрома и более высоким риском летальности (по разным оценкам от 1 до 40% от числа лабораторно подтвержденных случаев).

Группа Кунина недавно выявила возможные генетические детерминанты, определяющие повышенную летальность в результате заражения высоковирулентными коронавирусами – SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 – по сравнению с низковирулентными сезонными HCoV-NL63, -229E, -OC43 и -HKU1 [61]. В геноме высокопатогенных коронавируса SARS-CoV, MERS-CoV и SARS-CoV-2 в результате анализа более 3000 коронавирусных геномов выявили четыре области (три в гене нуклеопротеина N и одну в гене S-белка), значимо отличающиеся по аминокислотным последовательностям от сезонных коронавирусов. Отличия в гене N предположительно определяют усиление сигналов ядер-

ной локализации и экспорта этого белка. Отличия в гене *S* находятся в области узнавания рецепторов и слияния вирусной оболочки с клеточной мембраной и гипотетически отвечают за усиление этапа прикрепления и входа вируса в клетку. Полученные результаты проливают свет на вероятные детерминанты вирулентности коронавирусов, но не имеют пока эмпирического подтверждения, поскольку работа выполнена методами компьютерного анализа.

В геноме любого вируса постоянно появляются новые мутации, часть которых способна изменить биологические свойства вируса, включая степень контагиозности, способность ускользать от иммунного ответа организма-хозяина, вирулентность. РНК-содержащий SARS-CoV-2 характеризуется высокой (но ниже, чем у других РНК-вирусов) частотой мутаций [62].

На сегодняшний день известны сотни тысяч геномных последовательностей коронавируса SARS-CoV-2. Результаты исследований пополняют базу данных геномных последовательностей GISAID, которая на январь 2021 года включает информацию о более чем 323493 последовательностей. В GISAID, помимо SARS-CoV-2, представлены геномные последовательности коронавирусов, выделенных от летучих мышей и панголинов. Основываясь на данных о вирусных последовательностях, а также информации о географическом происхождении образцов из GISAID, другой информационный ресурс Nextstrain (<https://nextstrain.org>) [63] размещает филогенетический, географический и геномный анализ SARS-CoV-2. Благодаря базе данных GISAID и ресурсу Nextstrain за эволюцией вируса можно наблюдать в режиме реального времени. Анализ Nextstrain прогнозирует появление примерно 26 замен в геноме SARS-CoV-2 в год. Учитывая размеры генома SARS-CoV-2 (29.9 т.н.), расчетная скорость эволюции составляет примерно 0.90×10^{-3} замен/сайт/год [5]. Значение этого показателя сопоставимо с показателями, зарегистрированными для SARS-CoV ($0.80-2.38 \times 10^{-3}$) [64], MERS-CoV ($0.63-1.12 \times 10^{-3}$) [65] и HCoV-OC43 (0.43×10^{-3}) [66]. Частота мутаций (количество однонуклеотидных замен на сайт за цикл репликации) у SARS-CoV-2 скорее всего будет ниже, чем у других РНК-содержащих вирусов, таких, как, например, вирусы гриппа. Это связано с тем, что геном коронавирусов кодирует 3'-5'-экзорибонуклеазу (nsp14-ExoN), обладающую редактирующей активностью [67]. Этим обусловлена высокая стабильность генома коронавирусов, включая SARS-CoV-2. Анализ нуклеотидных последовательностей 48635 изолятов вируса подтверждает низкую частоту мутаций, которая составила в среднем 7.23 мутации на образец по от-

ношению к эталонным последовательностям генома SARS-CoV-2 (NC_045512.2) [68].

Кроме того, показано, что геном SARS-CoV-2 имеет гораздо более низкую частоту мутаций и генетическое разнообразие по сравнению с вирусом SARS-CoV, который вызвал вспышку атипичной пневмонии в 2002–2003 годах [69]. Следует также отметить, что RBD-домен S-белка (~90 аминокислот) SARS-CoV-2, который непосредственно реагирует с рецептором ACE2 на поверхности клеток-мишеней, значительно отличается от RBD SARS-CoV, особенно в двух областях, которые взаимодействуют с ACE2, и является самой вариабельной частью SARS-CoV-2 [70]. Последнее предполагает участие нескольких механизмов, задействованных в процессе проникновения вируса в клетку. Определены шесть аминокислотных остатков RBD S-белка (Leu455, Phe486, Gln493, Ser494, Asn501 и Tyr505), которые играют ключевую роль в связывании с ACE2. Причем пять из них отличаются от RBD SARS-CoV, что следует учитывать при разработке специфических противовирусных препаратов, блокирующих вход вируса в клетку [70].

Следует отметить, что многочисленные элементы генома вируса в разной степени подвержены мутациям. Так, на основе анализа около 223000 полноразмерных последовательностей протеома SARS-CoV-2 была рассчитана частота мутаций каждого вирусного белка. Самой высокой частота мутаций была у белков S, NSP12, NS9c и N [71].

Анализ нуклеотидных последовательностей изолятов SARS-CoV-2 выявил несколько областей генома с повышенной частотой мутаций [72–81]. Среди них следует выделить одну – D614G, в С-концевой области домена S1 [72–74, 77, 81]. Показано, что в Европе доминирует мутантный вирус с заменой D614G в S1-домене [68]. Сравнение функциональных свойств S-белка с аспарагиновой кислотой в положении 614 (S^{D614}) и глицином (S^{G614}) показало, что псевдовirusы, несущие S^{G614}, проникают в клетки, экспрессирующие ACE2, более эффективно, чем вирусы с S^{D614} [82]. Хотя накопление данных все еще продолжается, однако растущая доля вируса с заменой D614G предполагает, что вирусы с этой мутацией имеют преимущество в виде более эффективной передачи от человека к человеку. Интересно, что эта мутация, по-видимому, не влияет существенно на тяжесть течения заболевания [73, 79].

В декабре 2019 года появились сообщения о выделении в Великобритании нового штамма SARS-CoV-2, характеризующегося повышенным уровнем контагиозности [83]. По данным филогенетического анализа этот штамм формирует отдельный филогенетический кластер (линия B.1.1.7) [84]. В S-белке этого вируса идентифицированы семь характер-

Таблица 1. Наиболее значимые генетические варианты SARS-CoV-2

Генетический вариант SARS-CoV-2	Регион, где впервые был зафиксирован	Характерные мутации	Характерные особенности
V.1.1.7	Великобритания	S-белок: RBD (N501Y, A570D), S1 (Δ H69/V70), S2 (P681H, T716I, S982A и D1118H)	Высокая контагиозность
V.1.351 (N501Y.V2)	ЮАР	S-белок: RBD (K417N, E484K и N501Y)	Некоторые вакцины менее эффективны в отношении этого варианта, высокая контагиозность
P1-потомок варианта V.1.1.28	Бразилия	S-белок: RBD (E484K, K417T и N501Y).	Высокая контагиозность
Fin-796H	Финляндия	S-белок: RBD (E484K, K417T и N501Y)	Не детектируется в ПЦР

ных мутаций: RBD (N501Y, A570D), S1 (Δ H69/V70) и S2 (P681H, T716I, S982A и D1118H) [83]. Мутация N501Y в рецепторсвязывающем домене (RBD) обеспечивает повышенную аффинность по отношению с ACE2 человека и мыши [85]. Делеция Δ H69/V70 в S1 способствует ускользанию вируса от иммунного ответа. Мутация P681H непосредственно примыкает к участку расщепления фурином между S1 и S2 в S-белке. Кроме того, представлены данные, указывающие на существование нескольких независимых линий SARS-CoV-2, для которых характерна делеция Δ H69/V70 в S-белке, и рост циркуляции этих вирусов в некоторых странах Европы, наблюдаемый с августа 2020 года [83].

В январе 2021 года в Южной Африке зафиксировано появление новой линии SARS-CoV-2 (501Y.V2), которая быстро распространилась и стала доминирующей в нескольких регионах страны. Выявлено восемь характерных для этой линии мутаций в S-белке, включая три в RBD (K417N, E484K и N501Y), которые могут иметь функциональное значение. Две из них (E484K и N501Y) расположены в рецепторсвязывающем мотиве (RBM), который непосредственно взаимодействует с ACE2 [86]. Мутация N501Y также характерна для линии V.1.1.7, выявленной в Великобритании. Возможно, эта мутация определяет уровень контагиозности SARS-CoV-2.

Также появились сообщения о новой линии P.1 SARS-CoV-2 в Бразилии [87]. Следует отметить появление конвергентных мутаций, общих для линий P.1, V.1.1.7 и V.1.351 (табл. 1). Это мутация N501Y в S-белке и делеция в ORF1b (del11288–11296 (3675–3677 SGF)) общие для P.1 и британского V.1.1.7, а также мутации в RBD (K417N/T, E484K, N501Y), характерные как для P.1, так и для южноафриканского V.1.351.

Набор мутаций/делеций, характерных для линий P.1, V.1.1.7 и V.1.351, возник, вероятно, совершенно независимо. Кроме того, мутации, общие для P.1 и V.1.351, по-видимому, связаны с быстрым увеличением случаев инфекции в местах, где ранее уже был зафиксирован высокий уровень заболеваемости.

Поэтому крайне важно выяснить, существует ли повышенная вероятность повторного заражения людей, перенесших COVID-19 [87]. В средствах массовой информации появилась информация о выделении нового штамма SARS-CoV-2 (Fin-796H), который имеет сходство как с британским, так и с южноафриканским вариантом вируса, но при этом выявление этого варианта при ПЦР-анализе может быть затруднено.

Следует отметить, что мутации в S-гене представляют особый интерес для исследователей. На ресурсе GISAID регулярно обновляются данные о вариантах гена S-белка вируса SARS-CoV-2. Самые распространенные из них на январь 2021 года указаны на рис. 1.

Анализ 95 полноразмерных последовательностей генома SARS-CoV-2, доступных в GenBank на период с декабря 2019 по апрель 2020 года, позволил обнаружить 116 мутаций, из которых наиболее часто встречались 8782C > T в гене *ORF1ab*, 28144T > C в гене *ORF8* и 29095C > T в гене *N*. Предполагается, что выявленные мутации могут влиять на вирулентность и контагиозность SARS-CoV-2 [88].

Еще одна попытка исследовать взаимосвязь определенных мутаций в геноме SARS-CoV-2 с вирулентностью вируса сделана Young и соавт. [89]. В частности, изучено, каким образом делеция нуклеотида в положении 382 (Δ 382) в области *ORF8* генома SARS-CoV-2 влияла на клинические особенности инфекции. Установлено, что вариант Δ 382 SARS-CoV-2, по-видимому, связан с более легким течением инфекции.

В настоящее время продолжается сбор и анализ данных о взаимосвязи мутаций в геноме SARS-CoV-2 с вирулентностью и контагиозностью вируса. Основные мутации, зафиксированные за год циркуляции пандемического вируса, обозначены на рис. 1. Очевидно, что значительная доля мутаций, которые влияли на трансмиссивность вируса, содержится в гене, кодирующем S-белок. Это очень важное наблюдение должно быть принято во внимание разработчиками вакцин против SARS-CoV-2, подавляющее число которых основано на S-белке [90]. Показано, что сы-

воротки от 20 человек, вакцинированных BNT162b2 (РНК-вакцина, кодирующая S-белок), нейтрализовали псевдовирусы SARS-CoV-2 с мутациями N501 и Y501 [91]. Возможно, что при разработке вакцин следует обратить внимание на другие белки вируса, включая белок нуклеокапсида N. Так, например, 90% эпитопов при Т-клеточном ответе расположено в ORF1ab гена белка нуклеокапсида SARS-CoV-2 [92].

СИСТЕМАТИЗАЦИЯ И ГЕОГРАФИЧЕСКАЯ РАСПРОСТРАНЕННОСТЬ ГЕНЕТИЧЕСКИХ ВАРИАНТОВ SARS-CoV-2

Молекулярно-генетический мониторинг новой коронавирусной инфекции и филогенетический анализ позволили выделить разные генетические варианты SARS-CoV-2, отличающиеся своей географической распространенностью. Существует несколько подходов к сравнительному геномному анализу вариантов SARS-CoV-2. В одном из них, предложенном Forster P. и соавт., выделяют три основных варианта SARS-CoV-2 (A, B, C), которые различаются аминокислотными заменами. При проведении филогенетического анализа близкородственный коронавирус летучих мышей BatCoVraTG13, выделенный в провинции Юньнань [93], определен как предковый и помещен в основу филогенетического дерева (кластер A) [94]. Выделяют два подкластера A, которые различаются синонимичной мутацией T29095C. Вариант B произошел от A в результате двух мутаций: синонимичной T8782C и несинонимичной C28144T, изменяющей лейцин на серин. При этом тип C отличается от своего родительского типа наличием несинонимичной мутации G26144T, которая приводит к замене глицина на валин [94]. Типы A и C встречаются в основном в Европе и Америке. Напротив, тип B наиболее распространен в Восточной Азии, а его предковый геном, видимо, не вышел за пределы Восточной Азии, что предполагает существование иммунологической или экологической устойчивости к этому типу за пределами Азии [94]. Эти исследования дополнены группой ученых из Гонконга [95], которые провели филогенетический и филодинамический анализ 247 геномных последовательностей SARS-CoV-2, доступных в базе данных GISAID на 5 марта 2020 года. Среди них идентифицировали четыре генетических кластера вирусов, названных «суперраспространителями» (super-spreaders, SS), т.е. вирусы, которые вызвали крупные вспышки заболевания COVID-19 в разных странах мира. Так, SS1 был широко распространен в Азии и США и в основном ответствен за вспышки в штатах Вашингтон и Калифорния, а также в Южной Корее, тогда как SS4 способствовал развитию пандемии в Европе. Используя сигнатурные мутации каждого SS в качестве маркеров, допол-

нительно проанализировали 1539 последовательностей генома SARS-CoV-2, зарегистрированных после 29 февраля 2020 года, и обнаружили, что 90% этих геномов были «суперраспространителями», причем доминировал SS4 [95]. Проводя параллели с работой [94], следует отметить, что вирус, идентифицированный как SS1, эквивалентен типу B, SS2 – типу C, а тип A – предковый вариант. Результаты географического распространения разных типов вирусов совпадают в обоих исследованиях.

Популяционный генетический анализ 103 геномов SARS-CoV-2 показал [96], что вирусы можно разделить на два основных типа (L и S), которые различаются двумя точечными мутациями в аминокислотной последовательности сайта 84 (S84L) гена ORF8. Несмотря на то что тип L (~70%) более распространен, чем тип S (~30%), результаты эволюционного анализа предполагают, что тип S, скорее всего, является предковой версией SARS-CoV-2. Кроме того, предполагается, что тип L более агрессивен и распространяется быстрее, чем S, а вмешательство человека, возможно, изменило соотношение L- и S-типов вскоре после первой вспышки SARS-CoV-2. Однако в настоящее время неясно, произошел ли L-тип в результате эволюции S-типа коронавируса человека или промежуточных хозяев. Также неясно, является ли L-тип более вирулентным, чем S-тип [96].

Чтобы оценить связь генетических мутаций с уровнем вирулентности вируса, Zhang и соавт. изучили клинические, молекулярные и иммунологические характеристики 326 пациентов с подтвержденной инфекцией SARS-CoV-2 в Шанхае [97]. Они идентифицировали два основных клайда. Клайд I включал несколько подгрупп, характеризующихся различиями в ORF3a – p.251G> V (субклайд V), или S – p.614D> G (субклайд G). Клайд II отличается от клайда I двумя связанными мутациями в ORF8: p.84L> S (28144T> C) и ORF1ab: p.2839S (8782C> T). Такая классификация не согласуется с S/L-типированием [96], несмотря на то, что она основана на тех же двух связанных полиморфизмах. Кроме того, авторы не выявили существенных различий в частоте мутаций и трансмиссивности у вирусов, относящихся к клайду I или II, а также в клинических особенностях вызываемых ими заболеваний.

Еще один подход к систематизации генетических вариантов SARS-CoV-2 представлен в препринте [98]. При сравнении полноразмерных вирусных геномов рассчитывали коэффициент сходства Жаккара. При этом в анализ не включали информацию о географическом происхождении образцов и не пытались моделировать эволюционные взаимоотношения различных геномов SARS-CoV-2 с помощью филогенетического анализа. Несмотря на это, результаты

Таблица 2. Современные подходы к субвидовой классификации SARS-CoV-2

Клайды по GISAID [101] и характерные мутации		Линии по Rambaut [103]	Клайды по Hodcroft [105] и характерные мутации	
S	C8782T, T28144C, включая NS8-L84S	A	19A 19B	C8782T T28144C
L	C241, C3037, A23403, C8782, G11083, G26144, T28144 (референсная последовательность - штамм WIV04, GISAID: hCoV-19/Wuhan/WIV04/2019)	B.2	20A	C3037T, C14408T и A23403G
V	G11083T, G26144T NSP6-L37F + NS3-G251V	B.1		
G	C241T, C3037T, A23403G, включая S-D614G	B.1*		
GH	C241T, C3037T, A23403G, G25563T, включая S-D614G + NS3-Q57H	B.1.1.	20C	C1059T и G25563T
GR	C241T, C3037T, A23403G, G28882A, включая S-D614G + N-G204R		20B	G28881A, G28882A и G28883C
GV	C241T, C3037T, A23403G, C22227T, включая S-D614G + S-A222V			

проведенного анализа отражают хронологическое распространение SARS-CoV-2 по всему земному шару, начиная с первых случаев заболевания, наблюдавшихся в Китае, и заканчивая современными вспышками заболевания в Европе и Северной Америке. Кроме того, использование данных о нуклеотидной последовательности 7 640 геномов SARS-CoV-2, представленных в базе данных GISAID, позволило сделать вывод о том, что вирусы группируются в четыре отдельные генетические подгруппы [98].

Анализ десятков тысяч геномов SARS-CoV-2, проведенный группой ученых из Темпльского университета, позволил выявить его прародительский штамм (препринт [99], опубликованный на сайте bioRxiv.org). Со временем мутации в геноме предкового вируса дали начало семи доминантным линиям, которые распространились по разным континентам. Использование технологии молекулярного баркодирования позволило установить, что геномные последовательности североамериканских коронавирусов отличаются от последовательностей коронавирусов, циркулирующих в то же время в Европе и Азии [99].

На основе анализа 75 полноразмерных геномов выделены шесть кластеров, названных Ухань, Бриллиантовая принцесса, Азиатский, Европейский, США и Пекин [100]. Обнаруженные в образцах из Южной Кореи, Индии, Греции, Испании, Австралии, Швеции и Юньнани мутации в гене, кодирующем шиповидный гликопротеин S, возможно, предполагают преобладание мутировавших штаммов с разной степенью вирулентности.

Несмотря на многообразие подходов к классификации SARS-CoV-2, консорциум GISAID сформировал собственную, обобщенную систему классификации [101], согласно которой выделяют семь основных клайдов (на основе характерных наборов мутаций): S, L, V, G, GH, GR, GV (табл. 2).

Согласно [68], клайды G и GR преобладают в Европе, в то время как S и GH – в основном

в Северной и Южной Америке. Референсный клайд L представлен преимущественно последовательностями из Азии. В настоящее время представители клайда G и его производных – GH и GR, наиболее распространены среди секвенированных геномов SARS-CoV-2, на долю которых в глобальном масштабе приходится 74% всех известных последовательностей. В частности, клайд GR, несущий комбинацию мутаций D614G S-белка и RG203KR N-белка, в настоящее время является самым распространенным представителем SARS-CoV-2 в мире. Исходный вирусный штамм, представленный клайдом L, по-прежнему составляет 7% от числа секвенированных геномов [68].

Проведен анализ 1566 последовательностей генома SARS-CoV-2, выделенных в 10 азиатских странах [102]. Последовательности сравнивали с эталонной последовательностью штамма WIV04 (Accession no MN996528.1) для идентификации мутаций в различных областях генома. Анализ *in silico* показал, что изоляты из 10 азиатских стран формируют клайды G, GH, GR, L, S, O и V. При этом самый высокий уровень мутаций зафиксирован в клайдах GH и GR [102].

Классификация GISAID дополняется более детальной динамической системой номенклатуры, предложенной Rambaut и соавт. [103]. Согласно этой системе, выделяют 81 линию SARS-CoV-2 и большая их часть относится к линиям A, B и B.1. Выделены шесть линий, производных от линии A (A.1–A.6), и две сублинии-потомки A.1 (A.1.1 и A.3). Также описано 16 линий, производных от линии B. Линия B.1, включающая на апрель 2020 года 70 сублиний, является преобладающей. Линия B.2 имеет шесть сублинейных потомков. Согласно этой классификации, клайды S, V, G, GH, GR, GV соответствуют линиям A, B.2, B.1, B.1*, B.1.1. (табл. 2) [68]. На основе этой системы разработано программное обеспечение pangolin [104], которое позволяет автоматически классифицировать новые геномы.

Еще один подход к систематизации описан в работе Hodcroft с соавт. [105]. Авторы предлагают указывать в названии год выявления штаммов, входящих в определенный клайд. При этом клайд формируется из штаммов, которые циркулируют в течение нескольких месяцев и имеют характерное географическое распространение. Согласно этой классификации, в настоящее время выделяют следующие клайды: 19A, 19B, 20A, 20B, 20C (табл. 1). Клайды 19A и 19B преобладали в Азии в начале пандемии, тогда как 20A был детектирован в Европе в начале 2020 года. Клайд 20B также распространился в Европе, тогда как 20C в основном в Северной Америке.

Таким образом, в настоящее время продолжается формирование удобной и понятной системы классификации пандемического SARS-CoV-2. Следует отметить, что на момент написания обзора не было опубликовано официальных рекомендаций МКТВ (ICTV) по субвидовой таксономии SARS-CoV-2.

В конце января 2020 года в России зафиксировали первые случаи заражения SARS-CoV-2, а с мая 2020 года Россия входит в число четырех стран с наибольшим количеством подтвержденных случаев заболевания COVID-19. На март 2021 года в России зафиксировано 4,3 млн случаев COVID-19 и 87000 смертельных исходов. Однако вспышка в России началась позже, чем во многих соседних европейских странах, возможно, благодаря принятым мерам по ограничению транспортного сообщения с Китаем. Филогенетический анализ изолятов SARS-CoV-2, выделенных в России, показал, что большинство образцов соответствуют линиям B.1, B.1.1 и B.1* (номенклатура PANGOLIN) или клайдам G, GR и GH (номенклатура GISAID), широко распространенным в Европе [106]. При этом самой распространенной генетической линией является GR / 20B / B.1.1 (номенклатура GISAID, Nextstrain, Pangolin соответственно) [107]. В результате филогенетического анализа российских штаммов установлено, что, как и повсеместно, российские изоляты SARS-CoV-2 характеризовались низкой частотой мутаций. Однако обнаружена высокая частота несинонимичных мутаций, приводящих к неконсервативным заменам.

Большинство несинонимичных замен найдены в нуклеотидных последовательностях, кодирующих нуклеопротеин N. Предполагается, что это наблюдение может служить косвенным доказательством интенсивной циркуляции вируса в человеческой популяции и его адаптации к новым носителям [108].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

При глобальном распространении SARS-CoV-2 с отчетливым порогом начала пандемии новой для иммунной системы человека вирусной инфекции возникли условия, когда возможно получение достаточно убедительных данных о том, зависит ли структура клинических форм COVID-19 от динамических изменений генетически обусловленных биологических свойств вируса, или же она детерминирована только характеристиками хозяина. Этот вопрос принципиально важен для разработки вакцин и планирования ресурсов общественного здравоохранения. По истечении 12 месяцев от начала распространения нового коронавируса в человеческой популяции все меньше остается сомнений в дивергенции SARS-CoV-2, т.е. в появлении штаммов, отличающихся по биологическим свойствам, что обусловлено высокой пластичностью геномов РНК-вирусов и благоприятными условиями для их эволюции.

Любые изменения вирусного генома, нарушающие взаимодействие с клеткой хозяина, изменяющие условия для репродукции коронавируса, экспрессию генов хозяина или противодействие иммунитету хозяина, могут изменить степень его контагиозности и вирулентности. Более того, биологические свойства вируса может изменить одна или несколько точечных мутаций, как показано в ряде исследований. При этом взаимодействие между коронавирусом и хозяином является ключом к патогенезу коронавирусных заболеваний и, в конечном счете, определяет исход инфекции. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60079.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Liu Y.C., Kuo R.L., Shih S.R. // *Biomed. J.* 2020. V. 43. № 4. P. 328–333.
- COVID-19 Dashboard by the Center for Systems Science and Engineering (CSSE) at Johns Hopkins University (JHU). <https://gisanddata.maps.arcgis.com/apps/opsdashboard/index.html#/bda7594740fd40299423467b48e9ecf6>.
- Geoghegan J.L., Holmes E.C. // *Nat. Rev. Genet.* 2018. V. 19. № 12. P. 756–769.
- ICTV (International Committee on Taxonomy of Viruses). https://talk.ictvonline.org/ictv-reports/ictv_9th_report/positive-sense-rna-viruses-2011/w/posrna_viruses/222/coronaviridae.
- Nakagawa S., Miyazawa T. // *Inflamm. Regen.* 2020. V. 40. № 1. P. 17.
- 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.
- Zhou H., Chen X., Hu T., Li J., Song H., Liu Y., Wang P., Liu D., Yang J., Holmes E.C., et al. // *Curr. Biol.* 2020. V. 30. № 11. P. 2196–2203 e2193.
- Guo Y.R., Cao Q.D., Hong Z.S., Tan Y.Y., Chen S.D., Jin H.J., Tan K.S., Wang D.Y., Yan Y. // *Mil. Med. Res.* 2020. V. 7. № 1. P. 11.
- Yuan S., Jiang S.C., Li Z.L. // *Front. Vet. Sci.* 2020. V. 7. P. 379.
- Lam T.T., Jia N., Zhang Y.W., Shum M.H., Jiang J.F., Zhu H.C., Tong Y.G., Shi Y.X., Ni X.B., Liao Y.S., et al. // *Nature.* 2020.

- V. 583. № 7815. P. 282–285.
11. Wu C., Liu Y., Yang Y., Zhang P., Zhong W., Wang Y., Wang Q., Xu Y., Li M., Li X., et al. // *Acta Pharm. Sin B*. 2020. V. 10. № 5. P. 766–788.
 12. Chen Y., Liu Q., Guo D. // *J. Med. Virol.* 2020. V. 92. № 4. P. 418–423.
 13. Li X., Giorgi E.E., Marichanegowda M.H., Foley B., Xiao C., Kong X.P., Chen Y., Gnanakaran S., Korber B., Gao F. // *Sci. Adv.* 2020. V. 6. № 27. P. eabb9153.
 14. Liu C., Mendonca L., Yang Y., Gao Y., Shen C., Liu J., Ni T., Ju B., Liu C., Tang X., et al. // *Structure*. 2020. V. 28. № 11. P. 1218–1224 e1214.
 15. Zhu N., Zhang D., Wang W., Li X., Yang B., Song J., Zhao X., Huang B., Shi W., Lu R., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 382. № 8. P. 727–733.
 16. Lim Y.X., Ng Y.L., Tam J.P., Liu D.X. // *Diseases*. 2016. V. 4. № 3. P. 26.
 17. Nelson C.W., Ardern Z., Goldberg T.L., Meng C., Kuo C.-H., Ludwig C., Kolokotronis S.-O., Wei X. // *eLife*. 2020. V. 9. P. e59633.
 18. Davidson A.M., Wysocki J., Batlle D. // *Hypertension*. 2020. V. 76. № 5. P. 1339–1349.
 19. Li W., Choe H., Farzan M. // *Nidoviruses*. 2006. doi: 10.1007/978-0-387-33012-9-36
 20. Walls A.C., Park Y.J., Tortorici M.A., Wall A., McGuire A.T., Veesler D. // *Cell*. 2020. V. 181. № 2. P. 281–292 e6.
 21. Shang J., Ye G., Shi K., Wan Y., Luo C., Aihara H., Geng Q., Auerbach A., Li F. // *Nature*. 2020. V. 581. № 7807. P. 221–224.
 22. Hoffmann M., Kleine-Weber H., Schroeder S., Kruger N., Herrler T., Erichsen S., Schiergens T.S., Herrler G., Wu N.H., Nitsche A., et al. // *Cell*. 2020. V. 181. № 2. P. 271–280 e8.
 23. Bestle D., Heindl M.R., Limburg H., Van Lam van T., Pilgram O., Moulton H., Stein D.A., Hards K., Eickmann M., Dolnik O., et al. // *Life Sci. Alliance*. 2020. V. 3. № 9. P. e202000786.
 24. Tang T., Bidon M., Jaimes J.A., Whittaker G.R., Daniel S. // *Antiviral Res.* 2020. V. 178. P. 104792.
 25. Ruch T.R., Machamer C.E. // *Viruses*. 2012. V. 4. № 3. P. 363–382.
 26. Neuman B.W., Kiss G., Kunding A.H., Bhella D., Baksh M.F., Connelly S., Droese B., Klaus J.P., Makino S., Sawicki S.G., et al. // *J. Struct. Biol.* 2011. V. 174. № 1. P. 11–22.
 27. McBride R., van Zyl M., Fielding B.C. // *Viruses*. 2014. V. 6. № 8. P. 2991–3018.
 28. Sungnak W., Huang N., Becavin C., Berg M., Queen R., Litvinukova M., Talavera-Lopez C., Maatz H., Reichart D., Sampaziotis F., et al. // *Nat. Med.* 2020. V. 26. № 5. P. 681–687.
 29. Zhang X.Y., Huang H.J., Zhuang D.L., Nasser M.I., Yang M.H., Zhu P., Zhao M.Y. // *Infect. Dis. Poverty*. 2020. V. 9. № 1. P. 99.
 30. Khan F.A. // *New Microbes New Infect.* 2020. V. 36. P. 100697.
 31. Russell C.D., Millar J.E., Baillie J.K. // *Lancet*. 2020. V. 395. № 10223. P. 473–475.
 32. Yang X., Yu Y., Xu J., Shu H., Xia J.a., Liu H., Wu Y., Zhang L., Yu Z., Fang M., et al. // *Lancet Respiratory Med.* 2020. V. 8. № 5. P. 475–481.
 33. Liu K., Fang Y.Y., Deng Y., Liu W., Wang M.F., Ma J.P., Xiao W., Wang Y.N., Zhong M.H., Li C.H., et al. // *Chin. Med. J. (Engl.)*. 2020. V. 133. № 9. P. 1025–1031.
 34. Oran D.P., Topol E.J. // *Ann. Intern. Med.* 2020. V. 173. № 5. P. 362–367.
 35. Abduljalil J.M., Abduljalil B.M. // *New Microbes New Infect.* 2020. V. 35. P. 100672.
 36. Wu Z., McGoogan J.M. // *J. Am. Med. Ass.* 2020. V. 323. № 13. P. 1239–1242.
 37. Harrison S.L., Fazio-Eynullayeva E., Lane D.A., Underhill P., Lip G.Y.H. // *PLoS Med.* 2020. V. 17. № 9. P. e1003321.
 38. Richardson S., Hirsch J.S., Narasimhan M., Crawford J.M., McGinn T., Davidson K.W., the Northwell C.-R.C., Barnaby D.P., Becker L.B., Chelico J.D., et al. // *J. Am. Med. Ass.* 2020. V. 323. № 20. P. 2052–2059.
 39. Petrilli C.M., Jones S.A., Yang J., Rajagopalan H., O'Donnell L., Chernyak Y., Tobin K.A., Cerfolio R.J., Francois F., Horwitz L.I. // *Brit. Med. J.* 2020. V. 369. P. m1966.
 40. Wang D., Hu B., Hu C., Zhu F., Liu X., Zhang J., Wang B., Xiang H., Cheng Z., Xiong Y., et al. // *J. Am. Med. Ass.* 2020. V. 323. № 11. P. 1061–1069.
 41. 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.
 42. Mehta P., McAuley D.F., Brown M., Sanchez E., Tattersall R.S., Manson J.J., Hlth Across Speciality Collaboration U.K. // *Lancet*. 2020. V. 395. № 10229. P. 1033–1034.
 43. Rawson T.M., Moore L.S.P., Zhu N., Ranganathan N., Skolimowska K., Gilchrist M., Satta G., Cooke G., Holmes A. // *Clin. Infect. Dis.* 2020. V. 71. № 9. P. 2459–2468.
 44. Ludvigsson J.F. // *Acta Paediatrica*. 2020. V. 109. № 6. P. 1088–1095.
 45. Meskina E.R. // *J. Microbiol. Epidemiol. Immunobiol.* 2020. V. 97. № 3. P. 202–215.
 46. Ahmed M., Advani S., Moreira A., Zoretic S., Martinez J., Chorath K., Acosta S., Naqvi R., Burmeister-Morton F., Burmeister F., et al. // *Eclin. Med.* 2020. V. 26. P. 100527.
 47. Hamming I., Timens W., Bulthuis M.L., Lely A.T., Navis G., van Goor H. // *J. Pathol.* 2004. V. 203. № 2. P. 631–637.
 48. LoPresti M., Beck D.B., Duggal P., Cummings D.A.T., Solomon B.D. // *Am. J. Hum. Genet.* 2020. V. 107. № 3. P. 381–402.
 49. Fujikura K., Uesaka K. // *J. Clin. Pathol.* 2021. V. 74. № 5. P. 307–313.
 50. Hou Y., Zhao J., Martin W., Kallianpur A., Chung M.K., Jehi L., Sharifi N., Erzurum S., Eng C., Cheng F. // *BMC Med.* 2020. V. 18. № 1. P. 216.
 51. Ellinghaus D., Degenhardt F., Bujanda L., Buti M., Albillos A., Invernizzi P., Fernandez J., Prati D., Baselli G., Asselta R., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2020. V. 383. № 16. P. 1522–1534.
 52. Wang F., Huang S., Gao R., Zhou Y., Lai C., Li Z., Xian W., Qian X., Li Z., Huang Y., et al. // *Cell Discov.* 2020. V. 6. № 1. P. 83.
 53. Zimmerman P.A., Buckler-White A., Alkhatib G., Spalding T., Kubofcik J., Combadiere C., Weissman D., Cohen O., Rubbert A., Lam G., et al. // *Mol. Med.* 1997. V. 3. № 1. P. 23–36.
 54. de Wilde A.H., Snijder E.J., Kikkert M., van Hemert M.J. // *Curr. Top. Microb. Immunol.* 2018. V. 419. P. 1–42.
 55. Menachery V.D., Yount B.L., Debbink K., Agnihothram S., Gralinski L.E., Plante J.A., Graham R.L., Scobey T., Ge X.-Y., Donaldson E.F., et al. // *Nat. Med.* 2015. V. 21. № 12. P. 1508–1513.
 56. Imai M., Watanabe T., Hatta M., Das S.C., Ozawa M., Shinya K., Zhong G., Hanson A., Katsura H., Watanabe S., et al. // *Nature*. 2012. V. 486. № 7403. P. 420–428.
 57. Maines T.R., Chen L.-M., Van Hoesven N., Tumpey T.M., Blixt O., Belser J.A., Gustin K.M., Pearce M.B., Pappas C., Stevens J., et al. // *Virology*. 2011. V. 413. № 1. P. 139–147.
 58. Klimov A.I., Cox N.J., Yotov W.V., Rocha E., Alexandrova G.I., Kendal A.P. // *Virology*. 1992. V. 186. № 2. P. 795–797.
 59. Lin J.-H., Wu H.-S. // *BioMed Research International*. 2015. V. 2015. P. 805306.
 60. Jernigan D.B., Cox N.J. // *Annu. Rev. Med.* 2015. V. 66. № 1. P. 361–371.
 61. Gussow A.B., Auslander N., Faure G., Wolf Y.I., Zhang F., Koonin E.V. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. V. 117. № 26. P. 15193–15199.

62. Islam M.R., Hoque M.N., Rahman M.S., Alam A., Akther M., Puspo J.A., Akter S., Sultana M., Crandall K.A., Hossain M.A. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 14004.
63. Hadfield J., Megill C., Bell S.M., Huddleston J., Potter B., Callender C., Sagulenko P., Bedford T., Neher R.A. // *Bioinformatics.* 2018. V. 34. № 23. P. 4121–4123.
64. Zhao Z., Li H., Wu X., Zhong Y., Zhang K., Zhang Y.P., Boerwinkle E., Fu Y.X. // *BMC Evol. Biol.* 2004. V. 4. P. 21.
65. Cotten M., Watson S.J., Zumla A.I., Makhdoom H.Q., Palser A.L., Ong S.H., Al Rabeeah A.A., Alhakeem R.F., Assiri A., Al-Tawfiq J.A., et al. // *mBio.* 2014. V. 5. № 1. P. e01062–01013.
66. Vijgen L., Keyaerts E., Moës E., Thoelen I., Wollants E., Lemey P., Vandamme A.-M., van Ranst M. // *J. Virol.* 2005. V. 79. № 3. P. 1595–1604.
67. Smith E.C., Blanc H., Surdel M.C., Vignuzzi M., Denison M.R. // *PLoS Pathog.* 2013. V. 9. № 8. P. e1003565.
68. Mercatelli D., Giorgi F.M. // *Front. Microbiol.* 2020. V. 11. P. 1800.
69. Jia Y., Shen G., Zhang Y., Huang K.-S., Ho H.-Y., Hor W.-S., Yang C.-H., Li C., Wang W.-L. // *bioRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.04.09.034942.
70. Naqvi A.A.T., Fatima K., Mohammad T., Fatima U., Singh I.K., Singh A., Atif S.M., Hariprasad G., Hasan G.M., Hassan M.I. // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis. Dis.* 2020. V. 1866. № 10. P. 165878.
71. Vilar S., Isom D.G. // *bioRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.12.16.423071.
72. Morais I.J., Poveiro R.C., Souza G.M., Bortolin D.I., Sassaki F.T., Lima A.T.M. // *Sci. Rept.* 2020. V. 10. № 1. P. 18289.
73. Korber B., Fischer W.M., Gnanakaran S., Yoon H., Theiler J., Abfalterer W., Hengartner N., Giorgi E.E., Bhattacharya T., Foley B., et al. // *Cell.* 2020. V. 182. № 4. P. 812–827 e819.
74. Laha S., Chakraborty J., Das S., Manna S.K., Biswas S., Chatterjee R. // *Infection, Genetics and Evolution.* 2020. V. 85. P. 104445.
75. Alouane T., Laamarti M., Essabbar A., Hakmi M., Bouricha E.M., Chemaou-Elfihri M.W., Kartti S., Boumajdi N., Bendani H., Laamarti R., et al. // *Pathogens.* 2020. V. 9. № 10. P. 829.
76. Lokman S.M., Rasheduzzaman M., Salauddin A., Barua R., Tanzina A.Y., Rumi M.H., Hossain M.I., Siddiki A.M.A.M.Z., Mannan A., Hasan M.M. // *Infect. Genet. Evol.* 2020. V. 84. P. 104389.
77. Comandatore F., Chiodi A., Gabrieli P., Biffignandi G.B., Perini M., Ricagno S., Mascolo E., Petazzoni G., Ramazzotti M., Rimoldi S.G., et al. // *bioRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.04.30.071027.
78. Zhang L., Wang S., Ren Q., Yang J., Lu Y., Zhang L., Gai Z. // *medRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.04.27.20081349.
79. van Dorp L., Richard D., Tan C.C., Shaw L.P., Acman M., Balloux F. // *bioRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.05.21.108506.
80. Bhowmik D., Pal S., Lahiri A., Talukdar A., Paul S. // *bioRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.04.26.062471.
81. Cortey M., Li Y., Díaz I., Clilverd H., Darwich L., Mateu E. // *bioRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.05.16.099499.
82. Zhang L., Jackson C.B., Mou H., Ojha A., Peng H., Quinlan B.D., Rangarajan E.S., Pan A., Vanderheiden A., Suthar M.S., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 6013.
83. Kemp S., Harvey W., Datir R., Collier D., Ferreira I., Carabelli A., Robertson D., Gupta R. // *bioRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.12.14.422555.
84. Preliminary genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in the UK defined by a novel set of spike mutations. 2020. <https://virological.org/t/preliminary-genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-the-uk-defined-by-a-novel-set-of-spike-mutations/563>.
85. Starr T.N., Greaney A.J., Hilton S.K., Crawford K.H.D., Navarro M.J., Bowen J.E., Tortorici M.A., Walls A.C., Veasley D., Bloom J.D. // *bioRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.06.17.157982.
86. Tegally H., Wilkinson E., Giovanetti M., Iranzadeh A., Fonseca V., Giandhari J., Doolabh D., Pillay S., San E.J., Msomi N., et al. // *medRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.12.21.20248640.
87. Genomic characterisation of an emergent SARS-CoV-2 lineage in Manaus: preliminary findings. 2021. <https://virological.org/t/genomic-characterisation-of-an-emergent-sars-cov-2-lineage-in-manaus-preliminary-findings/586>.
88. Khailany R.A., Safdar M., Ozaslan M. // *Gene Rep.* 2020. V. 19. P. 100682.
89. Young B.E., Fong S.-W., Chan Y.-H., Mak T.-M., Ang L.W., Anderson D.E., Lee C.Y.-P., Amrun S.N., Lee B., Goh Y.S., et al. // *Lancet.* 2020. V. 396. № 10251. P. 603–611.
90. Krammer F. // *Nature.* 2020. V. 586. № 7830. P. 516–527.
91. Xie X., Zou J., Fontes-Garfias C.R., Xia H., Swanson K.A., Cutler M., Cooper D., Menachery V.D., Weaver S., Dormitzer P.R., et al. // *bioRxiv.* 2021. doi: 10.1101/2021.01.07.425740.
92. Ferretti A.P., Kula T., Wang Y., Nguyen D.M.V., Weinheimer A., Dunlap G.S., Xu Q., Nabilsi N., Perullo C.R., Cristoforo A.W., et al. // *Immunity.* 2020. V. 53. № 5. P. 1095–1107 e1093.
93. Wahba L., Jain N., Fire A.Z., Shoura M.J., Artiles K.L., McCoy M.J., Jeong D.E. // *mSphere.* 2020. V. 5. № 3. P. e00160–20.
94. Forster P., Forster L., Renfrew C., Forster M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. № 17. P. 9241–9243.
95. Yang X., Dong N., Chan E.W., Chen S. // *Emerg. Microbes Infect.* 2020. V. 9. № 1. P. 1287–1299.
96. Tang X., Wu C., Li X., Song Y., Yao X., Wu X., Duan Y., Zhang H., Wang Y., Qian Z., et al. // *Nat. Sci. Rev.* 2020. V. 7. № 6. P. 1012–1023.
97. Zhang X., Tan Y., Ling Y., Lu G., Liu F., Yi Z., Jia X., Wu M., Shi B., Xu S., et al. // *Nature.* 2020. V. 583. № 7816. P. 437–440.
98. Hahn G., Lee S., Weiss S.T., Lange C. // *bioRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.05.05.079061.
99. Kumar S., Tao Q., Weaver S., Sanderford M., Caraballo-Ortiz M.A., Sharma S., Pond S.L.K., Miura S. // *bioRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.09.24.311845.
100. Sundru Manjulata D., Annapurna P., Balakuntalam K., Kumar S. // *Res. Square.* 2021. doi: 10.21203/rs.3.rs-29557/v1.
101. GISAID: Clade and lineage nomenclature, July 4, 2020. <https://www.gisaid.org/references/statements-clarifications/clade-and-lineage-nomenclature-aids-in-genomic-epidemiology-of-active-hcov-19-viruses/>
102. Sengupta A., Hassan S.S., Choudhury P.P. // *bioRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.11.30.402487.
103. Rambaut A., Holmes E.C., Hill V., O’Toole Á., McCrone J., Ruis C., du Plessis L., Pybus O.G. // *bioRxiv.* 2020. doi: 10.1101/2020.04.17.046086.
104. Phylogenetic Assignment of Named Global Outbreak LINEages (PANGOLIN) updated 2020. <https://github.com/cov-lineages/pangolin>.
105. Hodcroft E.B., Hadfield J., Neher R.A., Bedford T. Year-letter genetic clade naming for SARS-CoV-2 on nextstrain.org. 2020. <https://nextstrain.org/blog/2020-06-02-SARSCoV2-clade-naming>
106. Komissarov A.B., Safina K.R., Garushyants S.K., Fadeev A.V., Sergeeva M.V., Ivanova A.A., Danilenko D.M., Lioznov D., Shneider O.V., Shvyrev N., et al. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 649.
107. Shchetinin A.M., Tsyganova E.V., Protsenko D.N. // *Cureus.* 2021. V. 13. № 3. P. e13733.
108. Kozlovskaya L., Pinaeva A., Ignatyev G., Selivanov A., Shishova A., Kovpak A., Gordeyuk I., Ivin Y., Berestovskaya A., Prokhortchouk E., et al. // *Int. J. Infect. Dis.* 2020. V. 99. P. 40–46.

УДК 576.32/36:535.379

Хемилюминесценция в исследовании свободнорадикальных реакций. Часть 1

Л. А. Ромодин*

Московская государственная академия ветеринарной медицины и биотехнологии – МВА имени К.И. Скрябина, Министерство сельского хозяйства РФ, Москва, 109472 Россия

*E-mail: rla2904@mail.ru

Поступила в редакцию 18.03.2020

Принята к печати 11.06.2020

DOI: 10.32607/actanaturae.10912

РЕФЕРАТ В представленном обзоре рассмотрено применение метода регистрации хемилюминесценции для оценки течения свободнорадикальных процессов в модельных биологических системах. Приведена классификация экспериментальных модельных биологических систем. В общих чертах рассмотрены метаболические пути свободных радикалов в клетке. Представлены аргументы в пользу необходимости использования метода регистрации хемилюминесценции при исследовании свободнорадикальных процессов наряду с такими методами регистрации электромагнитного излучения, как электронный парамагнитный резонанс, спектрофотометрия и регистрация инфракрасного излучения, а также с химическими методами оценки конечных продуктов свободнорадикальных реакций. Наиболее подробно рассмотрена хемилюминесценция, сопровождающая свободнорадикальные реакции с участием липидов – одну из ключевых причин гибели клеток по пути апоптоза (в случае запуска комплексом цитохрома с с кардиолипином) или ферроптоза (индуцируемого свободными ионами двухвалентного железа), а также разобрано понятие квантового выхода хемилюминесценции.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА свободнорадикальные реакции, апоптоз, ферроптоз, хемилюминесценция, перекисное окисление липидов, активные формы кислорода.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МДА – малоновый диальдегид; ЭВС – электронные возбужденные состояния; ЭПР – электронный парамагнитный резонанс.

ВВЕДЕНИЕ

Биохемилюминесценция – явление генерации фотонов в биологических системах. Нередко можно встретить также термин «биолюминесценция», который, строго говоря, лишен смысла, так как описывает свечение живых организмов, обусловленное химическими реакциями. Это свечение вызвано протеканием в этих системах реакций с участием свободных радикалов. Закономерности протекания этих реакций и влияние на этот процесс различных факторов, например антиоксидантов, изучают с использованием метода регистрации хемилюминесценции. Однако перед непосредственным описанием хемилюминесценции и механизмов ее возникновения в биологических системах необходимо написать несколько фраз, относящихся к систематизации модельных биологических систем.

МОДЕЛЬНЫЕ БИОЛОГИЧЕСКИЕ СИСТЕМЫ В ИЗУЧЕНИИ СВОБОДНОРАДИКАЛЬНЫХ РЕАКЦИЙ

Экспериментальная модельная система – материальная система, воздействие на которую физиче-

ским, химическим, биологическим или иным фактором способно дать информацию о последствиях влияния этого фактора на систему-оригинал. Можно привести следующую классификацию экспериментальных модельных систем, имеющих отношение к биологическим исследованиям.

А. Собственно биологические модельные системы:

А1. Лабораторные животные. Эта модель наиболее полно отражает свойства человеческого организма. Однако необходимо учитывать таксономические особенности используемых животных (например, способность синтезировать витамин С), что позволит понять, насколько результат, полученный на данной модели, можно перенести на организм человека. В качестве примера можно привести изучение свободнорадикальных процессов, выполненное коллективом под руководством М.В. Листова [1, 2] на мышах, и разработку модели цирроза печени у крыс, индуцированного ацетаминофеном (парацетамолом) [3];

А2. Эмбрионы животных. Основное отличие данной модели от предыдущей заключается в возможности сокращения времени эксперимента, а также

в использовании более полного набора воздействий в силу нераспространения на эмбрионы ранних стадий развития нормативных актов о правах лабораторных животных. В качестве примера можно привести работу [4], в которой на эмбрионах рыбки *Brachydanio rerio* (полосатый данио) изучали последствия авитаминоза и гипервитаминоза витамина Е у их родителей;

А3. Нейромышечный препарат. На этой модели [5] показана свободнорадикальная природа возбуждения и торможения в нервной ткани;

А4. Культуры клеток. Эту модель используют для определения содержания формальдегида методом регистрации хемилюминесценции, усиленной производным кумарина, в условиях искусственно индуцированного стресса [6].

А5. Культура митохондрий. Эта модель позволяет прицельно исследовать процессы, происходящие в митохондриях. В качестве примера можно привести работы под руководством Ю.А. Владимирова по регистрации хемилюминесценции в суспензии митохондрий, результаты которых позволили предположить, что перекисное окисление липидов митохондриальных мембран инициируется при дефиците ферментов, катализирующих β -окисление жирных кислот [7–9]. К этой же группе можно отнести и культуру изолированных пластид растений, например хлоропластов [10];

А6. Препарат тканей. При исследовании тканей, полученных непосредственно от животных, экспериментальной моделью служат, строго говоря, сами лабораторные животные. На тканевом препарате впервые обнаружили биохемилюминесценцию [11]. Метод регистрации хемилюминесценции крови и ее фракций используется во многих работах [12–16];

А7. Модель на основе грибов. Наиболее часто в качестве экспериментальной модели используют пекарские дрожжи (*Saccharomyces cerevisiae*). Так, эту модель использовали для изучения окислительного стресса методом регистрации хемилюминесценции [17];

А8. Растительные модели. К этой группе моделей можно отнести как целые растения, проростки или отдельные органы, так и культуры растительных клеток и тканей. На семядолях бобов [18] показано увеличение концентрации супероксидного анион-радикала при повышении активности липоксигеназ. В качестве примера можно привести применение метода регистрации хемилюминесценции [19] при изучении связывания пептидного лиганда с клеточным рецептором.

Можно выделить также большую группу моделей, названную молекулярными моделями, в которую вошли две группы систем.

В. Условно биологические экспериментальные модели:

В1. Модели на основе биологических молекул, выделенных исключительно из живых организмов, например, на выделенных из животных цитохроме с и кардиолипине [20], в качестве молекулярной модели использовали также ДНК *Escherichia coli* [1];

В2. Молекулярные модели на основе биологических молекул, выделенных из живых организмов, и идентичных им искусственно синтезированных молекул. В качестве примера можно привести изучение участия производных кумарина в реакции, катализируемой комплексом цитохрома с с кардиолипином, с использованием цитохрома с, выделенного из сердца лошади, и искусственно синтезированного тетраолеилкардиолипина [21];

С. Модели на основе синтетических полимеров и низкомолекулярных органических веществ. Строго говоря, эти модели нельзя считать биологическими, однако некоторые данные, полученные с их использованием, можно переносить на живые системы. При этом именно эти модели зачастую оказываются наиболее подходящими при изучении базовых закономерностей свободнорадикальных реакций:

С1. Молекулярная модель, в которой используются биомолекулы и небологический аналог биомолекулы. Так, додецилсульфат-анион используют в качестве аналога кардиолипина для изучения изменения свойств цитохрома с при связывании с фосфолипидами [22]. Эта модель позволяет изучать комплекс цитохрома с с кардиолипином, запускающий перекисидацию липидов мембран митохондрий, что приводит к инициации апоптоза по митохондриальному пути [23];

С2. Молекулярная модель с использованием синтетического полимера. С помощью данной модели изучали генерацию хемилюминесценции при разрушении полимеров [24] и кинетику алкил-радикального распада полиэтилена [25];

С3. Молекулярная модель на основе только низкомолекулярных органических веществ. С помощью этой модели получены данные о природе хемилюминесценции, вызванной реакциями углеводородных радикалов, образующихся при действии продуктов термического распада α_1, α_2 -азобисизобутиронитрила [26]. Углеводороды можно считать весьма удобной моделью для изучения свободнорадикальных реакций с участием липидов, так как «хвосты» липидных молекул являются по своей сути углеводородами. Опубликованы результаты подобных работ [26, 27], послужившие основой для исследования механизмов перекисного окисления липидов [28–31].

ЯВЛЕНИЕ ХЕМИЛЮМИНЕСЦЕНЦИИ И МЕХАНИЗМ ЕГО ВОЗНИКНОВЕНИЯ

Впервые испускание биообъектами светового излучения очень слабой интенсивности было замечено в конце первой трети прошлого века: В.В. Лепешкин обнаружил засветку лежащих на биопрепаратах фотопластинок, посчитав это излучение ультрафиолетовым, испускаемым при коагуляции протопласта при гибели клеток и назвав его некробиотическим излучением [32, 33]. А.Г. Гурвич, зарегистрировавший свечение суспензии делящихся дрожжей, выдвинул предположение о сигнальной роли люминесценции биопрепаратов в ультрафиолетовой области спектра. Это свечение он назвал «митогенетическим излучением» [34].

Впоследствии при помощи фотоэлектронных умножителей в третьей четверти XX века обнаружили световое излучение чрезвычайно низкой интенсивности в видимой области спектра (обозначенное в англоязычной литературе термином *ultraweak chemiluminescence* [35]), испускаемое биообъектами растительного [36] происхождения и животными тканями [11], была открыта хемилюминесценция интактных тканей, митохондрий [7–9] и хлоропластов [10]. В начале 1970-х годов Р. Эллан открыл хемилюминесценцию лейкоцитов из крови человека, осуществляющих фагоцитоз бактерий [37, 38]. Это открытие позволило использовать хемилюминесценцию в качестве клинического метода определения иммунореактивности.

Хемилюминесценция – это свечение, обусловленное переходом различных метаболитов свободнорадикальных реакций из электронно-возбужденного состояния (ЭВС) в основное [39, 40].

Свободнорадикальные процессы в биологических системах

Свободным радикалом называют частицу, имеющую свободную валентность, обусловленную наличием неспаренного электрона. Впервые радикалы описал М. Гомберг в начале XX века [41–43]. Свободные радикалы обладают высокой реакционной способностью. Это обуславливает их химическую нестабильность и короткое время жизни. При этом молекулярная структура радикала может влиять на его стабильность. К примеру, метильные заместители [44, 45] и иминоацетильный заместитель в *para*-положении [44] способствуют стабилизации радикала хинона.

В середине XX века были открыты радикальные формы компонентов дыхательной цепи – описан одноэлектронный перенос энергии [46–48]. До этого считалось, что окислительно-восстановительные реакции в биологических системах возможны лишь

отдачей и получением одновременно двух электронов [31].

Один из наиболее важных радикалов в процессах окислительного стресса – супероксид-анион радикал ($O_2^{\cdot-}$), образующийся при взаимодействии радикала семихинона (полувосстановленной формы убихинона) и молекулярного кислорода с внутренней стороны мембраны митохондрий, на комплексе III дыхательной цепи [49], а также на комплексе I [29] и в цитоплазме: NADPH-оксидазным комплексом на мембране эндоплазматического ретикулума или плазмалемме [50, 51]. Кроме того, супероксидный радикал образуется при окислении гемоглобина до гемина [2]. Образующийся супероксидный радикал является одним из компонентов нейрогуморальной регуляции [1, 2, 5, 52]. Коллективом под руководством М.В. Листова установлено, что супероксид-анион радикал, образующийся в крови, способствует генерации потенциалов на поверхности клеток, выполняя функцию триггера для эффекторов [5]. В частности, супероксидный радикал поддерживает автоматические сокращения миокарда, действуя на синусно-предсердный узел проводящей системы миокарда [52] и являясь мощным фактором деполаризации и гиперполяризации клеточной мембраны. Тем самым супероксидный радикал запускает механизмы возбуждения и торможения на поверхности проводящих волокон [5]. В предложенной Ю.А. Владимировым классификации супероксид-анион радикал наряду с монооксидом азота, образуемым NO-синтазами, назван первичным [29]. Этот термин указывает на то, что образование обоих радикалов катализируется ферментными системами [29, 53].

Первичные радикалы образуют молекулярные продукты: $O_2^{\cdot-}$ превращается под действием фермента супероксид-дисмутазы в пероксид водорода или реагирует с NO с образованием токсичного иона пероксинитрита $ONOO^-$ [54]. Супероксид обладает также способностью восстанавливать трехвалентное железо, содержащееся в ферритине или входящее в состав железосерных комплексов цепей переноса электронов, до двухвалентного, которое реагирует с пероксидом водорода или гипохлоритом с образованием чрезвычайно активного гидроксильного радикала ($\cdot OH$) и способно разветвлять цепи окисления липидов, реагируя с липогидропероксидами. Гидроксилрадикал может инициировать процесс перекисного окисления липидов с образованием липидных радикалов [29]. Образующиеся при этом активные формы кислорода и азота и гипохлорит в малых концентрациях выполняют функции вторичных мессенджеров, а при нарушении антиоксидантных систем клетки (большую роль играет глутатион

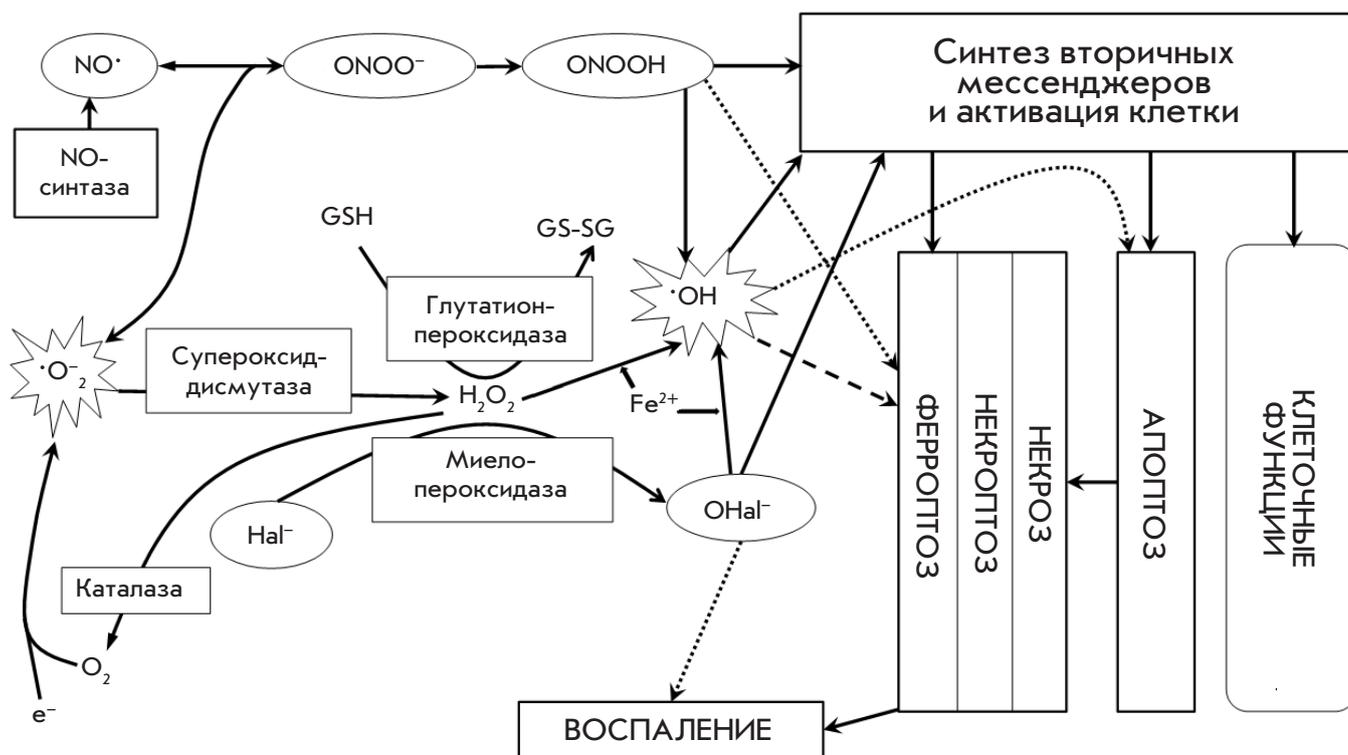


Рис. 1. Метаболические пути свободных радикалов [29, 54–57]

и глутатионпероксидаза [56]) приводят к состоянию окислительного стресса и, как следствие, к апоптозу [23, 58] или ферроптозу [59–61], запуская реакции пероксидации липидов. Необходимо заметить, что чаще всего пероксидацию липидов, ведущую к апоптозу, запускает цитохром с, образующий комплекс с кардиолипином; при связывании с которым происходит изменение конформации цитохрома с, и в результате данный белок приобретает способность катализировать липопероксидазную реакцию [62–64]. А ферроптоз обусловлен запуском ионами Fe^{2+} реакции Фентона с последующей пероксидацией липидов, вызванной гидроксильными радикалами [59–61]. В предложенной Ю.А. Владимировым классификации и гидроксильные, и липидные радикалы названы вторичными [53]. На схеме, представленной на рис. 1, приведены основные метаболические пути свободных радикалов в организме. Необходимо отметить отсутствие единой системы терминов, описывающих свободнорадикальные процессы в биологических системах и окислительный стресс.

Обнаружение свободных радикалов в биологических системах, собственная хемилюминесценция

Метод регистрации хемилюминесценции позволяет оценить скорость реакции образования свободных

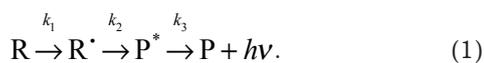
радикалов [28, 31]. Этот физический метод используется при изучении свободнорадикальных процессов наряду с химическими методами обнаружения молекулярных продуктов радикальных реакций. Наиболее часто маркером свободнорадикальных реакций и состояния окислительного стресса служит один из продуктов реакции перекисного окисления липидов – малоновый диальдегид (МДА), концентрацию которого определяют с использованием тиобарбитуровой кислоты (ТБА) [65, 66]. Для большей достоверности результатов предпочтительно также определять концентрации оснований Шиффа [67, 68], диеновых [69, 70] и триеновых [67] конъюгатов. Другие методы основаны на использовании перхвачников радикалов: антиоксидантных ферментов, таких, как каталаза (H_2O_2) [71] и супероксиддисмутаза ($O_2^{\cdot-}$) [69], фенольных антиоксидантов – для гидроксильных и липидных радикалов и других органических молекул [71]. Главный недостаток химических методов – невозможность определить природу и концентрацию самих свободных радикалов [29].

Метод электронного парамагнитного резонанса (ЭПР), разработанный в середине XX века [72], позволяет обнаружить и идентифицировать многие радикалы путем анализа сверхтонкой структуры ЭПР-сигналов [73, 74]. Однако применение мето-

да ЭПР затрудняется малой продолжительностью жизни и, как следствие, низкой концентрацией свободных радикалов [75]. К примеру, обнаружить радикалы, образующиеся в реакции катионов Fe^{2+} с гидропероксидами липидов, удалось только в проточной системе при большом расходе реактивов [76]. Расход реактивов можно снизить, используя спиновые ловушки [1, 77], которые, однако, могут влиять на биохимические реакции, протекающие в системе, а также разрушаться в ходе некоторых из них [29]. Свободнорадикальные процессы при гемзависимом экзофтальме изучали наряду с ЭПР методом спектроскопии в инфракрасном диапазоне (ИК-спектроскопии) [1]. Среди физических методов следует также указать метод спектрофотометрии. Так, этот метод использовали для определения концентрации продуктов окисления при изучении механизмов окисления гетероауксина (β -индолилуксусной кислоты) пероксидазой хрена и анионной пероксидазой табака [78]. Концентрацию маркеров перекисного окисления липидов в подавляющем большинстве случаев также определяют спектрофотометрически. При помощи спектрофотометрии с параллельной регистрацией хемилюминесценции исследовали производные кумарина, используемые в качестве люминесцирующей добавки при изучении пероксидазных свойств комплекса цитохрома с с кардиолипином [21].

Метод регистрации хемилюминесценции позволяет изучать интенсивность реакций с участием короткоживущих радикалов. Это возможно благодаря большому количеству энергии, которая образуется в элементарном акте радикальной реакции и частично выделяется в виде фотонов [40].

Представим обобщенные сведения о кинетике реакций, сопровождающихся хемилюминесценцией. В ходе этих реакций исходные вещества R образуют свободные радикалы R^\cdot , способные в последующей реакции привести к образованию электронно-возбужденных продуктов P^* , которые, переходя в основное состояние P, могут высветить фотон ($h\nu$). Возникновение продукта в ЭВС весьма высоко, если активированный комплекс реагентов и продукты реакции имеют состояния с разной мультиплетностью [40]. Для удобства дальнейшего описания рассматриваемых процессов приведем общую схему цепной реакции с образованием и участием свободных радикалов с последующим высвечиванием фотона:



При этом необходимо заметить, что в большинстве случаев спектр хемилюминесценции не соответствует спектру флуоресценции продукта P^* , но соответ-

ствует его спектру фосфоресценции [79]. Это явно указывает на то, что продукты P^* находятся в триплетном возбужденном состоянии.

Интенсивность хемилюминесценции (J) пропорциональна скорости третьей реакции на приведенной схеме (1): $J \propto k_3[\text{P}^*]$.

Из-за большой скорости реакции превращения свободных радикалов в продукты реакции в системе быстро устанавливается стационарное состояние, при котором скорости всех реакций данной цепи равны. Следовательно, интенсивность свечения пропорциональна скорости v_1 образования свободных радикалов (реакция с константой скорости k_1). Отсюда следует, что интенсивность хемилюминесценции пропорциональна также стационарной концентрации свободных радикалов, определить которую можно, зная скорость реакции их образования и константу скорости превращения в продукты в ЭВС [40, 80]:

$$J \propto v_1 = k_2 [\text{R}^\cdot] \quad (2)$$

$$[\text{R}^\cdot] = \frac{v_1}{k_2}. \quad (3)$$

Важно заметить, что как ЭПР-методом, так и флуориметрически и спектроскопически определяют стационарные концентрации веществ, в нашем случае – свободных радикалов $[\text{R}^\cdot]$. По мере увеличения реакционной способности радикалов, т.е. с ростом k_2 , величина $[\text{R}^\cdot]$ падает – уменьшается регистрируемый сигнал. И активные радикалы, даже при крайне высокой степени их образования, не будут регистрироваться ЭПР-методом из-за большого значения k_2 , означающей высокую скорость их превращения в продукты реакции. Однако интенсивность хемилюминесценции зависит не от концентрации радикалов, а от скорости свободнорадикальных реакций. Поэтому при помощи этого метода можно детектировать даже самые активные радикалы, концентрация которых ничтожно мала [80].

Понятие квантового выхода собственной хемилюминесценции

Применительно к явлению хемилюминесценции необходимо рассматривать два понятия квантового выхода: квантовый выход возбуждения (Q_{ex}) – отношение молекул в ЭВС продуктов радикальной реакции к общему числу молекул продуктов реакции; квантовый выход люминесценции (Q_{lum}) – отношение молекул в ЭВС, испустивших фотон, к общему количеству молекул в ЭВС. Общий выход свечения, хемилюминесценции (Q_{ChLum}), равен их произведению: $Q_{\text{ChLum}} = Q_{\text{ex}} \cdot Q_{\text{lum}}$ [40].

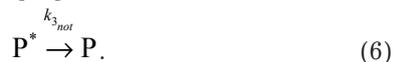
Рассмотрим более подробно реакции, приведенные на схеме (1) с константами скоростей k_2 и k_3 :



Это хемилюминесцентная реакция [40].



Это люминесценция [40].



Это безызлучательный переход [40].

Квантовый выход Q_{lum} реакции (5) – это квантовый выход фотолюминесценции продукта, близкий к нулю в большинстве биохимических реакций. Но и квантовый выход Q_{ex} при образовании продуктов в ЭВС крайне низок, так как большая часть молекул в химических реакциях, протекающих в водной среде при обычных температурах, сопровождается образованием молекул не в возбужденном, а в основном электронном состоянии [29] («другие продукты» из реакции (4) с константой k_2). А общий квантовый выход хемилюминесценции, используемый для оценки именно скорости образования свободных радикалов, вычисляется по формуле: $Q_{ChLum} = Q_{ex} \cdot Q_{lum}$ [40]. Это свечение называют сверхслабым именно из-за столь низкого значения квантового выхода биохемилюминесценции [31, 81].

Величину квантовых выходов, а значит, и итоговой интенсивности хемилюминесценции можно вычислить по формулам [40]:

$$Q_{lum} = \frac{k_3}{k_3 + k_{3not}} \quad (7)$$

$$J = k_3 [P^*] = Q_{ex} \frac{k_3}{k_3 + k_{3not}} k_2 [A][B], \quad (8)$$

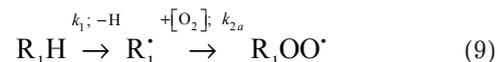
где k_3 – константа скорости реакции (5), k_{3not} – константа скорости реакции (6), k_2 – константа скорости реакции (4), J – интенсивность хемилюминесценции.

Очевидно, что не каждый квант света, попадающий на хемилюминометр, способен выбить электрон с фотокаатода фотоэлектронного умножителя [31]. Поэтому программное обеспечение современных хемилюминометров учитывает коэффициент светосбора (доля квантов, попавших на фотокаатод, от общего числа квантов, высвеченных изучаемой системой [82]) и квантовый выход фотокаатода (отношение выбитых с катода электронов к числу упавших на катод квантов).

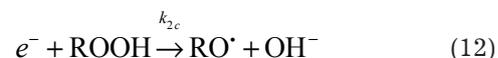
Механизм хемилюминесценции при реакциях перекиса биомолекул

Перекисное окисление липидов – один из основных процессов, способствующих развитию ферроптоза [60, 61, 83] и апоптоза по митохондриальному пути [23]. Поэтому при изучении этих процессов наибольшее внимание уделяется именно радикальным реакциям с участием липидов. Однако схема, описывающая липидные радикальные реакции, сопровождающиеся хемилюминесценцией, в целом справедлива и применима к хемилюминесцентным реакциям белков, что показано И.И. Сапезинским и Е.А. Лисси [75, 84–86], и нуклеиновых кислот в растворах, подвергнутых воздействию низкочастотного электромагнитного излучения [87, 88]. Обратим внимание, что для возбуждения, вызывающего дальнейшую люминесценцию, энергетический выход реакции должен быть не менее 40 ккал/моль (167.5 кДж/моль) [40]. Механизмы генерации люминесценции первоначально были открыты и продолжают изучаться на модельных системах на основе синтетических полимеров [24, 89] и низкомолекулярных органических веществ [26, 90, 91]. К примеру, изучен алкил-радикальный распад полиэтилена [25], а также опубликованы результаты спектрометрического исследования хемилюминесценции, сопровождающей окисление поликарбоната, полистирола и полиэтилметакрилата продуктами температурного распада дициклогексилпероксидикарбоната, приведено значение общего квантового выхода хемилюминесценции, равное 10^{-9} [24].

Перекисаия липидов, которой в наибольшей степени подвержены полиненасыщенные ацилы, представлена в виде не одной реакции, а каскада разветвляющихся цепных реакций [92–94]. Приведем более подробно схему реакции (4) с общей константой скорости k_2 :

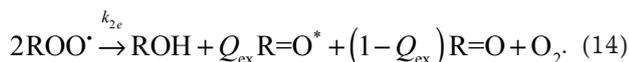


Гидропероксиды липидов ROOH очень легко становятся источниками новых цепей окисления липидов, согласно общим принципам протекания подобных реакций [95, 96]:



Образование кислородсодержащих радикалов – ключевой этап каскада реакций, приводящих в конечном счете к хемилюминесценции. Несмотря на известный факт, что молекулярный кислород является тушителем люминесценции [97], в середине XX века установили, что присутствие кислорода в системе с белками и углеводородами усиливает интенсивность хемилюминесценции [26, 40, 75, 80, 90, 98]. Это позволило предположить, что возбужденные частицы, в конечном итоге испускающие свет, образуются в результате рекомбинации именно кислородсодержащих радикалов. Следует также обратить внимание на то, что, помимо белков и углеводородных группировок, субстратом окисления с последующим высвечиванием фотонов может служить люминол [99, 100]. Однако образующийся в этом случае люминесцирующий продукт находится в синглетном ЭВС, а не в триплетном, в котором пребывают возбужденные продукты свободнорадикальных реакций с участием углеводородных группировок. К слову, люминол широко используется в качестве добавки для усиления интенсивности хемилюминесценции.

Хемилюминесценция, сопровождающая реакции перекисного окисления липидов, обусловлена диспропорционированием радикалов ROO^{\cdot} [27, 90]. В общем виде этот процесс можно описать следующим образом [90]:



Впервые механизм диспропорционирования пероксильных радикалов с образованием карбонильного соединения, спирта и молекулы кислорода был описан Г. Расселлом [101] и впоследствии назван его именем. Реакция (14) является реакцией обрыва цепи радикального окисления, в то время как реакция (10) – это реакция продолжения цепи. Г. Расселл определил среднее отношение скорости реакции (10) к скорости реакции (14), равное 7.4 для углеводородной модельной системы [101].

Реакция (14) – это реакция второго порядка. Следовательно, к ней можно применить общеизвестное математическое выражение:

$$\frac{1}{C} - \frac{1}{C_0} = k_{2e} t, \quad (15)$$

где t – время, прошедшее от начала реакции, C и C_0 – концентрации радикалов ROO^{\cdot} в момент времени t и в начале реакции соответственно. Однако М. Дол [102] указывает на то, что часть радикалов ROO^{\cdot} в системе может не вступать в реакцию диспропорционирования. Концентрацию этих радикалов обозначим буквой A . Тогда согласно [102], формула (15)

приобретает вид (для удобства восприятия представим выражение в двух видах):

$$\frac{t}{C_0 - C} = \frac{1}{(C_0 - A)^2 4\pi D r_0} + \frac{t}{C_0 - A} - \frac{1}{2\pi D (C_0 - A)^2 (2r_0 + \sqrt{\pi D t})}$$

$$\frac{t}{C_0 - C} = \frac{\sqrt{\pi D t} + 4\pi D r_0 t (C_0 - A) (2r_0 + \sqrt{\pi D t})}{4\pi D r_0 (C_0 - A)^2 (2r_0 + \sqrt{\pi D t})}, \quad (16)$$

где r_0 – расстояние между радикалами, в пределах которого они реагируют, D – сумма коэффициентов диффузии реагентов.

Высвечивание фотона происходит при переходе кетона, образовавшегося в ходе реакции (14) из триплетного ЭВС в основное:



При этом выделяется свет с максимумом интенсивности в области 450–550 нм [103].

Реакция (14) протекает через образование тетраоксида с последующим его распадом на спирт и бирадикал вследствие механического напряжения в скелете молекулы – это момент разделения электронов в молекуле. После этого происходит выделение молекулы кислорода и образуется кетон в триплетном ЭВС [27, 80]. Однако тетраоксид с высокой долей вероятности может вновь распасться на два липопероксильных радикала. В пользу этого говорит тот факт, что константа скорости диффузии этих радикалов на порядки выше, чем константа скорости реакции их диспропорционирования [27]. Графически механизм Расселла представлен на рис. 2А. Отметим, что образовавшийся кислород может находиться в синглетном ЭВС. Согласно [104], квантовый выход возбуждения молекулы O_2 в данном случае составляет $\approx 11\%$. При переходе кислорода в основное состояние наблюдается люминесценция с максимумом в области 634 и 703 нм [103, 105].

В силу крайне низких значений квантовых выходов образования возбужденных молекул кетона и их люминесценции (в данном случае фосфоресценции) общий квантовый выход хемилюминесценции составляет всего порядка 10^{-8} [80].

Связь между концентрацией липопероксильных радикалов и интенсивностью свечения J следует из уравнения [24, 40]:

$$J = Q_{\text{ChLum}} k_{2e} [\text{ROO}^{\cdot}]^2, \quad (18)$$

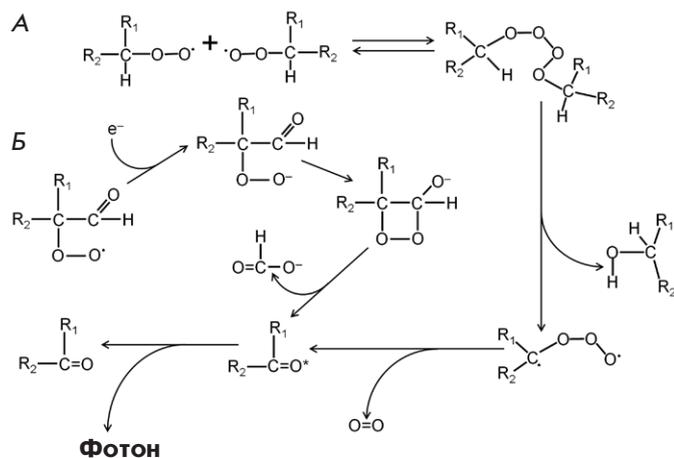


Рис. 2. Основные механизмы высвечивания фотонов в результате окисления липидов [80, 101, 103, 106]. А – реакция диспропорционирования пероксильных радикалов; Б – образование и распад диоксетановой группировки (на схеме – диоксетанон)

где J – общий световой поток при всех длинах волн и во всех направлениях; Q_{ChLum} – квантовый выход хемилюминесценции.

Помимо механизма Расселла, существует еще один путь образования карбонильных соединений в триплетном ЭВС – распад диоксетановой группировки [86], образовавшейся в ходе циклизации перекисной структуры. Графически этот процесс представлен на рис. 2Б.

Научным коллективом под руководством Е. Бечары исследованы механизмы реакций образования и распада диоксетановой структуры, результаты которого рассмотрены в [103]. Приведены данные о том, что кроме классического нерадикального распада диоксетановой структуры на два карбонильных соединения, одно из которых находится в триплетном возбужденном состоянии, а второе – в основном состоянии, вместо второго соединения образуется радикал, содержащий карбонил, а также липопероксид или липопероксильные радикалы. В обход механизма Расселла эти радикалы могут превратиться в липоксильный радикал $RO\cdot$, который может перейти в алкильный радикал и карбонильное соединение или радикал с оксетановой структурой, или же радикал, содержащий оксирановую структуру, которая быстро распадается, что ведет к образованию третичного радикала, связанного с алкоксильной группировкой [103]. В обзоре Г. Чиленто и В. Адама [106] приведены различные механизмы образования диоксетановых группировок с последующим их распадом с образованием возбужденного продукта. Помимо классической схемы, приведен механизм окисления

альдегида кислородом через образование диоксетановой структуры с последующим отрывом формиата и образованием возбужденного альдегида, на одну гомологическую разность короче изначального [106]. Описан также механизм образования возбужденного кетона при окислении и распаде диэтилстилбэстрола и другие похожие механизмы. Образование диоксетана возможно при окислении кислородом фенольного радикала, образовавшегося при взаимодействии фенола с липопероксильным радикалом. Эта реакция является частью механизма действия фенольных антиоксидантов [107]. Приведены и иные варианты образования возбужденных продуктов [107], такие, как рекомбинация двух третичных α -радикалов спиртов, образование возбужденных продуктов при «склеивании» радикалов свободными валентностями, образование возбужденного кетона при дегидратации углеводородного гидропероксида (сюда же можно отнести и липогидропероксиды) и т.д.

Но вернемся к процессам перекисаации липидов. Скорость перекисидного окисления – это скорость образования продуктов окисления липогидропероксидов в реакции (10) с константой скорости k_{2b} , поэтому:

$$\begin{aligned} \frac{d[\text{ROOH}]}{dt} &= k_{2b} [\text{RH}][\text{ROO}\cdot] = \\ &= k_{2b} [\text{RH}] \sqrt{\frac{J}{Q_{\text{ChLum}} k_{2e}}} \end{aligned} \quad (19)$$

Следовательно, скорость перекисного окисления в определенной степени пропорциональна стационарной концентрации свободных радикалов в системе и связана с интенсивностью хемилюминесценции. Поэтому, регистрируя интенсивность хемилюминесценции, можно оценивать изменения во времени скорости перекисного окисления липидов – изучать кинетику этого процесса и его механизм [24].

Описанная связь между интенсивностью собственной хемилюминесценции, сопровождающей свободнорадикальное окисление липидов, и скоростью этого окисления подтверждена при изучении последовательных стадий хемилюминесценции модельных систем, содержащих липиды (липосомы и митохондрии), при добавлении в них солей, диссоциирующих с образованием катионов Fe^{2+} [108, 109]. Исследование кинетики такой хемилюминесценции вместе с определением уровня потребления кислорода, окисления Fe^{2+} до Fe^{3+} и математическим моделированием реакций [110] позволило расшифровать уравнения каскада реакций окисления липидов, определить константы скоростей основных его реакций, а также изучить влияние на него различных

антиоксидантов. Метод регистрации хемилюминесценции является удобным инструментом исследования перекисного окисления липидов. Данный метод широко применяли представители научной школы Р.Ф. Васильева [111–116], Ю.А. Владимирова [62, 117–119], А.И. Журавлева [31] и другие авторы [17, 30, 120–127].

В настоящее время актуальным вновь становится изучение кинетики перекисаации липидов, вызванной свободными ионами железа. Связано это с открытием в 2012 году еще одного способа запрограммированной гибели клетки – ферроптоза [61], некрозоподобной гибели клетки, обусловленной окислением митохондриальных структур, в первую очередь мембран, индуцированным ионами железа через реакцию Фентона [59, 83, 93].

При помощи регистрации собственной хемилюминесценции исследуют различные модельные биологические системы [29, 128, 129]. Хемилюминесценция тканей помимо перекисаации липидов обусловлена также синтезом NO, что показано группой под руководством Тьюренса на перфузируемом легком и на модельных системах [130, 131], а также взаимодействием пероксинитрита с белками [132], причем наибольший вклад в свечение вносит взаимодействие пероксинитрита с триптофаном, несколько меньший – с фенилаланином [131]. Метод регистрации собственной хемилюминесценции с успехом исполь-

зован при изучении перекисаации липидов в составе липопротеинов низкой плотности плазмы крови, стимулированной нейтрофилами [133].

Однако интенсивность собственной хемилюминесценции в абсолютном большинстве случаев крайне мала [29, 31, 134], что сильно усложняет ее регистрацию. К тому же зачастую необходимо исследовать конкретные радикалы, к примеру, реакции перекисаации липидов, т.е. оценить наличие в исследуемой системе именно липидных радикалов, но метод регистрации собственной хемилюминесценции абсолютно неспецифичен [29]. Поэтому в большинстве исследований приходится использовать специальные люминесцирующие добавки, усиливающие свечение за счет миграции на них энергии электронного возбуждения с молекул продуктов свободнорадикальных реакций с последующим высвечиванием фотонов с большим квантовым выходом, чем у этих продуктов. Такие вещества можно назвать усилителями, или активаторами хемилюминесценции, и о них речь пойдет в следующей части обзора. ●

Автор настоящего обзора благодарит Н.П. Лысенко, профессора кафедры радиобиологии и вирусологии имени академиков А.Д. Белова и В.Н. Сюрин ФГБОУ ВО МГАВМиБ – МВА имени К.И. Скрябина, за помощь в подготовке англоязычной версии статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Листов М.В., Мамыкин А.И., Рассадина А.А. // Вестник новых медицинских технологий. Электронное издание. 2017. Т. 2. С. 259–266.
- Листов М.В., Мамыкин А.И. // Вестник Российской военной медицинской академии. 2018. Т. 4. № 64. С. 117–122.
- Тропская Н.С., Кислякова Е.А., Вилкова И.Г., Кислицына О.С., Гурман Ю.В., Попова Т.С., Байматов В.Н. // Бюл. экп. биологии и медицины. 2020. Т. 169. № 3. С. 391–396.
- Miller G.W., Labut E.M., Lebold K.M., Floeter A., Tanguay R.L., Traber M.G. // J. Nutr. Biochem. 2012. V. 23(5). P. 478–486.
- Листов М.В., Мамыкин А.И. // Клин. патофизиология. 2014. Т. 3. С. 34–39.
- Liang X.G., Cheng J., Qin S., Shao L.X., Huang M.Z., Wang G., Han Y., Han F., Li X. // Chem. Commun. 2018. V. 54. № 85. P. 12010–12013.
- Владимиров Ю.А., Львова О.Ф. // Биофизика. 1964. № 9(4). С. 506–507.
- Владимиров Ю.А., Львова О.Ф., Черемисина З.П. // Биохимия. 1966. Т. 31(3). С. 507–514.
- Львова О.Ф., Владимир Ю.А. // Труды Мос. общества испытателей природы. 1966. Т. 16. С. 214–217.
- Maune B.C. // Brookhaven Symposia Biology. 1966. V. 19. P. 460–466.
- Тарусов Б.Н., Поливода А.И., Журавлев А.И. // Биофизика. 1961. Т. 6. № 4. С. 490–492.
- Байматов В.Н., Хромова Е.В., Рыбкова О.О. // Кролиководство и звероводство. 2016. № 6. С. 27–28.
- Hughes D.L., Richards R.S., Lexis L.A. // Luminescence: J. Biol. Chem. Luminescence. 2018. V. 33. № 4. P. 764–770.
- Ding L., Wu Y., Duan Y., Yu S., Yu F., Wang J., Tian Y., Gao Z., Wan Z., He L. // ACS Sensors. 2020. V. 5. № 2. P. 440–446.
- Jantan I., Harun N.H., Septama A.W., Murad S., Mesaik M.A. // J. Nat. Med. 2011. V. 65. № 2. P. 400–405.
- Каражаева М.И., Саксонова Е.О., Клебанов Г.И., Любичкий О.Б., Гурьева Н.В. // Вестник офтальмологии. 2004. Т. 120. № 4. С. 14–18.
- Krasowska A., Piasecki A., Murzyn A., Sigler K. // Folia Microbiol. 2007. V. 52. № 1. P. 45–51.
- Lynch D.V., Thompson J.E. // FEBS Lett. 1984. V. 173. № 1. P. 251–254.
- Wildhagen M., Albert M., Butenko M.A. // Meth. Mol. Biol. 2017. V. 1610. P. 287–295.
- Ромодин Л.А., Владимир Ю.А., Лысенко Н.П., Зарудная Е.Н. // Изв. Международной акад. аграрного образования. 2018. Т. 1. № 42. С. 112–117.
- Ромодин Л.А., Шангин С.В., Владимир Ю.А., Лысенко Н.П., Храмов А.П. // Изв. Международной акад. аграрного образования. 2018. Т. 1. № 42. С. 118–123.
- Jain R., Sharma D., Kumar R. // J. Biochem. 2019. V. 165. № 2. P. 125–137.
- Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В., Алексеев А.В. // Биохимия. 2013. Т. 78. № 10. С. 1391–1404.
- Phillips D., Anissimov V., Karpukhin O., Shlyapintokh V. //

- Photochem. Photobiol. 1969. V. 9. № 2. P. 183–187.
25. Wen W.Y., Johnson D.R., Dole M. // *Am. Chem. Soc.* 1974. V. 7. № 2. P. 199–204.
26. Vassil'ev R.F., Vichutinskii A.A. // *Nature*. 1962. V. 194. № 4835. P. 1276–1277.
27. Belyakov V.A., Vassil'ev R.F. // *Photochem. Photobiol.* 1970. V. 11. № 3. P. 179–192.
28. Владимиров Ю.А., Арчаков А.И. Перекисное окисление липидов в биологических мембранах. М.: Наука, 1972. 252 с.
29. Владимиров Ю.А., Проскурнина Е.В. // *Успехи биол. химии*. 2009. Т. 49. С. 341–388.
30. Байматов В.Н., Багаутдинов А.М., Байматов Н.В. Механизмы коррекции свободнорадикального окисления антиоксидантами. Уфа: РИЦ БашГАУ, 2008. 312 с.
31. Журавлев А.И., Зубкова С.М. Антиоксиданты. Свободнорадикальная патология, старение. М.: Белые альфы, 2014. 304 с.
32. Lepeschkin W.W. // *Science*. 1932. V. 76. № 1975. P. 409.
33. Lepeschkin W.W. // *Science*. 1932. V. 76. № 1964. P. 168.
34. Гурвич А.Г. Митогенетическое излучение. М.: Госмедиздат, 1934.
35. Boveris A., Cadenas E., Chance B. // *Fed. Proc.* 1981. V. 40. № 2. P. 195–198.
36. Colli L., Facchini U. // *Nuovo Cimento*. 1954. V. 12. № 1. P. 150–153.
37. Allen R.C., Stjernholm R.L., Steele R.H. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1972. V. 47. № 4. P. 679–684.
38. Stjernholm R.L., Allen R.C., Steele R.H., Waring W.W., Harris J.A. // *Infection Immunity*. 1973. V. 7. № 2. P. 313–314.
39. Vassil'ev R.F. // *Nature*. 1962. V. 196. № 4855. P. 668–669.
40. Шляпинтох В.Я., Карпунин О.Н., Постников Л.М., Захаров И.В., Вичутинский А.А., Цепалов В.Ф. Хемилюминесцентные методы исследования медленных химических процессов. Москва: Наука, 1966. 300 с.
41. Gomberg M. // *J. Chem. Edu.* 1932. V. 9. № 3. P. 439–451.
42. Gomberg M. // *J. Am. Chem. Soc.* 1903. V. 25. № 12. P. 1274–1277.
43. Gomberg M. // *J. Am. Chem. Soc.* 1901. V. 23. № 7. P. 496–502.
44. Fischer V., Mason R.P. // *J. Biol. Chem.* 1984. V. 259. № 16. P. 10284–10288.
45. Fischer V., West P.R., Harman L.S., Mason R.P. // *Envi. Hlth Persp.* 1985. V. 64. P. 127–137.
46. Michaelis L. // *Am. Sci.* 1946. V. 34. № 4. P. 573–596.
47. Michaelis L., Schubert M.P., Smythe C.V. // *Science*. 1936. V. 84. № 2171. P. 138–139.
48. Granick S., Michaelis L., Schubert M.P. // *Science*. 1939. V. 90. № 2340. P. 422–423.
49. Дизрегуляторная патология: Руководство для врачей и биологов. М.: Медицина, 2002. С. 140–151.
50. Babior V.M. // *Adv. Enzymol. Related Areas Mol. Biol.* 1992. V. 65. P. 49–95.
51. Babior V.M. // *J. Clin. Invest.* 1984. T. 73. № 3. С. 599–601.
52. Листов М.В., Мамыкин А.И. // *Клин. патофизиология*. 2015. № 2. С. 54–58.
53. Владимиров Ю.А. // *Вестн. Рос. акад. мед. наук*. 1998. № 7. С. 43–51.
54. Лобачев В.Л., Рудаков Е.С. // *Успехи химии*. 2006. Т. 75. № 5. С. 422–444.
55. Узбеков М.Г. // *Социальная клиническая психиатрия*. 2014. Т. 24. № 4. С. 97–103.
56. Benhar M. // *Free Rad. Biol. Med.* 2018. V. 127. P. 160–164.
57. Панасенко О.М., Горудко И.В., Соколов А.В. // *Успехи биол. химии*. 2013. Т. 53. С. 195–244.
58. Kagan V.E., Tyurin V.A., Jiang J., Tyurina Y.Y., Ritov V.B., Amoscato A.A., Osipov A.N., Belikova N.A., Kapralov A.A., Kini V.V., et al. // *Nat. Chem. Biol.* 2005. V. 1. P. 223–232.
59. Chen G., Guo G., Zhou X., Chen H. // *Oncol. Lett.* 2020. V. 19. № 1. P. 579–587.
60. Lei G., Zhang Y., Koppula P., Liu X., Zhang J., Lin S.H., Ajani J.A., Xiao Q., Liao Z., Wang H., et al. // *Cell Res.* 2020. V. 30. P. 146–162.
61. Dixon S.J., Lemberg K.M., Lamprecht M.R., Skouta R., Zaitsev E.M., Gleason C.E., Patel D.N., Bauer A.J., Cantley A.M., Yang W.S., et al. // *Cell*. 2012. V. 149. № 5. P. 1060–1072.
62. Демин Е.М., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. // *Вестн. Моск. ун-та. Сер. 2: Химия*. 2008. Т. 49. № 5. С. 354–360.
63. Capdevila D.A., Oviedo Rouco S., Tomasina F., Tortora V., Demicheli V., Radi R., Murgida D.H. // *Biochemistry*. 2015. V. 54. № 51. P. 7491–7504.
64. Kobayashi H., Nagao S., Hirota S. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2016. V. 55. № 45. P. 14019–14022.
65. Singh H., Pritchard E.T. // *Can. J. Biochem. Physiol.* 1962. V. 40. P. 317–318.
66. Ruottinen M., Kuosmanen V., Saimanen I., Kaaronen V., Rahkola D., Holopainen A., Selander T., Kokki H., Kokki M., Eskelinen M. // *Anticancer Res.* 2020. V. 40. № 1. P. 253–259.
67. Бельская Л.В., Косенок В.К., Массард Ж., Завьялов А.А. // *Вестн. РАМН*. 2016. Т. 71(4). С. 313–322.
68. Login C.C., Baldea I., Tipericiu B., Benedec D., Vodnar D.C., Decea N., Suciuc S. // *Oxidative Med. Cell. Long.* 2019. V. 2019. P. 1607903.
69. Тарасов С.С., Корякин А.С. // *Вестн. Перм. ун-та. Сер.: Биология*. 2016. Вып. 3. С. 292–296.
70. Shaw S., Rubin K.P., Lieber C.S. // *Digestive Dis. Sci.* 1983. V. 28. № 7. P. 585–589.
71. Меньщикова Е.Б., Зенков Н.К., Ланкин В.З. Окислительный стресс. Патологические состояния и заболевания. Новосибирск: АРТА, 2008. 284 с.
72. Cole T., Heller C., McConnell H.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1959. V. 45. № 4. P. 525–528.
73. Hole E.O., Sagstuen E., Nelson W.H., Close D.M. // *Radiation Res.* 2000. V. 153. № 6. P. 823–834.
74. Chiesa M., Giamello E., Livraghi S., Paganini M.C., Polliotto V., Salvadori E. // *J. Physics. Condensed Matter: an Institute of Physics journal*. 2019. T. 31. № 44. С. 444001.
75. Сапезинский И.И., Эмануэль Н.М. // *ДАН СССР*. 1965. Т. 165. № 4. С. 845–847.
76. Осипов А.Н., Савов В.М., Яхъяев А.В., Зубарев В.Е., Азизова О.А., Каган В.Е., Владимиров Ю.А. // *Биофизика*. 1984. № 29(4). С. 533–536.
77. Азизова О.А., Осипов А.Н., Савов В.М., Яхъяев А.В., Зубарев В.Е., Каган В.Е., Владимиров Ю.А. // *Биофизика*. 1985. № 30(1). С. 36–39.
78. Gazarian I.G., Lagrimini L.M., Mellon F.A., Naldrett M.J., Ashby G.A., Thorneley R.N. // *Biochem. J.* 1998. V. 333(Pt 1). P. 223–232.
79. Shliapintokh V.J., Vasil'ev R.F., Karpukhine O.N., Postnikov L.M., Kibalko L.A. // *J. Chim. Phys.* 1960. V. 57. P. 1113–1122.
80. Vassil'ev R.F. // *Progress Reaction Kinetics*. 1967. V. 4. P. 305–352.
81. Владимиров Ю.А. Сверхслабые свечения при биохимических реакциях. Москва: Наука, 1966. 126 с.
82. Маргулис Г.В. // *Сверхслабые свечения в биологии / Под редакцией Журавлева А.И. М.: Наука. 1972. С. 72–75.*
83. Proneth B., Conrad M. // *Cell Death Differ.* 2019. V. 26. № 1. P. 14–24.
84. Aspee A., Lissi E.A. // *J. Protein Chem.* 2001. V. 20. № 6. P. 479–485.
85. Aspee A., Lissi E.A. // *Luminescence: J. Biol. Chem. Luminescence*. 2000. V. 15. № 5. P. 273–282.

86. Lissi E.A., Caceres T., Videla L.A. // *Free Rad. Biol. Med.* 1988. V. 4. № 2. P. 93–97.
87. Новиков В.В., Пономарев В.О., Новиков Г.В., Кувичкин В.В., Яблокова Е.В., Фесенко Е.Е. // *Биофизика*. 2010. Т. 55. № 4. С. 631–639.
88. Текуцкая Е.Е., Барышев М.Г., Ильченко Г.П. // *Биофизика*. 2015. Т. 60. № 6. С. 1099–1103.
89. Gnaïm S., Shabat D. // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. V. 139. № 29. P. 10002–10008.
90. Belyakov V.A., Vasil'ev R.F. // *Photochem. Photobiol.* 1967. V. 6. № 1. P. 35–40.
91. Melville H.W., Richards S. // *J. Chem. Soc.* 1954. P. 944–952.
92. Викулина А.С., Алексеев А.В., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. // *Биохимия*. 2015. Т. 80. № 10. С. 1573–1578.
93. Yang W.S., Stockwell B.R. // *Trends Cell Biol.* 2016. V. 26. № 3. P. 165–176.
94. Vladimirov Y.A., Olenov V.I., Suslova T.B., Cheremisina Z.P. // *Adv. Lipid Res.* 1980. V. 17. P. 173–249.
95. Семенов Н.Н. // *Успехи химии*. 1976. Т. 36. № 1. С. 3–33.
96. Семенов Н.Н. // *Успехи физ. наук*. 1931. Т. 11. № 2. С. 250–275.
97. Pringsheim P. *Fluorescence and Phosphorescence*. New York and London: Intersci. Publ. 1949. 794 p.
98. Конев С.В. *Электронно-возбужденные состояния биополимеров*. Минск: Наука и техника, 1965. 186 с.
99. De Oliveira S., De Souza G.A., Eckert C.R., Silva T.A., Sobral E.S., Fávero O.A., Ferreira M.J.P., Romoff P., Baader W.J. // *Química Nova*. 2014. V. 37. № 3. P. 497–503.
100. Bastos E.L., Romoff P., Eckert C.R., Baader W.J. // *J. Agricult. Food Chem.* 2003. V. 51. № 25. P. 7481–7488.
101. Russell G.A. // *J. Am. Chem. Soc.* 1957. V. 79(14). P. 3871–3877.
102. Dole M. // *J. Phys. Chem.* 1987. V. 91. № 12. P. 3117–3119.
103. Timmins G.S., Dos Santos R.E., Whitwood A.C., Catalani L.H., Di Mascio P., Gilbert B.C., Bechara E.J. // *Chem. Res. Toxicol.* 1997. V. 10. № 10. P. 1090–1096.
104. Niu Q., Mendenhall G.D. // *J. Am. Chem. Soc.* 1990. V. 112. № 4. P. 1656–1657.
105. Cadenas E. // *Annu. Rev. Biochem.* 1989. V. 58. P. 79–110.
106. Cilento G., Adam W. // *Free Rad. Biol. Med.* 1995. V. 19. № 1. P. 103–114.
107. Vasil'ev R.F., Trofimov A.V. // *Kinetics Catalysis*. 2009. V. 50. № 4. P. 540–542.
108. Sharov V.S., Driomina E.S., Vladimirov Y.A. // *J. Bolum. Chemilum.* 1996. V. 11. № 2. P. 91–98.
109. Владимиров Ю.А., Сулова Т.Б., Оленев В.И. // *Биофизика*. 1969. Т. 14. № 5. С. 836–845.
110. Владимиров Ю.А., Гутенев П.И., Кузнецов П.И. // *Биофизика*. 1973. Т. 18. № 6. С. 1024–1029.
111. Васильев Р.Ф., Вепринцев Т.Л., Долматова Л.С., Наумов В.В., Трофимов А.В., Цаплев Ю.Б. // *Кинетика и катализ*. 2014. Т. 55. № 2. С. 157–162.
112. Васильев Р.Ф., Кънчева В.Д., Федорова Г.Ф., Бътовска Д.И., Трофимов А.В. // *Кинетика и катализ*. 2010. Т. 51. № 4. С. 533–541.
113. Fedorova G.F., Menshov V.A., Trofimov A.V., Vasil'ev R.F. // *The Analyst*. 2009. V. 134. № 10. P. 2128–2134.
114. Slavova-Kazakova A.K., Angelova S.E., Vepreintsev T.L., Denev P., Fabbri D., Dettori M.A., Kratchanova M., Naumov V.V., Trofimov A.V., Vasil'ev R.F., et al. // *Beilstein J. Organic Chem.* 2015. V. 11. P. 1398–1411.
115. Fedorova G.F., Menshov V.A., Trofimov A.V., Tsaplev Y.B., Vasil'ev R.F., Yablonskaya O.I. // *Photochem. Photobiol.* 2017. V. 93. № 2. P. 579–589.
116. Fedorova G.F., Lapina V.A., Menshov V.A., Naumov V.V., Trofimov A.V., Tsaplev Y.B., Vasil'ev R.F., Yablonskaya O.I. // *Photochem. Photobiol.* 2019. V. 95. № 3. P. 780–786.
117. Владимиров Ю.А., Сергеев П.В., Сейфулла Р.Д., Руднев Ю.Н. // *Молекуляр. биология*. 1973. Т. 7. № 2. С. 247–253.
118. Ли Х.И., Владимиров Ю.А., Деев А.И. // *Биофизика*. 1990. Т. 35. № 1. С. 82–85.
119. Рубене Д.Я., Шаров В.С., Оленев В.И., Тирзит Г.Д., Дубур Г.Я., Владимиров Ю.А. // *Журн. физ. химии*. 1981. Т. 55. № 2. С. 511–512.
120. Tsukagoshi K., Taniguchi T., Nakajima R. // *Anal. Chim. Acta*. 2007. V. 589. № 1. P. 66–70.
121. Saleh L., Plieth C. // *Nat. Protocols*. 2010. V. 5. № 10. P. 1627–1634.
122. Mcdermott G.P., Conlan X.A., Noonan L.K., Costin J.W., Mnatsakanyan M., Shalliker R.A., Barnett N.W., Francis P.S. // *Anal. Chim. Acta*. 2011. V. 684. № 1–2. P. 134–141.
123. Ginsburg I., Kohen R., Shalish M., Varon D., Shai E., Koren E. // *PLoS One*. 2013. V. 8. № 5. P. e63062.
124. Xie G.Y., Zhu Y., Shu P., Qin X.Y., Wu G., Wang Q., Qin M.J. // *J. Pharmaceut. Biomed. Analysis*. 2014. V. 98. P. 40–51.
125. Malejko J., Nalewajko-Sieliwoniuk E., Szabunko J., Nazaruk J. // *Phytochem. Analysis: PCA*. 2016. V. 27. № 5. P. 277–283.
126. Sun S., Xu S., Xu Y., Guo L., Liu H., Yang L., Wang Z. // *Anal. Chim. Acta*. 2019. V. 1046. P. 148–153.
127. Kishikawa N., El-Maghrabey M., Nagamune Y., Nagai K., Ohyama K., Kuroda N. // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. № 10. P. 6984–6992.
128. Волкова П.О., Алексеев А.В., Джатдоева А.А., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. // *Вест. МГУ. Сер. 2: Химия*. 2016. Т. 57. № 1. С. 41–52.
129. Vladimirov Yu.A., Proskurnina E.V., Izmajlov D.Yu. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2007. V. 144. № 3. P. 390–396.
130. Barnard M.L., Robertson B., Watts B.P., Turrens J.F. // *Am. J. Physiol.* 1997. V. 272. № 2. Pt 1. P. L262–L267.
131. Pollet E., Martinez J.A., Metha B., Watts B.P., Jr., Turrens J.F. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1998. V. 349. № 1. P. 74–80.
132. Watts B.P., Jr., Barnard M., Turrens J.F. // *Arch. Biochem. Biophys.* 1995. V. 317. № 2. P. 324–330.
133. Vladimirov Yu.A., Ribarov S.R., Bochev P.G., Benov L.C., Klebanov G.I. // *Gen. Physiol. Biophys.* 1990. V. 9. № 1. P. 45–54.
134. Викулина А.С., Джатдоева А.А., Лобиченко Е.Н., Проскурнина Е.В., Владимиров Ю.А. // *Журн. аналит. химии*. 2017. Т. 72. № 7. С. 639–644.

Inactivating Gene Expression with Antisense Modified Oligonucleotides

Sidney Altman^{1*}, Carlos Angele-Martinez²

¹Yale University New Haven CT USA, Arizona State University, Tempe AZ USA

²Yale University New Haven CT USA

*E-mail: sidney.altman@yale.edu

Received March 11, 2021; in final form, September 21, 2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11522

ABSTRACT Modified nucleotides, including phosphoramidates and mesyl nucleotides, are very effective in inactivating gene expression in bacteria. *Gyr A* is the target gene in several organisms, including *Plasmodium falciparum*. Antisense reactions with bacteria infecting citrus plants are promising but incomplete. Human tissue culture cells assayed with a different target are also susceptible to the presence of mesyl oligonucleotides.

KEYWORDS modified nucleotides, gene expression, bacteria, *Plasmodium falciparum*, citrus plants.

INTRODUCTION

Over several years, the research focused on RNase P has been relying on standard oligonucleotides A, C, U, G in RNA (Fig. 1). That was sufficient to probe both the function and structure of the enzyme in bacteria [1–5]. However, once the focus switched to the study of the suppression of the activity of various genes, the advent of phosphoramidates (PMs; [6, 7]; see Fig. 2) and 2'OMe nucleotides, which have the advantage of being characterized by a higher membrane permeability and nuclease resistance compared to those of standard oligonucleotides, has led to a spate of attempts using modified oligonucleotides (MOs) as antisense oligonucleotides to turn gene expression off.

Various permutations of MOs (i.e., using different modified oligos at various positions in the antisense

molecules) proved unsuccessful in gene inactivation studies. Fully modified MOs were nonspecifically lethal in living cells. When using modified oligonucleotides, the application of RNase P and a particular MO to target gene expression has the potential to kill the bacteria being studied (*gyr A*, the ultimate target; [8]) in lethal gene suppression studies. In the present report, critical metabolism functions were not extensively studied.

The target chosen was the essential gene *gyr A* [8], the aspecific target gene sequence in the gene being almost invariant in several bacteria (Table 1). An MO with a 5' peptide attached (Fig. 2) was used to test most of the bacteria with the *gyr A* target. This oligonucleotide facilitated the import of MOs in bacteria.

RNase P will cleave any oligonucleotide containing the 3'CCA sequence and at least one extra nucleotide

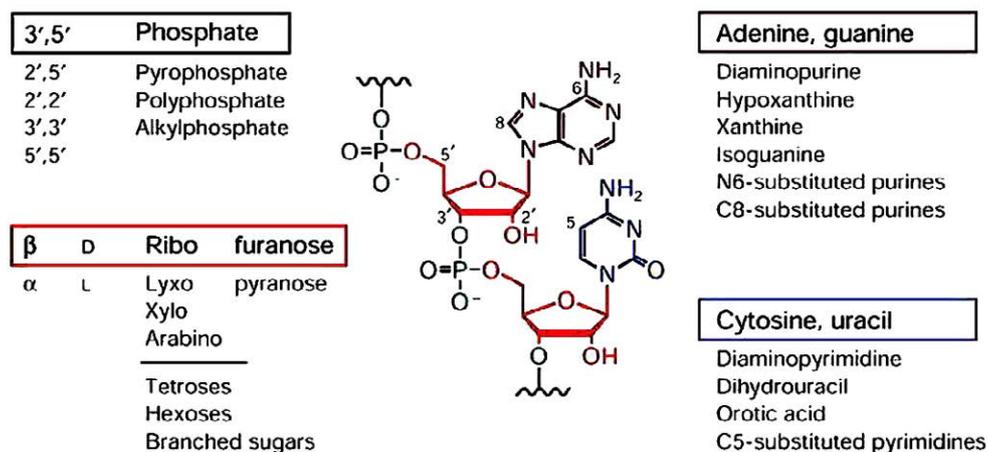


Fig. 1. Schematic portrayal of the standard ribonucleotides with substitutes in different positions

Table 1. The sequences of parts of the *gyr A* gene that are complementary to the *E. coli gyr A* gene listed above. Note the mismatches in Watson–Crick (W-C) base pairing. The mismatches are shown in red. *Gyr 313-14* is simply the name of one of the preparations

Alignment of GyrA 313 bacterial sequences

Gyr 313-14:	ACCCTGACCGACCA	
<i>Escherichia coli</i>	CGGTCAGGGT	
<i>Acinetobacter ADP1</i>	CGGTCAGGGC	
<i>Acinetobacter baumannii</i>	TGGTCAGGGT	
<i>Bacillus subtilis</i>	CGGTCAGGGA	
<i>Clostridium difficile</i>	TGGTCATGGT	
<i>Enterobacter cloacae</i>	TGGCCAGGGT	
<i>Enterococcus faecalis</i>	CGGCCACGGA	
<i>Klebsiella pneumonia</i>	CGGCCAGGGT	
<i>Mycobacterium marinorum</i>	CGGTCAGGGC	
<i>Mycobacterium smegmatis</i>	CGGCCAGGGC	
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	CGGCCAGGGC	
<i>Pseudomonas syringae</i>	CGGTCAGGGC	
<i>Salmonella enterica ssp. typhimurium</i>	TGGTCAGGGT	
<i>Staphylococcus aureus</i>	TGGCCAAGGT	
<i>Streptococcus pneumoniae</i>	TGGTCATGGG	
<i>Listeria monocytogenes</i>	TGGACATGGT	
<i>Xylella fastidiosa</i>	GGGTCAGGT	
<i>Candidatus Liberibacter asiaticus</i>	AGGACAAGGA	

at its 5' end adjacent to the double-stranded region (For details please refer to Fig. 3) [9]. The initial experiments to suppress the activity of the genes that provide drug resistance (penicillin, chloramphenicol) used the known properties of RNase P (Table 2, [10–12]). The success of the new methodology is apparent: under the conditions used by us, *Streptococcus* and *Staphylococcus* were inhibited only to a level of 10⁻² after 6 h of incubation at 37°C. Two major pathogens, *Yersinia pestis* and *Francisellatularensis*, assayed using MOs in a slightly different way, were also inhibited to

Structure of P7-PMO

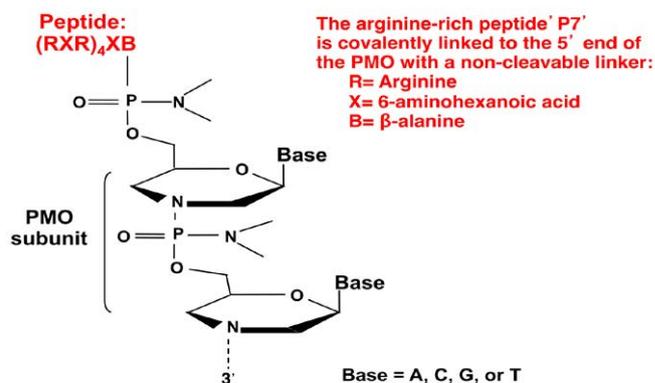


Fig. 2. The portrayal of a phosphoramidate with a basic peptide attached to the 5' end. Courtesy of Sarepta

a level of 40–50% [13, 14], but *gyr A* was not the target in the two cases, and these experiments were never pursued. The new methodology and the *gyr A* target can be employed to ensure a much lower survival rate under the conditions used.

Table 1 lists several sequences in bacteria that are complements to the *E. coli gyr A* sequence as a target. It is noteworthy that there are several W-C mismatches in some bacteria, but at the most three proved successful in the experiments that were performed. The viability of bacteria infected with an appropriate MO decreased from 3 to 6 orders of magnitude after the incubation with the MO at 37°C for 6 h (Table 2; Figs. 2 and 4). Several bacteria responsible for acute human infections (*Streptococcus* and *Staphylococcus*) can be inactivated in the way noted above. A MO with an attached peptide facilitated the penetration of MO into bacteria, as

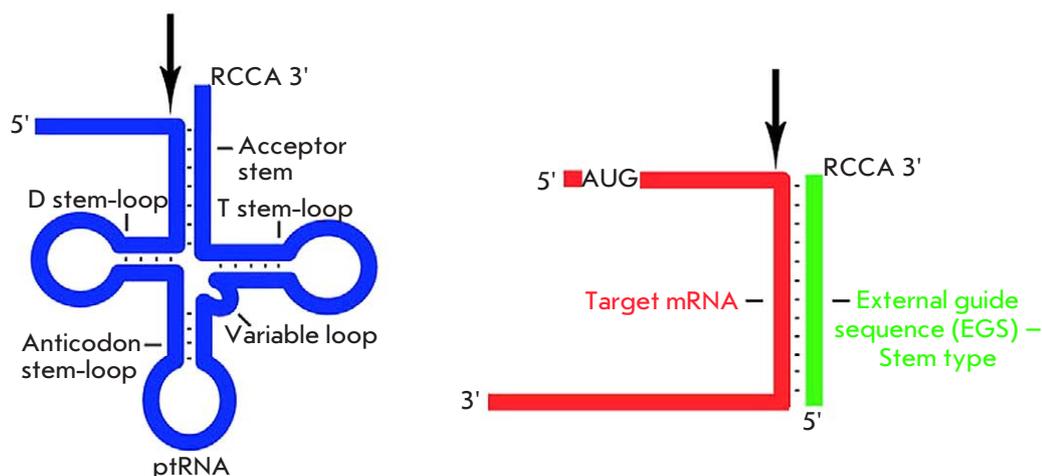


Fig. 3. (Left) Schematic portrayal of a tRNA precursor with the arrow indicating the site of cleavage by RNase P (Right). Portrayal of a minimal substrate for RNase P

Table 2. Inactivation of various genes using the antisense technology*

Inhibition of gene expression by appropriate conjugate

Gene	Organism
<i>gyrA</i>	Gram negative and Gram positive bacteria
<i>bla</i> (ampicillin)	<i>E. coli</i>
Cm (chloramphenicol)	"
<i>gyrA</i>	<i>P. falciparum</i>
DXR	"
Chloroquine resist.	"
Artemisinin clear.	"

*Bacteria and *P. falciparum* were exposed to an antisense molecule (~ 5 µg/ml) at 37°C for 6 hrs. Please see the text for the details.

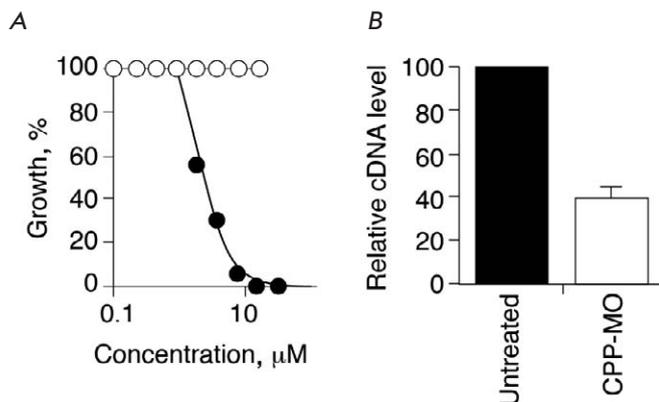


Fig. 4. Survival of *P. falciparum* in red blood cells after treatment with an antisense oligonucleotide

shown in Table 2 [15, 16] and Fig. 4. Subsequently, the *in vitro* inactivation of *P. falciparum* in red blood cells was tested again, with targeting of the *gyr A* gene of this organism [17, 18]. These experiments have been successful (Figs. 5 and 6). Note that the development of the *P. falciparum* is clearly inhibited (50%) at a MO concentration of 0.5 µg/ml (Fig. 6). The MO used was effective against *P. falciparum* cells, being resistant to different drugs (artemisinin, etc.), as well as against the normal parasite. The prospect of using the MO as an anti-malarial therapy remains to be explored.

The general method failed to work in one experiment in mice where the amount of MO was inadequate and no lipofectamine was used to aid cell penetration of the MO and additionally there was no taking into consideration the cost of MO synthesis and the enzymatic subunit of *Escherichia coli*, RNase P. Research then

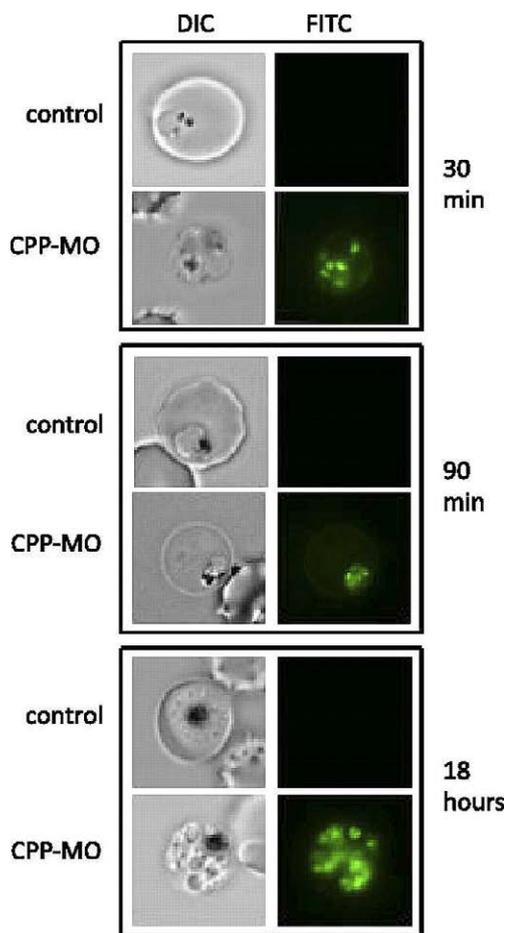


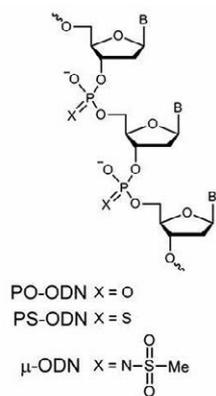
Fig. 5. Development of *P. falciparum* in red blood cells after treatment with an antisense oligonucleotide. Fluorescence microscopy images are shown on the right-hand side of the figure. No lysis of red blood cells by the fluorescent dye occurred

subsequently shifted to bacterial infection in plants (e.g., inactivation of citrus plants by infecting bacteria).

The citrus industry in the U.S. has suffered devastating losses from infection by the insect *Diaphorinacitri* carrying a bacteria that renders saplings and trees unable to produce fruit [19]. Table 1 shows the sequence of the complement of the *Wolbachia gyrA* gene. Several *Wolbachia* species can infect citrus saplings. RNase P can be isolated from *D. melanogaster* S2 cells *in vitro* to indicate the ability of similar flies to produce the enzyme. It would cleave tRNA precursors and M1 RNA in separate experiments. To show cleavage of the *gyr A* sequence, the *Wolbachia* sequence (Table 1), the MO, and the *gyr* RNA were exposed to M1 RNA, as well as to the purified *E. coli* RNase P. Preliminary analysis of the M1 RNA MO reactions with *gyrA* RNA, with low levels of radioactivity, indicated that some successful

Fig. 6. Schematic portrayal of an oligonucleotide with substitutions indicated, including the mesyl group

Structure of PO-ODNs, PS-ODNs, and μ -ODNs used in the study.



cleavage took place. These experiments must be repeated, along with the reactions with the *Wolbachia gyr A* sequence, which has only three mismatches with *E. coli gyr A*. If these reactions succeed, confirming the lethality of *Wolbachia in vitro*, a method of administration to hundreds or thousands of saplings must still be developed.

The *C. liberibacterasiaticus*, another factor in infecting saplings, has four mismatches in its *gyr A* gene compared to the one in *E. coli* (Table 1), an indication that complementarity would not be a valid counterpart in our experiments using MOs (Table 1).

Stetsenko et al. have recently synthesized a new modified oligonucleotide named mesyl MO (Fig. 6 [20]) that is DNA-based and is more effective in inactivating gene expression. Its lethality characteristics are increased in comparison with previously designed modified oligos. RNase H attacks the DNA-miR21 hybrid. This new MO is much less successful in aiding cells separated by a scratch test to migrate during wound healing than cells transfected with other MO oligos (Fig. 7). This method of synthesizing mMO should be tested for inactivating the expression of the various genes mentioned in this paper. The new mesyl oligo is much more resistant to nonspecific nuclease degradation than other oligos and is 22 nts long, making it unique in human cells. A lipofectamine-driven encapsulation provides entry of this oligonucleotide into the cells in tissue culture. The targets listed in Fig. 7 include miR21, specific to the new MO, and other non-specific targets. At zero time, all the samples showed intact colonies.

During the past few years, antisense oligonucleotides have been used to inhibit the function of various molecules in tissue culture cells. The prospect for designing new antibiotics has not been quite as bright as was promised by the industry, but some results have been achieved with derivatives of aminoglycosides and a few other molecules. Derivatives of hammerhead ri-

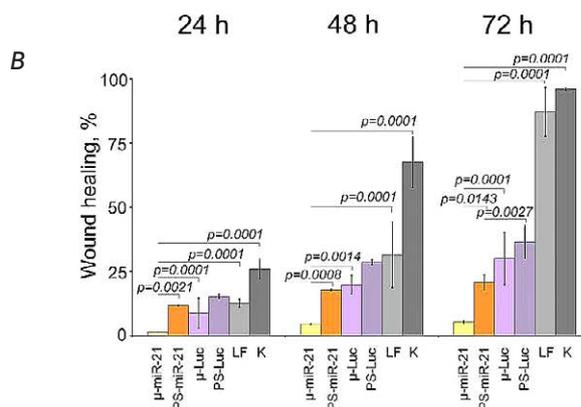
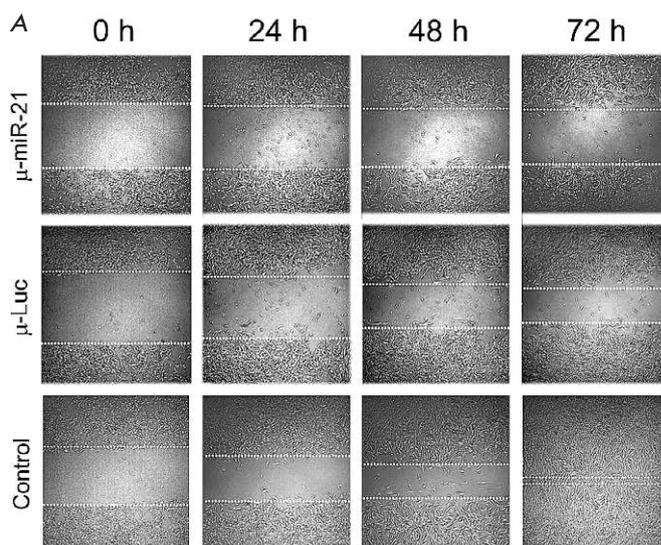


Fig. 7. The kinetics of wound healing with different mesyloligonucleotides. Zero time points were identical or corresponded to whole colonies. A. The image of the colonies at different time points. B. The kinetics of wound healing. K is the control. Other non-specific targets are also indicated

bozymes are still being studied as potential mechanisms of gene inactivation. The design of small pieces of RNA with distinct three-dimensional structures as gene inactivation inhibitors is in progress. Antisense has also been used to alter splicing reactions. In one case, antisense molecules have been productively used as therapy in cases of Duchenne muscular dystrophy [6]. The future of antisense molecules, modified or otherwise, appears bright. ●

We thank Professors A. Gabibov and A. Belogurov Jr. for their encouragement, Prof. A. Forster for comments, and our esteemed colleagues at Yale for their valuable advice and work.

REFERENCES

1. Stark B.C., Kole R., Bowman E.J., Altman S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1978. V. 75. P. 3717–3721.
2. Guerrier-Takada C., Gardiner K., Marsh T., Pace N., Altman S. // *Cell*. 1983. V. 35. P. 849–857.
3. Lan P., Tan M., Zhang Y., Niu S., Chen J., Shi S., Qui S., Wang X., Peng X., Cai G., et al. // *Science*. 2018. V. 362. № 6415. P. eaat6678.
4. Wu J., Niu S., Tan M., Huang C., Li M., Song Y., Wang Q., Chen J., Shi S., Lan P., et al. // *Cell*. 2018. V. 175. P. 1393–1404.
5. Wan F., Wang Q., Tan J., Tan M., Chen J., Shi S., Lan P., Wu J., Lei M. // *Nat. Comm.* 2019. V. 10. P. 2617.
6. Kole R., Krainer A.R., Altman S. // *Nature Drug Discovery*. 2012. V. 11. P. 125–140.
7. Gait M.J., Arzumanov A.A., McClorey G., Godfrey C., Betts C., Hammond S., Wood M.J.A. // *Nucl. Acid Ther.* 2019. V. 29. P. 1–12.
8. Swanberg S.L., Wang J.C. // *J. Mol. Biol.* 1987. V. 197. P. 729–736.
9. Thomas B.C., Li X., Gegenheimer P. // *RNA*. 2000. V. 6. № 4. P. 545–553.
10. Panchal R.G., Geller B.L., Mellbye B., Lane D., Iversen P.L., Bavari S. // *Nucl. Acid Ther.* 2012. V. 22. № 5. P. 316–322.
11. Altman S. *Ribonuclease P*. New York: Springer Science, 2010. 280 p.
12. Wesolowski D., Tae H.S., Gandotra N., Llopis P., Shen N., Altman S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2011. V. 108. P. 16582–16587.
13. Ko J.-H., Izadjoo M., Altman S. // *RNA*. 2008. V. 14. P. 1656–1662.
14. Xiao G., Lundblad E.W., Izadjoo M., Altman S. // *PLoS One*. 2008. V. 3. P. e3719–3725.
15. Shen N., Ko J.-H., Xiao G., Wesolowski D., Shan G., Geller B., Izadjoo M., Altman S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 8163–8168.
16. Wesolowski D., Alonso D., Altman S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. P. 8686–8689.
17. Augagneur Y., Wesolowski D., Tae H.-S., Altman S., Ben Mamoun C. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. P. 6235–6240.
18. Garg A., Wesolowski D., Alonso D., Deitsch K.W., Ben Mamoun C., Altman S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. P. 11935–11940.
19. Ren S.-L., Li Y.-H., Ou D., Guo Y.-J., Qureshi J.A., Stansly P.A., Qiu B.L. // *Microbiologyopen*. 2018. V. 7. P. e00561.
20. Miroshnichenko S.K., Patutina O.A., Burakova E.A., Chelobanov B.P., Fokina A.A., Vlassov V.V., Altman S., Zenkova M.A., Stetsenko D.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2019. V. 116. P. 1229–1234.

УДК 577.175.82

Провокационный тест с моноидтирозином на экспериментальной модели болезни Паркинсона

А. Р. Ким*, Е. Н. Павлова, В. Е. Блохин, В. В. Богданов, М. В. Угрюмов

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: alexandrrkim@gmail.com

Поступила в редакцию 09.04.2021

Принята к печати 03.06.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11399

РЕФЕРАТ Ранняя (доклиническая) диагностика болезни Паркинсона остается актуальной задачей современных нейронаук. С целью выявления скрытой функциональной недостаточности nigrostriатной системы разработан диагностический провокационный тест с использованием эндогенного ингибитора тирозингидроксилазы – моноидтирозина (МИТ). Показано, что МИТ в дозе 100 мг/кг через 2 ч после подкожного введения снижает уровень дофамина в стриатуме интактных мышей на 34%, при этом дальнейшее увеличение дозы не усиливает наблюдаемый эффект. Введение выбранной дозы МИТ вызвало симптомы моторных нарушений на нейротоксической модели доклинической стадии болезни Паркинсона у мышей, но не в контроле. Это связано с тем, что только на модели болезни Паркинсона у мышей воздействие МИТ привело к снижению уровня дофамина в стриатуме до порога проявления двигательных симптомов. Таким образом, на экспериментальной модели доклинической стадии болезни Паркинсона у мышей показана эффективность провокационного теста с МИТ для выявления скрытой функциональной недостаточности nigrostriатной системы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА болезнь Паркинсона, ранняя диагностика, провокационный тест, моноидтирозин, МФТП.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БП – болезнь Паркинсона; ВЭЖХ-ЭД – высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией; МИТ – моноидтирозин; МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; ТГ – тирозингидроксилаза; ЧС – черная субстанция.

ВВЕДЕНИЕ

В основе патогенеза болезни Паркинсона (БП) – распространенного нейродегенеративного заболевания, лежит деградация nigrostriатной системы мозга, осуществляющей регуляцию двигательной функции [1]. Для БП характерна продолжительная бессимптомная доклиническая стадия, на которой происходит активация механизмов, компенсирующих развивающуюся функциональную недостаточность nigrostriатной системы [2]. Только через 20–30 лет после начала заболевания при гибели более половины дофаминергических нейронов в черной субстанции (ЧС) и снижения уровня дофамина в стриатуме ниже порогового значения (20–30% от исходного уровня) у больного проявляются специфические моторные нарушения, позволяющие поставить диагноз [3].

В связи с этим актуальной становится разработка способа выявления скрытой нейродегенерации в nigrostriатной системе, который позволит поставить

диагноз БП задолго до перехода заболевания в необратимую клиническую стадию. Одним из наиболее перспективных подходов считается провокационный тест, суть которого заключается в кратковременном и обратимом ингибировании тирозингидроксилазы (ТГ), ключевого фермента синтеза дофамина [4]. Использование такого ингибитора в дозе, понижающей уровень дофамина в стриатуме на 30–40% от исходных значений, не вызовет нарушений моторики у здоровых людей. В свою очередь, на доклинической стадии БП уровень дофамина в стриатуме изначально снижен и дальнейшее его понижение под воздействием ингибитора приведет к достижению порога, при котором проявятся моторные симптомы, что позволит поставить диагноз [5].

В качестве такого провокационного агента мы использовали моноидтирозин (МИТ) – обратимый ингибитор ТГ, который присутствует в организме как промежуточный продукт синтеза тиреоидных

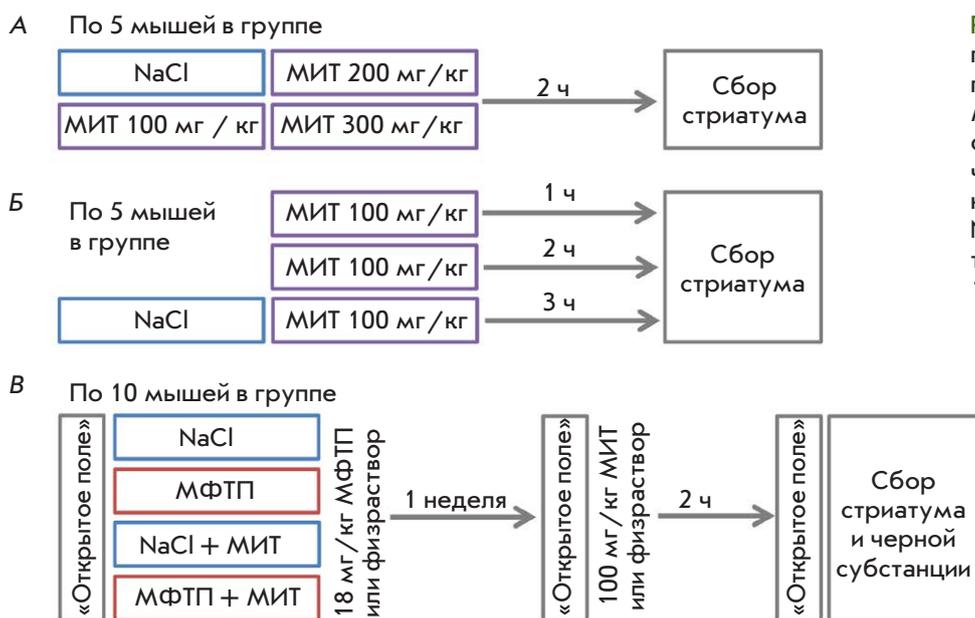


Рис. 1. Схемы экспериментов: подбор дозы МИТ (А), времени после его введения на интактных мышах (Б) и провокационный тест с МИТ на МФТП-модели доклинической стадии болезни Паркинсона (В). МИТ – моноидотирозин, NaCl – физиологический раствор, МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин

гормонов [6]. В отличие от синтетических ингибиторов, таких, как α -метил-*n*-тирозин, МИТ имеет эндогенное происхождение и подвергается быстрому метаболизму, что минимизирует время ингибирования синтеза дофамина и снижает риск побочных эффектов [7].

Цель нашей работы состояла в экспериментальной разработке провокационного теста с помощью МИТ для определения скрытой нейродегенерации на модели доклинической стадии БП у мышей. В качестве такой модели использовали созданную ранее в нашей лаборатории нейротоксическую модель доклинической стадии БП, основанную на дозированном системном введении мышам 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) – предшественника нейротоксина дофаминергических нейронов [8].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали 80 самцов мышей линии C57BL/6 в возрасте 2–2,5 месяца и массой 22–26 г (питомник «Столбовая»), которых содержали в стандартных условиях вивария со свободным доступом к пище и воде. Проведение экспериментов с животными одобрено этическим комитетом Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН (протокол № 43 от 19.11.2020 г.).

В ходе работы выполнено три эксперимента (рис. 1). В первом оценили влияние разных доз МИТ на уровень дофамина в стриатуме интактных мышей и выбрали оптимальную дозу для дальнейшего анализа (рис. 1А). Во втором эксперименте выбранную дозу МИТ (100 мг/кг) использовали для оценки фармакодинамики и определения оптимального временного интервала после введения, при котором наблю-

дается наиболее сильное снижение уровня дофамина в стриатуме интактных мышей (рис. 1Б). Третий эксперимент посвящен разработке провокационного теста с МИТ на нейротоксической МФТП-модели доклинической стадии БП у мышей (рис. 1В).

МИТ (здесь и далее, все реактивы – Sigma-Aldrich, США) вводили животным подкожно в указанных дозах, растворяя в физиологическом растворе (0,9% NaCl), содержащем также 5% аскорбиновой кислоты и 0,5% диметилсульфоксида. Контрольные группы получали аналогичный раствор без МИТ. Для моделирования БП на доклинической стадии мышам однократно подкожно вводили МФТП в дозе 18 мг/кг [8]. Контрольные группы получали физиологический раствор.

Двигательную активность мышей оценивали по параметрам пройденного пути и вертикальных стоек в поведенческом тесте «открытое поле». Мышей для адаптации переносили в помещение для тестирования поведения за 2 ч до начала теста. Тест «открытое поле» проводили с помощью автоматизированной поведенческой установки PhenoMaster (TSE Systems, Германия) в течение 6 мин. Параметры рассчитывали с использованием прилагаемого программного обеспечения.

Для сбора структур нигростриатной системы анестезированных изофлураном мышей декапитировали, дорсальный стриатум и ЧС выделяли из мозга согласно ранее описанной методике [8]. Пробы структур мозга взвешивали, замораживали в жидком азоте и хранили при -70°C . Концентрацию дофамина в пробах измеряли методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией согласно [9].

Данные представлены в виде среднего (в процентах от контроля) \pm стандартная ошибка среднего. Нормальность данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка. Статистический анализ результатов проводили с помощью однофакторного метода ANOVA, параметрического *t*-критерия Стьюдента или непараметрического критерия Манна–Уитни в программном пакете GraphPad Prism 6.0 (GraphPad Software, США). В качестве критерия значимости использовали $p \leq 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подбор эффективной дозы МИТ и времени после его введения

При подборе дозы МИТ установили, что максимальное снижение концентрации дофамина в стриатуме нормальных мышей (на 34% от уровня в контроле) обеспечивало уже использование 100 мг/кг МИТ (рис. 2А). Однако дальнейшее увеличение дозы МИТ – до 200 и 300 мг/кг – не привело к дальнейшему снижению уровня дофамина (рис. 2А), что указывает на насыщение ТГ ингибитором и отсутствие линейной зависимости МИТ в данном интервале доз. Поэтому для дальнейшей работы в качестве эффективной дозы МИТ выбрали 100 мг/кг.

При анализе временных интервалов установили, что через 1 ч после введения МИТ концентрация дофамина в стриатуме снижается на 22% по сравнению с контролем, через 2 ч – на 35%, а через 3 ч происходит полное восстановление уровня дофамина до контрольных значений (рис. 2Б). Эти результаты подтверждают кратковременность и обратимость ингибирующего действия МИТ на ТГ в стриатуме. Поэтому для разработки провокационного теста с МИТ выбрали временной интервал – 2 ч после введения ингибитора.

Интересно, что, как показано ранее, через 4 ч после введения α -метил-*n*-тирозин в аналогичной дозе (100 мг/кг) снижал уровень дофамина в стриатуме в несколько большей степени – на 40.2% [5]. При этом согласно *in vitro* оценкам, МИТ является более эффективным ингибитором ТГ по сравнению с α -метил-*n*-тирозином [10]. По-видимому, более быстрый метаболизм МИТ при применении его *in vivo* ограничивает его ингибирующее воздействие на ТГ.

Провокационный тест на экспериментальной модели доклинической стадии БП

Важным фактором при моделировании БП является точно установленный порог нейродегенерации, по достижении которого проявляются симптомы двигательных нарушений – это гибель 50–60% тел дофаминергических нейронов в ЧС, снижение числа

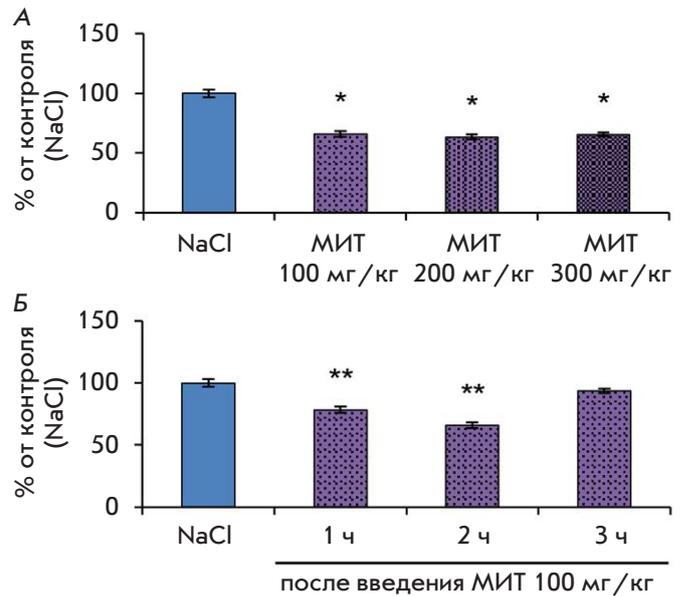


Рис. 2. Дофамин в стриатуме мышей через 2 ч после введения моноидо酪озина (МИТ) в различных дозах (А) и через различные сроки после введения 100 мг/кг МИТ (Б). * $p < 0.05$ относительно контроля (NaCl); ** $p < 0.05$ относительно контроля и других групп

их аксонов и концентрации дофамина в стриатуме на 70–80% по сравнению с контролем [8]. Поэтому в качестве ключевых параметров модели доклинической стадии БП мы выбрали отсутствие изменений двигательной активности животных в тесте «открытое поле» и уровня дофамина в ЧС, а также снижение уровня дофамина в стриатуме менее чем на 70%.

Пройденный путь и число вертикальных стоек в тесте «открытое поле» у мышей, получивших 18 мг/кг МФТП, перед введением МИТ (т.е. через 1 неделю после введения МФТП) не отличалось от значений в контроле (рис. 3А, Б). Кроме того, введение МФТП не повлияло на уровень дофамина в ЧС, но привело к снижению его уровня в стриатуме на 49% (рис. 3В), что меньше указанного порога, равного 70%. Таким образом, экспериментальная модель по ключевым параметрам соответствует характеристикам доклинической стадии БП.

Через 2 ч после подкожного введения 100 мг/кг МИТ у мышей, моделирующих доклиническую стадию БП, проявились нарушения двигательной активности: пройденный путь в тесте «открытое поле» сократился на 50% относительно контрольной группы (рис. 3А), наблюдалась тенденция к снижению вертикальных стоек на 39% (рис. 3Б). При этом ни у здоровых мышей, получавших МИТ, ни у МФТП-мышей, получавших физраствор, подобные изменения моторного поведения не обнаружены.

По-видимому, это объясняется тем, что под действием МИТ концентрация дофамина снизилась

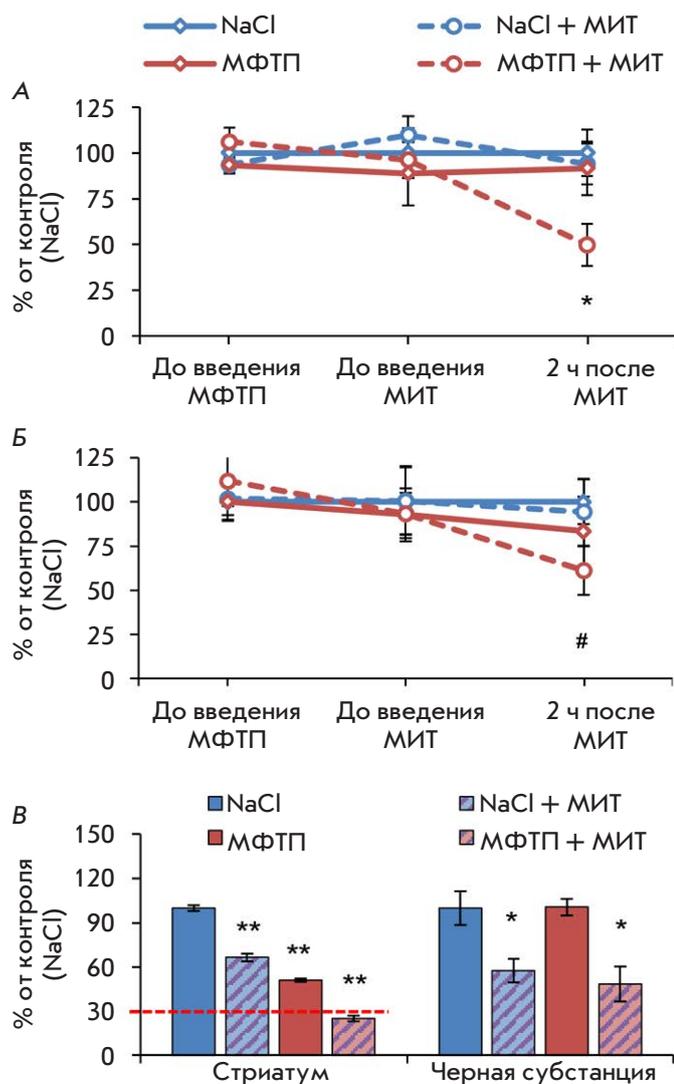


Рис. 3. Пройденный путь (А) и число вертикальных стоек (Б) в тесте «открытое поле» и уровень дофамина в стриатуме и черной субстанции (В) мышей, получавших МФТП или физраствор (NaCl), через 2 ч после введения 100 мг/кг МИТ. * $p < 0.05$ относительно контроля (NaCl); ** $p < 0.05$ относительно контроля и других групп; # $p < 0.15$ относительно контроля

на 75% от уровня в контроле (т.е. ниже порога возникновения моторных нарушений) только в стриатуме мышей на модели доклинической стадии БП (рис. 3В). Таким образом, введение МИТ в выбранной дозе спровоцировало проявление симптомов двигательных нарушений на модели доклинической стадии БП, т.е. у мышей со скрытой функциональной недостаточностью nigrostriatной системы.

Важно отметить, что применение системных ингибиторов ТГ относительно безопасно и давно используется в клинической практике. Другой такой ингибитор – α -метил-*n*-тирозин, применяется при лечении феохромоцитомы – доброкачественной опухоли надпочечников [4, 5]. Используемые при этом дозы препарата приводят к ингибированию синтеза дофамина на 35–80%, а длительность ежедневного приема варьирует от нескольких недель до нескольких лет [11], что указывает на отсутствие серьезных побочных эффектов даже при пролонгированном ингибировании ТГ. Тем не менее, опубликованы свидетельства потенциальной нейротоксичности МИТ [12], в связи с чем в дальнейшей работе необходимо уделить особое внимание анализу кратковременных и отдаленных последствий его действия на головной мозг и периферические органы.

Таким образом, на экспериментальной модели доклинической стадии БП у мышей показана эффективность провокационного теста с МИТ для выявления скрытой функциональной недостаточности nigrostriatной системы. В ходе работы подобраны оптимальные доза МИТ и время после его введения. Следующим этапом разработки метода ранней диагностики БП на основе провокационного теста с МИТ являются доклинические исследования фармакокинетики, токсикологических свойств и отдаленных последствий воздействия препарата. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ № 20-75-00034.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bernheimer H., Birkmayer W., Hornykiewicz O., Jellinger K., Seitelberger F. // J. Neurol. Sci. 1973. V. 20. P. 415–455.
- Bezard E., Gross C. // Prog. Neurobiol. 1998. V. 55. P. 93–116.
- Agid Y. // Lancet. 1991. V. 337. P. 1321–1324
- Ugrumov M. // CNS Neurosci. Ther. 2020. V. 26. P. 997–1009.
- Khakimova G.R., Kozina E.A., Kucheryanu V.G., Ugrumov M.V. // Mol. Neurobiol. 2017. V. 54. P. 3618–3632.
- Citterio C.E., Targovnik H.M., Arvan P. // Nat. Rev. Endocrinol. 2019. V. 15. P. 323–338.
- Tan S.A., Lewis J.E., Berk L.S., Wilcox R.B. // Clin. Physiol. Biochem. 1990. V. 8. P. 109–115.
- Ugrumov M.V., Khaindrava V.G., Kozina E.A., Kucheryanu

- V.G., Bocharov E.V., Kryzhanovsky G.N., Kudrin V.S., Narkevich V.B., Klodt P.M., Rayevsky K.S., Pronina T.S. // Neuroscience. 2011. V. 181. P. 175–188.
- Kim A.R., Nodel M.R., Pavlenko T.A., Chesnokova N.B., Yakhno N.N., Ugrumov M.V. // Acta Naturae. 2019. V. 11. № 4 (43). С. 99–103.
- Udenfriend S., Zaltzman-Nirenberg P., Nagatsu T. // Biochem. Pharmacol. 1965. V. 14. P. 837–845.
- Wachtel H., Kennedy E.H., Zaheer S., Bartlett E.K., Fishbein L., Roses R.E., Fraker D.L., Cohen D.L. // Ann. Surg. Oncol. 2015. V. 22. Suppl. 3. P. S646–654.
- Fernández-Espejo E., Bis-Humbert C. // Neurotoxicology. 2018. V. 67. P. 178–189.

УДК 612.822.56

Модель деградации дофаминергических аксонов nigrostriatной системы мышей для тестирования нейропротекторов

А. А. Колачева*, М. В. Угрюмов

Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: annakolacheva@gmail.com

Поступила в редакцию 20.04.2021

Принята к печати 14.07.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11433

РЕФЕРАТ Гибель дофаминергических нейронов nigrostriatной системы при болезни Паркинсона начинается с терминалей аксонов, ретроградно распространяясь к телам нейронов. Изучение динамики деградации терминалей аксонов позволит не только найти новые мишени для нейропротекторной терапии, но также может быть инструментом для тестирования потенциальных лекарственных средств. Нами показано, что скорость деградации терминалей дофаминергических аксонов в стриатуме не постоянна, а наиболее чувствительным к действию 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) параметром является концентрация дофамина в стриатуме. Эта модель валидирована с помощью нейропротекторов с известными механизмами действия: ингибитора мембранного переносчика дофамина – номифензина, и пептида СЕМАКС, который может стимулировать секрецию эндогенных нейротрофических факторов или действовать как антиоксидант. Показано, что введение номифензина почти полностью защищает дофаминергические волокна и сохраняет концентрацию дофамина в стриатуме на контрольном уровне. При этом небольшое, но достоверное увеличение концентрации дофамина обнаружено при использовании СЕМАКС в качестве индуктора секреции эндогенных нейротрофических факторов, но не в качестве антиоксиданта.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА болезнь Паркинсона, терминали аксонов, модели, тест-система, нейропротекторы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БП – болезнь Паркинсона; ВМАТ2 – везикулярный транспортер моноаминов типа 2; ДА – дофамин; ДАергический нейрон – дофаминергический нейрон; ДАТ – мембранный транспортер дофамина; ВЭЖХ с ЭД – высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией; ИГХ – иммуногистохимия; МФП+ – 1-метил-4-фенилпиридин; МФТП – 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридин; ТГ – тирозингидроксилаза.

ВВЕДЕНИЕ

Изучение молекулярных механизмов нейродегенерации и нейропластичности является ключом к пониманию механизмов нормального старения, которое сопровождается постоянной относительно медленной гибелью нейронов (4.5% за 10 лет), и патогенеза врожденных и хронических заболеваний нервной системы, в основе которых лежит ускоренная гибель нейронов [1]. Одно из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний – болезнь Паркинсона (БП), характеризуется нарушением двигательной функции в результате гибели дофаминергических (ДАергических) нейронов nigrostriatной системы. В настоящее время при БП применяется только симптоматическое лечение агонистами дофамина (ДА), которое не останавливает гибель нейронов, что приводит к быстрой инвалидизации пациентов. Попытки дополнительно использовать нейропротекторную терапию пока не привели

к успеху. Действительно, лекарственные средства с нейропротекторными свойствами, показавшие высокую эффективность на животных при моделировании паркинсонизма, не прошли клинических испытаний [2, 3]. Это связывают с критическим снижением числа ДАергических нейронов к моменту начала лечения [4]. С другой стороны, первоначальное тестирование нейропротекторов на моделях БП проводится без учета динамики дегенерации нейронов, когда тестируемый препарат вводится либо до индуцированной гибели ДАергических нейронов, либо после, стимулируя компенсаторные резервы мозга.

Ранее с помощью 1-метил-4-фенил-1,2,3,6-тетрагидропиридина (МФТП) мы разработали модель ранней клинической стадии БП у мышей, на которой исследовали период завершения гибели ДАергических нейронов и период развития компенсаторных процессов. Однако начальный период развития нейродегенерации не был затронут. Поэтому

целью данного исследования стала разработка модели деградации терминалей ДАергических нейронов в стриатуме с последующим тестированием потенциальных нейропротекторов. Комплексное исследование морфофункциональных параметров терминалей аксонов в начальный период времени после введения МФТП позволило определить параметры, наиболее чувствительные к действию нейротоксина.

На следующем этапе на разработанной нами тест-системе предполагалось протестировать два известных нейропротектора с разными механизмами действия: номифензин, ингибитор мембранного транспортера ДА, с помощью которого в ДАергические нейроны проникают специфичные для них токсины (например, МФП+, 6-ГДА), вызывая окислительный стресс и последующую гибель; и СЕМАКС, фрагмент адренокортикотропного гормона, пептид Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro, который может действовать в качестве индуктора синтеза эндогенных нейротрофических факторов или антиоксиданта в зависимости от схемы его введения [5, 6].

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали самцов мышей линии C57BL/6 (2–2.5 месяца). Мышей содержали в стандартных условиях вивария (свободный доступ к пище и воде, смена день/ночь каждые 12 ч). Манипуляции с животными проводили согласно протоколу, утвержденному комиссией по биоэтике Института биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН и соответствующему национальным и международным требованиям.

Оценку морфофункционального состояния терминалей ДАергических аксонов в начальный период их деградации в стриатуме проводили через 2 ч после двух инъекций МФТП (Sigma Aldrich, США) в разовой дозе 12 мг/кг с интервалом 2 ч. Контрольным животным вводили 0.9% NaCl по аналогичной схеме (рис. 1А). Методом иммуногистохимии (ИГХ) на срезах стриатума выявляли тирозингидроксилазу (ТГ) ($n = 3-4$) с последующим подсчетом терминалей аксонов в четырех областях дорсального стриатума как описано ранее [7]. Также в стриатуме определяли концентрацию ДА методом высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией (ВЭЖХ с ЭД) ($n = 5-7$) (рис. 1А).

Номифензин, (RS)-2-метил-4-фенил-1,2,3,4-тетрагидроизохинолин-8-амин, вводили подкожно в разовой дозе 10 мг/кг (Sigma, США) за 30 мин до каждой из четырех подкожных инъекций МФТП в дозе 12 мг/кг с интервалом 2 ч ($n = 8-9$) (рис. 1Б). Пептид Met-Glu-His-Phe-Pro-Gly-Pro (СЕМАКС) вводили интраназально в дозе 50 мкг/кг по двум схемам (препарат предоставлен НИЦ «Курчатовский

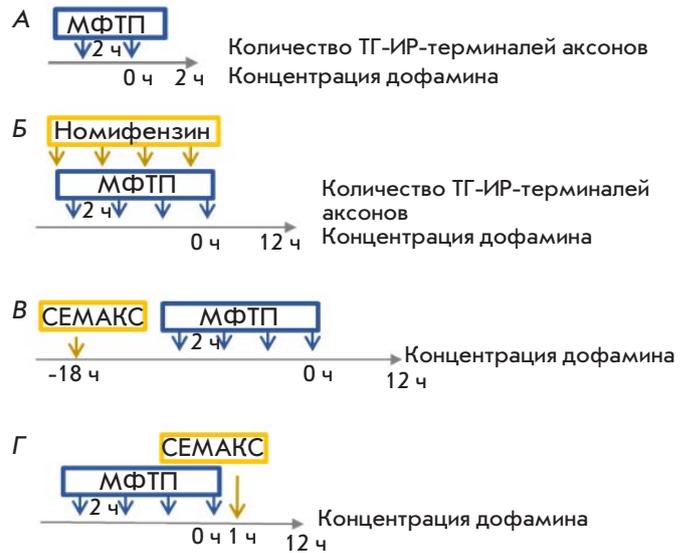


Рис. 1. Схема экспериментов. А – через 2 ч после двух инъекций МФТП (s.c. 12 мг/кг, интервал между инъекциями 2 ч) определено количество ТГ-иммунореактивных терминалей аксонов, выявленных иммуногистохимически на срезах стриатума, и концентрация ДА в стриатуме с помощью ВЭЖХ с ЭД. Б – номифензин (s.c. 10 мг/кг) вводили за 30 мин до каждой из четырех инъекций МФТП (s.c. 12 мг/кг, интервал между инъекциями 2 ч). Через 12 ч после последней инъекции МФТП определяли концентрацию ДА в стриатуме методом ВЭЖХ с ЭД и количество ТГ-иммунореактивных терминалей аксонов, выявленных иммуногистохимически на срезах стриатума. СЕМАКС (i.p. 50 мкг/кг) вводили однократно либо за 12 ч до первой инъекции МФТП (В), либо через 1 ч после последней инъекции МФТП (Г). Через 12 ч после последней инъекции МФТП определяли концентрацию ДА в стриатуме методом ВЭЖХ с ЭД

институт» – ИМГ). Синтез эндогенных нейротрофических факторов индуцировали, вводя СЕМАКС за 12 ч до первой из четырех инъекций МФТП в дозе 12 мг/кг с интервалом 2 ч (рис. 1В), а для использования в качестве антиоксиданта СЕМАКС вводили через 1 ч после последней из четырех инъекций МФТП в дозе 12 мг/кг с интервалом 2 ч (рис. 1Г) ($n = 5-10$). Сбор материала (стриатум) для всех нейропротекторов осуществляли через 12 ч после последней инъекции МФТП и определяли концентрацию ДА в ткани с помощью ВЭЖХ с ЭД. Также в эксперименте с номифензином проводили количественную оценку терминалей ТГ-иммунореактивных аксонов в стриатуме. Подробные описания методик иммуногистохимического выявления ТГ, подсчета терминалей аксонов и определения концентрации ДА в стриатуме представлены ранее [7].

Статистическую значимость полученных данных определяли с использованием параметриче-

ского *t*-критерия Стьюдента и непараметрического *U*-критерия Манна–Уитни. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$, $p < 0.1$ рассматривали как тенденцию к изменению. Данные представлены как среднее \pm стандартная ошибка среднего в процентах от контроля, принятого за 100%.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Дегенерация ДАергических нейронов nigростриатной системы при БП начинается с терминалей аксонов (варикозов) в стриатуме, ретроградно распространяясь к телам нейронов [4]. При этом стоит отметить немногочисленность работ, посвященных изучению периода деградации nigростриатной системы на уровне стриатума на ранних сроках после введения МФТП. Почти во всех этих работах с помощью полуколичественного иммуногистохимического анализа ТГ на срезах стриатума определяли только оптическую плотность на единицу ткани [8, 9], что интерпретировали как степень деградации аксонов. Однако это не вполне корректно, так как содержание ТГ в аксонах при БП и на моделях заболевания изменяется [10].

Ранее мы показали, что деградация терминалей ДАергических аксонов в стриатуме прекращается через 6 ч после четырех инъекций МФТП, после чего начинают развиваться компенсаторные процессы (например, увеличение активности ТГ) [7]. Количество терминалей аксонов через 3 и 6 ч соответственно составляло 67 и 55% от контроля [7]. В этот период скорость деградации терминалей аксонов в течение первого часа составляла 4%. Однако это свидетельствует о том, что количество терминалей на момент первой инъекции МФТП должно было составлять около 120%. Поэтому для уточнения скорости деградации nigростриатной системы в начальный период нейродегенерации nigростриатной системы мы взяли точку 2 ч после двух инъекций МФТП и показали, что количество варикозов составляло 72% от контроля (рис. 2А–В). Сопоставляя эти данные, можно заключить, что скорость гибели терминалей аксонов не линейна: в первые 4 ч после первой инъекции МФТП она составляла около 7%/ч, а в последующие 5 ч – 1%/ч.

Нелинейная скорость деградации терминалей аксонов может быть связана с метаболизмом МФТП+ (токсин, образуется из МФТП в клетках глии), который захватывается в ДАергические нейроны с помощью ДАТ, индуцируя окислительный стресс. Попадая внутрь нейрона МФТП+ также может конкурентно с ДА захватываться в везикулы с помощью везикулярного транспортера моноаминов типа 2 (ВМАТ2), что является механизмом, защищающим нейроны от гибели.

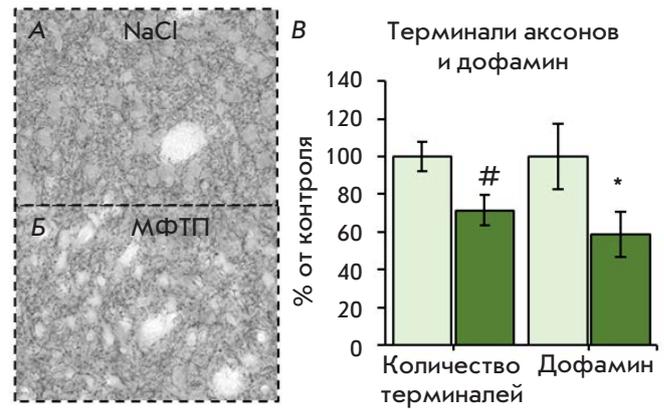


Рис. 2. ТГ-иммунореактивные терминали аксонов (А, Б) через 2 ч после двукратного введения МФТП в разовой дозе 12 мг/кг с интервалом 2 ч (Б), а также их количество и концентрация ДА (В) в стриатуме. * $p < 0.05$, # $p < 0.1$

Высокая скорость деградации терминалей аксонов вплоть до 2 ч после второй инъекции МФТП, вероятно, связана с запуском окислительного стресса МФТП+ и невозможностью его «обезвредить» за счет накопления в везикулах, которые заполнены ДА. Постепенно происходит выделение и деградация нейротрансмиттера и к 2 ч после двух инъекций МФТП концентрация ДА в стриатуме составляла 59% (рис. 2Б). На следующем этапе скорость деградации терминалей аксонов резко замедляется в результате установления баланса между захватом МФТП+ в везикулы и продолжающимся выделением ДА с его деградацией.

Таким образом, при использовании модели деградации терминалей ДАергических аксонов для тестирования потенциальных нейропротекторов в первую очередь следует ориентироваться на концентрацию ДА в стриатуме как показатель, наиболее чувствительный к действию МФТП. Однако, учитывая нелинейную скорость деградации терминалей ДАергических аксонов, фактический период действия нейропротектора ограничивается 6 ч после индукции нейродегенерации nigростриатной системы.

На следующем этапе оценили возможность использования динамики дегенерации терминалей аксонов в качестве тест-системы лекарственных веществ с нейропротекторными свойствами. С этой целью использовали два нейропротектора, которые обладают «прямым» (селективным) и «непрямым» действием. Под прямым действием подразумевается ингибирование захвата нейротоксина через ДАТ. Ведь помимо МФТП существуют и другие нейротоксины, которые могут селективно проникать в ДАергические нейроны и вызывать окислительный стресс, например, салсолинол, который образуется из ДА и может захватываться с помощью ДАТ [11].

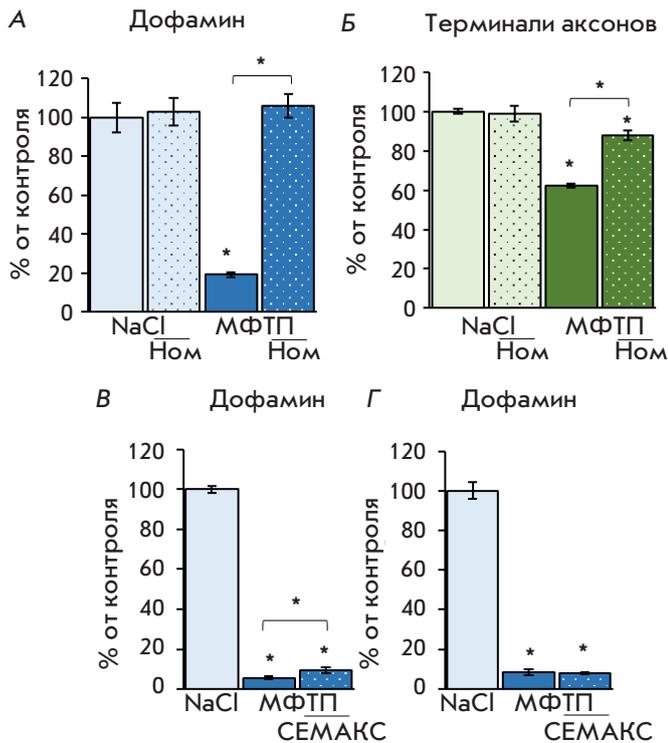


Рис. 3. Концентрация ДА (А) и количество ТГ-иммунореактивных терминалей аксонов (Б) в стриатуме через 12 ч после четырехкратного введения МФТП (12 мг/кг), а также при введении 10 мг/кг номифензина (Ном) за 30 мин до каждой инъекции МФТП. Концентрация ДА в стриатуме через 12 ч после четырехкратного введения МФТП (12 мг/кг), а также при введении 50 мкг/кг СЕМАКС за 12 ч до первой инъекции МФТП (В) или через 1 ч после последней инъекции МФТП (Г). * $p < 0.05$

Показано, что введение номифензина обеспечивало поддержание концентрации ДА на уровне контроля в стриатуме на фоне введения МФТП и в значительной степени защищало терминали аксонов (рис. 3А, Б). Более того, учитывая, что проникновение

МФТП+ происходит через ДАТ, его ингибирование с помощью номифензина также является «эталонным» действия потенциальных нейропротекторов.

СЕМАКС может стимулировать выработку эндогенных нейротрофических факторов, а также выступать в роли антиоксиданта [5, 6]. Чтобы разделить эти два эффекта, использовали две схемы эксперимента. В первом случае СЕМАКС вводили за 12 ч до МФТП для увеличения экспрессии эндогенных нейротрофических факторов или через 1 ч после последней инъекции МФТП. Увеличение ДА наблюдали только в группе, получившей СЕМАКС за 12 ч (рис. 3В, Г). Также в этой группе обнаружено значимое снижение оборота ДА (ДОФУК/ДА) по сравнению с группой, получавшей только МФТП (данные не приведены). Учитывая, что СЕМАКС не влияет на уровень ДА в стриатуме [12], полученные данные свидетельствуют о нейропротекторном действии СЕМАКС на ДАергические нейроны, однако, для увеличения этого эффекта необходимо изменить схему эксперимента, например, использовать многократные инъекции препарата.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, можно заключить, что наиболее чувствительным показателем эффективности действия нейропротекторов является концентрация ДА в стриатуме, отражающая биохимические изменения. При обнаружении положительного влияния на уровень нейротрансмиттера следует ориентироваться на органические изменения в стриатуме путем подсчета терминалей ДАергических аксонов. Показана также возможность использования динамики дегенерации терминалей ДАергических нейронов в качестве тест-системы для оценки эффективности нейропротекторов. ●

*Работа поддержана грантом
РНФ № 20-75-00110.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Fearnley J.M., Lees A.J. // Brain. 1991. V. 114. P. 2283–2301.
- DATATOP: a multicenter controlled clinical trial in early Parkinson's disease. Parkinson Study Group // Arch. Neurol. 1989. V. 46. № 10. P. 1052–1060.
- Schirinzi T., Martella G., Imbriani P., Di Lazzaro G., Franco D., Colona V.L., Alwardat M., Sinibaldi Salimei P., Mercuri N.B., Pierantozzi M., et al. // Front. Neurol. 2019. V. 10. P. 148.
- Kordower J.H., Olanow C.W., Dodiya H.B., Chu Y., Beach T.G., Adler C.H., Halliday G.M., Bartus R.T. // Brain. 2013. V. 136. P. 2419–2431.
- Дологов О.В., Середенина Т.С., Левицкая Н.Г., Каменский А.А., Андреева Л.А., Алфеева Л.Ю., Нагаев И.Ю., Золотарев Ю.А., Гривенников И.А., Энгеле Ю., и др. // Докл. Академии наук. 2003. Т. 391. № 1. С. 131–134.
- Levitskaya N.G., Sebentsova E.A., Andreeva L.A., Alfeeva L.Y., Kamenskii A.A., Myasoedov N.F. // Neurosci. Behav. Physiol. 2004. V. 34. № 4. P. 399–405.
- Колачева А.А., Козина Е.А., Волина Е.В., Угрюмов М.В. // Нейрохимия. 2014. Т. 31. № 3. С. 225–235.
- Kurosaki R., Muramatsu Y., Kato H., Araki T. // Pharmacol. Biochem. Behav. 2004. V. 78. № 1. P. 143–153.
- Jakowec M.W., Nixon K., Hogg E., McNeill T., Petzinger G.M. // J. Neurosci. Res. 2004. V. 76. № 4. P. 539–550.
- Kozina E.A., Khakimova G.R., Khaindrava V.G., Kucheryanu V.G., Vorobyeva N.E., Krasnov A.N., Georgieva S.G., Kerkerian-Le Goff L., Ugrumov M.V. // J. Neurol. Sci. 2014. V. 340. № 1–2. P. 198–207.
- Matsubara K., Senda T., Uezono T., Fukushima S., Ohta S., Igarashi K., Naoi M., Yamashita Y., Ohtaki K., Hayase N., et al. // Eur. J. Pharmacol. 1998. V. 348. № 1. P. 77–84.
- Еремин К.О., Кудрин В.С., Гривенников И.А., Мясоедов Н.Ф., Раевский К.С. // Докл. Академии наук. 2004. Т. 394. № 1. С. 130–132.

УДК 57.083

Таргетинг внеклеточных везикул к дендритным клеткам и макрофагам

Л. А. Овчинникова¹, И. Н. Филимонова¹, М. Ю. Захарова^{1,2}, Д. С. Балабашин¹, Т. К. Алиев^{1,3}, Я. А. Ломакин^{1*}, А. Г. Габибов^{1,3}

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

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

³Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, химический факультет, Москва, 119991 Россия

*E-mail: yasha.l@bk.ru

Поступила в редакцию 13.04.2021

Принята к печати 12.05.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11478

РЕФЕРАТ Направленная доставка белковых терапевтических препаратов в клетки и ткани-мишени является фундаментальной задачей современной медицины. Повышение специфичности этого процесса повысит эффективность разрабатываемых лекарств. Один из перспективных инструментов доставки терапевтических белковых агентов – внеклеточные везикулы (ВВ), представляющие собой двухслойные липидные частицы. ВВ секретируются почти всеми типами клеток и обладают важными преимуществами: биосовместимостью, стабильностью и возможностью проникать через гематоэнцефалический барьер. Сверхэкспрессия белка G вируса везикулярного стоматита (VSV-G), как показано ранее, способствует образованию ВВ клеткой-продуцентом. Нами разработана система адресной доставки содержимого ВВ в антигенпрезентирующие клетки – макрофаги и дендритные клетки. Показано, что добавление рекомбинантного антитела ламы α -CD206 к N-концу укороченной формы VSV-G повышает селективность доставки белковых препаратов ВВ преимущественно к макрофагам и дендритным клеткам. Полученные результаты подчеркивают выдающийся технологический и биомедицинский потенциал систем доставки с использованием ВВ для коррекции иммунного ответа у пациентов с аутоиммунными, вирусными и онкологическими заболеваниями.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА внеклеточные везикулы, наноконтейнеры, антигенпрезентирующие клетки, направленная доставка, наноантитело, CD206, VSV-G.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АПК – антигенпрезентирующие клетки; ВВ – внеклеточные везикулы; ДК – дендритные клетки; МФ – макрофаги; МНК – мононуклеарные клетки; ОБМ – основной белок миелина; РС – рассеянный склероз; GM-CSF – гранулоцитарно-макрофагальный колониестимулирующий фактор; ИЛ – интерлейкин; VSV-G – гликопротеид G везикулярного вируса стоматита (vesicular stomatitis virus G).

ВВЕДЕНИЕ

Стремительное развитие современной биомедицины предполагает создание терапевтических препаратов, обладающих высокой селективностью и низкой токсичностью. Появление таких препаратов требует не только разработки высокоактивных терапевтических компонентов, но и обеспечение их эффективной доставки к определенным органам, тканям и клеткам-мишеням [1, 2]. Существенный прогресс в области адресной доставки препаратов достигнут с помощью антитело-направленной терапии, дарпинов и использования наночастиц [3–6]. Использование внеклеточных везикул (ВВ) в качестве носителей белковых молекул имеет ряд таких преимуществ, как (1) природная биосовместимость клеточной мем-

браны и мембран ВВ, (2) способность ВВ проникать через гематоэнцефалический барьер, (3) возможность изменения белкового состава мембраны ВВ [7]. Модификация белкового профиля мембран ВВ позволяет осуществлять адресную доставку терапевтического содержимого ВВ внутрь желаемых клеточных мишеней [8, 9].

Предшественниками ВВ в области направленной доставки терапевтических препаратов и первыми наиболее подробно изученными носителями являются липосомы. Многие препараты, относящиеся к данной категории, успешно прошли клинические испытания и введены в клиническую практику [10–12]. Один из перспективных препаратов для лечения рассеянного склероза (РС) на основе липосом – Ксемус

[13–15], состоящий из маннозилированных липосом, нагруженных иммунодоминантными пептидами основного белка миелина (ОБМ). Терапевтические пептиды доставляются направленно в антигенпрезентирующие клетки (АПК) – дендритные клетки (ДК) и макрофаги (МФ) – за счет остатков маннозы на поверхности липосом. Предполагаемый механизм действия заключается в гиперпрезентации доставляемых фрагментов ОБМ в составе главного комплекса гистосовместимости класса II на поверхности АПК, что и вызывает иммуносупрессию и подавление аутоиммунного воспаления. Ксемус успешно прошел доклинические испытания и II стадию клинических испытаний. Предполагается проведение фазы III клинических испытаний для получения разрешения на применение на территории Российской Федерации. Однако при РС необходимо регулярное пожизненное поступление таких липосом в организм, что сопряжено с определенными экономическими трудностями и неудобством для пациентов. Более удобными носителями фрагментов ОБМ для длительной терапии пациентов с РС могут оказаться ВВ. Опираясь на существующие методы получения ВВ [16], можно создать генетически кодируемый препарат ВВ, нагруженных пептидами ОБМ. Использование аутологичных клеток человека в качестве клеток-продуцентов позволит совершить переход к персонализированной медицине и избежать необходимости в постоянных инъекциях, снижающих качество жизни [17].

В представленной работе описана система адресной доставки содержимого ВВ к АПК. По аналогии с препаратом Ксемус выбран поверхностный маркер ДК и МФ – CD206 (маннозный рецептор) [18]. Данный рецептор связывает гликоконъюгаты, оканчивающиеся остатками маннозы, фукозы или N-ацетил-D-глюкозамина, присутствующие в больших количествах на поверхности патогенных микроорганизмов [19]. Конформационные изменения, возникающие в рецепторе при взаимодействии с остатком маннозы, приводят к интернализации связанного патогена и его транспорту в лизосомы [20], что объясняет

ся высоким уровнем экспрессии данного рецептора на ДК и МФ – классических АПК иммунной системы человека. Нами разработана система наработки ВВ, несущих на своей поверхности наноантитело ламы, специфичное к CD206 человека и мыши. Эти везикулы имеют размер порядка 100–140 нм и несут экзосомальные маркеры [7]. Мы показали возможность доставки целевого белка в клетки-мишени при использовании таргетированных везикул, а также доставки целевого белка в ДК и МФ человека. Полученные данные позволяют использовать стратегию нацеливания генетически кодируемых везикул в АПК для разработки препаратов, направленных на коррекцию иммунного ответа у пациентов с аутоиммунными, вирусными и онкологическими заболеваниями.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Плазмиды

Для получения конструкции pCMV-NanoLuc-Jun (Addgene ID: 167308) ген, кодирующий люциферазу NanoLuc, амплифицировали с праймеров For_NanoLuc и Rev_NanoLuc (таблица) и лигировали в вектор pCMV-Jun по сайтам рестрикции HindIII/KpnI. Последовательность, кодирующая укороченный VSV-G (pCMV-VSV-G_truncated) (аминокислотная последовательность: EHPHIQDAASQLPDD-ESLFFGDTGLSKNPIELVEGWSSWKSSIASFFFIIGLIIGLFLVLRVGIHLCLKLNHTKKRQIYTDIEMNRLGK), амплифицирована с полноразмерного VSV-G (AddgeneID: 138479) с праймеров For_VSVG_trunc и Rev_VSVG_trunc (таблица) и клонирована в вектор pCMV по сайтам BstBI/ClaI.

Ген, кодирующий наноантитело ламы α -CD206 (клон 3.49) [21], синтезирован и клонирован на 5'-конец укороченного VSV-G в конструкцию pCMV-VSV-G_truncated для эукариотической экспрессии и в вектор pET22 для прокариотической экспрессии. Для наработки рекомбинантного антитела ламы α -CD206 в прокариотической системе экспрессии на C-конец белка был добавлен гистидиновый эпитоп

Праймеры, использованные для создания конструкций

Праймер	Нуклеотидная последовательность
For_CD206	5'-TGGGGTGAATTGCTTCGGAAGTCAGGTTCAACTGCAGGAGTC-3'
Rev_CD206	5'-GAATGTGAGGATGTTTCAAGCTGCCTCCTCCTGAGC-3'
For_NanoLuc	5'-TCTGGTACCATGGTCTTCACACTCGAA-3'
Rev_NanoLuc	5'-GGGTGGTGGTGGTGGCAAGCTT-3'
For_VSVG_trunc	5'-GGGGTGAATTGCTTCGAACATCCTCACATTCAAG-3'
Rev_VSVG_trunc	5'-AGAGATGAACCGACTTGGAAAGGGCTCC-3'

для аффинной очистки и 3×FLAG-эпитоп для детекции вторичными антителами.

Клеточные линии

Клетки линии HEK293T культивировали в полной среде DMEM с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco, США); клеточные линии Jurkat и DC2.4 культивировали в полной среде RPMI с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота (Gibco).

Для получения популяций стимулированных ДК и МФ из периферической крови человека центрифугированием в градиенте фиколла выделяли мононуклеарные клетки (МНК). Полученные клетки инкубировали в полной среде RPMI с добавлением 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота до тех пор, пока предшественники ДК и МФ не прикрепятся к пластику. После этого неприкрепившиеся клетки удаляли, к прикрепившимся добавляли IL-4 (50 нг/мл) и GM-CSF (100 нг/мл). Дифференцировку МНК в дендритные клетки проводили в течение 6 дней со сменой среды, содержащей свежую порцию цитокинов, каждые 2 дня.

Все клеточные линии культивировали при температуре 37°C и 8% CO₂.

Продукция антитела ламы α-CD206-FLAG в прокариотической системе экспрессии

Рекомбинантное антитело ламы α-CD206 нарабатывали в прокариотической системе экспрессии – в клетках *E. coli* BL21 (DE3). Ночную культуру клеток инокулировали в среду 2xYT в соотношении 1 : 100 и растили до OD₆₀₀ = 0.6. Экспрессию индуцировали добавлением 1 мМ изопропил-β-D-1-тиогаляктопиранозидом. Культуру инкубировали при высокой аэрации (16 ч, 28°C). Затем центрифугировали при 3500 g в течение 10 мин при 4°C. Полученный осадок ресуспендировали в лизирующем буфере (50 мМ Трис-НСl pH 8.0; 150 мМ NaCl; 1 мМ PMSF) и добавляли лизоцим до конечной концентрации 0.2 мг/мл. Инкубировали при комнатной температуре до тех пор, пока раствор не станет вязким. Для дезинтеграции клеточной массы использовали ультразвук. Полученный раствор центрифугировали при 20000 g в течение 10 мин при 4°C. Надосадочную жидкость фильтровали через 0.45-мкм фильтр, затем наносили на колонку Ni-NTA (Qiagen). Для очистки от примесных белков через колонку пропускали буфер нанесения (50 мМ Трис-НСl pH 8.0; 150 мМ NaCl), затем промывочный буфер с имидазолом (50 мМ Трис-НСl pH 8.0; 150 мМ NaCl; 20 мМ имидазол). Элюировали буферным раствором (50 мМ Трис-НСl pH 8.0; 150 мМ NaCl; 350 мМ имидазол).

Окрашивание ДК и МФ рекомбинантным антителом ламы α-CD206

Возможность использования рекомбинантного антитела ламы α-CD206 для адресной доставки белковых препаратов к АПК верифицировали на ДК и МФ из периферической крови человека. Для этого брали 500000 клеток, отмывали 2 раза в буфере PBS и ресуспендировали в 100 мкл раствора, содержащего 15–300 мкг/мл рекомбинантных антител ламы α-CD206-FLAG. Инкубировали в течение 1 ч при 4°C и постоянном деликатном перемешивании. После инкубации клетки отмывали 2 раза PBS и окрашивали вторичными антителами к эпитопу FLAG, конъюгированными с флуоресцентной меткой PE по протоколу производителя (BioLegend, США). Для контрольного окрашивания использовали антитело к маркеру CD206 человека, конъюгированное с флуоресцентной меткой PE (или α-human α-CD206-PE) (BioLegend). В качестве отрицательного контроля окрашивали клетки линии HEK293T и нестимулированные МНК.

Наработка и очистка внеклеточных везикул

ВВ нарабатывали в клетках линии HEK293T. С этой целью клетки при достижении 90% монослоя трансфицировали одновременно тремя конструкциями: pCMV-VSV-G (или pCMV-VSV-G_truncated или pCMV-α-CD206_VSV-G_truncated), pCMV-EPN, pCMV-NanoLuc. Среду от клеток, содержащую ВВ, собирали через 48 ч и подвергали дифференциальному центрифугированию (300 g 10 мин; 1000 g 20 мин). Далее супернатант фильтровали через мембрану 0.4 мкм и концентрировали с использованием Amicon Ultra-0.5 100 кДа (Millipore, Ирландия). Для избавления от различных примесей концентрат несколько раз промывали буфером PBS. Концентрацию ВВ определяли с использованием набора SBQSA Protein Quantitation Kit (Invitrogen, США).

Инкубация внеклеточных везикул с клетками

ВВ, несущие репортерный белок люциферазу, выравнивали в соответствии с концентрацией белка в препарате, добавляли к 300000 клеток (Jurkat и DC2.4) и инкубировали в течение 2 ч при 37°C и 8% CO₂. В качестве контроля использовали свободную люциферазу NanoLuc-Jun, не загруженную в ВВ. После инкубации клетки промывали PBS при 300 g в течение 10 мин, затем инкубировали в буфере с протеиназой К (Invitrogen) в конечной концентрации 0.1 мг/мл при температуре 37°C в течение 15 мин. После инкубации клетки дважды отмывали в PBS. Содержание люциферазы в клетках анализировали с использованием набора NanoGlo Luciferase Assay System (Promega, США). На тест брали 30000 клеток и ресуспендировали их в 15 мкл PBS, затем к ним добавляли 15 мкл

лизирующего буфера, содержащего субстрат люциферазы. Сигнал детектировали на пласечном ридере VarioScan (Thermo Scientific, США) при 460 нм.

Адресная доставка NanoLuc в ДК и МФ при помощи таргетированных ВВ

К гетерогенной популяции стимулированных ДК и МФ из периферической крови человека добавляли таргетированные ВВ (несущие на своей поверхности укороченный вариант VSV-G, слитый с антителом α -CD206) в концентрации 5–20 мкг/мл. Инкубировали в течение 2 ч при 37°C и 8% CO₂. Затем клетки аккуратно промывали по методике, описанной выше, ресуспендировали в полной среде ДМЕМ и инкубировали еще 16 ч в среде без везикул. Через 16 ч клетки окрашивали антителами к α -CD206-PE человека (BioLegend). Проводили клеточный сортирование на приборе Sony SH800 (Германия). Выделяли две субпопуляции клеток – CD206⁺ и CD206⁻. Из каждой субпопуляции брали по 30000 клеток на люциферазный тест.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Получение рекомбинантного антитела, специфичного к поверхностному маркеру дендритных клеток и макрофагов

Для таргетной доставки содержимого генетически кодируемых везикул внутрь АПК мы выбрали поверхностный маркер ДК и МФ (M2) – CD206 (макрофагальный маннозный рецептор) [18]. Нами подобрано кросс-реактивное наноантитело ламы Nb3.49 [21], взаимодействующее с маннозным рецептором человека и мыши. Эта кросс-реактивность чрезвычайно полезна при проведении доклинических испытаний таргетированных внеклеточных везикул на животной модели с возможностью дальнейшего использования этого антитела и при проведении клинических испытаний. Для проверки функциональности и специфичности данного антитела было создано рекомбинантное наноантитело α -CD206-FLAG в прокариотической системе экспрессии на основе вектора pET22. Для детекции и аффинной очистки использовали гистидиновый эпитоп, для дополнительного увеличения чувствительности детекции на N-конец белка добавляли 3×FLAG-эпитоп.

Специфичность полученного наноантитела верифицирована на субпопуляции ДК человека. Для этого мононуклеарные клетки (МНК) из периферической крови человека культивировали в полной питательной среде в присутствии IL-4 и GM-CSF в течение недели с частичной заменой среды каждые 2 дня. При таких условиях в культуре лимфоцитов человека стимулируется дифференцировка ДК и МФ [22]. К полученной культуре ДК добавляли пре-

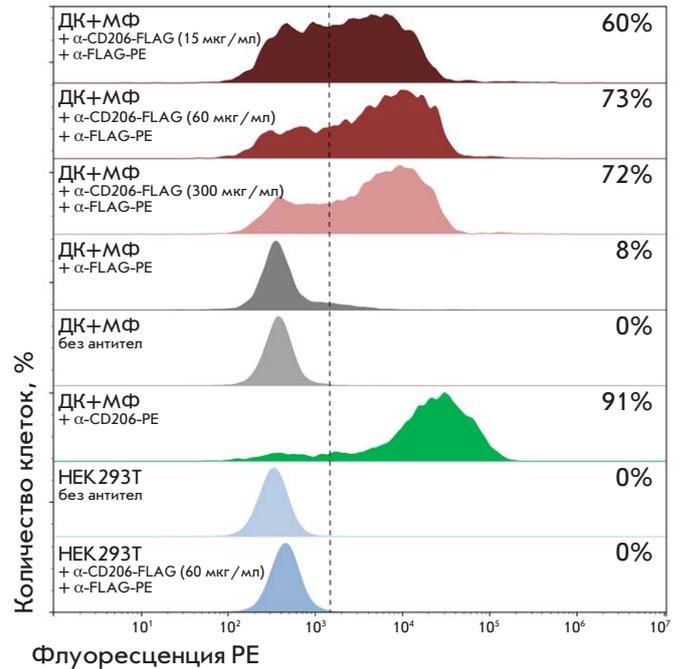


Рис. 1. Цитофлуориметрический анализ окрашивания ДК и МФ периферической крови человека при помощи рекомбинантных антител к поверхностному маркеру CD206. Дифференцировку ДК и МФ из МНК периферической крови человека стимулировали IL-4 и GM-CSF в течение 7 дней. На гистограммах отображен сигнал связывания клеток с рекомбинантным наноантителом α -CD206-FLAG в различных концентрациях с последующей визуализацией сигнала флуоресцентными антителами α -FLAG-PE (бордовый, красный, розовый) или с коммерчески доступным антителом α -CD206-PE (зеленый). Неокрашенные клетки и окрашенные только вторичными антителами (α -FLAG-PE) обозначены серым цветом. На нижней панели изображено контрольное связывание клеточной линии HEK293T с рекомбинантным наноантителом α -CD206-FLAG (голубой). На оси X отложен сигнал флуоресценции, на оси Y – количество зарегистрированных событий. На каждой гистограмме показано количество клеток (%), связавшихся с анализируемыми антителами

парат очищенного рекомбинантного наноантитела α -CD206-FLAG, после стадий инкубаций и отмывок добавляли вторичные антитела к FLAG-эпитопу, конъюгированные с флуоресцентной меткой PE (рис. 1). Окрашивание стимулированных МНК человека с использованием рекомбинантного наноантитела α -CD206-FLAG позволило четко детектировать субпопуляцию ДК, сопоставимую с субпопуляцией, выделяемой при окрашивании коммерчески доступным флуоресцентным антителом α -CD206-PE. Таким образом, мы подтвердили функциональность и специфичность α -CD206-FLAG в формате на-

ноантитела ламы, что позволяет использовать его для дальнейшей адресной доставки белковых препаратов при помощи ВВ к АПК.

Доставка содержимого внеклеточных везикул внутрь клеток

Оценка эффективности проникновения терапевтического препарата в клетки-мишени – необходимый этап в разработке носителей белковых препаратов. Наиболее удобно такую оценку можно проводить при использовании флуоресцентных белков или люциферазы в качестве доставляемого препарата. Существенный недостаток флуоресцентных белков – большая молекулярная масса и необходимость использования высокочувствительных методов детекции. В связи с этим, в качестве доставляемого препарата мы использовали люциферазу NanoLuc, обладающую хорошими спектральными характеристиками и небольшим размером (19 кДа).

Поверхность клеток-мишеней покрыта большим количеством мембранных белков, способных опосредовать неспецифичное взаимодействие растворимых белков с клетками-мишенями *in vitro*, искажая таким образом визуализацию реального распределения доставляемых ВВ между клетками. В своей работе мы минимизируем уровень неспецифического сигнала, опосредованного залипанием растворимой (не заключенной в везикулы) люциферазы, добавляя стадию инкубации клеток с протеиназой К. Внеклеточные везикулы, нагруженные люциферазой, и свободную люциферазу добавляли к клеткам-мишеням. После инкубации в течение 2 ч клетки отмывали от везикул и свободной люциферазы либо только фосфатно-солевым буфером, либо с дальнейшей инкубацией с протеиназой К. Как видно из рис. 2, инкубация клеток с протеиназой К позволяет снизить уровень неспецифического сигнала по сравнению с клетками, которые инкубировали в буфере без добавления протеиназы К. При этом сигнал, полученный от клеток, инкубированных с ВВ, более чем на порядок выше сигнала, полученного от клеток, инкубированных со свободной люциферазой. Использование протеиназы К на стадиях отмывки подтверждает, что доставляемая люцифераза проникает внутрь клеток, а не залипает на мембране. Таким образом, нам удалось обеспечить доставку люциферазы внутрь клеток с использованием внеклеточных везикул и оптимизировать условия детекции данного сигнала.

Основной компонент, определяющий способность внеклеточных везикул проникать внутрь клетки-мишени – вирусный гликопротеид VSV-G, который связывается с рецепторами липопротеинов низкой плотности, присутствующими в большом количе-

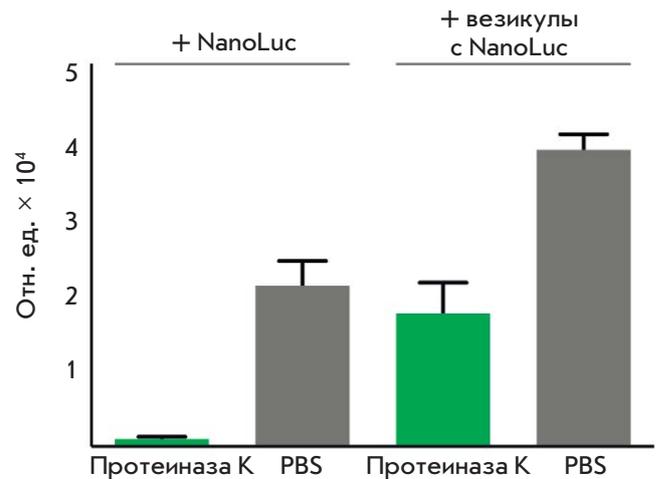


Рис. 2. Инкубация клеток-мишеней с внеклеточными везикулами, загруженными NanoLuc-люциферазой. Подобраны условия детекции сигнала доставляемых внутрь клеток ВВ, загруженных люциферазой. Неспецифичный сигнал от свободной люциферазы NanoLuc, залипающей на клетках, детектируется при использовании отмывок только с буфером PBS (серые столбцы), добавление стадии инкубации с протеиназой К (зеленые столбцы) позволяет в дальнейшем детектировать сигнал только от люциферазы, доставленной внутрь клеток. Для детекции NanoLuc, доставленного к клеткам, использовали люциферазный тест

стве на поверхности клеток млекопитающих [23]. Таким образом, используя полноразмерный VSV-G для доставки содержимого везикул внутрь клеток-мишеней, невозможно достичь высокой специфичности адресной доставки. В своей работе мы добились увеличения специфичности адресной доставки при использовании укороченного варианта VSV-G. В данном варианте VSV-G присутствует только стержневая часть белка [24], отвечающая за отпочковывание внеклеточных везикул от клетки-продуцента и освобождение содержимого везикулы внутри клетки-мишени. При этом становится возможным использование укороченной последовательности VSV-G, объединенной с рекомбинантным наноантителом, способным к высокоспецифическому взаимодействию с клеткой-мишенью, без потери функциональности получаемых внеклеточных везикул. Для проверки эффективности доставки препарата внутрь клеток мы использовали ВВ, загруженные люциферазой NanoLuc, несущие на своей поверхности различные варианты VSV-G: (1) полноразмерный VSV-G, (2) укороченный VSV-G, (3) укороченный VSV-G с экспонированным на поверхности наноантителом, специфически узнающим маркер дендритных клеток и макрофагов – CD206 (рис. 3).

Для проверки функционирования везикул, несущих различные варианты гликопротеида VSV-G, использовали линию дендритных клеток мыши DC2.4 и линию Jurkat (иммортализованные Т-клетки человека). Клетки инкубировали с различными вариантами везикул либо с раствором свободной люци-

феразы и отмывали в присутствии протеиназы К. Относительные значения интенсивности люминесценции, полученные с использованием люциферазного теста, приведены на рис. 4. В данном эксперименте значения, полученные при инкубации клеток с препаратом везикул, несущих полноразмерный VSV-G, приняты за 100%, так как именно в этом случае наблюдается максимальное взаимодействие везикул и клеток-мишеней. Использование укороченной формы VSV-G в 5–10 раз снижает эффективность доставки люциферазы в клетки-мишени. Это связано с тем, что нарушается функция распознавания рецептором липопротеинов низкой плотности. Подстановка наноантитела α -CD206 к укороченному VSV-G позволила добиться существенного увеличения целевой доставки белка в клетки-мишени. При этом при использовании антитела α -CD206 наблюдается более эффективная доставка белка к дендритным клеткам DC2.4, чем к клеткам Jurkat.

В дальнейшем внеклеточные везикулы планируется использовать для направленной доставки терапевтических препаратов в организме человека. Однако использование линейных клеточных линий не позволяет достоверно воспроизводить реальное распределение АПК и уровень экспрессии маркеров на клеточной поверхности. Для доказательства функциональности разработанных таргетированных внеклеточных везикул с укороченным VSV-G в условиях гетерогенной популяции клеток мы использовали МНК периферической крови человека, в которых стимулировали дифференцировку ДК

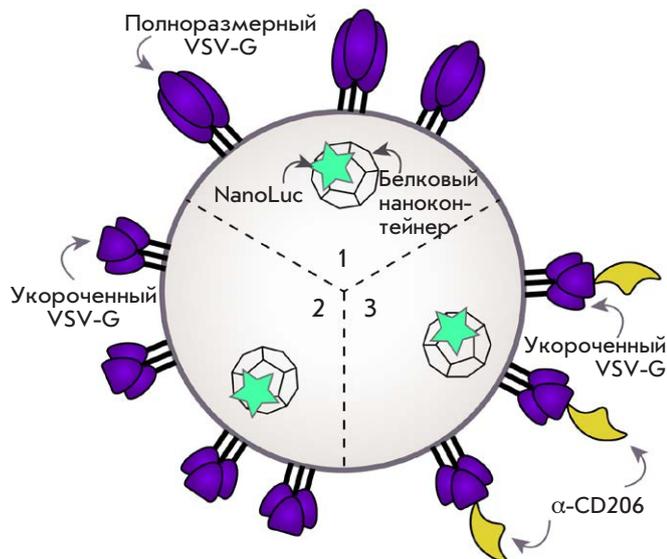


Рис. 3. Схематическое изображение генетически кодируемой везикулы с различными вариантами VSV-G на поверхности. 1 – полноразмерный VSV-G, 2 – укороченный VSV-G, 3 – укороченный VSV-G с экспонированным наноантителом α -CD206

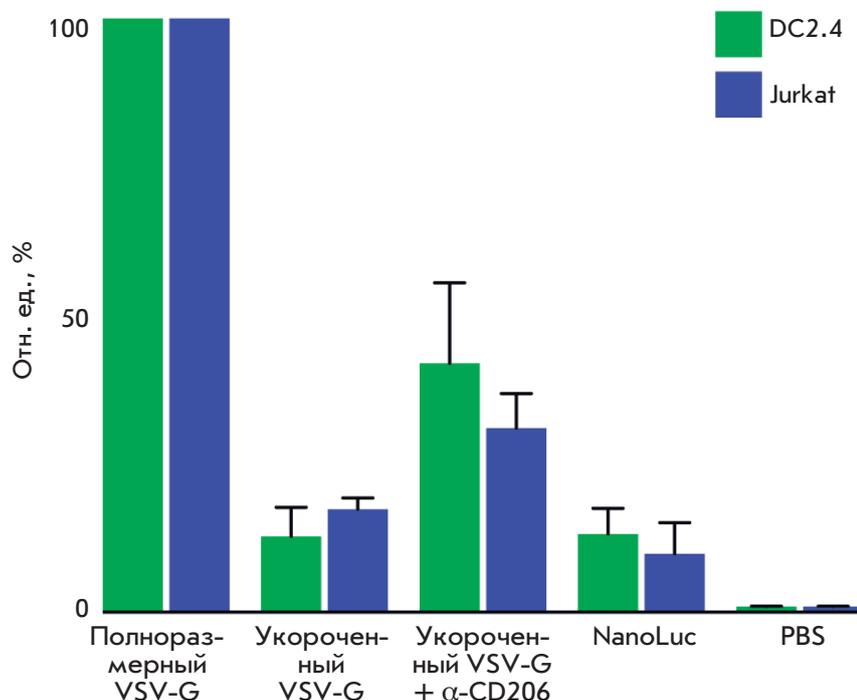


Рис. 4. Сравнение эффективности доставки целевого белка внутрь клеток-мишеней при использовании внеклеточных везикул, нагруженных люциферазой NanoLuc и несущих на своей поверхности различные варианты вирусного гликопротеида VSV-G. Анализ проводили на клеточных линиях DC2.4 (зеленые столбцы) и Jurkat (синие столбцы). Эффективность доставки при использовании внеклеточных везикул с полноразмерным VSV-G принята за 100% для каждой клеточной линии. В качестве контроля использовали свободную люциферазу NanoLuc, не нагруженную внутрь везикул (образец «NanoLuc»)

и МФ. Препарат таргетированных внеклеточных везикул, загруженных люциферазой, инкубировали с данной гетерогенной популяцией клеток, содержащей клетки CD206⁺ и CD206⁻. Далее анализируемые клетки отмывали, окрашивали флуоресцентным антителом α-CD206-PE и разделяли на две субпопуляции – CD206⁺ и CD206⁻ с использованием проточной цитофлуорометрии. Содержание люциферазы, доставленной внутрь клеток-мишеней, определяли отдельно в субпопуляциях клеток CD206⁺ и CD206⁻. Нам удалось достигнуть высокой специфичности доставки люциферазы преимущественно в клетки CD206⁺ (рис. 5).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящий момент одним из основных приоритетов разработок лекарственных препаратов является увеличение селективности доставки. В этом исследовании нами предложен усовершенствованный метод таргетной доставки терапевтических белковых препаратов, заключенных внутрь ВВ. Высокая биосовместимость и биоразлагаемость ВВ дает им огромное преимущество перед искусственными наночастицами. Добавление рекомбинантного антитела ламы α-CD206 к N-концу укороченной формы VSV-G позволяет повысить селективность доставки ВВ преимущественно к CD206⁺ клеткам без значимого снижения уровня продукции данных ВВ. Функциональность разработанных конструкций подтверждена на линейных дендритных клетках DC2.4 мыши и на гетерогенных субпопуляциях стимулированных ДК и МФ периферической крови человека. Полученные данные указывают на возможность использования стратегии нацеливания генетически кодируемых внеклеточных везикул в АПК для создания препаратов, направленных на коррекцию иммунного ответа у пациентов с аутоиммунными, вирусными и онкологическими заболеваниями. Препараты на основе везикул способны доставлять в клетки не только целевые белковые молекулы, но и липиды, нуклеиновые кислоты, транскрипционные факторы [1]. В перспективе подобные таргетные препараты на основе ВВ можно использовать и для нужд генотерапии. В настоящее время разработке и созданию систем доставки на основе ВВ посвящено множество исследований. Такие препараты специфично загружают белками [25], пептидами [26], РНК [27, 28]. При этом остро стоит вопрос переноса

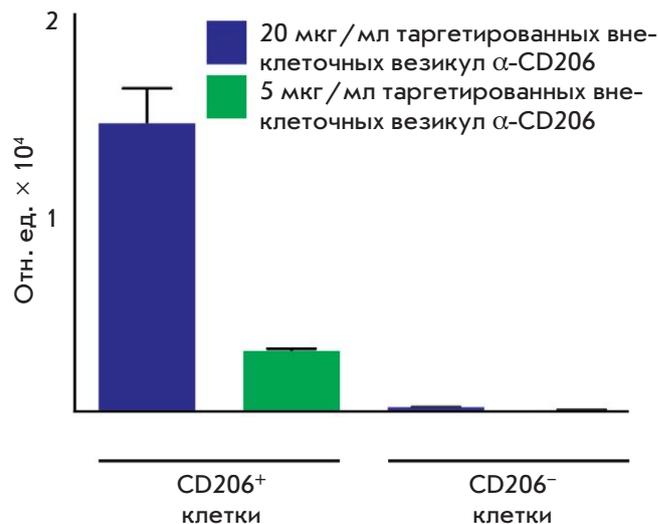


Рис. 5. Направленная доставка целевого белка внутрь клеток-мишеней при помощи таргетированных внеклеточных везикул. Таргетированные α-CD206 внеклеточные везикулы, загруженные NanoLuc, инкубировали с мононуклеарными клетками периферической крови человека после стимуляции дифференцировки ДК и МФ. После цитофлуорометрического сортирования субпопуляций CD206⁺ и CD206⁻ показано, что весь препарат NanoLuc был доставлен к клеткам CD206⁺. В люциферазном тесте использовали одинаковое количество клеток CD206⁺ и CD206⁻.

не целевых, балластных молекул различных классов в составе продуцируемых ВВ. Попадание нежелательных компонентов внутрь клетки-мишени может серьезно повлиять на биосовместимость препарата и привести к непредсказуемым побочным эффектам. Одним из путей решения данной проблемы является использование аутологичных клеток для наработки везикул [29]. Безопасность применения таких препаратов ВВ подтверждена клиническими испытаниями [30–32]. Однако при создании потенциальных лекарственных средств следует тщательно оценивать долгосрочный эффект от попадания естественного содержимого ВВ в клетки. ●

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

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sokolov A.V., Kostin N.N., Ovchinnikova L.A., Lomakin Y.A., Kudriaeva A.A. // Acta Naturae. 2019. V. 11. P. 28–41. <https://doi.org/10.32607/20758251-2019-11-2-28-41>.
- Stepanov A.V., Belogurov A.A., Ponomarenko N.A.,

- Stremovskiy O.A., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Balabashin D.S., et al. // PLoS One. 2011. V. 6. P. e20991. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0020991>.
- Mirkasymov A.B., Zelepukin I.V., Nikitin P.I., Nikitin M.P.,

- Deyev S.M. // *J. Control Release*. 2021. V. 330. P. 111–118. <https://doi.org/10.1016/j.jconrel.2020.12.004>.
4. Shilova O.N., Deyev S.M. // *Acta Naturae*. 2019. V. 11. P. 42–53. <https://doi.org/10.32607/20758251-2019-11-4-42-53>.
 5. Belogurov A., Kozyr A., Ponomarenko N., Gabibov A. // *BioEssays*. 2009. V. 31. P. 1161–1171. <https://doi.org/10.1002/bies.200900020>.
 6. Durova O.M., Vorobiev I.I., Smirnov I.V., Reshetnyak A.V., Telegin G.B., Shamborant O.G., Orlova N.A., Genkin D.D., Bacon A., Ponomarenko N.A., et al. // *Mol. Immunol.* 2009. V. 47. P. 87–95. <https://doi.org/10.1016/j.molimm.2008.12.020>.
 7. Ovchinnikova L.A., Terekhov S.S., Ziganshin R.H., Bagrov D.V., Filimonova I.N., Zalevsky A.O., Lomakin Y.L. // *Pharmaceutics*. 2021. V. 13. P. 768. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics13060768>.
 8. Buschmann D., Mussack V., Byrd J.B. // *Adv. Drug Deliv. Rev.* 2021. V. 174. P. 348–368. <https://doi.org/10.1016/j.addr.2021.04.027>.
 9. Ukrainskaya V.M., Rubtsov Y.P., Knorre V.D., Maschan M.A., Gabibov A.G., Stepanov A.V. // *Acta Naturae*. 2019. V. 11. P. 33–41. <https://doi.org/10.32607/20758251-2019-11-4-33-41>.
 10. Beltrán-Gracia E., López-Camacho A., Higuera-Ciapara I., Velázquez-Fernández J.B., Vallejo-Cardona A.A. // *Cancer Nanotechnol.* 2019. V. 10. P. 11. <https://doi.org/10.1186/s12645-019-0055-y>.
 11. Lamichhane N., Udayakumar T.S., D'Souza W.D., Simone C.B., Raghavan S.R., Polf J., Mahmood J. // *Molecules*. 2018. V. 23. P. 288. <https://doi.org/10.3390/molecules23020288>.
 12. Bulbake U., Doppalapudi S., Kommineni N., Khan W. // *Pharmaceutics*. 2017. V. 9. P. 9. <https://doi.org/10.3390/pharmaceutics9020012>.
 13. Belogurov A.A., Stepanov A.V., Smirnov I.V., Melamed D., Bacon A., Mamedov A.E., Boitsov V.M., Sashchenko L.P., Ponomarenko N.A., Sharanova S.N., et al. // *FASEB J.* 2013. V. 27. P. 222–231. <https://doi.org/10.1096/fj.12-213975>.
 14. Belogurov A., Zakharov K., Lomakin Y., Surkov K., Avtushenko S., Kruglyakov P., Smirnov I., Makshakov G., Lockshin C., Gregoriadis G., et al. // *Neurotherapeutics*. 2016. V. 13. P. 895–904. <https://doi.org/10.1007/s13311-016-0448-0>.
 15. Ivanova V.V., Khaiboullina S.F., Gomzikova M.O., Martynova E.V., Ferreira A.M., Garanina E.E., Sakhapov D.I., Lomakin Y.A., Khaibullin T.I., Granatov E.V., et al. // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. P. 1335. <https://doi.org/10.3389/fimmu.2017.01335>.
 16. Votteler J., Ogohara C., Yi S., Hsia Y., Nattermann U., Belnap D.M., King N.P., Sundquist W.I. // *Nature*. 2016. V. 540. P. 292–309. <https://doi.org/10.1038/nature20607>.
 17. Menzin J., Caon C., Nichols C., White L.A., Friedman M., Pill M.W. // *J. Manag. Care Pharm.* 2013. V. 19. P. 24–40. <https://doi.org/10.18553/jmcp.2013.19.s1.s24>.
 18. Wollenberg A., Mommaas M., Oppel T., Schottdorf E.M., Günther S., Moderer M. // *J. Invest. Dermatol.* 2002. V. 118. P. 327–334. <https://doi.org/10.1046/j.0022-202x.2001.01665.x>.
 19. Fiani M.L., Barreca V., Sargiacomo M., Ferrantelli F., Manfredi F., Federico M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. P. 6318. <https://doi.org/10.3390/ijms21176318>.
 20. Szolnokoy G., Bata-Csörgö Z., Kenderessy A.S., Kiss M., Pivarsci A., Novák Z., Newman K.N., Michel G., Ruzicka T., Maródi L., et al. // *J. Invest. Dermatol.* 2001. V. 117. P. 205–213. <https://doi.org/10.1046/j.1523-1747.2001.14071.x>.
 21. Blyckers A., Schoonooghe S., Xavier C., D'Hoe K., Laoui D., D'Huyvetter M., Vaneycken I., Cleeren F., Bormans G., Heemskerck J., et al. // *J. Nucl. Med.* 2015. V. 56. P. 1265–1271. <https://doi.org/10.2967/jnumed.115.156828>.
 22. Ahn J.S., Agrawal B. // *Int. Immunol.* 2005. V. 17. P. 1337–1346. <https://doi.org/10.1093/intimm/dxh312>.
 23. Finkelshtein D., Werman A., Novick D., Barak S., Rubinstein M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. P. 7306–7311. <https://doi.org/10.1073/pnas.1214441110>.
 24. Kolangath S.M., Basagoudanavar S.H., Hosamani M., Saravanan P., Tamil Selvan R.P. // *VirusDisease*. 2014. V. 25. P. 441–446. <https://doi.org/10.1007/s13337-014-0229-5>.
 25. Yim N., Ryu S.-W., Choi K., Lee K.R., Lee S., Choi H., Kim J., Shaker M., Sun W., Park J., et al. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. P. 12277. <https://doi.org/10.1038/ncomms12277>.
 26. Nakase I., Noguchi K., Aoki A., Takatani-Nakase T., Fujii I., Futaki S. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 1991. <https://doi.org/10.1038/s41598-017-02014-6>.
 27. Lamichhane T.N., Jeyaram A., Patel D.B., Parajuli B., Livingston N.K., Arumugasaamy N., Schardt J.S., Jay S.M. // *Cell Mol. Bioeng.* 2016. V. 9. P. 315–324. <https://doi.org/10.1007/s12195-016-0457-4>.
 28. O'Loughlin A.J., Mäger I., de Jong O.G., Varela M.A., Schiffelers R.M., El Andaloussi S., Wood M.J.A., Vader P. // *Mol. Ther.* 2017. V. 25. P. 1580–1587. <https://doi.org/10.1016/j.ymthe.2017.03.021>.
 29. Somiya M. // *J. Cell Commun. Signal.* 2020. V. 14. P. 135–146. <https://doi.org/10.1007/S12079-020-00552-9>.
 30. Dai S., Wei D., Wu Z., Zhou X., Wei X., Huang H., Li G. // *Mol. Ther.* 2008. V. 16. P. 782–790. <https://doi.org/10.1038/mt.2008.1>.
 31. Morse M.A., Garst J., Osada T., Khan S., Hobeika A., Clay T.M., Valente N., Shreeniwas R., Sutton M.A., Delcayre A., et al. // *J. Transl. Med.* 2005. V. 3. P. 9. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-3-9>.
 32. Escudier B., Dorval T., Chaput N., André F., Caby M.-P., Novault S., Flament C., Leboulaire C., Borg C., Amigorena S., et al. // *J. Transl. Med.* 2005. V. 3. P. 10. <https://doi.org/10.1186/1479-5876-3-10>.

УДК 57.085.23

Метод оценки эффективности работы системы эксцизионной репарации нуклеотидов *ex vivo*

А. А. Попов¹, К. Е. Орищенко^{2,3}, К. Н. Науменко¹, А. Н. Евдокимов¹, И. О. Петрусева¹,
О. И. Лаврик^{1,3*}

¹Институт химической биологии и фундаментальной медицины СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

²Институт цитологии и генетики СО РАН, Новосибирск, 630090 Россия

³Новосибирский национальный исследовательский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

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

Поступила в редакцию 06.02.2021

Принята к печати 23.04.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11430

РЕФЕРАТ Эксцизионная репарация нуклеотидов (ЭРН) – одна из основных систем репарации, которая отвечает за удаление широкого спектра объемных повреждений ДНК. Разработан метод анализа эффективности ЭРН в клетке (*ex vivo*), основанный на восстановлении продукции флуоресцентного белка TagRFP в результате репарации повреждений, блокирующих экспрессию соответствующего гена. Показано, что сконструированные плазмиды, содержащие объемные повреждения nFlu или nAnt вблизи промотора гена *tagrfp*, подвергаются репарации в эукариотических клетках (НЕК 293Т) и могут быть использованы для анализа эффективности ЭРН *ex vivo*. Сравнительный анализ временной зависимости накопления флуоресцентных клеток после трансфекции nFlu- и nAnt-ДНК выявил различия в эффективности их репарации системой ЭРН клеток НЕК 293Т. Разработанный метод может быть использован для сравнения репаративного статуса клеток и эффективности репарации повреждений разной структуры.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА эксцизионная репарация нуклеотидов, методы *ex vivo*, повреждения ДНК.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ЭРН – эксцизионная репарация нуклеотидов; ОДН – олигодезоксирибонуклеотид; АТФ – аденозинтрифосфат; nFlu – N-[6-(5(6)-флуоресцеинилкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол; nAnt – N-[6-(9-антраценилкарбамоил)гексаноил]-3-амино-1,2-пропандиол; MCS – сайт множественного клонирования.

ВВЕДЕНИЕ

Система эксцизионной репарации нуклеотидов (ЭРН) с высокой эффективностью удаляет из ДНК объемные повреждения, возникающие в результате воздействия различных факторов – химически активных соединений, УФ- и рентгеновского излучения. Существуют два типа ЭРН. Общегеномная ЭРН отвечает за поиск и удаление объемных повреждений во всем геноме, независимо от его функционального состояния, используя для первичного распознавания места повреждения комплексы фактора ХРС [1]. ЭРН, связанная с транскрипцией, активируется при блокировании продвижения транскрипционного комплекса РНК-полимеразы II объемным повреждением в транскрибируемой цепи ДНК [2]. Примерно 30 белковых факторов и ферментов, одинаковых для обоих типов ЭРН, формируют затем на ДНК ряд комплексов, осуществляющих удаление повреждения, репаративный синтез и лигирование.

Использование подходов, ориентированных на изучение структуры и функций белков-участников ЭРН, позволило выяснить механизм процесса, определить основные этапы, влияющие на эффективность его протекания, а также состав и структуру мультибелковых комплексов, возникающих и функционирующих на разных этапах ЭРН [1, 3]. Активность эукариотической системы ЭРН *in vitro* в большинстве работ оценивают с использованием протяженных ДНК, содержащих в заданной позиции природные объемные повреждения, либо их синтетические аналоги, а также фракционированные экстракты клеток, содержащие набор белков ЭРН (ЭРН-компетентные экстракты) [4, 5]. Тем не менее, актуальной как для фундаментальных, так и для прикладных исследований остается разработка подходов, нацеленных на исследование и сравнение эффективности протекания репарации объемных повреждений в живых клетках (*ex vivo*).

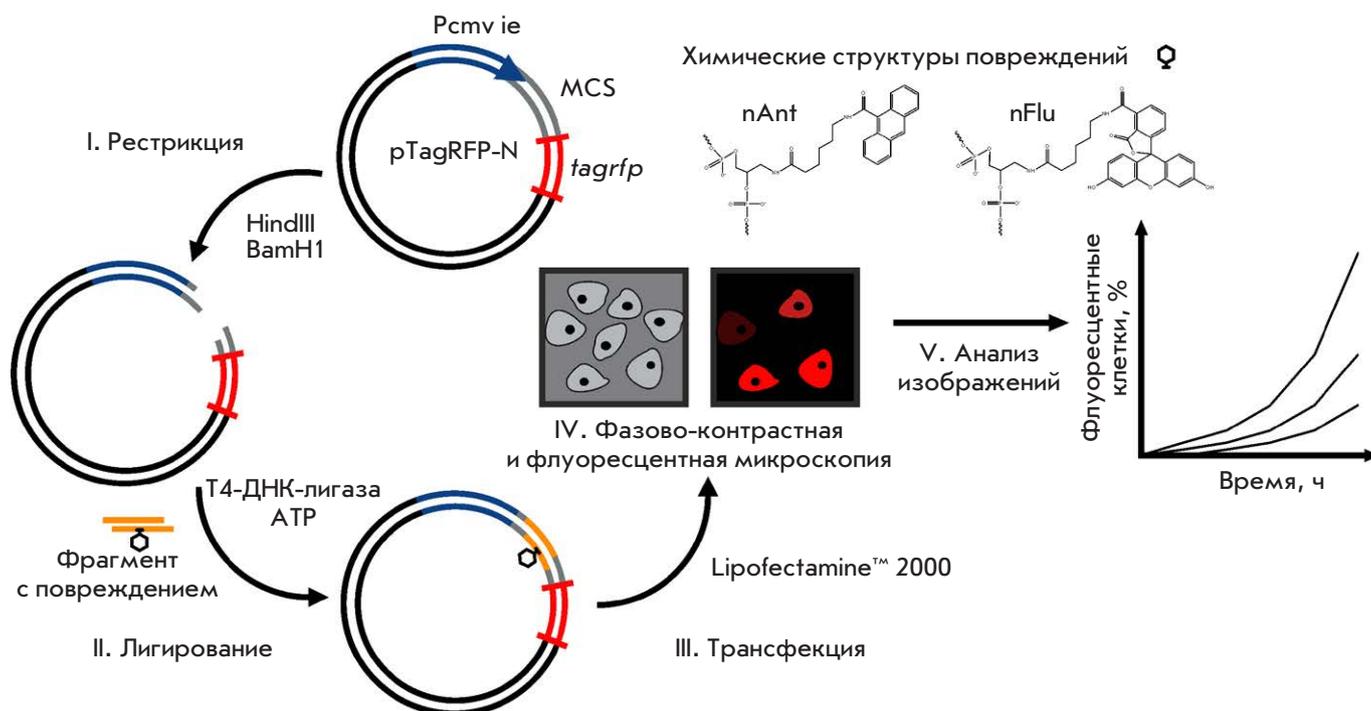


Рис. 1. Схема метода оценки эффективности работы системы ЭРН *ex vivo*

В данной работе приведено описание разработанного нами метода, который позволяет проводить такие оценки с использованием модельных плазмид с объемным повреждением вблизи промоторной области гена, кодирующего флуоресцентный белок TagRFP. Схема создания модельных плазмид с объемным повреждением и оценки эффективности ЭРН *ex vivo* путем наблюдения за результатом восстановления репаративным аппаратом эукариотических клеток экспрессии репортерного флуоресцентного белка, нарушенной присутствием объемного повреждения в ДНК, представлена на рис. 1.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки НЕК 293Т культивировали в среде IMDM (Gibco) с добавлением 10% FBS (Gibco), 1% GlutaMAX™ Supplement (Gibco), 10^5 ед./л пенициллина, 100 мг/л стрептомицина, 2,5 мг/л амфотерицина β, при температуре 37°C и 5% CO₂.

ОДН для создания вставок синтезированы в лаборатории биомедицинской химии (ИХБФМ СО РАН) по методике, описанной в работе [5]. Последовательности ОДН приведены в таблице.

Из плазмиды pTagRFP-N с помощью эндонуклеаз рестрикции HindIII и BamHI («СибЭнзим») вырезали участок длиной 38 п.н. (622–660 п.н., MCS) путем инкубации 1 мкг плазмиды с 1 ед. HindIII и 1 ед. BamHI в буфере W («СибЭнзим») в течение 1 ч при 37°C. После инактивации ферментов (70°C, 20 мин) и осаждения ДНК по стандартной методике [6], линейари-

Последовательности ОДН

№	ОДН
1	5'-P- <i>agctgctgctcatctc</i> gagatctgagtagtacattggattgccattctccgagtgattaccgtgacg-3'
2	5'-P- <i>gatccgtcacggtaata</i> caactcggagaatggcaatccaat M1 tactcagatctcagatgagcagc-3', где M1 – nFlu
3	5'-P- <i>gatccgtcacggtaata</i> caactcggagaatggcaatccaat M2 tactcagatctcagatgagcagc-3', где M2 – nAnt

зованную плазмиду растворяли в воде и добавляли 40-кратный молярный избыток ДНК-вставки, 2 ед. T4-ДНК-лигазы («СибЭнзим») в SE-буфере и 5 мМ АТФ. Лигирование плазмиды проводили при температуре 12°C в течение 16 ч, затем реакционную смесь прогревали (65°C, 20 мин), а ДНК, содержащуюся в реакционной смеси после лигирования, разделяли в 0.8% агарозном геле. Кольцевую плазмиду с введенными вставками элюировали из агарозного геля с использованием набора для элюции ДНК (diaGene) согласно протоколу производителя.

Трансфекцию клеток плазмидой проводили с помощью Lipofectamine™ 2000 (Invitrogen) согласно протоколу производителя. Клетки рассаживали на 24-луночный планшет в количестве 2.5×10^4 клеток на лунку в 500 мкл культуральной среды, не содержащей антибиотиков. По достижению 50–70% конfluence среды удаляли и добавляли к клеткам комплекс плазмиды (150 нг) с реагентом Lipofectamine™ 2000 в среде, не содержащей сыворотки. Флуоресценцию регистрировали с исполь-

зованием системы для длительного прижизненно-го наблюдения за клетками Cell-IQ MLF (Chip-Man Technologies, Финляндия) в ЦКП клеточных технологий ФИЦ ИЦиГ СО РАН. Съемку клеток проводили с интервалом 10 мин в режимах фазового контраста и флуоресценции с использованием $\times 10$ объектива Nikon CFI Plan Fluorescence DL. Полученные изображения анализировали с помощью программы ImageJ и программного обеспечения Cell-IQ Analyser.

Статистический анализ осуществляли с помощью программы Statistica 10. Все эксперименты проведены минимум 3 раза, а статистическую значимость определяли, используя *t*-критерий Стьюдента.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Подход, основанный на реактивации экспрессии флуоресцентных белков после удаления повреждения из ДНК, блокирующего их экспрессию, ранее успешно применяли в исследованиях ЭРН [7, 8]. Мы решили модифицировать этот подход и регистрировать флуоресцентный сигнал в живых клетках с помощью оборудования для прижизненных исследований Cell-IQ MLF, которое сочетает в себе микроскоп с фазово-контрастным и флуоресцентным режимами съемки, а также систему для подачи CO₂ и поддержания температуры, обеспечивающую создание оптимальных для клеток условий при достаточно длительном процессе съемки. Прилагаемое к оборудованию программное обеспечение позволяет анализировать изображения и извлекать информацию об общем количестве и количестве клеток, экспрессирующих флуоресцентные белки, интенсивности флуоресцентного сигнала, подвижности клеток, а также анализировать другие параметры.

Для создания ДНК с объемными повреждениями использовали вектор pTagRFP-N (4.7 т.п.н.), ко-

торый содержит ген *tagrfp*, кодирующий мономерный флуоресцентный белок RFP морских актиний *Entactmaea quadricolor* [9]. Преимущества использования TagRFP заключаются в генерируемом ярком флуоресцентном сигнале, стабильности белка при высоких значениях pH, быстром созревании, а также в отсутствии токсического влияния на клетки. Ген *tagrfp* находится под контролем раннего промотора цитомегаловируса (Pcmv ie), вблизи которого находится сайт множественного клонирования (MCS) с участками узнавания различных эндонуклеаз рестрикции, что дает возможность клонирования необходимой ДНК-вставки в данную область.

Синтезированы рекомбинантные плазмиды, содержащие объемные повреждения nFlu и nAnt (далее nFlu- и nAnt-ДНК соответственно). Выраженные субстратные свойства данных повреждений, выявленные в реакции специфической эксцизии, катализируемой белками ЭРН различных клеточных экстрактов *in vitro* [5, 10], учитывали при использовании nFlu и nAnt для создания модельных плазмид.

Проанализирована эффективность протекания ЭРН nFlu- и nAnt-ДНК в клетках эмбриональной почки человека НЕК 293Т. Оценено время появления клеток, флуоресценция которых свидетельствовала о восстановлении экспрессии белка TagRFP (рис. 2). В качестве контроля использовали плазмиду, содержащую ДНК-вставку без объемного повреждения. Оценка количества флуоресцентных клеток в общей популяции клеток с помощью Cell-IQ Analyser и ImageJ выявила различия в эффективности репарации nAnt- и nFlu-ДНК. В случае клеток, для трансфекции которых использовали nAnt-ДНК, первые флуоресцентные клетки можно было наблюдать через 10 ч после трансфекции, в то время как в случае nFlu-ДНК время появления первых флуоресцент-

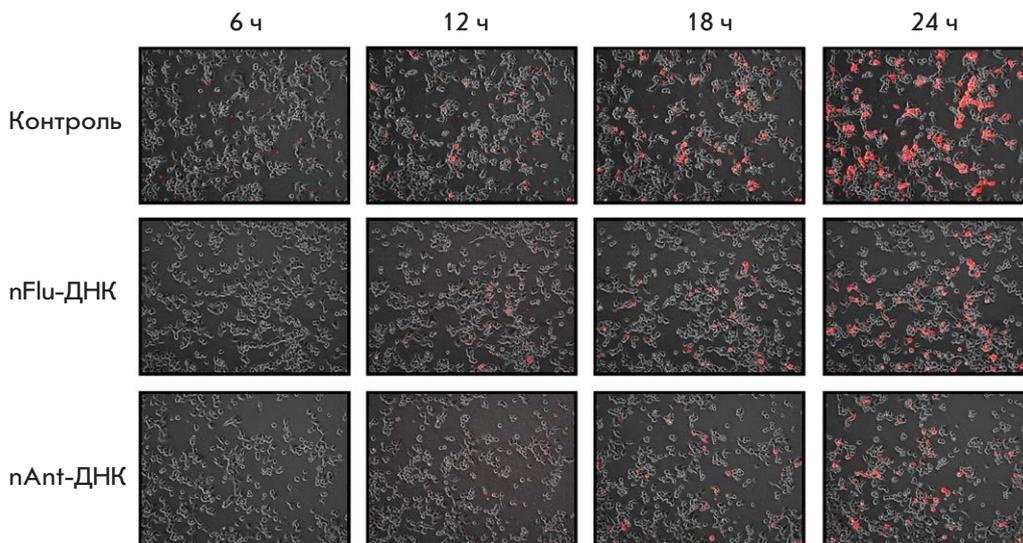


Рис. 2. Экспрессия TagRFP в клетках НЕК 293Т, трансфицированных плазмидными ДНК. Представленные изображения получены путем наложения флуоресцентных и фазово-контрастных снимков с помощью ImageJ. Слева указаны типы плазмидных ДНК-субстратов; сверху – время после трансфекции клеток

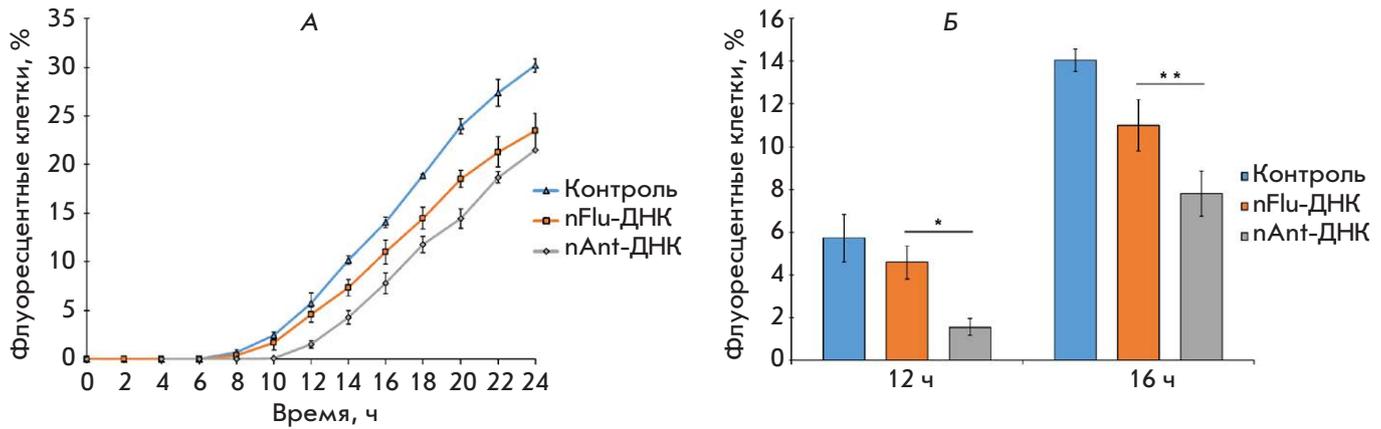


Рис. 3. Анализ эффективности ЭРН плазмидных ДНК *ex vivo* в клетках НЕК 293Т. А – график изменения количества флуоресцентных клеток (%) во времени после трансфекции плазмидными ДНК; Б – репрезентативная диаграмма, демонстрирующая различия в количестве флуоресцентных клеток, трансфицированных nFlu- или nAnt-ДНК, через 12 и 16 ч после трансфекции. Статистические уровни значимости соответствуют * $p < 0.01$ и ** $p < 0.05$

ных клеток составило 8 ч (рис. 3А). Через 12 ч после трансфекции клеток nAnt-ДНК количество флуоресцентных клеток составило $1.56 \pm 0.39\%$, в то время как в случае nFlu-ДНК количество флуоресцентных клеток составило $4.59 \pm 0.76\%$ (рис. 3Б). Для достижения близкого количества флуоресцентных клеток, трансфицированных nAnt-ДНК, потребовалось еще 2 ч, и через 14 ч оно составило $4.27 \pm 0.67\%$.

Репарация nFlu-ДНК проходит быстрее, чем nAnt-ДНК, что согласуется с результатами изучения репарации nAnt- и nFlu-содержащих ДНК-дуплексов *in vitro* в присутствии белков ЭРН-компетентных экстрактов различных линий раковых клеток (HeLa, SiHa, С33А) [5].

Существует много факторов, определяющих разницу в эффективности удаления объемных повреждений системой ЭРН. Это могут быть структурные различия повреждений, определяющие характер первичного узнавания поврежденного участка и эффективность последующей верификации повреждения белками комплекса ТРПН [11], а также скорость и эффективность ответа системы ЭРН различных

клеток на повреждающее воздействие. Дальнейшее изучение ЭРН с использованием комбинации методов *in vitro* и *ex vivo* может способствовать значительному прогрессу в понимании функционирования данного процесса в клетках эукариот.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, предложенный нами метод позволил определить эффективность удаления объемных повреждений nAnt и nFlu из модельных плазмид системой ЭРН клеток НЕК 293Т. Метод является перспективным инструментом изучения ЭРН, он позволяет сравнивать как репаративный статус различных клеток, так и эффективность репарации повреждений различной структуры. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (проект № 19-74-10056), получение и анализ изображений частично выполнены в рамках бюджетного проекта № 0259-2021-0011.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Schärer O.D. // Cold Spring Harb. Perspect. Biol. 2013. V. 5. № 10. P. 1–20.
- Svejstrup J.Q. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2002. V. 3. № 1. P. 21–29.
- Luijsterburg M.S., von Bornstaedt G., Gourdin A.M., Politi A.Z., Moné M.J., Warmerdam D.O., Goedhart J., Vermeulen W., van Driel R., Höfer T. // J. Cell Biol. 2010. V. 189. № 3. P. 445–463.
- Reardon J.T., Sancar A. // Methods Enzymol. 2006. V. 408. P. 189–213.
- Evdokimov A., Petrusheva I., Tsidulko A., Koroleva L., Serpokylova I., Silnikov V., Lavrik O. // Nucl. Acids Res. 2013. V. 41. № 12. P. 1–10.
- Maniatis T., Fritsch E.F., Sambrook J. Molecular Cloning: A Laboratory Manual. Cold Spring Harbor, Cold Spring Harbor University Press, 2001. 2231 p.
- Kitsera N., Gasteiger K., Lühnsdorf B., Allgayer J., Epe B., Carell T., Khobta A. // PLoS One. 2014. V. 9. № 4. P. 1–6.
- Kitsera N., Rodriguez-Alvarez M., Emmert S., Carell T., Khobta A. // Nucl. Acids Res. 2019. V. 47. № 16. P. 8537–8547.
- Merzlyak E., Goedhart J., Shcherbo D., Bulina M., Shcheglov A., Fradkov A., Gaintzeva A., Lukyanov K., Lukyanov S., Gadella T.W.J., et al. // Nat. Methods. 2007. V. 4. № 7. P. 555–557.
- Lukyanchikova N., Petrusheva I., Evdokimov A., Silnikov V., Lavrik O. // Biochem. 2016. V. 81. № 3. P. 263–274.
- Batty D.P., Wood R.D. // Gene. 2000. V. 241. № 2. P. 193–204.

Рецензия на учебник «Иммунология» (2021 г., автор – академик РАН Р.М. Хаитов)

Учебник «Иммунология», 4-е издание (сентябрь 2021 г.), подготовил известный советский и российский ученый с мировым именем, иммунолог, доктор медицинских наук, профессор, академик РАН Рахим Мусаевич Хаитов. Новое издание – это обновленная, переработанная и дополненная, версия учебника, который за последние 15 лет стал одним из лучших учебников по иммунологии. Он используется повсеместно. По всей России и в странах СНГ по нему учатся студенты вузов медицинского и биологического профилей, по нему готовятся врачи, избравшие профессию аллергологов и иммунологов, им пользуются исследователи в самых разных естественных науках – иммунологии, аллергологии, микробиологии, вирусологии, инфектологии, вакцинологии и других смежных с ними науках. Словом, учебник «Иммунология» Р.М. Хаитова – это один из лучших в нашей стране, один из самых востребованных и признанных учебников.

В чем достоинства этого учебника? В чем причины успеха прежних изданий и основы для успеха нового, 4-го, издания? Тут много факторов и все они важны:

- хороший, доступный язык изложения;
- множество иллюстраций, облегчающих понимание и освоение нового материала;
- простота объяснения очень сложных живых систем и процессов;
- широкий, практически всеобъемлющий, охват областей иммунологии;
- современность, представление самых последних достижений в областях науки, которым учит этот учебник;
- достоверность и научное качество сведений, составляющих содержание учебника;
- практическая ориентированность научных знаний, всегда направленная на их полезное применение в интересах здоровья человека.

Современное научное знание об иммунитете – это огромный объем сведений. Учебник иммунологии должен помочь студентам медицинских или биологических вузов понять и запомнить самое важное и, при этом, не утопить обучающихся в изобилии научных фактов, способах их получения, значении этих знаний для нашей иммунной защиты от различных опасностей.

ДОСТУПНОСТЬ, ИЛЛЮСТРИРОВАННОСТЬ, ПРОСТОТА

Сколь угодно сложные структуры и процессы, их взаимные влияния необходимо представить в учебнике для студентов в максимально упрощенном, понятном виде. Упрощая, нельзя исказить природу

живой системы, описываемых в ней объектов и событий. Недопустимо отойти от научного знания об этих объектах и явлениях, с ними связанных. Для схематизации и упрощения сложных процессов полезны графические иллюстрации, и к ним предъявляются те же требования – не исказить действительности, не сформировать ложных представлений, которые не соответствуют истинной природе описываемых объектов и явлений.

В учебнике Р.М. Хаитова схемы и пояснения к ним просты и понятны, вполне соответствуют строгим научным представлениям, достаточны для быстрого понимания и запоминания, что является несомненным достоинством этой книги.

ПОЛНОТА ОХВАТА

Учебник иммунологии должен отразить или хотя бы обозначить все самые значительные области иммунологии. Именно таким и является учебник Р.М. Хаитова. При самом придирчивом анализе не удастся найти каких-либо значительных разделов современной иммунологии, которых бы не было в книге Р.М. Хаитова. Специализированные области иммунологии, такие, как иммунология опухолей и иммунология старения, без сомнений, не включены в структуру этого учебника преднамеренно. Эти разделы иммунологии оставлены для самостоятельных, специализированных учебников, поскольку указанные области науки очень сложны и их целесообразно рассматривать отдельно, обстоятельно и всерьез. Впрочем, автор может восполнить этот пробел в следующем издании учебника, так как им опубликован ряд оригинальных и обзорных статей по этой теме. В частности, монография «Иммунитет

и рак» (Р.М. Хаитов, З.Г. Кадагидзе, ГЭОТАР-Медиа, 2018). Это же касается и иммунологии старения. Р.М. Хаитов опубликовал достаточно экспериментальных и обзорных статей по иммунологии старения.

В учебнике Р.М. Хаитова есть всё, что составляет содержание науки иммунология:

(а) понимание предназначения иммунитета, его особенной роли, границ ответственности этой системы в организме живого существа;

(б) знание, что функция иммунной защиты обеспечивается определенными типами клеток и молекул, процессами, в которых они участвуют и которые они выполняют;

(в) сведения о природе и свойствах многих сотен типов и подтипов клеток, стадий их развития и преобразования в ходе выполнения своих функций. Детальные знания о большом разнообразии веществ, обеспечивающих координированное функционирование клеточных сообществ и, в конечном счете, иммунную защиту живого существа;

(г) знания о процессах иммунного реагирования и иммунной защиты на всех уровнях: от уровня целого организма, его отдельных органов и систем до уровня клеток, молекул и атомов, составляющих эти молекулы, реакций, в которых происходят химические и физические превращения на молекулярном и супрамолекулярном уровнях.

Особо следует отметить, что значительная часть учебника посвящена патологическим процессам, при которых функционирование иммунной системы значительно нарушено – иммунные дефициты, аллергия, аутоиммунные болезни. Это – несомненное достоинство учебника. В этих разделах фундаментальные знания иммунологии проецируются на клинически значимые, практически важные области медицины. Яркими примерами успешного клинического применения указан путь от фундаментальной иммунологии к практике медицины и здоровью человека, что очень важно при обучении нового поколения медиков и биологов.

(д) большой интерес представляет раздел по вакцинации. Сформулированы требования к вакцинирующим препаратам. Рассмотрены новые поколения вакцин, в том числе векторные вакцинирующие препараты (Гам-КОВИД-Вак) против новой коронавирусной инфекции SARS-CoV-2, вакцины на основе нуклеиновых кислот (ДНК- и РНК-вакцины), аллерговакцины.

СОВРЕМЕННОСТЬ И НОВИЗНА

Учебник иммунологии обязан содержать фундаментальные знания, многие из которых добыты давно. Студенту необходимо узнать основополагающие

факты, о которых ученые узнали год, десять или сто лет назад. То есть в учебнике должна быть представлена информация, ставшая классической и неоднократно описанная во многих предшествующих учебниках и руководствах по иммунологии. В то же время хороший учебник обязан быть максимально современным, содержать самые последние достижения в данной области науки и техники. Сочетание классического знания и суперсовременных сведений в одном издании – это сложная задача для автора. Классику описать не сложно, да и то нельзя просто переписать у предшественников. Нужно умудриться подать фундаментальные основы, хорошо известные всем специалистам в данной области, в каком-то оригинальном виде, при этом, не потеряв главного – сути этих принципиальных знаний. Так в иммунологии из учебника в учебник кочуют сведения о структуре иммуноглобулинов и генов, кодирующих эти белки, о факторах и реакциях в системе комплемента, о механизмах экстравазации лейкоцитов при воспалении и многие другие классические знания, которые не менялись в течение десятилетий, но без которых трудно представить полноценный учебник иммунологии.

Наряду с классическими, основополагающими сведениями, учебник должен дать самые последние, самые современные достижения, открытия, факты, знания. А это – совершенно иной пласт науки. Это то, что интенсивно разрабатывается и изучается в настоящее время, обсуждается на периодических встречах профессионалов (конгрессы, конференции, симпозиумы, рабочие совещания), публикуется в профессиональных научных журналах. В учебнике должны быть охвачены все значительные области иммунологии, но следить за публикацией последних достижений во всех областях очень сложно или почти невозможно. Это – одна из самых трудных задач для автора учебника. Несмотря на трудность задачи, в рецензируемом издании Р.М. Хаитову удалось представить как общие, классические сведения, формирующие основы иммунологии, так и наиболее интересные и перспективные новые достижения этой науки.

СЛОЖНОСТЬ ПОНИМАНИЯ И ПРЕДСТАВЛЕНИЯ СОВРЕМЕННЫХ ЗНАНИЙ В УЧЕБНИКЕ ДЛЯ СТУДЕНТОВ

Последние годы сильно изменили биологию в целом и иммунологию в частности. Виной тому – технологическая революция, которая произошла в последние 20–25 лет и по сей день продолжается с нарастающей скоростью. Эта революция основывается на создании мощных компьютеров с огромными скоростями действия и практически неограниченными объемами памяти. Важно и то, что эти

компьютеры стали доступны всем, ими можно пользоваться, выходя в сеть со своего ноутбука. В свою очередь, мощные компьютерные системы позволили создать автоматизированные системы анализа, синтеза, секвенирования, измерения концентраций тысяч веществ и многое другое, что потрясает воображение. Раньше иммунологи анализировали одну или несколько клеточных популяций, один или несколько клеточных белков (цитокины, хемокины, рецепторы и т.д.), измеряли экспрессию мРНК одного или нескольких генов. Теперь в одном анализе можно получать данные об экспрессии всех (более 20 тысяч) генов, продукции сотен белков, структуре миллионов рецепторов (TCR- и BCR-секвенирование). Современные системы и методы исследования дают гигантские массивы данных, которые невозможно анализировать, как раньше. Чтобы соответствовать современному уровню, биолог (иммунолог) теперь не может ограничиться флуоресценцией одного или нескольких белков в клетке (микроскопия, цитометрия) или измерением уровня экспрессии мРНК одного или нескольких генов (РВ-ПЦР), или измерением концентрации нескольких цитокинов в биологической жидкости (иммуоферментный или иммуохемилюминесцентный анализы). Теперь метод РНК-секвенирования дает возможность оценить экспрессию мРНК сразу всех генов, а мультиплексные методы протеомики – продукцию сразу многих сотен белков. Раньше иммунолог окрашивал интересующий его белок на гистологическом срезе (иммуногистохимия), а теперь мультиплексная иммуногистофлуоресценция использует окрашивание до 50 молекулярных маркеров на одном гистологическом срезе, что позволяет типировать каждую клетку, а затем переводить эту информацию в виртуальный (компьютерный) образ, где уже нет среза, но есть вся информация о нем. Такой виртуальный гистологический срез содержит информацию о каждой клетке, ее позиции и молекулярных особенностях, о размерах и форме клеток, о количестве клеток разных типов, о контактах любых клеток друг с другом, о дистанции между клетками одного типа или клетками разных типов, о клеточных скоплениях и сообществах и т.д., и т.п. Компьютерная система может содержать подобную информацию о сотнях полей зрения на одном срезе, может сравнивать десятки и сотни разных срезов между собой. Компьютерные системы обу-

чены реконструировать структуру ткани в объеме (виртуальные 3D-изображения), могут «крутить» это изображение в пространстве, позволяя исследователю лучше рассмотреть какие-то детали. То есть современные автоматизированные и компьютеризированные системы могут делать то, что никак не мог бы сделать гистолог. Возможности такого современного анализа бесконечно большие, но его не может выполнять классический биолог, гистолог или иммунолог. Слишком велики массивы данных. Чтобы с ними работать, нужны специальные программы и специально обученные профессионалы, биоинформатики.

Как следствие описанной революции, которая привела к получению гигантских объемов сведений в каждом современном анализе, произошла радикальная трансформация научных публикаций в биологии вообще и в иммунологии в частности. Современные научные статьи уже настолько насыщены информацией, настолько сложны для понимания, что даже многим классическим иммунологам «не по зубам». Статьи изобилуют Heat map, PCA plot, TSNE plot, UMAP plot, Cluster map, Volcano plot и еще десятками других форм презентации данных. Понять, что в них содержится, слишком сложно даже зрелым профессионалам-иммунологам. А как эту самую современную информацию трансформировать в простые и понятные формы для студентов, только начинающих осваивать основы иммунологии? Это весьма непростая задача для автора учебника.

На этом самом современном уровне еще сложнее охватить все новое, что публикуется во всех значительных областях иммунологии. Исследователь может читать и знать новости в своей области науки, в которой он работает, а автор учебника должен знать все, должен успевать следить за стремительным развитием всех областей иммунологии. Это – почти невыполнимая задача. Остается лишь удивляться и с большим уважением констатировать, что Р.М. Хаитову это удалось. 4-е издание учебника «Иммунология» содержит все значительные достижения иммунологии последних лет.

Не вызывает сомнений, что 4-е издание учебника «Иммунология» Р.М. Хаитова будет по достоинству оценено студентами и преподавателями медицинских и биологических вузов, а также исследователями в самых разных областях медицины и биологии. ●

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 комплексные 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.