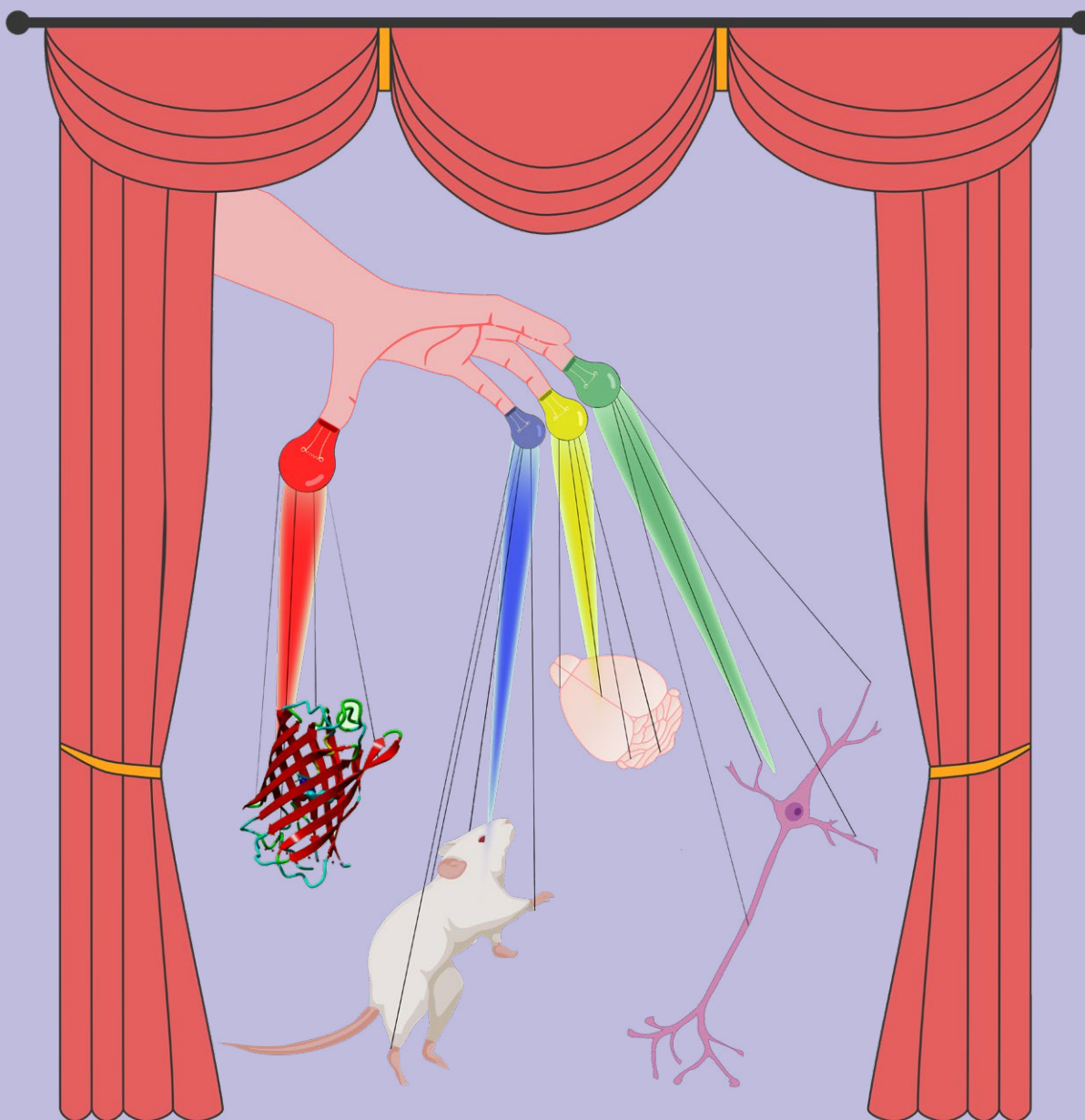


# Acta Naturae

Молекулярные инструменты направленного контроля электрической активности нервных клеток



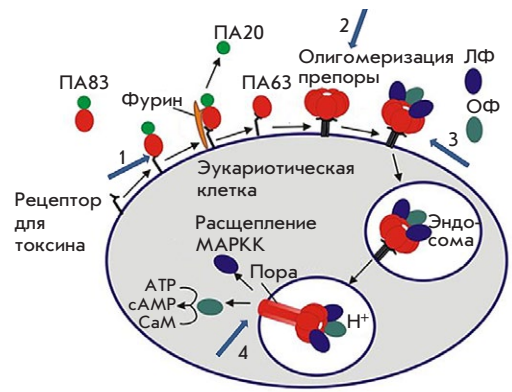
**НАНОАНТИТЕЛА – ПОТЕНЦИАЛЬНЫЙ  
ТЕРАПЕВТИЧЕСКИЙ ПРЕПАРАТ  
ПРОТИВ ЛИХОРАДКИ ЭБОЛА**  
**СТР. 53**

**СРАВНИТЕЛЬНЫЙ АНАЛИЗ СОДЕРЖАНИЯ  
МОНОАМИНОВ КАК НЕЙРОГОРМОНОВ  
В ЛИКВОРЕ И КРОВИ КРЫС В ОНТОГЕНЕЗЕ**  
**СТР. 89**

## Механизм блокирования активности летального токсина *Bacillus anthracis* моноклональными антителами

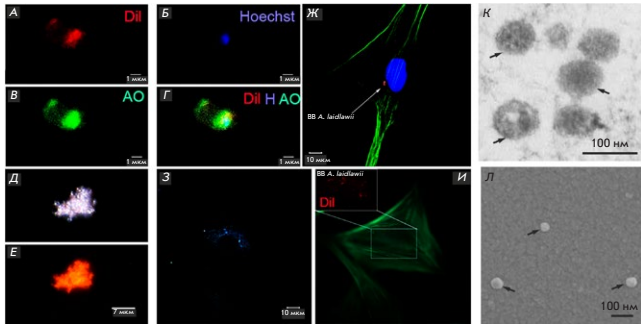
Я. О. Романенко, А. К. Рябко, М. А. Марьин, А. С. Карцева, М. В. Силкина, И. Г. Шемякин, В. В. Фирстова

Получено нейтрализующее моноклональное антитело 1E10 против летального токсина *Bacillus anthracis*. Изучен поэтапный механизм блокирования летального токсина моноклональным антителом 1E10. Обнаружено, что взаимодействие моноклонального антитела 1E10 с протективным антигеном приводит к ингибированию ферментативной активности летального фактора на этапе образования истинной поры.



Схематическая модель сборки и проявления активности токсинов *B. anthracis*

## Внеклеточные везикулы микоплазм способны проникать в клетки эукариот *in vitro* и модулировать их протеом



Взаимодействие фибробластов кожи человека с внеклеточными везикулами *A. laidlawii*

А. А. Музыкантов, Э. В. Рожина, Р. Ф. Фахруллин, М. О. Гомзикова, М. А. Золотых, О. А. Чернова, В. М. Чернов

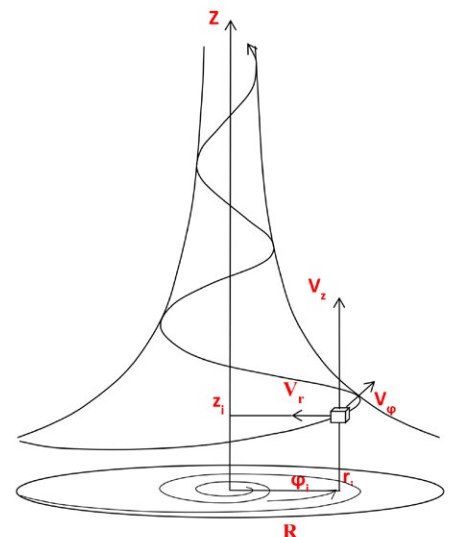
Внеклеточные везикулы, продуцируемые бактериями, опосредуют межклеточные взаимодействия и могут быть важными участниками механизмов персистенции инфекционных агентов. В работе впервые показано, что внеклеточные везикулы *Acholeplasma laidlawii* (класс Mollicutes) – убиквитарной микоплазмы, инфицирующей высших эукариот, являющейся также основным контаминантом клеточных культур и вакцинных препаратов, могут проникать в клетки эукариот и модулировать клеточный протеом.

## Гидродинамические особенности закрученного потока крови в левых отделах сердца и аорте

А. В. Агафонов, Е. А. Талыгин, Л. А. Бокерия, А. Ю. Городков

Предложен новый подход к количественному анализу гидродинамической структуры потока крови в проточном канале, начинающемся в левом предсердии и заканчивающемся в конце аорты. Этот подход основан на использовании концепции структурной организации смерчеобразных закрученных струй в каналах определенной геометрической конфигурации.

Схематическое изображение закрученной струи с обозначением направления осей координат и векторов составляющих скорости



# Acta Naturae

ТОМ 13, № 4 (51), ОКТЯБРЬ—ДЕКАБРЬ 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. Габиров, С.Н. Кочетков

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

## Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре

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

Руководитель проекта: Н.В. Соболева

Выпускающий редактор: Н.Ю. Деева

Подготовка иллюстраций: К.К. Опарин

Верстка: К.К. Опарин

Корректурa: Р.С. Шаймарданова

Дизайн-проект: Х. Шнайдер

WEB-редактор: О.Б. Семина

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 декабря 2021 г.

Тираж 100 экз. Цена свободная.

Отпечатано в типографии: НИУ ВШЭ,  
г. Москва, Измайловское шоссе, 44, стр. 2

Включен в базы данных PubMed,  
Web of Science, Scopus, РИНЦ

Журнал Acta Naturae входит  
в Перечень ведущих периодических  
изданий Высшей аттестационной комиссии  
Минобрнауки России

Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 1.845

## СОДЕРЖАНИЕ

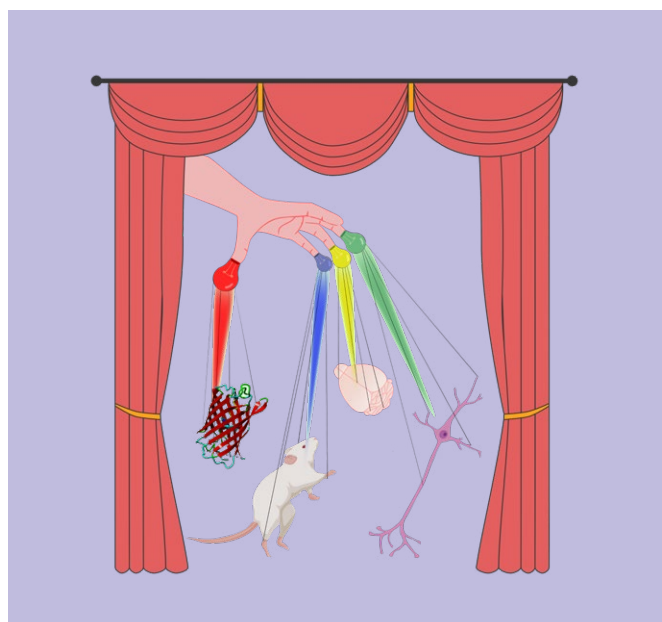
### ОБЗОРЫ

- А. В. Агафонов, Е. А. Талыгин,  
Л. А. Бокерия, А. Ю. Городков  
Гидродинамические особенности  
закрученного потока крови  
в левых отделах сердца и аорте..... 4
- Д. В. Колесов, Е. Л. Соколинская,  
К. А. Лукьянов, А. М. Богданов  
Молекулярные инструменты  
направленного контроля электрической  
активности нервных клеток. Часть II ..... 17

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Д. В. Воронина, Д. В. Щербляков,  
И. Б. Есмагамбетов, А. А. Деркаев,  
О. Попова, Д. Н. Щербинин  
Получение нейтрализующих  
наноантител к стеблевому домену  
гемагглютинаина вируса гриппа типа А ..... 33
- О. Е. Гичкун, О. П. Шевченко,  
Р. М. Курабекова, Н. П. Можейко,  
А. О. Шевченко  
Полиморфизм rs1800470 гена *TGFB1*  
связан с фиброзом миокарда  
у реципиентов сердца ..... 42

О. А. Дмитриева, Е. Д. Овчинникова, Е. А. Уткина, П. А. Левашов, О. И. Афанасьева, И. Ю. Адамова, С. Н. Покровский Сорбент с синтетическим лигандом для удаления провоспалительных и проатерогенных компонентов из плазмы крови человека. .... 47	А. А. Музыкантов, Э. В. Рожина, Р. Ф. Фахруллин, М. О. Гомзикова, М. А. Золотых, О. А. Чернова, В. М. Чернов Внеклеточные везикулы микоплазм способны проникать в клетки эукариот <i>in vitro</i> и модулировать их протеом. .... 82
И. Б. Есмагамбетов, Д. В. Щедляков, Д. А. Егорова, О. Л. Воронина, А. А. Деркаев, Д. В. Воронина, О. Попова, Е. И. Рябова, Д. Н. Щербинин, Е. И. Аксенова, А. Н. Семенов, М. С. Кунда, Н. Н. Рыжова, О. В. Зубкова, А. И. Тухватулин, Д. Ю. Логун, Б. С. Народицкий, С. В. Борисевич, А. Л. Гинцбург Наноантитела – потенциальный терапевтический препарат против лихорадки Эбола ..... 53	А. Р. Муртазина, Н. С. Бондаренко, Т. С. Пронина, К. И. Чандрян, В. В. Богданов, Л. К. Дильмухаметова, М. В. Угрюмов Сравнительный анализ содержания моноаминов как нейрогормонов в ликворе и крови крыс в онтогенезе ..... 89
Г. В. Какурина, М. Н. Стахеева, И. А. Бахронов, Е. Е. Середа, О. В. Черемисина, Е. Л. Чойнзонов, И. В. Кондакова Актинсвязывающие белки системного кровотока при раке гортани: связь с циркулирующими опухолевыми клетками и клетками иммунной системы ... 64	Я. О. Романенко, А. К. Рябко, М. А. Марьин, А. С. Карцева, М. В. Силкина, И. Г. Шемякин, В. В. Фирстова Механизм блокирования активности летального токсина <i>Bacillus anthracis</i> моноклональными антителами. .... 98
Т. Д. Лебедев, Э. Р. Вагапова, В. С. Прасолов Ингибирование ERK по-разному влияет на дифференцировку клеток нейробластомы, астроцитомы и рабдомиосаркомы. .... 69	Правила для авторов .....105
Е. С. Матюгина, М. С. Новиков, Л. И. Козловская, В. П. Волок, Е. Ю. Шустова, А. А. Ишмухаметов, С. Н. Кочетков, А. Л. Хандажинская Оценка противовирусного потенциала модифицированных гетероциклических оснований и 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов в отношении SARS-CoV-2 ..... 78	



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

УДК 612.133/.179+532.5.031

# Гидродинамические особенности закрученного потока крови в левых отделах сердца и аорте

А. В. Агафонов, Е. А. Талыгин, Л. А. Бокерия, А. Ю. Городков\*

Национальный медицинский исследовательский центр сердечно-сосудистой хирургии им. А.Н. Бакулева МЗ РФ, Москва, 121552 Россия

\*E-mail: agorodkov@bk.ru

Поступила в редакцию 26.04.2021

Принята к печати 12.07.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11439

**РЕФЕРАТ** Предложен новый подход к количественному анализу гидродинамической структуры потока крови в проточном канале, начинающемся в левом предсердии и заканчивающемся в конце аорты. Этот подход основан на использовании концепции структурной организации смерчеобразных закрученных струй в каналах определенной геометрической конфигурации. На основании большого количества экспериментальных данных показано, что на всем протяжении рассматриваемого канала существуют условия для генерации и поддержания закрученной структуры струи в течение всего сердечного цикла. В результате исследования появилось новое направление фундаментальной физиологии и медицины, имеющее большое практическое значение для диагностики и лечения расстройств кровообращения, сопровождаемых изменением геометрической конфигурации и биомеханических характеристик сердца и магистральных сосудов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** левое предсердие, левый желудочек сердца, аорта, закрученный поток крови.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АК – аортальный клапан; ГКМП – гипертрофическая обструктивная кардиомиопатия; ЛВ – легочные вены; ЛЖ – левый желудочек; ЛП – левое предсердие; МК – митральный клапан; МСКТ – мультиспиральная компьютерная томография; ПМ – папиллярные мышцы; УЛП – ушко левого предсердия;  $P_{лж}$  – давление в ЛЖ;  $P_{лп}$  – давление в ЛП.

## ВВЕДЕНИЕ

Органы и системы органов живого организма находятся в определенной иерархии, определяющей степень жизнеобеспечения. В этой иерархии первое место занимает система кровообращения, обеспечивающая бесперебойное и устойчивое функционирование всего организма. Это определяет широкий спектр состояний кровообращения, существующих без нарушения стабильности системы и обеспечивающих предельно высокий уровень ее адаптивности. Недостаточно изученным остается вопрос о том, что лежит в основе гидродинамической стабильности потока крови, который, на первый взгляд, не может быть организованной структурой в силу своей нестационарности, сложной геометрической формы подвижных обтекаемых граничных поверхностей, биологической нестабильности компонентов как жидкой среды, так и стенок проточных каналов. Тем не менее, система органов кровообращения способна функционировать с высокими напорно-

расходными характеристиками при малых затратах энергии, способна менять свои размеры в процессе роста и старения без потери стабильности, способна в несколько раз изменять производительность в пределах регуляторного резерва организма и поддерживать функцию за счет компенсации необратимых существенных геометрических и функциональных изменений в условиях патологии.

Все это требует наличия особого механизма, обеспечивающего такую стабильность (типа маятника в механических системах). Однако ни в фундаментальной физиологии, ни в клинической кардиологии такой механизм не обозначен и не исследован.

Действительно, вся история исследования кровообращения была основана на эмпирическом подходе. Не существует теоретической концепции, обосновывающей общие механизмы движения крови, а, следовательно, и методы исследования движения крови до сих пор не систематизированы и не направлены на общую цель – понимание механизма



доставки крови к органам-мишеням. В результате, утвердившиеся и признаваемые сегодня представления о движении крови содержат большое количество противоречий и допущений и не позволяют составить общее согласованное мнение, основанное на единых теоретических предпосылках.

Огромный массив данных, накопленных при исследованиях движения крови в сердце и аорте, не позволяет с достаточной точностью объяснить, каким образом относительно слабый мышечный насос перекачивает 4–5 л крови ежеминутно на протяжении человеческой жизни, преодолевая очевидно высокое сопротивление сосудистого русла; за счет чего достигается детерминированное распределение крови в местах ветвления сосудов; чем обеспечивается достаточный венозный возврат к сердцу; каковы механизмы регуляции и компенсации сердечного выброса и т.д.

Из всего, что известно в физиологии кровообращения, только один факт зарегистрирован феноменологически и не имеет функционального обоснования – это факт закрутки потока крови на всех этапах его эволюции в сердце и крупных артериальных сосудах. Этот факт был впервые зарегистрирован в начале 30-х годов [1], и в последние годы он многократно подтвержден с помощью современной диагностической техники [2–5]. Это явление изучал ряд исследовательских групп, однако результаты этих работ не позволили определить механизмы генерации закрутки потока и выделить достоверные количественные критерии оценки качества закрученной струи крови [6, 7]. Преимущества закрутки потока, декларируемые в проведенных исследованиях, сформулированы довольно туманно и сводятся к уменьшению размеров отрывных и застойных зон и предотвращению утолщения пограничного слоя вдоль пути эволюции потока крови [8]. В ряде работ указано, что закрутка потока в аорте связана с распределением поля скоростей сдвига вдоль стенки аорты и может оказывать влияние на атерогенез в аорте и крупных артериях [9]. Однако никто не пытался объяснить, к каким нежелательным для организма последствиям может привести нарушение закрутки (как это происходит, например, при установке механических протезов клапанов сердца). Тем не менее, известно, что клиническая эффективность реконструктивных кардиохирургических вмешательств выше, если в результате реконструкции восстановлена нормальная анатомическая конфигурация полости ЛЖ [10].

Многими авторами структура потока исследовалась с позиций известных течений – ламинарного и турбулентного, однако при этом не учитывался

факт закрутки потока, что не позволяло объяснить физиологический смысл этого феномена (например, [11]). Лишь в отдельных работах предпринимались такие попытки, но они были ограничены только общими рассуждениями о том, что закрутка потока, являясь физиологической нормой, благотворна для кровообращения [12]. Так, закрутку потока рассматривали как результат патологического изменения стенки аорты в результате стеноза или атерогенеза [13]. В большом цикле работ вихревые структуры, возникающие в полости левого желудочка, рассматривают как результат отрыва струи, заполняющей полость, с края створки митрального клапана [14, 15]. И только в серии работ, опубликованных с участием Н.Б. Кузьминой, утверждалось, что закрутка потока крови является имманентным свойством нормального кровообращения (см., например, [16]).

Закрученные течения широко распространены в природе [17, 18] и технологических процессах [19–23]. Несмотря на огромное количество экспериментальных и теоретических исследований, многие явления, связанные с закрученными потоками, до сих пор не поняты. В частности, отсутствуют общепринятые модели торнадо [17, 18], распада вихря [20] и процесса энергоразделения в вихревых трубах Ранка–Хилша [20–23]. Это затрудняет интерпретацию экспериментов, демонстрирующих сложную организацию взаимодействующих вихревых структур, которым часто сопутствует неустойчивость и турбулентность.

Простые приближенные модели закрученных течений можно искать среди точных решений уравнений гидродинамики [24, 25]. В частности, решения [24] являются групповыми инвариантными решениями уравнений Навье–Стокса и неразрывности [26]. Распространенную проблему представляет интерпретация инвариантных решений, как точных или асимптотических решений корректной начально-краевой задачи, имеющей физический смысл. Например, можно использовать эти решения для квазистационарного анализа сложных динамических систем. Другая проблема аналитического описания закрученных потоков связана с существованием большого количества парадоксов [27], возможностей коллапса, нарушения симметрии и гистерезиса [28].

При этом закрученные потоки нашли широкое применение в технике в виде струйных технологий, завихрителей, теплообменников, горелок и пр.

Предлагаемый обзор представляет собой попытку систематизации результатов, полученных в НМИЦ ССХ им. А.Н. Бакулева за последние 20 лет, с целью формирования непротиворечивой концепции

движения крови в сердце и магистральных сосудах на основании существующих представлений о центростремительных закрученных течениях вязкой жидкости.

**ТОЧНЫЕ РЕШЕНИЯ НЕСТАЦИОНАРНЫХ УРАВНЕНИЙ ГИДРОДИНАМИКИ ДЛЯ КЛАССА ЦЕНТРОСТРЕМИТЕЛЬНЫХ ЗАКРУЧЕННЫХ ТЕЧЕНИЙ ВЯЗКОЙ ЖИДКОСТИ**

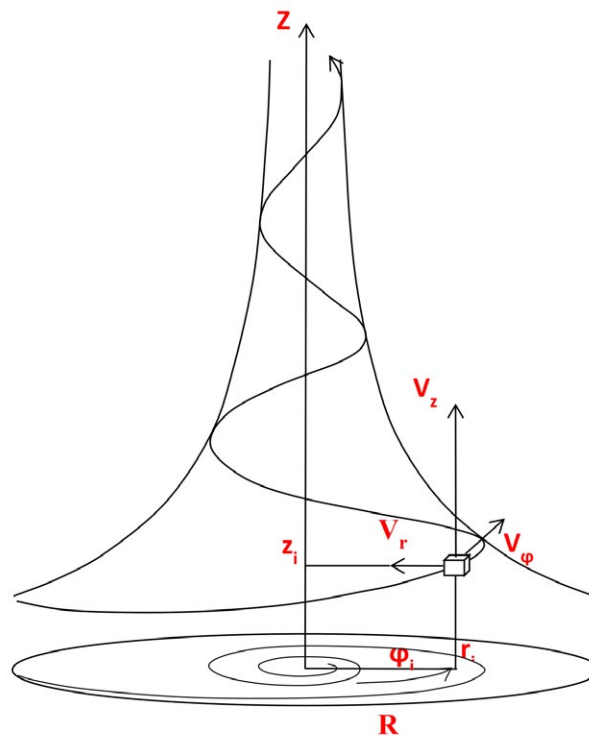
Уравнения Навье–Стокса описывают движение вязкой ньютоновской жидкости в классической гидродинамике и представляют собой систему дифференциальных уравнений в частных производных. Эти уравнения не имеют аналитического решения. Тем не менее, они широко применяются в математическом моделировании многих природных явлений и технических задач.

Качественный сдвиг в исследовании роли закрутки потока крови в насосно-транспортном сегменте системы кровообращения (сердце и магистральные артерии) стал возможным после обнаружения, идентификации и формального описания нового класса закрученных струй, возникающих на дне углублений определенной формы, обтекаемых потоком среды и названных смерчеобразными [29, 30]. Экспериментально показано, что смерчеобразные струи изменяют характер обтекания, существенно снижая гидродинамическое сопротивление и интенсифицируя теплообмен на таких поверхностях. Эти гидродинамические особенности позволили выдвинуть гипотезу о потенциальности обнаруженных струй в продольном и радиальном направлениях и получить точные решения уравнений Навье–Стокса и неразрывности, описывающие структуру течений этого класса (т.е. поле скоростей и давлений во всем объеме струи) при заданных начальных и граничных условиях [24, 25].

Полученные решения уравнений Навье–Стокса и неразрывности использованы нами для квазистационарного анализа особенностей течения крови в центральных отделах системы кровообращения. В соответствии с этими решениями, любое радиально сходящееся закрученное течение исчерпывающим образом можно охарактеризовать в цилиндрической системе координат через величины векторов скорости в продольном ( $u_z$ ), радиальном ( $u_r$ ) и тангенциальном ( $u_\varphi$ ) направлениях (рисунк). Тогда суммарная скорость  $u_\Sigma$  потока равна

$$u_\Sigma = \sqrt{u_r^2 + u_z^2 + u_\varphi^2}$$

А выражения для каждой из составляющих скорости в общем виде выглядят следующим образом:



Схематическое изображение закрученной струи с обозначением направления осей координат и векторов составляющих скорости

$$\begin{cases} u_r = C_0(t)r + \frac{2Bv}{r} \\ u_z = -2C_0(t)z + C_2(t) \\ u_\varphi = \frac{\Gamma_0(t)}{2\pi r} + \sum_i \frac{\Gamma_i(t)}{2\pi r} \Gamma[C_1 + 1, \beta_i(t)r^2] \end{cases}$$

где  $v$  – кинематическая вязкость;  $C_0(t)$ ,  $C_2(t)$ ,  $\Gamma_0(t)$ ,  $\Gamma_i(t)$ ,  $\beta_i(t)$  – произвольные функции времени,  $C_1$ ,  $B$  – произвольные константы.  $\Gamma[...]$  – гамма-функция Эйлера. Функция  $\beta_i(t)$  определяется выражением:

$$\beta_i(t) = \frac{\beta_0(t) \times e^{-2 \int_0^t C_0(\tau_1) d\tau_1}}{1 + 4v\beta_i(0) \int_0^t e^{-2 \int_0^{\tau_1} C_0(\tau_2) d\tau_2} d\tau_1}$$

где  $\beta_i(0)$  – произвольная постоянная.

В этом классе течений одна вихревая струя отличается от другой структурой азимутальной компоненты скорости  $u_\varphi$ , но общим признаком всех вихревых структур этого класса является потенциальность радиальной ( $u_r$ ) и продольной ( $u_z$ ) компонент скорости. Структура скорости простейшей закрученной струи из этого класса течений имеет вид:

$$\left\{ \begin{array}{l} u_z = 2C_0 z \\ u_r = -C_0 r \\ u_\varphi = \frac{\Gamma_0}{2\pi r} \left( 1 - e^{-\frac{C_0 r^2}{2\nu}} \right) \end{array} \right.$$

В приведенных выше соотношениях  $u_z$  – продольная,  $u_r$  – радиальная,  $u_\varphi$  – азимутальная компоненты скорости,  $C_0(t)$  – радиальный градиент скорости ( $c^{-1}$ ),  $\Gamma_0(t)$  – циркуляция струи ( $m^2/c$ );  $C_0(t)$ ,  $\Gamma_0(t)$  – независимые функции времени, изменяющиеся в силу нестационарности течения;  $\nu$  – кинематическая вязкость среды ( $m^2/c$ ).

Такие вихревые струи расходуют энергию в меру инерционности и вязкости закручиваемой среды за счет ее вращения с азимутальной скоростью  $u_\varphi$ . Основная диссипация при этом зависит от размера и интенсивности вихря и происходит в его приосевой зоне, имеющей радиус

$$R = \sqrt{\frac{2k\nu}{C_0}}$$

и представляющей собой ядро течения, где  $k$  – коэффициент, отражающий меру снижения азимутальной скорости в результате потери энергии в закрученной струе, а  $C_0$  – градиент скорости в вихре вдоль его радиуса. Этот размер определяет минимальный калибр канала, в котором при данных значениях скорости течения и вязкости среды может существовать закрученный поток рассматриваемого типа.

Приведенные выражения повторяют структуру вихря Бюргерса [31] с тем отличием, что они допускают возможность квазистационарного анализа струи в силу изменения во времени величин  $C_0$ ,  $\Gamma_0$  и геометрических соотношений в проточном канале. Однако приведенные уравнения не удовлетворяют условиям прилипания ни в продольном, ни в азимутальном направлениях, что требует предположения об особом типе взаимодействий на границе и в ядре потока.

Необходимо подчеркнуть качественное отличие этих струй от всего многообразия закрученных потоков, широко используемых в различных технических устройствах и представляющих собой закрученные турбулентные потоки, возникающие за счет принудительной закрутки среды.

Экспериментальные и теоретические исследования смерчеобразных струй указали на очевидные аналогии с известными свойствами потока крови и позволили объяснить многие, ранее казавшиеся противоречивыми, представления о механизмах генерации, эволюции и стабильности течений, формируемых в сердце [32–38].

## ОБОСНОВАНИЕ ПРИМЕНИМОСТИ «ТОЧНЫХ РЕШЕНИЙ» К АНАЛИЗУ ЗАКРУЧЕННОГО ПОТОКА КРОВИ

Прежде чем переходить к анализу этих аналогий, необходимо сформулировать, что является критически важным в осуществлении потока крови в рассматриваемом сегменте системы кровообращения.

Итак, чего мы ждем от потока крови в сердце и аорте?

1. Чтобы кровь находилась в непрерывном движении с достаточно высокой скоростью.

2. Чтобы форменные элементы крови двигались с одинаковой скоростью, не задерживаясь ни на одной стадии эволюции течения, совершая цикл газообмена с наибольшей эффективностью.

3. Чтобы было минимизировано взаимодействие между форменными элементами как друг с другом, так и с биологически активными белками крови в ядре потока (во избежание их активации), и взаимодействие форменных элементов и биологически активных белков крови с биологически активными стенками сердца и сосудов (особенно на тех стадиях, когда скорость течения высока) на границе потока. Иначе говоря, чтобы не было зон застоя и отрыва потока, а уровень сдвиговых напряжений был минимизирован.

4. Чтобы переход от одного типа течения к другому проходил без скачкообразных переходных процессов (вены–сердце–аорта–магистральные артерии).

5. Чтобы при изменении размеров (при росте организма) или функциональных характеристик проточных каналов (при старении) не возникало скачкообразных переходных процессов.

6. Чтобы производительность системы в рассматриваемом сегменте могла существенно меняться (в разы) при минимальном изменении геометрических размеров для обеспечения регуляторного резерва системы.

7. Чтобы система имела возможность функционировать и стабилизироваться при необратимом, но не катастрофическом изменении геометрической конфигурации или функциональных характеристик (подвижности, эластичности границ), обеспечивая компенсаторный резерв системы.

«Точные решения», описывающие структуру струи, возникающей при обтекании углубления определенной формы [24, 25], позволяют сформулировать основные свойства течений рассматриваемого класса, которые подтверждены экспериментально. Основными из них являются:

1. Уменьшение потерь энергии на трении (вязкости). Это означает, что напряжения, возникающие в ядре потока и на его границе, существенно сниже-



ны. Этот феномен подтвержден экспериментально при измерении сопротивления обтекания поверхностей с нанесенными углублениями. Показано, что закрученные струи, возникающие в углублениях и встраивающиеся в основной поток, обеспечивают существенное достоверное снижение гидродинамического сопротивления [13].

2. Структурная организация, т.е. движущиеся элементы среды перемещаются вдоль линий тока, форма которых predetermined и представляет собой осесимметричную сходящуюся спираль. Трубка тока представляет собой гиперболоид вращения второго порядка. В пределах трубки тока все элементы среды движутся с одинаковой угловой скоростью. Структурная организация струи достигается при внешних побудителях закрутки – предварительной закрутке среды, асимметрии образующей поверхности относительно оси струи, направляющих лопаток, закручивающих поток.

3. Поперечные градиенты давления. В силу вращения струи в ее осевой зоне возникает область пониженного давления. Чем больше азимутальная составляющая скорости, тем выше градиенты динамического давления, направленные поперек струи. Поэтому в зоне зарождения струи, где азимутальная составляющая скорости имеет наибольшее значение, струя засасывает среду. Таким образом, поступление среды в струю происходит только с ее торца, а не с боковой границы. Этот факт подтвержден экспериментально по данным визуализации закрученных струй в углублениях [13].

4. Структура пограничного слоя. Закрученное течение такого типа осуществляется только при наличии совокупности специальных условий в начале и на границе струи. Эти условия предполагают иную структуру пограничного слоя, нежели сдвиговый пограничный слой Прандтля. Эксперименты с обтеканием углублений позволили визуализировать трехмерный вихревой пограничный слой в основании струи [13]. Однако трудности исследования пограничного слоя не позволяют однозначно судить о его структуре. Точные решения, используемые нами для анализа, не учитывают условие прилипания пограничного слоя. Вероятно, это условие выполняется каким-то другим образом, например, заменой напряжений сдвига напряжениями качения или проскальзыванием пристеночных слоев за счет реологических свойств среды. Известно, что в кровеносном русле пограничный слой очень тонок и не утолщается вдоль потока крови [11]. Возможно, что здесь эти условия создаются благодаря пульсирующему режиму потока, динамически изменяющемуся рельефу и подвижности стенок проточного канала. При этом они так же могут реализоваться

через механизм трехмерного вихревого пограничного слоя [39].

5. Сходимость. В силу действия центростремительных ускорений все линии тока закрученного течения направлены от периферии струи к ее оси. Это означает, что струя имеет внешние границы, независимо от того, движется она в канале или в окружении относительно неподвижной среды. В силу монотонного уменьшения радиуса струя ускоряется на всем протяжении своего существования. При этом поперечный обмен с внешней средой практически отсутствует, что показано экспериментально при визуализации закрученных струй, возникающих в углублениях [13].

6. Конечность – струя имеет начало и конец. Начало струи соответствует нулевой точке, в которой все составляющие скорости равны нулю, например, при формировании радиально-азимутального закрученного движения над вогнутой криволинейной (образующей) поверхностью. Если скорость притока среды внутрь такой поверхности и форма поверхности таковы, что возникают силы, выталкивающие среду, сохраняющую закрученное движение, наружу, то формируется закрученная смерчеобразная струя. Концом струи можно считать место, где прекращают действовать условия, обеспечивающие поддержание структуры струи (например, ее радиус уменьшается настолько, что силы вязкого сопротивления в осевой зоне струи начинают превышать инерцию ее вращения). В этом случае струя вырождается в турбулентный или ламинарный поток в зависимости от величины остаточной скорости. Возможна реструктуризация струи, если вновь возникают условия, необходимые для ее формирования.

7. Стационарность/нестационарность. Струя может быть стационарной. Это возможно, если условия формирования струи не изменяются во времени (скорость притока, кривизна образующей поверхности, сходимость проточного канала соответствуют одной и той же трубке тока). Тогда функциональные коэффициенты, входящие в «точные решения» (положение начала координат, произведение  $zr^2$ , функции  $C_0$  и  $\Gamma_0$ ), являются константами. Струя может быть нестационарной (затухающей или пульсирующей, т.е. периодически возобновляемой). В этом случае функциональные коэффициенты  $C_0$  и  $\Gamma_0$  изменяются во времени в соответствии с законом нестационарности струи, определяемым внешними воздействиями.

8. Инерционность вращения струи – вращение среды в струе обладает инерцией, поэтому время возникновения струи очень мало, а время затухания относительно велико.

Перечисленные свойства центростремительных закрученных течений позволяют выдвинуть ряд положений, обосновывающих возможность использования «точных решений» для анализа механизма движения крови на участках кровеносного русла, характеризующихся высокими скоростями и достаточно большими размерами, например, в артериальном сегменте большого круга кровообращения от левого предсердия до аорты.

1. Вращение среды в потоке обеспечивает подсос крови из зоны зарождения струи на всем пути ее эволюции от левого предсердия до аорты.

2. Продольное перемещение и ускорение струи происходят за счет ее сходимости. При этом при отсутствии препятствий на пути эволюции струи не возникает поперечных вихрей.

3. Гидродинамическое сопротивление струи в рассматриваемом канале может быть снижено за счет специальной организации пограничного слоя, что может обеспечиваться активной мышечной и пассивной эластичной подвижностью стенок, направляющими анатомическими структурами и, возможно, особыми реологическими свойствами крови.

4. Закрученное течение может осуществляться в безотрывном режиме в искривленном канале, если считать, что продольное и радиальное перемещение безынерционно, а вращение струи поддерживается за счет инерции. При этом закрутка потока возобновляется в каждом сердечном цикле. Таким образом, ни в одной точке канала не возникает остановки движения среды.

5. «Точные решения» предполагают, что центростремительные закрученные потоки рассматриваемого типа формируются вокруг вихревого ядра. Это позволяет предположить, что объем струи в пульсирующем режиме меняется в зависимости от поступления среды через торец струи. Учитывая, что закрученная струя на рассматриваемом участке русла затоплена и имеет внешнюю границу, через которую обмен средой отсутствует, внешне по отношению к струе вторичные течения обеспечивают пропорциональное распределение крови по ветвям аорты. При этом в ветвях формируются потоки с аналогичной структурой.

Преимуществом используемых решений является возможность выразить значения функциональных элементов, входящих в выражения для скорости, через значения цилиндрических координат системы, в которой описана струя. Так как движение струи крови в сердце и аорте определяется геометрической конфигурацией проточного канала, ее структура должна соответствовать геометрической конфигурации канала, мгновенное состояние которого

можно количественно охарактеризовать в тех же координатах. Таким образом, выражения для поля скоростей течения можно получить из описания динамики границ при условии, что эти границы соответствуют условиям формирования смерчеобразной струи.

### **ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ РЕЗУЛЬТАТЫ, УКАЗЫВАЮЩИЕ НА СООТВЕТСТВИЕ СТРУКТУРЫ ПОТОКА КРОВИ ЗАКРУЧЕННЫМ БЕЗВИХРЕВЫМ ТЕЧЕНИЯМ**

Экспериментально исследование, предпринятое нашей группой более 20 лет назад, имело целью обнаружить такие аналогии в геометрической конфигурации проточного канала сердца и магистральных сосудов, которые позволили бы идентифицировать поток крови как потенциальный поток вязкой среды, описываемый точными решениями.

Методология поиска вытекала из поставленных задач – мы искали количественные соответствия между закономерностями, вытекающими из точных решений, и направлениями движения жидкости, задаваемыми соответствующими анатомическими структурами. При этом надо понимать, что измерительные возможности анатомо-физиологических параметров потока очень ограничены в силу невозможности внедрения в течение крови без внесения существенных искажений, явной анатомической вариабельности обтекаемых структур и в силу несовершенства методов измерений. Однако, если желаемый эффект обнаружен хотя бы 1 раз, нет необходимости в накоплении статистического материала, поскольку не может возникнуть оснований предполагать, что механизмы движения крови у разных особей различны.

Если предположить, что конфигурация проточного канала близка к геометрической конфигурации струи, формируемой в этом канале, то наличие точных решений позволяет на основе размерных характеристик канала определить конкретные количественные показатели, с помощью которых можно идентифицировать и охарактеризовать состояние закрученной струи:

1. Мгновенное положение цилиндрической системы координат, в которой струя может быть описана с помощью точных решений. Это положение изменяется по закону, определяемому кинетикой сердечного цикла.

2. Траектории линий тока и их проекции на продольно-радиальное и азимутально-радиальное сечения струи. Восстановление линий тока позволяет вычислить мгновенное положение оси струи.

3. Объемный показатель струи, равный произведению продольной и квадрата радиальной координаты.

нат ( $zr^2$ ) в подвижной цилиндрической системе координат струи и его динамику в течение сердечного цикла.

4. Характер функции  $C_0(t)$ , отражающей динамику радиального градиента скорости и напрямую зависящей от динамики сердечного сокращения.

5. Характер функции  $\Gamma_0(t)$ , являющейся циркуляцией струи, и зависимость этой величины от времени в течение сердечного цикла.

6. Отношение этих величин ( $C_0/\Gamma_0$ ), которое отражает степень закрученности струи и пропорционально отношению одной из потенциальных к азимутальной (вязкой) составляющей скорости.

7. Кривизну образующей поверхности, при обтекании которой происходит инициация струи. Эта поверхность представляет собой поверхность вращения эвольвенты, построенной к линии тока.

8. Время набора мощности и время угасания струи.

Для каждого из перечисленных показателей разработаны методы расчета [38, 40–42].

Если при наличии закручивающих механизмов геометрическая конфигурация проточного канала такова, что перечисленные величины выражаются рациональными численными значениями, то структура течения в этом канале должна соответствовать структуре смерчеобразной струи, описываемой точными решениями.

В результате экспериментальных исследований методами морфометрии слепков полостей левых отделов сердца и аорты, методом компьютерной томографии и магнитно-резонансной томографии и велосиметрии, методом ангиографии на препаратах человека и животных, а также на добровольцах и пациентах клиники кардиологического профиля впервые обнаружены эффекты, имеющие значение в обеспечении механизма формирования закрученного потока крови (не в хронологической, а в смысловой последовательности).

I. На уровне левого предсердия (ЛП) [42]:

1. Кривизна обтекаемой поверхности (соотношение радиуса кривизны и глубины) купола ЛП в течение фазы опорожнения качественно соответствует кривизне образующей поверхности, формирующей линии тока струи, совпадающей по своим размерам (исходный радиус и радиус в критическом сечении открытого митрального клапана (МК) со струей, заполняющей левый желудочек (ЛЖ)).

2. Дополнительная эвакуация крови из ЛП в конце фазы заполнения ЛЖ (фаза медленного заполнения) осуществляется за счет интенсивного закрученного течения в полости ЛЖ за счет динамических градиентов, возникающих в закрученном потоке.

3. Во время фазы заполнения ЛП кривизна купола формирует вогнутую поверхность, над которой возникает закрученное течение, питаемое четырьмя ЛВ. Одновременно с этим осуществляется инъекция порции крови из сокращающегося УЛП.

4. Направления струй, поступающих из ЛВ и УЛП, визуализированы при селективном окрашивании потоков на изображениях, полученных методом MRI 4D-Flow. Показана постоянная закрутка по часовой стрелке вдоль потока.

На основании перечисленных свойств можно заключить, что систола ЛП гемодинамически незначима и обеспечивает только постоянную вогнутость обтекаемой поверхности, поддерживая, таким образом, условия для формирования закрученного течения и исключая эпизоды пролабирования стенки при быстром опустошении левого предсердия в фазу быстрого изгнания в ЛЖ. Когда основная часть крови перемещается из ЛП в ЛЖ, масса остаточного объема в ЛП мала для поддержания инерционного вращения и обеспечения достаточного динамического градиента давления, отсасывающего кровь из ЛВ. В это время УЛП выбрасывает дополнительную порцию крови в направлении вращения, увеличивая азимутальную скорость и повышая динамический градиент давления, что приводит к увеличению скорости притока по ЛВ.

II. В ЛЖ:

1. Еще при исследовании слепков ЛЖ обнаружены геометрическую разнородность внутрисердечных структур, обтекаемых кровью. В результате была выделена группа трабекул, расположенных преимущественно на свободной и передней стенках полости ЛЖ, образующих вместе систему сходящихся спирально ориентированных направляющих, закрученных по часовой стрелке вдоль оси, соединяющей центр МК и некоторую точку, расположенную в верхушечной части полости, но не совпадающую с верхушкой. Альтернативная система направляющих состоит из трабекул переднеперегородочного угла и ПМ, которые ориентированы по сходящейся спирали (также закрученной по часовой стрелке) вдоль оси, соединяющей некоторую точку, находящуюся в нижней трети свободной стенки ЛЖ, и центр АК. Данные получены методом стереометрического измерения слепков: слепок закрепляли в стереометре с фиксированной системой координат, определяли координаты нескольких точек вдоль одной трабекулы, эти точки соединяли линией, несколько линий, объединенных общим направлением, ориентировали так, чтобы была видна спираль, определяли ось этой спирали и ее ориентацию в полости ЛЖ. Высказано предположение, что сокращение трабекул обеих систем (а следовательно, их

экспрессия в потоке крови) происходит в альтернативном режиме, при этом трабекулы свободной стенки формируют структуру струи, заполняющей полость ЛЖ, а трабекулы переднеперегородочного угла и ПМ формируют структуру струи, изгоняемой из полости ЛЖ в аорту. Впоследствии эти данные были полностью подтверждены при анализе динамических изображений полости ЛЖ с помощью МСКТ-вентрикулографии с контрастом. На этих изображениях отчетливо видна альтернативность функционирования обеих систем трабекул [32, 33].

2. В результате этих наблюдений рассчитана ориентация обеих систем направляющих трабекулярных линий относительно собственно оси и вычислено значение отношения время-зависимых функций  $C_0/\Gamma_0$ . Показано, что полученная величина изменяется по гиперболическому закону в зависимости от суммарной продольной координаты вдоль траектории эволюции струи (т.е. в результате суммирования длины оси вдоль приточной и изгоняющей систем трабекул). Это позволило предположить, что в полости ЛЖ происходит эволюция единственной закрученной струи, сохраняющей свою структуру при смене фаз диастолы и систолы желудочка [36, 37].

3. В развитие этих результатов выполнено сравнительно-анатомическое исследование слепков ЛЖ животных, существенно отличающихся размерами. Так, проведено сравнение трабекулярного рельефа на слепках левого желудочка крыс, кроликов, собак и человека. Зависимости, полученные ранее на слепках левого желудочка человека, были с высокой достоверностью воспроизведены на более мелких животных. Это позволило сделать вывод о том, что структура потока, формируемого в ЛЖ, не зависит от размеров полости, а следовательно, не подчиняется аналогии Рейнольдса, учитывая, что абсолютные значения скорости течения крови у всех животных примерно равны [41].

4. Также в развитие полученных ранее результатов проведено исследование архитектоники трабекулярного рельефа у больных гипертрофической обструкционной кардиомиопатией (ГКМП) до и после хирургической коррекции в сравнении с нормальным расположением трабекул. Исследование проведено по данным динамической вентрикулографии с помощью МСКТ. Показано, что графики изменения величины отношения  $C_0/\Gamma_0$  в зависимости от времени в течение сердечного цикла в норме и при ГКМП существенно отличаются. При гипертрофии значительно снижается закрутка струи, заполняющей полость ЛЖ, что приводит к существенному снижению сердечного выброса. Хирургическая коррекция гипертрофии методом миоэктомии досту-

пом из правого желудочка частично восстанавливает нормальный механизм эволюции закрученной струи в полости [38].

5. Визуализация струи в полости ЛЖ с помощью MRI 4D-Flow подтверждает, что закрученная струя поступает через МК в закрученном состоянии, направляется в сторону задней стенки полости и закручивается по часовой стрелке относительно оси, проходящей через МК (обеспечивая дополнительную эвакуацию крови из полости ЛП). После закрытия МК этот вихрь разворачивается относительно большой кривизны свободной стенки ЛЖ. Эта кривизна (по соотношению радиуса и глубины) качественно соответствует кривизне образующей поверхности, формирующей закрученную струю, изгоняемую из полости ЛЖ в аорту. В момент открытия АК эта струя, не теряя структуры за счет инерционности вращения, устремляется в просвет АК и инжектируется в аорту [43, 44].

Что необходимо для осуществления этого механизма? Во-первых, четкое разделение доминантной и вторичных струй в момент инъекции, что обеспечивается отсутствием поперечного переноса среды в закрученной струе. Во-вторых, подсос среды из зоны зарождения струи (в левом предсердии при заполнении ЛЖ и в ЛЖ при инъекции в аорту) за счет динамического градиента давления в закрученной струе. В-третьих, обоснование возможного поглощения более мелких вторичных течений доминирующей закрученной струей с учетом возможности формирования кольцевых вихрей, обладающих известной устойчивостью, зарегистрированных, в частности, G. Pedrizzetti [45]. В-четвертых, соответствие внешних контуров полости соотношениям для соответствующих проекций линий тока смерчеобразной струи и наличие криволинейной образующей поверхности, служащей основанием для такой струи. В-пятых, повсеместное наличие условий формирования подвижного вихревого пограничного слоя, исключающего возникновение сдвиговых напряжений на границе струи [39]. В ЛЖ в норме и при компенсированной патологии отсутствуют признаки, исключающие возможность выполнения этих условий.

Перечисленные свойства свидетельствуют, что координированное сокращение обтекаемых структур полости ЛЖ в течение всего сердечного цикла соответствует мгновенному состоянию эволюции внутрисердечного потока крови. При этом обеспечиваются механизмы поддержания циркуляции струи, поступающей из ЛП и струи, изгоняемой в аорту. Клапанный аппарат при этом выполняет пассивную роль, обеспечивая продолжение подвижной границы струи. Доминантная и вторичные струи имеют значение для механики закрытия клапанов.



### III. В аорте.

1. На слепках аорты различных животных (человек, свинья, собака, кролик) показано, что радиус проточного канала изменяется вдоль длины аорты в соответствии с закономерностями, вытекающими из точных решений. Эта закономерность состоит в том, что, начиная от начала координат вдоль канала, должно выполняться условие постоянства произведения квадрата радиуса на значение продольной координаты. Для аорты это условие выполняется, если положение начала координат отстоит от АК вглубь сердца на определенное расстояние. По идее, эта величина должна соответствовать расстоянию до места инициации закрученной струи. При исследовании на слепках показано, что это расстояние по порядку величин сопоставимо с суммой удвоенного продольного размера полости ЛЖ и продольного размера ЛП. Прижизненные измерения с помощью МСКТ и MRI показали, что эта величина несколько меньше и изменяется в течение сердечного цикла в соответствии с логикой эволюции струи (этот тезис нуждается в дополнительном уточнении) [46].

2. С помощью эластометрических и ангиографических измерений показано, что указанная закономерность выполняется при нормальном уровне давления в просвете аорты. Повышение давления более 150 мм рт.ст. приводит к искажениям данной зависимости [40].

3. С помощью эластометрических измерений показано, что в норме эластичность аорты увеличивается в дистальном направлении. При этом общая конфузность проточного канала аорты сохраняется, однако расчетное положение точки начала координат смещается в положительную сторону при закрытом АК и в отрицательную сторону при открытом АК, когда струя в полости ЛЖ и в аорте представляет собой единое целое. Такое распределение эластичности вдоль аорты также искажается при повышении внутрисосудистого давления более 150 мм рт.ст. [46].

4. Математическое моделирование круглого упругого канала с продольно-радиальными размерами аорты человека подтвердило существенную зависимость возможности формирования смерчеобразной закрученной струи от распределения упругости вдоль проточного канала [47].

5. Визуализация потока в аорте с помощью MRI 4D-Flow показывает существенное изменение степени закрученности струи в зависимости от фазовой динамики АК. Степень закрученности значительно увеличивается при закрытом клапане [44].

6. Картирование и анализ поля скоростей в аорте, измеренного с помощью фазово-контрастной

MRI-велоиметрии, позволили выявить следующие особенности течения: а) доминантное вращение векторов скорости по полю по часовой стрелке; б) постоянное наличие в каждом сечении аорты, по крайней мере двух центров циркуляции противоположного знака, соответствующих доминантной струе и вторичным возвратным струям с такой же структурой; в) вращение оси инжектируемой закрученной струи в просвете аорты (прецессию) по часовой стрелке в течение всего сердечного цикла (струя в целом как бы катится вдоль стенки аорты); г) уменьшение значения циркуляции струи вдоль аорты (как для положительной, так и для отрицательной циркуляции); д) уменьшение величины частотной характеристики струи  $C_0$  вдоль аорты; е) уменьшение величины циркуляции  $\Gamma_0$  в течение сердечного цикла (угасание вращения). Сделан вывод о необходимости пульсирующего режима изгнания крови в аорту для подкручивания среды и поддержания непрерывного вращения струи [35].

Суммируя перечисленные эффекты, можно заключить, что в течение всего сердечного цикла и на всем протяжении участка кровеносного русла от левого предсердия и до аорты выполняются геометрические условия, необходимые для поддержания структуры смерчеобразной струи. Детерминированное распределение крови по ветвям аорты обеспечивается за счет радиального смещения вторичных и возвратных течений с учетом локальных диффузорных сегментов проточного канала аорты.

### **ПРЕДЛАГАЕМЫЙ МЕХАНИЗМ ГЕНЕРАЦИИ И ПОДДЕРЖАНИЯ ЗАКРУЧЕННОЙ СТРУКТУРЫ ПОТОКА В СЕРДЦЕ И АОРТЕ**

На основании собственных данных и фактов, известных по исследованиям других авторов, концепция смерчеобразных закрученных течений позволяет описать механизм формирования и эволюции закрученной смерчеобразной струи крови в левых отделах сердца и аорте.

Этот механизм действует непрерывно и воспроизводится с каждым следующим сердечным сокращением во всех рассматриваемых сегментах проточного канала. Условно процесс может быть разделен на несколько стадий:

1. Наполнение ЛП. Первичная закрутка массы крови происходит на вогнутой обтекаемой поверхности ЛП между устьями ЛВ при достаточной скорости натекающего потока. Как только закрутка среды в полости ЛП произошла, наполнение ЛП происходит за счет двух механизмов – продолжающегося притока по ЛВ и подсоса среды вследствие динамического градиента давления в осевой зоне закрученного потока в полости ЛП.



2. Фаза быстрого наполнения ЛЖ. (МК открыт,  $P_{\text{лж}}$  минимально,  $P_{\text{лп}}$  максимально; струя ограничена в истоке криволинейной поверхностью ЛП, сходящимися стенками ЛП и створками МК, вместе образующими сходящийся канал; в ЛЖ потоку экспонированы трабекулы свободной стенки, радиус полости и азимутальная скорость увеличиваются.) Открытие МК за счет падения давления в полости ЛЖ вследствие активной диастолы и устремление закрученной смерчеобразной струи из ЛП в ЛЖ вдоль сходящегося канала, образованного стенками ЛП и створками МК. При этом циркуляция струи обеспечивает максимальную эвакуацию крови из ЛП (зоны зарождения) за счет динамического градиента давления в осевой зоне струи.

3. Фаза медленного наполнения ЛЖ. (МК открыт,  $P_{\text{лж}} = P_{\text{лп}}$ , в полости ЛЖ большой вихрь, обеспечивающий подсос из полости ЛП.) Систола УЛП обеспечивает циркуляцию остаточного объема в полости ЛП и подсос из ЛВ перед закрытием митрального клапана.

4. Начало изометрической фазы. (Сокращение ПМ и трабекул переднеперегородочного угла, подъем давления в ЛЖ, закрытие МК.) После закрытия МК в полости ЛЖ формируется доминантный вихрь, ось которого направлена в сторону АК, а основание сориентировано относительно свободной стенки ЛЖ, обладающей кривизной образующей поверхности. Циркуляция вихря поддерживается трабекулами свободной стенки. Эта циркуляция обеспечивает падение давления в центре струи, за счет которого струя «присасывается» к свободной стенке ЛЖ. Не объясненным остается механизм смены ориентации циркуляции струи, имеющей векторное выражение относительно полости ЛП, на ориентацию доминантного вихря в полости ЛЖ (векторное поле которого построено относительно полости ЛЖ).

5. Систола ЛЖ. В начале механической систолы в полости ЛЖ уже сформирован крупный доминантный вихрь, ориентированный относительно кривизны свободной стенки ЛЖ таким образом, что его ось направлена в сторону АК. Направляющими для этого вихря являются папиллярные мышцы и длинные трабекулы переднеперегородочного угла ЛЖ. Аортальный клапан открывается, как только давление в полости ЛЖ становится выше давления в аорте. В этот момент (со скоростью звука в среде крови) структура вихревого движения распространяется на всю доступную длину аорты, формируя так называемый «вихревой шнур», вдоль которого происходит наполнение доминантной струи средой, поступающей из ее основания.

6. Быстрое изгнание. По мере наполнения струи ее радиус увеличивается, возрастает азимутальная

составляющая скорости. Остаточный объем крови в аорте, взаимодействуя со струей, но не обмениваясь с ней средой, воспринимает структуру закрученных струй в силу вязких взаимодействий и локализуется в пространстве между доминантной струей и стенками аорты. Эти струи представляют собой вторичные и возвратные потоки и являются источником потоков, направляемых в ветви аорты.

7. Медленное изгнание. Закрученная струя в аорте продолжает вращение в силу инерционности, поддерживая градиент динамического давления от оси к границе струи. Этот градиент обеспечивает эвакуацию дополнительного объема среды из полости ЛЖ. Однако энергия струи уменьшается из-за дефицита притока, струя распадается на несколько противоположно направленных закрученных течений. Те из них, которые направлены ретроградно, обеспечивают закрытие аортального клапана.

8. Закрытие АК и подготовка к следующему циклу. После закрытия АК в полости ЛЖ остаточный объем, также сохраняющий структуру закрученного течения в силу инерции вращения, меняет свою локализацию и ориентацию для восприятия и сшивки со следующей струей, поступающей из МК.

Предложенный циклически воспроизводимый механизм устанавливает, что закрученность потока крови является важнейшим свойством кровообращения, поскольку обеспечивает движение крови с минимальными затратами энергии на сопротивление, минимизацию взаимодействий внутри струи и на ее границах (в том числе на стенках), максимальную эвакуацию среды из области формирования струи, осевую модель инъекции струи в каждую следующую полость без контакта со стенками канала, переориентацию направления течения, определяет организацию вторичных и возвратных течений и строго детерминированное распределение крови по ветвям. При этом вдоль потока в норме исключается возможность возникновения отрывных течений и застойных зон.

Этот механизм не содержит видимых противоречий, однако, многие этапы эволюции закрученного течения в сердце и магистральных сосудах требуют дополнительных исследований. Так, необходимо более детальное фазовое исследование притока по ЛВ, исследование динамики сокращения ЛП и уточнение роли сокращения УЛП в формировании первичной закрученной струи. Представляется важным уточнение последовательности сокращения внутрисердечных мышечных элементов, обтекаемых кровью, в дополнительном исследовании нуждается характер взаимодействия струи, инъектируемой в полость ЛЖ, с остаточным объемом крови и кинетика образующихся при этом

вихревых образований. Важным вопросом является процесс инжекции крови в аорту, детальное картирование скоростей инжектируемой струи и вторичных струй, с которыми она взаимодействует. Необходимы дополнительные исследования механизмов распределения потоков по основным ветвям аорты с учетом геометрической полиморфности ветвления. А основной и до сих пор нерешенной проблемой остается проблема энергетического баланса сердца – сколько энергии вырабатывается в результате метаболических процессов в миокарде и сколько энергии затрачивается на обеспечение насосной функции сердца.

Ответы на эти вопросы только частично можно получить из экспериментальных и клинических исследований. Основная роль в решении перечисленных проблем должна принадлежать методам математического моделирования потоков на основании предложенной концепции и точных решений уравнений гидродинамики для рассматриваемого класса течений.

Закрученное потенциальное течение может быть легко искажено и даже разрушено. Нарушения могут возникнуть при искажениях координации сердечного сокращения, при изменении геометрической конфигурации проточного канала, при изменении динамики работы клапанного аппарата, при снижении эластичности или измененном распределении реологических свойств крови. Так как закрученная струя на всех этапах своей эволюции является затопленной и контактирует со стенками канала только в критических точках, ее адаптивные возможности очень велики. Однако потери энергии неизбежны и в основном состоят во взаимодействии с вторичными и остаточными струями. Поэтому локальное увеличение объема проточного канала на пути эволюции струи приводит к потере ее мощности. Свойства струи могут критически измениться и при возникновении препятствий азимутальному вращению струи. Эти и другие нарушения нормальных физиологических параметров рассматриваемого сегмента кровообращения неминуемо приводят к снижению сердечного выброса, увеличению нагрузки на сердечную мышцу и нарушению функционирования системы в целом.

### **ЗАКЛЮЧЕНИЕ – ЗНАЧЕНИЕ ПРОВЕДЕННЫХ ИССЛЕДОВАНИЙ И ПОЛУЧЕННЫХ РЕЗУЛЬТАТОВ, ПЕРСПЕКТИВНЫЕ НАПРАВЛЕНИЯ ИССЛЕДОВАНИЙ В РАМКАХ КОНЦЕПЦИИ СМЕРЧЕОБРАЗНОЙ СТРУКТУРЫ ТЕЧЕНИЯ КРОВИ**

Предложенная концепция кровообращения, основанная на главенствующей роли закрученности потока

в осуществлении движения крови, имеет большое значение для общего понимания физиологических процессов и прикладных направлений клинического и технического характера.

Для фундаментальной физиологии и медицины:

- предложенный механизм позволяет непротиворечивым образом исследовать, каким образом возникает и эволюционирует пульсирующий поток крови, зарождающийся в ЛП и сохраняющий структуру, по крайней мере, до конца аорты.

Для моделирования кровообращения:

- точные решения позволяют выделить конкретные признаки начальных и граничных условий, имеющих значение при симуляции потока крови.

Для патофизиологии:

- предложенный механизм позволяет объяснить пути компенсаторной коррекции конфигурации проточного канала за счет пластических процессов в местах возникновения отрывов потока или застойных зон – геометрическое ремоделирование сердца и аорты.

Для кардиологии:

- использование точных решений позволяет сформулировать новые количественные диагностические критерии и разработать новые диагностические системы и программное обеспечение для оценки состояния потока крови.

Для кардиохирургии:

- использование точных решений и моделирование на их основе позволяет выбрать оптимальную тактику восстановления геометрической конфигурации проточного канала при реконструктивных операциях на сердце и главных сосудах.

Для конструирования органозамещающих протезов для кардиохирургии:

- использование точных решений позволяет создавать протезы с учетом особенностей течения крови – так возник полнопроточный механический протез АК, предложена модель протеза МК, разработан эластичный сосудистый протез.

Для физического моделирования кровообращения:

- точные решения создают основу для изготовления исследовательских и испытательных стендов, симулирующих реальные гидродинамические условия функционирования узлов сердечно-сосудистой системы.

Для решения проблемы полностью имплантируемого искусственного сердца: возможным решением этой проблемы была бы разработка насоса, способного генерировать структурированный закрученный поток крови.

Перспективными представляются новые научные направления, основанные на концепции смер-

чеобразной самоорганизации потока крови в сердце и магистральных сосудах:

- разработка новых подходов к математическому моделированию потока крови;
- разработка новых принципов диагностики, основанных на определении качества потока крови;
- исследование механизмов генерации и поддержания закрученного потока крови в правых отделах сердца и легочном русле. Анализ роли потока в патогенезе легочной гипертензии;
- исследование механизмов ремоделирования и разработка новых подходов к коррекции приобретенных патологических нарушений динамической геометрии проточного канала сердца и магистральных сосудов (клапаны, геометрическая конфигурация полостей, биомеханические характеристики обтекаемых поверхностей);
- исследование ремоделирования и разработка новых подходов к коррекции нарушений ритма (хирургическая изоляция очагов эктопии, фибрилляция предсердий, режимы кардиостимуляции, изолированная стимуляция УПП);
- анализ механизмов компенсации и разработка новых подходов к коррекции сложных врожденных пороков сердца;
- разработка физических моделей кровообращения, воспроизводящих гидродинамические особенности потока крови;

– разработка новых конструкций и режимов функционирования паракорпоральных устройств, подключаемых к системе кровообращения (аппараты искусственного кровообращения, гемодиализ, плазмоферез);

– разработка новых конструкций протезов сегментов системы кровообращения (клапаны, сосуды, вспомогательные насосы, полностью имплантируемое искусственное сердце), учитывающих гидродинамические особенности потока крови. Разработка новых испытательных систем для оценки функциональных характеристик имплантатов для кардиохирургии.

## ВЫВОД

Таким образом, сформировано новое перспективное научное направление, имеющее как фундаментальное значение для понимания физиологических механизмов кровообращения, так и прикладное значение для диагностики и лечения больных с различными циркуляторными расстройствами, а также для разработки новых органозамещающих и вспомогательных устройств, используемых в сердечно-сосудистой хирургии. ●

*Исследование выполнено при финансовой поддержке гранта Российского научного фонда № 16-15-00109.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bremer J. // Amer. J. Anatomy. 1932. V. 49. P. 409–440.
2. Markl M., Kilner P.J., Ebbers T. // J. Cardiovasc. Magn. Reson. 2011. V. 13. P. 7. doi: 10.1186/1532-429X-13-7
3. Buonocore M.H. // Magn. Reson. Med. 1998. V. 40(2). P. 210–226. doi: 10.1002/mrm.1910400207
4. Kilner P.J., Yang G.Z., Mohiaddin R.H., Firmin D.N., Longmore D.B. // Circulation. 1993. V. 88. № 5. P. 2235–2247. doi: 10.1161/01.cir.88.5.2235
5. Frazin L.J., Vonesh M.J., Chandran K.B., Shipkowitz T., Yaacoub A.S., McPherson D.D. // ASAIO J. 1996. V. 42(6). P. 951–956. doi: 10.1097/00002480-199642060-00006
6. Багаев С.Н., Захаров В.Н., Орлов В.А. // Рос. журн. биомех. 2002. Т. 6. № 4. С. 30–50.
7. Кирсанов Р.И., Куликов В.П. // Успехи физиол. наук. 2013. Т. 44. № 2. С. 62–78.
8. Gallo D., Isu G., Massai D., Pennella F., Deriu M.A., Ponzini R., Bignardi C., Audenino A., Rizzo G. Morbiducci U. Visualization and simulation of complex flows in biomedical engineering: Lecture notes in computational vision and biomechanics / Eds Lima R., Imai Y., Ishikawa T., Oliveira M. Dordrecht: Springer, 2014. V. 12.
9. De Nisco G., Kok A.M., Chiastra C., Gallo D., Hoogendoorn A., Migliavacca F., Wentzel J.J., Morbiducci U. // Ann. Biomed. Eng. 2019. V. 47(2). P. 425–438. doi: 10.1007/s10439-018-02169-x
10. Bockeria L.A., Gorodkov A.J., Dorofeev A.V., Alshibaya M.D. // Eur. J. Cardiothorac. Surg. and the RESTORE Group. 2006. V. 29. P. 251–258. doi: 10.1016/j.ejcts.2006.02.057
11. Pedley T.G. The fluid mechanics of large blood vessels. Cambridge: University Press, 1980.
12. Caro C.G., Watkins N.W., Sherwin S.J., Pitt R., Giordana S., Franke P.T., Peiro J., Doorly D.J., Papaharilaou Y., Chesire N., Jackson M., Bicknell C. Swirling circulatory and respiratory flow: Biological/pathological implications. IFMBE Proc. EMBEC, 2002. P. 8–16.
13. Гатаулин Я.А., Юхнев А.Д., Зайцев Д.К., Смирнов Е.М., Куликов В.П., Кирсанов Р.И. Структура вихревого течения в бифуркации кровеносного сосуда: сопоставление результатов пациент-ориентированных расчетов и клинических доплеровских измерений. Тез. докл. международной конференции ФизикА. СПб 23–25 октября 2018 года. Санкт-Петербург: ФТИ им. А.Ф. Иоффе. 2018. С. 270–271.
14. Pedrizzetti G., La Canna G., Alfieri O., Tonti G. // Nat. Rev. Cardiol. 2014. V. 11. P. 545–553. doi: 10.1038/nrcardio.2014.75
15. Pasipoularides A. // Hellenic J. Cardiol. 2012. V. 53. P. 458–469.
16. Бураковский В.И., Доброва Н.Б., Кузьмина Н.Б., Агафонов А.В., Роева Л.А., Дрогайцев А.Д. // Эксп. хирургия и анестезиология. 1976. № 3. С. 13–16.
17. Вараксин А.Ю., Ромаш М.Э., Копейцев В.Н. Горнадо. М.: Физматлит, 2011. 344 с.
18. Rotunno R. // Annu. Rev. Fluid Mechanics. 2013. V. 45. P. 59–84.
19. Гольдштик М.А. Вихревые потоки. Новосибирск: Наука, 1981. 367 с.
20. Escudier M. // Annu. Rev. Fluid Mechanics. 1987. V. 19. № 1. P. 27–52.

21. Пиралишвили Ш.А. Вихревой эффект. Т. 1. Физическое явление, эксперимент, теоретическое моделирование. М.: Научтехлитиздат, 2013. 343 с.
22. Бирюк В.В., Веретенников С.В., Гурьянов А.И., Пиралишвили Ш.А. Вихревой эффект. Технические приложения. М.: Научтехлитиздат, 2014. Т. 2. Ч. 1. 288 с.
23. Пиралишвили Ш.А., Писаревский А.С. // Известия Российской академии наук. Механика жидкости и газа. 2013. № 3. С. 138–147.
24. Кикнадзе Г.И., Краснов Ю.К. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 290. № 6. С. 1315–1319.
25. Кикнадзе Г.И., Краснов Ю.К., Подымака Н.Ф., Хабенский В.Б. // Докл. АН СССР. 1986. Т. 291. № 6. С. 1315–1318.
26. Андреев В.К., Капцов О.В., Пухначёв В.В., Родионов А.А. Применение теоретико-групповых методов в гидродинамике. Новосибирск: ВО Наука, 1994. 319 с.
27. Goldshtik M.A. // Annu. Rev. Fluid Mechanics. 1990. Т. 22. № 1. P. 441–472.
28. Shtern V., Hussain F. // Annu. Rev. Fluid Mechanics. 1999. V. 31. № 1. P. 537–566.
29. Kiknadze G.I., Gachechiladze I.A., Gorodkov A.Yu. Self-Organization of Tornado-Like Jets in Flows of Gases and Liquids and the Technologies Utilizing This Phenomenon. Proc. ASME 2009 Heat Transfer Summer Conference. San Francisco, California, USA. July 19–23 2009. P. 547–560. doi: 10.1115/HT2009-88644
30. Кикнадзе Г.И., Гачечиладзе И.А., Алексеев В.В. Самоорганизация смерчеобразных струй в потоках вязких сплошных сред и интенсификация тепломассообмена, сопровождающая это явление. М.: Изд-во МЭИ, 2005. 83 с.
31. Burgers J.M. // Adv. Appl. Mechanics. 1948. V. 1. P. 171–199.
32. Кикнадзе Г.И., Олейников В.Г., Гачечиладзе И.А., Городков А.Ю., Добрава Н.Б., Бакей Ш., Бара Ж.-Л. // Докл. Акад. наук. 1996. Т. 351. С. 119–122.
33. Городков А.Ю. // Бюл. НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. 2003. № 9. С. 61–66.
34. Городков А.Ю., Николаев Д.А. // Бюл. НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. 2003. № 9. С. 67–69.
35. Бокерия Л.А., Городков А.Ю., Николаев Д.А., Кикнадзе Г.И., Гачечиладзе И.А. // Бюл. НЦССХ им. А.Н. Бакулева РАМН. 2003. № 9. С. 70–74.
36. Bockeria L.A., Kiknadze G.I., Gachechiladze I.A., Gorodkov A.Y. Application of Tornado-flow Fundamental Hydrodynamic Theory to the Study of Blood Flow in the Heart and Main Vessels – Further Development of Tornado-like Jet Technology. Proc. ASME 2011 International Mechanical Engineering Congress & Exposition ASME2011, November 11–17, 2011. Denver, Colorado, USA. IMECE2011-63769. doi: 10.1115/IMECE2011-63769
37. Bockeria L.A., Kiknadze G.I., Gachechiladze I.A., Gabidullina R.F., Makarenko V.N. // *Cardiometry*. 2013. № 3. P. 5–29. doi: 10.12710/cardiometry.2013.3.530
38. Талыгин Е.А., Зазыбо Н.А., Жоржколиани Ш.Т., Крестинич И.М., Миронов А.А., Кикнадзе Г.И., Бокерия Л.А., Городков А.Ю., Макаренко В.Н., Александрова С.А. // Успехи физиол. наук. 2016. Т. 47. № 1. С. 48–68.
39. Шлихтинг Г. Теория пограничного слоя. М.: Наука, 1969.
40. Жоржколиани Ш.Т., Миронов А.А., Талыгин Е.А., Цыганков Ю.М., Агафонов А.В., Кикнадзе Г.И., Городков А.Ю., Бокерия Л.А. // Бюл. эксп. биол. мед. 2017. Т. 164. № 10. С. 519–524.
41. Тхагапсова М.М., Талыгин Е.А., Жоржколиани Ш.Т., Агафонов А.В., Дорофеев А.В., Городков А.Ю., Кикнадзе Г.И., Бокерия Л.А. // Биофизика. 2020. Т. 65. № 1. С. 165–174. doi: 10.31857/S0006302920010184
42. Talygin E., Kiknadze G., Agafonov A., Gorodkov A. Application of the tornado-like flow theory to the study of blood flow in the heart and main vessels: Study of the potential swirling jets structure in an arbitrary viscous medium. Proceedings of the ASME 2019 International Mechanical Engineering Congress and Exposition. V. 3: Biomedical and Biotechnology Engineering. Salt Lake City, Utah, USA. November 11–14, 2019. V003T04A032. ASME. <https://doi.org/10.1115/IMECE2019-11298>
43. Talygin E.A., Zhorzholiani Sh.T., Tkhangapsova M.M., Tsygankov Y.M., Agafonov A.V., Gorodkov A.Y., Kiknadze G.I., Bockeria L.A. Reconstruction of Swirling Blood Flow in the Heart and Aorta on the Basis of Measurements of Dynamic Geometry and Elastic Properties of the Flow Channel. 2019. IMECE2018-87680, V003T04A052; 7 pages. doi: 10.1115/IMECE2018-87680
44. Городков А.Ю. Использование концепции смерчеобразных течений вязкой жидкости для объяснения феномена движения крови в сердце и магистральных сосудах. «Физиология и патология кровообращения». VII Всероссийская с международным участием школа-конференция. 3–6 февраля 2020 г. М.: МГУ им. М.В. Ломоносова. Факультет фундаментальной медицины. 2020. С. 17–19.
45. Pedrizzetti G., Domenichini F. // *Ann. Biomed. Eng.* 2015. V. 43. № 1. P. 26–40. doi: 10.1007/s10439-014-1101-x.
46. Жоржколиани Ш.Т., Талыгин Е.А., Крашенинников С.В., Цыганков Ю.М., Агафонов А.В., Городков А.Ю., Кикнадзе Г.И., Чвалун С.Н., Бокерия Л.А. // Физиология человека. 2018. Т. 44. № 5. С. 47–56. doi: 10.1134/S013116461805017X.
47. Talygin E.A., Zhorzholiani Sh.T., Agafonov A.V., Kiknadze G.I., Gorodkov A.Yu., Bockeria L.A. // *Human Physiol.* 2019. V. 45. № 5. P. 527–535. doi: 10.1134/S0362119719050190.



УДК 577.25

# Молекулярные инструменты направленного контроля электрической активности нервных клеток. Часть II

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.11415

**РЕФЕРАТ** Проблема специфического воздействия на биохимические процессы в клетке актуальна для современной биологической науки. В случае электровозбудимых клеток конечной целью такого воздействия 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 настоящее время, когда нейробиология отказывается от редуccionистского подхода в пользу прямого изучения сложных нейрональных систем, основой технического арсенала этой науки становятся малоинвазивные методы стимуляции активности мозговых структур. В настоящем обзоре рассмотрены три группы подходов, основанных на доставке в нервную ткань генетически кодируемых молекул, чувствительных к внешним стимулам. Эти подходы – оптогенетика (ей посвящена часть I работы), хемогенетика и термогенетика (описаны во II 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** ИК – инфракрасный; ADPR – аденозиндифосфатрибоза (Adenosine DiPhosphoRibose); BL-OG – биолюминесцентная оптогенетика (BioLuminescent OptoGenetics); CID – химически индуцируемая димеризация (Chemically Induced Dimerization); CNO – клозапин-N-оксид (Clozapine N-Oxide); DAAO – оксидаза D-аминокислот (D-Amino Acids Oxidase); DHFR – дигидрофолат-редуктаза (dihydrofolate reductase); DREADD – химерные рецепторы, активируемые исключительно синтетическими агонистами (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs); FKBP – FK506-связывающий белок (FK506 Binding Protein); FRB – домен, связывающий FKBP12-рапамицин (FKBP12-Rapamycin Binding domain); GABA – гамма-аминомасляная кислота (Gamma-AminoButyric Acid); GFP – зеленый флуоресцентный белок (Green Fluorescent Protein); GPCR – рецептор, сопряженный с G-белками (G-protein-coupled receptor); GR – вкусовые рецепторы (Gustatory Receptors); Hsp – белок теплового шока (Heat shock protein); IPD – домен ионной поры (Ion Pore Domain); IR – ионотропные рецепторы (ionotropic receptors); KOR – каппа-опиоидный рецептор (K-Opioid Receptor); LBD – лигандсвязывающий домен (Ligand-Binding Domain); PSAM – фармакологически селективный актуаторный модуль (Pharmacologically Selective Actuator Module); PSEM – фармакологически селективная эффекторная молекула (Pharmacologically Selective Effector Molecule); PYP – фотоактивный желтый белок (Photoactive Yellow Protein); RASSL – рецепторы, активируемые исключительно синтетическими лигандами (Receptors Activated Solely by Synthetic Ligands); RNAT – РНК-термометр (RNA thermometer); TeNT – тетанотоксин; TRP – (каналы) транзиентного рецепторного потенциала (Transient Receptor Potential).



## ВВЕДЕНИЕ

Малоинвазивные методы селективной стимуляции активности нервных клеток и мозговых структур занимают важное место в арсенале нейронаук. В I части настоящего обзора мы обсуждали наиболее зрелый из них – оптогенетику, а II часть посвящена перспективным ортогональным подходам – термогенетике и хемогенетике.

## ТЕРМОГЕНЕТИКА

Тепловая энергия, как и видимый свет, распространяется в форме колебаний электромагнитного поля, а температура является одним из базовых факторов окружающей среды, с которым взаимодействуют биологические организмы. Сравнительно узкий диапазон температур, при которых возможно функционирование большинства клеточных форм жизни, детерминированный, в свою очередь, термодинамическими и кинетическими особенностями протекания биохимических процессов, способствует выработке разнообразных эволюционных приспособлений (термотаксис, поддержание постоянной температуры тела у гомойотермных животных и пр.), так или иначе связанных с восприятием температуры на клеточном и молекулярном уровнях [1, 2]. Терморесепторы и иные молекулы, специфически воспринимающие колебания температуры, характерны практически для всех живых организмов [3]. Это создает основу для разработки генно-инженерных подходов к воздействию на физиологию и биохимию клеток с помощью нагревания или охлаждения.

Термогенетика – относительно молодая группа методов, в которых термочувствительные генетически кодируемые эффекторные макромолекулы используются для воздействия на различные физиологические и биохимические процессы в живых клетках. Термогенетический подход может рассматриваться как альтернативный или даже ортогональный по отношению к оптогенетическому [4], но лишь с необходимой поправкой на существенно меньшую распространенность и универсальность первого. Так, на текущий момент число научных публикаций, описывающих применение термогенетических методов, не превышает нескольких сотен.

Интересным отличием термогенетики от оптогенетики является технологическое разнообразие способов активации эффекторных молекул. Хронологически первый и до сих пор наиболее распространенный способ – нагревание модельного организма целиком (как правило, речь идет о насекомых в специальном термостате) [5, 6]. Второй способ – локальное нагревание тканей с помощью магнитных наночастиц, диссипирующих тепло под действием внешних полей. Термическая активация рецептора

TRPV1 с помощью наночастиц оксида железа, облучаемых радиоволнами, описана по меньшей мере в трех работах [7–9]. В первой из них продемонстрирован принцип метода: авторы управляли активностью культуры нейронов, экспрессирующих рецептор TRPV1, воздействуя радиочастотами на ферритовые наночастицы, помещенные на поверхность клеток [7]. Во втором исследовании удалось регулировать уровень глюкозы в плазме крови мышей с перевиваемыми опухолями, экспрессирующими ген биоинженерного инсулина под контролем  $\text{Ca}^{2+}$ -чувствительного промотора. Промотор индуцировался кальциевым током через термочувствительный канал TRPV1, молекула которого была помечена наночастицами с помощью антител к гистидиновой метке [8]. В третьей работе аналогичным способом была осуществлена стимуляция нейронов, временно экспрессирующих TRPV1, в глубине ткани мозга живых мышей [9]. Более подробная информация о применении магнитных наночастиц в термогенетике изложена в материалах тематического обзора [10]. Наконец, третий способ термогенетической стимуляции – облучение лазерами, испускающими в инфракрасном диапазоне [11–13]. Авторы одной из работ разработали установку, обеспечивающую прецизионную активацию нейронов дрозофилы, и дали ей оригинальное название FlyMAD (the fly mind-altering device) [12]. Необходимо отметить, что в природе термогенетического стимула коренятся как фундаментальные недостатки метода, так и его потенциальные преимущества перед оптогенетикой. С одной стороны, необходимость локального изменения температуры заметно снижает временное разрешение стимуляции (что частично решается мощными ИК-лазерами), а подход с общим нагреванием объекта страдает фактической потерей пространственного разрешения. С другой стороны, и для лазерной ИК-стимуляции, и для радиоволнового возбуждения наночастиц характерна высокая степень проникновения стимула в ткань (до нескольких миллиметров), которая дает термогенетике заметное преимущество по сравнению с оптогенетикой в экспериментах по изучению таких органов, как сердце и головной мозг [4, 9, 10].

Несмотря на то что термогенетический подход пока применяется сравнительно редко, репертуар связанных с ним эффекторных молекул и модельных систем характеризуется значительным разнообразием и продолжает расти. Например, в качестве инструмента исследования и модуляции температурозависимой генной экспрессии в бактериях – паразитах теплокровных млекопитающих, использовали так называемые РНК-термометры (RNAT) [14]. Трехмерная укладка этих природных последовательностей, встречающихся в 5'-нетранслиру-

емых областях мРНК некоторых бактериальных генов, изменяется в зависимости от температуры. При низких температурах РНК-термометр ингибирует трансляцию мРНК путем ограничения возможности посадки рибосомы, а при повышении температуры, наоборот, происходит индукция трансляции. Другая техника термогенетического контроля транскрипции получила название IR-LEGO [15]. В этом случае ИК-лазерами облучали живую нематоду *C. elegans*, добиваясь локальной активации транскрипции трансгена (ген *GFP*), контролируемой промотором теплового шока *hsp16-2*. Сходную схему облучения в той же модельной системе недавно применили для демонстрации метода FLIRT (Fast Local InfraRed Thermogenetics) [16]. В данном случае термогенетический эксперимент был направлен на управление активностью белков, а мишенями служили термочувствительные варианты миозина-II, Delta и сук-4.

Исторически первый термогенетический эффектор для нейробиологии – мутант GTP-азы динамина, продукта экспрессии чувствительного к температуре аллеля гена *shibire* (*shi<sup>ts1</sup>*) *Drosophila* [17]. Динамин играет ключевую роль в регуляции эндоцитоза, в частности, в рециркуляции синаптических везикул, а экспрессия в нейронах его варианта *Shibire* (G273D) приводит к ингибированию их активности за счет истощения пула синаптических везикул и блокирования синаптической передачи [18]. С помощью таргетированной экспрессии *shi<sup>ts1</sup>* в холинергических нейронах дрозофилы удалось показать обратимый двигательный паралич животных в ответ на повышение температуры до 30° [17]. Сегодня аллельный вариант *shi<sup>ts1</sup>* – стандартный ингибиторный эффектор в нейробиологических исследованиях *Drosophila* [19–24].

Интересно, что в восприятие температуры у насекомых вовлечены хеморецепторы семейств IR и GR [25, 26]. Эти молекулы представляют собой лиганд-специфические катионнеселективные каналы, а молекулярные механизмы, позволяющие им участвовать в формировании поведения избегания в ответ на охлаждение или нагревание, остаются плохо изученными. Тем не менее, один из рецепторов семейства GR – Gr28bD – стал родоначальником принципиально нового класса термогенетических эффекторов [26]. Установлено, что термостимуляция ооцитов *Xenopus* и моторных нейронов дрозофилы, экспрессирующих *Gr28bD*, приводит к генерации трансмембранного катионного тока, запускающего потенциал действия в нейронах. Gr28bD использовали как активатор дофаминергических нейронов при изучении обучения и памяти у дрозофилы [27].

Наиболее важным классом эффекторных молекул, применяемых в современной термогенетике, особен-

но применительно к нейробиологическим задачам, являются ионные каналы семейства TRP (transient receptor potential channels, TRP channels) [5, 28, 29].

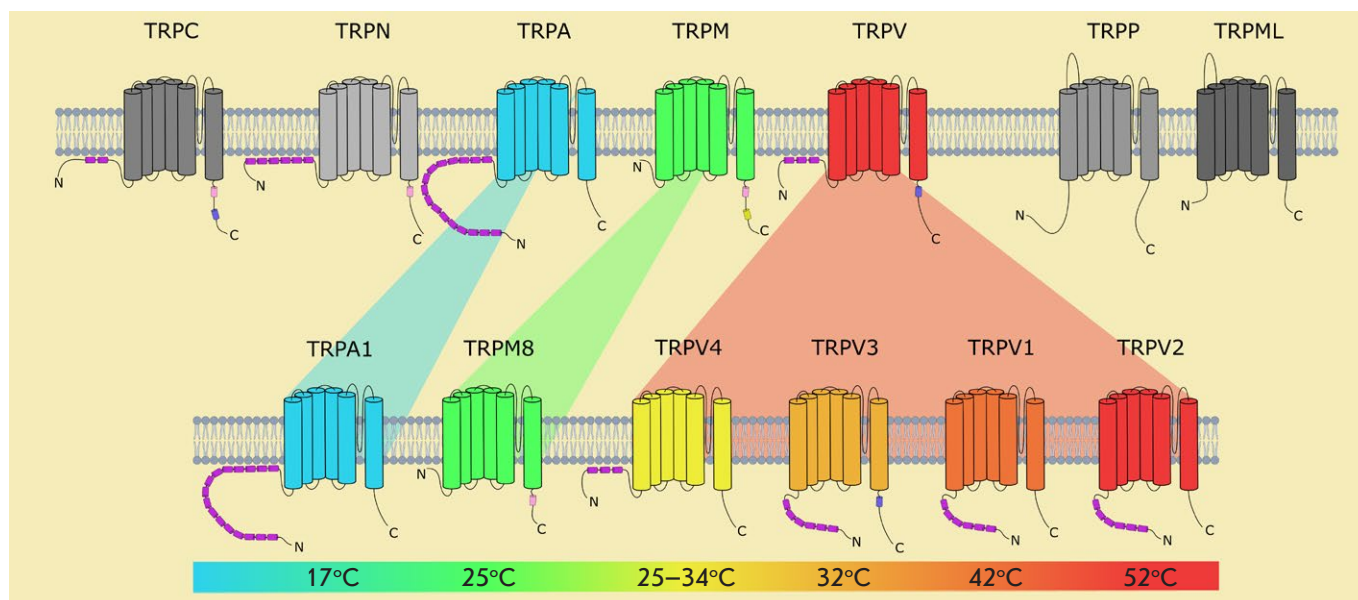
### TRP-каналы

TRP-каналы – это суперсемейство ионных каналов, расположенных на плазматической мембране животных клеток многих типов. На данный момент известно около 30 видов TRP-каналов, объединяемых в семь семейств и обладающих общими структурными свойствами (рис. 1). Все TRP-каналы состоят из шести трансмембранных сегментов, имеют в разной степени выраженную гомологию последовательности, а также неселективную катионную проницаемость [30]. От других ионных каналов TRP отличаются впечатляющим разнообразием катионной селективности и механизмов активации. Эти белки участвуют в работе всех сенсорных систем (зрение, вкус, обоняние, слух, осязание, термочувствительность и осмотическая чувствительность). Таким образом, TRP-каналы являются важными участниками формирования ответа на все основные классы внешних стимулов, включая свет, звук, химические вещества, температуру и механическое воздействие. Кроме того, TRP-каналы позволяют клеткам ощущать изменения в их ближайшем окружении, например, изменение осмолярности раствора [30].

TRP-каналы встречаются у большого числа многоклеточных организмов, включая червей, насекомых и позвоночных. Все суперсемейство TRP-каналов по принципу генной организации и топологии молекул можно разделить на две большие группы, включающие семь семейств (рис. 1).

После активации TRP-каналы начинают неселективно пропускать катионы, включая Na<sup>+</sup>, Ca<sup>2+</sup> и Mg<sup>2+</sup>. Вход ионов в нервные клетки приводит к изменению мембранного потенциала и генерации потенциала действия. Интересно, что проводимость TRP-каналов на три порядка величины выше, чем у канальных родосинов, задействованных в оптогенетике [31].

TRP-каналы могут активироваться различными веществами растительного происхождения, в том числе, обнаруженными в специях, например, в чесноке (аллицин), перце чили (капсаицин), васаби (аллилизотиоцианат), а также ментолом, камфорой, перечной мятой и др. Наибольший интерес для термогенетики представляют TRP-каналы, чувствительные к изменению температуры, так называемые термо-TRP-каналы (thermoTRP, рис. 1). Такие каналы активируются при достижении определенного порога температуры. Термо-TRP-каналы экспрессируются в термочувствительных нейронах и составляют молекулярную основу реакции организма на тепловые воздействия [30].



**Рис. 1.** Суперсемейство TRP-каналов и температурная чувствительность отдельных его представителей. В верхней части рисунка показаны семь семейств TRP, разделенных на две группы. В нижней части рисунка – представители трех семейств, задействованные в термогенетике. На цветовой шкале обозначены температуры активации соответствующих TRP

Известно четыре типа термо-TRP-каналов, активируемых нагреванием (TRPV1–4), и два термо-TRP-канала, активирующихся под воздействием холода (TRPM8 и TRPA1, см. рис. 1). При гетерологической экспрессии (в клетках HEK293, CHO, ооцитах *Xenopus*) все шесть TRP обладают удивительным свойством придавать клеткам чувствительность к температуре. Каждый тип термо-TRP-каналов имеет свой уникальный температурный порог активации [30, 32]. Их тепловая чувствительность такова, что нейрон, экспрессирующий thermoTRP, может активироваться при изменении температуры на 1–2°C [5, 33]. Высокая ионная проводимость делает эти рецепторы особенно удачными нейробиологическими инструментами. Даже при более низком уровне экспрессии thermoTRP вызывают деполяризацию стабильнее, чем каналы родопсины. Способность thermoTRP обеспечивать надежную активацию при умеренных уровнях экспрессии означает, что в генетических векторах могут использоваться относительно «слабые» промоторы. Кроме того, низкий уровень экспрессии сводит к минимуму потенциальную токсичность, связанную с экспрессией экзогенных белков. На сегодняшний день в нейробиологии дрозофилы широко применяются два инструмента на основе thermoTRP, TRPM8 крысы (rTRPM8) [34] и собственный рецептор дрозофилы TRPA1 (dTRPA1) [5] (более подробно – в разделе «Термогенетика в нейробиологии»). rTRPM8 – «холодный» канал, активируемый при температурах 25°C и ниже, а также чувствительный

к ментолу [28, 35]. На практике надежная активация нейронов мух с использованием гетерологической экспрессии rTRPM8 требует охлаждения животного до  $\leq 18^\circ\text{C}$  [34]. dTRPA1 – терморептор дрозофилы, реагирующий на нагревание и участвующий в формировании у личинок мух поведения избегания повышенных температур [5]. Интересно, что гомологи этого рецептора у млекопитающих, напротив, чувствительны к холоду [36]. dTRPA1 активируется при умеренном нагревании в диапазоне температур 25–29°C или несколько выше [5, 36–38]. Температурные режимы активации rTRPM8 и dTRPA1 делают эти рецепторы малоприспособными для экспериментов с теплокровными животными (и даже с их нейрональными культурами). На сегодняшний день большинство термогенетических экспериментов с клетками и тканями млекопитающих проведено с использованием «горячего» ванилоидного канала TRPV1 [7–9, 39], чувствительного к капсаицину и активирующегося при достаточно высоких температурах ( $> 42^\circ\text{C}$ ) [31, 40]. В единичных работах описано использование в роли термоэффекторов других thermoTRP: TRPV2 и 3 (в клетках HEK293) [41], TRPV4 (на первичной культуре нейронов крысы) [11], TRPA1 из термосенсорного аппарата гремучей змеи (на первичной культуре нейронов мыши) [13].

### Термогенетика в нейробиологии

Если в нейробиологической оптогенетике главным модельным организмом служит мышь, то нейроби-

ологическая термогенетика – практически исключительно «территория» плодовой мухи дрозофилы [20, 42]. За последнее десятилетие с помощью набора из двух thermoTRP-каналов (активаторы нейронов rTRPM8 и dTRPA1) и термочувствительного динамина (ингибитор нейронов Shibire<sup>ts</sup>) исследователям удалось совершить настоящий прорыв в понимании функционирования нервной системы этих насекомых. Термогенетический подход использовали при изучении памяти дрозофилы [21–23, 37], ее двигательной активности [19, 24, 34, 43], биологических ритмов [38, 44], пищевого [45, 46] и полового [6, 47] поведения, коннектома и механизмов обучения [48]. Чувствительные к температуре эффекторы применяли в оригинальных работах по исследованию влияния экспрессии микроРНК [49] и состава кишечного микробиома [50] на поведение плодовой мухи. На основе терморцептора dTRPA1 разработан учебный набор для демонстрации 60 различных типов поведения дрозофилы, инициируемых термогенетически [51].

Приложение термогенетического подхода к нейробиологии позвоночных пока не носит систематического характера. Описана активация thermoTRP *in vivo* в нейронах рыбы *Danio rerio* [13, 52] и мыши [8, 9]. Как уже упомянуто выше, принцип метода термогенетической активации продемонстрирован на культуре нейронов млекопитающих *in cellulo* [7, 11, 13] и на срезах мозга мыши *ex vivo* [39].

### Ограничения и перспективы метода

Современная термогенетика существенно уступает оптогенетике в пространственном и временном разрешении стимуляции. Так, thermoTRP активируют нейроны в течение секунд [5, 33], что, вероятно, отражает кинетику нагрева и охлаждения ткани. При планировании термогенетического эксперимента *in vivo* возникает необходимость координирования температурного режима активации эффектора и температурного оптимума экспериментального животного. Выход за рамки температурного оптимума может привести к активации собственных терморцепторов у животного, а иногда даже вызвать тепловой шок. Особую сложность представляет работа с теплокровными животными, так как в этом случае разница между нормальной температурой тела и температурой, при которой происходит разрушение тканей, составляет всего 6–7°C. Нагревание (или охлаждение) ткани с высоким пространственным разрешением – существенно более сложная задача, чем ее облучение светом видимой части спектра. С другой стороны, при необходимости воздействия на глубинные структуры мозга или на нервную систему в целом термогенетический подход может

быть предпочтительней оптогенетического (что подтверждается успешным его применением в нейробиологии насекомых).

Дальнейший прогресс термогенетики во многом связан с поиском новых эффекторных молекул, в частности, обладающих быстрой кинетикой активации/инактивации и/или функционирующих в температурном диапазоне 38–42°C (т.е. хорошо совместимых с физиологией теплокровных животных). В качестве теоретической возможности рассмотрено применение термогенетической нейростимуляции в терапевтических целях, например, для функционирования кохлеарных имплантатов [53].

### ХЕМОГЕНЕТИКА

Хемогенетика – семейство методов, подразумевающих химическую стимуляцию биологических систем малыми молекулами, опосредованную генетически введенными в эти системы эффекторами, обладающими: а) специфической чувствительностью к лигандам-стимулам; б) физиологически/биохимически значимой активностью, развивающейся в ответ на связывание лиганда. Из трех подходов, которые мы рассматриваем в настоящем обзоре, хемогенетика на сегодняшний момент, несомненно, развивается наиболее бурно. Так, если в 2013 году общее число опубликованных работ, в которых использовали хемогенетический арсенал, не превышало двух десятков (из которых лишь единицы в области нейробиологии), то в прошлом, 2019 году, выпущено не менее 300 хемогенетических исследований (в основном включающих эксперименты *in vivo* нейробиологической направленности). Экспоненциальная динамика роста интереса к инструментам специфической химической стимуляции наметилась примерно в 2014–2015 годах и, похоже, сохранится в ближайшие годы. Такой «хемогенетический бум», отчасти обусловленный общей «мобилизацией» нейронаук (в том числе подстегиваемой успехами оптогенетики), в высокой степени связан и с небывалым разнообразием механизмов стимуляции, доступных с привлечением малых молекул.

Сам термин «хемогенетика» допускает широкую трактовку. Мы перечислим основные хемогенетические подходы, двигаясь в направлении наиболее значимых для нейробиологии.

I. К хемогенетическим инструментам относят белки/РНК-флуорогены и малые молекулы, выступающие в роли экзогенных хромофоров для этих макромолекул [54]. Здесь реализуется принцип флуоресцентного мечения *dye in box* (краситель в коробочке), когда молекула красителя, способная проникнуть в клетку и самостоятельно не флуоресцирующая, нековалентно, с высокой спе-



цифичностью связывается с генетически введенной в клетку макромолекулой, приобретая способность к флуоресценции [55, 56]. Ярким примером воплощения этой концепции служит система FAST (fluorescence-activating and absorption shifting tag), в первоначальной форме представленная мономерным генно-инженерным вариантом апо-формы фотоактивного желтого белка (photoactive yellow protein, PYP) из галофильной протеобактерии *Halorhodospira halophila*, образующего флуоресцентные комплексы с производными 4-гидроксibenзилиденроданина [57]. В рамках FAST разработаны хемотретические инструменты для многоцветного мечения [58], включая флуорофоры с эмиссией флуоресценции в дальнекрасной области [59]. Как флуоресцентные метки флуорогенные пары обладают рядом преимуществ и перед однокомпонентными генетически кодируемыми красителями (GFP и сходными), и перед малыми органическими флуорофорами. В частности, для них характерна высокая фотостабильность и устойчивость к фотоусталости, которые критичны в контексте новейших методов микроскопии [60, 61].

II. Ряд авторов относит к хемотретическим подходам создание искусственных ферментов (в основном металлоэнзимов) и управление их активностью с помощью биотин-(стрепт)авидинового таргетинга [62–65]. Принцип состоит в доставке металлорганических катализаторов в биотинилированной форме к молекуле стрептавидина или его вариантов. Хемотретическая оптимизация каталитической активности таких гибридных молекул может осуществляться комбинированием библиотеки биотинилированных катализаторов с библиотекой мутантов стрептавидина [65].

III. Схожий, но более биологически релевантный принцип реализован в хемотретике (или даже хемотретомике) как инструменте скрининга библиотек малых молекул (drug discovery & screening) [66–69]. Метод, как правило, предполагает воздействие на биологическую модельную систему целевыми соединениями с селекцией по функционально значимому параметру, например, фенотипическому проявлению ферментативной активности. Он позволяет как выявить наиболее активное вещество в составе химической библиотеки, так и наоборот – вариант белка (или генотипа), наиболее чувствительного к заданному индивидуальному веществу. Хемотретический скрининг в дрожжевой системе позволил обнаружить новые ингибиторы протеинкиназ [66], гистоновых ацетилтрансфераз [69], новые фунгициды [70]. В недавнем масштабном проекте [71] был охарактеризован резистом (т.е. набор генов и их аллельных вариантов, связанных с устойчивостью к веществу) возбудителя малярии к нескольким десяткам противомалярийных препаратов.

Обнаружены генетические детерминанты множественной лекарственной устойчивости.

IV. Контроль белок-белковых взаимодействий с помощью малых молекул также концептуально относится к хемотретическим подходам. Здесь особенно значимы системы химически индуцируемой димеризации (CID) [72], позволяющие инициировать взаимодействие между белками-мишенями, слитыми с лиганд-активируемыми димеризующими доменами. Хорошо зарекомендовали себя CID-системы, основанные на гомодимеризации белка FKBP [73], гетеродимеризации белков FKBP/FRB [74] и их производные [75, 76]. В нейробиологии такие CID применяют для обратимой инактивации синаптической передачи сигнала *in vivo* (на трансгенных мышах) за счет подавления слияния синаптических везикул [77]. В другом семействе систем химически индуцируемой димеризации используется фермент дигидрофолатредуктаза (DHFR) и его синтетические ингибиторы (метотрексат, триметоприм). Для гетеродимеризации мишеней DHFR комбинируют с другими лигандсвязывающими белками [78, 79]. Большой интерес представляют основанные на этой CID-системе наноантитела (nanobodies) с химическим контролем аффинности к мишени [80, 81]. В частности, описано антитело, связывание которого с GFP включается и выключается лигандами NADPH и TMP соответственно [80]. Эта технология обеспечивает химически контролируемое обратимое флуоресцентное мечение.

В последнее время разрабатываются методы компьютерного дизайна белковых молекул, которые, будучи экспрессированными в виде двух комплементарных фрагментов, могут ассоциировать при связывании лиганда [82].

Взаимодействие FKBP с его партнером FRB и модуляция активности этих белков малыми молекулами (рапамицином и др.) нашли применение не только в системах димеризации, но и в хемотретическом управлении стабильностью белков-мишеней [83–85]. Интересная система контроля стабильности белка разработана на основе протеазы вируса гепатита С [86, 87]. Вирусный полипептид при его интеграции в химерный белок по умолчанию проявляет автопротеолитическую активность, которая блокируется введением в систему молекулы ингибитора. Таким образом, химерный белок сохраняет целостность и активность, пока ингибитор присутствует в клетке, и разрушается при его удалении. Удалось адаптировать различные фармакологические препараты к ингибированию протеолиза и показать потенциал этой системы дестабилизации белков в экспериментах с контролем транскрипции, редактирования генома, апоптоза.



V. В обиход входят хомогенетические генераторы малых молекул. Яркий пример – оксидаза *D*-аминокислот (DAAO) для генерирования пероксида водорода в клетках [88]. Этот дрожжевой фермент катализирует превращение *D*-аминокислот в соответствующие альфа-кето-производные с выделением молекулы пероксида [89]. Таким образом, для активации генератора  $H_2O_2$  можно использовать практически любую *D*-аминокислоту. DAAO как хомогенетический эффектор нашел применение в изучении активности антиоксидантных систем [90] и клеточного сигналинга [91] на культуре клеток, а также влияния пероксида на сердечную деятельность *in vivo* [92]. В перечисленных работах DAAO активировали совместно с мониторингом уровня пероксида с помощью флуоресцентных индикаторов.

VI. Принципы хомогенетики используются при конструировании флуоресцентных индикаторов мембранного потенциала. В одних случаях потенциал-чувствительные красители таргетируются на клеточную мембрану при помощи белковых молекул (как правило, с ковалентным присоединением к последним) [93, 94] или даже флуорогенно активируются заякоренными в мембране ферментами [95]. В других – ассоциированный с плазматической мембраной флуоресцентный белок играет роль донора FRET для органического флуорофора, мигрирующего в липидном бислое в ответ на изменение электрического потенциала [96]. В третьих, наоборот, потенциал-чувствительной единицей служит молекула микробного родопсина, а его флуоресцентный сигнал усиливается за счет резонансного переноса энергии с яркого флуоресцентного красителя, добавляемого в клетки экзогенно [97, 98]. Подобные индикаторы – перспективные нейробиологические инструменты, уже сегодня они используются для мониторинга электрической активности нейронов *in vivo* [98].

VII. Химическая индукция транскрипции генов бактериальных ферментов, вероятно, один из первых прототипов хомогенетических методов [99, 100]. В свою очередь, гетерологическая экспрессия бактериальных ферментов для внутриклеточной модификации малых молекул служит основной хомогенетических систем, в которых фармакологически релевантные соединения модулируют активность эндогенных белков в специфических типах клеток. Так, воздействие дауномицином (daun02, производным галактозы) на эукариотические клетки, экспрессирующие бактериальную бета-галактозидазу, применяли в качестве модельного инструмента терапии опухолей [101]. Ферментативная активность бета-галактозидазы конвертирует фармакологически инертный daun02 в антибиотик даунорубин, который вызывает апоптоз клеток. В контексте нейронаук приме-

чательны эксперименты на линии трансгенных крыс, в клетках которых бета-галактозидаза экспрессируется под контролем промотора *c-fos*. Авторы воспользовались феноменом дифференциального усиления экспрессии эндогенного транскрипционного трансактиватора Fos в нейронах, восприимчивых к воздействию кокаина, для селективного блокирования кальциевого сигналинга в этих клетках. Таким образом, введение дауномицина в мозг крыс позволило заблокировать ионные каналы (и, соответственно, передачу двигательных сигналов) только в нейронах, сенситизованных кокаином [102]. Хорошим потенциалом для нейробиологического применения в системах экспрессии с химической индукцией обладают некоторые природные нейротоксины. В частности, легкая цепь столбнячного токсина (TeNT), блокирующая синаптическую передачу путем протеолитического расщепления белков синаптических везикул [103], экспрессируемая в нейронах под контролем тетрациклин-чувствительных регуляторных элементов, используется (совместно с тетрациклиновым трансактиватором) как обратимый хомогенетический ингибитор [104–106].

VIII. Наконец, обширная и весьма гетерогенная в структурном и функциональном смысле группа хомогенетических эффекторов используется практически исключительно в нейробиологических исследованиях. Подробная характеристика этой группы представлена в следующем разделе.

### Хомогенетические эффекторы для нейробиологии

Все эффекторные молекулы, применяемые в нейробиологической хомогенетике, можно разделить на два типа: лиганд-зависимые ионные каналы и химически активируемые G-белок-сопряженные рецепторы [107]. Эволюция молекулярных инструментов обоих типов чаще всего направлена от применения природных рецепторов к инжинирингу химерных молекул, оптимизированных для эффективного решения частных научных задач.

Среди природных лиганд-зависимых катионных каналов в качестве хомогенетических эффекторов применяли уже упомянутые в разделе «Термогенетика» TRP-рецепторы. Напомним, что для этих катионных каналов характерна не только температурная, но и химическая чувствительность. При расшифровке роли эндогенного рецептора TRPM2, экспрессирующегося в клетках гипоталамуса млекопитающих, в центральной регуляции температуры тела активировали этот белок природным агонистом – аденозиндифосфатрибозой (ADPR), а также модулировали его активность сенсibilизатором – пероксидом водорода

[108]. Активацию ванилоидного рецептора TRPV1 капсаицином применяли для возбуждения культивируемых нейронов [109], а также *in vivo*, в мозге трансгенных мышей [110, 111], в том числе для изучения пищевого поведения [112] и боли [113]. Описана также стимуляция ментолом нейронов, экспрессирующих холодовой рецептор TRPM8 [109]. Существенный недостаток TRP-каналов как хомогенетических эффекторов – их присутствие в тканях мозга млекопитающих в качестве эндогенных рецепторов, чреватое развитием неспецифических ответов на стимуляцию. В этой связи в работах *in vivo* используют линии мышей с нокаутами генов TRP [107].

Важнейшая группа химически активируемых ионных каналов, нашедших применение в нейробиологии, – рецепторы с цистеиновой петлей (Cys-loop receptors) [107, 114]. Это семейство пентамерных молекул, несущих характерный цистеин-богатый структурный элемент, контролирующей проницаемость ионной поры, включает никотиновые, глициновые, серотониновые и GABA-рецепторы, а также

глутаматные хлорные каналы [107]. Хотя в единичных работах для контроля активности нейронов использовали и Cys-loop-рецепторы дикого типа (в частности, GABA(C) и его агонист *цис*-4-аминокроновую кислоту [115], а также GluCl и ивермектин [116]), большее распространение в качестве нейромодуляторов получили их искусственные варианты с повышенной чувствительностью [117, 118] и модифицированной специфичностью [119] к лиганду, а также с измененной ионной селективностью [120]. Однако наиболее востребованный хомогенетический инструмент, разработанный на основе Cys-loop-рецепторов, – это семейство химерных модульных ионных каналов (PSAM) и их лигандов (PSEM) [107, 120, 121]. Первый вариант фармакологически селективного активаторного модуля PSAM – продукт генетической модификации лигандсвязывающего домена (LBD)  $\alpha 7$ -никотинового ацетилхолинового рецептора (nAChR), направленной на снижение его сродства к ацетилхолину и выработку специфичности к синтетическим соединениям, не активирующим nAChR дикого типа. Последние

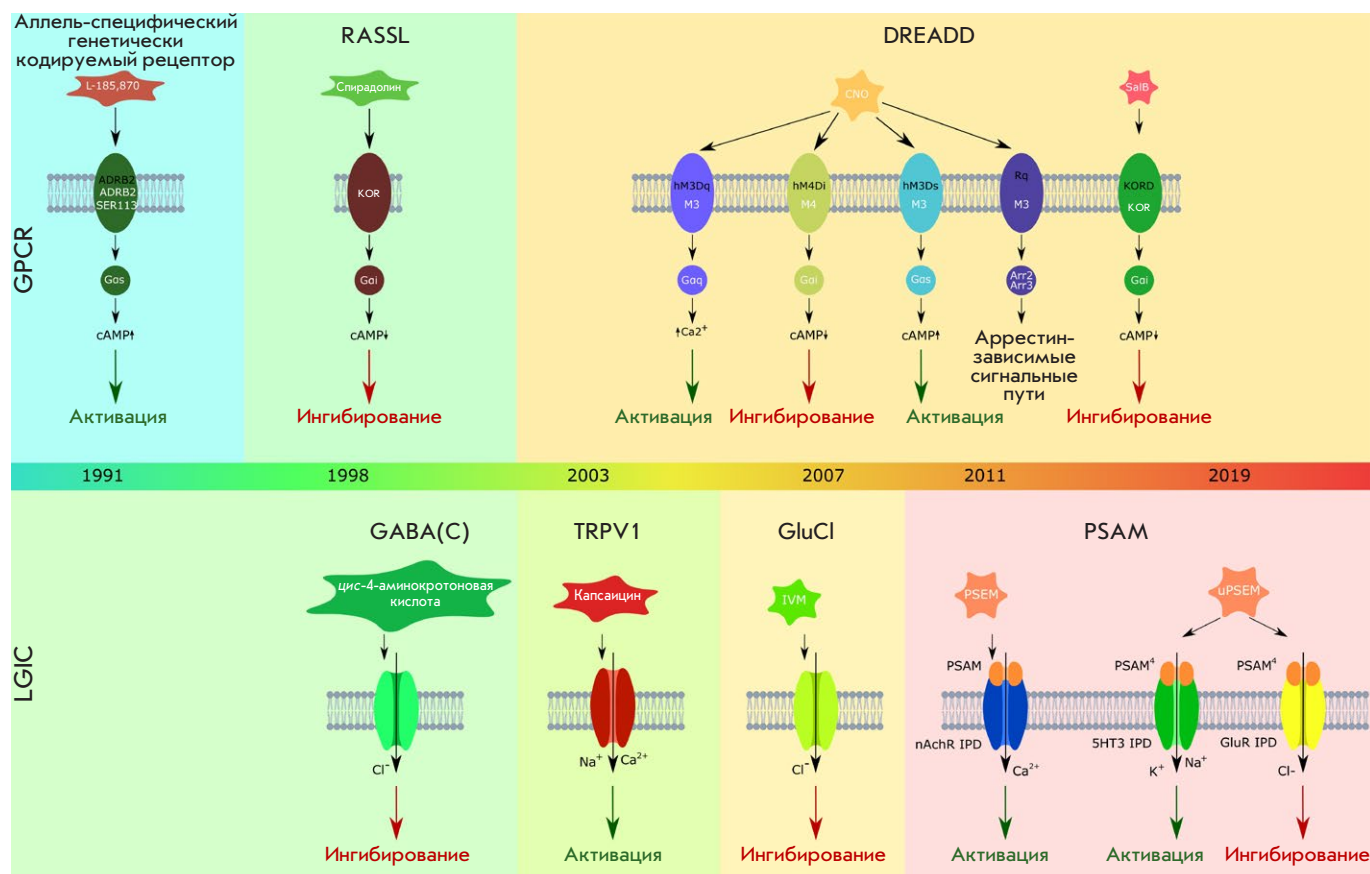


Рис. 2. Временная шкала, отражающая появление различных хомогенетических подходов. Показаны основные инструменты хомогенетики и их предшественники (сверху – на основе GPCR, снизу – лиганд-зависимых ионных каналов (ligand-gated ion channels, LGIC)), а также схематически изображены молекулярные механизмы активации этих молекул

были названы фармакологически селективными эффекторными модулями – PSEM [122]. Особенности молекулярной организации Cys-loop-рецепторов, а именно, относительная структурная независимость лигандсвязывающего домена (LBD) и домена ионной поры (IPD) [123], сделали возможным модульный инжиниринг рецепторов на основе PSAM. Так, селективный к PSEM-лигандам LBD был скомбинирован с доменами ионной поры других Cys-loop-рецепторов [122]. В сочетании с IPD серотонинового рецептора 5HT<sub>3</sub> активированный PSAM обеспечивает Na<sup>+</sup>/K<sup>+</sup>-токи внутрь клетки, деполяризацию мембраны и возбуждение нейрона, с IPD-рецептора nAChR – кальциевый ток внутрь клетки, а с IPD глицинового или GABA-рецептора – входящий ток Cl<sup>-</sup>, сопровождаемый гиперполяризацией мембраны и сайленсингом нейрональной активности (рис. 2). Каждый из хомогенетических модулей – PSAM, IPD и PSEM – может быть объектом дальнейших модификаций, направленных на расширение палитры доступных лигандов, увеличения специфичности и сродства к лиганду, проводимости ионной поры [107, 121]. В прошлом году были опубликованы результаты масштабной работы по рациональному дизайну нового активатора PSAM4, специфичного к антитабачному препарату варениклину, а также нового семейства лигандов uPSEM, обладающих субнаномолярным сродством к PSAM4 [124] (рис. 2). Потенциал этих инструментов показан в *in vivo* экспериментах по активации и подавлению нейрональной активности в мозге мышей и обезьян.

Система хомогенетической нейромодуляции на основе PSAM/PSEM использована в ряде важных работ по изучению механизмов памяти и обучения [125–129], боли [68], мотивационных эффектов голода и жажды [130], двигательной и поведенческой активности [131, 132] *in vivo*. Рассматриваются клинико-терапевтические перспективы этого подхода [133].

Как и оптогенетические инструменты на базе микробных родопсинов, лиганд-зависимые ионные каналы (TRP, Cys-loop) обладают ионотропным механизмом нейромодуляции, т.е. создают трансмембранные ионные токи, изменяющие поляризацию мембраны нейронов. Однако в хомогенетике существенно более широко, чем в оптогенетике, используют рецепторы с метаботропным механизмом активации – химически активируемые G-белок-сопряженные рецепторы (GPCR). Формирование пула хомогенетических GPCR, пригодных для нейробиологических экспериментов *in vivo*, заняло около 20 лет и происходило в несколько этапов (рис. 2). В ходе изучения молекулярных механизмов распознавания лиганда бета-адренергическими метаботропными рецепторами установлены ключевые аминокислотные положения,

связанные со специфичностью связывания адреналина, и на основе этих данных созданы варианты рецепторов, активируемые синтетическими производными катехола [134, 135]. Так появились первые аллель-специфические генетически кодируемые рецепторы [121, 134]. Сами модифицированные бета-адренергические рецепторы не нашли применения в нейробиологии, однако концепция изменения лиганд-специфичности средствами рационального дизайна стала ключевой для разработки семейства RASSL – рецепторов, активируемых исключительно синтетическими лигандами [136, 137].

Первые RASSL были получены в результате мутагенеза каппа-опиоидного рецептора (k-opioid receptor, KOR) [136]. Модифицированный KOR утратил чувствительность к эндогенным пептидным лигандам, однако стал активироваться синтетическим агонистом – спирадолином. Хомогенетические эксперименты *in vivo* с ранними вариантами RASSL позволили осуществить модуляцию сердечной деятельности мыши [138]. Позднее специфическую стимуляцию вкусовых нейронов с помощью RASSL использовали для расшифровки механизмов восприятия сладкого, умами и горького вкусов [139, 140]. RASSL нашли ограниченное применение в нейробиологии прежде всего из-за чувствительности к их лиганду, спирадолину, эндогенных опиоидных рецепторов [107].

Недостатки, характерные для RASSL, в основном устранены в следующем поколении химерных GPCR, названных DREADD (designer receptors exclusively activated by designer drugs, рис. 2) [141]. На сегодняшний день именно эти молекулы являются наиболее востребованными хомогенетическими инструментами.

### DREADD

Систематическое изучение молекулярной структуры и механизмов активации природных GPCR [142] обеспечило концептуальную основу для дизайна химерных молекул, активирующихся фармакологически инертным веществом [143]. Пилотной мишенью для мутагенеза стал мускариновый ацетилхолиновый рецептор hM3, который в результате модификации приобрел высокую селективность в отношении клозапин-N-оксида (CNO) и практически потерял сродство к природному агонисту, ацетилхолину [143]. Этот рецептор, ставший первым представителем семейства DREADD, получил название hM3Dq, поскольку связывает G-белки типа Gq. Выбор CNO как лиганда продиктован тем, что это вещество имеет благоприятную фармакокинетику в организме мыши и человека, а также практически не активирует эндогенные GPCR. Потенциал hM3Dq вскоре показали в экспериментах *in vivo*, где этот рецептор селек-

тивно активировал нейроны гиппокампа мыши [144]. Механизм возбуждения нейронов при активации GPCR гораздо сложнее, чем у ионотропных рецепторов. Например, активация hM3Dq приводит к запуску фосфоинозитольного сигналинга, повышающего возбудимость нейронов, а также к выбросу катионов кальция из внутриклеточных депо, которые, в свою очередь, способствуют запуску  $\text{Na}^+/\text{Ca}^{2+}$ -антипорта, деполяризующего мембрану [107]. Как и в случае с Cys-loop-рецепторами, «модульность» молекул GPCR облегчает дизайн их новых вариантов. Так, на основе упомянутого выше hM3Dq путем замены внутриклеточного G-белоксвязывающего модуля (на Gs-сопряженный из бета-адренергического рецептора) получен hM3Ds [145] – DREADD, активирующий продукцию cAMP в ответ на связывание CNO [146]. По аналогии с hM3 были модифицированы и другие мускариновые рецепторы, в результате чего семейство чувствительных к CNO DREADD расширилось. Помимо hM3Dq/hM3Ds, оно включает в себя hM1Dq, hM2Di, hM4Di, hM5Dq, некоторые из которых нашли широкое применение в нейробиологии [121, 143, 147]. В частности, hM4Di представляет собой ингибиторный эффектор, снижающий продукцию cAMP и обеспечивающий гиперполяризацию мембран нейронов, опосредованную открытием калиевых каналов [143]. В дальнейшем показали, что hM4Di также является мощным ингибитором синаптической передачи сигнала [148, 149]. Таким образом, в семейство DREADD входят как активирующие, так и ингибирующие нейрональную активность эффекторы, воздействующие на клеточную физиологию с помощью трех канонических G-белковых каскадов (Gas, Gaq, Gai). Кроме того, внесение дополнительной мутации в hM3Dq позволило получить DREADD[Rq(R165L)], не взаимодействующий с G-белками, но селективно запускающий  $\beta$ -аррестинный сигналинг [150]. Принципы молекулярного дизайна DREADD применили для инжиниринга других GPCR. Так, модификация капаопиоидного рецептора (KOR) позволила изменить лиганд-специфичность: вместо природного агониста, психоактивного сальвинорина А, его мутантный вариант KORDi – сайленсер нейрональной активности – активируется фармакологически инертным сальвинорином В [151].

Стратегии доставки генов DREADD в целевые клетки в целом схожи со стратегиями доставки канальных родопсинов и других оптогенетических эффекторов (см. I часть обзора) и включают транзентную экспрессию с помощью вирусных векторов и трансгенез [107]. При этом DREADD активируются исключительно специфическим химическим лигандом (CNO), который не присутствует в стимулируемых клетках и проявляет чрезвычайно слабую

активность в отношении эндогенных рецепторов. Можно выделить следующие преимущества использования DREADD для нейростимуляции [121]:

а) CNO может быть доставлен в мозг животного не только инвазивными методами (инъекции), но и перорально (с пищей или питьевой водой), а активация DREADD не требует специальных технических приспособлений и манипуляций (например, вживления в мозг экспериментального животного оптоволоконного кабеля или носимого имплантата);

б) фармакокинетика CNO подразумевает пролонгированное воздействие на нервные клетки (от минут до часов), что позволяет проводить эксперименты, предполагающие долговременную стимуляцию. Кроме того, при введении в организм животного лиганд DREADD достаточно равномерно распределяется в тканях и достигает самых глубоких областей мозга, исключая характерные для оптогенетики сложности со стимуляцией крупных популяций нейронов и труднодоступных участков нервной ткани.

Таким образом, не обладая высоким пространственным и временным разрешением и будучи малопригодной к анализу быстрых физиологических процессов, хемогенетическая стимуляция прекрасно подходит для изучения влияния на клетки различных хронических эффектов или для имитации протяженных во времени биохимических циклов, например циркадных ритмов.

Определенные сложности в применении DREADD создают высокие дозы CNO, необходимые для достижения достаточной интенсивности стимуляции [152], и связанные с этим побочные эффекты [153], а также пробелы в понимании молекулярных механизмов проникновения CNO в мозговую ткань. В 2017 году было показано, что в мозге крыс активация DREADD осуществляется не самим CNO (который плохо проникает через гематоэнцефалический барьер), а метаболически образованным клозапином [154]. Эти факты побудили к разработке новых агонистов DREADD, лучше проникающих в мозг и обладающих более высоким сродством к химерным рецепторам [155, 156]. Также предлагаются усовершенствованные технологии доставки лигандов, в частности, акустический таргетинг [157] и хемомагнитная модуляция с помощью рассеивающих тепло наночастиц [158], облегчающие локальное прохождение гематоэнцефалического барьера.

### **Применение в нейробиологии и перспективы метода**

Как мы уже отмечали, в последние 4–5 лет наблюдается настоящий бум нейробиологической хемогенетики. В основной массе новых работ используются рецепторы семейства DREADD, эксперименты про-



водят *in vivo*, а спектр модельных систем по широте (от мышей до обезьян) не уступает таковому в оптогенетике. Примечательно, что потребовалось почти десятилетие, чтобы подход, связанный с дизайнерскими хеморецепторами, стал общеупотребимым в нейронауках. Мы связываем это со сложностью молекулярных механизмов стимуляции нейронов с помощью экзогенных GPCR. Здесь мы приведем лишь отдельные яркие примеры хомогенетических работ, не имея возможности в формате обзора охватить все их разнообразие.

Хомогенетический подход позволил разобраться в механизмах регенерации аксонов [159], организации коннектома и взаимодействии крупных популяций нейронов [160–162], изучить нейрофизиологические основы когнитивной дисфункции на генетических моделях шизофрении [163, 164] и аутизма [165, 166]. В ряде работ селективную стимуляцию нейронов, экспрессирующих DREADD, использовали для изучения поведенческих эффектов кокаина [167] и алкоголя [168], а также нарушений в функционировании мозга потомства, обусловленных приемом алкоголя беременной самкой [169]. Множество «хомогенетических» публикаций посвящено расшифровке механизмов памяти [170–174] и сна [175–178]. В нескольких крупных работах рассмотрены необычные взаимосвязи функционирования нервной и пищеварительной систем: роль специфических популяций нейронов в развитии ожирения [179], гастронейральные пути выработки предпочтений в потреблении сахара [180], влияние микробиоты кишечника на активность симпатических нейронов [181]. В недавно проведенном изящном исследовании рецепторы DREADD помогли в установлении взаимосвязи стресса и появления седых волос [182]. Пожалуй, самый крупный и значимый блок научных проектов, в которых задействован хомогенетический арсенал, связан с изучением нейрофизиологических детерминант поведения животных. Здесь охвачены как традиционные темы – пищевое [183], защитное [184] поведение и внимание [185], так и специфические поведенческие паттерны, например, родительская забота [186] и вокализация при материнской коммуникации с новорожденным [187]. Хомогенетические инструменты нашли применение даже при изучении механизмов восприятия мышью запаха кошки [188, 189].

Обсуждается вопрос клинико-терапевтического применения хомогенетики. Речь идет и о системах рецептор–лиганд на основе GPCR [178, 190], и о лиганд-зависимых ионных каналах [133].

Невероятное разнообразие природных хеморецепторов (как их химической специфичности, так и механизмов активации) открывает широкие перспективы дальнейшего развития хомогенетического подхода.

## КОМБИНАЦИИ ПОДХОДОВ

Итак, мы рассмотрели три современных подхода к контролю биохимических процессов, сделав акцент на управлении активностью нервных клеток, а также молекулярные инструменты, связанные с реализацией этих подходов. У каждого из них – оптогенетического, термогенетического и хомогенетического – есть сильные и слабые стороны, причем преимущества одного подхода зачастую комплементарны недостаткам другого. Это позволяет в каждом отдельном случае применять более эффективный и релевантный инструмент и даже комбинировать разные принципы воздействия на клетки в одной модельной системе. Свою роль здесь играет и ортогональность механизмов стимуляции: например, кратковременное оптическое воздействие через ионные каналы и пролонгированная химическая стимуляция через G-белковый сигналинг с очевидностью могут дополнять друг друга.

Действительно, примеры взаимодополняющего использования опто- и хомогенетики можно найти в значительном числе нейробиологических экспериментов. Так, совместную оптогенетическую и хомогенетическую стимуляцию *in vivo* используют для изучения механизмов мотивации [191] и поведенческих адаптаций [192, 193], установления роли катиона натрия в регуляции циркадных ритмов [194] и роли микроглии в регуляции миелинизации [195], исследования эпилепсии [196], физиологии сна [197], регуляции пищевого поведения [198] и болевого восприятия [199].

Вместе с тем, существуют системы, где принципы оптической и химической стимуляции переплетены на молекулярном уровне, формируя не отдельно работающие, а по-настоящему гибридные молекулярные инструменты.

Пожалуй, первый пример такого рода относится к периоду зарождения нейробиологической оптогенетики, когда в 2003 году удалось осуществить стимуляцию нейронов гиппокампа, экспрессирующих лиганд-зависимые катионные каналы TRPV1 и P2X2, фотовысвобождаемыми лигандами (капсаицином и АТФ соответственно) [109]. Позже гибридную фотохимическую стимуляцию канала P2X2 применяли *in vivo* для контроля поведения дрозофилы [200]. Описано несколько систем обратимой фотохимической стимуляции, основанных на ковалентной модификации белка малой молекулой, пришитой через фотоизомеризующуюся (азобензольную) группу. В одном случае фотоизомеризация позволяла открывать (длинноволновым светом) и закрывать (коротковолновым) калиевый канал [201], в другом – обратимо презентировать лиганд ионотропному глутаматному рецептору (iGluR) [202]. Дальнейшим развитием это-



го подхода стала модификация эндогенных калиевых каналов и опосредованная ими фотохимическая стимуляция нейронов крысы *in cellulo* и *ex vivo* [203], а также появление новых «дизайнерских» калиевых каналов [204], ацетилхолиновых [205] и глутаматных [206] рецепторов с аналогичным принципом активации. Последние – из семейства LiGluR – использовали в экспериментах *in vivo* [206, 207]. В 2020 году появилось первое сообщение о фотохимически активируемом GPCR – эндогенном метаботропном глутаматном рецепторе (mGluR2), способном обратимо стимулировать нейроны [208].

К хемооптогенетическим эффекторам относится и флуорогенактивирующий пептид Mito-FAR, доставляющий в митохондрии фотосенсибилизатор MG-2I [209].

Наконец, самой изящной реализацией гибридного фотохимического подхода к контролю клеточной активности можно назвать систему BL-OG (BioLuminescent OptoGenetics), в которой эффектор представляет собой слитый белок (люминопсин), состоящий из люциферазы и канального родопсина [210–214]. Молекула родопсина активируется люминесценцией люциферазы, включение и интенсивность эмиссии которой, в свою очередь, может регулироваться составом и количеством добавляемых в систему кофакторов (люциферина и его транспортера). Метафорически BL-OG можно охарактеризовать как систему адресной доставки света в мозг.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ И ПЕРСПЕКТИВЫ

Оптогенетика – зрелый и чрезвычайно продуктивный метод, получивший широкое признание в научном сообществе. Так, в 2010 году оптогенетика была признана Методом Года по версии авторитетного

журнала Nature Methods [215] и заняла почетное место в сборнике Прорывы Десятилетия (Breakthroughs of the Decade), выпущенном журналом Science [216]. Исключительно высокая ценность оптогенетического подхода для нейробиологических исследований отмечена престижной премией Brain Prize, врученной в 2013 году шести исследователям, внесшим ключевой вклад в разработку и развитие оптогенетических инструментов. Оптогенетика включена в перечень базовых подходов к реализации крупнейшей научной программы BRAIN initiative (<https://braininitiative.nih.gov/>), курируемой американским Национальным институтом здоровья (NIH). Более того, с нашей точки зрения, успех оптогенетики оказал глобальное влияние на развитие научной методологии, став мощным катализатором развития самых разнообразных генетически кодируемых инструментов. Вероятно, лучшее свидетельство этому – сотни прорывных работ, увидевших свет за последнее десятилетие и демонстрирующих гибкость и эффективность новых подходов – хемогенетики, термогенетики и гибридных фотохимических методов. В дополнение к этим оформившимся и хорошо себя зарекомендовавшим методикам появляются и совершенно новые, например, ультразвуковая стимуляция нейронов, опосредованная активацией катионных каналов (соногенетика) [217] и однокомпонентная магнитная стимуляция (магнетогенетика), осуществляемая с помощью железосодержащих белков [218]. Пожелаем им успехов. ●

*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

- Abram P.K., Boivin G., Moiroux J., Brodeur J. // *Biol. Rev. Camb. Philos. Soc.* 2017. V. 92. № 4. P. 1859–1876.
- Garrity P.A., Goodman M.B., Samuel A.D., Sengupta P. // *Genes Dev.* 2010. V. 24. № 21. P. 2365–2382.
- McKemy D.D. // *Pflugers Arch.* 2007. V. 454. № 5. P. 777–791.
- Bernstein J.G., Garrity P.A., Boyden E.S. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2012. V. 22. № 1. P. 61–71.
- Hamada F.N., Rosenzweig M., Kang K., Pulver S.R., Ghezzi A., Jegla T.J., Garrity P.A. // *Nature.* 2008. V. 454. № 7201. P. 217–220.
- Kohatsu S., Koganezawa M., Yamamoto D. // *Neuron.* 2011. V. 69. № 3. P. 498–508.
- Huang H., Delikanli S., Zeng H., Ferkey D.M., Pralle A. // *Nat. Nanotechnol.* 2010. V. 5. № 8. P. 602–606.
- Stanley S.A., Gagner J.E., Damanpour S., Yoshida M., Dordick J.S., Friedman J.M. // *Science.* 2012. V. 336. № 6081. P. 604–608.
- Chen R., Romero G., Christiansen M.G., Mohr A., Anikeeva P. // *Science.* 2015. V. 347. № 6229. P. 1477–1480.
- Tay A., Di Carlo D. // *Curr. Med. Chem.* 2017. V. 24. № 5. P. 537–548.
- Albert E.S., Bec J.M., Desmadryl G., Chekroud K., Travo C., Gaboyard S., Bardin F., Marc I., Dumas M., Lenaers G., et al. // *J. Neurophysiol.* 2012. V. 107. № 12. P. 3227–3234.
- Bath D.E., Stowers J.R., Hörmann D., Poehlmann A., Dickson B.J., Straw A.D. // *Nat. Methods.* 2014. V. 11. № 7. P. 756–762.
- Ermakova Y.G., Lanin A.A., Fedotov I.V., Roshchin M., Kelmanson I.V., Kulik D., Bogdanova Y.A., Shokhina A.G., Bilan D.S., Staroverov D.B., et al. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. P. 15362.
- Klinkert B., Cimdins A., Gaubig L.C., Roßmanith J., Aschke-Sonnenborn U., Narberhaus F. // *J. Biotechnol.* 2012. V. 160. № 1–2. P. 55–63.
- Kamei Y., Suzuki M., Watanabe K., Fujimori K., Kawasaki T., Deguchi T., Yoneda Y., Todo T., Takagi S., Funatsu T., et al. // *Nat. Methods.* 2009. V. 6. № 1. P. 79–81.
- Hirsch S.M., Sundaramoorthy S., Davies T., Zhuravlev Y., Waters J.C., Shirasu-Hiza M., Dumont J., Canman J.C. // *Nat. Methods.* 2018. V. 15. № 11. P. 921–923.
- Kitamoto T. // *J. Neurobiol.* 2001. V. 47. № 2. P. 81–92.

18. Kawasaki F, Hazen M, Ordway R.W. // *Nat. Neurosci.* 2000. V. 3. № 9. P. 859–860.
19. Scaplen K.M., Mei N.J., Bounds H.A., Song S.L., Azanchi R., Kaun K.R. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 4427.
20. Luo L., Callaway E.M., Svoboda K. // *Neuron.* 2018. V. 98. № 2. P. 256–281.
21. Felsenberg J., Jacob P.F., Walker T., Barnstedt O., Edmondson-Stait A.J., Pleijzier M.W., Otto N., Schlegel P., Sharifi N., Perisse E., et al. // *Cell.* 2018. V. 175. № 3. P. 709–722.e15.
22. Senapati B., Tsao C.-H., Juan Y.-A., Chiu T.-H., Wu C.-L., Waddell S., Lin S. // *Nat. Neurosci.* 2019. V. 22. № 12. P. 2029–2039.
23. Zhao B., Sun J., Zhang X., Mo H., Niu Y., Li Q., Wang L., Zhong Y. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 4550.
24. Kohsaka H., Zwart M.F., Fushiki A., Fetter R.D., Truman J.W., Cardona A., Nose A. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 2654.
25. Ni L., Klein M., Svec K.V., Budelli G., Chang E.C., Ferrer A.J., Benton R., Samuel A.D., Garrity P.A. // *Elife.* 2016. V. 5. P. e13254.
26. Mishra A., Salari A., Berigan B.R., Miguel K.C., Amirshenava M., Robinson A., Zars B.C., Lin J.L., Milesu L.S., Milesu M., et al. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 901.
27. Mishra A., Cronley P., Ganesan M., Schulz D.J., Zars T. // *J. Neurogenet.* 2020. V. 34. № 1. P. 115–122.
28. McKemy D.D., Neuhusser W.M., Julius D. // *Nature.* 2002. V. 416. № 6876. P. 52–58.
29. Dhaka A., Viswanath V., Patapoutian A. // *Annu. Rev. Neurosci.* 2006. V. 29. P. 135–161.
30. Venkatachalam K., Montell C. // *Annu. Rev. Biochem.* 2007. V. 76. P. 387–417.
31. Tominaga M., Caterina M.J. // *J. Neurobiol.* 2004. V. 61. № 1. P. 3–12.
32. Jordt S.-E., McKemy D.D., Julius D. // *Curr. Opin. Neurobiol.* 2003. V. 13. № 4. P. 487–492.
33. Pulver S.R., Pashkovski S.L., Hornstein N.J., Garrity P.A., Griffith L.C. // *J. Neurophysiol.* 2009. V. 101. № 6. P. 3075–3088.
34. Peabody N.C., Pohl J.B., Diao F., Vreede A.P., Sandstrom D.J., Wang H., Zelensky P.K., White B.H. // *J. Neurosci.* 2009. V. 29. № 11. P. 3343–3353.
35. Peier A.M., Moqrich A., Hergarden A.C., Reeve A.J., Andersson D.A., Story G.M., Earley T.J., Dragoni I., McIntyre P., Bevan S., et al. // *Cell.* 2002. V. 108. № 5. P. 705–715.
36. Viswanath V., Story G.M., Peier A.M., Petrus M.J., Lee V.M., Hwang S.W., Patapoutian A., Jegla T. // *Nature.* 2003. V. 423. № 6942. P. 822–823.
37. Krashes M.J., DasGupta S., Vreede A., White B., Armstrong J.D., Waddell S. // *Cell.* 2009. V. 139. № 2. P. 416–427.
38. Parisky K.M., Agosto J., Pulver S.R., Shang Y., Kuklin E., Hodge J.J.L., Kang K., Kang K., Liu X., Garrity P.A., et al. // *Neuron.* 2008. V. 60. № 4. P. 672–682.
39. Roshchin M., Ermakova Y.G., Lanin A.A., Chebotarev A.S., Kelmanson I.V., Balaban P.M., Zheltikov A.M., Belousov V.V., Nikitin E.S. // *Neurosci. Lett.* 2018. V. 687. P. 153–157.
40. Tominaga M., Caterina M.J., Malmberg A.B., Rosen T.A., Gilbert H., Skinner K., Raumann B.E., Basbaum A.I., Julius D. // *Neuron.* 1998. V. 21. № 3. P. 531–543.
41. Yao J., Liu B., Qin F. // *Biophys. J.* 2009. V. 96. № 9. P. 3611–3619.
42. Guo C., Pan Y., Gong Z. // *Neurosci. Bull.* 2019. V. 35. № 6. P. 1058–1072.
43. Park J., Kondo S., Tanimoto H., Kohsaka H., Nose A. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 10307.
44. Dreyer A.P., Martin M.M., Fulgham C.V., Jabr D.A., Bai L., Beshel J., Cavanaugh D.J. // *PLoS Genet.* 2019. V. 15. № 11. P. e1008478.
45. Youn H., Kirkhart C., Chia J., Scott K. // *PLoS One.* 2018. V. 13. № 6. P. e0198362.
46. Poças G.M., Domingos P.M., Mirth C.K. // *J. Vis. Exp.* 2020. № 160. P. e61323.
47. Agrawal S., Dickinson M.H. // *J. Exp. Biol.* 2019. V. 222. № 16. P. jeb203414.
48. Warth Pérez Arias C.C., Frosch P., Fiala A., Riemensperger T.D. // *Front. Physiol.* 2020. V. 11. P. 53.
49. Picao-Osorio J., Johnston J., Landgraf M., Berni J., Alonso C.R. // *Science.* 2015. V. 350. № 6262. P. 815–820.
50. Schretter C.E., Vielmetter J., Bartos I., Marka Z., Marka S., Argade S., Mazmanian S.K. // *Nature.* 2018. V. 563. № 7731. P. 402–406.
51. McKellar C.E., Wytenbach R.A. // *J. Undergrad. Neurosci. Edu.* 2017. V. 15. № 2. P. A110–A116.
52. Chen S., Chiu C.N., McArthur K.L., Fetcho J.R., Prober D.A. // *Nat. Methods.* 2016. V. 13. № 2. P. 147–150.
53. Richter C.-P., Rajguru S., Bendett M. // *Proc. SPIE—the Int. Soc. Opt. Eng.* 2013. V. 8565. P. 85651Y.
54. Broch F., Gautier A. // *Chempluschem.* 2020. V. 85. № 7. P. 1487–1497.
55. Szent-Gyorgyi C., Schmidt B.F., Schmidt B.A., Creeger Y., Fisher G.W., Zakel K.L., Adler S., Fitzpatrick J.A.J., Woolford C.A., Yan Q., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2008. V. 26. № 2. P. 235–240.
56. Gallo E. // *Bioconjug. Chem.* 2020. V. 31. № 1. P. 16–27.
57. Plamont M.-A., Billon-Denis E., Maurin S., Gauron C., Pimenta F.M., Specht C.G., Shi J., Quérard J., Pan B., Rossignol J., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 3. P. 497–502.
58. Tebo A.G., Moeyaert B., Thauvin M., Carlon-Andres I., Böken D., Volovitch M., Padilla-Parra S., Dedecker P., Vriz S., Gautier A. // *Nat. Chem. Biol.* 2020. V. 17. № 1. P. 30–38.
59. Li C., Tebo A.G., Thauvin M., Plamont M.-A., Volovitch M., Morin X., Vriz S., Gautier A. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2020. V. 59. № 41. P. 17917–17923.
60. Li H., Vaughan J.C. // *Chem. Rev.* 2018. V. 118. № 18. P. 9412–9454.
61. Kiuchi T., Higuchi M., Takamura A., Maruoka M., Watanabe N. // *Nat. Methods.* 2015. V. 12. № 8. P. 743–746.
62. Collot J., Gradinaru J., Humbert N., Skander M., Zocchi A., Ward T.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2003. V. 125. № 30. P. 9030–9031.
63. Klein G., Humbert N., Gradinaru J., Ivanova A., Gilardoni F., Rusbandi U.E., Ward T.R. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2005. V. 44. № 47. P. 7764–7767.
64. Zimbron J.M., Sardo A., Heinisch T., Wohlschlagler T., Gradinaru J., Massa C., Schirmer T., Creus M., Ward T.R. // *Chemistry.* 2010. V. 16. № 43. P. 12883–12889.
65. Heinisch T., Ward T.R. // *Acc. Chem. Res.* 2016. V. 49. № 9. P. 1711–1721.
66. Bishop A.C., Ubersax J.A., Petsch D.T., Matheos D.P., Gray N.S., Blethrow J., Shimizu E., Tsien J.Z., Schultz P.G., Rose M.D., et al. // *Nature.* 2000. V. 407. № 6802. P. 395–401.
67. Deb Roy A., Gruschow S., Cairns N., Goss R.J.M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. № 35. P. 12243–12245.
68. Ren W., Centeno M.V., Berger S., Wu Y., Na X., Liu X., Kondapalli J., Apkarian A.V., Martina M., Surmeier D.J. // *Nat. Neurosci.* 2016. V. 19. № 2. P. 220–222.
69. Secci D., Carradori S., Bizzarri B., Bolasco A., Ballario P., Patramani Z., Fragapane P., Vernarecci S., Canzonetta C., Filetici P. // *Bioorg. Med. Chem.* 2014. V. 22. № 5. P. 1680–1689.

70. Chaillot J., Tebbji F., García C., Wurtele H., Pelletier R., Sellam A. // *Front. Microbiol.* 2017. V. 8. P. 1956.
71. Cowell A.N., Istvan E.S., Lukens A.K., Gomez-Lorenzo M.G., Vanaerschot M., Sakata-Kato T., Flannery E.L., Magistrado P., Owen E., Abraham M., et al. // *Science*. 2018. V. 359. № 6372. P. 191–199.
72. Voß S., Klewer L., Wu Y.-W. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2015. V. 28. P. 194–201.
73. Spencer D.M., Wandless T.J., Schreiber S.L., Crabtree G.R. // *Science*. 1993. V. 262. № 5136. P. 1019–1024.
74. Ho S.N., Biggar S.R., Spencer D.M., Schreiber S.L., Crabtree G.R. // *Nature*. 1996. V. 382. № 6594. P. 822–826.
75. Liberles S.D., Diver S.T., Austin D.J., Schreiber S.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1997. V. 94. № 15. P. 7825–7830.
76. Wu H.D., Kikuchi M., Dagliyan O., Aragaki A.K., Nakamura H., Dokholyan N.V., Umehara T., Inoue T. // *Nat. Methods*. 2020. V. 17. № 9. P. 928–936.
77. Karpova A.Y., Tervo D.G.R., Gray N.W., Svoboda K. // *Neuron*. 2005. V. 48. № 5. P. 727–735.
78. Lin H., Abida W.M., Sauer R.T., Cornish V.W. // *J. Am. Chem. Soc.* 2000. V. 122. № 17. P. 4247–4248.
79. Czlapinski J.L., Schelle M.W., Miller L.W., Laughlin S.T., Kohler J.J., Cornish V.W., Bertozzi C.R. // *J. Am. Chem. Soc.* 2008. V. 130. № 40. P. 13186–13187.
80. Farrants H., Tarnawski M., Müller T.G., Otsuka S., Hiblot J., Koch B., Kueblbeck M., Kräusslich H.-G., Ellenberg J., Johnsson K. // *Nat. Methods*. 2020. V. 17. № 3. P. 279–282.
81. Marzilli A.M., McMahan J.B., Ngo J.T. // *Nat. Methods*. 2020. V. 17. № 3. P. 259–260.
82. Dagliyan O., Krokhotin A., Ozkan-Dagliyan I., Deiters A., Der C.J., Hahn K.M., Dokholyan N.V. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 4042.
83. Banaszynski L.A., Chen L.-C., Maynard-Smith L.A., Ooi A.G.L., Wandless T.J. // *Cell*. 2006. V. 126. № 5. P. 995–1004.
84. Banaszynski L.A., Sellmyer M.A., Contag C.H., Wandless T.J., Thorne S.H. // *Nat. Med.* 2008. V. 14. № 10. P. 1123–1127.
85. Glass M., Busche A., Wagner K., Messerle M., Borst E.M. // *Nat. Methods*. 2009. V. 6. № 8. P. 577–579.
86. Tague E.P., Dotson H.L., Tunney S.N., Sloas D.C., Ngo J.T. // *Nat. Methods*. 2018. V. 15. № 7. P. 519–522.
87. Jacobs C.L., Badiie R.K., Lin M.Z. // *Nat. Methods*. 2018. V. 15. № 7. P. 523–526.
88. Stein K.T., Moon S.J., Sikes H.D. // *ACS Synth. Biol.* 2018. V. 7. № 9. P. 2037–2044.
89. Pollegioni L., Langkau B., Tischer W., Ghisla S., Piloni M.S. // *J. Biol. Chem.* 1993. V. 268. № 19. P. 13850–13857.
90. Mishina N.M., Bogdanova Y.A., Ermakova Y.G., Panova A.S., Kotova D.A., Bilan D.S., Steinhorn B., Arnér E.S.J., Michel T., Belousov V.V. // *Antioxid. Redox Signal.* 2019. V. 31. № 9. P. 664–670.
91. Saeedi Saravi S.S., Eroglu E., Waldeck-Weiermair M., Sorrentino A., Steinhorn B., Belousov V., Michel T. // *Redox Biol.* 2020. V. 36. P. 101605.
92. Steinhorn B., Sorrentino A., Badole S., Bogdanova Y., Belousov V., Michel T. // *Nat. Commun.* 2018. V. 9. № 1. P. 4044.
93. Sundukova M., Prifti E., Bucci A., Kirillova K., Serrao J., Reymond L., Umebayashi M., Hovius R., Riezman H., Johnsson K., et al. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2019. V. 58. № 8. P. 2341–2344.
94. Grenier V., Daws B.R., Liu P., Miller E.W. // *J. Am. Chem. Soc.* 2019. V. 141. № 3. P. 1349–1358.
95. Liu P., Grenier V., Hong W., Muller V.R., Miller E.W. // *J. Am. Chem. Soc.* 2017. V. 139. № 48. P. 17334–17340.
96. Chanda B., Blunck R., Faria L.C., Schweizer F.E., Mody I., Bezanilla F. // *Nat. Neurosci.* 2005. V. 8. № 11. P. 1619–1626.
97. Xu Y., Peng L., Wang S., Wang A., Ma R., Zhou Y., Yang J., Sun D.-E., Lin W., Chen X., et al. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2018. V. 57. № 15. P. 3949–3953.
98. Abdelfattah A.S., Kawashima T., Singh A., Novak O., Liu H., Shuai Y., Huang Y.-C., Campagnola L., Seeman S.C., Yu J., et al. // *Science*. 2019. V. 365. № 6454. P. 699–704.
99. Pardee A.B., Jacob F., Monod J. // *J. Mol. Biol.* 1959. V. 1. № 2. P. 165–178.
100. Jacob F., Monod J. // *J. Mol. Biol.* 1961. V. 3. P. 318–356.
101. Farquhar D., Pan B.F., Sakurai M., Ghosh A., Mullen C.A., Nelson J.A. // *Cancer Chemother. Pharmacol.* 2002. V. 50. № 1. P. 65–70.
102. Koya E., Golden S.A., Harvey B.K., Guez-Barber D.H., Berkow A., Simmons D.E., Bossert J.M., Nair S.G., Uejima J.L., Marin M.T., et al. // *Nat. Neurosci.* 2009. V. 12. № 8. P. 1069–1073.
103. Link E., Edelmann L., Chou J.H., Binz T., Yamasaki S., Eisel U., Baumert M., Südhof T.C., Niemann H., Jahn R. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 1992. V. 189. № 2. P. 1017–1023.
104. Nakashiba T., Young J.Z., McHugh T.J., Buhl D.L., Tonegawa S. // *Science*. 2008. V. 319. № 5867. P. 1260–1264.
105. Wahl A.S., Omlor W., Rubio J.C., Chen J.L., Zheng H., Schröter A., Gullo M., Weinmann O., Kobayashi K., Helmchen F., et al. // *Science*. 2014. V. 344. № 6189. P. 1250–1255.
106. Kinoshita M., Matsui R., Kato S., Hasegawa T., Kasahara H., Isa K., Watakabe A., Yamamori T., Nishimura Y., Alstermark B., et al. // *Nature*. 2012. V. 487. № 7406. P. 235–238.
107. Atasoy D., Sternson S.M. // *Physiol. Rev.* 2018. V. 98. № 1. P. 391–418.
108. Song K., Wang H., Kamm G.B., Pohle J., Reis F. de C., Heppenstall P., Wende H., Siemens J. // *Science*. 2016. V. 353. № 6306. P. 1393–1398.
109. Zemelman B.V., Nesnas N., Lee G.A., Miesenbock G. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2003. V. 100. № 3. P. 1352–1357.
110. Arenkiel B.R., Klein M.E., Davison I.G., Katz L.C., Ehlers M.D. // *Nat. Methods*. 2008. V. 5. № 4. P. 299–302.
111. Güler A.D., Rainwater A., Parker J.G., Jones G.L., Argilli E., Arenkiel B.R., Ehlers M.D., Bonci A., Zweifel L.S., Palmiter R.D. // *Nat. Commun.* 2012. V. 3. P. 746.
112. Dietrich M.O., Zimmer M.R., Bober J., Horvath T.L. // *Cell*. 2015. V. 160. № 6. P. 1222–1232.
113. Wang S., Bian C., Yang J., Arora V., Gao Y., Wei F., Chung M.-K. // *eNeuro*. V. 7. № 3. P. ENEURO.0118-20.2020.
114. Sine S.M., Engel A.G. // *Nature*. 2006. V. 440. № 7083. P. 448–455.
115. Cheng Q., Kulli J.C., Yang J. // *J. Neurosci.* 2001. V. 21. № 10. P. 3419–3428.
116. Slimko E.M., McKinney S., Anderson D.J., Davidson N., Lester H.A. // *J. Neurosci.* 2002. V. 22. № 17. P. 7373–7379.
117. Lerchner W., Xiao C., Nashmi R., Slimko E.M., van Trigt L., Lester H.A., Anderson D.J. // *Neuron*. 2007. V. 54. № 1. P. 35–49.
118. Lin D., Boyle M.P., Dollar P., Lee H., Lein E.S., Perona P., Anderson D.J. // *Nature*. 2011. V. 470. № 7333. P. 221–226.
119. Obenaus H.A., Rozov A., Bertocchi I., Tang W., Kirsch J., Betz H., Sprengel R. // *Front. Mol. Neurosci.* 2016. V. 9. P. 75.
120. Islam R., Keramidis A., Xu L., Durisic N., Sah P., Lynch J.W. // *ACS Chem. Neurosci.* 2016. V. 7. № 12. P. 1647–1657.
121. Sternson S.M., Roth B.L. // *Annu. Rev. Neurosci.* 2014. V. 37. P. 387–407.
122. Magnus C.J., Lee P.H., Atasoy D., Su H.H., Looger L.L., Sternson S.M. // *Science*. 2011. V. 333. № 6047. P. 1292–1296.
123. Eiselé J.L., Bertrand S., Galzi J.L., Devillers-Thiéry A., Changeux J.P., Bertrand D. // *Nature*. 1993. V. 366. № 6454.



- P. 479–483.
124. Magnus C.J., Lee P.H., Bonaventura J., Zemla R., Gomez J.L., Ramirez M.H., Hu X., Galvan A., Basu J., Michaelides M., et al. // *Science*. 2019. V. 364. № 6436. P. eaav5282.
125. Donato F., Rompani S.B., Caroni P. // *Nature*. 2013. V. 504. № 7479. P. 272–276.
126. Lovett-Barron M., Kaifosh P., Kheirbek M.A., Danielson N., Zaremba J.D., Reardon T.R., Turi G.F., Hen R., Zemelman B.V., Losonczy A. // *Science*. 2014. V. 343. № 6173. P. 857–863.
127. Donato F., Chowdhury A., Lahr M., Caroni P. // *Neuron*. 2015. V. 85. № 4. P. 770–786.
128. Basu J., Zaremba J.D., Cheung S.K., Hitti F.L., Zemelman B.V., Losonczy A., Siegelbaum S.A. // *Science*. 2016. V. 351. № 6269. P. aaa5694.
129. Karunakaran S., Chowdhury A., Donato F., Quairiaux C., Michel C.M., Caroni P. // *Nat. Neurosci.* 2016. V. 19. № 3. P. 454–464.
130. Betley J.N., Xu S., Cao Z.F.H., Gong R., Magnus C.J., Yu Y., Sternson S.M. // *Nature*. 2015. V. 521. № 7551. P. 180–185.
131. Esposito M.S., Capelli P., Arber S. // *Nature*. 2014. V. 508. № 7496. P. 351–356.
132. Muñoz W., Tremblay R., Levenstein D., Rudy B. // *Science*. 2017. V. 355. № 6328. P. 954–959.
133. Vogt N. // *Nat. Methods*. 2019. V. 16. № 5. P. 363.
134. Strader C.D., Gaffney T., Sugg E.E., Candelore M.R., Keys R., Patchett A.A., Dixon R.A. // *J. Biol. Chem.* 1991. V. 266. № 1. P. 5–8.
135. Small K.M., Brown K.M., Forbes S.L., Liggett S.B. // *J. Biol. Chem.* 2001. V. 276. № 34. P. 31596–31601.
136. Coward P., Wada H.G., Falk M.S., Chan S.D., Meng F., Akil H., Conklin B.R. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 1998. V. 95. № 1. P. 352–357.
137. Conklin B.R., Hsiao E.C., Claeysen S., Dumuis A., Srinivasan S., Forsayeth J.R., Guettier J.-M., Chang W.C., Pei Y., McCarthy K.D., et al. // *Nat. Methods*. 2008. V. 5. № 8. P. 673–678.
138. Redfern C.H., Coward P., Degtyarev M.Y., Lee E.K., Kwa A.T., Hennighausen L., Bujard H., Fishman G.I., Conklin B.R. // *Nat. Biotechnol.* 1999. V. 17. № 2. P. 165–169.
139. Zhao G.Q., Zhang Y., Hoon M.A., Chandrashekar J., Erlenbach I., Ryba N.J.P., Zuker C.S. // *Cell*. 2003. V. 115. № 3. P. 255–266.
140. Mueller K.L., Hoon M.A., Erlenbach I., Chandrashekar J., Zuker C.S., Ryba N.J.P. // *Nature*. 2005. V. 434. № 7030. P. 225–229.
141. Zhu H., Roth B.L. // *Int. J. Neuropsychopharmacol.* 2014. V. 18. № 1. P. pyu007.
142. Armbruster B.N., Roth B.L. // *J. Biol. Chem.* 2005. V. 280. № 7. P. 5129–5132.
143. Armbruster B.N., Li X., Pausch M.H., Herlitze S., Roth B.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 12. P. 5163–5168.
144. Alexander G.M., Rogan S.C., Abbas A.I., Armbruster B.N., Pei Y., Allen J.A., Nonneman R.J., Hartmann J., Moy S.S., Nicoletti M.A., et al. // *Neuron*. 2009. V. 63. № 1. P. 27–39.
145. Guettier J.-M., Gautam D., Scarselli M., Ruiz de Azua I., Li J.H., Rosemond E., Ma X., Gonzalez F.J., Armbruster B.N., Lu H., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. № 45. P. 19197–19202.
146. Farrell M.S., Pei Y., Wan Y., Yadav P.N., Daigle T.L., Urban D.J., Lee H.-M., Sciaky N., Simmons A., Nonneman R.J., et al. // *Neuropsychopharmacology*. 2013. V. 38. № 5. P. 854–862.
147. Whissell P.D., Tohyama S., Martin L.J. // *Front. Genet.* 2016. V. 7. P. 70.
148. Mahler S.V., Vazey E.M., Beckley J.T., Keistler C.R., McGlinchey E.M., Kaufling J., Wilson S.P., Deisseroth K., Woodward J.J., Aston-Jones G. // *Nat. Neurosci.* 2014. V. 17. № 4. P. 577–585.
149. Stachniak T.J., Ghosh A., Sternson S.M. // *Neuron*. 2014. V. 82. № 4. P. 797–808.
150. Nakajima K., Wess J. // *Mol. Pharmacol.* 2012. V. 82. № 4. P. 575–582.
151. Vardy E., Robinson J.E., Li C., Olsen R.H.J., DiBerto J.F., Giguere P.M., Sassano F.M., Huang X.-P., Zhu H., Urban D.J., et al. // *Neuron*. 2015. V. 86. № 4. P. 936–946.
152. Roth B.L. // *Neuron*. 2016. V. 89. № 4. P. 683–694.
153. MacLaren D.A.A., Browne R.W., Shaw J.K., Krishnan Radhakrishnan S., Khare P., España R.A., Clark S.D. // *eNeuro*. V. 3. № 5. P. ENEURO.0219-16.2016.
154. Gomez J.L., Bonaventura J., Lesniak W., Mathews W.B., Sysa-Shah P., Rodriguez L.A., Ellis R.J., Richie C.T., Harvey B.K., Dannals R.F., et al. // *Science*. 2017. V. 357. № 6350. P. 503–507.
155. Bonaventura J., Eldridge M.A.G., Hu F., Gomez J.L., Sanchez-Soto M., Abramyan A.M., Lam S., Boehm M.A., Ruiz C., Farrell M.R., et al. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 4627.
156. Nagai Y., Miyakawa N., Takuwa H., Hori Y., Oyama K., Ji B., Takahashi M., Huang X.-P., Slocum S.T., DiBerto J.F., et al. // *Nat. Neurosci.* 2020. V. 23. № 9. P. 1157–1167.
157. Szablowski J.O., Lee-Gosselin A., Lue B., Malounda D., Shapiro M.G. // *Nat. Biomed. Eng.* 2018. V. 2. № 7. P. 475–484.
158. Rao S., Chen R., LaRocca A.A., Christiansen M.G., Senko A.W., Shi C.H., Chiang P.-H., Varnavides G., Xue J., Zhou Y., et al. // *Nat. Nanotechnol.* 2019. V. 14. № 10. P. 967–973.
159. Jaiswal P.B., Mistretta O.C., Ward P.J., English A.W. // *Brain Sci.* 2018. V. 8. № 5. P. 93.
160. Wall N.R., Neumann P.A., Beier K.T., Mokhtari A.K., Luo L., Malenka R.C. // *Neuron*. 2019. V. 104. № 5. P. 916–930.e5.
161. Zhang D., Yan X., She L., Wen Y., Poo M.-M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2020. V. 117. № 33. P. 20254–20264.
162. Peeters L.M., Hinz R., Detrez J.R., Missault S., De Vos W.H., Verhoye M., van der Linden A., Keliris G.A. // *Neuroimage*. 2020. V. 220. P. 117088.
163. Marissal T., Salazar R.F., Bertollini C., Mutel S., De Roo M., Rodriguez I., Müller D., Carleton A. // *Nat. Neurosci.* 2018. V. 21. № 10. P. 1412–1420.
164. Mukherjee A., Carvalho F., Eliez S., Caroni P. // *Cell*. 2019. V. 178. № 6. P. 1387–1402.e14.
165. Krishnan V., Stoppel D.C., Nong Y., Johnson M.A., Nadler M.J.S., Ozkaynak E., Teng B.L., Nagakura I., Mohammad F., Silva M.A., et al. // *Nature*. 2017. V. 543. № 7646. P. 507–512.
166. Trakoshis S., Martínez-Cañada P., Rocchi F., Canella C., You W., Chakrabarti B., Ruigrok A.N., Bullmore E.T., Suckling J., Markicevic M., et al. // *Elife*. 2020. V. 9. P. e55684.
167. Bariselli S., Miyazaki N.L., Creed M.C., Kravitz A.V. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 3996.
168. Valyear M.D., Glovaci I., Zaari A., Lahlou S., Trujillo-Pisanty I., Andrew Chapman C., Chaudhri N. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 3764.
169. Cuzon Carlson V.C., Gremel C.M., Lovinger D.M. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 2555.
170. Adamsky A., Kol A., Kreisel T., Doron A., Ozeri-Engelhard N., Melcer T., Refaeli R., Horn H., Regev L., Groysman M., et al. // *Cell*. 2018. V. 174. № 1. P. 59–71.e14.
171. Khalaf O., Resch S., Dixsaut L., Gorden V., Glauser L., Gräff J. // *Science*. 2018. V. 360. № 6394. P. 1239–1242.
172. Zhu B., Eom J., Hunt R.F. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 5156.
173. Shrestha P., Ayata P., Herrero-Vidal P., Longo F., Gastone



- A., LeDoux J.E., Heintz N., Klann E. // *Nat. Neurosci.* 2020. V. 23. № 2. P. 281–292.
174. Keinath A.T., Nieto-Posadas A., Robinson J.C., Brandon M.P. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 3026.
175. Eban-Rothschild A., Rothschild G., Giardino W.J., Jones J.R., de Lecea L. // *Nat. Neurosci.* 2016. V. 19. № 10. P. 1356–1366.
176. Holth J.K., Fritsch S.K., Wang C., Pedersen N.P., Cirrito J.R., Mahan T.E., Finn M.B., Manis M., Geerling J.C., Fuller P.M., et al. // *Science.* 2019. V. 363. № 6429. P. 880–884.
177. Feng H., Wen S.-Y., Qiao Q.-C., Pang Y.-J., Wang S.-Y., Li H.-Y., Cai J., Zhang K.-X., Chen J., Hu Z.-A., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 3661.
178. Fleury Curado T., Pho H., Freire C., Amorim M.R., Bonaventura J., Kim L.J., Lee R., Cabassa M.E., Streeter S.R., Branco L.G., et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2020. V. 203. № 1. P. 102–110.
179. Ewbank S.N., Campos C.A., Chen J.Y., Bowen A.J., Padilla S.L., Dempsey J.L., Cui J.Y., Palmiter R.D. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. № 34. P. 20874–20880.
180. Tan H.-E., Sisti A.C., Jin H., Vignovich M., Villavicencio M., Tsang K.S., Goffer Y., Zuker C.S. // *Nature.* 2020. V. 580. № 7804. P. 511–516.
181. Muller P.A., Schneeberger M., Matheis F., Wang P., Kerner Z., Ilanges A., Pellegrino K., Del Marmol J., Castro T.B.R., Furuichi M., et al. // *Nature.* 2020. V. 583. № 7816. P. 441–446.
182. Zhang B., Ma S., Rachmin I., He M., Baral P., Choi S., Gonçalves W.A., Shwartz Y., Fast E.M., Su Y., et al. // *Nature.* 2020. V. 577. № 7792. P. 676–681.
183. Barbier M., Chometton S., Pautrat A., Miguët-Alfonsi C., Datiche F., Gascuel J., Fellmann D., Peterschmitt Y., Coizet V., Risold P.-Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. № 27. P. 15967–15976.
184. Barbano M.F., Wang H.-L., Zhang S., Miranda-Barrientos J., Estrin D.J., Figueroa-González A., Liu B., Barker D.J., Morales M. // *Neuron.* 2020. V. 107. № 2. P. 368–382.e8.
185. Nabel E.M., Garkun Y., Koike H., Sadahiro M., Liang A., Norman K.J., Taccheri G., Demars M.P., Im S., Caro K., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 3983.
186. Bendesky A., Kwon Y.-M., Lassance J.-M., Lewarch C.L., Yao S., Peterson B.K., He M.X., Dulac C., Hoekstra H.E. // *Nature.* 2017. V. 544. № 7651. P. 434–439.
187. Tasaka G.-I., Feigin L., Maor I., Groysman M., DeNardo L.A., Schiavo J.K., Froemke R.C., Luo L., Mizrahi A. // *Neuron.* 2020. V. 107. № 3. P. 566–579.e7.
188. Kondoh K., Lu Z., Ye X., Olson D.P., Lowell B.B., Buck L.B. // *Nature.* 2016. V. 532. № 7597. P. 103–106.
189. Tong W.H., Abdulai-Saiku S., Vyas A. // *Neuroendocrinology.* 2020. V. 111. № 6. P. 505–520.
190. Shchepinova M.M., Hanyaloglu A.C., Frost G.S., Tate E.W. // *Curr. Opin. Chem. Biol.* 2020. V. 56. P. 98–110.
191. Parker K.E., Pedersen C.E., Gomez A.M., Spangler S.M., Walicki M.C., Feng S.Y., Stewart S.L., Otis J.M., Al-Hasani R., McCall J.G., et al. // *Cell.* 2019. V. 178. № 3. P. 653–671.e19.
192. Han W., Tellez L.A., Rangel M.J., Motta S.C., Zhang X., Perez I.O., Canteras N.S., Shammah-Lagnado S.J., van den Pol A.N., de Araujo I.E. // *Cell.* 2017. V. 168. № 1–2. P. 311–324.e18.
193. Mu Y., Bennett D.V., Rubinov M., Narayan S., Yang C.-T., Tanimoto M., Mensh B.D., Looger L.L., Ahrens M.B. // *Cell.* 2019. V. 178. № 1. P. 27–43.e19.
194. Gizowski C., Bourque C.W. // *Nature.* 2020. V. 583. № 7816. P. 421–424.
195. Hughes A.N., Appel B. // *Nat. Neurosci.* 2020. V. 23. № 9. P. 1055–1066.
196. Chen B., Xu C., Wang Y., Lin W., Wang Y., Chen L., Cheng H., Xu L., Hu T., Zhao J., et al. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 923.
197. Zhong P., Zhang Z., Barger Z., Ma C., Liu D., Ding X., Dan Y. // *Neuron.* 2019. V. 104. № 4. P. 795–809.e6.
198. Bai L., Mesgarzadeh S., Ramesh K.S., Huey E.L., Liu Y., Gray L.A., Aitken T.J., Chen Y., Beutler L.R., Ahn J.S., et al. // *Cell.* 2019. V. 179. № 5. P. 1129–1143.e23.
199. Yin L., Li L., Deng J., Wang D., Guo Y., Zhang X., Li H., Zhao S., Zhong H., Dong H. // *Front. Neural Circuits.* 2019. V. 13. P. 73.
200. Lima S.Q., Miesenböck G. // *Cell.* 2005. V. 121. № 1. P. 141–152.
201. Banghart M., Borges K., Isacoff E., Trauner D., Kramer R.H. // *Nat. Neurosci.* 2004. V. 7. № 12. P. 1381–1386.
202. Volgraf M., Gorostiza P., Numan R., Kramer R.H., Isacoff E.Y., Trauner D. // *Nat. Chem. Biol.* 2006. V. 2. № 1. P. 47–52.
203. Fortin D.L., Banghart M.R., Dunn T.W., Borges K., Wagenaar D.A., Gaudry Q., Karakossian M.H., Otis T.S., Kristan W.B., Trauner D., et al. // *Nat. Methods.* 2008. V. 5. № 4. P. 331–338.
204. Fortin D.L., Dunn T.W., Fedorchak A., Allen D., Montpetit R., Banghart M.R., Trauner D., Adelman J.P., Kramer R.H. // *J. Neurophysiol.* 2011. V. 106. № 1. P. 488–496.
205. Tochitsky I., Banghart M.R., Mourou A., Yao J.Z., Gaub B., Kramer R.H., Trauner D. // *Nat. Chem.* 2012. V. 4. № 2. P. 105–111.
206. Szobota S., Gorostiza P., Del Bene F., Wyart C., Fortin D.L., Kolstad K.D., Tulyathan O., Volgraf M., Numan R., Aaron H.L., et al. // *Neuron.* 2007. V. 54. № 4. P. 535–545.
207. Wyart C., Del Bene F., Warp E., Scott E.K., Trauner D., Baier H., Isacoff E.Y. // *Nature.* 2009. V. 461. № 7262. P. 407–410.
208. Donthamsetti P.C., Broichhagen J., Vyklicky V., Stanley C., Fu Z., Visel M., Levitz J.L., Javitch J.A., Trauner D., Isacoff E.Y. // *J. Am. Chem. Soc.* 2019. V. 141. № 29. P. 11522–11530.
209. Qian W., Kumar N., Roginskaya V., Fouquerel E., Opreško P.L., Shiva S., Watkins S.C., Kolodieznyi D., Bruchez M.P., van Houten B. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. № 37. P. 18435–18444.
210. Berglund K., Clissold K., Li H.E., Wen L., Park S.Y., Gleixner J., Klein M.E., Lu D., Barter J.W., Rossi M.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 3. P. E358–E367.
211. Park S.Y., Song S.-H., Palmateer B., Pal A., Petersen E.D., Shall G.P., Welchko R.M., Ibata K., Miyawaki A., Augustine G.J., et al. // *J. Neurosci. Res.* 2020. V. 98. № 3. P. 410–421.
212. Zenchak J.R., Palmateer B., Dorka N., Brown T.M., Wagner L.-M., Medendorp W.E., Petersen E.D., Prakash M., Hochgeschwender U. // *J. Neurosci. Res.* 2020. V. 98. № 3. P. 458–468.
213. Berglund K., Fernandez A.M., Gutekunst C.-A.N., Hochgeschwender U., Gross R.E. // *J. Neurosci. Res.* 2020. V. 98. № 3. P. 422–436.
214. Gomez-Ramirez M., More A.I., Friedman N.G., Hochgeschwender U., Moore C.I. // *J. Neurosci. Res.* 2020. V. 98. № 3. P. 471–480.
215. Method of the Year 2010. // *Nat. Methods.* 2011. V. 8. № 1. P. 1. doi: 10.1038/nmeth.f.321.
216. News Staff. // *Science.* 2010. V. 330. № 6011. P. 1612–1613.
217. Ibsen S., Tong A., Schutt C., Esener S., Chalasani S.H. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 8264.
218. Wheeler M.A., Smith C.J., Ottolini M., Barker B.S., Purohit A.M., Grippo R.M., Gaykema R.P., Spano A.J., Beenhakker M.P., Kucenas S., et al. // *Nat. Neurosci.* 2016. V. 19. № 5. P. 756–761.

УДК 612.017.1616-097

# Получение нейтрализующих наноантител к стеблевому домену гемагглютинаина вируса гриппа типа А

Д. В. Воронина\*, Д. В. Щепляков, И. Б. Есмагамбетов, А. А. Деркаев, О. Попова,  
Д. Н. Щербинин

Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Москва, 123098 Россия

\*E-mail: daryavoronin2009@yandex.ru

Поступила в редакцию 18.06.2021

Принята к печати 05.08.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11495

**РЕФЕРАТ** Вирус гриппа ежегодно уносит порядка 650 000 жизней. В условиях прогрессирующей резистентности к противовирусным препаратам и сниженной эффективности вакцинации среди определенных групп населения возникает необходимость в новых подходах к терапии гриппозной инфекции. Представленная работа посвящена получению однодоменных антител (наноантител) к высококонсервативному стержневому домену гемагглютинаина вируса гриппа типа А при помощи технологии фагового дисплея. В результате были отобраны два высокоаффинных клона наноантител, показавшие 100% нейтрализующую активность *in vivo* при заражении мышей летальными дозами вируса гриппа штаммов H1N1 и H5N2. Полученные данные указывают на возможность создания высокоэффективных препаратов на основе однодоменных антител для терапии гриппозной инфекции.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** наноантитела, VHN, фаговый дисплей, вирус гриппа.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** HA – гемагглютинин; CD – стеблевой (стержневой) домен HA; HcAb – тяжелоцепочечные антитела представителей семейства Camelidae; VHN – вариабельный домен HcAb; ПЦР – полимеразная цепная реакция; ИФА – иммуноферментный анализ; EC<sub>50</sub> – полумаксимальная эффективная концентрация; SPR – поверхностный плазмонный резонанс; LD<sub>50</sub> – полуметальная доза; mAb – моноклональные антитела.

## ВВЕДЕНИЕ

Грипп остается серьезной проблемой мирового здравоохранения, несмотря на доступность ежегодно обновляющихся вакцин и разработанные этиопатогенетические подходы к терапии этого инфекционного заболевания. Основным способом контроля гриппозной инфекции на сегодняшний день остается вакцинация. Специфическую профилактику дополняют противовирусные препараты, действующие как на сезонные, так и на пандемические штаммы вируса гриппа. Однако, принимая во внимание возрастающую лекарственную резистентность, сниженную эффективность вакцинации у определенных групп населения и короткое терапевтическое окно имеющихся противовирусных лекарственных средств, остро встает необходимость в препаратах нового типа для лечения инфекции, вызванной вирусом гриппа.

Эффективной стратегией в терапии гриппозной инфекции может быть получение антител, спе-

цифичных к высококонсервативным участкам вирусных белков. Гемагглютинин (HA) – один из главных белков оболочки вируса гриппа, находится на поверхности вириона в виде тримера, мономеры которого состоят из двух субъединиц: HA1 и HA2. Пространственно в HA выделяют апикальный глобулярный домен, включающий центральную часть субъединицы HA1, и дистальный стеблевой (стержневой) домен (CD), который сформирован субъединицей HA2, а также N- и C-концевыми участками субъединицы HA1 [1]. Подавляющее большинство антител в организме направлено на высокоиммуногенный участок вокруг рецепторсвязывающего сайта, расположенного в глобулярном домене, обеспечивая тем самым нейтрализацию вируса и оказывая одновременно с этим иммуноселективный прессинг, приводящий к возникновению эскейп-мутантов [2]. Такие антитела почти всегда штаммо- или подтип-специфичны. CD, напротив, менее иммуногенен, однако антитела к нему зачастую распознают несколько

подтипов НА за счет высококонсервативной последовательности [2]. Таким образом, разработка антител к СД считается перспективным направлением в создании новых противовирусных препаратов.

Известные на данный момент мАт к СД обладают различным спектром реактивности: от связывания с подтипами НА внутри одной филогенетической группы [3–10] до распознавания НА среди обеих групп [11–21] и даже перекрестной активности между НА типа А и В [22]. Большинство этих антител узнают консервативные конформационные эпитопы в СД. Наряду с каноническими антителами, получены и однодоменные антитела (наноантитела, VHH) к СД [23, 24]. Все описанные наноантитела обладают перекрестной реактивностью и нейтрализуют вирусы внутри одной филогенетической группы НА или в результате создания мультиспецифичных конструкций приобретают способность нейтрализовать вирусы гриппа как типа А, так и типа В.

VHH – это вариабельный домен «тяжелощепоочечных» иммуноглобулинов, HcAb, обнаруженных у представителей семейства Camelidae [25]. Несмотря на свой небольшой размер (12–15 кДа), VHH не уступают в аффинности и специфичности каноническим антителам. Благодаря уникальной стабильности в широком диапазоне температур, в присутствии различных детергентов, а также устойчивости к протеолитическому расщеплению, однодоменные антитела можно доставлять в организм перорально или ингаляционно [26, 27]. Наноантитела нашли применение в терапии онкологических, гематологических, инфекционных и аутоиммунных заболеваний, некоторые препараты проходят клинические испытания или одобрены к применению в европейских странах и США [28, 29].

В данной работе получен стабилизированный тример СД для сохранения конформационных эпитопов нейтрализующих антител, с помощью технологии фагового дисплея отобраны вируснейтрализующие VHH, специфичные к СД. Выбраны два высокоаффинных клона, показавших 100% нейтрализующую активность *in vivo* в модели летальной инфекции на вирусах гриппа H1N1 и H5N2. Таким образом, установлена возможность получения высокоэффективных препаратов на основе VHH для терапии гриппозной инфекции.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Биоматериалы

В работе использованы высокоочищенные препараты рекомбинантных белков: полноразмерные НА вируса гриппа типа А H3N2 (A/

Switzerland/9715293/2013) (Sino Biological, Китай), H1N1 (A/California/04/2009) (Sino Biological). Эндонуклеазы рестрикции, Т4-ДНК-лигаза и щелочная фосфатаза (FastAP) получены от фирм NEB (США) и Thermo Fisher Scientific (США). Для иммунизации альпака использовали гриппозную трехвалентную инактивированную полимер-субъединичную вакцину Гриппол® плюс («НПО ПЕТРОВАКС ФАРМ», Россия).

### Получение СД НА

Нуклеотидную последовательность, соответствующую аминокислотной последовательности СД вируса гриппа штамма H1N1 (A/Brisbane/59/2007) (НА stem) #4900, приведенной в работе Impagliazzo А. и соавт. [30], синтезировали в ЗАО «Евроген» (Россия), клонировали в плазмиду pShuttle-CMV (Stratagene, США) и получали плазмиду pShuttle-CMV-NAstem. Далее культуру клеток CHO-S (Thermo Fisher Scientific) транзистентно трансфицировали плазмидой pShuttle-CMV-NAstem с использованием системы CHO Gro (Mirus Bio, США) в соответствии с протоколом производителя. Клетки культивировали в колбах Эрленмейера (125 об/мин, 5% CO<sub>2</sub>, 80% влажности, 37°C), спустя 24 ч температуру снижали до 32°C и продолжали культивировать в течение 10 дней. Начиная с 3-го дня добавляли подпитки Cell boosts 7a (2%), 7b (0.2%) (HyClone, США) и 0.5% CHO Bioreactor Feed (Sigma, США) 1 раз в день. По истечении 10 дней культуральную жидкость осветляли центрифугированием при 5000 g. СД НА очищали аффинной хроматографией на системе АКТА start (Cytiva Швеция), используя колонки HisTrap 1 мл (Cytiva) в соответствии с протоколом производителя. Дополнительную очистку и замену буфера на 20 мМ фосфат натрия, 150 мМ натрия хлорид проводили на колонке XK 26/100 (Cytiva), упакованной сорбентом Superdex 200 pg (Cytiva).

### Иммунизация животного

Альпака (*Vicugna pacos*) иммунизировали 5 раз с интервалом 14 дней между первой и второй инъекцией и 10 дней между последующими. При проведении первичной иммунизации животному подкожно вводили препарат, состоящий из вакцины Гриппол® плюс (100 мкг) и полного адъюванта Фрейнда (Sigma), смешиваемых в соотношении 1 : 1 до получения гомогенной суспензии. В последующие четыре инъекции вводили Гриппол® плюс в сочетании с неполным адъювантом Фрейнда (Sigma). До иммунизации и через 7 дней после пятой инъекции у животного отбирали небольшое количество крови (5–10 мл) в качестве контроля для опреде-

ления концентрации специфичных антител. Спустя неделю после последней инъекции 50 мл венозной крови отбирали в стерильный контейнер с антикоагулянтом литий-гепарин. Фракцию мононуклеарных клеток периферической крови получали по стандартному протоколу путем центрифугирования с раствором фиколла плотностью 1.077 («ПанЭко», Россия).

#### Получение фаговой библиотеки, селекция индивидуальных клонов

Выделение мРНК, ПЦР-амплификацию целевых фрагментов ДНК и конструирование библиотеки проводили по стандартным протоколам [31, 32]. Варибельные домены тяжелоцепочечных иммуноглобулинов из В-лимфоцитов периферической крови иммунизированного альпака клонировали в фагмидный вектор pHEN1. Используемые в двухстадийной ПЦР специфические праймеры содержали сайты рестрикции SfiI и NotI на 5'- и 3'-конце соответственно. Амплифицированные последовательности V<sub>H</sub> клонировали по указанным сайтам рестрикции с помощью эндонуклеаз SfiI, NotI и ДНК-лигазы фага T4. Полученными рекомбинантными плазмидными ДНК методом электропорации трансформировали электрокомпетентные клетки *Escherichia coli* штамм TG1. В результате получили базовую библиотеку наноантител, сложность которой составила  $3 \times 10^6$  индивидуальных клонов.

Фаги, несущие специфичные к СД наноантитела, отобраны с помощью трех раундов селекции (паннинга). В качестве антигена использовали СД HA H1N1 (A/Brisbane/59/2007) в количестве 5 мкг в первом раунде и 1 мкг в двух последующих. Из индивидуальных клонов, отобранных в процессе селекции, выделяли плазмидную ДНК и секвенировали последовательности фрагментов V<sub>H</sub>.

#### Экспрессия и очистка наноантител

Для экспрессии кандидатных наноантител рекомбинантную фагмидную ДНК, выделенную из отобранных индивидуальных клонов клеток TG1, трансформировали в *E. coli* штамм BL21. Бактериальные клетки наращивали в течение ночи в жидкой среде при 30°C, осаждали центрифугированием и лизировали BugBuster Protein Extraction Reagent (Novagen, США) согласно протоколу производителя. Наноантитела очищали на кобальтовой смоле TALON Superflow (GE Healthcare Bio-Sciences AB, Швеция) с последующим переводом элюированной фракции в фосфатно-солевой буфер. Наличие экспрессии и ее уровень оценивали с использованием электрофореза в 12% полиакриламидном геле в денатурирующих условиях.

#### Электрофорез белков

Электрофорез белков проводили в 12% полиакриламидном геле (Bio-Rad, США) в присутствии додецилсульфата натрия по Лэммли. При электрофорезе в денатурирующих невосстанавливающих условиях образцы смешивали с буфером для нанесения проб без 2-меркаптоэтанола и, не нагревая, вносили в лунки геля. В качестве стандарта молекулярных масс использовали Precision Plus Protein™ (Bio-Rad).

#### Иммуноферментный анализ

Для измерения антител в сыворотке крови альпака образцы сыворотки добавляли в лунки планшета с иммобилизованными в стандартном 0.05 М карбонатно-бикарбонатном буфере (pH 9.6) рекомбинантными HA или СД (1 мкг/мл), затем обрабатывали поликлональными антителами козы к IgG ламы, конъюгированными с пероксидазой хрена (HRP) (Bethyl Laboratories, США). Обогащение библиотек оценивали с использованием меченных пероксидазой хрена антител к фагу M13 (Sino Biological). При проведении непрямого анализа с наноантителами использовали вторичные поликлональные HRP-антитела к эпитопу с-мус (Abcam, Великобритания). В качестве субстрата для пероксидазы хрена использовали раствор тетраметилбензидина (ТМБ) (Bio-Rad). Оптическую плотность измеряли на длине волны 450 нм с помощью мультимодального ридера Varioskan LUX (Thermo Fisher Scientific).

#### Поверхностный плазмонный резонанс (SPR)

Аффинность и кинетику взаимодействия наноантител и антигена (СД HA) определяли на четырехканальном оптическом биосенсоре Biacore 3000 (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Рекомбинантный белок СД (20 мкг/мл в 10 мМ ацетатном буфере pH 4.5) ковалентно иммобилизовали на поверхности оптического чипа CM5 с помощью набора Amine Coupling Kit (GE Healthcare Bio-Sciences AB). Уровень иммобилизации лиганда в рабочем канале оптического биосенсора составил 1800 RU.

Кинетические параметры анализировали путем инъекции пятикратных разведений образцов наноантител в диапазоне концентраций от 267 до 0 нМ через контрольный (без иммобилизованного лиганда) и рабочий каналы в течение 3 мин с постоянной скоростью потока 15 мкл/мин. В качестве рабочего буфера использовали HBS-EP (0.01 М HEPES pH 7.4, 0.15 М NaCl, 3 мМ EDTA, 0.005% Surfactant P20). Время диссоциации после нанесения образцов составляло 10 мин. После каждого измерения проводили регенерацию поверхности чипа с помощью инъекции буфера, содержащего 100 мМ Трис-HCl pH 1.3, в течение 30 с при скорости потока



30 мкл/мин. Все измерения проводили при температуре 25°C не менее 2 раз.

Значения равновесных констант диссоциации и ассоциации ( $K_d$  и  $K_a$ ), констант скорости образования ( $k_{on}$ ) и распада ( $k_{off}$ ) молекулярных комплексов рассчитывали с помощью программного обеспечения BIAEvaluation (GE Healthcare Bio-Sciences AB).

### Оценка нейтрализующей способности ВНН *in vivo*

Исследования выполняли на 6-недельных самках мышей линии BALB/c массой 18–20 г. Для заражения животных использовали вирусы гриппа A/Duck/mallard/Moscow/4970/2018 (H1N1) и A/Mallard duck/Pennsylvania/10218/84 (H5N2), адаптированные к мышам, любезно предоставленные Лабораторией молекулярной биотехнологии ФГБУ «НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи» Министерства здравоохранения РФ.

Животных разделяли на группы (опытные и контрольные) по пять особей в каждой и заражали интраназально смесью антител (200 мкг) и вируса (15 LD<sub>50</sub>), предварительно инкубированной в течение 1 ч при 37°C, в объеме 50 мкл/мышь (в случае опытных групп) или вирусом в дозе 15 LD<sub>50</sub> в ФСБ (контрольные группы). За мышами наблюдали в течение 14 дней после инфицирования, ежедневно осматривали и взвешивали. Агонизирующих или потерявших более 25% от изначальной массы животных подвергали эвтаназии методом цервикальной дислокации. Нейтрализующее действие наноантител оценивали по выживаемости мышей и динамике изменения массы тела.

### Статистический анализ

Статистическую обработку данных выполняли с помощью программ Microsoft Excel и GraphPad Prism 7.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Стабилизированный тример СД НА

Мы использовали аминокислотную последовательность стабилизированного тримеризующегося СД НА штамма H1N1 (A/Brisbane/59/2007), опубликованную Impagliazzo A. и соавт. [30]. Для повышения уровня экспрессии СД НА последовательность сигнального пептида НА заменили последовательностью сигнального пептида щелочной фосфатазы SEAP. СД НА нарабатывали в клеточной линии CHO-S, способной обеспечивать высокий уровень экспрессии рекомбинантного белка [33]. Препарат СД оптимальной чистоты получали, используя две стадии очистки: аффинную хроматографию и гель-фильтрацию. Тримеризацию СД подтверж-

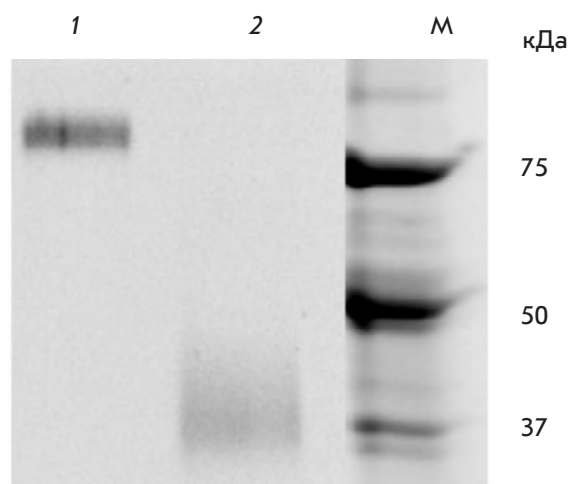


Рис. 1. Электрофоретический анализ СД в 12% полиакриламидном геле. 1 – неденатурирующие невосстанавливающие условия; 2 – денатурирующие восстанавливающие условия

дали методом электрофореза в восстанавливающих денатурирующих (для визуализации мономерной структуры, молекулярная масса 37 кДа) и невосстанавливающих неденатурирующих условиях (для визуализации тримеризованной конструкции, молекулярная масса около 110 кДа) (рис. 1).

### Получение наноантител, специфичных к СД НА

Панель наноантител к СД НА получали путем иммунизации альпака *V. pacos* по схеме, представленной на рис. 2А. На 7-й день после последней инъекции у животного отбирали 50 мл крови, отделяли мононуклеарную фракцию, из которой выделяли суммарную РНК для приготовления иммунной библиотеки, а также отбирали сыворотку для оценки индукции гуморального иммунного ответа. Уровень сывороточных антител альпака был определен как для СД НА, так и для рекомбинантных НА (рис. 2Б). Титр антител к СД НА составил 1 : 12500. Выявлен высокий титр антител к НА Н1 (A/California/04/2009) и Н3 (A/Switzerland/9715293/2013): 1 : 204800 и 1 : 409600 соответственно. Эти результаты свидетельствуют о формировании выраженного гуморального ответа после пяти циклов иммунизации альпака гриппозной вакциной как к полноразмерным НА, так и непосредственно к СД.

Конструирование библиотеки наноантител и последующую селекцию методом фагового дисплея проводили как описано ранее [34]. Размер библиотеки составил  $3 \times 10^6$  индивидуальных клонов. Все 30 колоний, случайным образом выбранных и проанализированных в ПЦР на наличие гена фрагмен-



Параметры кинетики взаимодействия VНН и СД, определенные методом SPR

Клон	$k_{on}$ (1/Ms)	$k_{off}$ (1/s)	$R_{max}$ (RU)	$K_a$ (1/M)	$K_d$ (M)	Chi <sup>2</sup>
2F2	$3.95 \times 10^5$	$6.17 \times 10^{-3}$	51.7	$6.38 \times 10^7$	$1.57 \times 10^{-8}$	1.53
H1.2	$9.87 \times 10^5$	$3.6 \times 10^{-4}$	139	$2.74 \times 10^9$	$3.65 \times 10^{-10}$	1.59
G2.3	$3.68 \times 10^5$	$2.04 \times 10^{-4}$	154	$1.8 \times 10^9$	$5.54 \times 10^{-10}$	1.39

граммном обеспечении BIAEvaluation. Полученные результаты приведены в *таблице*.

**Нейтрализация в экспериментах *in vivo***

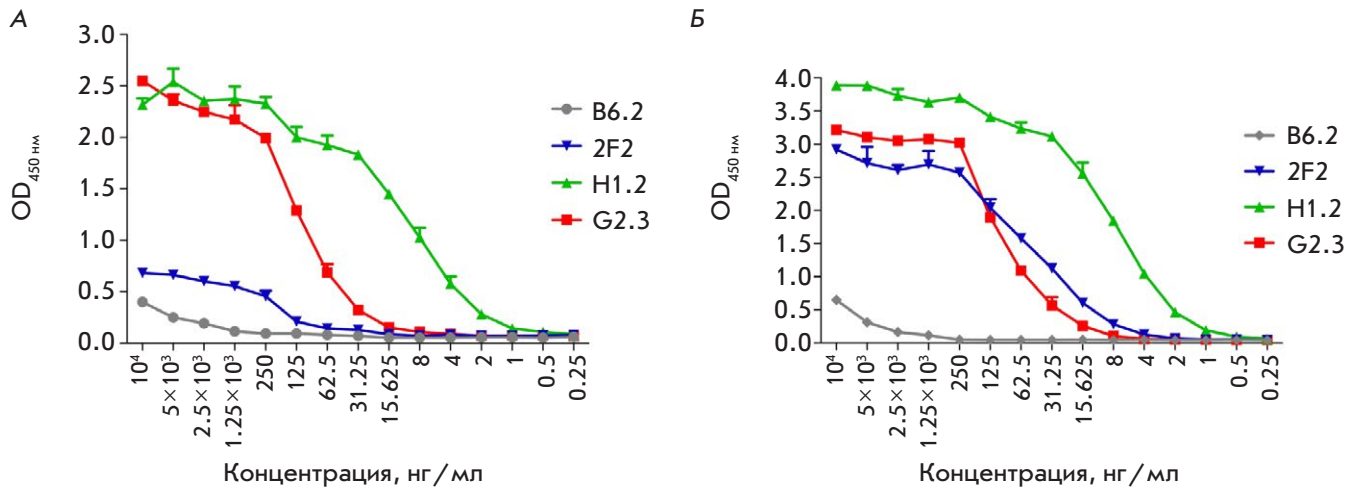
Нейтрализующие свойства наноантител исследовали на адаптированном к мышам вирусе гриппа H1N1 (A/Duck/mallard/Moscow/4970/2018). С этой целью мышей интраназально заражали высокими летальными дозами (15 LD<sub>50</sub>) указанного вирулентного штамма вируса гриппа H1N1, предварительно инкубированного с VНН H1.2 или G2.3. Выживаемость животных в опытных группах составила 100% при 100% гибели мышей контрольной группы (*рис. 5А*), что говорит об эффективной нейтрализации вируса H1N1 обоими наноантителами. Нейтрализующие свойства антител *in vivo* дополнительно подтверждаются незначительным снижением массы тела мышей и быстрым ее восстановлением в опытных группах по сравнению с контрольной (*рис. 5Б*).

Исследование *in vivo* нейтрализации вируса гриппа штамма H5N2 (A/Mallard duck/Pennsylvania/10218/84) проводили аналогично нейтрализации с вирусом H1N1. Полученные данные свидетельствуют о 100% нейтрализующей активности наноантител в отношении вируса H5N2 (*рис. 6*).

**ОБСУЖДЕНИЕ**

Преимущества наноантител перед каноническими мАт делают их привлекательной платформой для разработки терапевтических средств, в том числе противовирусных. Благодаря уникальной структуре варибельного домена, VНН могут взаимодействовать с труднодоступными эпитопами, характерными для поверхности вирусов [35, 36]. Меньший размер футпринта (отпечатка) VНН по сравнению с каноническими мАт, которые связываются с более крупными и плоскими эпитопами, может задать более высокий генетический барьер для возникновения эскейп-мутаций. Кроме того, высокая стабильность и растворимость наноантител крайне важны при создании эффективной лекарственной формы для доставки непосредственно в очаг инфекции – легкие.

Большинство мАт, способных нейтрализовать вирусы гриппа разных подтипов, узнают консервативные конформационные эпитопы в СД НА, однако при природной инфекции или иммунизации полноразмерным НА они труднодоступны, вследствие экспонирования преимущественно варибельных эпитопов глобулярного домена НА. Таким образом, необходимо получить СД в оптимальной стабилизированной конформации с сохранением эпитопов



**Рис. 4.** Результаты титрования отобранных клонов VНН в ИФА на СД НА (А) и на полноразмерном НА вируса гриппа H1N1 (A/California/04/2009) (Б)

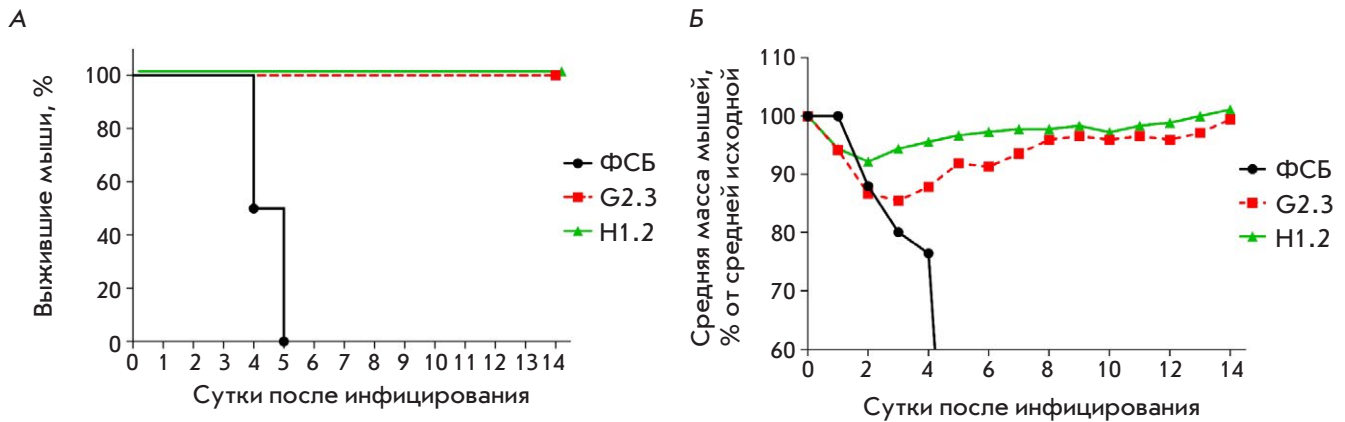


Рис. 5. Динамика выживаемости (А) и массы тела (Б) мышей после интраназального заражения Н1Н1 (А/Duck/mallard/Moscow/4970/2018) в дозе 15 LD<sub>50</sub>, смешанного с VHH. Различия между выживаемостью в опытных и контрольной группах статистически значимы ( $p < 0.0005$ )

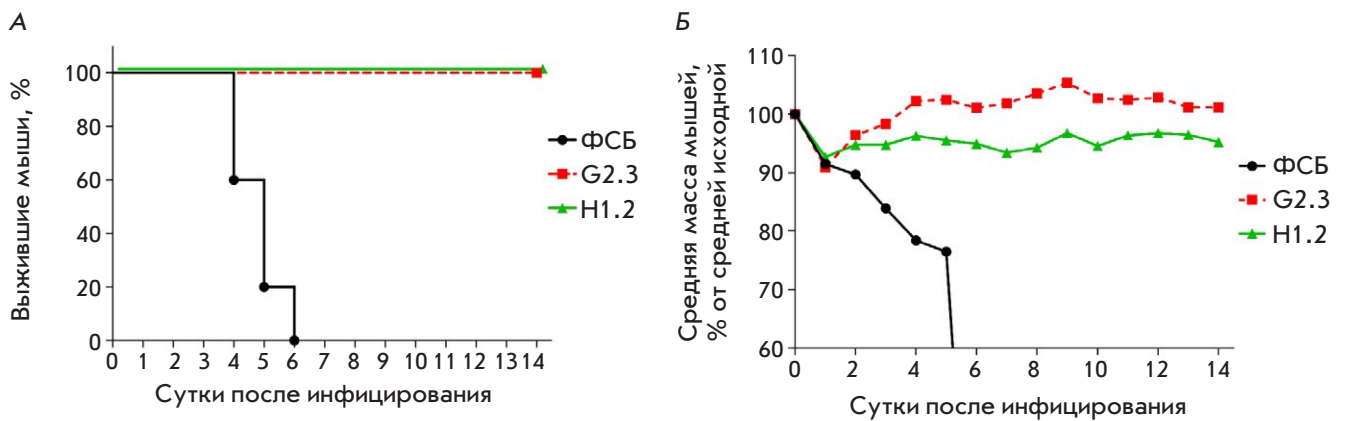


Рис. 6. Динамика выживаемости (А) и массы тела (Б) мышей после интраназального заражения Н5Н2 (А/Mallard duck/Pennsylvania/10218/84) в дозе 15 LD<sub>50</sub>, смешанного с VHH. Различия между выживаемостью в опытных и контрольной группах статистически значимы ( $p < 0.0002$ )

нейтрализующих мАт. В работе Impagliazzo A. и соавт. [30] сделано несколько вариантов стабилизированного тримера СД НА, из которых #4900 способен индуцировать выработку антител и обеспечивать защиту мышей против различных подтипов вируса гриппа А. На основании последовательности СД #4900 нами получен препарат, тримеризованная структура которого подтверждена с помощью электрофореза, использованный для селекции высокоаффинных антител, способных защищать мышей от инфекции, вызываемой различными подтипами вируса гриппа А.

Нами получены наноантитела, специфичные к СД НА, потенциально узнающие консервативные конформационные эпитопы и обладающие нейтрализующей активностью в отношении разных подтипов вируса гриппа А. В ходе селекции отобраны четыре индивидуальных клона (В6.2, 2F2, Н1.2 и G2.3),

охарактеризованные по уровню специфической активности в отношении СД и полноразмерного НА подтипов Н1 и Н3 в непрямом ИФА, аффинности в SPR-анализе и нейтрализации *in vivo*.

Результаты ИФА показали, что с наибольшей интенсивностью с СД и полноразмерным НА Н1 реагируют клоны Н1.2 и G2.3. Сравнимый сигнал наблюдался при взаимодействии клона 2F2 и НА Н1, однако на СД он был ниже, чем у Н1.2 и G2.3. Клон В6.2 даже в высоких концентрациях слабо реагировал с указанными антигенами (рис. 4). На этом этапе клон В6.2, показавший самый низкий титр в ИФА и, предположительно, обладающий наименьшей аффинностью, исключили из дальнейшей работы. По данным ИФА, отобранные нами клоны не связываются с НА Н3, тем не менее, многие существующие мАт широкого спектра нейтрализуют НА только внутри одной филогенетической группы.



Помимо эволюционного родства, эти группы объединяют общие консервативные эпитопы кросс-нейтрализующих антител в гидрофобном кармане СД [4]. Связывающие этот антигенный сайт мАт преимущественно нейтрализуют НА одной группы и либо не нейтрализуют подтипы другой, либо делают это с меньшей эффективностью.

Значения  $K_d$  коррелируют со значениями, полученными в непрямом ИФА: самые низкие константы диссоциации (наномолярный диапазон) характерны для антител H1.2 и G2.3. Несмотря на сопоставимую с этими клоном EC<sub>50</sub> в ИФА на H1N1, клон 2F2 показал существенно более низкую специфическую активность и аффинность на СД. На основании проведенных *in vitro* экспериментов для характеристики антител *in vivo* были отобраны клоны H1.2 и G2.3, обладающие наибольшей аффинностью ( $K_d$   $3.65 \times 10^{-10}$  и  $5.54 \times 10^{-10}$  М соответственно).

Проверка нейтрализующих свойств наноантител H1.2 и G2.3 против летальной дозы адаптированного к мышам вируса гриппа H1N1 (A/Duck/mallard/Moscow/4970/2018) показала 100% защиту мышей.

Основываясь на филогенетической близости вирусов с НА подтипов H1 и H5 и консервативности аминокислотной последовательности СД, предположили, что отобранные антитела могут связываться и нейтрализовать *in vivo* штаммы вируса гриппа с НА подтипа H5 [37]. Для эксперимента на животных выбран адаптированный вирус гриппа H5N2 (A/Mallard duck/Pennsylvania/10218/84). Предварительно последовательности СД НА вирусов гриппа, использованных в экспериментах на животных, анализировали в программном обеспечении Geneious Prime. Степень гомологии этих последовательностей составила 83%. Показано, что оба наноантитела, H1.2 и G2.3, обладают 100% нейтрализующей активностью и в отношении вируса гриппа с НА подтипа H5. Такие результаты могут быть обусловлены высокой степенью гомологии между СД НА выбранных штаммов и, как следствие, сохранением сайтов связывания VNN G2.3 и H1.2.

Полученные нами новые однодоменные антитела с крайне высокой аффинностью связываются

и эффективно нейтрализуют вирусы с НА подтипов H1 и H5, однако возможно дальнейшее увеличение связывающей и нейтрализующей способности VNN путем создания бивалентных или биспецифических конструкций с Fc-фрагментом. Таким образом, аффинность повышается за счет увеличения авидности и добавляются эффекторные функции, такие, как антителозависимая клеточная цитотоксичность, антителозависимый фагоцитоз и опосредованная антителом комплементзависимая цитотоксичность, критически важные для терминации гриппозной инфекции.

Антитела, способные нейтрализовать НА, относящиеся к первой филогенетической группе, имеют высокую значимость, так как в эту группу входят также вирусы с пандемическим потенциалом. Полученные нами VNN показали нейтрализующую активность в отношении вирусов, несущих НА подтипов H1 и H5. Наличие или отсутствие нейтрализующей активности в отношении других штаммов вируса гриппа станет предметом дальнейшего изучения.

## ВЫВОДЫ

Нами получен стабилизированный тример СД НА H1 (A/Brisbane/59/2007), содержащий конформационные эпитопы мАт, обладающих широким спектром нейтрализующей активности.

Идентифицированные нами новые наноантитела H1.2 и G2.3 специфически связываются с СД с константами диссоциации, превосходящими многие известные мономерные VNN, а также эффективно нейтрализуют вирусы гриппа H1N1 и H5N2, относящиеся к первой филогенетической группе НА. Получены конструкции указанных антител с Fc-фрагментом, которые будут использованы для изучения протективности в отношении различных штаммов вирусов гриппа типа А *in vivo*. ●

*Исследование выполнено в рамках  
Государственного задания Министерства  
здравоохранения Российской Федерации  
№ 121031800132-4.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gamblin S.J., Skehel J.J. // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. № 37. P. 28403–28409.
- Krammer F., Palese P. // Nat. Rev. Drug Discov. 2015. V. 14. № 3. P. 167–182.
- Ekiert D.C., Friesen R.H.E., Bhabha G., Kwaks T., Jongeneelen M., Yu W., Ophorst C., Cox F., Korse H.J., Brandenburg B., et al. // Science. 2011. V. 333. № 6044. P. 843–850.
- Throsby M., van den Brink E., Jongeneelen M., Poon L.L.M., Alard P., Cornelissen L., Bakker A., Cox F., van Deventer E., Guan Y., Cinatl J., et al. // PLoS One. 2008. V. 3. № 12. P. e3942.
- Sui J., Hwang W.C., Perez S., Wei G., Aird D., Chen L.M., Santelli E., Stec B., Cadwell G., Ali M., et al. // Nat. Struct. Mol. Biol. 2009. V. 16. № 3. P. 265–273.
- Wyrzucki A., Dreyfus C., Kohler I., Steck M., Wilson I.A., Hangartner L. // J. Virol. 2014. V. 88. № 12. P. 7083–7092.
- Corti D., Suguitan A.L., Pinna D., Silacci C., Fernandez-Rodriguez B.M., Vanzetta F., Santos C., Luke C.J., Torres-Velez F.J., Temperton N.J., et al. // J. Clin. Invest. 2010. V. 120. № 5. P. 1663–1673.

8. de Marco D., Clementi N., Mancini N., Solforosi L., Moreno G.J., Sun X., Tumpey T.M., Gubareva L.V., Mishin V., Clementi M., et al. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 4. P. 1–9.
9. Kashyap A.K., Steel J., Rubrum A., Estelles A., Briante R., Ilyushina N.A., Xu L., Swale R.E., Faynboym A.M., Foreman P.K., et al. // *PLoS Pathog.* 2010. V. 6. № 7. P. 1–7.
10. Friesen R.H.E., Lee P.S., Stoop E.J.M., Hoffman R.M.B., Ekiert D.C., Bhabha G., Yu W., Juraszek J., Koudstaal W., Jongeneelen M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2014. V. 111. № 1. P. 445–450.
11. Corti D., Voss J., Gamblin S.J., Codoni G., Macagno A., Jarrossay D., Vachieri S.G., Pinna D., Minola A., Vanzetta F., et al. // *Science*. 2011. V. 333. № 6044. P. 850–856.
12. Nakamura G., Chai N., Park S., Chiang N., Lin Z., Chiu H., Fong R., Yan D., Kim J., Zhang J., et al. // *Cell Host Microbe*. 2013. V. 14. № 1. P. 93–103.
13. Wu Y., Cho M., Shore D., Song M., Choi J., Jiang T., Deng Y.Q., Bourgeois M., Almlı L., Yang H., et al. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 7708.
14. Tharakaraman K., Subramanian V., Viswanathan K., Sloan S., Yen H.L., Barnard D.L., Leung Y.H., Szretter K.J., Koch T.J., Delaney J.C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2015. V. 112. № 35. P. 10890–10895.
15. Wyrzucki A., Bianchi M., Kohler I., Steck M., Hangartner L. // *J. Virol.* 2015. V. 89. № 6. P. 3136–3144.
16. Hu W., Chen A., Miao Y., Xia S., Ling Z., Xu K., Wang T., Xu Y., Cui J., Wu H., et al. // *Virology*. 2013. V. 435. № 2. P. 320–328.
17. Li G.M., Chiu C., Wrammert J., McCausland M., Andrews S.F., Zheng N.Y., Lee J.H., Huang M., Qu X., Edupuganti S., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2012. V. 109. № 23. P. 9047–9052.
18. Henry Dunand C.J., Leon P.E., Kaur K., Tan G.S., Zheng N.Y., Andrews S., Huang M., Qu X., Huang Y., Salgado-Ferrer M., et al. // *J. Clin. Invest.* 2015. V. 125. № 3. P. 1255–1268.
19. Clementi N., de Marco D., Mancini N., Solforosi L., Moreno G.J., Gubareva L.V., et al. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 12. P. e28001.
20. Kallewaard N.L., Corti D., Collins P.J., Neu U., McAuliffe J.M., Benjamin E., Wachter-Rosati L., Palmer-Hill F.J., Yuan A.Q., Walker P.A., et al. // *Cell*. 2016. V. 166. № 3. P. 596–608.
21. Joyce M.G., Wheatley A.K., Thomas P.V., Chuang G.Y., Soto C., Bailer R.T., Druz A., Georgiev I.S., Gillespie R.A., Kanekiyo M., et al. // *Cell*. 2016. V. 166. № 3. P. 609–623.
22. Dreyfus C., Laursen N.S., Kwaks T., Zuijggeest D., Khayat R., Ekiert D.C., Lee J.H., Metlagel Z., Bujny M.V., Jongeneelen M., et al. // *Science*. 2012. V. 337. № 6100. P. 1343–1348.
23. Laursen N.S., Friesen R.H.E., Zhu X., Jongeneelen M., Blokland S., Vermond J., van Eijgen A., Tang C., van Diepen H., Obmolova G., et al. // *Science*. 2018. V. 362. № 6414. P. 598–602.
24. Gaiotto T., Hufton S.E. // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 10. P. 1–27.
25. Hamers-Casterman C., Atarhouch T., Muyldermans S., Robinson G., Hamers C., Songa E.B., Bendahman N., Hamers R. // *Nature*. 1993. V. 363. № 6428. P. 446–448.
26. Harmsen M.M., van Solt C.B., van Zijderveld-Van Bommel A.M., Niewold T.A., van Zijderveld F.G. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2006. V. 72. № 3. P. 544–551.
27. van Heeke G., Allosery K., De Brabandere V., De Smedt T., Detalle L., de Fougerolles A. // *Pharmacol. Ther.* 2017. V. 169. P. 47–56.
28. Arbabi-Ghahroudi M. // *Front. Immunol.* 2017. V. 8. P. 1589.
29. Jovčevska I., Muyldermans S. // *BioDrugs*. 2020. V. 34. № 1. P. 11–26.
30. Impagliazzo A., Milder F., Kuipers H., Wagner M.V., Zhu X., Hoffman R.M., van Meersbergen R., Huizingh J., Wannigen P., Verspuij J., et al. // *Science*. 2015. V. 349. № 6254. P. 1301–1306.
31. Arbabi Ghahroudi M., Desmyter A., Wyns L., Hamers R., Muyldermans S. // *FEBS Lett.* 1997. V. 414. № 3. P. 521–526.
32. Ledsgaard L., Kilstrup M., Karatt-Vellatt A., McCafferty J., Laustsen A.H. // *Toxins (Basel)*. 2018. V. 10. № 6. P. 236.
33. Fischer S., Handrick R., Otte K. // *Biotechnol. Adv.* 2015. V. 33. № 8. P. 1878–1896.
34. Godakova S.A., Noskov A.N., Vinogradova I.D., Ugriumova G.A., Solovyev A.I., Esmagambetov I.B., Tukhvatulin A.I., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Shcheblyakov D.V., et al. // *Toxins (Basel)*. 2019. V. 11. № 8. P. 464.
35. De Genst E., Silence K., Decanniere K., Conrath K., Loris R., Kinne J., Muyldermans S., Wyns L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2006. V. 103. № 12. P. 4586–4591.
36. Stijlemans B., Conrath K., Cortez-Retamozo V., van Xong H., Wyns L., Senter P., Revets H., De Baetselier P., Muyldermans S., Magez S. // *J. Biol. Chem.* 2004. V. 279. № 2. P. 1256–1261.
37. Nobusawa E., Aoyama T., Kato H., Suzuki Y., Tateno Y., Nakajima K. // *Virology*. 1991. V. 182. № 2. P. 475–485.

УДК 577.2

# Полиморфизм rs1800470 гена *TGFB1* связан с фиброзом миокарда у реципиентов сердца

О. Е. Гичкун<sup>1,2\*</sup>, О. П. Шевченко<sup>1,2</sup>, Р. М. Курабекова<sup>1</sup>, Н. П. Можейко<sup>1</sup>, А. О. Шевченко<sup>1,2</sup><sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр трансплантологии и искусственных органов им. академика В.И. Шумакова Минздрава России, Москва, 123182 Россия<sup>2</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119435 Россия

\*E-mail: gichkunoe@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.06.2021

Принята к печати 27.09.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11469

**РЕФЕРАТ** В формировании фиброза миокарда участвует трансформирующий фактор роста  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ), уровень которого может зависеть от полиморфизма гена *TGFB1*. Фиброз миокарда трансплантированного сердца может приводить к его структурному и функциональному ремоделированию и последующей дисфункции. Проанализирована частота встречаемости аллелей и генотипов полиморфных участков rs1800469, rs1800470, rs1800471 гена *TGFB1* у реципиентов сердца и их связь с фиброзом миокарда трансплантата. Среди реципиентов сердца реже, чем среди здоровых лиц, встречались носители генотипа CC ( $p = 0.023$ , ОШ = 0.12, 95% ДИ: 0.017–1.0) и чаще аллеля G ( $p = 0.023$ , ОШ = 7.76, 95% ДИ: 1.0–60.20) полиморфизма rs1800471 гена *TGFB1*. У пациентов с ишемической болезнью сердца (ИБС) реже встречался генотип GG ( $p = 0.035$ , ОШ = 2.68, 95% ДИ: 1.061–6.793) и чаще аллель A ( $p = 0.035$ , ОШ = 0.37, 95% ДИ: 0.148–0.942) полиморфизма rs1800469, чем у пациентов с дилатационной кардиомиопатией (ДКМП). У реципиентов сердца с генотипом AA полиморфизма rs1800470 гена *TGFB1* фиброз миокарда, верифицированный по результатам эндомиокардиальной биопсии, выявлялся чаще, нежели у носителей аллеля G (ОШ = 10.4, 95% ДИ: 1.152–94.538,  $p = 0.013$ ). Выявленные различия указывают на связь полиморфизма гена *TGFB1* с фиброзом миокарда трансплантата. Исследования на большей группе пациентов позволят охарактеризовать влияние генетических факторов на формирование фиброза миокарда трансплантированного сердца.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** ген трансформирующего фактора роста  $\beta 1$ , однонуклеотидные полиморфизмы, фиброз миокарда, трансплантат сердца.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** TGF $\beta 1$  – трансформирующий фактор роста  $\beta 1$ ; ДКМП – дилатационная кардиомиопатия; ИБС – ишемическая болезнь сердца; ОНП – однонуклеотидный полиморфизм; ОШ – отношение шансов; ПЦР – полимеразная цепная реакция.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время на фоне увеличения средней продолжительности жизни и снижения смертности от острых заболеваний в молодом и среднем возрасте отмечается увеличение количества больных с синдромом сердечной недостаточности. Трансплантация сердца является эффективным методом лечения терминальной сердечной недостаточности, способствующим улучшению прогноза и качества жизни обреченных больных. Наблюдаемое в последние годы увеличение продолжительности жизни реципиентов сердца достигнуто в основном за счет снижения смертности в раннем посттрансплантационном периоде. Один

из факторов, оказывающих негативное влияние на отдаленный прогноз после трансплантации сердца, – фиброз миокарда, развитие которого сопровождается нарушением структуры и функции сердечного трансплантата [1].

Фиброз миокарда сердечного трансплантата – это многофакторный процесс, к развитию и прогрессированию которого предрасполагает ряд клеточных и молекулярных факторов [2]. Исследования последних лет показали, что одним из патогенетических факторов фиброза является трансформирующий фактор роста  $\beta 1$  (TGF $\beta 1$ ) – профибротический медиатор, вовлеченный в продукцию внеклеточного матрикса [3].

Получены данные о генетической детерминированности уровня TGFβ1 в периферической крови. Показано, что некоторые виды генетического полиморфизма гена *TGFB1* ассоциированы с тяжестью коронарного атеросклероза и предрасположенностью к инфаркту миокарда, и эта связь различается в разных этнических группах [4, 5].

Белок TGFβ1 кодируется геном *TGFB1*, расположенным на хромосоме 19. На сегодняшний день в гене *TGFB1* идентифицированы восемь однонуклеотидных полиморфизмов и один делеционно-инсерционный полиморфизм, влияющие на экспрессию и активность TGFβ1 [6]. Среди полиморфизмов гена *TGFB1*, связанных с сердечно-сосудистыми заболеваниями, выделяют три: rs1800469, локализованный в промоторной области; rs1800470 (замена лейцина на пролин в кодоне 10) и rs1800471 (замена аргинина на пролин в кодоне 25) расположены в кодирующем регионе. Данные о влиянии полиморфизмов гена *TGFB1* на отдаленные результаты трансплантации сердца и предрасположенность к развитию посттрансплантационных осложнений у реципиентов сердца – острого и хронического (болезнь коронарных артерий пересаженного сердца) отторжения трансплантата – немногочисленны и неоднозначны [7–9].

Цель настоящего исследования состояла в выявлении связи полиморфизмов rs1800469, rs1800470, rs1800471 гена *TGFB1* с фиброзом миокарда трансплантата у реципиентов сердца.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследование включено 110 случайно отобранных реципиентов, которым в Национальном медицинском исследовательском центре трансплантологии и искусственных органов им. акад. В.И. Шумакова в период с 2017 по 2019 год была выполнена трансплантация донорского сердца; все этнически русские, среди них мужчин – 99 (84%), средний возраст реципиентов составил  $44 \pm 14$  (от 16 до 70) лет. У 57 пациентов причиной развития терминальной сердечной недостаточности, определившей показания к трансплантации, была дилатационная кардиомиопатия (ДКМП), у 53 – ишемическая болезнь сердца (ИБС). Срок наблюдения после трансплантации сердца до 4 ( $2.3 \pm 1.3$ ) лет.

Обследование и лечение пациентов проведены в соответствии с клиническими рекомендациями Российского трансплантологического общества. Эндомиокардиальную биопсию у реципиентов сердца выполняли по протоколу при плановом клинико-лабораторном обследовании или по показаниям; эндомиокардиальные биоптаты оценивали на основании результатов гистологического и иммуногистохимиче-

ского исследования. Для верификации фиброза сердечного трансплантата тонкие срезы ткани эндомиокарда окрашивали трихромом по Массону [10].

Геномную ДНК выделяли из периферической крови согласно протоколу с помощью коммерческого набора QIAamp DNA Blood Mini Kit на автоматическом анализаторе QIAcube™ (Qiagen, Германия). Полиморфные варианты rs1800469, rs1800470, rs1800471 гена *TGFB1* анализировали методом полимеразной цепной реакции в режиме реального времени с помощью зондов TaqMan (Applied Biosystems, США) на амплификаторе CFX96™ (Bio-Rad, США). Зонды с флуоресцентными метками по каналам VIC (аллель 1)/FAM (аллель 2) детектировали на каждом цикле амплификации. Полученные данные обрабатывали с помощью программного обеспечения BioRad CFX manager 3.0 software.

Статистический анализ проводили с помощью пакета прикладных программ для научно-технических расчетов IBM SPSS STATISTICS 20 (IBM SPSS Inc., США). Для подтверждения независимого распределения аллелей в изучаемых полиморфизмах проверяли их соответствие закону Харди–Вайнберга [11]. Частоты генотипов или отдельных аллелей в различных группах сравнивали с использованием критерия  $\chi^2$  Пирсона. Возможное влияние генотипа на признак оценивали, определяя отношение шансов и 95%-ные доверительные интервалы. Критическое значение уровня значимости принимали равным 0.05.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

Проведено геномное типирование полиморфных участков rs1800469, rs1800470, rs1800471 гена *TGFB1* у реципиентов сердца. Не выявлено отклонений в распределении аллелей и генотипов исследуемых полиморфизмов от равновесия Харди–Вайнберга в группе сравнения, в которую вошли здоровые лица (43), не отличающиеся значимо по полу и возрасту от группы реципиентов сердца. У реципиентов сердца равновесие Харди–Вайнберга для всех трех полиморфизмов не соблюдалось (табл. 1).

Таблица 1. Анализ данных на соответствие закону Харди–Вайнберга

Группы \ ОНП	rs1800469	rs1800470	rs1800471
Здоровые лица	$\chi^2 = 1.0$ $p = 0.31$	$\chi^2 = 0.02$ $p = 0.81$	$\chi^2 = 0.006$ $p = 0.93$
Реципиенты сердца	$\chi^2 = 4.32$ $p = 0.03^*$	$\chi^2 = 9.3$ $p = 0.002^*$	$\chi^2 = 5.73$ $p = 0.01^*$

\* $p < 0.05$  – не соответствует закону Харди–Вайнберга. ОНП – однонуклеотидный полиморфизм.



**Таблица 2.** Распределение генотипов и аллелей полиморфных участков гена *TGFβ1* у реципиентов сердца и здоровых лиц

Генотип/ аллель	Реципиенты сердца, n (%)	Здоровые лица, n (%)	p
rs1800469			
AA	22 (20)	6 (14)	0.38
AG	42 (38)	16 (37)	0.91
GG	46 (42)	21 (49)	0.43
A	64 (58)	22 (51)	0.43
G	88 (80)	37 (86)	0.38
rs1800470			
AA	91 (83)	40 (93)	0.12
AG	14 (13)	3 (7)	0.30
GG	4 (4)	-	0.20
A	105 (96)	43 (100)	0.20
G	18 (17)	3 (7)	0.12
rs1800471			
GG	3 (3)	-	0.27
GC	14 (13)	1 (2)	0.051
CC	92 (84)	42 (98)	0.023*
G	17 (16)	1 (2)	0.023*
C	106 (97)	43 (100)	0.27

\* $p < 0.05$ .

Отклонение от закона Харди–Вайнберга в группе реципиентов сердца может быть связано с сердечно-сосудистой патологией, хотя нельзя исключить и влияния небольшого размера выборки, что необходимо проверить на более многочисленной выборке.

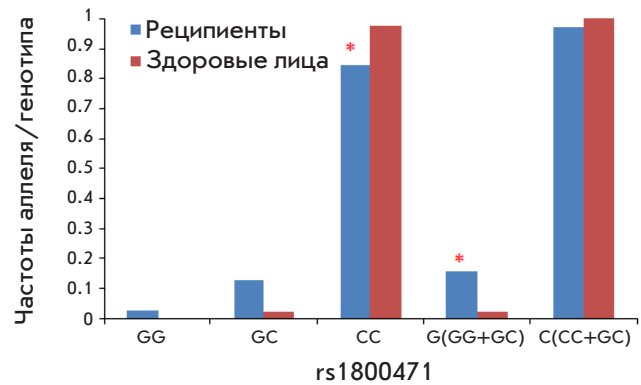
Распределение аллелей и генотипов гена *TGFβ1* у реципиентов сердца и в группе сравнения представлены в табл. 2.

Сравнительный анализ распределения генотипов и аллелей полиморфизмов rs1800469, rs1800470 гена *TGFβ1* не выявил различий между здоровыми лицами и реципиентами сердца. Однако обнаружены различия в распределении аллелей и генотипов полиморфизма rs1800471 гена *TGFβ1* (рис. 1).

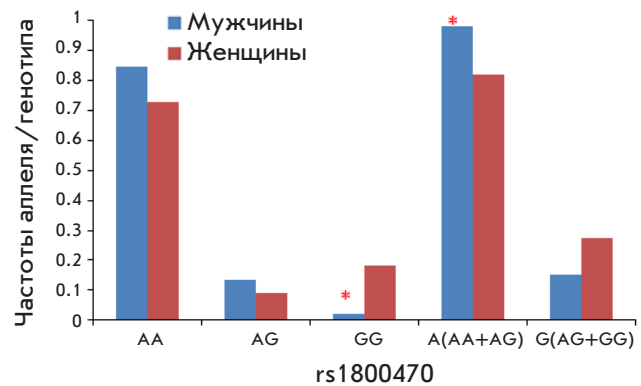
Среди реципиентов сердца носители генотипа CC rs1800471 гена *TGFβ1* встречались реже, чем среди здоровых лиц ( $p = 0.023$ , ОШ = 0.12, 95% ДИ: 0.017–1.0), а аллель G – чаще (в составе генотипов GG и GC) ( $p = 0.023$ , ОШ = 7.76, 95% ДИ: 1.0–60.2).

Анализ связи частот распределения исследованных полиморфизмов с демографическими и клиническими характеристиками реципиентов сердца позволил выявить статистически значимые ассоциации с полом, диагнозом и фиброзом миокарда трансплантированного сердца.

Распределение аллелей и генотипов полиморфизма rs1800470 гена *TGFβ1* у мужчин и женщин в группе реципиентов сердца различалось статистически значимо (рис. 2).



**Рис. 1.** Частотное распределение генотипов и аллелей полиморфизма rs1800471 гена *TGFβ1* у реципиентов сердца и здоровых лиц. \* $p < 0.05$  в сравнении со здоровыми лицами



**Рис. 2.** Частотное распределение генотипов и аллелей полиморфизма rs1800470 гена *TGFβ1* у мужчин и женщин, \* $p < 0.05$  в сравнении с женщинами

У мужчин – реципиентов сердца, носительство генотипа GG встречалось реже, чем у женщин ( $p \leq 0.05$ ). Сравнение частот отдельных аллелей показало, что частота носительства аллеля A rs1800470 гена *TGFβ1* у мужчин выше ( $p = 0.007$ , ОШ = 10.6, 95% ДИ: 1.34–85.01). Не выявлено различий в распределении генотипов и аллелей полиморфизмов rs1800469, rs1800471 гена *TGFβ1* у мужчин и женщин.

При сравнительном анализе распределения аллелей и генотипов полиморфизмов гена *TGFβ1* в зависимости от заболевания, приведшего к развитию сердечной недостаточности и последующей трансплантации донорского сердца, установлено, что у пациентов с ДКМП генотип GG rs1800469 встречался чаще, чем у пациентов с ИБС ( $p = 0.03$ , ОШ = 2.68, 95% ДИ: 1.061–6.793) (рис. 3).

Частота встречаемости аллеля A у пациентов с ИБС выше, чем с ДКМП ( $p = 0.01$ , ОШ = 0.37, 95% ДИ: 0.148–0.942).

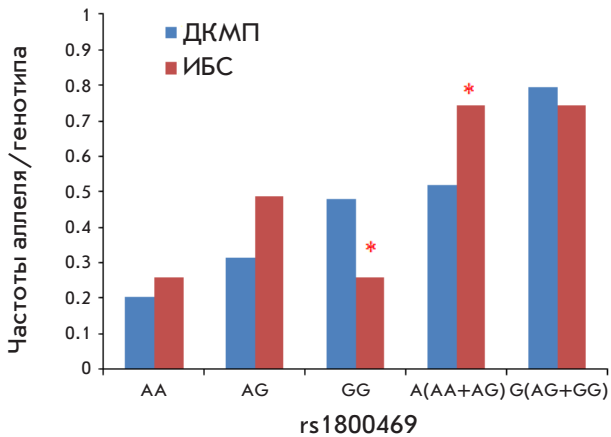


Рис. 3. Частотное распределение генотипов и аллелей полиморфизма rs1800469 гена *TGFBI* у пациентов с ДКМП и ИБС, \* $p < 0.05$  в сравнении с ДКМП

При исследовании эндомикардиального биоптата у 49 из 110 реципиентов сердца верифицирован фиброз интерстиция миокарда трансплантата. Окраска позволяла четко различать соединительную ткань, которая (в зависимости от ее зрелости) окрашивалась в различные оттенки синего и отличалась от других тканей миокарда. При анализе учитывали все виды фиброза: диффузный, очаговый и диффузно-очаговый.

На рис. 4 представлены примеры гистологических препаратов биоптата трансплантированного сердца, в котором обнаружены фибротические изменения.

Сравнительный анализ распределения частот и генотипов позволил выявить различия во встречаемости генотипа AA полиморфизма rs1800470

гена *TGFBI* у реципиентов с фиброзом миокарда и без такового (рис. 5).

У реципиентов сердца с генотипом AA полиморфизма rs1800470 гена *TGFBI* фиброз наблюдался чаще, нежели у носителей аллеля G (ОШ = 10.4, 95% ДИ: 1.152–94.538,  $p = 0.013$ ).

### ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящем исследовании проанализировано распределение аллелей и генотипов трех функционально значимых полиморфных участков гена *TGFBI* у пациентов с трансплантированным сердцем. У реципиентов сердца выявлены отличия по частоте встречаемости генотипов и аллелей полиморфизма rs1800471 гена *TGFBI* в сравнении со здоровыми лицами. В ряде работ показано, что аллель G rs1800471 связан с более высоким уровнем экспрессии гена и повышением уровня цитокина  $TGF\beta 1$  в крови. Дисрегуляция сигнального пути  $TGF\beta 1$ , возникающая в результате мутации, может быть связана с повышенным риском развития сердечно-сосудистых заболеваний [12, 13].

При анализе предрасположенности к первичному заболеванию, приведшему к развитию терминальной сердечной недостаточности и трансплантации сердца, в настоящем исследовании наблюдали значимую ассоциацию ишемической болезни сердца с однонуклеотидным полиморфизмом rs1800469. Схожие данные получены Барсовой и соавт. [4], которые обнаружили положительную ассоциацию аллеля *TGFBI*\*-509T (rs1800469) с предрасположенностью к раннему инфаркту миокарда (пациенты до 50 лет). Механизмы, лежащие в основе ассоциации полиморфизма с развитием терминальной

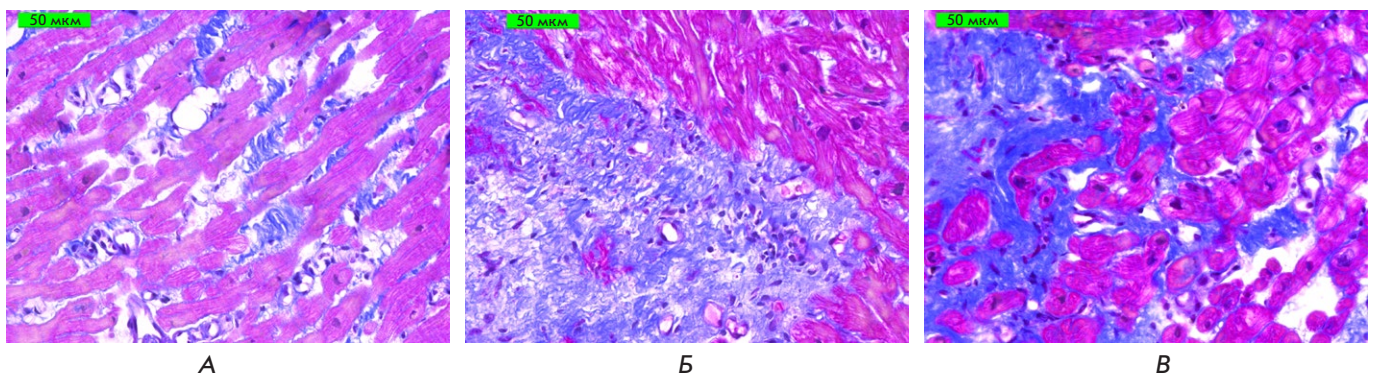


Рис. 4. Гистологические препараты эндомикардиальных биоптатов. Окраска трихромом по Массону  $\times 400$  (синим цветом окрашена соединительная ткань, розовым – кардиомиоциты). А – диффузное разрастание рыхлой волокнистой соединительной ткани с единичными клетками фибропластического ряда, очаговая белковая зернистая дистрофия кардиомиоцитов. Б – очаговое разрастание неоформленной соединительной ткани с единичными клетками соединительно-тканного ряда, умеренная белковая дистрофия кардиомиоцитов. В – диффузно-очаговое разрастание рыхлой волокнистой соединительной ткани, в которой отмечается пролиферация клеток соединительно-тканного ряда. Очаговая белковая дистрофия кардиомиоцитов

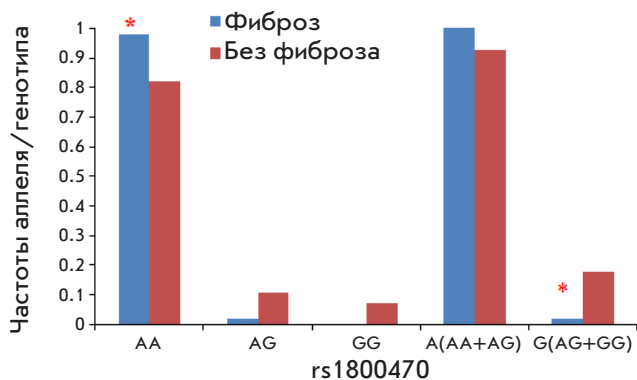


Рис. 5. Частотное распределение генотипов и аллелей полиморфизма rs1800470 гена *TGFβ1* у реципиентов с фиброзом миокарда трансплантата и без такового, \* $p < 0.05$  в сравнении с реципиентами без фиброза

стадии сердечной недостаточности, пока остаются неясными. Возможно, полиморфизм rs1800469, изменяя сродство транскрипционных факторов к промотору, подавляет экспрессию *TGFβ* и активирует таким образом провоспалительные цитокины – фактор некроза опухоли  $\alpha$  и интерлейкин-1, что может способствовать прогрессированию ИБС [4]. В ряде исследований получены противоречивые данные: так в группе немецких пациентов не выявлена ассоциация полиморфизма 509C/T с ИБС [14]. Liu и соавт. провели метаанализ восьми исследований и показали статистически значимую связь rs1800469 (TT) с повышенным риском развития ИБС [15].

Анализируя предрасположенность к фиброзу миокарда у реципиентов сердца, мы выявили значимые ассоциации данного признака с полиморфным участком rs1800470. Известно, что аллель А данного полиморфизма связан с высоким уровнем *TGFβ1* в пе-

риферической крови. *TGFβ1* – мощный стимулятор продукции внеклеточного матрикса, гиперпродукция которого связана с фибротическими нарушениями и развитием фиброза миокарда. В работе Leask A. показано, что *TGFβ*, при его добавлении в культуру фибробластов *in vitro*, индуцирует экспрессию генов, связанных с продукцией внутриклеточного матрикса, и таким образом способствует увеличению накопления матрикса и сопутствующему подавлению матриксной металлопротеиназы за счет повышения уровня ингибиторов экспрессии ее гена [16].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящем исследовании выявлены различия во встречаемости аллелей и генотипов гена *TGFβ1*: rs1800471 у реципиентов сердца и здоровых лиц, rs1800469 – у пациентов с ДКМП и ИБС, rs1800470 – у пациентов с фиброзом миокарда трансплантированного сердца и без такового. Полученные результаты позволяют предполагать участие гена *TGFβ1* и его полиморфизмов в формировании предрасположенности к фиброзу миокарда у реципиентов сердца. Дальнейшие исследования на большем количестве пациентов позволят получить более подробные характеристики влияния одонуклеотидных полиморфизмов на формирование фиброза в трансплантированном сердце. ●

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

*Исследование проведено при частичной поддержке гранта Президента Российской Федерации НШ-2598-2020.7 для государственной поддержки ведущих научных школ.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Готье С.В., Захаревич В.М., Халилулин Т.А., Шевченко А.О., Попцов В.Н., Ахмадзай Р.Л., Гольц А.М., Закирьянов А.Р., Колоскова Н.Н., Захаревич Н.Ю. и др. // Вестник трансплантологии и искусственных органов. 2019. Т. 21. № 2. С. 7–15.
2. Wynn T.A. // J. Pathol. 2008. V. 214. № 2. P. 199–210.
3. Akdis M., Aab A., Altunbulakli C., Azkur K., Costa R., Cramer R., Duan S., Eiwegger T., Eljaszewicz A., Ferstl R., et al. // J. Allergy Clin. Immunol. 2016. V. 138. № 4. P. 984–1010.
4. Barsova R.M., Titov B.V., Matveeva N.A., Favorov A.V., Sukhinina T.S., Shahnovich R.M., Ruda M.Ia., Favorova O.O. // Acta Naturae. 2012. V. 4. № 2. P. 74–79.
5. Brusentsov D.A., Nikulina S.Yu., Shesternya P.A., Chernova A.A. // Rus. J. Cardiology. 2018. V. 23. № 10. P. 43–47.
6. Martellosi Cebinelli G.C., Paiva Trugilo K., Badaró Garcia S., Brajão de Oliveira K. // Eur. Cytokine Netw. 2016. V. 27. № 4. P. 81–89.
7. van Setten J., Warmerdam E.G., Groot O.Q., De Jonge N., Keating B., Asselbergs F.W. // Transplant. Direct. 2019. V. 5. № 2. P. 1–6.
8. Densent C.G., Hutchinson I.V., Yonan N., Brooks N.H. // Transplant. Immunol. 2004. V. 13. № 3. P. 211–217.
9. Ge Y.Z., Wu R., Lu T.Z., Jia R.P., Li M.H., Gao X.F., Jiang X.M., Zhu X.B., Li L.P., Tan S.J., et al. // PLoS One. 2014. V. 9. № 4. P. e93938.
10. Готье С.В., Шевченко А.О., Попцов В.Н. Пациент с трансплантированным сердцем. Руководство для врачей по ведению пациентов, перенесших трансплантацию сердца. М.–Тверь: Изд-во «Триада», 2014. 144 с.
11. Namipashaki A., Razaghi-Moghadam Z., Ansari-Pour N. // Cell J. 2015. V. 17. № 2. P. 187.
12. Rao M., Guo D., Jaber B.L., Tighiouart H., Pereira B.J., Balakrishnan V.S. // Kidney Int. 2004. V. 66. P. 419–427. [PubMed: 15200451].
13. Nikolova P.N., Ivanova M.I., Mihailova S.M., Myhailova A.P., Baltadjieva D.N., Simeonov P.L., Paskalev E.K., Naumova E.J. // Transplant. Immunol. 2008. V. 18. № 4. P. 344–348.
14. Koch W., Hoppmann P., Mueller J., Schömig A., Kastrati A. // Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol. 2006. V. 26. № 5. P. 1114–1119.
15. Liu K., Liu X., Gu S., Sun Q., Wang Y., Meng J., Xu Z. // Oncotarget. 2017. V. 8. № 37. P. 62463–62469.
16. Leask A. // Circ. Res. 2010. V. 106. P. 1675–1680.

УДК 57.085.2

# Сорбент с синтетическим лигандом для удаления провоспалительных и проатерогенных компонентов из плазмы крови человека

О. А. Дмитриева<sup>1\*</sup>, Е. Д. Овчинникова<sup>1</sup>, Е. А. Уткина<sup>1</sup>, П. А. Левашов<sup>2</sup>, О. И. Афанасьева<sup>1</sup>, И. Ю. Адамова<sup>1</sup>, С. Н. Покровский<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный медицинский исследовательский центр кардиологии Минздрава РФ, Москва, 121552 Россия

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119991 Россия

\*E-mail: dmitrievaoksan@rambler.ru

Поступила в редакцию 22.03.2021

Принята к печати 20.07.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11292

**РЕФЕРАТ** Часто выявляемые у пациентов с сердечно-сосудистыми заболеваниями повышенные концентрации атерогенных apoB-100-содержащих липопротеидов и маркеров системного воспаления снижают с использованием медикаментозных либо экстракорпоральных методов. Сорбент для сочетанного удаления С-реактивного белка (СРБ) и атерогенных липопротеидов обеспечивает одновременное уменьшение уровней этих компонентов в кровотоке. Исследованы эффективность и селективность разработанного сорбента, рассчитаны константы десорбции СРБ ( $K_d = 4.2 \times 10^{-8}$  М) и липопротеидов низкой плотности ( $K_d = 7.7 \times 10^{-7}$  М), коэффициенты распределения СРБ ( $K_c = 101$ ) и липопротеида (а) ( $K_c = 38$ ). Показано, что сорбент способен связывать большие количества атерогенных липопротеидов – до 32 мг общего холестерина/мл геля сорбента. Разработанный сорбент может быть рекомендован для комплексного удаления СРБ и атерогенных липопротеидов из плазмы крови пациентов при терапии рефрактерных гиперлипидемий и сердечно-сосудистых заболеваний, сопровождающихся повышением уровня СРБ.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** С-реактивный белок, атерогенные липопротеиды, липопротеид (а), атеросклероз, терапевтический аферез.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** СРБ – С-реактивный белок; мСРБ – мономерная форма СРБ; нСРБ – пентамерная форма СРБ; Лп(а) – липопротеид (а); apoB-100 – аполипопротеин В-100; ЛНП – липопротеиды низкой плотности; ЛВП – липопротеиды высокой плотности; окЛНП – окисленные ЛНП; ОХС – общий холестерин; ТГ – триглицериды; ЧСА – сывороточный альбумин человека; IgG – иммуноглобулины класса G; ХС ЛНП холестерин липопротеидов низкой плотности; ХС ЛВП – холестерин липопротеидов высокой плотности; ССЗ – сердечно-сосудистые заболевания.

## ВВЕДЕНИЕ

Сердечно-сосудистые заболевания (ССЗ) по-прежнему остаются основной причиной смертности в развитых странах, несмотря на новые гиполипидемические препараты и высокотехнологичные инвазивные методы диагностики и лечения. Нарушения липидного обмена считаются основной причиной возникновения и развития атеросклероза, лежащего в основе ССЗ, в то время как С-реактивный белок (СРБ) служит маркером системного воспаления. Все больше данных свидетельствует в пользу того, что СРБ может быть не только маркером воспаления, но и одним из патогенетических компонентов разви-

тия ССЗ [1]. Наиболее патогенная, обладающая провоспалительными и протромбогенными свойствами мономерная форма СРБ (мСРБ) образуется при диссоциации нативной пентамерной формы (нСРБ) на поверхности активированных тромбоцитов и поврежденных клеток [2, 3]. мСРБ выявлена в зонах некроза при остром инфаркте миокарда и в атеросклеротических бляшках [4]. Высокий уровень СРБ после перенесенного инфаркта миокарда связан с риском последующего развития дисфункции миокарда и сердечной недостаточности [5, 6]. Концентрация СРБ в плазме крови ассоциирована с прогнозом течения заболевания при атеросклерозе, хронической



сердечной недостаточности, мерцательной аритмии, миокардите, недостаточности аортального клапана и после трансплантации сердца [7]. Исследование CANTOS, проведенное на пациентах высокого риска с повышенным уровнем нСРБ (медиана 4.1 мг/л), показало, что подавление воспаления без влияния на концентрацию холестерина липопротеидов низкой плотности (ХС ЛНП) приводит к значимому снижению риска сердечно-сосудистых осложнений и может представлять собой новую терапевтическую стратегию в случае пациентов с ССЗ [8].

В ряде исследований выявлена связь повышенной концентрации нСРБ и атерогенных apoB-100-содержащих липопротеидов. Увеличение уровней нСРБ и окисленных липопротеидов низкой плотности (окЛНП) отмечено у больных ишемической болезнью сердца (ИБС) при нарастании тяжести атеросклероза, оцениваемой по количеству пораженных коронарных артерий [9]. Повышенные уровни нСРБ и липопротеида (а) (Лп(а)) наблюдали в группе пациентов моложе 45 лет, перенесших острый инфаркт миокарда [10]. Grønholdt M. и соавт. установили, что повышенная концентрация маркеров острой фазы воспаления прочно ассоциирована с высоким уровнем триглицерид-богатых липопротеидных частиц, повышенным объемом атеромы и экзогенностью бляшек в сонных артериях, что также говорит о роли маркеров воспаления как возможных предикторов тяжести поражения и формирования нестабильной атеросклеротической бляшки [11].

В настоящее время возможности медикаментозной коррекции уровня СРБ ограничены препаратами, воздействующими на пути его синтеза в печени [12], при этом ведется интенсивный поиск способов влияния непосредственно на концентрацию этого белка. Один из таких способов – удаление СРБ из кровотока с помощью экстракорпоральных методов терапевтического афереза. Наиболее эффективными и селективными являются методы на основе сорбционных технологий. В качестве активных ингредиентов сорбционных колонок используют специфические антитела или синтетические миметики природных лигандов и сайтов связывания молекул СРБ.

Удаление СРБ привело к достоверному уменьшению зоны некроза в животной модели острого инфаркта миокарда [13]. Снижение уровня СРБ (до 50% за процедуру) наблюдали при использовании колонки PentraSorb® CRP (Pentracor, Германия) у пациентов с острым инфарктом миокарда [14]. В настоящее время продолжается накопление данных о клинической эффективности таких процедур.

Ранее нами был синтезирован сорбент с синтетическим лигандом-миметиком, способный одновременно связывать СРБ и атерогенные липопротеиды

[15]. Одновременное снижение уровней этих компонентов в кровотоке позволит уменьшить их провоспалительное и проатерогенное действие и таким образом воздействовать на оба важных звена патогенеза атеросклероза.

Цель данной работы состояла в изучении эффективности и селективности связывания провоспалительных и проатерогенных компонентов плазмы крови человека синтезированным сорбентом.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали растворы очищенных препаратов: липопротеидов низкой плотности, сывороточного альбумина человека (ЧСА), иммуноглобулинов класса G (IgG), СРБ, а также плазмы/сыворотки крови: плазмы здоровых доноров, стабилизированной антикоагулянтом цитрат-фосфат-декстроза, гепаринсодержащей плазмы, полученной после проведения процедур плазмообмена, сыворотки больных ИБС. Растворы ЛНП с концентрациями общего холестерина (ОХС) 500 и 800 мг/дл получены из плазмы крови здоровых доноров методом ультрацентрифугирования в градиенте плотности нейтральной соли NaBr [16]. Раствор ЧСА с концентрацией 29 мг/мл готовили с использованием лиофилизированного препарата (Calbiochem, США). Раствор СРБ с концентрацией 1 мг/мл содержал 1% ЧСА в качестве стабилизатора («Имтек», Россия). Использовали препарат иммуноглобулина G человека для внутривенного введения (Octapharma, Швейцария) с концентрацией 50 мг/мл.

При проведении сравнительного анализа использовали иммуносорбенты с иммобилизованными поликлональными антителами: к ЛНП – активный ингредиент колонки ЛНП-Липоак®, к IgG – активный ингредиент колонки Ig Адсоак® (оба сорбента НПФ «ПОКАРД», Россия) и к препарату нСРБ. Сорбент с синтетическим лигандом получен иммобилизацией ароматического альдегида на перешитую агарозную матрицу через молекулярный спейсер в соответствии с модифицированной методикой, описанной ранее [17]. При проведении синтеза не требовалось присутствие глутарового альдегида.

Свойства сорбентов изучали с использованием метода бечч-хроматографии (хроматографии в объеме) при комнатной температуре и соотношении объемов геля сорбента и исследуемого препарата (раствора белка, плазмы или сыворотки крови человека) 1 : 10, если не оговорено иначе. Для построения изотерм адсорбции хроматографию проводили в буферной смеси, содержащей 10 мМ NaH<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 140 мМ NaCl (pH 7.0), в течение 1 ч. На основании изотерм рассчитывали максимальную сорбционную емкость (S<sub>max</sub>) и константу десорбции (K<sub>d</sub>). Распределение компо-

нентов плазмы в процессе хроматографии, характеризующее отношением концентраций связанного с сорбентом и свободного вещества или величиной коэффициента распределения ( $K_c$ ), оценивали при постоянной нагрузке и разведении плазмы в 1–5 раз. Для определения максимальной ЛНП-связывающей способности проводили хроматографию с концентрированными растворами ЛНП (300 и 500 мг/дл), контролируя количество свободного холестерина (в течение 0.5–20 ч).

Для определения в плазме концентрации ОХС, ХС ЛВП, ЧСА, ТГ использовали наборы реагентов Analiticon Biotechnologies AG (Германия) и «Вектор Бест» (Россия). Концентрацию IgG и ЧСА в растворе определяли спектрофотометрически с использованием коэффициентов молярной экстинкции 1.4 и 0.6 соответственно. Концентрацию СРБ и IgG определяли с помощью иммуноферментного анализа («Вектор-Бест»). Концентрацию Лп(а) измеряли при помощи иммуноферментного анализа с использованием моноспецифических поликлональных антител барана против Лп(а) человека как описано ранее [18]. Концентрацию ХС ЛНП рассчитывали по формуле Фридвальда:  $\text{ХС ЛНП} = \text{ОХС} - \text{ХС ЛВП} - \text{ТГ} / 5$  (мг/дл) [19]. В образцах с повышенной концентрацией Лп(а) рассчитывали уровень коррегированного ХС ЛНП ( $\text{ХС ЛНП}_{\text{корр}}$ ), учитывающего холестерин, входящий в состав Лп(а), по модифицированной формуле Фридвальда:  $\text{ХС ЛНП}_{\text{корр}} = \text{ХС ЛНП} - \text{Лп(а)} \times 0.33$ , где Лп(а) – концентрация Лп(а), мг/дл [20].

Процессы адсорбции СРБ, IgG, ЧСА и ЛНП на сорбенте удовлетворительно описываются уравнением Ленгмюра:  $S = S_{\text{max}} \times [\text{Ср-р}] / (K_d + [\text{Ср-р}])$ , где  $S$  – количество связанного с сорбентом компонента,  $S_{\text{max}}$  – максимальная сорбционная емкость,  $[\text{Ср-р}]$  – концентрация свободного компонента в растворе,  $K_d$  – константа десорбции. При пересчете  $K_d$  в константы десорбции, выраженные в количестве частиц ( $K_d \text{ M}$ ), использовали соответствующие молекулярные массы. При пересчете концентрации ХС ЛНП в концентрацию ЛНП учитывали процентное содержание холестерина в данной липопротеидной частице.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Разработанный нами сорбент представляет собой полимерную агарозную матрицу, к которой посредством молекулярного спейсера ковалентно присоединен синтетический лиганд, содержащий ароматическую группу. Сорбент имеет значительную удельную поверхность и развитые поры, доступные для всех исследуемых в нашей работе компонентов плазмы крови человека. Размер гранул матрицы варьирует от 40 до 180 мкм, размер пор (предел

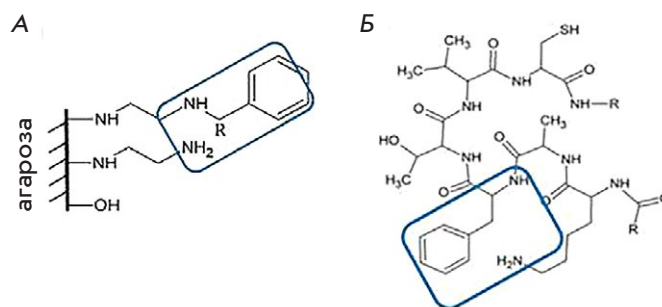


Рис. 1. Структурные компоненты разработанного сорбента (А) и участок молекулы СРБ (AFTV), ответственный за связывание с рецептором лейкоцитов (Б) [22]

исключения по молекулярной массе) составляет  $6.3 \times 10^5$  кДа [21].

Возможными функциональными группами на поверхности синтезированного сорбента являются гидроксильные группы моносахаридных остатков агарозы, первичные и вторичные аминогруппы спейсера и бензольные группы лиганда (рис. 1А). Адсорбция компонентов плазмы может осуществляться посредством ионообменных, ароматических и гидрофобных взаимодействий.

При изучении пептидов – ингибиторов взаимодействия СРБ с клетками линии U937, Zen и соавт. показали, что критическое значение для взаимодействия молекулы СРБ с СРБ-связывающим сайтом рецептора имеет аминокислотная последовательность TKPLK**AFTV**CLN [22]. Эта последовательность содержит участок из трех гидрофобных аминокислот, в том числе одну ароматическую (рис. 1Б). При разработке сорбента было сделано допущение, что ароматические и аминогруппы будут участвовать в связывании СРБ по принципу комплементарности и гидрофобных взаимодействий. Адсорбция атерогенных липопротеидов, происходящая на данном сорбенте, позволяет также считать его миметиком рецептора LOX-1 [23].

Сорбционные характеристики – максимальная сорбционная емкость ( $S_{\text{max}}$ ) и константа десорбции ( $K_d$ ) – представлены в табл. 1 в сравнении с соответствующими параметрами иммуносорбентов IgG-Адсопак® и сорбента с иммобилизованными поликлональными антителами против нСРБ человека. Значение константы десорбции ( $4.2 \times 10^{-8} \text{ M}$ ) свидетельствует о специфичном связывании синтетического сорбента с СРБ и показывает, что набор функциональных групп сорбента способен выполнять роль миметика СРБ-связывающего сайта. Взаимодействие синтетического сорбента с такими основными белковыми компонентами плазмы крови человека, как IgG и ЧСА, существенно менее специфично ( $K_d$  для IgG и ЧСА равны  $2.9 \times 10^{-5}$

Таблица 1. Параметры изотерм адсорбции белков плазмы крови человека – СРБ, IgG, ЧСА

	Белки плазмы крови		
	СРБ	IgG	ЧСА
Мол. масса, кДа	115	146	64
Сорбционные характеристики			
Константа десорбции, Kd, М			
Синтетический сорбент	$4.2 \times 10^{-8}$	$2.9 \times 10^{-5}$	$1.4 \times 10^{-5}$
Иммунсорбент*	$1.3 \times 10^{-8}$	$7.5 \times 10^{-7}$	Н.о.#
Сорбционная емкость, Smax, мг/мл геля			
Синтетический сорбент	34.4	45.2	46.6
Иммунсорбент*	0.9	16.1	Н.о.#

\*Для сорбции СРБ использовали сорбент с иммобилизованной сульфатной фракцией поликлональных антител козла к нСРБ человека; для сорбции IgG – сорбент с иммобилизованными поликлональными антителами барана к IgG человека IgG-Адсопак®.

# - Н.о. – не определяли.

и  $1.4 \times 10^{-5}$  М соответственно). Взаимодействие с ЛНП характеризуется значением константы десорбции, равным  $(7.7 \pm 3.6) \times 10^{-7}$  М и соизмеримым со значением для высокоспецифичного к ЛНП иммунсорбента ЛНП-Липопак® ( $(8.0 \pm 2.2) \times 10^{-7}$  М). Большое количество активных функциональных групп в составе синтетического сорбента обуславливает высокие значения Smax, подтвержденные в опытах *in vitro* с плазмой/сывороткой крови.

Липопротеиды плазмы крови являются лигандами разнообразных рецепторов, присутствующих на поверхности эндотелиальных и гладкомышечных клеток, макрофагов и тромбоцитов. Эти многочисленные рецепторы, способные связывать нативные и/или модифицированные ЛНП, участвуют не только в транспорте холестерина, но и во множестве физиологических и патофизиологических процессов,

включая процессы воспаления, репарации и атеросклероза [24]. Семейство скавенджер-рецепторов (рецепторов-мусорщиков) способно связывать широкий спектр различных лигандов, включая апоВ-100-содержащие модифицированные липопротеиды, Лп(а) и СРБ [25, 26], что предполагает существование возможных общих эпитопов для взаимодействия.

Липопротеид (а) представляет собой ЛНП-подобную частицу, в которой молекула апоВ-100 связана ковалентной дисульфидной связью с высокомолекулярным гликозилированным апобелком (а). Несмотря на то что Лп(а) является независимым генетическим фактором риска широкого спектра ССЗ, медикаментозных способов коррекции его уровня до сих пор не существует [27, 28]. Разработанные с этой целью терапевтические антисмысловые олигонуклеотиды проходят в настоящее время клинические испытания [29].

Адсорбцию Лп(а), ТГ и ХС ЛНП<sub>корр</sub> на сорбенты изучали методом хроматографии с плазмой крови человека при варьировании концентрации исследуемых компонентов (разведение от 1 до 5 раз) с постоянной нагрузкой, равной 1 мл плазмы на 0.1 мл синтетического либо иммунсорбента. Значения коэффициентов распределения (Kс) представлены в табл. 2, сорбционной емкости и эффективности сорбции (% удаления) – на рис. 2. Обнаружена бо-

Таблица 2. Значения коэффициентов распределения (Kс) компонентов плазмы крови человека – Лп(а), ТГ и ЧСА

Сорбент	Коэффициенты распределения, Kс		
	Лп(а)	ТГ	ЧСА
Синтетический сорбент	$38 \pm 7$	$7 \pm 1$	$6 \pm 5$
ЛНП-Липопак®	$23 \pm 6$	$6 \pm 1$	$5 \pm 4$

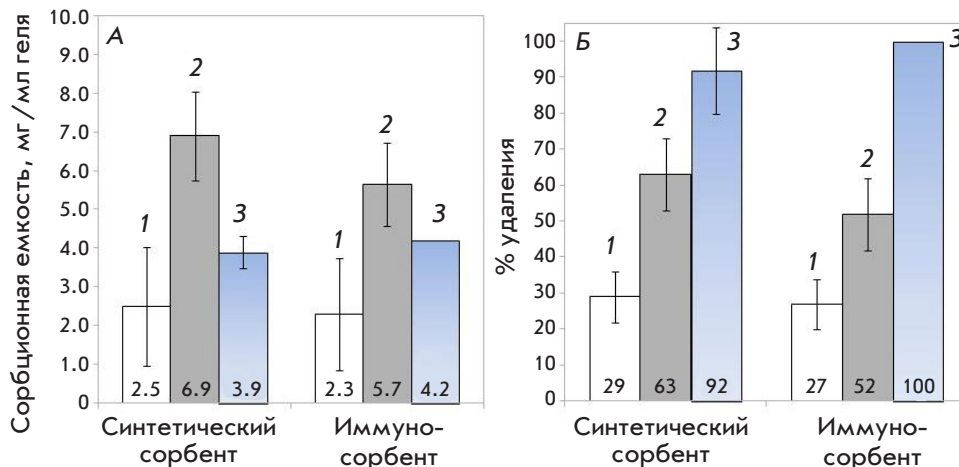
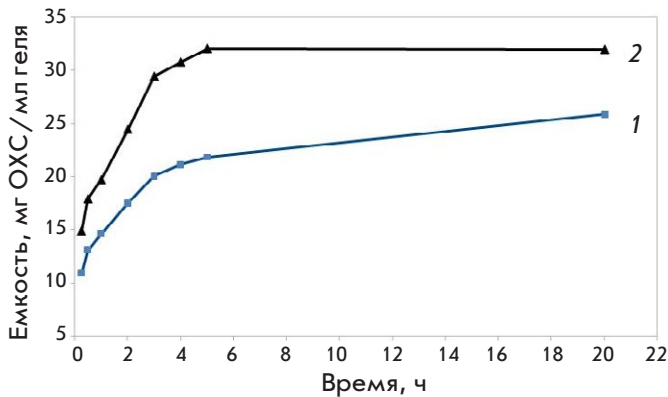


Рис. 2. Значения сорбционной емкости (А); эффективности сорбции (% удаления) исследуемых компонентов плазмы на синтетическом сорбенте и иммунсорбенте ЛНП-Липопак® (Б). Исследуемые компоненты плазмы – ТГ (1), Лп(а) (2), ХС ЛНП<sub>корр</sub> (3). Исходные концентрации в плазме (мг/дл): ОХС – 149, ХС ЛВП – 48, ТГ – 108, Лп(а) – 109, ХС ЛНП<sub>корр</sub> – 42 (расчетное значение)



**Рис. 3.** Зависимость сорбционной емкости синтетического сорбента от нагрузки и времени хроматографии (от 30 мин до 20 ч). 1 – нагрузка 30 мг ОХС/мл геля, 2 – нагрузка 50 мг ОХС/мл геля

лее выраженная адсорбция Лп(а) по сравнению с ТТ и ЧСА, причем максимальное различие по значениям  $K_s$  у синтетического сорбента. Иммуносорбент ЛНП-Липопак® лучше взаимодействует с ЛНП, что подтверждается большими величинами эффективности сорбции.

Адсорбцию СРБ изучали в опытах *in vitro* с сывороткой крови пациента с экстремально высокой концентрацией СРБ (1330 мг/л). Специфичность взаимодействия синтетического сорбента с СРБ убедительно доказана высокой эффективностью связывания, равной 91%, а также высоким значением коэффициента распределения СРБ, равным 101, тогда как для ЧСА и IgG значение  $K_s$  составило 2. По результатам данного эксперимента сорбционная емкость синтетического сорбента достигла 12 мг СРБ/мл геля.

Как показывают результаты длительной инкубации сорбента с синтетическим лигандом с концентрированными растворами ЛНП (300 и 500 мг/дл), максимальная ЛНП-связывающая способность сорбента достигается не ранее 6-го ч инкубации, что, по-видимому, можно объяснить стерическими затруднениями при взаимодействии активных функциональных групп сорбента с таким крупным надмолекулярным комплексом, как частица ЛНП. При более высокой нагрузке сорбционная емкость через 6 ч инкубации составляет 32 мг ОХС/мл геля, а эффективность связывания 64%. При более низкой нагрузке через 20 ч инкубации наблюдали меньшую сорбци-

онную емкость (26 мг ОХС/мл геля) при большей эффективности связывания (86%). Зависимость сорбционной емкости синтетического сорбента от нагрузки и времени хроматографии представлена на рис. 3.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате проведенных экспериментов получены данные, свидетельствующие о высокой специфичности взаимодействия сорбента с синтетическим лигандом с СРБ – константа десорбции ( $K_d$ ), равная  $4.2 \times 10^{-8}$  М, в 1000 раз превышает  $K_d$  таких основных белков плазмы, как ЧСА и IgG, и коэффициент распределения ( $K_s$ ), равный 101, в 50 раз превышает  $K_s$  ЧСА и IgG. Показана способность сорбента связывать большие количества атерогенных липопротеидов; максимальное значение сорбционной емкости, полученное на растворе ЛНП, составляет 32 мг ОХС/мл геля сорбента. Разработанный нами сорбент можно рекомендовать для комплексного удаления СРБ и атерогенных липопротеидов из плазмы крови пациентов при рефрактерных гиперлипидемиях и ССЗ, сопровождающихся повышенным уровнем СРБ.

### Ограничения исследования

Изотерма адсорбции СРБ была построена с использованием раствора, содержащего СРБ в концентрации 1 мг/мл и ЧСА в концентрации 10 мг/мл. Коэффициент распределения холестерина ЛНП ( $K_s$  ЛНП<sub>корр</sub>) не был рассчитан из-за низкой исходной концентрации ЛНП в плазме. Время проведения хроматографии, равное 1 ч, было меньше времени, необходимого для насыщения синтетического сорбента при высоких концентрациях ЛНП.

*Работа выполнена в рамках программы исследований ФГБУ НМИЦ Кардиологии МЗ РФ – НИР ГЗ АААА-А18-118030690076-7 «Разработка новых поколений аффинных сорбентов для процедур терапевтического афереза при лечении больных сердечно-сосудистыми и другими заболеваниями, резистентных к лекарственной терапии».*

*Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Соблюдение этических норм. Настоящая статья не содержит описания выполненных авторами исследований с участием людей или животных в качестве объектов.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Avan A., Tavakoly Sany S.B., Ghayour-Mobarhan M., Rahimi H.R., Tajfard M., Ferns G. // J. Cell. Physiol. 2018. V. 233. № 11. P. 8508–8525. doi:10.1002/jcp.26791

2. Sproston N.R., Ashworth J.J. // Front. Immunol. 2018. V. 9. P. 754. doi:10.3389/fimmu.2018.00754  
3. Thiele J.R., Habersberger J., Braig D., Schmidt Y., Goerendt K., Maurer V., Bannasch H., Scheichl A., Woollard K.J.,



- von Dobschütz E. // *Circulation*. 2014. V. 130. № 1. P. 35–50. doi:10.1161/CIRCULATIONAHA.113.007124.
4. Meuwissen M., van der Wal A.C., Niessen H.W., Koch K.T., de Winter R.J., van der Loos C.M., Rittersma S.Z., Chamuleau S.A., Tijssen J.G., Becker A.E. // *J. Clin. Pathol.* 2006. V. 59. № 2. P. 196–201. doi:10.1136/jcp.2005.027235
  5. Al Aseri Z.A., Habib S.S., Marzouk A. // *Vasc. Health Risk Manag.* 2019. V. 15. P. 221–227. doi:10.2147/VHRM.S198452
  6. Wang J., Tang B., Liu X., Wu X., Wang H., Xu D., Guo Y. // *Atherosclerosis*. 2015. V. 239. № 2. P. 343–349. doi:10.1016/j.atherosclerosis.2015.01.024
  7. Osman R., L'Allier P.L., Elgharib N., Tardif J.C. // *Vasc. Health Risk Manag.* 2006. V. 2. № 3. P. 221–237. doi:10.2147/vhrm.2006.2.3.221
  8. Koenig W. // *Eur. Cardiol.* 2017. V. 12. № 2. P. 89–91. doi:10.15420/ecr.2017.18:1
  9. Abolhasani S., Shahbazloo S.V., Saadati H.M., Mahmoodi N., Khanbabaei N. // *Arq. Bras. Cardiol.* 2019. V. 113. № 4. P. 667–674. doi:10.5935/abc.20190159
  10. Wadhwa A., Avasthi R., Ghambhir J.K., Dwivedi S. // *J. Assoc. Physicians India.* 2013. V. 61. № 6. P. 384–386.
  11. Grønholdt M.L., Sillesen H., Wiebe B.M., Laursen H., Nordestgaard B.G. // *Eur. J. Vasc. Endovasc. Surg.* 2001. V. 21. № 3. P. 227–234. doi:10.1053/ejvs.2001.1321
  12. McFadyen J.D., Kiefer J., Braig D., Loseff-Silver J., Potempa L.A., Eisenhardt S.U., Peter K. // *Front Immunol.* 2018. V. 9. P. 1351. doi:10.3389/fimmu.2018.01351
  13. Sheriff A., Schindler R., Vogt B., Abdel-Aty H., Unger J.K., Bock C., Gebauer F., Slagman A., Jerichow T., Mans D. // *J. Clin. Apher.* 2015. V. 30. № 1. P. 15–21. doi:10.1002/jca.21344
  14. Ries W., Heigl F., Garlichs C., Sheriff A., Torzewski J. // *Ther. Apher. Dial.* 2019. V. 23. № 6. P. 570–574. doi:10.1111/1744-9987.12804
  15. Левашов П.А., Дмитриева О.А., Афанасьева М.И., Овчинникова Е.Д., Уткина Е.А., Афанасьева О.И., Адамова И.Ю., Покровский С.Н. // Патент РФ № 2700605. В01J 20/26 (2006.01). В01J 20/32 (2006.01). 2019.
  16. Patsch J.R., Sailer S., Kostner G., Sandhofer F., Holasek A., Braunsteiner H. // *J. Lipid. Res.* 1974. V. 15. № 4. P. 356–366.
  17. Левашов П.А., Овчинникова Е.Д., Фрид Д.А., Азьмуко А.А., Афанасьева М.И., Коткина Т.И., Афанасьева О.И., Адамова И.Ю., Покровский С.Н. // *Биоорг. химия*. 2015. Т. 41. № 5. С. 553–558. doi:10.7868/S0132342315040089
  18. Афанасьева О.И., Адамова И.Ю., Беневоленская Г.Ф., Покровский С.Н. // *Бюл. эксп. биол. мед.* 1995. Т. 120. № 10. С. 398–401.
  19. Friedewald W.T., Levy R.I., Fredrickson D.S. // *Clin. Chem.* 1972. V. 18. № 6. P. 499–502.
  20. Dahlen G.H. // *Lipoprotein(a)*. / Ed. Scanu A.M. New York: Acad. Press, 1990. P. 151–173.
  21. Афанасьева М.И., Дмитриева О.А., Афанасьева О.И., Адамова И.Ю., Левашов П.А., Овчинникова Е.Д., Покровский С.Н. // *Кардиол. вест.* 2019. Т. 14. № 3. С. 26–32. doi:10.36396/MS.2019.14.03.004
  22. Zen Q., Zhong W., Mortensen R.F. // *J. Cell. Biochem.* 1997. V. 64. № 1. P. 140–151. doi:10.1002/(sici)1097-4644(199701)64:1<140::aid-jcb16>3.0.co;2-p
  23. Stancel N., Chen C.C., Ke L.Y., Chu C.S., Lu J., Sawamura T., Chen C.H. // *Clin. Chem.* 2016. V. 62. № 2. P. 320–327. doi:10.1373/clinchem.2015.243923
  24. Mineo C. // *Cardiovasc. Res.* 2020. V. 116. № 7. P. 1254–1274. doi:10.1093/cvr/cvz338
  25. Pirillo A., Norata G.D., Catapano A.L. // *Mediators Inflamm.* 2013. V. 2013. P. 152786. doi:10.1155/2013/152786
  26. McCormick S.P.A., Schneider W.J. // *Pathology*. 2019. V. 51. № 2. P. 155–164. doi:10.1016/j.pathol.2018.11.003
  27. Pokrovsky S.N., Afanasieva O.I., Ezhov M.V. // *Curr. Opin. Lipidol.* 2016. V. 27. № 4. P. 351–358. doi:10.1097/MOL.0000000000000319
  28. Афанасьева О.И., Покровский С.Н. // *Рос. кардиол. журн.* 2019. Т. 24. № 5. С. 101–108. doi:10.15829/1560-4071-2019-5-101-108
  29. Афанасьева О.И., Ежов М.В., Покровский С.Н. // *Рос. кардиол. журн.* 2018. Т. 23. № 8. С. 99–109. doi:10.15829/1560-4071-2018-8-99-109

УДК 612.017.1:616-097

# Наноантитела – потенциальный терапевтический препарат против лихорадки Эбола

И. Б. Есмагамбетов<sup>1</sup>, Д. В. Щебляков<sup>1</sup>, Д. А. Егорова<sup>1</sup>, О. Л. Воронина<sup>1</sup>, А. А. Деркаев<sup>1</sup>, Д. В. Воронина<sup>1</sup>, О. Попова<sup>1</sup>, Е. И. Рябова<sup>1</sup>, Д. Н. Щербинин<sup>1</sup>, Е. И. Аксенова<sup>1</sup>, А. Н. Семенов<sup>1</sup>, М. С. Кунда<sup>1</sup>, Н. Н. Рыжова<sup>1</sup>, О. В. Зубкова<sup>1</sup>, А. И. Тухватулин<sup>1</sup>, Д. Ю. Логунов<sup>1</sup>, Б. С. Народицкий<sup>1</sup>, С. В. Борисевич<sup>2</sup>, А. Л. Гинцбург<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Национальный исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 123098 Россия

<sup>2</sup>«48 Центральный научно-исследовательский институт» Министерства обороны Российской Федерации, Сергиев Посад, 141306, Россия

\*E-mail: esmagambetovib@gmail.com

Поступила в редакцию 18.06.2021

Принята к печати 14.07.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11487

**РЕФЕРАТ** Лихорадка Эбола – высококонтагиозное вирусное заболевание, при котором смертность достигает 90%. В настоящее время в мире не существует зарегистрированных средств специфической терапии заболевания, вызываемого вирусом Эбола. Однако в качестве перспективных противовирусных препаратов рассматриваются моноклональные антитела, обладающие высокой специфичностью к поверхностному гликопротеину вируса Эбола (EBOV GP). За последнее десятилетие широкое применение в диагностике и терапии различных инфекционных и неинфекционных заболеваний получили наноантитела (однодоменные антитела, неканонические антитела семейства верблюдовых). В настоящей работе при помощи иммунизации альпака (*Vicugna pacos*) рекомбинантным аденовирусом человека 5-го серотипа, экспрессирующим ген EBOV GP (Ad5-GP), впервые получена панель наноантител, специфичных к EBOV GP. Наиболее перспективный клон наноантитела аЕv6 был выбран для дальнейшего изучения на основе данных по специфической активности, констант аффинности и вируснейтрализующей активности в отношении рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного EBOV GP (rVSV-GP). С целью улучшения фармакокинетических и иммунологических свойств клон аЕv6 был модифицирован Fc-фрагментом человеческого IgG1 (аЕv6-Fc). Для оценки протективной активности химерной молекулы аЕv6-Fc разработана летальная модель инфекции мышей rVSV-GP при помощи иммуносупрессии. Испытания на летальной модели продемонстрировали защитные свойства наноантитела аЕv6-Fc. Таким образом, полученное нами наноантитело и его модификация обладают потенциальными защитными свойствами против вируса лихорадки Эбола.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** вирус лихорадки Эбола, наноантитела, рекомбинантный аденовирусный вектор, рекомбинантный вирус везикулярного стоматита.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** БВВЭ – болезнь, вызванная вирусом Эбола; БОЕ – бляшкообразующая единица; ИФА – иммуноферментный анализ; ТМБ – тетраметилбензидин; ФСБ-Т – фосфатно-солевой буфер с полисорбатом 20; HRP – пероксидаза хрена; РВМС – мононуклеарные клетки периферической крови; PRNT50 – 50% вируснейтрализующая доза антитела.

## ВВЕДЕНИЕ

Вирус лихорадки Эбола, относящийся к семейству Filoviridae, роду *Ebolavirus*, вызывает геморрагическую лихорадку у людей и нечеловеческих приматов [1]. Род *Ebolavirus* состоит из шести видов: Заир эболавирус (EBOV), Судан эболавирус (SUDV), Бундибуге

эболавирус (BDBV), эболавирус Тайского леса (TAFV), Рестон эболавирус (RESTV) и Бомбали эболавирус (BOMV) [2]. Болезнь, вызванная вирусом Эбола (БВВЭ), сопровождается 60–90% летальностью [3, 4]. Последние вспышки БВВЭ зарегистрированы в Конго (2018 г.), Уганде (2019 г.), в Конго и Гвинее (2021 г.) [5].

Коктейли из моноклональных антител, специфичных к EBOV GP, могут обеспечить полную защиту нечеловеческих приматов от БВВЭ, и некоторые из них (Zmapp, MAb114, REGN-EB3 и GamEMab) в настоящее время проходят клинические испытания [6–8]. В предыдущем исследовании [9] с помощью иммунизации мышей Ad5-GP (компонент B вакцины ГамЭвак Комби [10]) нам удалось получить два моноклональных антитела мыши (2c8 и 6g3), способных защищать от БВВЭ.

Помимо моноклональных антител, в последние 20 лет интерес вызывает возможность применения наноантител (неканонические формы моноклональных антител семейства Верблюдовых), а также их модификаций в терапии инфекционных заболеваний [11, 12]. Однако существует лишь несколько исследований, направленных на разработку препаратов для лечения БВВЭ на основе наноантител [13–15]. Основные преимущества наноантител – относительная простая технология получения, а также способность связываться с труднодоступными антигенными эпитопами [13–15]. В то же время недостатки наноантител связаны с их быстрым выведением почками и отсутствием самостоятельной эффекторной функции у Fc-фрагмента. Для улучшения фармакокинетических и эффекторных свойств наноантител [12], а также для увеличения их авидности за счет димеризации молекулы необходима модификация Fc-фрагментом IgG.

Нами получено наноантитело, обладающее протективной активностью в отношении рекомбинантного вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного гликопротеином вируса Эбола (rVSV-GP). С этой целью мы использовали технологию, включающую: (1) иммунизацию альпака Ad5-GP; (2) получение панели наноантител, специфичных к гликопротеину вируса Эбола (EBOV GP); (3) отбор клона с оптимальной активностью *in vitro*; (4) модификацию выбранного клона для улучшения его фармакокинетических и иммунологических свойств; (5) оценку защитной активности выбранного клона *in vivo*.

В результате работы нами отобран и охарактеризован наиболее перспективный клон наноантитела – aEv6. Протективность модифицированной формы этого клона (aEv6-Fc) оценивали на модели летальной инфекции иммуносупрессивных мышей rVSV-GP. Для создания иммуносупрессии мышам вводили дексаметазон и циклофосфамид. Такой подход использовали ранее [16, 17] для оценки активности противовирусных препаратов, а также для изучения факторов патогенеза вируса лихорадки Эбола. В нашем исследовании показана способность антитела aEv6-Fc защищать мышей от летальной инфекции

rVSV-GP, что может говорить о его потенциальной противовирусной активности в отношении вируса Эбола.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Вирусы и антигены

Ad5-GP – рекомбинантный дефектный по репликации аденовирус, полученный, как описано ранее [10, 18], и экспрессирующий ген GP Zaire ebolavirus (изолят *Ebola virus/H. sapiens-wt/SLE/2014/Makona-G3735.1*, GenBank Accession Number KM233056).

rVSV-GP – рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, полученный, как описано ранее [10], и экспрессирующий ген GP Zaire ebolavirus (изолят *Ebola virus/H. sapiens-wt/SLE/2014/Makona-G3735.1*, GenBank Accession Number KM233056).

Рекомбинантный белок GP Zaire ebolavirus (штамм *H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15*) – Sino Biological, Китай, кат. № 40442-V02H.

Фар-помощник M13 Hyperphage M13 K07ΔpIII – Progen, Германия, кат. № PRHYPE.

### Клеточные линии

Клеточная линия CHO-S – Thermo Fisher Scientific, США, кат. № R80007.

Клеточные линии Vero E6 (ATCC CRL 1586) и GMK-AN-1(D) (CVCL\_L878) получены из Российской коллекции клеточных культур позвоночных (Санкт-Петербург, Россия, <https://www.incras.ru/institut/struktura/ckp/rossijskaja-kollekcija-kletochnyh-kultur/>).

### Иммунизация альпака, получение иммунной библиотеки, экспрессия и очистка наноантител

Здорового 4-летнего самца альпака (*Vicugna pacos*) использовали для иммунизации и дальнейшего отбора крови. Животное предоставлено фермой «Российские Альпаки» (Походкино, Россия).

Ad5-GP (10<sup>8</sup> БОЕ) вводили внутримышечно, трехкратно, с трехнедельными интервалами, без адъювантов. Рекомбинантный белок EBOV GP (200 мкг) вводили внутримышечно спустя 3 недели после последней инъекции Ad5-GP вместе с неполным адъювантом Фрейнда.

Отбор крови (150 мл) проводили спустя 5 дней после последней иммунизации, образцы крови помещали в стерильные вакуумные пробирки с гепарином лития.

Выделение мРНК, ПЦР, конструирование библиотеки и специфический скрининг выполняли согласно [19] с использованием рекомбинантного белка EBOV GP в качестве антигена.

Экспрессию и очистку наноантител осуществляли как описано ранее [19].

### Секвенирование генов наноантител методом NGS

Ампликоны генов наноантител получали с помощью специальных праймеров [19] и очищали набором MinElute PCR Purification Kit (QiaGen, Нидерланды). Библиотеки готовили по протоколу для случайных фрагментов (Roche, Швейцария). Размер и качество библиотек контролировали с помощью набора Agilent High Sensitivity DNA Kit (Agilent, США). Секвенирование выполняли с использованием набора GS Junior Titanium Sequencing Kit и GS Junior + Series XL + Kit GS Junior + Series XL (Roche) в соответствии с рекомендациями производителя.

Полную обработку ампликонов проводили с помощью программного обеспечения 454 Sequencing System Software v.3.0 и собственных программ.

### Измерение констант аффинности наноантител

Константы аффинности наноантител определяли с помощью поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе Biacore 3000 (GE Healthcare BioSciences AB, Швеция) как описано ранее [19] с рекомбинантным белком EBOV GP.

### Получение модифицированной формы aEv6-Fc

Нуклеотидную последовательность гена *aEv6-Fc*, синтезированную в ЗАО «Евроген» (Россия), клонировали в плазмиду pShuttle-CMV (Stratagene, США) и получили таким образом плазмиду pShuttle-CMV-aEv6Fc.

Культуру клеток CHO-S (Thermo Fisher Scientific) транзитивно трансфицировали плазмидой pShuttle-CMV-aEv6Fc с использованием системы CHO Gro (Mirus Bio, США) в соответствии с протоколом производителя. Клетки культивировали в колбах Эрленмейера при 125 об/мин, 5% CO<sub>2</sub>, 80% влажности, 37°C, спустя 24 ч снижали температуру до 32°C и продолжали культивировать в течение 10 дней. Начиная с 3-го дня добавляли подпитки Cell boosts 7a (2%), 7b (0.2%) (HyClone, США) и 0.5% CHO Bioreactor Feed (Sigma, США) 1 раз в день. По истечении 10 дней культивирования культуральную жидкость осветляли центрифугированием при 5000 g. Антитело очищали аффинной хроматографией на системе AKTA start (Cytiva, Швеция), используя колонки MAbSelect SuRe 1 мл (Cytiva, Швеция) в соответствии с протоколом производителя. Дополнительную очистку и замену буфера проводили на колонке XK 26/100 (Cytiva) с сорбентом Superdex 200 pg (Cytiva).

### Получение контрольного антитела MAb114

Для получения контрольного антитела MAb114 использовали аминокислотную последовательность,

опубликованную Corti и соавт. [7]. Нуклеотидные последовательности, кодирующие тяжелую и легкую цепь антитела MAb114, синтезировали в ЗАО «Евроген», клонировали в плазмиду pShuttle-CMV (Stratagene). Полученными плазмидами pShuttle-CMV-Mab114HC и pShuttle-CMV-Mab114LC трансфицировали клеточную линию CHO-S. Процедуры трансфекции клеток и очистки антитела проводили как описано в предыдущем пункте.

### Непрямой ИФА

Непрямой ИФА проводили согласно [9]. Конъюгированные с пероксидазой хрена (HRP) антитела – anti-human IgG (Sigma, cat. no A8667), anti-Myc-tag (Abcam, 1326) и anti-Llama IgG (Bethyl, A160-100P), использовали для обнаружения наноантител и антител (aEv6-Fc и MAb114) в сыворотке альпака соответственно.

### Реакция нейтрализации вируса

Реакцию нейтрализации вируса проводили согласно [9], используя модель инфекции клеток Vero E6 вирусом rVSV-GP.

### Изучение фармакокинетики aEv6-Fc

Трем интактным макакам резусам (*Macaca mulatta*), полученным из НИИ медицинской приматологии (Веселое, Россия), внутривенно вводили 10 мг/кг aEv6-Fc со скоростью инфузии 10 мл/ч. Образцы крови отбирали до инфузии и спустя 1, 4, 8, 16, 24, 48, 96 ч и через 7, 14, 21 дней после инфузии. Концентрацию aEv6-Fc в крови оценивали методом непрямого ИФА с использованием различных разведений aEv6-Fc в качестве стандартов. Фармакокинетические параметры рассчитывали с использованием программы Microsoft Excel и PKSolver softs.

### Пассивная иммунизация и оценка протективной активности

Самки мышей BALB/c (возраст 4–6 недель, вес 18–20 г) предоставлены Пущинским филиалом Института биоорганической химии РАН (Пущино, Россия). Мышам для иммуносупрессии вводили дексаметазон (1 раз в день внутрибрюшинная инъекция 10 мг/кг/день за 10 дней до инъекции вируса) [17] и циклофосфамид (однократная внутрибрюшинная инъекция 150 мг/кг за 5 дней до введения вируса). rVSV-GP вводили внутривенно в дозе 10<sup>9</sup> БОЕ/мышь, антитело aEv6-Fc – внутривенно, в дозе 50 мг/кг. Подопытных животных наблюдали и взвешивали каждый день в течение всего эксперимента. Результаты выражали в процентах выживаемости мышей в различные временные точки.

Более детально схема эксперимента изложена в разделе «Результаты».



### Определение титров rVSV-GP в органах и тканях инфицированных мышей

Органы и ткани инфицированных мышей выделяли в стерильных условиях. Кусочки органов (20 мг) гомогенизировали в 1 мл DMEM. Суспензию осветляли центрифугированием при 2000 об/мин в течение 10 мин. Супернатант отбирали для определения титров rVSV-GP в реакции вирус-нейтрализации.

### Статистический анализ

Данные анализировали в EXCEL 2010 и STATISTICA 7.0. Для оценки межгрупповых различий титров антител и выживаемости использовали U-тест Манна–Уитни и тест Гехана–Уилкоксона с уровнем значимости 0.05.

### Соблюдение стандартов работы с животными

Экспериментальные процедуры проводили в соответствии с Руководством по уходу и использованию лабораторных животных, опубликованному National Institutes of Health (NIH Publication #85–23, revised 1996), и с Национальным стандартом Российской Федерации ГОСТ Р 53434-2009. Все эксперименты были одобрены этическим комитетом ФГБУ НИЦЭМ им. Н.Ф. Гамалеи (протокол № 27 от 2020 г.). Все лица, использовавшие животных или ухаживающих за ними в ходе исследований, проходили ежегодное обучение в соответствии с требованиями IACUC.

### РЕЗУЛЬТАТЫ

#### Получение панели наноантител, специфичных к EBOV GP

Панель наноантител, специфичных к EBOV GP, получали путем иммунизации альпака (*V. pacos*) рекомбинантным аденовирусом Ad5-GP и рекомбинантным белком GP в соответствии со схемой, представленной на рис. 1А.

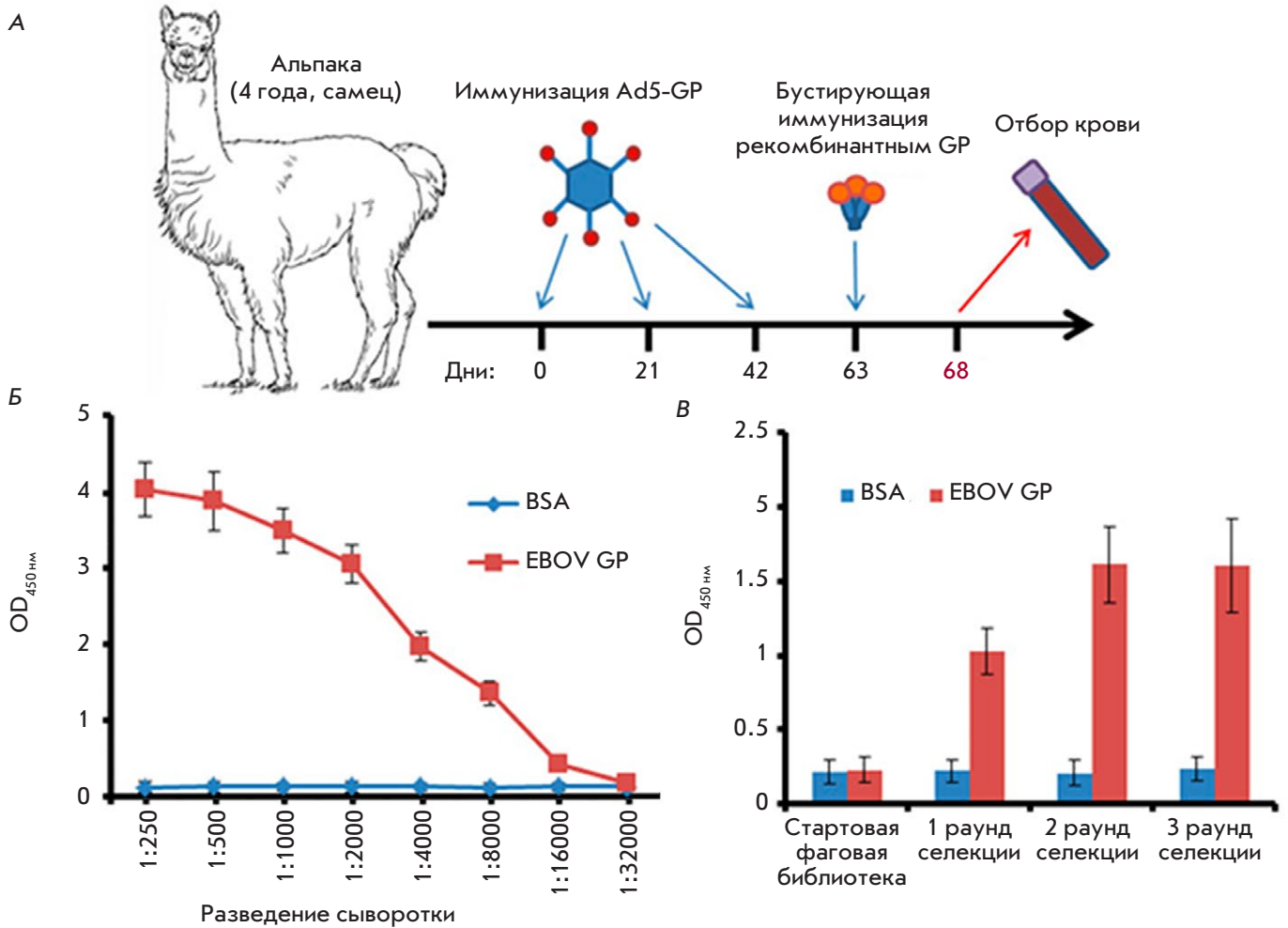
На 5-й день после бустирующей иммунизации отбирали 150 мл крови альпака и выделяли сыворотку, в которой определяли титр антител, специфичных к EBOV GP, для подтверждения эффективности иммунизации. Титр антител к EBOV GP определен в разведении 1 : 16000, что свидетельствует о высоком иммунном ответе у иммунизированного животного (рис. 1Б).

Для создания иммунной библиотеки наноантител отбирали мононуклеарные клетки периферической крови (PBMC). Нуклеотидные последовательности, кодирующие вариабельные фрагменты наноантител, полученных из PBMC альпака, клонировали в фагмидный вектор pHEN1. Специфичные антитела отбирали методом фагового дисплея как описано в [19].

Результаты отбора анализировали с помощью поликлонального фаг-ИФА (рис. 1В). В дальнейшей работе использовали библиотеку второго раунда селекции с целью предотвращения умень-

Таблица 1. Результаты анализа библиотек наноантител при помощи NGS

Клон	Частоты считываний, %		Фактор амплификации	CDR3 (аминокислотная последовательность)
	Стартовая библиотека	Библиотека после селекции		
aEv1	0.33	18.89	57.79024	NVQLGRFGILE
aEv2	0.31	7.81	24.89199	KSRRYGVVDYW
aEv3	0.01	3.70	282.6006	AAVNSWAVYSLSRNYDY
aEv4	0.05	2.01	38.44366	AMRRGGVSYTYW
aEv5	0.01	3.71	283.5078	AVRSERYTRRYDH
aEv6	0.01	0.42	31.75288	YVDARYGALHTYRS
aEv7	0.08	1.60	20.41256	NAHYWSRD
aEv8	0.01	3.38	258.5591	KVTRGDFLGRRTDY
aEv9	0.01	0.20	14.96921	AARPGSYSRDARRYD
aEv10	0.03	2.08	79.609	NAQLSRSVLWGRY
aEv11	0.01	1.29	98.88753	QQKYAGRLY
aEv12	0.05	0.97	18.59811	AADRVLTSRRNWDY
aEv13	0.01	1.54	117.9393	YARRRTYLAAY
aEv14	0.01	0.61	46.72209	AAGRSSMGLLDATDWRH
aEv15	0.01	0.85	65.3202	NSRGRHDWNRYN
aEv16	0.01	0.42	32.20649	AASPRTSMLVVGNDH
aEv17	0.01	1.39	106.5989	NAQSHFFGSNY
aEv18	0.05	0.14	2.721675	AARPEYYSGTASYVSTSYDY
Другие	98.954	48.99	0.494915	



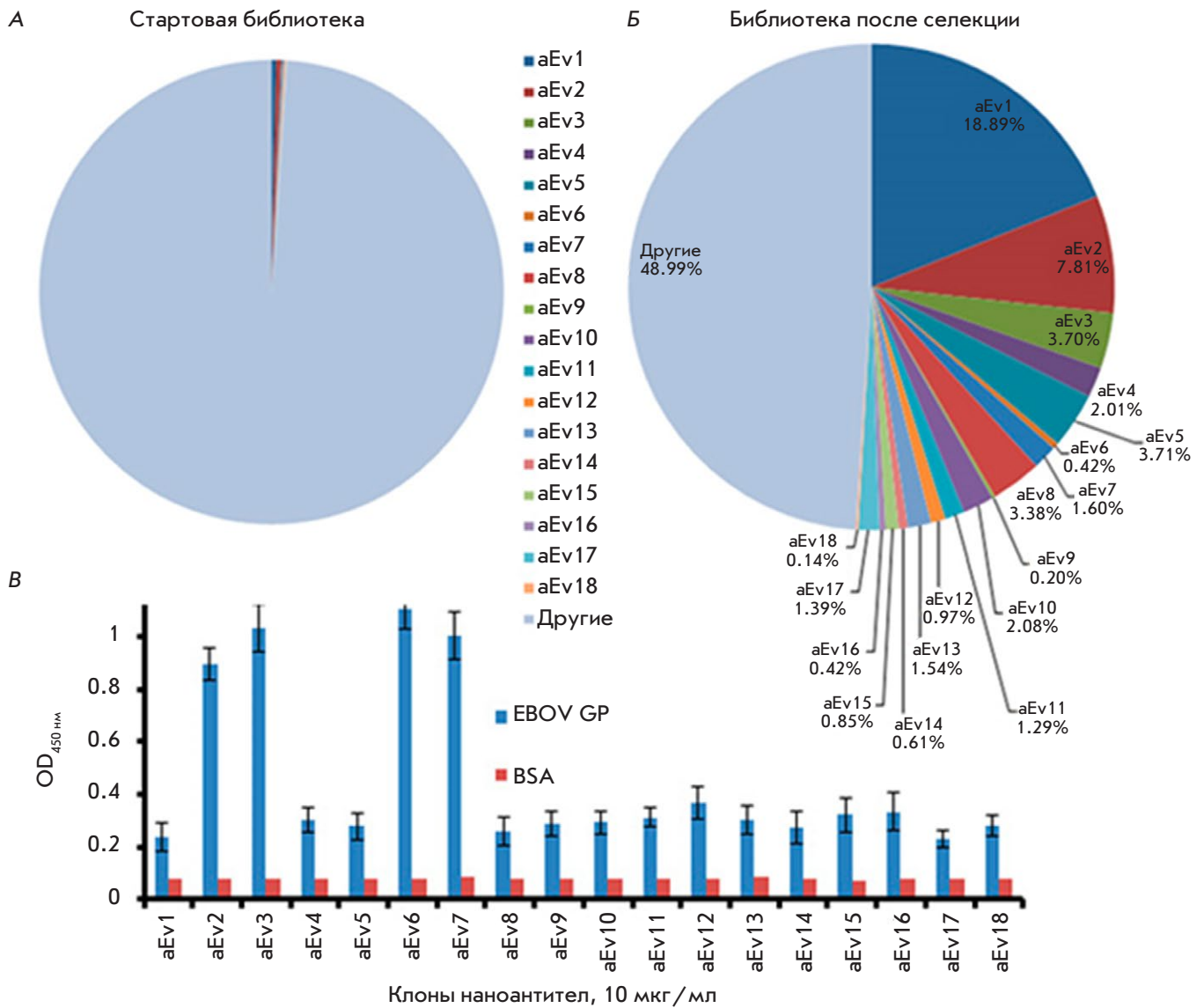
**Рис. 1.** Схема иммунизации альпака (*V. pacos*) для получения панели наноантител (А), определение титра антител к EBOV GP в сыворотке иммунизированного альпака (Б) и результаты поликлонального фаг-ИФА (В). Б – в иммунологические планшеты сорбировали 100 мкл (1 мкг/мл) EBOV GP (*H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15*). На следующий день лунки промывали 5 раз 0.1% ФСБ-Т, а затем блокировали 5% раствором обезжиренного молока в ФСБ-Т. В лунки добавляли различные разведения сыворотки в ФСБ-Т и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После промывки добавляли антитела 5× anti-Llama IgG (Bethyl, A160-100P) в блокирующем буфере (1 : 5000) и инкубировали в течение 1 ч при 37°C. После пятикратной промывки добавляли субстрат ТМБ и оценивали результаты. В – в иммунологические планшеты сорбировали 100 мкл EBOV GP (1 мкг/мл) (*H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15*). На следующий день лунки промывали пятикратно 0.1% ФСБ-Т, а затем блокировали 5% раствором обезжиренного молока, разведенным в ФСБ-Т. Фаговые частицы (10<sup>11</sup>) с каждого этапа отбора добавляли в ФСБ-Т в лунки и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. Затем после 5-кратной промывки не связавшихся фагов добавляли антитела – HRP-конъюгированные anti-M13 phage IgG (Abscam, Великобритания), разведенные в блокирующем буфере в соотношении 1 : 500, и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После 5-кратной промывки добавляли субстрат ТМБ и оценивали результаты

шения разнообразия наноантител. Нуклеотидные последовательности наноантител идентифицировали при помощи секвенирования нового поколения (NGS).

В результате анализа идентифицировали 18 клонов (aE1-18) (табл. 1). Фактор амплификации 16 клонов после двух раундов селекции составил более 20, что указывает на их специфическое накопление

в результате связывания с EBOV GP. В то же время анализ библиотеки показал, что отобранные клоны составляют около 51% всех ампликонов библиотеки после селекции, тогда как в стартовой библиотеке число этих клонов было менее 1% (рис. 2А и 2Б).

По результатам непрямого ИФА с EBOV GP в качестве антигена отобрали четыре клона (aEv2, aEv3, aEv6, aEv7) как наиболее специфичные (рис. 2В).



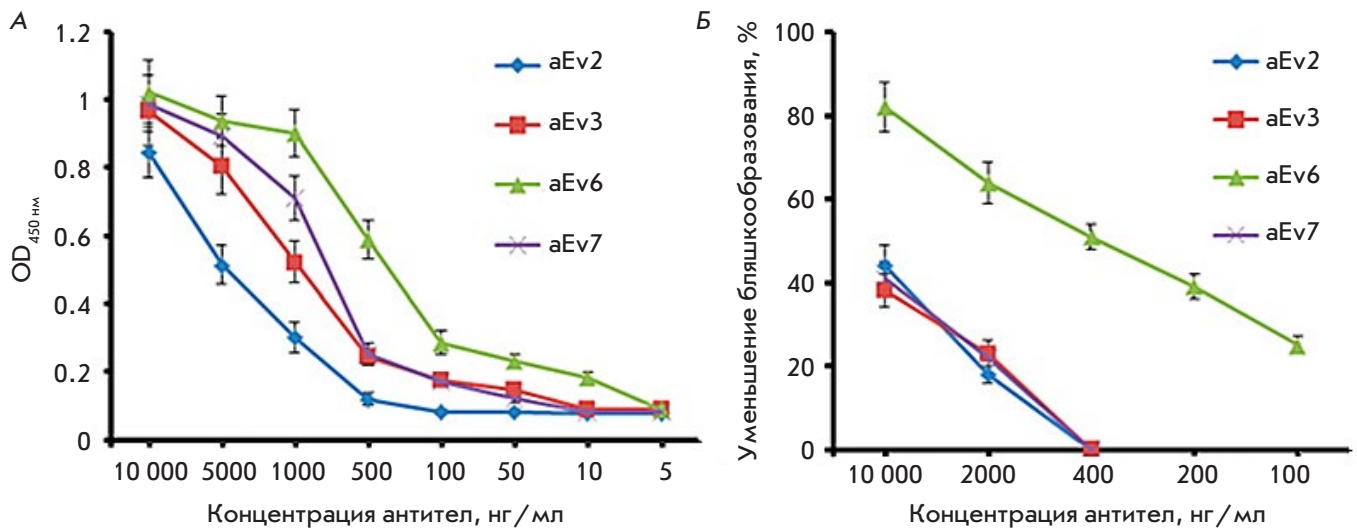
**Рис. 2.** Результаты сравнительного анализа соотношения специфических наноантител в библиотеках до и после отбора. А – процент клонов в стартовой библиотеке. Б – процент клонов в библиотеке после селекции. В – скрининг отобранных клонов в непрямом ИФА. aEv1–18 – клоны отобранных наноантител, EBOV GP – рекомбинантный EBOV GP, BSA – бычий сывороточный альбумин (отрицательный контроль)

На иммунологические планшеты сорбировали 100 мкл (1 мкг/мл) EBOV GP (*H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15*). На следующий день лунки промывали 5 раз 0.1% ФСБ-Т, затем блокировали 5% обезжиренным молоком, растворенным в ФСБ-Т. Образцы отобранных клонов (10 мкг/мл) добавляли в лунки и инкубировали при 37°C в блокирующем буфере в течение 1 ч. После пятикратной промывки добавляли HRP-конъюгированные anti-Мус-tag IgG-антитела в блокирующем буфере (1 : 5000) на 1 ч при 37°C. После пятикратной промывки добавляли субстрат ТМБ и оценивали результаты.

### Изучение отобранных клонов в реакции непрямого ИФА, поверхностного плазмонного резонанса и реакции нейтрализации вируса

Иммунологические свойства отобранных клонов aEv2, aEv3, aEv6 и aEv7 изучали с помощью ИФА, поверхностного плазмонного резонанса SPR (изменение констант аффинности,  $K_D$ ) и реакции нейтрализации в условиях *in vitro*; основные результаты представлены на рис. 3.

По результатам непрямого ИФА рабочие титры составляли не менее 1 мкг/мл, 500 нг/мл, 500 нг/мл и 50 нг/мл для клонов aEv2, aEv3, aEv7 и aEv6 соответственно (рис. 3А). Самые низкие значения



**Рис. 3.** Изучение активности отобранных клонов наноантител с помощью непрямого ИФА (А) и вируснейтрализующей активности (Б). А – на иммунологические планшеты сорбировали 100 мкл (1 мкг/мл) EBOV GP (*H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15*). На следующий день лунки 5 раз промывали 0.1% ФСБ-Т, затем блокировали 5% обезжиренным молоком, растворенным в ФСБ-Т. Разведения антител в блокирующем буфере добавляли в лунки и инкубировали при 37°C в течение 1 ч. После 5-кратной промывки добавляли HRP-конъюгированные anti-Мус-tag IgG-антитела в блокирующем буфере (1 : 5000) и выдерживали 1 ч при 37°C. После 5-кратной промывки добавляли субстрат ТМБ и оценивали результаты. Б – rVSV-GP (*H. sapiens-wt/SLE/2014/Макона-G3735.1*) разводили в буфере (10 мМ Трис-НСl рН 7.5, 1 мМ EDTA, 10% сахарозы). Смесь равных объемов VNH и исходного вируса инкубировали в течение 1 ч при 37°C, затем переносили на культуральные планшеты с монослоем клеточной линии Vero E6. После адсорбции комплекса антитела+вирус (120 мин при 37°C) клетки покрывали слоем агара. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 ч. Результаты оценивали путем подсчета количества бляшек под микроскопом. Для определения бляшкообразующих единиц (БОЕ) использовали следующую формулу: БОЕ/мл = (среднее число БОЕ/0.2 мл) × фактор разведения

$K_D$  имел клон аЕv6 ( $1.87 \times 10^{-10}$  М), далее клоны аЕv3 и аЕv7 со значениями  $K_D = 5.53 \times 10^{-8}$  и  $2.4 \times 10^{-8}$  М соответственно. Клон аЕv2 имел наиболее низкое значение  $K_D = 7.13 \times 10^{-7}$  М. Как показано на рис. 3Б, клоны аЕv2, аЕv3, аЕv7 не обладали значительной вируснейтрализующей активностью против rVSV-GP, в то время как клон аЕv6 показал 50% вируснейтрализующую активность при концентрации не менее 400 нг/мл. Согласно полученным результатам для дальнейшего изучения был выбран клон аЕv6, имевший наиболее высокую аффинность к EBOV GP, а также наибольший вируснейтрализующий потенциал против rVSV-GP.

**Получение клона аЕv6, модифицированного Fc-фрагментом IgG1 человека и изучение его свойств**

Отобранный клон аЕv6 был модифицирован Fc-фрагментом IgG1 человека для улучшения его иммунологических и фармакокинетических свойств. Полученное антитело аЕv6-Fc показало специфичную активность к EBOV GP штамма *H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15*, сравнимую с активностью

антитела MAb114, взятого в качестве контроля (рис. 4А).

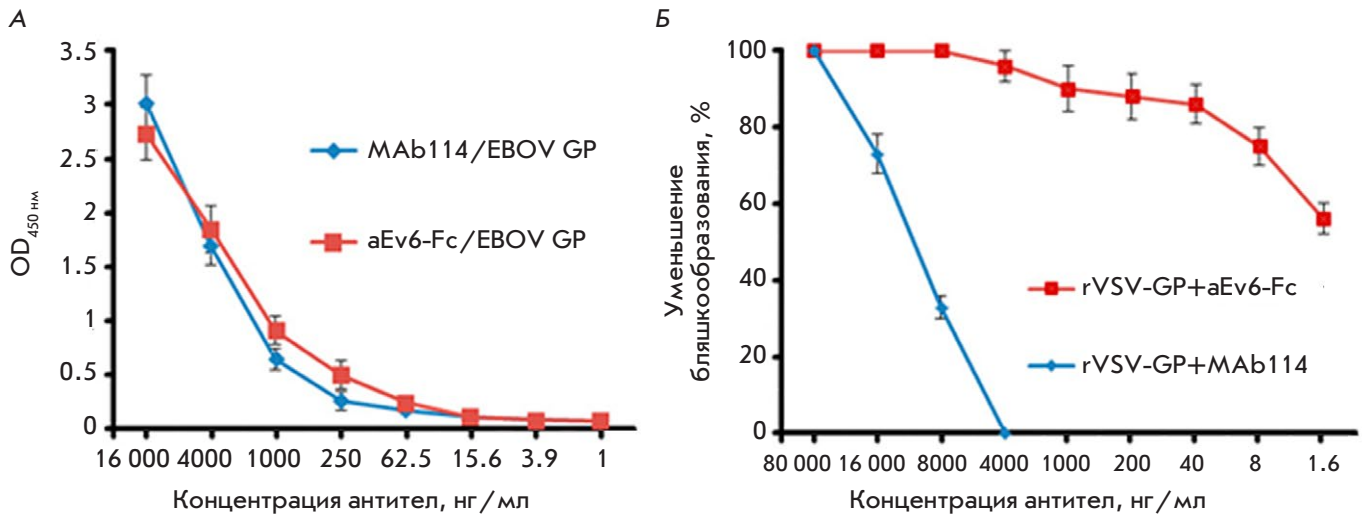
Далее в реакции вирусной нейтрализации с использованием rVSV-GP сравнили антитела аЕv6-Fc и MAb114. Показано, что антитело аЕv6-Fc обладает значительно большей вируснейтрализующей активностью, чем антитело MAb114 (рис. 4Б).

Изучение фармакокинетических свойств аЕv6-Fc на макаках резусах показало, что среднее время циркуляции антител в крови после инъекции составляет не менее 7 дней (данные не представлены), что гораздо больше, чем у не модифицированных наноантител, имеющих низкую молекулярную массу [20, 21].

**Оценка протективной активности антитела аЕv6-Fc на модели летальной инфекции мышей rVSV-GP**

На последнем этапе оценивали защитные свойства аЕv6-Fc на модели летальной инфекции мышей rVSV-GP. Несмотря на то что наиболее репрезентативной является модель нечеловеческих приматов, финансовые и этические соображения вынуждают





**Рис. 4.** Сравнение специфичной активности антител aEv6-Fc и MAb114 к EBOV GP штамма *H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15* (А) и вируснейтрализующей активности против rVSV-GP (Б). А – на иммунологические планшеты сорбировали 100 мкл (1 мкг/мл) EBOV GP (*H. sapiens-wt/GIN/2014/Kissidougou-C15*). На следующий день лунки промывали 5 раз 0.1% ФСБ-Т, затем блокировали 5% обезжиренным молоком, растворенным в ФСБ-Т. В лунки добавляли различные разведения антител aEv6-Fc и MAb114 и инкубировали при 37°C в блокирующем буфере в течение 1 ч. После 5-кратной промывки добавляли HRP-конъюгированные anti-human IgG-антитела (A8667, Sigma) в блокирующем буфере (1 : 5000) и выдерживали в течение 1 ч при 37°C. После 5-кратной промывки добавляли субстрат ТМБ и оценивали результаты. Б – разведения rVSV-GP делали в буфере (10 мМ Трис-НСl рН 7.5, 1 мМ EDTA, 10% сахарозы). Смесь равных объемов антител и вируса инкубировали в течение 1 ч при 37°C, а затем переносили на культуральные планшеты с монослоем клеточной линии Vero E6. После адсорбции комплекса антитело+вирус (120 мин при 37°C) клетки покрывали слоем агара. Планшеты инкубировали при 37°C, 5% CO<sub>2</sub> в течение 48 ч. Результаты оценивали путем подсчета количества бляшек под микроскопом. Для определения бляшкообразующих единиц (БОЕ) использовали следующую формулу: БОЕ/мл = (среднее число БОЕ/0.2 мл) × фактор разведения

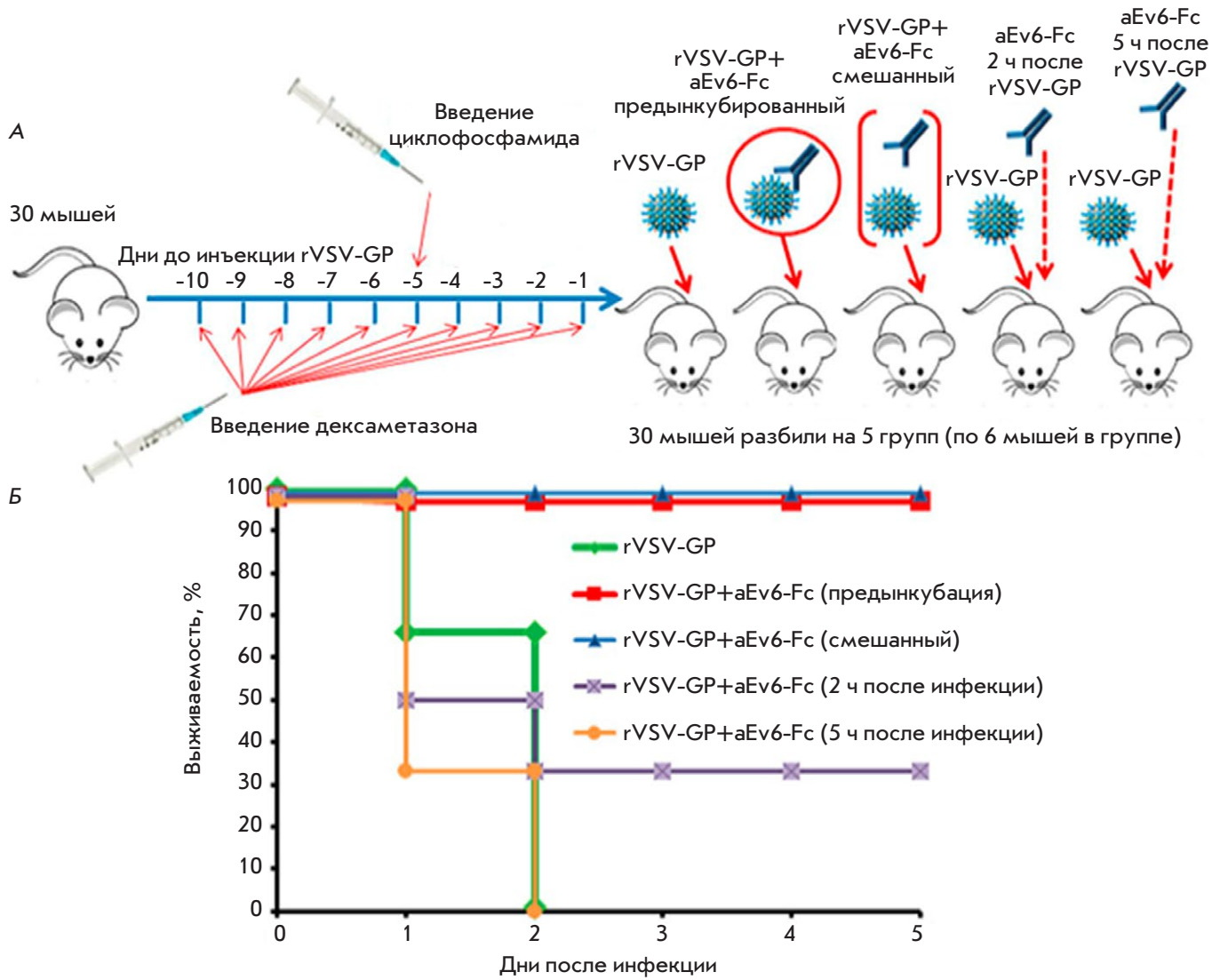
разрабатывать новые модели, основанные на более мелких животных [22]. Более того, все работы с филовirusами необходимо выполнять при четвертом уровне биобезопасности [22]. Все это делает обоснованной замену природного вируса лихорадки Эбола рекомбинантным аналогом, более безопасным для человека. Таким аналогом может служить рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, псевдотипированный белком EBOV GP (rVSV-GP). Поскольку rVSV-GP не является патогенным для мышей, перед инъекцией вируса мышам вводили дексаметазон и циклофосфамид для иммуносупрессии [17]. Эксперимент проводили следующим образом: отбирали пять групп мышей по шесть особей в каждой. Животных из всех групп подвергали иммуносупрессивной терапии в течение 10 дней, после чего мышам из первой группы проводили инъекцию вируса, а животным из других групп вводили смесь вирус+антитело.

На 11 день мышам внутривенно вводили 10<sup>9</sup> БОЕ rVSV-GP как в отсутствие, так и в присутствии антитела aEv6-Fc, предынкубированного с вирусом в течение 1 ч при 37°C; смешанного с вирусом непо-

средственно перед инъекцией; введенного внутривенно спустя 2 ч после инфицирования; введенного внутривенно спустя 5 ч после инфицирования. Схема эксперимента показана на рис. 5А.

За мышами наблюдали в течение 5 дней после заражения. Мыши контрольной группы, которым не вводили aEv6-Fc, погибли на второй день после заражения. Введение aEv6-Fc спустя 5 ч после заражения также не смогло предотвратить или отсрочить гибель животных. Введение антител спустя 2 ч после заражения обеспечило выживание двух из шести мышей. Предынкубация и смешивание aEv6-Fc с rVSV-GP полностью защитило животных. Результаты эксперимента представлены на рис. 5Б.

Для более детальной оценки защитных свойств антитела aEv6-Fc против rVSV-GP на модели инфекции у мышей определяли число БОЕ в крови и органах зараженных мышей. Мыши были поделены на три группы по четыре особи в каждой. Первая группа иммуносупрессированных мышей оставалась интактной. Мыши второй группы были заражены rVSV-GP. Третья группа была заражена rVSV-GP, предварительно нейтрализованным



**Рис. 5.** Оценка протективной активности антитела aEv6-Fc. **А** – схема эксперимента; **Б** – результаты эксперимента. **А** – rVSV-GP – рекомбинантный вирус везикулярного стоматита, псевдотипированный гликопротеином вируса Эбола (*H. sapiens-wt/SLE/2014/Makona-G3735.1*); aEv6-Fc – антитело aEv6-Fc. **Б** – rVSV-GP – мыши, инфицированные rVSV-GP ( $10^9$  БОЕ/мышь); rVSV+aEv6 (предынкубация) – мыши, получившие rVSV-GP ( $10^9$  БОЕ/мышь), ранее смешанный и инкубированный с 300 мкл антитела aEv6-Fc (3 мг/мл); rVSV-GP+aEv6-Fc (смешанный) – мыши, получившие rVSV-GP ( $10^9$  БОЕ/мышь), предварительно смешанный с 300 мкл aEv6-Fc (3 мг/мл); rVSV-GP+aEv6-Fc (2 ч после заражения) – мыши, получившие rVSV-GP ( $10^9$  БОЕ/мышь), а затем, спустя 2 ч, 300 мкл aEv6-Fc (3 мг/мл); rVSV-GP+aEv6-Fc (5 ч после заражения) – мыши, получившие rVSV-GP ( $10^9$  БОЕ/мышь), а затем, спустя 5 ч, 300 мкл aEv6-Fc (3 мг/мл)

aEv6-Fc (900 мкг). Затем, спустя 1 и 2 дня, определяли присутствие rVSV-GP в мозгу, печени, почках, селезенке, кишечнике и крови зараженных мышей, используя культуру клеток Vero Е6. Результаты эксперимента показаны в *табл. 2*. В тканях и органах иммуносупрессированных мышей, не зараженных rVSV-GP (отрицательный контроль), признаки присутствия вируса не обнаружены. У животных второй группы (иммуносупрессированные мыши,

инфицированные rVSV-GP) вирус обнаружен в крови, печени, почках, селезенке в первый день после его введения. На второй день титр rVSV-GP стал значительно больше в крови и печени, в то время как в органах и тканях мышей, которым rVSV-GP вводили вместе с антителами aEv6-Fc (группа 3), вирус не был обнаружен.

Таким образом, экспериментальные данные подтверждают, что антитело aEv6-Fc обладает ви-

Таблица 2. Титры rVSV-GP в некоторых органах инфицированных мышей

Группа	День после введения	Средние титры rVSV-GP (две мыши), БОЕ/20 мкг органа					
		кровь	мозг	печень	почка	селезенка	кишечник
Интактные иммуносупрессированные мыши	1	–	–	–	–	–	–
	2	–	–	–	–	–	–
Иммуносупрессированные мыши, инфицированные rVSV-GP	1	$4.44 \times 10^5$	–	$6.67 \times 10^4$	$4.14 \times 10^4$	$3.65 \times 10^4$	–
	2	$1.7 \times 10^7$	–	$1.27 \times 10^5$	$2.44 \times 10^4$	$3.44 \times 10^4$	–
Иммуносупрессированные мыши, получившие rVSV-GP+aEv6-Fc	1	–	–	–	–	–	–
	2	–	–	–	–	–	–

Таблица 3. Иммуногенные свойства клонов aEv2, aEv3, aEv6 и aEv7

Клон	Титры к EBOV GP, нг/мл	Константа аффинности ( $K_D$ ) к EBOV GP, М	Вируснейтрализующая активность в отношении rVSV-GP (PRNT50)
aEv2	Не менее 1000	$7.13 \times 10^{-7}$	Не вируснейтрализующий
aEv3	Не менее 500	$5.53 \times 10^{-8}$	Не менее 400 нг/мл
aEv6	Не менее 50	$1.87 \times 10^{-10}$	Не вируснейтрализующий
aEv7	Не менее 500	$2.4 \times 10^{-8}$	Не вируснейтрализующий

руснейтрализующей и протективной активностью в отношении летальной инфекции rVSV-GP у иммуносупрессированных мышей.

**ОБСУЖДЕНИЕ**

В нашей работе впервые показана возможность получения наноантитела, слитого с Fc-фрагментом IgG1 человека, которое обладает вируснейтрализующей и защитной активностью против вируса везикулярного стоматита, псевдотипированного белком GP вируса лихорадки Эбола. Кроме того, при помощи иммунизации альпака рекомбинантным аденовирусом Ad5-GP впервые получена панель наноантител, специфичных к EBOV GP. Эту стратегию иммунизации успешно использовали ранее для получения моноклональных антител с защитной активностью против вируса лихорадки Эбола [9]. Таким образом получены четыре клон наноантител (aEv2, aEv3, aEv6 и aEv7), обладающих характеристиками, приведенными в табл. 3.

Анализируя данные, представленные в табл. 3, можно заключить, что результаты трех независимых экспериментов полностью коррелируют друг с другом. Согласно полученным данным, клон aEv6 показал наибольшую аффинность к EBOV GP и вируснейтрализующую активность в отношении rVSV-GP, поэтому этот клон был выбран для дальнейшего изучения.

Далее клон aEv6 модифицировали Fc-фрагментом IgG1 человека, увеличивающим массу наноан-

титела до 40–45 кДа, димеризующим молекулу, а также позволяющим взаимодействовать с Fc-рецепторами на поверхности клеток [21]. Эта модификация увеличила циркуляцию антитела aEv6-Fc в крови нечеловеческих приматов до 7 дней, тогда как циркуляция первичных наноантител составляет, как правило, несколько часов [20, 23, 24]. Мы использовали нечеловеческих приматов, исходя из наибольшей гомологии их иммунной системы и Fc-рецепторов с человеческими. Улучшение фармакокинетики антител является важным аспектом, позволяющим значительно уменьшить дозу и количество инъекций препарата при терапии вирусных заболеваний. Кроме того, модифицированное антитело aEv6-Fc имело сопоставимый уровень специфической активности в ИФА с антителом MAб114 (рис. 4А), обладающим протективной активностью в отношении вируса лихорадки Эбола [25], и более выраженную вируснейтрализующую активность по сравнению с MAб114 (рис. 4Б), а также по сравнению с немодифицированной Fc-фрагментом формой антитела.

Последним этапом исследования стало изучение протективной активности aEv6-Fc на модели летальной инфекции мышей вирусом везикулярного стоматита, псевдотипированного EBOV GP. Эта модель разработана нами во избежание необходимости работы с природным вирусом лихорадки Эбола и использования нечеловеческих приматов (дорогостоящего и нежелательного по этическим со-

ображениям [22]). Доза препарата (50 мг/кг) была выбрана, исходя из опубликованных данных [25]. Экспериментально показано, что антитело аЕv6-Fc полностью защищало мышей при предынкубации с вирусом и при смешивании с вирусом перед инъекцией, а также обладало 30% защитой, если его вводили не позже 2 ч после заражения вирусом. Таким образом, антитело аЕv6-Fc может проявлять протективную активность в режиме профилактики и экстренной терапии непосредственно после предполагаемого контакта с возбудителем. Детальный анализ накопления rVSV-GP в органах и тканях инфицированных мышей выявил наибольшее количество вируса в крови, печени, почках и селезенке, тогда как в мозге и кишечнике rVSV-GP не обнаружен. Полученные данные могут быть связаны с псевдотипированием вируса везикулярного стоматита гликопротеином EBOV GP, который, по-видимому, изменяет тропизм вируса. Изменения в тропизме rVSV, в свою очередь, могут объяснять накопление вируса в почках, селезенке, особенно

в печени и крови, что, по-видимому, вызывает полиорганную недостаточность и гибель животных на второй день после инфицирования. Важно отметить, что в органах и тканях мышей, инфицированных rVSV-GP, инкубированным с аЕv6-Fc, вирус не обнаружили, что еще раз подтверждает вируснейтрализующую и протективную активность антитела.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данном исследовании впервые показана принципиальная возможность получения наноантител и их модификаций, специфичных к поверхностному гликопротеину вируса лихорадки Эбола и обладающих выраженной противовирусной активностью в летальной модели мышей, инфицированных псевдотипированным вирусом везикулярного стоматита. ●

*Мы благодарим А.И. Смирнова (владелец фермы «Русские Альпаки») за предоставление альпака для нашего исследования.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Siragam V., Wong G., Qiu X. // Zool. Res. 2018. V. 39. № 1. P. 15–24.
- Zhu W., Banadyga L., Emeterio K., Wong G., Qiu X. // Viruses. 2019. V. 11. № 11. e999.
- Qiu X., Fernando L., Melito P.L., Audet J., Feldmann H., Kobinger G., Alimonti J.B., Jones S.M. // PLoS Neglected Tropical Diseases. 2012. V. 6. № 3. e1575
- Qiu X., Audet J., Wong G., Pillet S., Bello A., Cabral T., Strong J.E., Plummer F., Corbett C.R., Alimonti J.B., et al. // Sci. Transl. Med. 2012. V. 4. № 138. P. 138ra81.
- ECDC. Ebola outbreak in the Democratic Republic of the Congo – ongoing. URL: <https://ecdc.europa.eu/en/ebola-virus-disease-outbreak-democratic-republic-congo-ongoing> (accessed August 9, 2019).
- Moekotte A.L., Huson M.A., van der Ende A.J., Agnandji S.T., Huizenga E., Goorhuis A., Grobusch M.P. // Expert Opin. Investigat. Drugs. 2016. V. 25. № 11. P. 1325–1335.
- Corti D., Misasi J., Mulangu S., Stanley D.A., Kanekiyo M., Wollen S., Ploquin A., Doria-Rose N.A., Staube R.P., Bailey M., et al. // Science. 2016. V. 351. P. 1339–1342. Suppl. Materials.
- Hoenen T., Groseth A., Feldmann H. // Nat. Rev. Microbiol. 2019. V. 17. № 10. P. 593–606.
- Shcheblyakov D., Esmagambetov I., Simakin P., Kostina L., Kozlov A., Tsibezov V., Grebennikova T., Chifanov D., Rumyantseva I., Boyarskaya N., et al. // Antiviral Res. 2019. V. 172. e104617.
- Dolzhiyeva I.V., Zubkova O.V., Tikhvatulin A.I., Dzhazullaeva A.S., Tikhvatulina N.M., Shcheblyakov D.V., Shmarov M., Tokarskaya E., Simakova Y., Egorova D., et al. // Human Vaccines Immunotherapeutics. 2017. V. 13. № 3. P. 613–620.
- Wu Y., Jiang S., Ying T. // Front. Immunol. 2017. V. 8. P. e1802.
- De Vlioger D., Ballegeer M., Rossey I., Schepens B., Saelens X. // Antibodies (Basel). 2018. V. 8. № 1. e1.
- Liu J.L., Shriver-Lake L.C., Anderson G.P., Zabetakis D., Goldman E.R. // Microbial Cell Factories. 2017. V. 16. № 1. e223.
- Darling T.L., Sherwood L.J., Hayhurst A. // Front. Immunol. 2017. V. 8. e1197.
- Sherwood L.J., Hayhurst A. // PLoS One. 2013. V. 8. № 4. e61232.
- Brunton B., Rogers K., Phillips E.K., Brouillette R.B., Bouls R., Butler N.S., Maury W. // PLoS Neglected Tropical Diseases. 2019. V. 13. № 6. e0006983.
- Marathe B.M., Mostafa H.H., Vogel P., Pascua P.N.Q., Jones J.C., Russell C.J., Webby R.J., Govorkova E.A. // Antiviral Res. 2017. V. 148. P. 20–31.
- Shcherbinin D.N., Esmagambetov I.B., Noskov A.N., Selyaninov Y.O., Tutykhina I.L., Shmarov M.M., Logunov D.Yu., Naroditsky B.S., Gintsburg A.L., et al. // Acta Naturae. 2014. V. 6. № 1. P. 76–84.
- Godakova S.A., Noskov A.N., Vinogradova I.D., Ugriumova G.A., Solovyev A.I., Esmagambetov I.B., Tikhvatulin A.I., Logunov D.Y., Naroditsky B.S., Shcheblyakov D.V. // Toxins (Basel). 2019. V. 11. № 8. e464.
- Cortez-Retamozo V., Lauwereys M., Hassanzadeh Gh.G., Gobert M., Conrath K., Muyldermans S., De Baetselier P., Revets H. // Internat. J. Cancer. 2002. V. 98. № 3. P. 456–462.
- Harmsen M.M., van Solt C.B., Fijten H.P., van Setten M.C. // Vaccine. 2005. V. 23. № 41. P. 4926–4934.
- St Claire M., Ragland D., Bollinger L., Jahrling P. // Comp. Med. 2017. V. 67. № 3. P. 253–262.
- Huston J.S., George A.J., Adams G.P., Stafford W.F., Jamar F., Tai M.S., McCartney J.E., Oppermann H., Heelan B.T., Peters A.M., et al. // Quarterly J. Nucl. Med. Mol. Imaging. 1996. V. 40. P. 320–333.
- Batra S.K., Jain M., Wittel U.A., Chauhan S.C., Colcher D. // Curr. Opin. Biotechnol. 2002. V. 13. P. 603–608.
- WHO. WHO R&D Blueprint – Ad-hoc Expert Consultation on clinical trials for Ebola Therapeutics. Appendix 4. URL: <https://www.who.int/ebola/drc-2018/treatments-approved-for-compassionate-use-update/en/> (accessed January, 2020).



УДК 617.51/.53-006.61:576.322:577.2

# Актинсвязывающие белки системного кровотока при раке гортани: связь с циркулирующими опухолевыми клетками и клетками иммунной системы

Г. В. Какурина\*, М. Н. Стахеева, И. А. Бахронов, Е. Е. Середа, О. В. Черемисина, Е. Л. Чойнзонов, И. В. Кондакова

Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, 634050 Россия

\*E-mail: kakurinagv@oncology.tomsk.ru

Поступила в редакцию 13.04.2021

Принята к печати 30.07.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11413

**РЕФЕРАТ** Рассмотрена перспективность использования актинсвязывающих белков (АСБ), циркулирующих в системном кровотоке, в качестве дополнительных прогностических факторов опухолевого заболевания. Оценка связи циркулирующих АСБ с их возможными клеточными источниками в системном кровотоке поможет определить их диагностическую ценность. С этой целью уровень АСБ, циркулирующих в кровотоке, сопоставлен с количеством АСБ в лейкоцитах и опухолевых клетках (ЦОК), циркулирующих в крови больных высокоагрессивным плоскоклеточным раком гортани. Уровень циркулирующих АСБ (кофилина (CFL1), профилина (PFN1), эзрина (EZR), фасцина (FSCN1) и белка 1, ассоциированного с аденилилциклазой (CAP1)) определяли с использованием иммуноферментного анализа. Экспрессию АСБ в клеточных пулах анализировали методом проточной цитофлуориметрии. В сыворотке крови больных раком гортани наиболее представлены белки FSCN1 и EZR. Лейкоциты и ЦОК различались уровнем экспрессии АСБ. Лейкоциты были в основном представлены пулами CAP1+ и FSCN1+, ЦОК – субпопуляциями CAP1+, FSCN1+ и EZR+. Уровень FSCN1 в сыворотке коррелировал с количеством лейкоцитов FSCN1+ и CFL1+. Возможно, уровень EZR в циркуляции связан с его экспрессией в ЦОК, а уровень CFL1 и PFN1 поддерживается их экспрессией лейкоцитами. Источником FSCN1 и CAP1 в крови могут быть как ЦОК, так и лейкоциты. Выявленные закономерности могут быть обусловлены тканевой специфичностью плоскоклеточного рака гортани и/или отражать иммунный ответ на опухолевый рост в целом.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** актинсвязывающие белки, циркулирующие опухолевые клетки, лейкоциты, плоскоклеточный рак гортани.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** РГ – плоскоклеточный рак гортани; АСБ – актинсвязывающие белки; ЦОК – циркулирующие опухолевые клетки; CAP1 – белок 1, ассоциированный с аденилилциклазой; CFL1 – кофилин 1; PFN1 – профилин 1; EZR – эзрин; FSCN1 – фасцин 1.

## ВВЕДЕНИЕ

Основной причиной смертности онкологических больных считается метастазирование. Изучение биологических процессов, связанных с метастазированием, важно для поиска прогностических маркеров опухолевой прогрессии [1]. Активно ведутся исследования по профилированию протеома сыворотки/плазмы крови онкологических больных с помощью масс-спектрометрических методов.

Плоскоклеточный рак гортани (РГ) – один из агрессивных типов рака, что делает его хорошей моделью для изучения механизмов метастазирования [2–4]. Ранее мы выявили различия в составе протеома сыворотки крови больных РГ и здоровых доноров, а также связь нескольких функционально различных белков, в том числе актинсвязывающего белка CAP1 (белок 1, ассоциированный с аденилилциклазой) [4], с метастазированием РГ.

Актинсвязывающие белки (АСБ) координируют перестройку актинового цитоскелета, которая тесно связана с метастазированием. Достаточно широко исследуется уровень АСБ в опухолях [5–7], АСБ, циркулирующие в системном кровотоке (цАСБ), изучены недостаточно. Ранее обнаружено изменение сывороточных уровней САР1, профилина 1 и фасцина 1 у больных РГ со стадией Т3-4N0-1M0 по сравнению с Т1N0M0 [8]. Уровень цАСБ в системном кровотоке, вероятно, может поддерживаться несколькими источниками, в том числе иммунными и циркулирующими опухолевыми клетками (ЦОК). Связь между цАСБ и их возможными клеточными источниками в системном кровотоке практически не изучена. Поэтому в настоящей работе уровень цАСБ в сыворотке крови сопоставлен с их экспрессией в популяциях лейкоцитов и ЦОК системного кровотока с целью определения связи между этими показателями. В качестве модели агрессивного типа опухоли с высокой вероятностью метастазирования использовали образцы периферической крови больных РГ.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Материал и характеристика групп

В исследование вошли 13 больных РГ, стадии Т2-4N0-2M0 (Т2-4N0M0 – четыре человека, Т2-4N1-2M0 – девять), с морфологически верифицированным диагнозом, которые не получали противоопухолевого лечения. Средний возраст больных составил 57 (52–63) лет. Сыворотку крови для иммуноферментного анализа получали по утвержденному протоколу и хранили при  $-80^{\circ}\text{C}$ . При проведении проточной цитофлуориметрии использовали образцы свежесобранной крови. Все манипуляции проведены при условии добровольного участия и конфиденциальности в соответствии с Хельсинкской декларацией Всемирной медицинской ассоциации «Этические принципы проведения научных медицинских исследований с участием человека» с поправками 2000 года. Исследование разрешено этическим комитетом НИИ онкологии ТНИМЦ. Все участники исследования подписали информированное согласие.

### Методы исследования

Анализ цАСБ периферической крови проводили с помощью иммуноферментного метода на микропланшетном ридере Multiscan FC (Thermo Fisher Scientific, США) согласно инструкции к наборам. Использовали наборы ELISA (Cloud-Clone Corp.): САР1 (SEB349Hu), PFN1 (SEC233Hu), CFL1 (SEB559Hu), FSCN1 (EB757Hu), EZR (SEB297Hu).

Экспрессию АСБ в лейкоцитах и ЦОК анализировали методом проточной цитофлуориметрии на цитофлуориметре BD FACS Canto II (BD, США). Общий пул лейкоцитов и популяции ЦОК идентифицировали, используя мечение клеток крови специфическими флуоресцентными маркерами CD45 (AF700 (BD)) и EpCAM (PerCPCy5.5 (BD)) соответственно. Экспрессию АСБ в клеточных пулах оценивали с использованием моноклональных антител мыши против эзрина (pY353) человека, конъюгированных с AF488 (BD); поликлональных антител кролика против CFL1 человека, конъюгированных с APC (Cloud-Clone Corp); поликлональных антител кролика против PFN1 человека, конъюгированных с AF647 (Cloud-Clone Corp); поликлональных антител кролика против FSCN1 человека, конъюгированных с PE (Biorbyt); неконъюгированных моноклональных антител кролика против САР1 человека (Abcam, Великобритания); козьих антител против антител кролика, конъюгированных с AF488 (Abcam) в качестве вторых антител для САР1. Стратегия гейтирования включала этапы разделения клеток крови на CD45+ клетки (лейкоциты) и CD45- клетки. Из гейта CD45+ лейкоцитов выделяли гейты САР1+, EZR+, PFN1+, CFL1+, FSCN1+ клеток и определяли их количество в процентах от общего пула лейкоцитов. Из гейта CD45- клеток выделяли CD326 (EpCAM)+ клетки, принимая их за циркулирующие опухолевые клетки, из ЦОК CD326 (EpCAM)+ последовательно выделяли названные выше популяции и оценивали их количество в пуле ЦОК. Результаты выражали как % CD45+ и EpCAM+ клеток, экспрессирующих указанные АСБ.

### Статистический анализ

Данные обрабатывали с помощью программы IBM SPSS Statistics 22.0. Существование связи и ее силу оценивали с использованием коэффициента ранговой корреляции Спирмена ( $r$ ). Результаты представлены в виде Me (Q1; Q3), где Me – медиана, Q1 и Q3 – нижний и верхний квартили. Статистически значимыми считали различия при  $p \leq 0.05$ .

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

С помощью иммуноферментного анализа мы определили содержание цАСБ в сыворотке крови больных РГ. Наибольшими были уровни FSCN1 и EZR, медианы которых составили 1.8 (0.43–8.1) и 2.1 (1.69–2.56) нг/мл соответственно, наименьшими – САР1, затем PFN1 и CFL1, медианы которых составили 0.11 (0.08–1.15), 0.28 (0.23–0.38) и 0.78 (0.63–1.14) нг/мл соответственно. Разброс со-

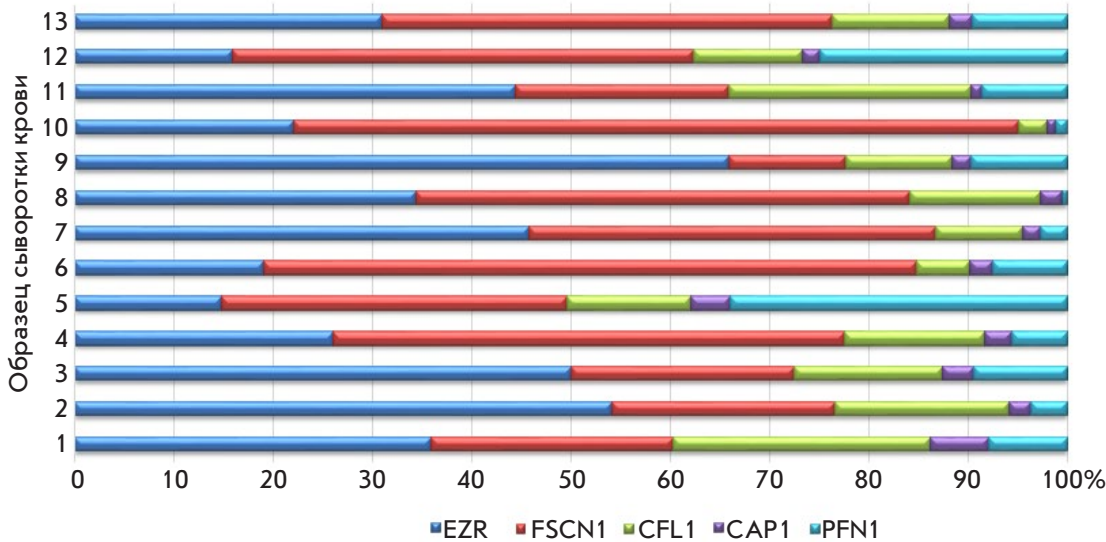


Рис. 1. Уровни циркулирующих актинсвязывающих белков в сыворотке крови больных плоскоклеточным раком гортани. По оси ординат – образцы сыворотки крови, взятые у больных РГ, по оси абсцисс – относительное количество актинсвязывающих белков, в % от суммарного содержания цАСБ, принятого за 100%

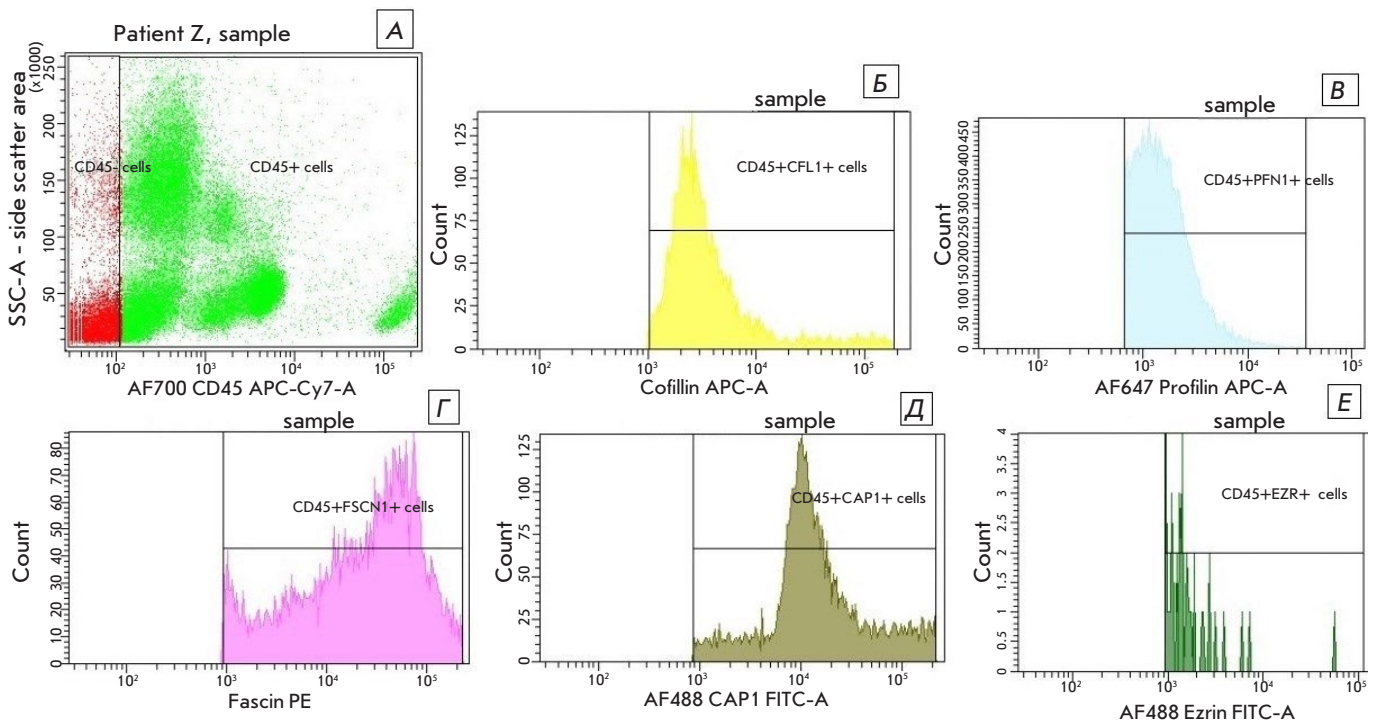


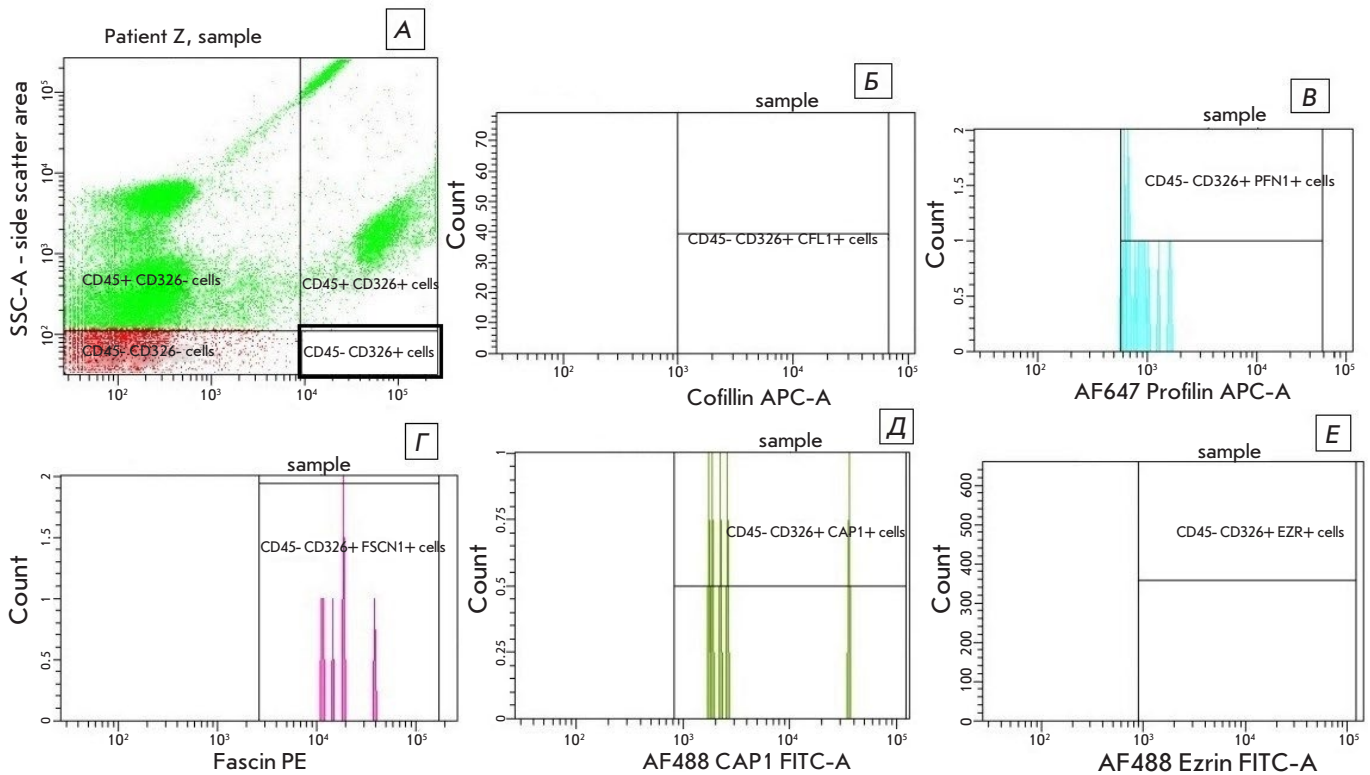
Рис. 2. Относительное количество лейкоцитов, экспрессирующих актинсвязывающие белки CD45+, у больных раком гортани. А – гейты CD45- и CD45+ клеток периферической крови. Гистограммы содержания актинсвязывающих белков в CD45+ клетках: Б – уровень CD45+ клеток, содержащих CFL1; В – уровень PFN1-содержащих CD45+ клеток; Г – уровень FSCN1-содержащих CD45+ клеток; Д – уровень CAP1-экспрессирующих и Е – уровень EZR-содержащих CD45+ клеток

держания каждого из этих белков в сыворотке крови больных РГ представлен на рис. 1.

Далее определено содержание АСБ в пулах ЦОК (CD45-CD326+) и лейкоцитов (CD45+CD326-) в цельной крови больных РГ. На представленной выборке больных РГ показано, что медиана уровня ЦОК CD45-CD326+ составила 0.006 (0.00–0.1) %

от всех клеточных элементов крови (на 50000 клеток крови). Выявлены различия в относительном содержании всех АСБ в популяциях ЦОК CD45-CD326+ и CD45+ лейкоцитов (рис. 2, 3).

Относительное количество CD45-CD326+ ЦОК и CD45+ лейкоцитов, экспрессирующих АСБ, у больных РГ представлено в таблице. У больных РГ ЦОК



**Рис. 3.** Относительное количество содержащих актинсвязывающие белки опухолевых клеток (CD45-CD326+), циркулирующих в периферической крови больных раком гортани. А – гейт CD45-CD326+ клеток (ЦОК) периферической крови. Гистограммы содержания актинсвязывающих белков в ЦОК: Б – уровень ЦОК, содержащих CFL1; В – уровень PFN1-содержащих ЦОК; Г – уровень FSCN1-содержащих ЦОК; Д – уровень CAP1-экспрессирующих и Е – уровень EZR-содержащих ЦОК

CD45-CD326+ в основном представлены субпопуляциями FSCN1+ и CAP1+, медиана которых составила 91.8 (87.2–100) и 87.0 (61.5–100) % соответственно. Снижено содержание ЦОК CD45-CD326+, экспрессирующих PFN1 и CFL1: 0.2 (0.0–0.5) и 0.3 (0.0–0.5) % соответственно. Популяция CD45+ лейкоцитов представлена в основном CAP1+ и FSCN1+ клетками: 45.3 (4.6–55.3) и 34.5 (31.3–72.1) % соответственно. Понижено содержание субпопуляции EZR+ CD45+ лейкоцитов, доля которой составила 0.3 (0.14–0.91) %. EZR экспрессировался в основном ЦОК – 51.5 (39.3–85.4) %.

Анализ взаимосвязей уровня цАСБ и количества клеточных субпопуляций, экспрессирующих соответствующий белок, выявил связи средней силы. Так, уровень циркулирующего FSCN1 коррелировал с количеством FSCN+ и CFL1+ субпопуляциями CD45+ лейкоцитов ( $r = 0.7$ ;  $p = 0.03$ ). Также в кровотоке больных РГ выявлены связи между изучаемыми пулами, экспрессирующими АСБ. Отмечена отрицательная связь между пулом CD45-CD326+ лейкоцитов, содержащих FSCN+, и CD45+ лейкоцитами, содержащими FSCN+ ( $r = -0.7$ ;  $p = 0.01$ )

Уровень актинсвязывающих белков (АСБ) в сыворотке крови, относительное количество CD45-CD326+ циркулирующих опухолевых клеток и CD45+ лейкоцитов, экспрессирующих актинсвязывающие белки, у больных плоскоклеточным раком гортани

цАСБ	Лейкоциты, CD45+, %	ЦОК, CD45-CD326+, %	Сыворотка крови, нг/мл
EZR	0.6 (0.3–1.0)	51.5 (39.3–85.4)	1.2 (0.9–1.7)
FSCN1	34.5 (31.3–72.1)	91.8 (87.2–100)	1.5 (0.8–2.2)
CFL1	12.0 (8.5–39.1)	0.3 (0.0–0.5)	0.5 (0.3–0.6)
CAP1	45.3 (4.6–55.3)	87.0 (61.5–100)	0.10 (0.06–0.14)
PFN1	5.7 (4.0–13.2)	0.2 (0.0–0.5)	0.2 (0.1–0.4)

и CFL1+ ( $r = -0.7$ ;  $p = 0.03$ ). Обнаружена положительная связь между CAP1+ CD326+ и CAP1+ CD45+ ( $r = 0.7$ ;  $p = 0.02$ ). На уровне лейкоцитарного пула выявлена связь между EZR+ и CFL1+ CD45+ лейкоцитами.



В настоящей работе показано, что содержание белков FSCN1 и EZR в системном кровотоке больных РГ было выше, чем других цАСБ. Установлено, что лейкоциты и ЦОК в периферической крови различаются экспрессией АСБ. Выявлена связь между сывороточным уровнем FSCN1 и количеством FSCN- и CFL1-содержащих CD45+ лейкоцитов. Отмечено, что в обеих клеточных популяциях была увеличена экспрессия CAP1 и FSCN1. Однако отмечены выраженные различия в содержании этих белков в ЦОК и лейкоцитах. Если практически все ЦОК содержали CAP1 и FSCN1, то доля CAP1+ и FSCN1+ лейкоцитов была ниже в 2 и 3 раза соответственно. В популяции CD45+ лейкоцитов практически отсутствовали клетки, содержащие EZR, в то время как доля EZR+ CD326+ составляла 51.5% от пула ЦОК. CFL1 и PFN1 содержались в лейкоцитах, но практически отсутствовали в ЦОК. Таким образом, опухолевые клетки, циркулирующие в крови больных РГ, могут экспрессировать несколько АСБ – EZR, CAP1 и FSCN1.

Сопоставляя результаты проточной цитофлуориметрии и иммуноферментного анализа, можно предположить, что присутствие EZR в циркуляции может быть связано с его наличием в ЦОК. Уровень циркулирующих в крови CFL1 и PFN1 поддерживается, вероятно, экспрессией этих белков лейкоцитами. Сывороточный уровень FSCN1 и CAP1 может быть связан как с ЦОК, так и с лейкоцитами.

Участие АСБ в патогенезе опухолевых заболеваний изучено в основном, исходя из результатов определения их тканевого уровня [7, 9, 10]. В качестве прогностического маркера опухолей

головы и шеи предложено использовать уровни фасцина в тканях опухолей этой локализации [https://www.proteinatlas.org; 11]. Итак, опубликованы результаты изучения АСБ в тканях новообразований, в которых наиболее вероятным и основным источником этих белков являются опухолевые клетки. Значение цАСБ при патологических состояниях, в том числе и при опухолях, изучено крайне мало. Например, показано, что внеклеточный гельзолин (pGSN) расщепляет актин, который может высвобождаться при повреждении клеток [12]. Вероятно, АСБ, изученные в представленной работе, также функционально активны в сыворотке крови, что может стать предметом следующих исследований.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящей работе впервые получены данные о связи функционально различных АСБ, циркулирующих в системном кровотоке, с популяциями ЦОК и иммунных клеток, экспрессирующих соответствующие белки при раке гортани. Выявленные связи и различия в содержании АСБ в ЦОК и лейкоцитах могут быть связаны как со специфичностью опухоли этой локализации, так и/или отражать иммунный ответ организма на опухолевый рост в целом. Для окончательных выводов необходимо продолжение работы с увеличением количества больных РГ и включением дополнительных клинико-морфологических параметров. ●

*Работа поддержана грантом  
РФФИ № 20-015-00151.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Гапонова А.В., Родин С., Мазина А.А., Волчков П.В. // Acta Naturae. 2020. Т. 12. № 3(46). С. 4–23. doi: 10.32607/actanaturae.11010
- Bhawal R., Oberg A.L., Zhang S., Kohli M. // Cancers (Basel). 2020. V. 12. № 9. P. 2428. doi:10.3390/cancers12092428
- Gasparri R., Sedda G., Noberini R., Bonaldi T., Spaggiari L. // Proteomics Clin. Appl. 2020. V. 14. № 5. P. 1900138. doi: 10.1002/prca.201900138
- Какурина Г.В., Кондакова И.В., Черемисина О.В., Шишкин Д.А., Чойнзонов Е.Л. // Бюл. эксп. биол. и мед. 2015. Т. 160. № 11. С. 648–651.
- Gross S.R. // Cell Adh Migr. 2013. V. 7. № 2. P. 199–213. doi: 10.4161/cam.23176
- Liu H., Cui J., Zhang Y., Niu M., Xue X., Yin H., Tang Y., Dai L., Dai F., Guo Y., et al. // IUBMB Life. 2019. V. 71. № 11. P. 1771–1784. doi: 10.1002/iub.2121
- Kakurina G.V., Kolegova E.S., Kondakova I.V. // Biochemistry (Moscow). 2018. V. 83. № 1. P. 45–53.
- Какурина Г.В., Шашова Е.Е., Черемисина О.В., Чойнзонов Е.Л., Кондакова И.В. // Сибирский онкологический журн. 2020. Т. 19. № 4. С. 88–93.
- Coumans J.V.F., Davey R.J., Moens P.D.J. // Biophys. Rev. 2018. V. 10. № 5. P. 1323–1335.
- Izdebska M., Zielińska W., Grzanka D., Gagat M. // BioMed. Res. Int. 2018. V. 2018. P. 4578373. doi: 10.1155/2018/4578373
- Papaspyrou K., Brochhausen C., Schmidtman I., Fruth K., Gouveris H., Kirckpatrick J., Mann W., Brieger J. // Oncol. Lett. 2014. V. 7(6). P. 2041–2046.
- Piktel E., Levental I., Durnaš B., Janmey P.A., Bucki R. // Int. J. Mol. Sci. 2018. V. 19. № 9. P. 2516.

УДК 577

# Ингибирование ERK по-разному влияет на дифференцировку клеток нейробластомы, астроцитомы и рабдомиосаркомы

Т. Д. Лебедев\*, Э. Р. Вагапова, В. С. Прасолов

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

\*E-mail: lebedevtd@gmail.com

Поступила в редакцию 24.05.2021

Принята к печати 02.08.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11461

**РЕФЕРАТ** Киназы ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) играют важную роль в таких процессах, как пролиферация, выживание и дифференцировка клеток. Нарушение активности этих ферментов может приводить к неконтролируемой пролиферации клеток, иммортализации и нарушению их дифференцировки, что считается одним из ключевых этапов злокачественного перерождения клеток. Нами изучена связь между активностью тирозинкиназ ERK в клетках нейробластомы SH-SY5Y, астроцитомы U-251 и рабдомиосаркомы TE-671 и такими основными чертами дифференцировки, как изменение морфологии клеток и экспрессии генов, кодирующих маркеры дифференцировки и рецепторы факторов роста. Активность ERK определяли с использованием репортерной системы, позволяющей проводить прижизненные измерения активности ERK в отдельных клетках. Показано, что подавление активности ERK с помощью селективных ингибиторов, в отличие от часто используемого индуктора дифференцировки – ретиноевой кислоты, вызывает существенные изменения морфологии клеток TE-671 и экспрессии генов-маркеров миогенной дифференцировки *PROM1*, *MYOG* и *PAX7*. Взаимосвязь между активностью ERK и морфологическими изменениями показана на уровне индивидуальных клеток. При этом дифференцировка клеток SH-SY5Y, индуцированная ретиноевой кислотой, не зависела от ERK. Показано, что ингибирование ERK повышает чувствительность клеток TE-671 к действию ростовых факторов EGF, IGF-1 и NGF предположительно за счет снижения базальной активности ERK и ростового фактора BDNF посредством увеличения экспрессии рецептора TrkB.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** дифференцировка клеток, злокачественные опухоли, ингибиторы ERK, ростовые факторы, флуоресцентный репортер.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ATRA – *all-trans* retinoic acid (третиноин); ERK – extracellular signal-regulated kinases; NGF – nerve growth factor (фактор роста нервов); BDNF – brain-derived neurotrophic factor (нейротрофический фактор мозга); EGF – epidermal growth factor (эпидермальный фактор роста); IGF-1 – insulin-like growth factor (инсулиноподобный фактор роста 1); EGFR – epidermal growth factor receptor (рецептор эпидермального фактора роста); IGF1R – insulin-like growth factor receptor (рецептор инсулиноподобного фактора роста 1); TrkA – tropomyosin receptor kinase A (нейротрофная рецепторная тирозинкиназа A); TrkB – tropomyosin receptor kinase B (нейротрофная рецепторная тирозинкиназа B); MYOG – myogenin (миогенин); FBS – fetal bovine serum (эмбриональная сыворотка крупного рогатого скота).

## ВВЕДЕНИЕ

Киназы ERK1/2 (extracellular signal-regulated kinases 1/2) играют ключевую роль в таких важнейших процессах, как пролиферация, выживание и дифференцировка клеток [1, 2]. При этом влияние активации ERK на эти процессы часто зависит от типа клеток, природы активирующего сигнала, его продолжительности и динамики активности ERK, что существенно затрудняет выявление конкретной роли ERK в кле-

точных процессах. Обычно активация ERK связана с сигналами выживания и пролиферации клеток [3]. Тем не менее, в зависимости от типа клеток ингибирование ERK может как стимулировать гибель клеток, так и препятствовать ей [4].

Появление различных репортерных систем, позволяющих отслеживать активность ERK в живых клетках, стимулировало развитие исследований в этой области [5–9]. Тем не менее, пока не суще-

ствуется общепринятой модели, описывающей влияние ERK на дифференцировку клеток. Известно, что ERK прямо блокирует активность таких факторов транскрипции, связанных с плюрипотентностью, как NANOG, OCT4, KLF2 и KLF4 [10, 11]. Снижение активности ERK, например, с помощью ингибиторов MEK, стимулирует самообновление эмбриональных стволовых клеток посредством блокирования ERK-зависимой дифференцировки [12]. При этом в ряде случаев ингибирование ERK стимулирует дифференцировку клеток, например, клеток нейроэктодермы или мезенхимальных стволовых клеток костного мозга [13, 14]. В процессе дифференцировки клеток важную роль играют многие ростовые факторы, такие, как FGF, NGF, PDGF, BDNF, EGF и IGF-1 [15, 16]. На поздних стадиях дифференцировки часто требуются определенные факторы роста, определяющие выживание дифференцированных клеток. При этом многие факторы роста действуют посредством активации ERK. Таким образом, активация ERK может по-разному влиять на процесс дифференцировки в зависимости от стадии и типа клеток.

Активность ERK повышена в большинстве злокачественных опухолей, в частности, за счет активирующих мутаций в сигнальном каскаде MAPK. При этом активирующие мутации в генах RAS блокируют дифференцировку эпидермальных клеток [17–19]. Изучение процессов дифференцировки злокачественных клеток необходимо для понимания процессов онкотрансформации клеток и разработки подходов к терапии опухолей. Так, подходы, основанные на стимуляции дифференцировки клеток с помощью ретиноевой кислоты, применяются в терапии нейробластом [20] и некоторых типов лейкозов [21]. Кроме того, ингибирование сигнального каскада RAS-MEK-ERK рассматривается как перспективный подход к терапии рабдомиосарком, астроцитом и нейробластом [22–24].

При тестировании эффективности ингибиторов ERK на клетках различной природы мы заметили морфологические изменения в некоторых типах клеток, схожие с изменениями, возникающими в процессе дифференцировки. В нашей работе с помощью репортерной системы, которая позволяет прижизненно измерять активность ERK в индивидуальных клетках, проведен количественный анализ взаимосвязи активности ERK и дифференцировки злокачественных клеток различной природы.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Клеточные культуры и препараты

Перевиваемые клетки рабдомиосаркомы TE-671, астроцитомы U-251, эмбриональные клетки почки

HEK293T культивировали в среде DMEM (Gibco, США), а клетки нейробластомы SH-SY5Y – в среде RPMI-1640 (Gibco), содержащей 10% эмбриональной сыворотки крупного рогатого скота (FBS), 100 ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 1 мМ пируват натрия, 2 мМ L-глутамин, при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Все клеточные линии подарены Heinrich-Pette Institute – Leibniz Institute for Experimental Virology (Гамбург, Германия). В работе использовали полностью *транс*-ретиноевую кислоту (R2625) и краситель ДНК Hoechst 33342 (14533) производства компании Sigma-Aldrich (США). Использовали ингибиторы ERK: SCH772984 (S7101), Ulixertinib (S7854) и VX-11e (S7709) производства компании Selleckchem (США). Все препараты были изначально разведены в ДМСО. Использовали также рекомбинантные факторы роста человека: EGF (ab179628), IGF-1 (ab9573), NGF (ab179616) и BDNF (ab206642) производства компании Abcam (Великобритания).

### Получение репортерных клеточных линий ERK-KTR

Лентивирусные частицы, направляющие экспрессию гена, кодирующего репортерный белок ERK-KTR, получены с помощью кальций-фосфатной трансфекции клеток HEK293T с использованием набора ProFection® Mammalian Transfection System (Promega, США, E1200). Использовали упаковывающие плазмиды третьего поколения pMDLg/pRRE, pRSV-Rev и плазмиду, кодирующую белок оболочки VSV-G. Лентивирусный вектор pLentiCMV Puro DEST ERKKTRClover получен из Addgene (#59150). Клетки TE-671, SH-SY5Y и U-251 после лентивирусной трансдукции отбирали на антибиотике пурамицине (Sigma-Aldrich, P7255) до получения более 80% клеток, позитивных по репортерному белку. После лентивирусной трансдукции проводили селекцию клеток TE-671, SH-SY5Y и U-251 на средах, содержащих пурамицин (0.5–2 мкг/мл), что позволило получить популяцию клеток, более 80% которых содержали репортерный белок.

### Программная обработка изображений клеток и расчет активности ERK и длины клеток

Микрофотографии клеток получали на автоматизированном флуоресцентном микроскопе Leica DMI8 (Германия). Изображения обрабатывали с помощью программного обеспечения CellProfiler 4. Для определения сегментации ядер, окрашенных красителем Hoechst 33342, использовали алгоритм бинаризации полутоновых изображений методом Оцу. Границы цитоплазмы определяли по наличию сигнала флуоресцентного репортера ERK-KTR, используя положение ядер для определения границ клеток с помо-

щью алгоритма бинаризации изображений Sauvola Thresholding. Для расчета длины цитоскелета и клеточных отростков сначала задавали тело клетки (область радиусов в 3–5 пикселей вокруг ядра), после чего проводили бинаризацию цитоскелета по наличию сигнала флуоресцентного репортера. Параметры бинаризации подбирали на всех этапах для каждого типа клеток. Неправильно распознанные клетки, устранение выбросов и артефактов, последующую обработку данных проводили с помощью оригинальных алгоритмов в Python 3.8. Используемые протоколы для CellProfiler доступны по ссылке: <https://github.com/CancerCellBiology/ActaNaturae-2021>.

### Измерение экспрессии генов

Суммарную РНК выделяли методом хлороформ-тризольной экстракции реагентом TRIzol (Thermo Scientific, США, 15596018) согласно протоколу производителя. Суммарную РНК (1 мкг) использовали для получения кДНК с помощью набора RevertAid First Strand cDNA Synthesis Kit (Thermo Scientific, K1622) согласно протоколу производителя. Экспрессию анализировали методом ПЦР в реальном времени с использованием набора qPCRMix-HS SYBR («Евроген», Россия, PK147L) на приборе Bio-Rad CFX96 (США). Результаты обрабатывали с помощью программного обеспечения Bio-Rad CFX Manager 3.1 и GraphPad Prism 9.1. Список праймеров приведен в *таблице*.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Создание клеточных линий, экспрессирующих репортер ERK-KTR

Роль ERK в дифференцировке клеток мы изучали на трех линиях злокачественных клеток различной природы, способных к дифференцировке *in vitro*: клетках нейробластомы SH-SY5Y, астроцитомы U-251 MG и рабдомиосаркомы TE-671. С помощью лентивирусной трансдукции клеток этих линий получены клетки, экспрессирующие репортер активности ERK – ERK-KTR (kinase translocation reporter) – химерный белок, состоящий из участка белка ELK1, с которым связываются киназы ERK1/2, сигналов ядерной локализации NLS (nuclear localization signal) и ядерного экспорта NES (nuclear extraction signal), а также зеленого флуоресцентного белка mClover [25]. Сигнал NLS в составе химерного белка активирован в отличие от NES, что обеспечивает преимущественно ядерную локализацию репортерного белка. Активированные киназы ERK1/2 попадают в ядро клетки, где связываются с участком белка ELK1 и фосфорилируют участки NLS и NES. Это приводит к активации сигнала экспорта из ядра

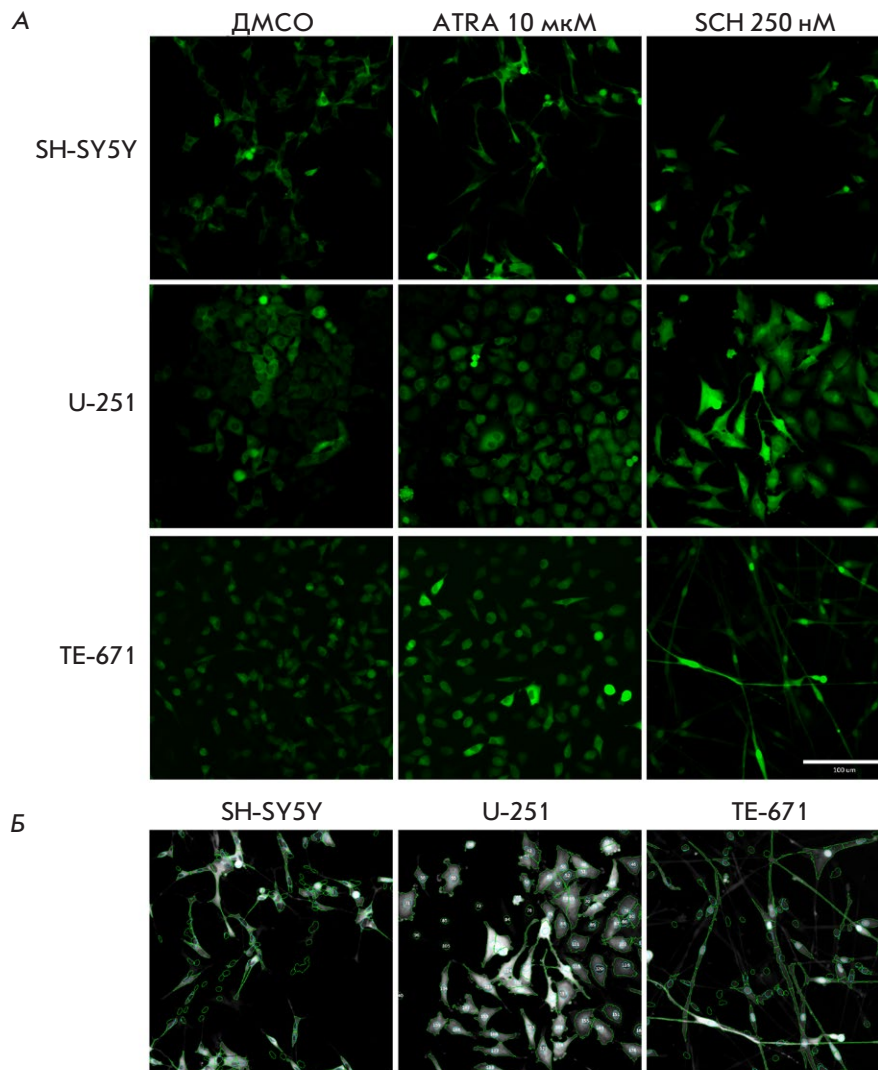
### Праймеры, использованные в ПЦР в реальном времени

Праймер	Нуклеотидная последовательность 5'→3'
GAPDH pr1	GAGCCCGCAGCCTCCCGCT
GAPDH pr2	GCGCCCAATACGACCAAAATC
PROM1 pr1	CCTGGTCCAACAGGGCTATC
PROM1 pr2	TCGTGGTTTGCGGTTGTA
RBFOX3 pr1	CAGACAGTGCCGCAGACAG
RBFOX3 pr2	TTCTCTGTAGGGTTCGGAGGG
TUBB3 pr1	ATGAGCATGGCATCGACCC
TUBB3 pr2	AGGCACGTACTTGTGAGAAGA
MYOG pr1	TCAGCTCCCTCAACCAGGAG
MYOG pr2	CCGTGAGCAGATGATCCCC
PAX7 pr1	CACTGTGACCGAAGCACTGT
PAX7 pr2	TCCAGCCGGTTCCCTTTGT
EGFR pr1	AGGAGAGGAGAACTGCCAGAA
EGFR pr2	TCTCGGAATTTGCGGCAGAC
IGF1R pr1	CATCCGACGGGGGAATAACA
IGF1R pr2	GCTGCAAGTTCTGGTTGTCG
NTRK1 pr1	CCATCCCTGACACTAACAGCA
NTRK1 pr2	GCACAAGGAGCAGCGTAGAA
NTRK2 pr1	CTGAACCAAGCACGGTTTCC
NTRK2 pr2	CAGGGGCAGAAACTCCAGAA

и деактивации сигнала ядерной локализации, в результате чего репортерный белок транспортируется из ядра в цитоплазму. В цитоплазме под действием клеточных фосфатаз репортерный белок дефосфорилируется и переходит обратно в ядро. В зависимости от уровня активности ERK устанавливается баланс в распределении репортерного белка в ядре и цитоплазме. Присутствие флуоресцентного белка в составе репортера позволяет оценить активность ERK по соотношению интенсивности сигнала от флуоресцентного белка в цитоплазме и ядре. Таким образом, репортер ERK-KTR позволяет прижизненно определять активность ERK в индивидуальных клетках с помощью флуоресцентного микроскопа.

Далее мы обработали клетки, экспрессирующие репортер ERK-KTR, ингибиторами ERK и полностью *транс*-ретиноевой кислотой (ATRA), которая широко используется для индукции дифференцировки клеток различных типов, а также в терапии нейробластомы. Для первоначального теста мы выбрали три ингибитора ERK, которые показали свою эффективность в клинических испытаниях: SCH772984, Ulixertinib и VX-11e. Клетки обрабатывали ингибиторами ERK (250 нМ) или ATRA (10 мкМ) в течение 72 ч, а затем делали фотографии на флуоресцентном микроскопе. Все ингибиторы существенно снизили активность ERK, что видно по изменению распределения флуоресцентного сигнала в ядре и цитоплазме (*рис. 1А*). Мы также заметили морфологические изменения клеток SH-SY5Y





**Рис. 1.** Клетки SH-SY5Y, U-251 и TE-671, экспрессирующие репортер ERK-KTR. А – фотографии клеток SH-SY5Y, U-251 и TE-671 через 72 ч после добавления 10 мкМ транс-ретиноевой кислоты (ATRA) или 250 нМ ингибитора ERK SCH772984 (SCH). Б – обработка фотографий клеток с помощью программного обеспечения CellProfiler 4. Фотографии приведены в градиенте серого. Зеленым выделены границы цитоплазмы клеток, синим – ядра клеток, определенные с помощью окрашивания красителем ДНК Hoechst 33342

под действием ATRA; TE-671 и U-251 – под действием ингибиторов ERK. Наиболее выраженные изменения вызывал препарат SCH772984 (рис. 1А). Наблюдаемые морфологические изменения включали удлинение клеточных отростков и цитоскелета в целом, особенно в клетках TE-671. Эти изменения похожи на описанные ранее морфологические изменения, характерные для дифференцировки клеток. Для численного анализа наблюдаемых изменений мы создали алгоритмы для программы CellProfiler 4, которые позволяют определить ядра клеток (предварительно окрашенные красителем Hoechst 33342) и цитоплазму каждой клетки по флуоресценции белка mClover (рис. 1Б). На основании медианных интенсивностей mClover в ядре и цитоплазме рассчитана активность ERK в отдельных клетках, а по форме цитоплазмы измерена длина цитоскелета клеток с учетом отростков. Такой алгоритм позволил оценить изменения средней активности ERK и длины цитоскелета при каждом воздействии,

а также сопоставить активность ERK и изменения длины цитоскелета в индивидуальных клетках.

#### Активность ERK связана с дифференцировкой клеток

Воздействие ретиноевой кислоты привело к снижению активности ERK в клетках всех трех линий: SH-SY5Y, U-251 и TE-671. Однако это снижение было менее выраженным по сравнению с действием ингибиторов ERK SCH772984, Ulixertinib и VX-11e (рис. 2А). При этом ретиноевая кислота вызвала удлинение отростков только у клеток нейробластомы SH-SY5Y. Индукция дифференцировки и, как следствие, удлинение клеточных отростков – хорошо известное действие ретиноевой кислоты на клетки нейробластомы. Ингибиторы ERK, в свою очередь, не вызывали удлинения цитоскелета клеток SH-SY5Y (рис. 2Б). Интересно, что в клетках U-251 и TE-671 мы наблюдали обратные эффекты. Так, ретиноевая кислота не влияла на длину клеток

TE-671 и даже уменьшала длину U-251. При этом ингибиторы ERK, особенно SCH772984, существенно увеличивали длину клеток TE-671 и U-251, в том числе за счет удлинения клеточных отростков (рис. 2Б). Стоит также отметить, что препарат SCH772984 оказался наиболее сильным ингибитором ERK (рис. 2А), и именно он наиболее сильно влиял на длину клеток U-251 и TE-671.

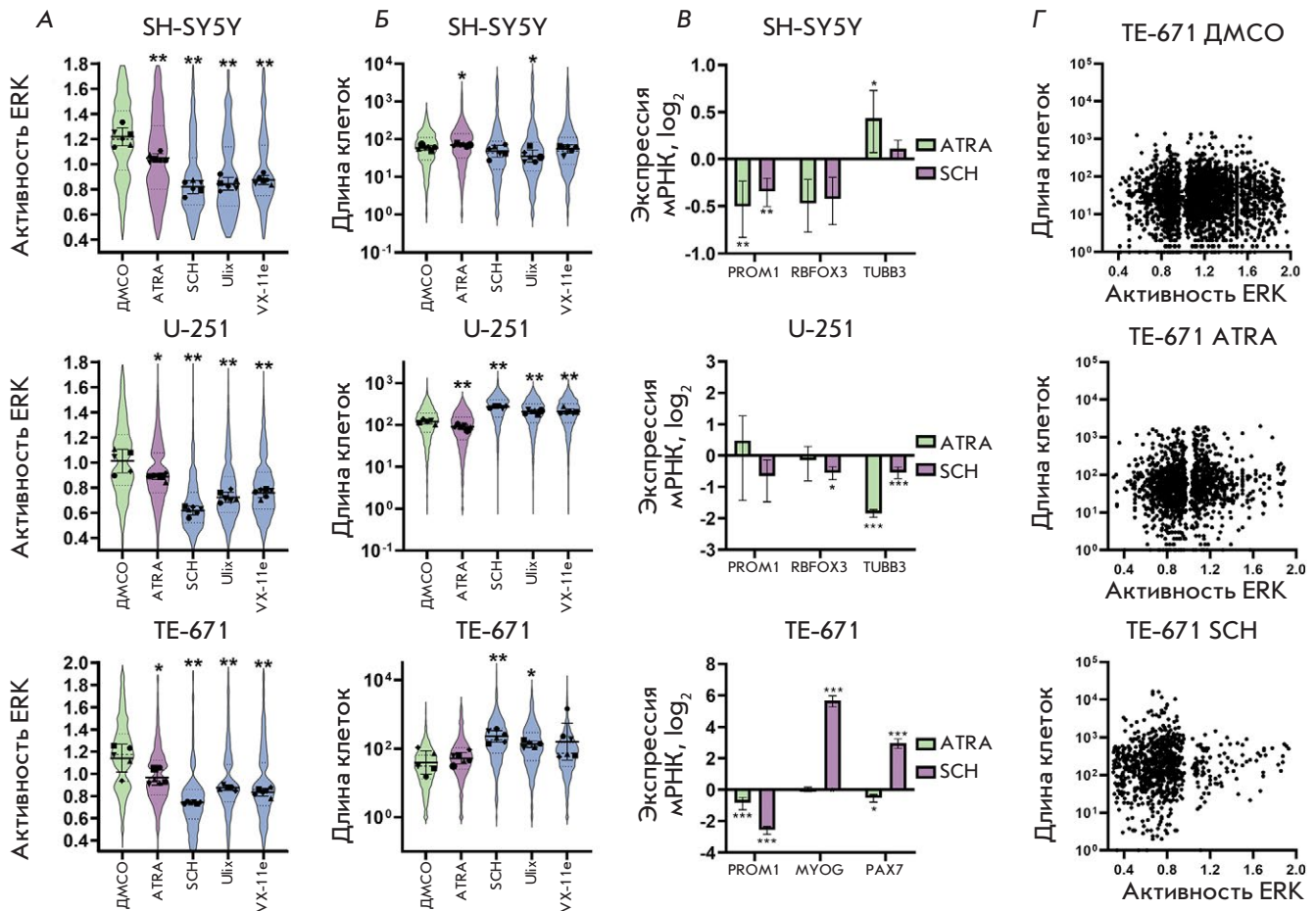
Чтобы проверить, связаны ли наблюдаемые морфологические изменения с дифференцировкой клеток, мы измерили экспрессию мРНК генов, кодирующих маркеры дифференцировки (рис. 2В). Мы измерили экспрессию гена *PROM1*, который кодирует белок CD133, во всех клетках. Экспрессия этого гена характерна для недифференцированных клеток, в том числе для злокачественных стволовых клеток нейробластомы, глиобластомы и недифференцированных клеток рабдомиосаркомы. Также мы выбрали гены, экспрессия которых может меняться при дифференцировке нейтральных клеток: *RBFOX3*, который кодирует белок NeuN [26, 27], а также ген  $\beta$ 3-тубулина *TUBB3* [27]. Поскольку известно, что клетки рабдомиосаркомы TE-671 могут дифференцироваться в мышечные клетки, то для анализа дифференцировки этих клеток мы выбрали ген миогенина *MYOG* и транскрипционного фактора *PAX7* [28]. Миогенин – это один из основных маркеров дифференцировки мышечных клеток, а фактор *PAX7* является важным регулятором ранней дифференцировки таких клеток. Нами обнаружен существенный рост экспрессии генов *MYOG* и *PAX7*, а также снижение экспрессии *PROM1* в клетках TE-671 после воздействия SCH772984. Ретиноевая кислота не вызвала заметных изменений в экспрессии данных генов. Отмечено также небольшое снижение экспрессии *PROM1* в клетках U-251, обработанных SCH772984, и снижение экспрессии *TUBB3* после воздействия ретиноевой кислоты. В клетках SH-SY5Y не обнаружено существенных изменений экспрессии генов. Интересно, что клетки TE-671, длина которых под действием SCH772984 увеличилась наиболее сильно, имели низкую активность ERK (рис. 2Г). Эти данные указывают на существование связи между активностью тирозинкиназы ERK и дифференцировкой клеток TE-671 на уровне как всей популяции, так и индивидуальных клеток.

### Ингибирование ERK меняет экспрессию рецепторов ростовых факторов

Как ингибитор ERK SCH772984 и ретиноевая кислота влияют на чувствительность клеток к ростовым факторам? Чтобы понять это, мы обработали клетки препаратами в течение 72 ч, а затем отмыли от культуральной среды, содержащей препараты, и добавили

к клеткам среду без сыворотки, поскольку содержащиеся в сыворотке ростовые факторы могут сильно влиять на активность ERK. Через 12 ч после смены среды к клеткам добавляли ростовые факторы в концентрации 100 нг/мл. Мы выбрали факторы роста, которые могут активировать ERK в клетках различной природы, участвуют в нейтральной или миогенной дифференцировке и могут стимулировать выживание клеток: эпидермальный фактор роста (EGF) [29], инсулиноподобный фактор роста 1 (IGF-1) [30], фактор роста нервов (NGF) [15, 31] и нейротрофический фактор мозга BDNF [15]. Все ростовые факторы значительно активировали ERK в клетках нейробластомы SH-SY5Y, в том числе после индукции дифференцировки клеток ретиноевой кислотой и обработки клеток ингибитором ERK SCH772984 (рис. 3А). Ростовые факторы также активировали ERK в контрольных клетках астроцитомы U-251 (обработанных только ДМСО) и клетках, обработанных SCH772984 (рис. 3А). Однако обработка клеток U-251 ретиноевой кислотой привела к менее выраженному эффекту EGF, IGF-1 и BDNF. Интересно, что мы не обнаружили статистически значимого влияния ростовых факторов на контрольные клетки TE-671 и клетки, обработанные ретиноевой кислотой. Дифференцировка клеток TE-671, вызванная SCH772984, сделала клетки чувствительными ко всем факторам роста. Важно отметить, что недифференцированные клетки TE-671 в среде без сыворотки имели высокую активность ERK, сравнимую с активностью в присутствии сыворотки, тогда как после обработки ингибитором ERK в течение 72 ч базальная активность ERK была значительно ниже. Возможно, что изначально высокая базальная активность ERK в TE-671 не позволяет выявлять значимые изменения активности ERK под действием ростовых факторов. Тем не менее, даже после продолжительного воздействия ингибитора ERK SCH772984 все клетки либо сохранили, либо приобрели способность реагировать на действие факторов роста (рис. 3А).

Поскольку действие факторов роста может зависеть как от базальной активности ERK, так и от изменения представленности рецепторов факторов роста в ходе дифференцировки, мы измерили изменение экспрессии мРНК рецепторов. С этой целью выбрали гены *NTRK1* и *NTRK2*, кодирующие основные рецепторы использованных факторов роста NGF и BDNF (TrkA и TrkB); *IGF1R*, кодирующий рецептор IGF-1; и *EGFR*, кодирующий рецептор EGF. Экспрессия гена *NTRK2* – одного из основных маркеров дифференцировки клеток нейробластомы, существенно увеличилась в клетках SH-SY5Y под действием ретиноевой кислоты (рис. 3Б). Аналогичные изменения экспрессии

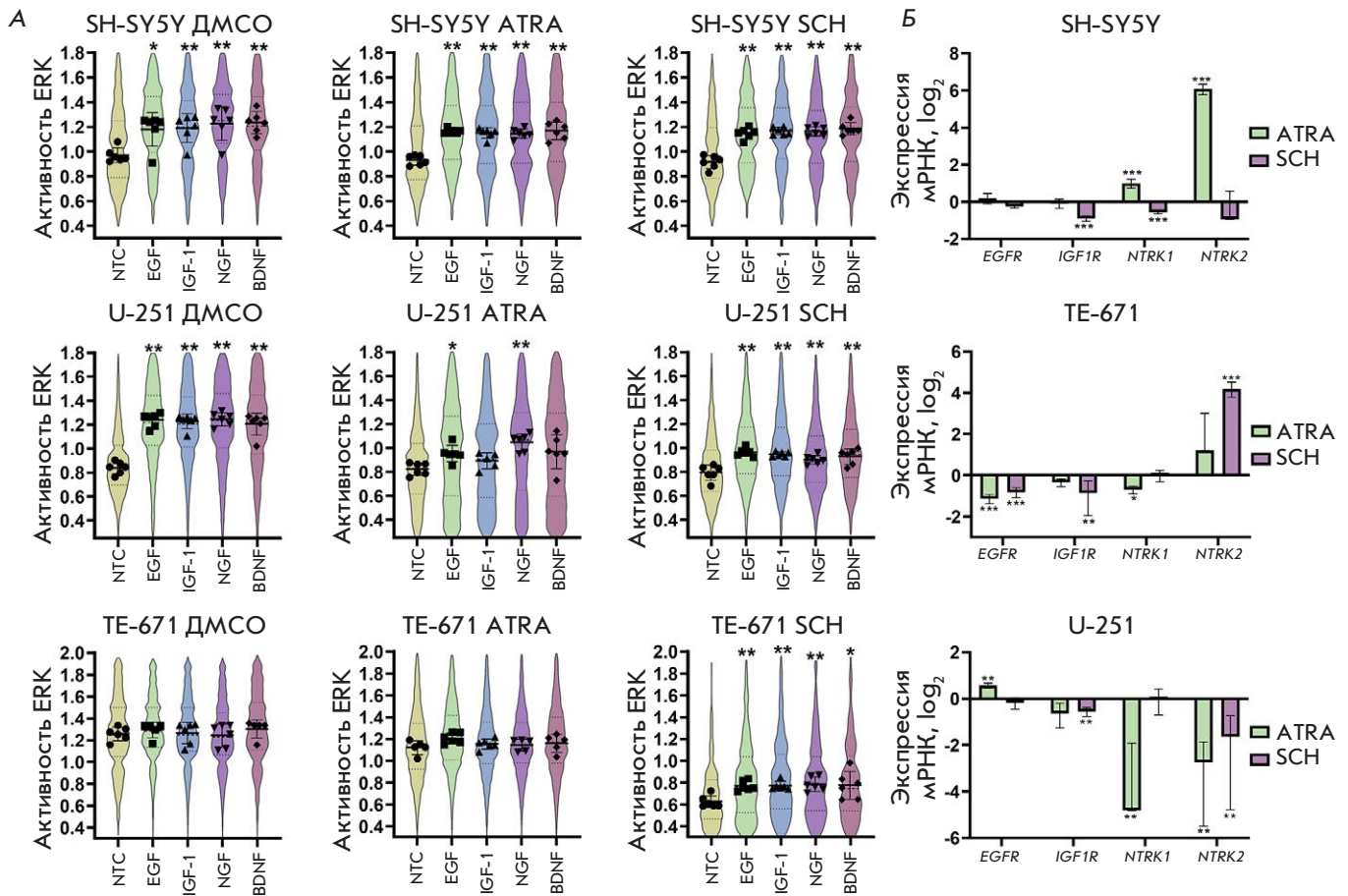


**Рис. 2.** Изменения активности ERK и длины клеток под действием ретиноевой кислоты и ингибиторов ERK. А – распределения активности (скрипичные диаграммы) ERK в клетках SH-SY5Y, U-251 и TE-671 через 72 ч после добавления 10 мкМ *транс*-ретиноевой кислоты (ATRA) или 250 нМ ингибиторов ERK SCH772984 (SCH), Ulixertinib (Ulix) и VX-11e. В качестве контроля к клеткам добавляли ДМСО, поскольку все препараты разведены в ДМСО. Каждое измерение проводили для фотографий шести полей, выбранных случайным образом (медианные значения для каждого поля отмечены точками). На графиках приведены значения отношения интенсивности сигнала репортерного белка в цитоплазме к сигналу в ядре. Б – распределения длины клеток (скрипичные диаграммы) в пикселях через 72 ч после добавления препаратов. Скрипичные диаграммы построены по результатам измерения активности ERK и длины не менее чем 300 уникальных клеток. Точками указаны медианные значения для каждого из шести проанализированных независимых полей, выбранных случайным образом. На скрипичных диаграммах отмечены стандартные отклонения (SD), статистическую значимость определяли непараметрическим тестом по U-критерию Манна–Уитни. В – результаты измерения экспрессии генов *PROM1* (CD133), *RBFOX3* (NeuN), *TUBB3* ( $\beta$ 3-тубулин), *MYOG* (миогенин) и *PAX7* с помощью ПЦР в реальном времени, через 72 ч после добавления препаратов. Данные ПЦР нормированы на экспрессию гена *GAPDH* в каждой пробе, результаты представлены как логарифм изменения экспрессии гена относительно контроля (клетки, обработанные ДМСО). Опыты по измерению экспрессии генов выполнены в трех повторах. На графиках показаны средние значения изменения экспрессии и 95% доверительный интервал. Статистическую значимость определяли методом *t*-критерия Стьюдента. Г – распределение активности ERK и длины индивидуальных клеток линии TE-671 через 72 ч после добавления препаратов. Активность ERK выражена в единицах отношения интенсивности сигнала репортерного белка в цитоплазме к сигналу в ядре. Длина указана в количестве пикселей, которые занимает клетка на фотографии. \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.01$ , \*\*\* $p < 0.001$

*NTRK2* мы обнаружили в клетках TE-671, обработанных SCH772984. Ретиноевая кислота вызвала небольшой рост экспрессии *NTRK1* в клетках TE-671 и SH-SY5Y. При этом в клетках U-251 экспрессия *NTRK1* существенно снизилась после об-

работки ретиноевой кислотой, а экспрессия *NTRK2* снизилась под воздействием и ретиноевой кислоты, и SCH772984 (рис. 3Б). Не обнаружено значительных изменений экспрессии *EGFR* и *IGF1R*. Эти данные указывают на то, что повышенная чувстви-





**Рис. 3.** Влияние ингибирования ERK и ретиноевой кислоты на действие факторов роста. А – распределения активности (скрипичные диаграммы) ERK через 30 мин после добавления факторов роста EGF, IGF-1, NGF и BDNF (100 нг /мл каждый) к клеткам SH-SY5Y, U-251 и TE-671, предварительно обработанным 10 мкМ ретиноевой кислоты (ATRA) или 250 нМ ингибитора ERK SCH772984 (SCH) в течение 72 ч. Обработку клеток ДМСО использовали в качестве контроля. NTC (non-treated control) – клетки, к которым добавляли культуральную среду без ростовых факторов. Точками указаны медианные значения для каждого из шести проанализированных независимых полей, выбранных случайным образом. На скрипичных диаграммах отмечены стандартные отклонения (SD), статистическую значимость определяли непараметрическим тестом по U-критерию Манна–Уитни. Б – результаты измерения экспрессии генов *EGFR*, *IGF1R*, *NTRK1* (*TrkA*) и *NTRK2* (*TrkB*) с помощью ПЦР в реальном времени через 72 ч после добавления препаратов. Данные ПЦР нормированы на экспрессию гена *GAPDH* в каждой пробе, результаты представлены как логарифм изменения экспрессии гена относительно контроля (клетки, обработанные ДМСО). Опыты по измерению экспрессии генов выполнены в трех повторах. Показаны средние значения изменения экспрессии и 95% доверительный интервал. Статистическую значимость определяли с использованием *t*-критерия Стьюдента. \*  $p < 0.05$ , \*\*  $p < 0.01$ , \*\*\*  $p < 0.001$

ность клеток TE-671 к ростовым факторам может быть связана как со снижением базального уровня активности ERK, так и с ростом экспрессии рецепторов, например, в случае *TrkA* и *TrkB*.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В данной работе мы изучили влияние ретиноевой кислоты на активность ERK, а также влияние ингибирования ERK на процессы дифференцировки злокачественных клеток трех типов. Нами обнаружена прямая связь между снижением активности тирозинкиназы ERK в клетках астроцитомы U-251

и рабдомиосаркомы TE-671 и морфологически изменениями этих клеток, ассоциированными с дифференцировкой. Воздействие ингибитора ERK SCH772984 в течение 72 ч на клетки TE-671 привело к значительному увеличению экспрессии гена миогенина *MYOG*. Повышенная экспрессия миогенина считается основным маркером дифференцировки скелетных мышц [32]. Обнаружено снижение экспрессии гена *PROM1*, характерного для злокачественных стволовых клеток. Совокупность изменений в экспрессии генов *PROM1* и *MYOG* и значительные морфологические изменения кле-



ток TE-671, обусловленные действием SCH772984, указывают на индукцию миогенной дифференцировки. Полученные нами результаты согласуются с опубликованными данными, согласно которым ингибиторы MEK инициируют дифференцировку клеток рабдомиосаркомы [22]. При этом ингибирование MEK в течение 72 ч приводит к снижению экспрессии гена PAX7 [28], тогда как при прямом ингибировании ERK наблюдали существенный рост экспрессии PAX7. Считается, что PAX7 необходим для инициации миогенной дифференцировки и уровень его экспрессии повышен в ранних клетках-предшественниках скелетных мышц [33]. На поздних стадиях дифференцировки экспрессия PAX7 обычно снижается, однако нет однозначных данных о влиянии изменения экспрессии PAX7 на дифференцировку клеток при подавлении ERK. Наблюдаемые различия в экспрессии PAX7 связаны, возможно, с различиями в эффектах ингибирования MEK и ERK. Мы не обнаружили существенных изменений в экспрессии маркеров нейтральной дифференцировки NeuN и  $\beta$ 3-тубулина на уровне мРНК в клетках SH-SY5Y и U-251, обработанных ретиноевой кислотой или ингибитором ERK SCH772984. Однако в клетках SH-SY5Y ретиноевая кислота вызвала значительное увеличение экспрессии рецептора TrkB – основного маркера дифференцировки этих клеток. Интересно, что дифференцировка клеток TE-671, вызванная ингибированием ERK, приводила к повышению экспрессии TrkB. Это указывает на возможное сходство в регуляции экспрессии TrkB в этих типах клеток при дифференцировке. В случае клеток астроцитомы U-251 требуется подбор маркеров дифференцировки, подходящих для проведения ПЦР-анализа.

С помощью репортерной системы ERK-KTR мы показали, что длина клеток TE-671 зависит от уровня снижения активности ERK как во всей популяции, так и в каждой отдельной клетке. Это указывает на существование прямой взаимосвязи между активностью ERK и дифференцировкой клеток. Аналогичные результаты получены для клеток астроцитомы U-251. Дифференцировка клеток нейробластомы SH-SY5Y с помощью ретиноевой кислоты также привела к снижению активности ERK. Однако прямое ингибирование ERK в клетках SH-SY5Y не приводит к инициации дифференцировки, что указывает на вторичную роль снижения активности ERK под действием ретиноевой кислоты. Некоторые исследования показывают, что активация ERK в нейтральных стволовых клетках или ранних предшественниках инициирует дифференцировку в нейроны и подавляет дифференцировку в глиальные клетки [34, 35]. Следует отметить, что в астроци-

томах [36] и рабдомиосаркомах [37, 38] часто встречаются мутации непосредственно в сигнальном каскаде MAPK, приводящие к гиперактивации ERK, тогда как в нейробластомах такие мутации находят относительно редко. Клетки TE-671 содержат мутацию в гене NRAS(Q61H) [39, 40], которая приводит к гиперактивации ERK, а клетки U-251 – делецию гена NF1 [41], который кодирует белок нейрофибромин – негативный регулятор активности белков RAS и всего сигнального каскада RAS-MEK-ERK [42]. Мутация в рецепторной тирозинкиназе ALK(F1174L) тоже приводит к активации ERK в клетках SH-SY5Y, однако не регулирует непосредственно сигнальный каскад RAS-MEK-ERK. Возможно, что именно мутации в каскаде RAS-MEK-ERK обуславливают инициацию дифференцировки клеток TE-671 и U-251 в результате ингибирования ERK [40].

У нашего исследования имеется несколько ограничений. Хотя мы видим возникновение морфологических изменений и изменений в экспрессии генов под действием ингибиторов ERK, но не можем сказать, до какой именно стадии происходит дифференцировка клеток. Кроме того, неизвестно, возможна ли дифференцировка клеток TE-671 в полноценные мышечные клетки при ингибировании ERK. Тем не менее, ингибирование ERK может быть, как минимум, инициирующим событием, которое не препятствует действию ростовых факторов. Также нельзя однозначно утверждать, что наблюдаемые изменения морфологии клеток U-251 являются именно дифференцировкой. Поэтому необходимо проведение дополнительных опытов, в том числе поиск надежных маркеров дифференцировки.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В нашей работе показана связь морфологических изменений, ассоциированных с дифференцировкой клеток TE-671, U-251 и SH-SY5Y, и активностью киназы ERK, в том числе на уровне отдельных клеток. Нами показано, что ингибирование ERK в клетках рабдомиосаркомы TE-671 инициирует их миогенную дифференцировку. Дифференцировка делает клетки TE-671 более чувствительными к действию ростовых факторов потенциально за счет снижения базальной активности ERK и увеличения экспрессии рецептора TrkB. Полученные данные могут использоваться для разработки новых протоколов дифференцировки клеток, в том числе для фундаментальных исследований и разработки новых подходов к терапии злокачественных заболеваний. ●

*Исследование выполнено за счет гранта  
Российского научного фонда  
(проект № 19-74-00120).*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lavoie H., Gagnon J., Therrien M. // *Nat. Rev. Mol. Cell Biol.* 2020. V. 21. № 10. P. 607–632.
2. Orlova N.N., Lebedev T.D., Spirin P.V., Prassolov V.S. // *Mol. Biol. (Moscow)*. 2016. V. 50. № 3. P. 395–405.
3. Bonni A., Brunet A., West A.E., Datta S.R., Takasu M.A., Greenberg M.E. // *Science*. 1999. V. 286. № 5443. P. 1358–1362.
4. Spirin P., Lebedev T., Orlova N., Morozov A., Poymenova N., Dmitriev S.E., Buzdin A., Stocking C., Kovalchuk O., Prassolov V. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 34. P. 56991–57002.
5. Ma M., Bordignon P., Dotto G.P., Pelet S. // *Heliyon*. 2020. V. 6. № 12. P. e05574.
6. Simon C.S., Rahman S., Raina D., Schroter C., Hadjantoniakis A.K. // *Dev. Cell*. 2020. V. 55. № 3. P. 341–353 e345.
7. Pokrass M.J., Ryan K.A., Xin T., Pielstick B., Timp W., Greco V., Regot S. // *Dev. Cell*. 2020. V. 55. № 3. P. 328–340 e325.
8. Ogura Y., Sami M.M., Wada H., Hayashi S. // *Genes Cells*. 2019. V. 24. № 4. P. 297–306.
9. Maryu G., Matsuda M., Aoki K. // *Cell Struct. Funct.* 2016. V. 41. № 2. P. 81–92.
10. Hamilton W.B., Mosesson Y., Monteiro R.S., Emdal K.B., Knudsen T.E., Francavilla C., Barkai N., Olsen J.V., Brickman J.M. // *Nature*. 2019. V. 575. № 7782. P. 355–360.
11. Spelat R., Ferro F., Curcio F. // *J. Biol. Chem.* 2012. V. 287. № 45. P. 38279–38288.
12. Ying Q.L., Wray J., Nichols J., Batlle-Morera L., Doble B., Woodgett J., Cohen P., Smith A. // *Nature*. 2008. V. 453. № 7194. P. 519–523.
13. Tamama K., Sen C.K., Wells A. // *Stem Cells Dev.* 2008. V. 17. № 5. P. 897–908.
14. Yu Y., Wang X., Zhang X., Zhai Y., Lu X., Ma H., Zhu K., Zhao T., Jiao J., Zhao Z.A., et al. // *Stem Cell Res. Ther.* 2018. V. 9. № 1. P. 2.
15. Liu F., Xuan A., Chen Y., Zhang J., Xu L., Yan Q., Long D. // *Mol. Med. Rep.* 2014. V. 10. № 4. P. 1739–1745.
16. Yan L., Zhou L., Yan B., Zhang L., Du W., Liu F., Yuan Q., Tong P., Shan L., Efferth T. // *Cell Death Dis.* 2020. V. 11. № 10. P. 857.
17. Khavari T.A., Rinn J. // *Cell Cycle*. 2007. V. 6. № 23. P. 2928–2931.
18. Kern F., Niault T., Baccarini M. // *Br. J. Cancer*. 2011. V. 104. № 2. P. 229–234.
19. Olson E.N., Spizz G., Tainsky M.A. // *Mol. Cell. Biol.* 1987. V. 7. № 6. P. 2104–2111.
20. Reynolds C.P., Matthy K.K., Villablanca J.G., Maurer B.J. // *Cancer Lett.* 2003. V. 197. № 1–2. P. 185–192.
21. Tallman M.S., Andersen J.W., Schiffer C.A., Appelbaum F.R., Feusner J.H., Ogden A., Shepherd L., Willman C., Bloomfield C.D., Rowe J.M., et al. // *N. Engl. J. Med.* 1997. V. 337. № 15. P. 1021–1028.
22. Yohe M.E., Gryder B.E., Shern J.F., Song Y.K., Chou H.C., Sindiri S., Mendoza A., Patidar R., Zhang X., Guha R., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2018. V. 10. № 448. P. eaan4470.
23. Forsheew T., Tatevossian R.G., Lawson A.R., Ma J., Neale G., Ogunkolade B.W., Jones T.A., Aarum J., Dalton J., Bailey S., et al. // *J. Pathol.* 2009. V. 218. № 2. P. 172–181.
24. Tanaka T., Higashi M., Kimura K., Wakao J., Fumino S., Iehara T., Hosoi H., Sakai T., Tajiri T. // *J. Pediatr. Surg.* 2016. V. 51. № 12. P. 2074–2079.
25. Regot S., Hughey J.J., Bajar B.T., Carrasco S., Covert M.W. // *Cell*. 2014. V. 157. № 7. P. 1724–1734.
26. Gusel'nikova V.V., Korzhhevskiy D.E. // *Acta Naturae*. 2015. V. 7. № 2. P. 42–47.
27. Constantinescu R., Constantinescu A.T., Reichmann H., Janetzky B. // *J. Neural. Transm. Suppl.* 2007. № 72. P. 17–28.
28. De Luna N., Suarez-Calvet X., Garicano M., Fernandez-Simon E., Rojas-Garcia R., Diaz-Manera J., Querol L., Illa I., Gallardo E. // *J. Neuropathol. Exp. Neurol.* 2018. V. 77. № 10. P. 964–972.
29. Garcez R.C., Teixeira B.L., Schmitt Sdos S., Alvarez-Silva M., Trentin A.G. // *Cell Mol. Neurobiol.* 2009. V. 29. № 8. P. 1087–1091.
30. Galvin C.D., Hardiman O., Nolan C.M. // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2003. V. 200. № 1–2. P. 19–29.
31. Lebedev T.D., Vagapova E.R., Popenko V.I., Leonova O.G., Spirin P.V., Prassolov V.S. // *Front. Oncol.* 2019. V. 9. P. 1046.
32. Bentzinger C.F., Wang Y.X., Rudnicki M.A. // *Cold Spring Harb. Perspect. Biol.* 2012. V. 4. № 2. P. a008342.
33. Florkowska A., Meszka I., Zawada M., Legutko D., Proszynski T.J., Janczyk-Ilach K., Streminska W., Ciemerych M.A., Grabowska I. // *Stem Cell Res. Ther.* 2020. V. 11. № 1. P. 238.
34. Paquin A., Barnabe-Heider F., Kageyama R., Miller F.D. // *J. Neurosci.* 2005. V. 25. № 46. P. 10747–10758.
35. Samuels I.S., Karlo J.C., Faruzzi A.N., Pickering K., Her-rup K., Sweatt J.D., Saitta S.C., Landreth G.E. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 27. P. 6983–6995.
36. Jones D.T., Gronych J., Lichter P., Witt O., Pfister S.M. // *Cell Mol. Life Sci.* 2012. V. 69. № 11. P. 1799–1811.
37. Marampon F., Bossi G., Ciccarelli C., Di Rocco A., Sacchi A., Pestell R.G., Zani B.M. // *Mol. Cancer Ther.* 2009. V. 8. № 3. P. 543–551.
38. Ciccarelli C., Vulcano F., Milazzo L., Gravina G.L., Marampon F., Macioce G., Giampaolo A., Tombolini V., Di Paolo V., Hassan H.J., et al. // *Mol. Cancer*. 2016. V. 15. P. 16.
39. Stratton M.R., Darling J., Pilkington G.J., Lantos P.L., Reeves B.R., Cooper C.S. // *Carcinogenesis*. 1989. V. 10. № 5. P. 899–905.
40. Dolgikh N., Hugle M., Vogler M., Fulda S. // *Cancer Res.* 2018. V. 78. № 8. P. 2000–2013.
41. McGillicuddy L.T., Fromm J.A., Hollstein P.E., Kubek S., Beroukhir R., De Raedt T., Johnson B.W., Williams S.M., Nghiemphu P., Liau L.M., et al. // *Cancer Cell*. 2009. V. 16. № 1. P. 44–54.
42. Cichowski K., Jacks T. // *Cell*. 2001. V. 104. № 4. P. 593–604.

УДК 577.113.3

# Оценка противовирусного потенциала модифицированных гетероциклических оснований и 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов в отношении SARS-CoV-2

Е. С. Матюгина<sup>1</sup>, М. С. Новиков<sup>2</sup>, Л. И. Козловская<sup>3,4</sup>, В. П. Волок<sup>3</sup>, Е. Ю. Шустова<sup>3</sup>,  
А. А. Ишмухаметов<sup>3,4</sup>, С. Н. Кочетков<sup>1</sup>, А. Л. Хандажинская<sup>1\*</sup>

<sup>1</sup>Институт молекулярной биологии им. В.А. Энгельгардта РАН, Москва, 119991 Россия

<sup>2</sup>Волгоградский государственный медицинский университет, Волгоград, 400131 Россия

<sup>3</sup>Федеральный научный центр исследований и разработки иммунобиологических препаратов им. М.П. Чумакова РАН, Москва, 108819 Россия

<sup>4</sup>Первый Московский государственный медицинский университет им. И.М. Сеченова Минздрава России (Сеченовский университет), Москва, 119991 Россия

\*E-mail: khandzhinskaya@bk.ru

Поступила в редакцию 25.10.2021

Принята к печати 10.12.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11479

**РЕФЕРАТ** Пандемия, вызванная новым бетакоронавирусом SARS-CoV-2, унесла уже почти 5 млн жизней. Несмотря на разработку и широкое применение вакцин против COVID-19, это заболевание остается главной проблемой мирового здравоохранения. В рамках перепрофилирования существующих лекарственных средств ведутся интенсивные исследования препаратов, созданных для терапии других вирусных, бактериальных и паразитарных инфекций, аутоиммунных, онкологических и других заболеваний с целью создания эффективного терапевтического средства. В данной работе в результате фенотипического скрининга библиотек модифицированных гетероциклических оснований и 5'-норкарбоциклических аналогов нуклеозидов, синтезированных нами ранее, выявлены два соединения-лидера, способные ингибировать размножение вируса SARS-CoV-2 со значениями  $EC_{50}$  в диапазоне 20–70 мкМ. Структуры этих соединений могут быть использованы для дальнейшей оптимизации с целью создания противовирусного препарата.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** SARS-CoV-2, противовирусные препараты, нуклеозиды, аналоги нуклеозидов.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ**  $EC_{50}$  – 50% эффективная концентрация, т.е. концентрация соединения, подавляющая репродукцию вируса в 50% тест-объектов; ННС – N-гидроксицитидин; ВИЧ – вирус иммунодефицита человека; ДМСО – диметилсульфоксид;  $TCD_{50}$  – 50% тканевая цитотоксическая доза, т.е. доза вируса, вызывающая появление признаков цитопатического действия в 50% тест-объектов.

## ВВЕДЕНИЕ

Coronaviridae – семейство вирусов, включающее два подсемейства: Orthocoronavirinae и Letovirinae. Опасные для здоровья человека патогены относятся к подсемейству Orthocoronavirinae. В 60-х годах XX века впервые были идентифицированы коронавирусы человека (HCoV) – HCoV-OC43 (OC43) и HCoV-229E (229E) [1]. Позднее обнаружили и другие коронавирусы человека: HCoV-NL63 (NL63) в 2004 году и HCoV-NKU1 (NKU1) в 2005 году [1]. Эти четыре вируса обычно вызывают острые заболевания верхних, реже нижних дыхательных путей, но тяжелые слу-

чай коронавирусной инфекции регистрировали редко и связывали, как правило, с сопутствующей патологией и/или иммунологическим старением. Два более опасных коронавируса человека – SARS-CoV (2003 г.) и MERS-CoV (2012 г.) вызывают атипичные поражения верхних и нижних дыхательных путей, которые особенно тяжело протекают у людей старше 65 лет и пациентов с сопутствующими заболеваниями [1].

Седьмым в группе коронавирусов человека стал SARS-CoV-2, идентифицированный в декабре 2019 года в городе Ухань (Китай). Инфекция, вызываемая этим вирусом, получила название COVID-19 и бы-

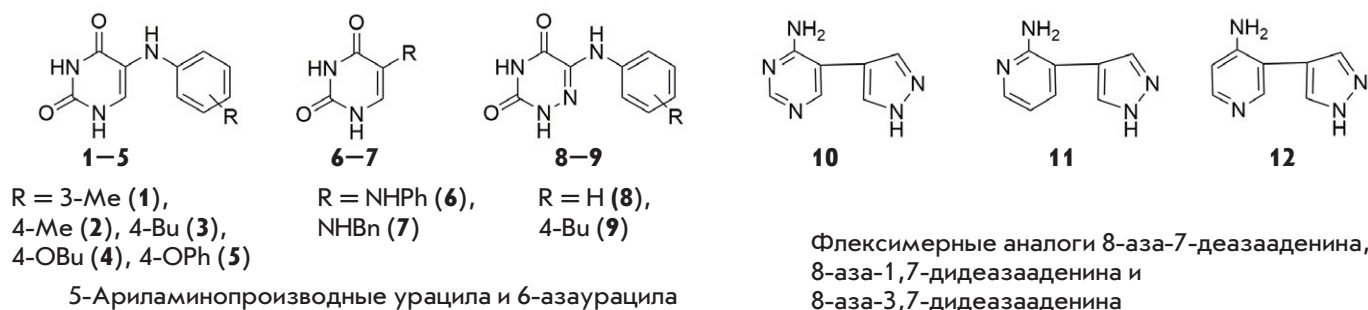


Рис. 1. Аналоги гетероциклических оснований

стро распространилась по всему миру. Всемирная организация здравоохранения объявила 11 марта 2020 года о пандемии COVID-19 [2]. Объединенные усилия ученых всего мира, позволившие быстро выявить этиологический агент, получить информацию о структуре и жизненном цикле вируса, а также опыт разработки вакцин против «атипичной пневмонии», вызванной SARS-CoV, привели к появлению вакцин, некоторые из которых успешно прошли доклинические и клинические испытания и используются для массовой вакцинации [2].

Тем не менее, на 27 октября 2021 диагноз COVID-19 подтвержден более чем у 274 млн пациентов в мире, из которых 4.96 млн умерли [2]. К настоящему моменту не существует общепринятых эффективных методов терапии COVID-19, в связи с чем создание специфических препаратов для лечения этого заболевания остается весьма актуальной задачей. Разрабатывают препараты на основе антител, ингибиторов вирусных ферментов (РНК-зависимой РНК-полимеразы, протеаз и др.), ингибиторов проникновения вируса в клетку и др. [3]. В рамках перепрофилирования существующих лекарственных средств во всем мире ведутся интенсивные исследования препаратов, созданных для терапии других вирусных (грипп, ВИЧ-инфекция, гепатит С, лихорадка Эбола и др.), бактериальных и паразитарных инфекций, аутоиммунных, онкологических и других заболеваний [3].

В контексте данной стратегии мы провели скрининг библиотеки аналогов гетероциклических оснований и нуклеозидов, полученных нами ранее и показавших противовирусную [4–8], антибактериальную [7, 9–11], противопаразитарную [12, 13] или антипролиферативную активность [14, 15].

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Стоковые растворы тестируемых соединений в концентрации 5 мкМ готовили в 100% ДМСО. Для оценки противовирусной активности использовали штамм ПИК35 вируса SARS-CoV-2 (GISAID ID EPI\_ISL\_428851) [16]. Вирус прошел пять пассажей

в клетках Vero и хранился в виде суспензии инфицированных клеток при температуре  $-70^{\circ}\text{C}$ . Линия клеток почки зеленой мартышки Vero получена из Biologicals, ВОЗ, Швейцария (RCB 10-87). Клетки вели на культуральной среде ДМЕМ («ФНЦИРИП им. М.П. Чумакова РАН», Россия) с фетальной сывороткой крупного рогатого скота (Gibco, США, 5%), стрептомицином (0.1 мг/мл) и пенициллином (100 ед./мл) («ПанЭко», Россия).

Методика фенотипического скрининга апробирована ранее [16]. Готовили восемь двукратных разведений стоковых растворов соединений в среде ДМЕМ. Далее разведения соединений смешивали с равными объемами вирусной суспензии, содержащей 50–200 ТЦД<sub>50</sub> на лунку, инкубировали в течение 1 ч при  $37^{\circ}\text{C}$ , далее смеси вирус-соединение добавляли к конфлюэнтным монослоям клеток Vero в двух повторностях. После 5-дневной инкубации при  $37^{\circ}\text{C}$  цитопатический эффект (ЦПЭ) оценивали микроскопически. Значения ЕС<sub>50</sub> рассчитывали по методу Кербера как описано ранее [16]. Эксперимент повторяли не менее 2 раз для каждого соединения. В качестве положительного контроля использовали N-гидроксицитидин (ННС), в качестве отрицательного – ДМСО.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Проведен фенотипический скрининг библиотеки аналогов гетероциклических оснований (рис. 1) и нуклеозидов (рис. 2), синтезированных нами ранее, на активность против SARS-CoV-2. Первая группа аналогов гетероциклических оснований представляет собой 5-ариламинопроизводные урацила и 6-азаурацила (рис. 1), проявившие себя как ненуклеозидные ингибиторы ВИЧ и ингибиторы роста *Mycobacterium tuberculosis* [7, 11]. Вторая группа представляет собой новые флексимерные аналоги аза/дезазапуриновых оснований (рис. 1) [17]. Известно, что аза/дезазапурины, как и соответствующие нуклеозиды, проявляют широкий спектр противопаразитарных, противоопухолевых и противовирусных свойств [18]. С другой стороны, флексимерные основания обладают высокой



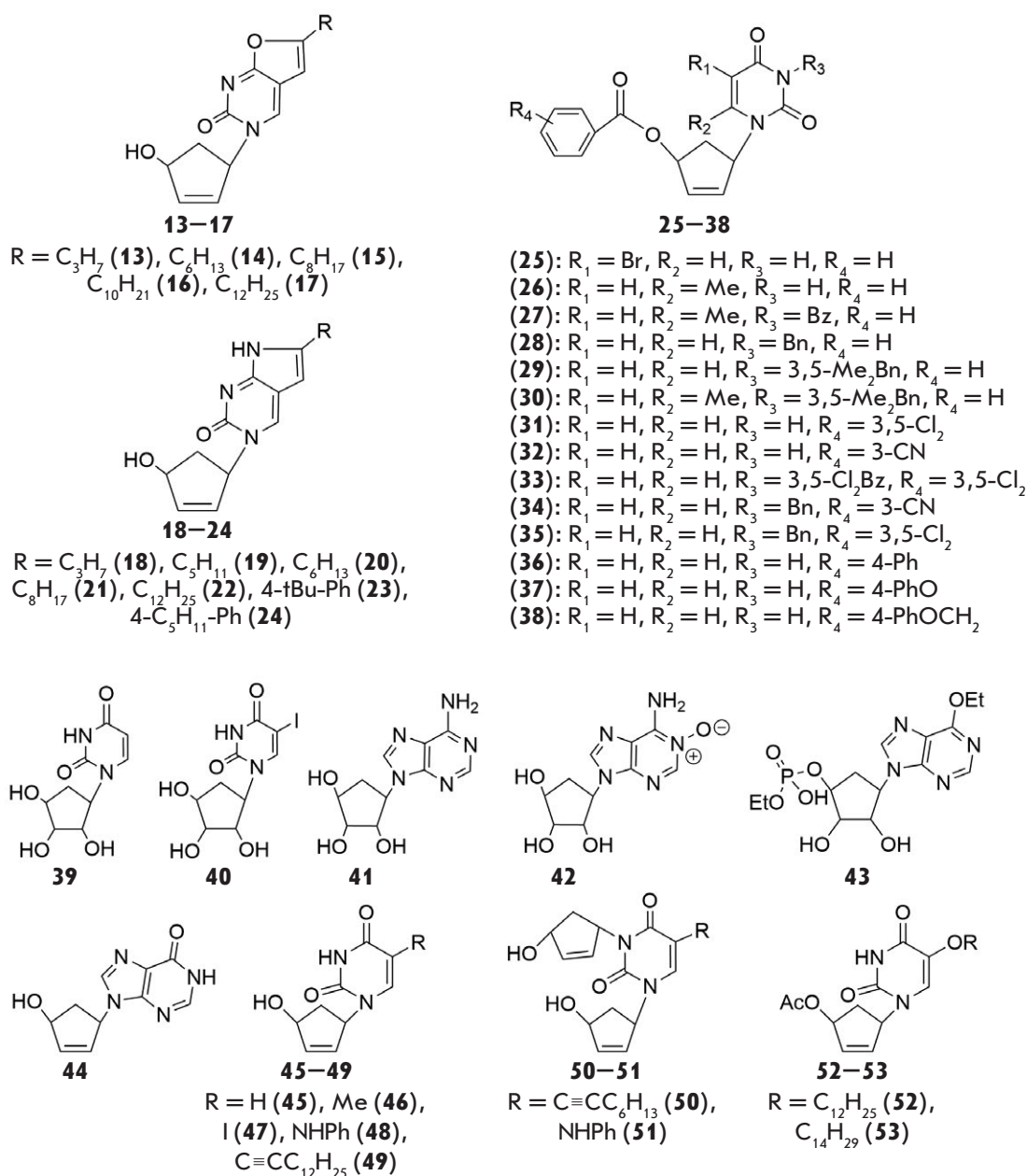


Рис. 2. 5'-Норкарбоциклические аналоги нуклеозидов

подвижностью (гибкостью) структуры, которая создается за счет размыкания пуринового кольца на отдельные гетероциклические фрагменты. Свободное вращение вокруг С–С-связи позволяет подобным соединениям наилучшим образом подстраиваться к пространственной структуре активного центра фермента-мишени, что в ряде случаев позволяет обходить возникающие в последнем точечные мутации, тем самым обеспечивая механизм преодоления лекарственной устойчивости [17].

Другая группа соединений включает 5'-норкарбоциклические аналоги пуриновых и пиримидиновых

нуклеозидов (рис. 2). Структурная особенность этих аналогов нуклеозидов – отсутствие 5'-метиленовой группы и, как следствие, невозможность превращаться в фосфорилированные формы под действием клеточных ферментов и проявлять биологическую активность по традиционным для обычных модифицированных нуклеозидов механизмам. Однако представители соединений данного класса способны выступать в качестве ненуклеозидных ингибиторов обратной транскриптазы (ННИОТ) ВИЧ, а кроме того, обладают антибактериальной и противоопухолевой активностью [4–7, 9–11, 15].

Противовирусную активность определяли по способности исследуемых соединений ингибировать гибель клеток Vero, индуцированную заражением штаммом ПИК35 вируса SARS-CoV-2. В качестве положительного контроля использовали N-гидроксицитидин (NHC), известный ингибитор репродукции SARS-CoV-2, активность которого в данной серии экспериментов соответствовала ранее полученным данным [16]. Всего протестировано 53 соединения, большинство из которых не проявили активности в концентрации до 100 мкМ. Только два соединения, 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1-ил)-6-(4-третбутилфенил)-3H-пирроло[2,3-d]-пиримидин-2-он **23** и 1-(4'-гидрокси-2'-циклопентен-1-ил)-6-(4-пентилфенил)-3H-пирроло[2,3-d]-пиримидин-2-он **24**, показали дозозависимую способность ингибировать размножение SARS-CoV-2 со значениями  $EC_{50} = 53$  и 21 мкМ соответственно (таблица). При этом наблюдалась довольно выраженная цитотоксичность, что соответствует ранее полученным данным [14].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В данной работе методами фенотипического скрининга выявлены два аналога нуклеозидов, 5'-нор-

### Константы противовирусной активности и цитотоксичности активных соединений

Соединение	$EC_{50}$ , мкМ (M ± SEM)	$CC_{50}$ , мкМ (M ± SEM)	Индекс селективности (SI)
<b>23</b>	53 ± 18	75 ± 25	1.42
<b>24</b>	21 ± 6	53 ± 18	2.52
NHC	5.3 ± 0.9	>100	> 19

карбоциклические производные бициклических фурано[2,3-d]пиримидинов **23** и **24**, способных ингибировать репродукцию вируса SARS-CoV-2 *in vitro*. Структуры этих соединений могут быть использованы для дальнейшей оптимизации с целью создания противовирусного препарата. ●

*Исследование выполнено при финансовой поддержке РФФИ в рамках научного проекта № 20-04-60414. Синтез флексимерных аналогов гетероциклических оснований был осуществлен при поддержке РФФ № 19-74-10048.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Shi Z., Brugere-Picoux J. // Bull. Acad. Natl. Med. 2021. V. 205. P. 732–736.
- <https://covid19.who.int/>.
- [https://covid-nma.com/living\\_data/index.php](https://covid-nma.com/living_data/index.php).
- Matyugina E.S., Valuev-Elliston V.T., Babkov D.A., Novikov M.S., Ivanov A.V., Kochetkov S.N., Balzarini J., Seley-Radtke K.L., Khandazhinskaya A.L. // Medchemcomm. 2013. V. 4. P. 741–748.
- Matyugina E.S., Valuev-Elliston V.T., Geisman A.N., Novikov M.S., Chizhov A.O., Kochetkov S.N., Seley-Radtke K.L., Khandazhinskaya A.L. // Medchemcomm. 2013. V. 4. P. 1443–1451.
- Matyugina E., Valyev-Elliston V.T., Novikov M.S., Alexandrova L.A., Chernoysova L.N., Kochetkov S.N., Khandazhinskaya A.L. // FEBS J. 2013. V. 280. P. 358–359.
- Matyugina E.S., Novikov M.S., Babkov D.A., Valuev-Elliston V.T., Vanpouille C., Zicari S., Corona A., Tramontano E., Margolis L.B., Khandazhinskaya A.L., Kochetkov S.N. // Acta Naturae. 2015. V. 7. P. 113–115.
- Matyugina E.S., Seley-Radtke K.L., Andronova V.L., Galegov G.A., Kochetkov S.N., Khandazhinskaya A.L. // Russ. J. Bioorg. Chem. 2010. V. 36. P. 730–733.
- Matyugina E., Khandazhinskaya A., Chernousova L., Andreevskaya S., Smirnova T., Chizhov A., Karpenko I., Kochetkov S., Alexandrova L. // Bioorgan. Med. Chem. 2012. V. 20. P. 6680–6686.
- Matyugina E.S., Andreevskaya S.N., Smirnova T.G., Khandazhinskaya A.L. // Acta Naturae. 2012. V. 4. P. 73–77.
- Matyugina E., Novikov M., Babkov D., Ozerov A., Chernousova L., Andreevskaya S., Smirnova T., Karpenko I., Chizhov A., Murthu P., et al. // Chem. Biol. Drug Des. 2015. V. 86. P. 1387–1396.
- Alzahrani K.J., Matyugina E.S., Khandazhinskaya A.L., Kochetkov S.N., Seley-Radtke K.L., de Koning H.P. // Bioorg. Med. Chem. Lett. 2017. V. 27. P. 3081–3086.
- Khandazhinskaya A.L., Matyugina E.S., Solyev P.N., Wilkinson M., Buckheit K.W., Buckheit R.W., Chernousova L.N., Smirnova T.G., Andreevskaya S.N., Alzahrani K.J., Natto M.J., Kochetkov S.N., de Koning H.P., Seley-Radtke K.L. // Molecules. 2019. V. 24. P. 19E3433.
- Klimenko A.A., Matyugina E.S., Logashenko E.B., Solyev P.N., Zenkova M.A., Kochetkov S.N., Khandazhinskaya A.L. // Molecules. 2018. V. 23. P. 2654.
- Matyugina E.S., Logashenko E.B., Zenkova M.A., Kochetkov S.N., Khandazhinskaya A.L. // Heterocycl. Commun. 2015. V. 21. P. 259–262.
- Kozlovskaya L.I., Volok V.P., Shtro A.A., Nikolaeva Y.V., Chistov A.A., Matyugina E.S., Belyaev E.S., Jegorov A.V., Snoeck R., Korshun V.A., et al. // Eur. J. Med. Chem. 2021. V. 220. P. 113467.
- Khandazhinskaya A., Eletskaia B., Fateev I., Kharitonova M., Konstantinova I., Barai V., Azhaye A., Hyvonen M., Keinanen T., Kochetkov S., et al. // Organic. Biomol. Chem. 2021. V. 19. P. 7379–7389.
- Matyugina E.S., Kochetkov S.N., Khandazhinskaya A.L. // Russ. Chem. Rev. 2021. V. 90. P. 1454–1491.

УДК 57.085.23

# Внеклеточные везикулы микоплазм способны проникать в клетки эукариот *in vitro* и модулировать их протеом

А. А. Музыкантов<sup>1\*</sup>, Э. В. Рожина<sup>2</sup>, Р. Ф. Фахруллин<sup>2</sup>, М. О. Гомзикова<sup>2</sup>, М. А. Золотых<sup>2</sup>, О. А. Чернова<sup>1</sup>, В. М. Чернов<sup>1</sup>

<sup>1</sup>Казанский институт биохимии и биофизики – обособленное структурное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федеральный исследовательский центр «Казанский научный центр Российской академии наук», Казань, 420111 Россия

<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420008 Россия

\*E-mail: muzaleksei@mail.ru

Поступила в редакцию 07.07.2021

Принята к печати 09.11.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11506

**РЕФЕРАТ** Внеклеточные везикулы (ВВ), продуцируемые бактериями, транспортируют соединения широкого спектра, включая белки, ДНК и РНК, опосредуют межклеточные взаимодействия и могут быть важными участниками механизмов персистенции инфекционных агентов. Исследование посвящено проверке предположения, что ВВ микоплазм, мельчайших из способных к самостоятельному воспроизведению прокариот, объединенных в класс Mollicutes, могут проникать в клетки эукариот и модулировать их иммунореактивность. Эту гипотезу проверяли на системе, моделирующей взаимодействие культивируемых *in vitro* фибробластов кожи человека и изолированных везикул *Acholeplasma laidlawii* – убиквитарной микоплазмы, – инфицирующей высших эукариот и являющейся основным контаминантом клеточных культур и вакцинных препаратов. Использовали конфокальную лазерную сканирующую микроскопию и протеомное профилирование с применением комбинации 2D-DIGE и MALDI-TOF/TOF, программы анализа масс-спектров Mascot и инструмент функциональной аннотации DAVID. В результате этих исследований впервые установлено, что ВВ *A. laidlawii* способны проникать в эукариотические клетки *in vitro* и модулировать клеточный протеом. Молекулярные механизмы взаимодействия везикул микоплазмы с клетками эукариот и вклад соответствующих наноструктур в молекулярную машинерию клеточной перmissивности еще предстоит выяснить. Изучение этих аспектов актуально как для фундаментальных исследований логики жизни простейших прокариот, так и практических разработок эффективного контроля гипермутабельных бактерий, инфицирующих человека, животных и растения, контаминирующих клеточные культуры и вакцинные препараты.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** микоплазмы, везикулы, интернализация, фибробласты человека, протеом.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ВВ – внеклеточные везикулы; HSF – фибробласты кожи человека; 2D-DIGE – дифференциальный двумерный электрофорез; MALDI-TOF/TOF – времяпролетная/времяпролетная матрично-активированная лазерная десорбция/ионизация; PBS – фосфатно-солевой буфер.

## ВВЕДЕНИЕ

Молекулярные механизмы взаимодействия микоплазм (мельчайших, способных к самостоятельному воспроизведению прокариот, объединенных в класс Mollicutes) с клетками эукариот, обеспечивающие персистенцию инфекционных агентов, не ясны [1]. К настоящему времени установлено, что взаимодей-

ствие клеток микро- и макроорганизмов опосредуется ВВ, которые переносят соединения широкого спектра, включая белки, ДНК, РНК, в том числе короткие РНК [2]. ВВ бактерий могут проникать в клетки эукариот и модулировать иммунореактивность – такая способность обнаружена у некоторых возбудителей персистентных инфекций. ВВ мико-

плазм описаны [3, 4], но доказательства их способности проникать в эукариотические клетки пока отсутствуют.

В представленной работе изучена способность ВВ *A. laidlawii* – убиквитарной микоплазмы, инфицирующей высших эукариот, и основного контаминанта клеточных культур и вакцинных препаратов, проникать в культивируемые *in vitro* клетки эукариот и модулировать клеточный протеом.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Культуры клеток

Использовали культуру *A. laidlawii* PG8B в середине лог-фазы роста и первичную культуру фибробластов кожи человека (HSF – Human Skin Fibroblast). Фибробласты получали из биопсий кожи и культивировали в среде  $\alpha$ MEM с добавлением 100 Ед/мл пенициллина, 100 мкг/мл стрептомицина, 10% бычьей сыворотки и 2 мМ *L*-глутамин при 37°C и 5% CO<sub>2</sub>. Образцы кожи человека отбирали в соответствии с протоколом эксперимента, утвержденным Экспертной комиссией по биомедицинской этике Казанского федерального университета и Республиканской клинической больницы (№ 218, 15.11.2012). От доноров были получены письменные информированные согласия.

### Выделение внеклеточных везикул

ВВ *A. laidlawii* выделяли как описано [3]. Изолированные везикулы анализировали с помощью трансмиссивной электронной микроскопии и сканирующей электронной микроскопии как описано [3]. Микровезикулы, продуцируемые HSF в присутствии и в отсутствие везикул *A. laidlawii*, выделяли согласно [5]. Отбирали культуральную среду контрольных и опытных культур HSF. Клетки и дебрис удаляли с помощью центрифугирования (1500 *g*, 10 мин). Супернатант центрифугировали при 100000 *g* в течение 70 мин (ротор MLA-80, Beckman Coulter). Осадки ресуспендировали в PBS и центрифугировали при 100000 *g*, 70 мин. Промытые осадки ресуспендировали в PBS, наслаивали на градиент плотности Optiprep (10–20–30–40–45%) и ультрацентрифугировали при 100000 *g* в течение 17 ч. Фракции отбирали, трижды отмывали от Optiprep, суспендировали в PBS и хранили при 4°C до анализа. ВВ *A. laidlawii* добавляли к HSF в количестве 100 мкг (по общему белку) и инкубировали в течение 4 ч. Культуры фибробластов с ВВ и без ВВ составили опыт и контроль соответственно. Везикулярную ДНК *A. laidlawii* детектировали с помощью ПЦР как описано [6].

### Анализ с помощью конфокальной микроскопии

Препараты ВВ *A. laidlawii* окрашивали DiI, акридиновым оранжевым и Hoechst 33342 для визуализации мембраны, РНК и ДНК соответственно. Препараты микровезикул HSF окрашивали с помощью антител против р53, конъюгированными с Alexa Fluor 647 и DiO для визуализации мембраны. Несвязавшиеся молекулы красителей удаляли с использованием концентратора с пределом отсечения 3 кДа. Препараты исследовали с помощью конфокального лазерного сканирующего микроскопа Carl Zeiss LSM 780.

Для визуализации интернализации ВВ *A. laidlawii* фибробласты культивировали на покровных стеклах. ВВ *A. laidlawii* окрашивали флуоресцентными красителями, как описано выше, и добавляли к HSF. Фибробласты промывали буфером и фиксировали 2.5% глутаровым альдегидом. Ядра клеток окрашивали DAPI, а F-актин – с помощью антител, конъюгированных с Alexa Fluor 488. Слайды исследовали под микроскопом, данные обрабатывали в программе ZEN 9.0.

Микроскопические изображения окрашенных HSF и ВВ *A. laidlawii* в темном поле получали на микроскопе Olympus BX51 [7]. Данные обрабатывали в программе Exponent 7.

### Иммуноферментный анализ

Для количественного определения цитокинов HSF удаляли центрифугированием, концентрации интерлейкинов ИЛ-6 и ИЛ-8 в супернатанте определяли методом ELISA («Вектор-Бест», Россия) согласно протоколу производителя.

### Протеомный анализ

Протеомный анализ HSF проводили согласно [8]. Клетки открепляли от пластика с помощью трипсина, трижды отмывали от питательной среды с помощью PBS. Осадки клеток растворяли в буфере (8 М мочевины, 2 М тиомочевина, 16.7% раствора (30% CHAPS + 10% NP-40)) и обрабатывали смесью нуклеаз (Micrococcal Nuclease Mix). Концентрацию белка в образцах измеряли по методу Бредфорд. Белки окрашивали с красителями CyDye DIGE Cy3 (контроль) и CyDye DIGE Cy5 (опыт), реакцию останавливали с помощью 10 мМ раствора лизина. Эффективность окрашивания проверяли с помощью 1D-электрофореза в ПААГ и сканирования геля на сканере Turphoon Trio. Образцы объединяли (брали равные количества каждого образца), добавляли дитиотреитол (ДТТ) до 80 мМ и амфолиты 3–10 до 0.2% и разделяли с помощью 2D-электрофореза. Гели сканировали на сканере Turphoon Trio. Для визуализации белковых пятен гели окрашивали нитратом серебра.



Белковые пятна на гелях анализировали с помощью программы PDQuest v.8.01 (Bio-Rad). Вырезали пятна, соотношение содержания белка в которых в контроле и опыте было больше 1.5. Кусочки геля промывали в смеси ацетонитрил : 200 мМ NH<sub>4</sub>HCO<sub>3</sub> (1 : 1). Затем инкубировали с ДТТ и йодацетамидом. Дегидратацию гелей проводили с помощью ацетонитрила. К гелю добавляли рабочий раствор трипсина, инкубировали в течение 60 мин при 4°C. Трипсинолиз проводили при 37°C в течение ночи. Пептиды экстрагировали с помощью 0.5% раствора ТФУ. Идентификацию белков с помощью MALDI-времяпролетно-времяпролетного масс-спектрометра Ultraflextreme проводили согласно протоколу [8]. Образцы пептидов смешивали с раствором матрицы (1% 2,5-дигидроксibenзойная кислота, 20% ацетонитрил, 0.5% ТФУ), наносили на мишень и высушивали на воздухе. Масс-спектрометрию проводили в режиме положительных ионов в диапазоне 500–4000 Да. Точность измеренных моноизотопных масс после докалибровки по пикам автолиза трипсина составляла 0.007% с учетом возможного окисления метионина и модификации цистеинов акриламидом. Белки идентифицировали с использованием программы Mascot в режиме Peptide Mass Fingerprint (Matrix Science) и базы UniProt. При score ≥ 44 идентификацию белка считали надежной ( $p < 0.05$ ).

Для функциональной аннотации идентифицированных белков использовали базу данных DAVID (The Database for Annotation, Visualization and Integrated Discovery). Определяли метаболические пути и клеточные процессы, в которых эти белки участвуют (согласно KEGG); генную онтологию определяли с помощью GO (молекулярная функция, биологический процесс, локализация продукта).

### Вестерн-блоттинг

Таргетное количественное определение белков проводили с помощью Вестерн-блоттинга. Белки из лизатов HSF разделяли в ПААГ и переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond C. Использовали антитела (Sigma, США) к p53, HSP7C и β-актину, а также вторичные антитела, конъюгированные с пероксидазой хрена. Мембраны инкубировали последовательно с первичными и вторичными антителами, а затем окрашивали 3,3'-диаминобензидином (Sigma). Гели анализировали в программе ImageJ, используя в качестве контроля β-актин для нормирования интенсивности сигналов исследуемых образцов.

### Статистический анализ

Все эксперименты проводили в трех повторностях. Образцы анализировали через 4 ч после инкубации

HSF с ВВ микоплазмы во всех случаях, а также дополнительно через 48 ч при анализе экспрессии цитокинов. Статистический анализ проводили с использованием пакета RStudio. Значения  $p < 0.05$  считали статистически значимыми.

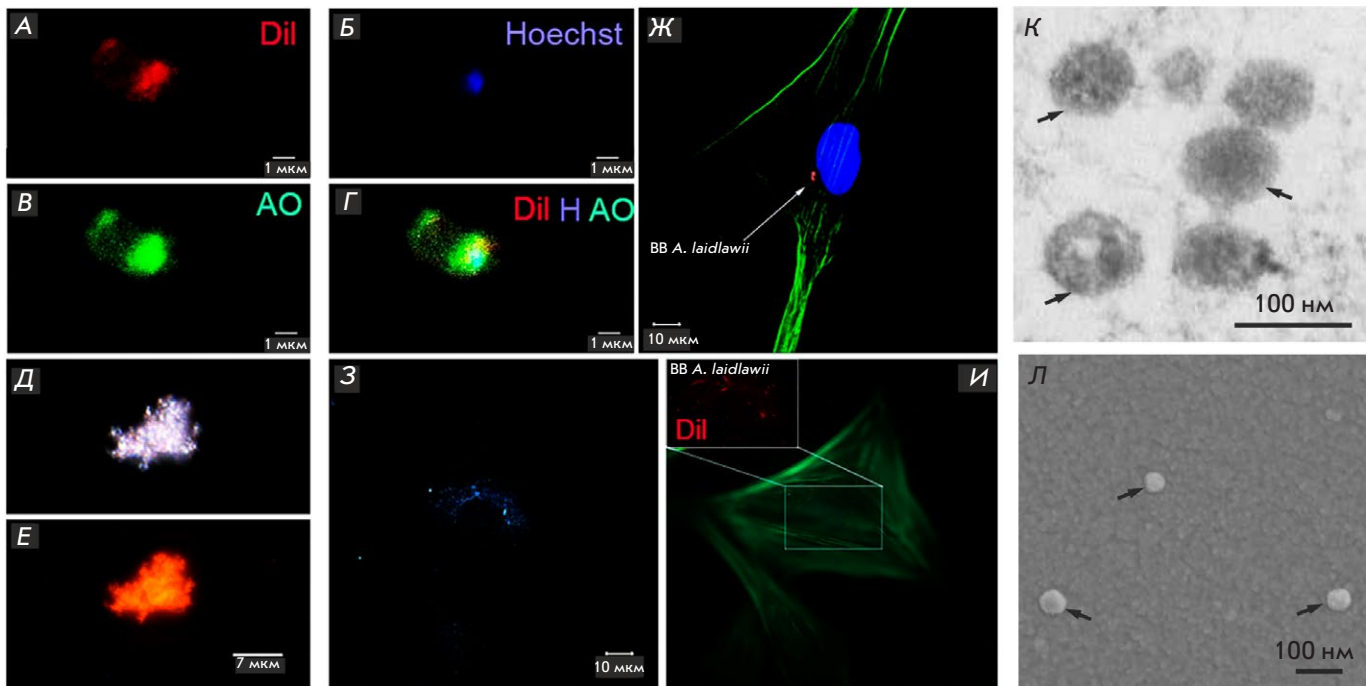
### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Ранее с помощью ПЦР и RNA-Seq нами было показано, что изолированные ВВ *A. laidlawii* PG8B содержат ДНК и РНК [9]. В данной работе установлено, что содержащие РНК ВВ *A. laidlawii* способны проникать в фибробласты кожи человека, культивируемые *in vitro*: ВВ микоплазмы обнаруживаются как в цитоплазме, так и в ядре эукариотических клеток при их совместном инкубировании. На *рис. 1Ж–И* показаны ВВ *A. laidlawii*, визуализируемые внутри клеток эукариот; на *рис. 1К, Л* представлены фотографии изолированных ВВ *A. laidlawii*, полученные с помощью трансмиссивной электронной и сканирующей микроскопии соответственно; на *рис. 2* – детекции ДНК *A. laidlawii* в фибробластах с помощью ПЦР.

Использование разных флуоресцентных красителей позволяет визуализировать ДНК (Hoechst) и РНК (акридиновый оранжевый), а также мембранные липиды (DiI) ВВ *A. laidlawii* (*рис. 1А–В*). Если объект имеет и липидную мембрану, и ДНК, и РНК, то при совмещении соответствующих фотографий регистрируется характерное изменение цветового сигнала, обусловленное наложением флуоресценции, что и наблюдается в случае ВВ микоплазмы (*рис. 1Г*).

Поскольку размеры везикул у *A. laidlawii* (диаметр большинства менее 120 нм) не позволяют визуализировать отдельные везикулы с помощью конфокальной флуоресцентной микроскопии, для анализа везикулярных препаратов мы использовали также варианты микроскопии более высокого разрешения. Так, изображения ВВ *A. laidlawii* получены нами с помощью трансмиссивной электронной (*рис. 1К*) и сканирующей (*рис. 1Л*) микроскопии. Индивидуальные везикулы имеют характерную морфологию. Они представляют собой сферические, окруженные мембраной наноструктуры, размер которых варьирует от 30 до 120 нм.

При использовании темнопольной флуоресцентной микроскопии везикулы микоплазмы регистрируются в виде агрегатов (*рис. 1Д, Е*). Аналогичные изображения получены и для ВВ *Pseudomonas aeruginosa* [10] – окрашенные флуоресцентными красителями (DiO и EdU) изолированные и интернализированные эпителиальными клетками легких A549 ВВ этой бактерии визуализировались при использовании конфокальной лазерной сканирующей



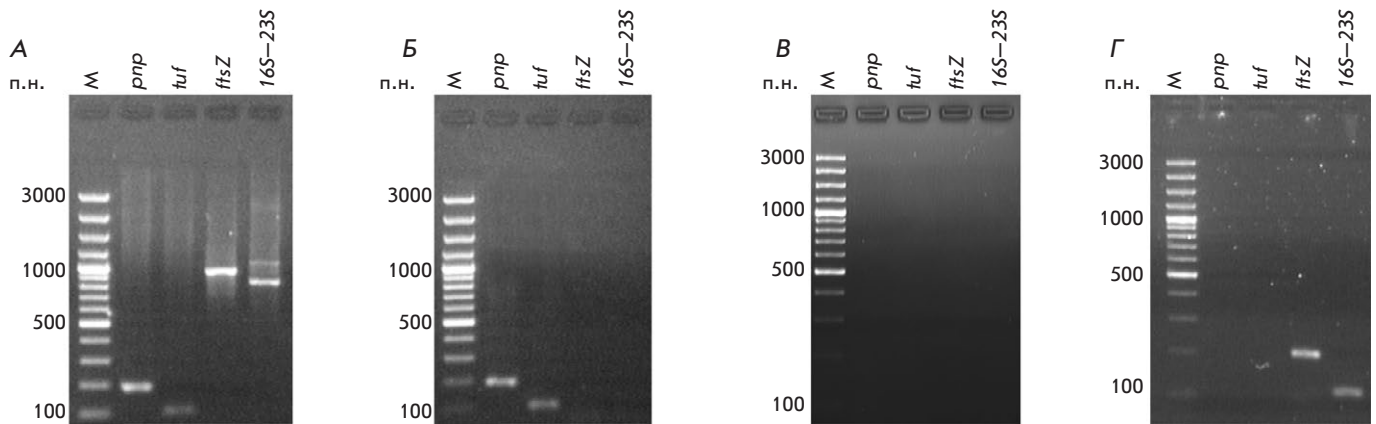
**Рис. 1.** Взаимодействие фибробластов кожи человека с BB *A. laidlawii*. Визуализация изолированных BB *A. laidlawii* (А–Е, К, Л) и инкубированных с HSF (Ж–И). Конфокальная лазерная микроскопия (А–Г, Ж): А – трейсер Dil (окрашивание липидов везикул, красный цвет); Б – Hoechst (окрашивание ДНК везикул, синий цвет); В – акридиноновый оранжевый (АО) (окрашивание РНК везикул, зеленый цвет); Г – совмещенная микрофотография (Dil, Hoechst, АО). Темнопольная (Д, З) и флуоресцентная (Е, И) микроскопия: (Д) агрегат везикул в темном поле и (Е) при флуоресценции трейсера Dil; Ж – флуоресценция BB *A. laidlawii*, окрашенных Dil (красный цвет), в полости HSF. Ядро клеток окрашено DAPI, актиновые филаменты – антителами, конъюгированными с красителем Alexa Fluor 488 (зеленый цвет); З – BB *A. laidlawii* в полости HSF в темном поле и при флуоресценции трейсера Dil (И), актиновые филаменты HSF окрашены антителами, конъюгированными с красителем Alexa Fluor 488 (зеленый цвет). Трансмиссивная электронная (К) и сканирующая (Л) микроскопия BB *A. laidlawii* (стрелки показывают индивидуальные везикулы)

микроскопии в виде скоплений. Это может быть связано с наложением эмиссии используемых красителей от индивидуальных объектов, расположенных рядом друг с другом. Связано ли это также и с особенностями путей интернализации бактериальных ВВ, еще предстоит выяснить.

Короткие РНК бактерий в везикулах могут функционировать как эукариотические микроРНК и подавлять трансляцию за счет связывания с мРНК-мишенями [11]. Это предположение верифицировано в модельных экспериментах с содержащимися в везикулах *P. aeruginosa* короткими РНК, гомологичными тРНК<sup>Met</sup>. Взаимодействие соответствующих везикулярных РНК бактерий приводило к подавлению экспрессии ИЛ-8 и угнетению врожденного звена иммунного ответа, способствующее персистенции микроорганизмов. Ранее мы показали, что ВВ *A. laidlawii* также содержат короткие РНК, в том числе гомологичные тРНК<sup>Met</sup> [9]. Однако достоверные изменения в экспрессии ИЛ-8, а также другого

критичного провоспалительного цитокина – ИЛ-6 – при заражении HSF везикулами микоплазмы в настоящем исследовании не обнаружены ( $22.71 \pm 0.89$  и  $19.69 \pm 2.86$  пг/мл в контроле и опыте для ИЛ-8,  $p < 0.05$ ;  $11.14 \pm 0.22$  и  $11.42 \pm 0.78$  пг/мл в контроле и опыте для ИЛ-6,  $p < 0.05$ ).

Время и уровень изменения экспрессии цитокинов могут существенно варьировать в зависимости от среды, клеточной линии, бактериального штамма, продуцирующего везикулы, количественного соотношения эукариотических клеток и бактериальных везикул. Вреязависимая реакция фибробластов человека на интернализацию *A. laidlawii* и экспрессия цитокинов при этом практически не изучены. Известна только одна работа [12], посвященная анализу вреязависимого изменения транскриптомного профиля клеток человека (HeLa) при интернализации и персистенции клеток микоплазмы (*Mycoplasma hominis*). В этой работе выявлены значимые изменения экспрессии генов ци-



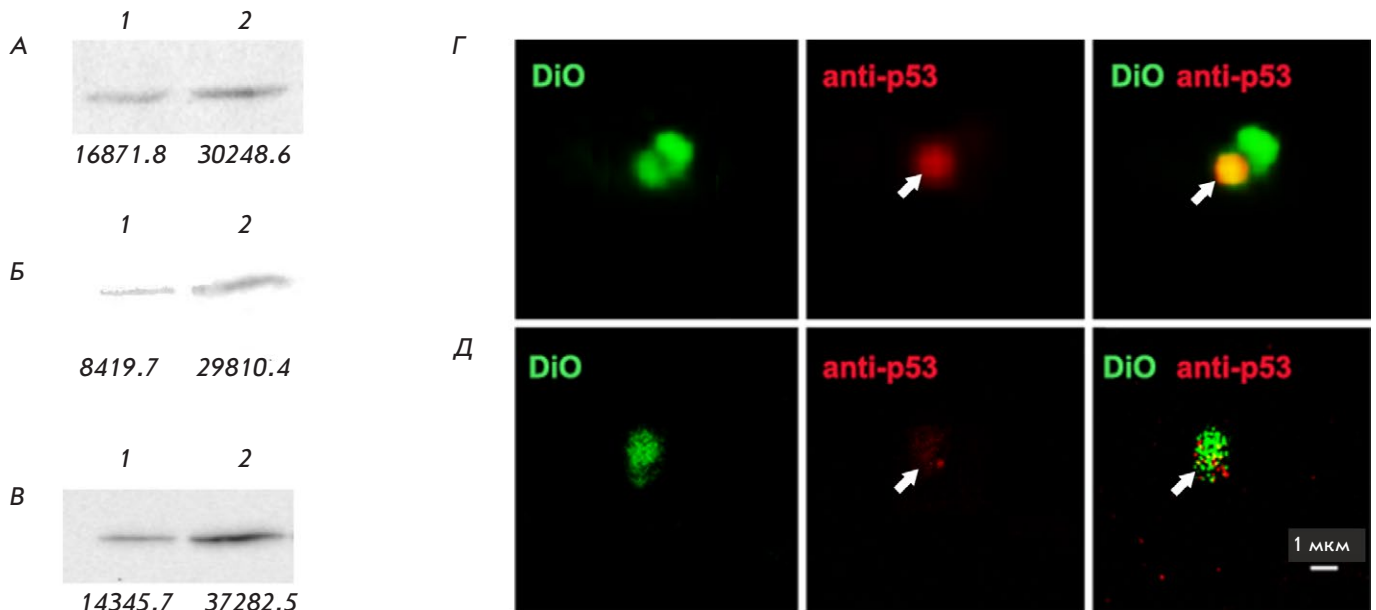
**Рис. 2.** Детекция ДНК *A. laidlawii* в ВВ микоплазмы и HSF с помощью ПЦР. ДНК экстрагирована из клеток *A. laidlawii* (А), ВВ *A. laidlawii* (Б), фибробластов (HSF), инкубированных без/с ВВ *A. laidlawii* (В, Г соответственно). М – маркер длин ДНК. В ПЦР использовали праймеры, специфичные к нуклеотидным последовательностям генов *pnp*, *tuf*, *ftsZ* (кодирующих полирибонуклеотид-нуклеотидилтрансферазу, фактор элонгации Tu, белок деления клетки FtsZ соответственно), а также спейсерному региону 16S–23S рPHK *A. laidlawii*

токинов через 4 и 48 ч после начала совместной инкубации бактериальных и эукариотических клеток: и в том, и в другом случае в стресс-реактивном пуле оказался ген *ИЛ-6*, но не *ИЛ-8*. В этой связи мы проанализировали образцы не только через 4 ч, но также через 48 ч от начала совместной инкубации ВВ микоплазмы и HSF. Обнаружено статистически значимое изменение экспрессии *ИЛ-6* ( $6.42 \pm 0.6$  и  $5.13 \pm 0.28$  пг/мл в контроле и опыте соответственно;  $p < 0.05$ ), но не *ИЛ-8* ( $8.59 \pm 3.23$  и  $17.64 \pm 5.88$  пг/мл в контроле и опыте соответственно;  $p < 0.05$ ). Полученные нами данные указывают на различия в молекулярных механизмах индукции иммунокомпромисса у микоплазм и классических бактерий.

Толерантность врожденного звена иммунитета, ассоциированная с отсутствием оперативной модуляции экспрессии провоспалительных цитокинов (*ИЛ-6* и *ИЛ-8*), не отменяет клеточную реактивность на инфекционный агент – молекулярную сигнатуру заражения можно выявить с помощью современных методов высокого разрешения, в том числе вариантов иммунной электронной микроскопии, а также омикс-профилирования [13]. В результате применения комбинации 2D-DIGE и MALDI-TOF/TOF – технологии протеомного анализа, основанной на использовании двумерного гель-электрофореза полипептидов, окрашенных разными (в контроле и опыте соответственно) флуоресцентными красителями, и последующей идентификации дифференциально представленных белков с помощью MALDI-TOF/TOF и программы Mascot в режиме Peptide Mass Fingerprint, а так-

же инструмента функциональной аннотации DAVID, нами установлено, что заражение HSF внеклеточными везикулами *A. laidlawii* приводит к модуляции протеома фибробластов – изменение представленности белков регистрируется через 4 ч после начала инкубации ВВ микоплазмы с эукариотическими клетками, т.е. когда изменение секреции цитокинов *ИЛ-6* и *ИЛ-8* не обнаруживается. Дифференциально экспрессируемые белки фибробластов (депонированы нами в базу данных ProteomeXchange, № PXD027040) участвуют в фолдинге, формировании цитоскелета, биогенезе ВВ (экзосомы и микровезикулы), иммунореактивности и пролиферации клеток. Большинство идентифицированных белков являются стресс-реактивными, они могут участвовать в клеточном ответе на бактериальные и/или вирусные инфекции [14]. Среди них оказались белки, связанные как с позитивной, так и с негативной регуляцией апоптоза (*TERA*, *LEG1* и *ENPL*, *CH60*, *ANXA5*, *GRP78*, *HSPB1*, *CRYAB* соответственно).

Известные ограничения варианта протеомного анализа 2D-DIGE и MALDI-TOF/TOF (низкокопийные белки не визуализируются при окрашивании гелей, высококопийные белки накладываются и «скрывают» расположенные рядом пятна, сильнощелочные белки плохо изоэлектрофокусируются, высокомолекулярные белки не проходят через поры используемых гелей, низкомолекулярные белки не могут быть эффективно разделены, гидрофобные белки не растворяются в используемом буфере), в том числе в отношении выявления пула дифференциально экспрессированных белков в эукариотической клетке (соотношение визуализируемого,



**Рис. 3.** Детекция белков в фибробластах кожи человека с помощью Вестерн-блоттинга (А–В) и p53 в микровезикулах фибробластов с помощью конфокальной лазерной сканирующей микроскопии (Г, Д). Вестерн-блоттинг белков фибробластов с антителами к β-актину (А), p53 (Б) и HSP7C (В). Дорожки 1 и 2 – белки фибробластов, инкубированных без/с ВВ *A. laidlawii* соответственно. Интенсивность полос определена с помощью ImageJ и указана под дорожками. Белок p53 в микровезикулах, продуцируемых фибробластами кожи человека, инкубированными с (Г) и без (Д) ВВ *A. laidlawii*. Стрелки указывают на сигнал p53

анализируемого, репортируемого и теоретического протеомов существенно отстоит от соотношения в клетках бактерий с маленьким геномом – оптимального для соответствующих исследований) [15, 16], определяют пределы его возможностей – далеко не все белки, дифференциально экспрессирующиеся в эукариотической клетке, могут быть обнаружены при использовании глобального протеомного профилирования. В этой связи для оценки экспрессии актуальных конкретных белков, не вошедших в выявленный стресс-реактивный пул, необходимо проводить дополнительный таргетный анализ, например, с помощью Вестерн-блоттинга, который рекомендуется использовать и для валидации данных глобального протеомного профилирования [17]. Поскольку в пуле идентифицированных белков не оказалось p53 – ключевого игрока исхода про- и антиапоптотических процессов [18], нами проведен таргетный анализ представленности этого белка в фибробластах, а также в секретлируемых фибробластами внеклеточных везикулах (рис. 3). Согласно полученным данным, заражение фибробластов кожи человека везикулами *A. laidlawii* приводит к увеличению количества p53 в клетках и не подавляет его секрецию – p53 обнаруживается

во внеклеточных везикулах фибробластов как контрольных, так и опытных образцов.

Внеклеточные везикулы эукариот включают разные группы секретлируемых во внеклеточное пространство везикул, которые различаются по функциям, размеру, составу и биогенезу – экзосомы, микровезикулы, апоптотические тельца. Микровезикулы образуются при выпячивании плазматической мембраны; диаметр этих структур составляет 100–1000 нм, а плотность 1.25–1.30 г/мл. Апоптотические тельца высвобождаются из плазматической мембраны клеток на поздней стадии апоптоза; диаметр этих структур равен 1–5 мкм, а плотность – 1.18–1.28 г/мл. Экзосомы образуются внутри клеток из поздних эндосом, называемых мультивезикулярными тельцами (при слиянии поздней эндосомы с плазмалеммой экзосомы оказываются за пределами клетки); диаметр этих структур составляет 30–150 нм, а плотность – 1.13–1.21 г/мл [19, 20]. Разница размеров и плотности везикул соответствующих групп определяет относительные возможности их дифференциации: апоптотические тельца можно отличить от более мелких по размеру ВВ (экзосом и микровезикул) с помощью микроскопии, а экзосомы и микровезикулы, благода-



ря разнице в размерах и плотности, разделяются на стадии ультрацентрифугирования и ультрацентрифугирования в градиенте плотности Optiprep. При использованном в нашей работе режиме центрифугирования экзосомы не осаждаются на дно пробирки, а в градиенте плотности находятся выше, чем микровезикулы. Визуализация образцов с помощью микроскопии высокого разрешения позволяет определить размеры структур. Структуры, соответствующие по размерам апоптотическим тельцам, в наших препаратах не были обнаружены – диаметр индивидуальных везикул, выделенных из эукариотических клеток, в исследованных образцах оказался в пределах 200–800 нм, что указывает на возможность их принадлежности к группе микровезикул.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами показано, что ВВ *A. laidlawii* – убиквитарной микоплазмы – основного контаминанта клеточных

культур, способны проникать в эукариотические клетки *in vitro* и модулировать клеточный протеом. Молекулярные механизмы взаимодействия везикул микоплазмы с клетками эукариот и вклад соответствующих наноструктур в молекулярную машинерию клеточной перmissивности еще предстоит выяснить. Выяснение этих механизмов важно как для фундаментальных исследований простейших прокариот, так и практических разработок контроля гипермутабельных бактерий, инфицирующих человека, животных и растения, контаминирующих клеточные культуры и вакцинные препараты. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке государственного задания ФИЦ Казанского научного центра РАН. Авторы выражают благодарность зав. лабораторией защитных механизмов клетки Института цитологии РАН д.б.н. И.В. Гужовой за помощь в проведении таргетного анализа белков.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Browning G., Citti C. Mollicutes: molecular biology and pathogenesis. Caister: Acad. Press, 2014. 333 p.
- Munhoz da Rocha I.F., Amatuzy R.F., Lucena A.C.R., Faoro H., Alves L.R. // Front. Cell Infect. Microbiol. 2020. V. 10. P. 593160.
- Chernov V.M., Mouzykantov A.A., Baranova N.B., Medvedeva E.S., Grygorieva T.Yu., Trushin M.V., Vishnyakov I.E., Sabantsev A.V., Borchsenius S.N., Chernova O.A. // J. Proteomics. 2014. V. 110. P. 117–128.
- Gaurivaud P., Ganter S., Villard A., Manso-Silvan L., Chevret D., Boulé C., Monnet V., Tardy F. // PLoS One. 2018. V. 13. e0208160.
- Iwai K., Minamisawa T., Suga K., Yajima Y., Shiba K. // J. Extracell. Vesicles. 2016. V. 5. P. 30829.
- Mouzykantov A.A., Medvedeva E.S., Baranova N.B., Chernova O.A., Chernov V.M. // Data Brief. 2020. V. 32. P. 106049.
- Akhatova F., Danilushkina A., Kuku G., Saricam M., Culha M., Fakhrullin R. // Bull. Chem. Soc. Jpn. 2018. V. 91. № 11. P. 1640–1645.
- Chernov V.M., Chernova O.A., Medvedeva E.S., Mouzykantov A.A., Ponomareva A.A., Shaymardanova G.F., Gorshkov O.V., Trushin M.V. // J. Proteomics. 2011. V. 74. № 12. P. 2920–2936.
- Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., Medvedeva E.S., Baranova N.B., Malygina T.Y., Aminov R.I., Trushin M.V. // FEMS Microbiol. Lett. 2018. V. 365. № 18. P. 185.
- Bitto N.J., Chapman R., Pidot S., Costin A., Lo C., Choi J., D’Cruze T., Reynolds E.C., Dashper S.G., Turnbull L., et al. // Sci. Rep. 2017. V. 7. P. 7072.
- Koeppen K., Hampton T.H., Jarek M., Scharfe M., Gerber S.A., Mielcarz D.W., Demers E.G., Dolben E.L., Hammond J.H., Hogan D.A., et al. // PLoS Pathog. 2016. V. 12. e1005672.
- Hopfe M., Deenen R., Degrandi D., Köhrer K., Henrich B. // PLoS One. 2013. V. 8. e54219.
- Chernov V.M., Chernova O.A., Mouzykantov A.A., Lopukhov L.L., Aminov R.I. // Expert Opin. Drug Discov. 2019. V. 14. № 5. P. 455–468.
- Wan Q., Song D., Li H., He M.L. // Signal Transduct. Target Ther. 2020. V. 5. № 1. P. 125.
- Westermeier R., Naven T. Proteomics in Practice. Weinheim: WILEY-VCH, 2002.
- Wasinger V.C., Pollack J.D., Humphery-Smith I. // Eur. J. Biochem. 2000. V. 267. P. 1571–1582.
- Poli G., Ceni E., Armignacco R., Ercolino T., Canu L., Baroni G., Nesi G., Galli A., Mannelli M., Luconi M. // Oncotarget. 2015. V. 6. P. 5695–5706.
- Aubrey B.J., Kelly G.L., Janic A., Herold M.J., Strasser A. // Cell Death Differ. 2018. V. 25. № 1. P. 104–113.
- Cesselli D., Parisse P., Aleksova A., Veneziano C., Cervellin C., Zanello A., Beltrami A.P. // Front. Physiol. 2018. V. 9. P. 1394.
- Zhang Y., Liu Y., Liu H., Tang W.H. // Cell Biosci. 2019. V. 9. P. 19.

УДК 577.032.22;577.175.82; 611.81.013

# Сравнительный анализ содержания моноаминов как нейрогормонов в ликворе и крови крыс в онтогенезе

А. Р. Муртазина, Н. С. Бондаренко, Т. С. Пронина, К. И. Чандрян, В. В. Богданов, Л. К. Дильмухаметова, М. В. Угрюмов\*

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

\*E-mail: michael.ugrumov@mail.ru

Поступила в редакцию 12.07.2021

Принята к печати 15.10.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11516

**РЕФЕРАТ** Ликвор желудочков мозга содержит многочисленные физиологически активные вещества нейронального происхождения, которые в качестве нейрогормонов могут участвовать в объемной нейротрансмиссии в перивентрикулярной области мозга. Нами проведен сравнительный анализ уровня моноаминов в ликворе и крови крыс в онтогенезе как показателя возрастных особенностей их поступления в указанные гуморальные среды и участия в качестве нейрогормонов в объемной нейротрансмиссии в мозге. Показано, что ликвор взрослых крыс и крыс в перинатальном периоде содержит функционально наиболее значимые моноамины – дофамин, норадреналин и серотонин. Из сопоставления концентраций моноаминов в ликворе и в крови животных разных возрастных групп следует, что моноамины, содержащиеся в ликворе, имеют преимущественно нейрональное (мозговое) происхождение и практически не поступают из общей системы циркуляции. Кроме того, показано, что в ликворе моноамины присутствуют в физиологически активной концентрации, в которой они могут действовать как нейрогормоны в обратимой объемной нейротрансмиссии в мозге взрослых животных и в регуляции развития мозга в перинатальном периоде.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** крыса, мозг, ликвор, плазма, моноамины, онтогенез.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** 3-МТ – 3-метокситирамин; 5-ГТ – 5-гидрокситриптамин (серотонин); А – адреналин; АД – альдегиддегидрогеназа; ГВК – гомованилиновая кислота; ГИУК – 5-гидроксииндолуксусная кислота; ДВГ – дофамин-β-гидроксилаза; ДА – дофамин; ДГБА – 3,4-дигидроксибензиламин; ДОФУК – 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота; КОМТ – катехол-О-метилтрансфераза; МАО – моноаминоксидаза; НА – норадреналин; П – постнатальный день; ФМТ – фенилэтанолламин-N-метилтрансфераза; Э – эмбриональный день.

## ВВЕДЕНИЕ

Важную роль в регуляции работы мозга в виде объемной нейротрансмиссии (действие на всю поверхность нейрона) и синаптической нейротрансмиссии (действие в области синапса) играют моноамины – дофамин, норадреналин и серотонин, продуцируемые нейронами мозга [1]. У взрослых животных моноамины в мозге обеспечивают обратимую ауторегуляцию синтезирующих их нейронов, а также регуляцию нейронов-мишеней другой ергичности. В перинатальном периоде онтогенеза моноамины, действуя на те же самые рецепторы на нейронах-мишенях, оказывают необратимое морфогенетическое влияние на развитие этих нейронов и мозга в целом [2–5].

Опубликованы доказательства того, что моноамины нейронального происхождения, содержащи-

еся в ликворе желудочков мозга, поступают в мозг и участвуют в объемной нейротрансмиссии в качестве нейрогормонов, чему способствует отсутствие для них ликвор-энцефалического барьера [1, 6]. Хотя моноамины также синтезируются в периферических органах и поступают в кровеносные сосуды, их нейрогормональное влияние на мозг возможно только до закрытия гематоэнцефалического барьера, что происходит в раннем постнатальном периоде [7]. Тем не менее, незначительный обмен моноаминов между ликвором и кровью возможен в течение всего онтогенеза – в области (а) хориоидных сплетений в боковых желудочках, где вещества поступают из плазмы в ликвор; (б) в месте перехода желудочков в каудальную область мозга в сосудистую систему; (в) в циркумвентрикулярных органах мозга, лишенных гематоэнцефалического барьера [7, 8].

Несмотря на обилие работ, констатирующих наличие физиологически активных веществ, включая моноамины, в ликворе и в крови, до сих пор не изучена динамика изменений уровня моноаминов в этих гуморальных средах в онтогенезе. Кроме того, отсутствует оценка градиента концентраций моноаминов на границе ликвор–кровь на различных этапах онтогенеза. Учитывая наши последние данные об отсутствии ликвор–энцефалического барьера для моноаминов в онтогенезе крыс [9], концентрация моноаминов в межклеточном пространстве в перивентрикулярной области мозга должна быть такой же, как в ликворе. Получение ответа на поставленные вопросы позволит определить, на каких этапах онтогенеза концентрация моноаминов в ликворе достаточно высока для их участия в качестве нейрого르몬ов в регуляции функционирования и развития мозга.

Исходя из вышеизложенного, цель нашей работы состояла в проведении сравнительного анализа уровня моноаминов в ликворе и в крови крыс в онтогенезе как показателя возрастных особенностей их поступления в указанные гуморальные среды и участия в качестве нейрого르몬ов в объемной нейротрансмиссии в мозге. Для достижения цели поставлены следующие задачи: (а) определить концентрацию моноаминов (дофамина, норадреналина, адреналина и серотонина) как показателя секреторной активности соответствующих нейронов в ликворе крыс на 18-й эмбриональный день (Э18), на 5-й постнатальный день (П5) и П30; (б) определить концентрацию моноаминов у тех же животных в плазме; (в) оценить соотношение концентрации моноаминов в ликворе и в плазме как интегрального показателя существования барьеров для моноаминов между желудочками мозга и общей системой циркуляции.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Животные

В работе использованы крысы Вистар – самки и самцы на 18-й эмбриональный день (Э18), самцы на 5-й постнатальный день (П5) и на П30 (рис. 1). Для получения датированного потомства использованы беременные самки крыс весом 250–350 г. День обнаружения сперматозоидов во влагалищных мазках принимали за Э1, а день родов – П1. Животных содержали в стандартных условиях вивария при свободном доступе к пище и воде и 12-часовом режиме день–ночь. Эксперименты проводили в соответствии с требованиями Национальных институтов здоровья (NIH Guide for the Care and Use of Laboratory Animals) и комитета по биоэтике Института биологии развития им. Н.К. Кольцова (протокол № 3 от 10.09.2020 и протокол № 44 от 24.12.2020).

Все манипуляции с животными проводили под наркозом хлоралгидратом (Sigma, США) в дозе 100 мг/кг на П5, 400 мг/кг на П30 и Э18 или 1% изофлурана на П30 (Laboratorios Karizoo, Испания).

### Получение ликвора и крови крыс на Э18, П5 и П30

У крыс на Э18 ( $n = 112$ ), П5 ( $n = 30$ ) и П30 ( $n = 20$ ) получали ликвор (рис. 1). Крысам на 18-й день беременности проводили лапаротомию, плоды извлекали из матки, не прерывая целостности пупочного канатика. После этого в каждый из боковых желудочков плодов по ранее описанной методике вводили стеклянную микроканюлю [10], соединенную тefлоновой трубкой с гамильтоновым шприцом, заполненным физраствором. Кончик канюли заполняли небольшим пузырьком воздуха, чтобы физраствор не смешался с ликвором. Из обоих же-

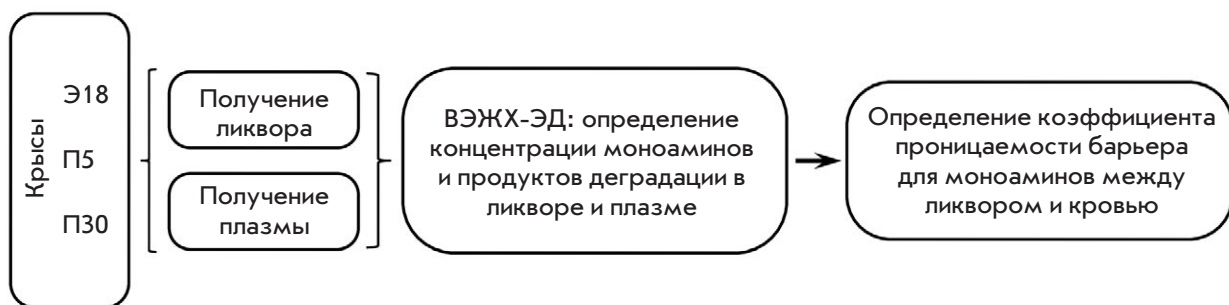


Рис. 1. Схема экспериментов на крысах на 18-й эмбриональный день (Э18), 5-й постнатальный день (П5) и П30: получение ликвора и плазмы крови, определение концентрации моноаминов и продуктов деградации в ликворе и плазме, определение коэффициента проницаемости барьера ликвор–кровь для моноаминов. ВЭЖХ-ЭД – высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией

лудочков плода получали в среднем  $1.5 \pm 0.5$  мкл ликвора.

Ликвор у крыс на П5 и П30 получали из цистерны магна по ранее описанной методике [11]. Для этого голову животного фиксировали в стереотаксическом приборе (NarishigeLab, Япония) и обеспечивали доступ к цистерне магна. После этого в цистерну магна стереотаксически вводили стеклянную микроканюлю, соединенную с гамильтоновым шприцом, используя описанную выше систему. От каждой крысы на П5 получали  $25 \pm 10$  мкл, а на П30 –  $55 \pm 15$  мкл ликвора. В образцы ликвора добавляли  $\text{HClO}_4$  в конечной концентрации 0.1 М и 3,4-дигидроксифениламин (ДГБА) (Sigma, США) – внутренний стандарт для определения моноаминов и продуктов деградации – в конечной концентрации 25 пмоль. В качестве одного образца на Э18 использовали ликвор, полученный от 14 плодов, а на П5 и П30 – ликвор от трех животных. Ликвор замораживали в жидком азоте и хранили при  $-70^\circ\text{C}$  до определения моноаминов (дофамина, норадреналина и серотонина), а также основных продуктов их деградации – 3,4-дигидроксифенилуксусной кислоты (ДОФУК), 3-метокситирамина (3-МТ), гомованилиновой кислоты (ГВК) и 5-гидроксииндолуксусной кислоты (ГИУК) (рис. 2).

На П30 ликвор получали не только из цистерны магна, но из боковых желудочков. С этой целью крысам ( $n = 4$ ) под изофлурановым наркозом в боковой желудочек мозга стереотаксически по рассчитанным в соответствии с атласом мозга [12] координатам ( $-0.4$  мм каудальнее и  $1.4$  мм латеральнее брегмы;  $2.2$  мм вглубь) вводили направляющую канюлю для микродиализного зонда (СМА-11 Guide Cannula, СМА, Швеция). Канюлю фиксировали на кости черепа с помощью микроболтов и стоматологического полимера («Протакрил-М», Украина). Через 48 ч в направляющую канюлю вводили микродиализный зонд (СМА 11 55 kDa Microdialysis Probe, СМА, Швеция), заполненный искусственным ликвором (мМ):  $147 \text{ NaCl}$ ;  $2.7 \text{ KCl}$ ;  $1 \text{ MgCl}_2$ ;  $1.2 \text{ CaCl}_2$ . С помощью тефлоновых трубочек зонд подсоединяли к насосу для микродиализа СМА 4004 (СМА, Швеция). Микродиализ начинали через 3 ч после введения зонда – боковые желудочки перфузировали в течение 20 мин со скоростью 2 мкл/мин. К полученному диализату добавляли 4 мкл 1 н.  $\text{HClO}_4$ , замораживали в жидком азоте и хранили при  $-70^\circ\text{C}$  до определения моноаминов и продуктов деградации (рис. 2).

После получения ликвора инсулиновым шприцом собирали кровь из левого желудочка сердца тех же животных под хлоралгидратным наркозом. У животного на Э18 объем получаемого образца крови был равен  $30 \pm 5$  мкл, на П5 –  $100 \pm 10$  мкл

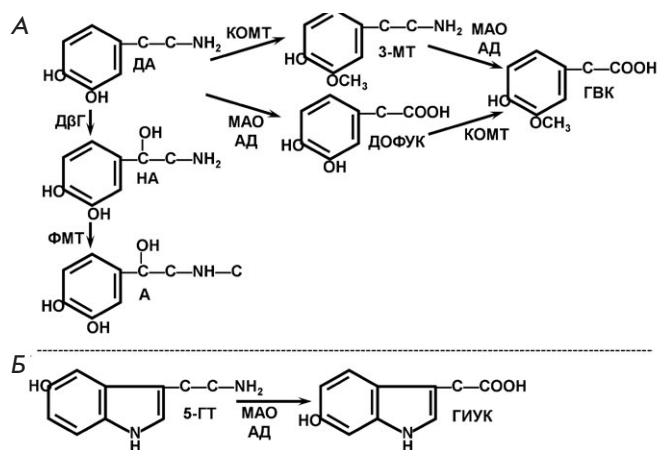


Рис. 2. Схемы синтеза катехоламинов и деградации дофамина (А) и деградации серотонина (Б). ДА – дофамин; НА – норадреналин; А – адреналин; ДОФУК – 3,4-дигидроксифенилуксусная кислота; 3-МТ – 3-метокситирамин; ГВК – гомованилиновая кислота; 5-ГТ – 5-гидроксиทริปтамин (серотонин); ГИУК – 5-гидроксииндолуксусная кислота

и на П30 –  $2000 \pm 20$  мкл. В образцы крови добавляли 5% этилендиаминтетрауксусной кислоты (Sigma, США) и 10% метабисульфита натрия (Sigma). Образцы центрифугировали при  $1350 g$  (10 мин,  $4^\circ\text{C}$ ) и собирали супернатант (плазму), в который добавляли 10% 1 н.  $\text{HClO}_4$  и 25 пмоль ДГБА. Плазму центрифугировали при  $16500 g$  в течение 20 мин при  $4^\circ\text{C}$ , супернатант замораживали в жидком азоте и хранили при  $-70^\circ\text{C}$  до определения моноаминов и продуктов деградации (рис. 2).

### Высокоэффективная жидкостная хроматография с электрохимической детекцией

Концентрацию моноаминов и продуктов их деградации в ликворе, плазме и в микродиализатах определяли с помощью высокоэффективной жидкостной хроматографии с электрохимической детекцией. Пробы ликвора и плазмы делили на две части. Одну часть экстрагировали, осаждая катехоламины и продукты деградации на оксиде алюминия, вторую часть использовали в неосажденном виде для измерения серотонина и ГИУК. Микродиализаты использовали в неосажденном виде.

Определяемые вещества разделяли с использованием обращенно-фазовой колонки ReproSil-Pur, ODS-3 размером  $4 \times 100$  мм с диаметром пор 3 мкм (Dr.Majsch GmbH, Германия) при температуре  $28^\circ\text{C}$  и скорости подвижной фазы 1 мл/мин, поддерживаемой жидкостным хроматографом LC-20ADsp (Shimadzu, Япония) при потенциале 850 мВ. В качестве подвижной фазы использовали 0.1 М цитратно-



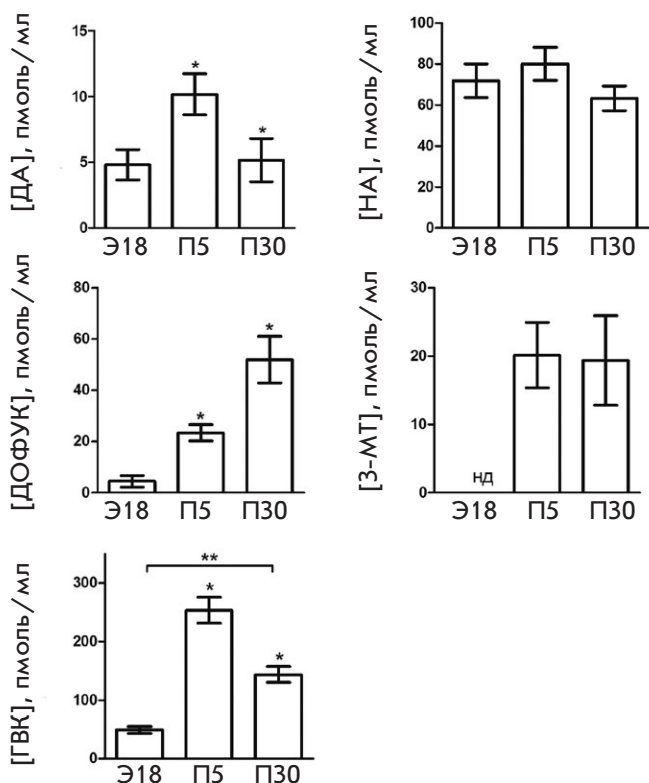


Рис. 3. Концентрация катехоламинов и продуктов деградации в ликворе крыс на Э18, П5 и П30. \* $p < 0.05$ , сравнение с предыдущим возрастом; \*\* $p < 0.05$ , сравнение выбранных параметров; нд – не детектируется. Здесь и далее сокращения как на рис. 2

фосфатный буфер pH 2.58 (0.3 мМ октансульфонат натрия, 0.1 мМ EDTA и 8% ацетонитрила) (все реактивы Sigma). Определение моноаминов проводили с помощью электрохимического детектора Decade II (AntecLeyden, Нидерланды) со стеклоуглеродным рабочим электродом (0.85 В) и хлорсеребряным электродом сравнения. Пики моноаминов и метаболитов определяли по времени их выхода в стандартном растворе.

### Статистика

Данные обрабатывали в программе GraphPadPrism 6.0 (GraphPad Software, США) и представляли как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего ( $\text{mean} \pm \text{SEM}$ ). Различия считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ ;  $0.05 < p < 0.1$  расценивали как тенденцию к изменению, при  $p > 0.1$  различия считали недостоверными. Статистическую значимость результатов определяли с использованием параметрического  $t$ -критерия Стьюдента ( $t$ -тест) и непараметрического  $U$ -критерия Манна–

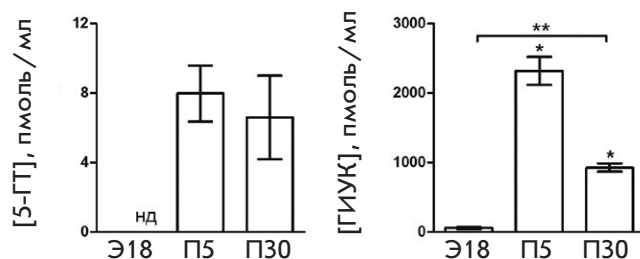


Рис. 4. Концентрация серотонина и продукта деградации в ликворе крыс на Э18, П5 и П30. \* $p < 0.05$ , сравнение с предыдущим возрастом; \*\* $p < 0.05$ , сравнение выбранных параметров; нд – не детектируется

Уитни ( $U$ -тест), для множественных сравнений применяли поправку Бонферрони.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Концентрация катехоламинов, серотонина и продуктов их деградации в ликворе в цистерне magna крыс в онтогенезе

Концентрация дофамина на Э18 равна примерно 5 пмоль/мл, причем она удваивается на П5, а на П30 становится такой же, как у плодов (рис. 3).

Концентрация норадреналина в течение всего изученного периода онтогенеза не изменяется, оставаясь во всех возрастных группах на высоком уровне – около 70 пмоль/мл. В отличие от дофамина и норадреналина, адреналин в ликворе не определяется ни в пренатальном, ни в постнатальном периоде.

В ликворе крыс всех возрастных групп наряду с катехоламинами выявлены продукты их деградации – 3-МТ (кроме Э18), ДОФУК и ГВК (рис. 3). Хотя 3-МТ не определяется у плодов, на П5 и П30 он содержится в ликворе в довольно высокой концентрации – около 20 пмоль/мл. В отличие от 3-МТ, ДОФУК определяется уже на Э18 (почти 4.5 пмоль/мл). На П5 этот показатель возрастает примерно в 5 раз, а на П30 снижается на 55%. При этом конечный продукт деградации дофамина – ГВК – определяется в ликворе в значительной концентрации (почти 50 пмоль/мл) уже на Э18. На П5 этот показатель возрастает примерно в 5 раз, а на П30 снижается на 45%.

Серотонин не определяется в ликворе крыс на Э18, однако на П5 и П30 он содержится в ликворе в довольно высокой концентрации – 8 пмоль/мл (рис. 4). При этом на Э18 концентрация конечного продукта деградации серотонина – ГИУК – достаточно высокая, а на П5 концентрация ГИУК превышает концентрацию серотонина почти в 300 раз.

К П30 концентрация ГИУК в ликворе снижается более чем в 2 раза по сравнению с П5 (рис. 4).

**Моноамины и продукты деградации в боковых желудочках крыс на 30-й постнатальный день**

В боковых желудочках мозга крыс на П30 из всех измеряемых моноаминов и продуктов деградации с помощью микродиализа удалось выявить только ДОФУК и ГИУК. Для установления базового уровня измеряемых веществ проводили не менее трех измерений. Измеренные в диализатах концентрации ДОФУК составляют:  $5.2 \pm 1.1$  пмоль/мл, а ГИУК –  $105.7 \pm 14.8$  пмоль/мл.

**Концентрация катехоламинов, серотонина и продуктов их деградации в плазме крыс в онтогенезе**

Концентрация дофамина в плазме крыс на Э18 не превышает 0.4 пмоль/мл, на П5 этот показатель возрастает в 6 раз, а к П30 снижается примерно в 2 раза (рис. 5). Концентрация норадреналина меняется в онтогенезе примерно так же, как и концентрация дофамина – с Э18 до П5 возрастает в 3.5 раза, а затем к П30 снижается в 3 раза. При этом во всех возрастных группах концентрация норадреналина на порядок выше, чем дофамина. В отличие от ликвора, в плазме определяется адреналин, концентрация которого возрастает с Э18 по П5 более чем в 50 раз, а к П30 снижается в 2.5 раза. Наряду с катехоламином в плазме обнаружены продукты их деградации. Так, 3-МТ определяется в плазме только на П30, а ДОФУК (в небольшой концентрации) уже на Э18. К П5 происходит многократное увеличение концентрации ДОФУК, и на этом уровне она сохраняется на П30. Концентрация ГВК – конечного продукта деградации дофамина, возрастает более чем в 4 раза с Э18 по П5, а к П30 становится ниже, чем у плодов (рис. 5).

Концентрация серотонина в плазме на Э18 равна примерно 5.5 пмоль/мл (рис. 6). К П5 этот показатель возрастает в 85 раз, а на П30 почти возвращается к эмбриональному уровню. Аналогичным образом изменяется и концентрация ГИУК: с Э18 по П5 возрастает в 10 раз, а на П30 становится в 2 раза ниже, чем в эмбриональный период.

**Соотношение концентраций моноаминов и продуктов их деградации в ликворе и в плазме крови крыс в онтогенезе**

Во всех возрастных группах концентрация дофамина, норадреналина и продуктов деградации в ликворе многократно превышает их концентрацию в плазме (рис. 7А). Однако пик различий приходится на разные периоды онтогенеза. Так, пик

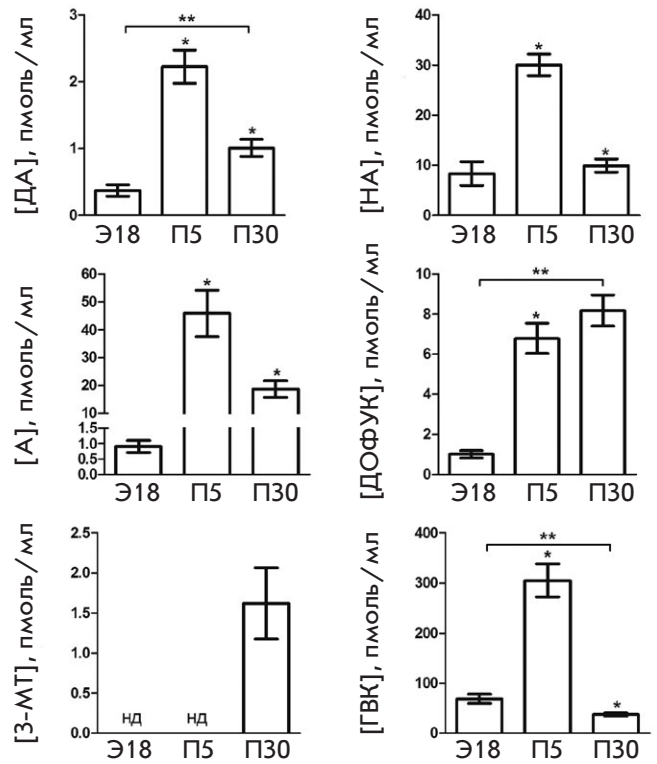


Рис. 5. Концентрация катехоламинов и продуктов деградации в плазме крыс на Э18, П5 и П30. \* $p < 0.05$ , сравнение с предыдущим возрастом; \*\* $p < 0.05$ , сравнение выбранных параметров; нд – не детектируется

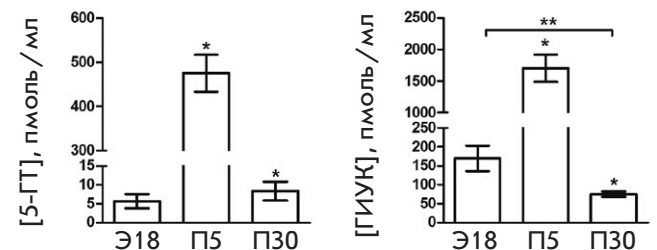


Рис. 6. Концентрация серотонина и продукта деградации в плазме крыс на Э18, П5 и П30. \* $p < 0.05$ , сравнение с предыдущим возрастом; \*\* $p < 0.05$ , сравнение выбранных параметров

дофамина и норадреналина наблюдается на Э18, а у ДОФУК, 3-МТ и ГВК – на П30.

Концентрация серотонина на П30 и ГИУК на П5 и П30 в ликворе превышает концентрацию этих веществ в плазме (рис. 7Б). Следует отметить, что на П5 концентрация серотонина в ликворе в 60 раз ниже, чем в плазме.

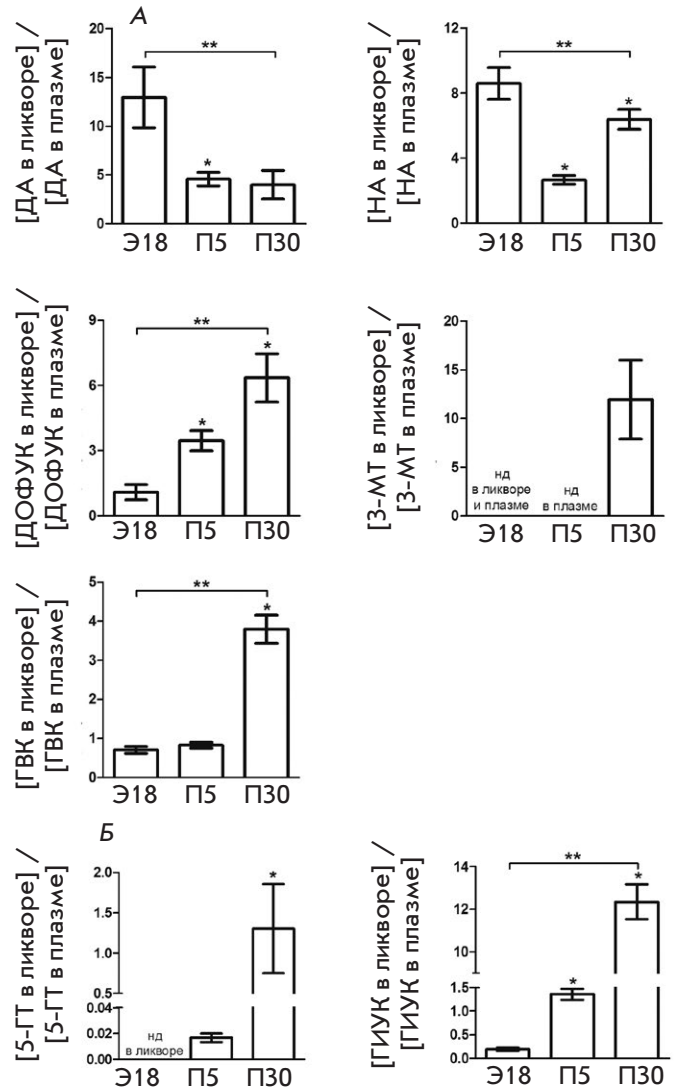
**ОБСУЖДЕНИЕ**

Ключевой задачей данной работы было проведение сравнительного анализа уровня моноаминов в ликворе и крови крыс в онтогенезе как показателя возрастных особенностей поступления этих соединений в эти гуморальные среды и участия в качестве нейрогормонов в регуляции функционирования и развития мозга. В этом контексте особое внимание уделено ликвору как гуморальной среде, в которую, с одной стороны, из мозга поступают моноамины, а с другой – моноамины в отсутствие ликвор-энцефалического барьера поступают из ликвора в перивентрикулярную область мозга, участвуя в качестве нейрогормонов в объемной нейротрансмиссии. Исторической предпосылкой для предположения о поступлении физиологически активных веществ из мозга в ликвор послужило обнаружение ликвор-контактирующих нейронов [8, 13].

**Содержащиеся в ликворе моноамины как нейрогормоны – потенциальные участники объемной нейротрансмиссии и морфогенетического контроля развития мозга**

Несмотря на то, что в нейронах мозга синтезируются десятки нейротрансмиттеров и нейромодуляторов, наиболее широко распространенными по мозгу классическими нейротрансмиттерами являются моноамины – дофамин, норадреналин и серотонин. У взрослых животных они вовлечены в регуляцию функциональной активности нейронов-мишеней, а в перинатальном периоде – в регуляцию развития нейронов и мозга в целом [2–5].

Исходя из представлений о качественных различиях в действии моноаминов на различных этапах онтогенеза, концентрацию моноаминов определяли в ликворе крыс в трех возрастных периодах. В первую возрастную группу входили крысы на Э18, поскольку к этому времени: (а) заканчивается образование нейронов из клеток-предшественников; (б) дифференцирующиеся нейроны мигрируют в места их окончательной локализации в мозге; (в) нейроны экспрессируют специфический фенотип; (г) аксоны дифференцирующихся нейронов начинают достигать желудочков мозга и кровеносных сосудов в циркумвентрикулярных органах, формируя пути поступления нейрогормонов в ликвор (аксо-вентрикулярные контакты) и в кровеносные сосуды (аксо-вазальные контакты) соответственно. Вторая возрастная группа включала крыс на П5. К этому времени: (а) заканчивается миграция дифференцирующихся нейронов в места их окончательной локализации; (б) заканчивается формирование аксо-вентрикулярных и аксо-вазальных контактов; (в) продолжает формироваться афферентная синапти-



**Рис. 7.** Соотношение концентраций катехоламинов (А), серотонина (Б) и продуктов деградации (А, Б) в ликворе и плазме крови крыс на Э18, П5 и П30. \* $p < 0.05$ , сравнение с предыдущим возрастом; \*\* $p < 0.05$ , сравнение выбранных параметров; nd – не детектируется

ческая иннервация нейронов. И, наконец, в третью возрастную группу вошли крысы на П30. К этому времени: (а) заканчивается формирование синаптических контактов; (б) заканчивается формирование гематоэнцефалического барьера, препятствующего проникновению большинства нейротрансмиттеров нелипидной природы из мозга в кровь и обратно [14–17].

С позиции представления о нейрогормональном действии моноаминов, содержащихся в ликворе, на нейроны мозга-мишени, важнейшим функцио-

нальным показателем считается концентрация моноаминов в ликворе. Действительно, в проведенных ранее, в основном *in vitro*, работах показано, что моноамины оказывают нейротрансмиттерное влияние на нейроны в широком диапазоне концентраций – от  $10^{-11}$  до  $10^{-8}$  М [18]. При этом *in vivo* моноамины способны влиять на нейроны в еще более низкой концентрации [19–21].

На первом этапе нашей работы необходимо было определить, изменяется ли качественный состав и концентрация моноаминов по ходу тока ликвора из боковых желудочков, где ликвор образуется в результате «фильтрации» плазмы крови из сосудов хориоидного сплетения до цистерны magna – каудального отдела желудочковой системы. Для этого у крыс на П30 был сопоставлен состав моноаминов и продуктов их деградации в ликворе боковых желудочков, получаемом с помощью микродиализа, и в ликворе цистерны magna, получаемом с помощью микроканюли. При этом в цистерне magna обнаружены все детектируемые нами моноамины и продукты их деградации, а в боковых желудочках только некоторые продукты их деградации – ДОФУК и ГИУК. Эти данные свидетельствуют о том, что моноамины поступают в ликвор не из плазмы сосудов хориоидного сплетения и нервной ткани, окружающей боковые желудочки, а в основном из нервной ткани каудальнее боковых желудочков мозга.

В дальнейшей работе определили состав ликвора, полученного только из цистерны magna. Катехоламины – дофамин и норадреналин, выявлены в ликворе крыс всех возрастных групп, однако динамика изменения их концентрации с возрастом существенно меняется. Так, норадреналин содержится в ликворе в значительной концентрации на Э18 ( $7.2 \times 10^{-8}$  М), и этот показатель не меняется на П5 ( $8 \times 10^{-8}$  М) и П30 ( $6.3 \times 10^{-8}$  М). Полученные данные свидетельствуют о том, что норадренергические нейроны секреторируют моноамины в ликвор в пренатальном и в постнатальном периодах. Это предположение подтверждается тем, что по данным *in vitro* норадреналин приблизительно в такой же концентрации, как и в ликворе, способен оказывать нейротрансмиттерный эффект на нейроны взрослых крыс [22–24]. Учитывая также то, что рецепторы к норадреналину, как и к другим моноаминам, экспрессируются еще в пренатальном периоде [25–27], наши данные позволяют предположить, что норадреналин, содержащийся в ликворе, способен в качестве нейрогормона не только участвовать в объемной нейротрансмиссии у взрослых животных, но и оказывать морфогенетическое влияние на нейроны мозга в перинатальном периоде.

Возрастная динамика изменений концентраций дофамина и норадреналина в ликворе имеет принципиальные отличия. Во-первых, на Э18 концентрация дофамина в ликворе ( $0.3 \times 10^{-9}$  М) как минимум на порядок меньше, чем норадреналина ( $0.48 \times 10^{-8}$  М), что, однако, не уменьшает вероятность его морфогенетического влияния на нейроны-мишени. К П5 концентрация дофамина в ликворе увеличивается вдвое ( $1 \times 10^{-8}$  М), хотя и остается значительно ниже, чем концентрация норадреналина. Следует отметить, что концентрация дофамина могла бы возрасти в перинатальном периоде (Э18–П5) намного больше, если бы одновременно не повысилась активность ферментов деградации дофамина – MAO и КОМТ. Об этом свидетельствует значительное увеличение концентрации продуктов ферментативной активности MAO и КОМТ – ДОФУК, 3-МТ и ГВК в перинатальном периоде. Тем не менее, увеличение концентрации дофамина в ликворе к П5 существенно повышает вероятность его морфогенетического влияния на дифференцирующиеся нейроны-мишени и развивающийся мозг в целом [28]. Второе отличие возрастной динамики концентрации дофамина в ликворе от динамики норадреналина – снижение концентрации дофамина к П30 в 2 раза по сравнению с П5. Это важный, хотя и косвенный показатель того, что содержащийся в ликворе дофамин может оказывать морфогенетическое влияние на нейроны-мишени, причем в основном в раннем постнатальном периоде.

Возрастная динамика концентрации серотонина в ликворе существенно отличается от динамики катехоламинов. Так, серотонин практически не определяется в ликворе на Э18, тогда как к П5 его концентрация приближается к концентрации дофамина. Концентрация серотонина в ликворе могла бы вырасти к П5 в еще большей степени, если бы не существенное повышение в это время активности фермента деградации серотонина – MAO, на что указывает высокий уровень продукта его ферментативной активности – ГИУК. На таком же уровне концентрация серотонина сохраняется и на П30. Из приведенных данных следует, что содержащийся в ликворе серотонин может участвовать как в объемной нейротрансмиссии в постнатальном периоде, так и в регуляции развития нейронов-мишеней и мозга в целом в раннем постнатальном периоде у крыс.

#### **Мозг – единственный источник моноаминов в ликворе в онтогенезе**

Как показано в нашей работе, ликвор крыс на П5 и П30 содержит моноамины в физиологически активной концентрации, причем, в отличие от се-



ротонина, катехоламины присутствуют в ликворе и на Э18. Однако эти данные не могут служить прямым доказательством того, что мозг является единственным источником моноаминов в ликворе. Действительно, в отсутствие гематоэнцефалического барьера для моноаминов в перинатальном периоде [14, 29, 30], а также при возможности обмена веществ между ликвором и кровью в области хориоидного сплетения в боковых желудочках, в циркуляторных органах и в области каудального венозного синуса даже у взрослых животных [7], нельзя исключить, что моноамины поступают в ликвор не только из нейронов мозга, но и из кровотока. Тем более, что на периферии имеются такие мощные источники моноаминов, как надпочечники, желудочно-кишечный тракт и симпатическая нервная система [31–33].

Ответить в первом приближении на вопрос, является ли мозг единственным источником моноаминов в ликворе, можно, рассчитав интегральный показатель проницаемости всех возможных барьеров на пути моноаминов из крови в ликвор в виде отношения концентрации моноаминов в ликворе и в крови. При этом могут рассматриваться три варианта: (1) коэффициент проницаемости приближается к единице, указывая на отсутствие барьера между ликвором и кровью; (2) коэффициент проницаемости больше единицы, что свидетельствует о барьерном препятствии поступления моноаминов из ликвора в кровь; (3) коэффициент проницаемости меньше единицы, что свидетельствует о барьерном ограничении поступления моноаминов из крови в ликвор.

Для расчета коэффициента проницаемости барьеров между ликвором и кровью для моноаминов концентрация моноаминов была измерена как в ликворе, так и в крови крыс в онтогенезе. Выявлено сходство в возрастной динамике изменений концентрации моноаминов – дофамина, норадреналина и серотонина – в плазме. В незначительной концентрации эти моноамины обнаружены в крови на Э18, к П5 их концентрация многократно возрастает, а затем к П30 снижается практически до уровня на Э18. Тем не менее, концентрация отдельных моноаминов в каждой возрастной группе существенно различается. Так, например, на П5 концентрация норадреналина в плазме в 15 раз больше, чем дофамина, и более чем в 150 раз меньше концентрации серотонина.

Определение соотношения концентраций моноаминов в ликворе и крови показало, что коэффициент проницаемости барьеров между ликвором и кровью на Э18 равен 8.5 и 13 для норадреналина и дофамина соответственно. Это означает, что катехоламины, содержащиеся в ликворе, поступают туда только из мозга. Для серотонина такие расчеты не могли быть проведены, поскольку серотонин в ликворе плодов в это время не определяется. В постнатальном периоде, хотя коэффициент проницаемости для катехоламинов значительно снижается, он остается больше единицы. Это означает, что и в этот период катехоламины поступают в ликвор только из нейронов мозга.

В отличие от катехоламинов коэффициент проницаемости для серотонина на П5 лишь незначительно меньше единицы, однако он резко возрастает к П30. Это означает, что барьер, препятствующий обмену моноаминов между ликвором и кровью, действует и для серотонина. Наиболее важным доказательством того, что моноамины не способны проникать через барьеры на пути из крови в ликвор, служит высокий уровень адреналина в крови крыс на П5 и П30 при его отсутствии в ликворе у крыс такого же возраста. Полученные данные подтверждают представления о существовании в пре- и постнатальном периоде барьеров, препятствующих поступлению веществ из ликвора в кровь и обратно [34–36].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Получены доказательства того, что: (1) ликвор взрослых крыс и крыс в перинатальном периоде содержит функционально наиболее значимые моноамины – дофамин, норадреналин и серотонин; (2) моноамины, содержащиеся в ликворе, имеют преимущественно нейрональное (мозговое) происхождение и практически не поступают из общей системы циркуляции; (3) моноамины содержатся в ликворе в физиологически активной концентрации, в которой они могут действовать в качестве нейротрансмиттеров в объемной нейротрансмиссии – в перинатальном периоде в необратимой регуляции развития нейронов в качестве морфогенетических факторов, а у взрослых животных – в обратимой регуляции функциональной активности нейронов-мишеней. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (№ 20-14-00325).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Fuxe K., Borroto-Escuela D.O. // Neural. Regen. Res. 2016. V. 11. № 8. P. 1220–1223.  
2. Ugrumov M.V. // Int. J. Dev. Biol. 1997. V. 41. № 6. P. 809–816.

3. Gaspar P., Cases O., Maroteaux L. // Nat. Rev. Neurosci. 2003. V. 4. № 12. P. 1002–1012.  
4. Pronina T., Ugrumov M., Adamskaya E., Kuznetsova T., Shishkina I., Babichev V., Calas A., Tramu G., Mailly P., Makarenko I. // J. Neuroendocrinol. 2003. V. 15. № 6.

- P. 549–558.
5. Izvol'skaia M., Duittoz A.H., Tillet Y., Ugrumov M.V. // *Brain Struct. Funct.* 2009. V. 213. № 3. P. 289–300.
  6. Shaywitz B.A., Anderson G.M., Cohen D.J. // *Brain Res.* 1985. V. 349. № 1–2. P. 225–232.
  7. Abbott N.J., Pizzo M.E., Preston J.E., Janigro D., Thorne R.G. // *Acta Neuropathol.* 2018. V. 135. № 3. P. 387–407.
  8. Kaur C., Ling E.A. // *Histol. Histopathol.* 2017. V. 32. № 9. P. 879–892.
  9. Муртазина А.Р., Пронина Т.С., Чандрян К.И., Дильмухаметова Л.К., Бондаренко Н.С., Блохин В.Е., Богданов В.В., Угрюмов М.В. // *Онтогенез.* 2021. Т. 52. № 6. С. 467–475.
  10. Zappaterra M.W., LaMantia A.S., Walsh C.A., Lehtinen M.K. // *J. Vis. Exp.* 2013. № 73. P. e50333.
  11. Liu L., Duff K. // *J. Vis. Exp.* 2008. № 21. P. e960.
  12. Ashwell K.W.S., Paxinos G. *Atlas of the developing rat nervous system.* 3d ed. London: Acad. Press, 2008.
  13. Vigh B., Manzano e Silva M.J., Frank C.L., Vincze C., Czirok S.J., Szabó A., Lukáts A., Szel A. // *Histol. Histopathol.* 2004. V. 19. № 2. P. 607–628.
  14. Ugrumov M.V. // *Neurochem. Res.* 2010. V. 35. № 6. P. 837–850.
  15. Угрюмов М.В. *Механизмы нейроэндокринной регуляции.* М.: Наука, 1999. 299 с.
  16. Nguyen L., Rigo J.M., Rocher V., Belachew S., Malgrange B., Rogister B., Leprince P., Moonen G. // *Cell Tissue Res.* 2001. V. 305. № 2. P. 187–202.
  17. Niederkofler V., Asher T.E., Dymecki S.M. // *ACS Chem. Neurosci.* 2015. V. 6. № 7. P. 1055–1070.
  18. Thomas G.B., Cummins J.T., Smythe G., Gleeson R.M., Dow R.C., Fink G., Clarke I.J. // *J. Endocrinol.* 1989. V. 121. P. 141–147.
  19. Liu J., Morrow A.L., Devaud L., Grayson D.R., Lauder J.M. // *J. Neurosci.* 1997. V. 17. № 7. P. 2420–2428.
  20. Dai S.Q., Yu L.P., Shi X., Wu H., Shao P., Yin G.Y., Wei Y.Z. // *Braz. J. Med. Biol. Res.* 2014. V. 47. № 9. P. 759–765.
  21. Martínez-Méndez R., Padilla-Cortés P., Gómez-Chavarín M., Gutiérrez-Ospina G. // *PeerJ. PrePrints.* 2016. V. 4. P. e1782v1. <https://doi.org/10.7287/peerj.preprints.1782v1>
  22. Baba H., Shimoji K., Yoshimura M. // *Anesthesiology.* 2000. V. 92. № 2. P. 473–484.
  23. Ghosh A., Purchase N.C., Chen X., Yuan Q. // *Front. Cell. Neurosci.* 2015. V. 9. P. 450.
  24. Bacon T.J., Pickering A.E., Mellor J.R. // *Cerebral Cortex.* 2020. V. 30. № 12. P. 6135–6151.
  25. Bruinink A., Lichtensteiger W. // *J. Neurochem.* 1984. V. 43. № 2. P. 578–581.
  26. Schlumpf M., Bruinink A., Lichtensteiger W., Cortés R., Palacios J.M., Pazos A. // *Dev. Pharmacol. Ther.* 1987. V. 10. № 6. P. 422–435.
  27. Happe H.K., Coulter C.L., Gerety M.E., Sanders J.D., O'Rourke M., Bylund D.B., Murrin L.C. // *Neuroscience.* 2004. V. 123. № 1. P. 167–178.
  28. Zhang L., Lidow M.S. // *Int. J. Dev. Neurosci.* 2002. V. 20. № 8. P. 593–606.
  29. Miyaguchi H., Kato I., Sano T., Sobajima H., Fujimoto S., Togari H. // *Pediatr. Int.* 1999. V. 41. № 4. P. 363–368.
  30. Murtazina A.R., Nikishina Y.O., Bondarenko N.S., Dil'mukhametova L.K., Sapronova A.Y., Ugrumov M.V. // *Brain Struct. Funct.* 2019. V. 224. № 9. P. 3059–3073.
  31. *Catecholamine research: From molecular insights to clinical medicine: Advances in Behavioral Biology.* V. 53 / Eds Nagatsu T., Nabeshima T., McCarty R., Goldstein D.S. Springer, 2002. 558 p.
  32. Goldstein D.S., Eisenhofer G., Kopin I.J. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. V. 305. № 3. P. 800–811.
  33. Bornstein S.R., Ehrhart-Bornstein M., Androutsellis-Theotokis A., Eisenhofer G., Vukicevic V., Licinio J., Wong M.L., Calissano P., Nisticò G., Preziosi P., et al. // *Mol. Psychiatry.* 2012. V. 17. № 4. P. 354–358.
  34. Redzic Z. // *Fluids Barriers CNS.* 2011. V. 8. № 1. P. 3.
  35. Saunders N.R., Daneman R., Dziegielewska K.M., Liddelov S.A. // *Mol. Aspects. Med.* 2013. V. 34. № 2–3. P. 742–752.
  36. Bueno D., Parvas M., Nabiuni M., Miyan J. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2020. V. 102. P. 3–12.

УДК 57.023

# Механизм блокирования активности летального токсина *Bacillus anthracis* моноклональными антителами

Я. О. Романенко, А. К. Рябко\*, М. А. Марьин, А. С. Карцева, М. В. Силкина, И. Г. Шемякин, В. В. Фирстова

Государственный научный центр прикладной микробиологии и биотехнологии  
Роспотребнадзора, Оболенск, Московская обл., 142279 Россия

\*E-mail: ryabko\_alena@mail.ru

Поступила в редакцию 19.03.2021

Принята к печати 22.03.2021

DOI: 10.32607/actanaturae.11387

**РЕФЕРАТ** Нейтрализация летального токсина *Bacillus anthracis* представляет важную проблему как фундаментальной медицины, так и практического здравоохранения в разрезе борьбы с особо опасными инфекциями. Нами получено нейтрализующее моноклональное антитело 1E10 против летального токсина *B. anthracis*. Описаны этапы рецепторного взаимодействия протективного антигена с поверхностью эукариотических клеток, образования олигомеров протективного антигена, сборки летального токсина и его транслокации с помощью эндоцитоза в эукариотическую клетку с последующим образованием истинной поры и выходом летального токсина в цитозоль. Показано селективное действие антитела на стадии взаимодействия *B. anthracis* с эукариотической клеткой, выявлен механизм токсиннейтрализующей активности антитела 1E10. Обнаружено, что взаимодействие моноклонального антитела 1E10 с протективным антигеном приводит к ингибированию ферментативной активности летального фактора, по всей видимости, за счет нарушения формирования истинной поры протективного антигена, что блокирует выход летального фактора в цитозоль.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** сибирская язва, моноклональные антитела, токсиннейтрализующая активность, цитометрический анализ, протективный антиген, летальный фактор.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ЛТ – летальный токсин; ЛФ – летальный фактор; рЛФ – рекомбинантный летальный фактор *B. anthracis*; ОФ – отечный фактор; ПА – протективный антиген; рПА – рекомбинантный протективный антиген *B. anthracis*; МАРКК – киназа митоген-активируемой протеинкиназы; МЕК – митоген-активируемая киназа; МКАТ – моноклональное антитело; ТНА – токсиннейтрализующая активность; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; MES – морфолино-2-этансульфоновая кислота; ПААГ – полиакриламидный гель; ФСБ-Т – фосфатно-солевой буфер с добавлением 0.05% Твин-20.

## ВВЕДЕНИЕ

Сибирская язва – антропозоонозная инфекция, возбудителем которой является грамположительная, аэробная, спорообразующая, палочковидная бактерия *Bacillus anthracis*. В зависимости от пути проникновения бактерии в организм выделяют три первичные формы заболевания: желудочно-кишечную (алиментарный путь проникновения), кожную (контактный путь) и легочную (ингаляционный). Все эти формы могут привести к летальному исходу, однако наиболее опасным для жизни человека считается воздушно-капельный путь [1, 2]. Размер спор *B. anthracis* колеблется от 1 до 5 мкм, что позволяет им легко проникнуть в альвеолы легких

при вдыхании. Попавшие в легкие споры не прорастают, а быстро и эффективно фагоцитируются альвеолярными макрофагами и дендритными клетками, которые затем переносятся по лимфатическим протокам к грудным лимфатическим узлам, где споры переходят в вегетативную форму и, разрушая клетки, распространяются по всему организму [3].

Патогенез сибирской язвы определяется двумя бинарными токсинами и капсулой, которые кодируются плазмидами рХ01 и рХ02. Плазмида рХ01 кодирует три компонента сибиреязвенного токсина: летальный фактор с молекулярной массой 83 кДа (ЛФ), отечный фактор 89 кДа (ОФ) и протективный антиген 85 кДа (ПА). Вторая плазмида,

pX02, кодирует гены, участвующие в синтезе поли-D-глутамила капсулы. Удаление любой плазмиды ослабляет вирулентность бактерий [4].

Субъединицы А (эффекторная) бинарных токсинов возбудителя сибирской язвы представлены ЛФ и ОФ, субъединица В – ПА. Субъединицы А и В образуют летальный токсин (ЛТ), состоящий из ПА и ЛФ, и отечный токсин (ОТ), состоящий из ПА и ОФ. Свое название бинарные токсины получили в соответствии с их биологическими эффектами, наблюдаемыми в животных моделях. Внутривенная инъекция ОТ (ПА + ОФ) вызывает отек, а инъекция ЛТ (ПА + ЛФ) в высокой концентрации приводит к тяжелой гипотензии с летальным исходом [5, 6].

Ключевой для патогенеза сибирской язвы субъединицей токсинов является ПА, который способен связываться с рецепторами на поверхности иммунокомпетентных клеток и обеспечивает проникновение ЛФ и ОФ в клетку. Рецепторное взаимодействие ПА массой 83 кДа с клеточной мембраной сопровождается отщеплением фрагмента 20 кДа фуриноподобными протеазами клеток хозяина, в результате чего образуется ПА с молекулярной массой 63 кДа (ПА63). Мономерный ПА63 начинает олигомеризоваться, образуя гептамерные или октамерные структуры, называемые препорами. С одним гептамером связываются три молекулы ЛФ или ОФ, а с октамером четыре [7, 8]. Комплекс, образующийся после сборки ПА и ЛФ/ОФ, поглощается клеткой путем клатринзависимого эндоцитоза. Образовавшаяся эндосома постепенно закисляется. В результате изменения уровня pH в окружающей среде ПА меняет свою конформацию и, внедряясь в эндосому, формирует истинную пору для транслокации ЛФ/ОФ в цитозоль [9]. ЛФ – это цинк-зависимая металлопротеаза, которая расщепляет киназу митоген-активируемой киназы (МАРКК) в цитозоле, что в конечном итоге приводит к апоптозу клетки [10, 11]. На рис. 1 показаны все этапы сборки и токсического действия ЛТ и ОТ *B. anthracis*, а также ключевые этапы, на которых возможно проявление антитоксического действия моноклональных антител, специфически взаимодействующих с доменом IV протективного антигена *B. anthracis*.

Одним из перспективных путей защиты организма от *B. anthracis* считается создание протективных терапевтических антител. Терапевтические антитела стали в последние годы мощным инструментом в борьбе с целым рядом патологий [12, 13]. Они используются в качестве агента, направленного на элиминацию патологических клеток [14, 15]. Весьма активно антитела используются в качестве

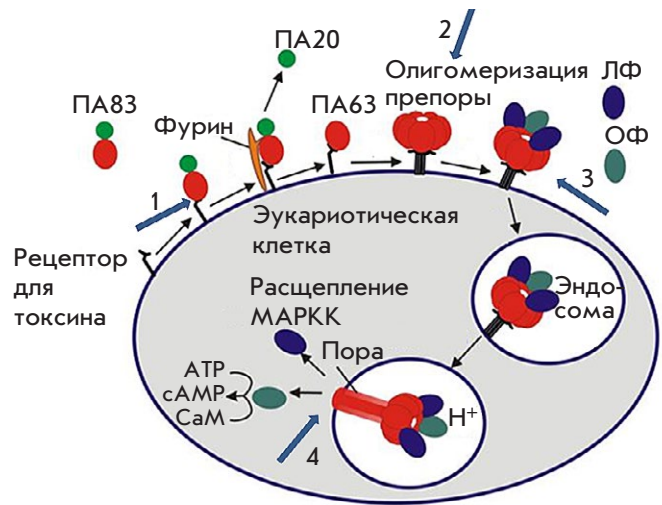


Рис. 1. Схематическая модель сборки и проявления активности токсинов *B. anthracis*.

Нумерованными стрелками указаны ключевые этапы, на которых возможно проявление антитоксического действия моноклонального антитела 1E10, специфически взаимодействующего с доменом IV протективного антигена *B. anthracis*: 1 – связывание МКАТ с ПА-рецептором; 2 – предотвращение сборки олигомерной ПА63-препоры; 3 – ингибирование связывания ЛФ и ОФ с ПА и предотвращение эндоцитоза эффекторных субъединиц токсинов; 4 – ингибирование превращения олигомерной формы препоры ПА63 в истинную пору

протективных агентов при токсикоинфекциях [11, 16, 17].

На рис. 1 представлено несколько возможных путей нарушения взаимодействия токсина с эукариотической клеткой. В частности, можно блокировать связывание ПА с клеточным рецептором или нарушить образование гептамерного комплекса. Также можно подавить связывание эффекторных субъединиц токсинов с препорой или ингибировать превращение препоры в истинную пору, следствием чего будет ингибирование киназного каскада.

К настоящему времени получено несколько моноклональных антител (МКАТ), нейтрализующих ЛТ, преимущественно мышиных, хотя имеются и токсиннейтрализующие МКАТ человека (Raxibacumab, GlaxoSmithKline). Тем не менее, продолжается поиск новых более эффективных антител, способных нейтрализовать ЛТ [18].

Ранее мы получили МКАТ 1E10, проявляющее специфическую активность в отношении домена IV ПА [19]. Результаты исследований, проведенных на клеточной линии J774A.1 и на мышах, по-



казали выраженную способность МКАТ 1Е10 нейтрализовать ЛТ сибирской язвы (часть данных не опубликована). Цель настоящего исследования заключалась в изучении механизма ингибирования моноклональным антителом 1Е10 цитотоксического действия ЛТ.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В работе использовали рекомбинантные белки: протективный антиген (рПА) [19] и летальный фактор (рЛФ) [20]. Эти белки имеют такие же аминокислотные последовательности, как и нативные ПА и ЛФ *B. anthracis*, но без сигнальных пептидов (UniProtKB – P13423 (PAG\_BACAN) и UniProtKB – P15917 (LEF\_BACAN) соответственно), слитые с N-концевым 6×His-tag и с-мус-эпитопом. Экспрессированные в *E. coli* BL21(DE3) рПА и рЛФ очищали из клеточного лизата хроматографией на металл-хелатном сорбенте сOmplete His-Tag Purification Resin (Roche, Германия). Биотинилированные варианты рекомбинантных белков получали конъюгированием с сульфосукцинимидным (sulfo-NHS) эфиром биотина (Sigma, США). Меченные флуорофором варианты рекомбинантных белков (рПА-FITC и рЛФ-Cy5) получали конъюгированием с FITC (Thermo Fisher, США) и Cy5 Mono-reactive dye (Amersham, Великобритания).

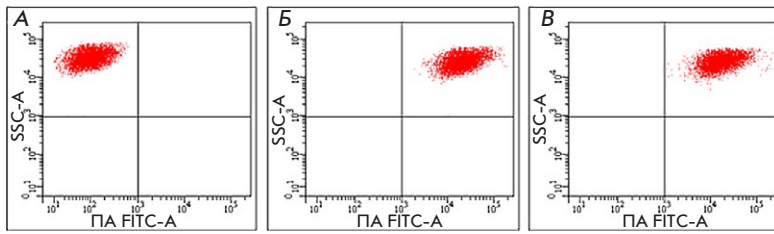
### Оценка адгезии ПА на поверхности клеточной линии макрофагов J774A.1 в присутствии МКАТ 1Е10 методом проточной цитофлуориметрии

Для оценки связывания ПА с поверхностными рецепторами макрофаги линии J774A.1 (АТСС @ TIB-67™) инкубировали ( $1 \times 10^6$  клеток на одну пробу) с меченым флуорохромом рПА-FITC или с рПА-FITC, заранее инкубированным с МКАТ 1Е10 в эквимольном соотношении в течение 1 ч при 37°C. Клетки линии J774A.1 инкубировали с пробами рПА-FITC или рПА-FITC+МКАТ в течение 1 ч при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе с плавным перемешиванием на орбитальном шейкере. После инкубации все пробы отмывали 3 раза нагретым до 37°C фосфатно-солевым буфером (ФСБ; 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.76 мМ KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, рН 7.4) и фиксировали 1% формалином. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACSAria III (Becton Dickinson, США) с использованием программного обеспечения BD FACSDiva (версия 8.0). Сначала клетки гейтировали по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию, что позволяло определить размер и гранулярность соответственно. Способность МКАТ 1Е10 ингибировать адгезию рПА-FITC на поверхности клеток оцени-

вали с использованием гейтирования по каналам SSC-A/FITC-A.

### Влияние МКАТ 1Е10 на олигомеризацию ПА

Полноразмерный рПА массой 83 кДа (ПА83) расщепляли трипсином (Roche) в концентрации 1 мкг/мл при комнатной температуре в течение 45 мин и получали ПА63 и ПА20. Реакцию прекращали, добавляя соевый ингибитор трипсина (Roche) до конечной концентрации 10 мкг/мл, и выдерживали при тех же условиях. Для стимулирования олигомеризации в растворе ко всем пробам добавляли рЛФ в молярном соотношении рПА : рЛФ = 2 : 1. На следующем этапе к расщепленному рПА добавляли МКАТ 1Е10 в молярных соотношениях 1:1, 1:2 или 1:3. Контрольные пробы содержали нерасщепленный рПА83, а также ПА63+ПА20 без добавления антитела. Все пробы инкубировали при температуре 37°C в течение 60 мин. Затем во все пробы вносили раствор морфолино-2-этансульфоновой кислоты (MES) рН 5.5 до конечной концентрации 50 мМ и инкубировали при 37°C в течение 30 мин. Для дальнейшего разделения в градиентном (4–20%) ПААГ в неденатурирующих и нередуцирующих условиях к пробам добавляли буфер для нанесения (по Лэммли) без меркаптоэтанола. После электрофоретического разделения пробы переносили на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Extra (GE Healthcare, Великобритания) при помощи системы автоматического полусухого блотинга (Trans-Blot® Turbo™ Transfer System, Bio-Rad, США). После завершения переноса мембрану блокировали, погружая в обезжиренное молоко с массовой долей жира не более 0.5%, инкубировали в течение 1 ч на орбитальном термостатируемом шейкере при 300 об/мин и 37°C. Мембраны промывали фосфатно-солевым буфером с добавлением 0.05% Твин-20 (ФСБ-Т; 137 мМ NaCl, 2.7 мМ KCl, 10 мМ Na<sub>2</sub>HPO<sub>4</sub>, 1.76 мМ KН<sub>2</sub>PO<sub>4</sub>, 0.05% Твин-20, рН 7.4). Затем мембрану инкубировали с биотинилированными моноклональными антителами мыши против ПА (клон 4F5 со специфической активностью в отношении домена III ПА, получены во ФБУН ГНЦ ПМБ) в разведении 5 мкг/мл (1 ч, 37°C). После инкубации мембрану трехкратно отмывали ФСБ-Т и инкубировали со стрептавидином, конъюгированным с пероксидазой хрена (Streptavidin–Peroxidase Polymer, Ultrasensitive, Sigma, США), в разведении 1 : 5000, затем шестикратно отмывали ФСБ-Т. Визуализацию проводили раствором субстратной смеси на основе диаминобензидина (0.05% диаминобензидина (Sigma, США), 0.015% H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> в ФСБ, рН 7.4). Реакцию останавливали промывкой дистиллированной водой, затем мембрану высушивали на воздухе.



**Рис. 2.** Влияние антител 1E10 на адгезию рПА на поверхности клеточной линии J774A.1. А – образцы клеток, проинкубированные в среде в отсутствие рПА-FITC и МКАТ 1E10. Б – образцы клеток, проинкубированные с рПА-FITC. В – образцы клеток, проинкубированные с рПА-FITC, предварительно обработанным МКАТ 1E10

### Исследование влияния МКАТ 1E10 на эндоцитоз ЛТ методом проточной цитофлуориметрии

Взаимодействие рПА с рЛФ с последующим эндоцитозом ЛТ подтверждали методом проточной цитофлуориметрии. С этой целью макрофаги линии J774A.1 ( $1 \times 10^6$  клеток на одну пробу) одновременно инкубировали с рПА-FITC и рЛФ-Су5 с добавлением МКАТ 1E10 или в отсутствие МКАТ. Растворы, содержащие рПА-FITC и/или рЛФ-Су5, в присутствии МКАТ или без антитела, предварительно инкубировали в течение 1 ч при 37°C, затем добавляли к клеткам. В качестве контроля использовали макрофаги J774A.1 ( $1 \times 10^6$  клеток), отдельно инкубированные с рПА-FITC+рЛФ и рЛФ-Су5+рПА, а также интактные неокрашенные клетки линии J774A.1. Все пробы инкубировали (30 мин, 37°C) в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при плавном перемешивании на орбитальном шейкере. Затем все пробы трижды отмывали ФСБ, нагретым до 37°C. Белки с поверхности клеток слущивали, добавляя 0.01% раствора трипсина, инкубировали в течение 5 мин при 37°C, затем трижды отмывали теплым ФСБ. Клетки фиксировали 1% формалином. Образцы анализировали на проточном цитофлуориметре FACS Aria III. Гейтирование проводили по прямому (FSC) и боковому (SSC) светорассеянию, для оценки влияния МКАТ 1E10 на взаимодействие ЛФ с ПА и эндоцитоз ЛТ проводили гейтирование по каналам флуоресценции FITC-A и Су5-A.

### Влияние МКАТ 1E10 на проявление специфической активности ЛТ

Специфическую активность интернализованного ЛТ определяли по присутствию нативного либо расщепленного МЕК. Готовили следующие пробы: макрофаги линии J774A.1 мыши ( $1 \times 10^7$  клеток) инкубировали в присутствии ЛТ в молярном соотношении рПА : рЛФ = 5 : 1 с добавлением МКАТ 1E10 и без него. ЛТ предварительно инкубировали с МКАТ или без них в течение 1 ч при 37°C, затем добавляли растворы к клеткам и инкубировали в течение 30, 60, 120 и 240 мин при 37°C в CO<sub>2</sub>-инкубаторе при плавном перемешивании на орбитальном шейкере. В качестве интактного контроля использовали макрофаги J774A.1 ( $1 \times 10^7$

клеток) без добавления ЛТ или МКАТ. После инкубации клетки осаждали центрифугированием, затем осадок лизировали в 0.5% Тритон X-100, после чего добавляли буфер для нанесения (по Лэммли) с добавлением меркаптоэтанола. Готовые пробы наносили на градиентный (4–20%) ПААГ. После электрофоретического разделения выполняли вестерн-блот-анализ с использованием стандартной методики, которая описана выше. Мембрану инкубировали с моноклональными антителами кролика против МЕК1 + МЕК2 (Abcam, Великобритания, ab200179) в разведении 1 : 10 000. По окончании инкубации со специфическими моноклональными антителами против МЕК мембрану отмывали ФСБ-Т и инкубировали с антивидовыми антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена (Goat Anti-Rabbit IgG Antibody, (H+L) HRP conjugate, Merck, Германия) в разведении 1 : 1000 в ФСБ. Взаимодействие визуализировали цветной реакцией с использованием диаминобензидина.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Оценка способности МКАТ 1E10 ингибировать адгезию рПА на поверхности макрофагоподобной клеточной линии J774A.1

На рис. 2 показано распределение клеток J774A.1, инкубированных в среде (А), с FITC-меченым ПА (Б) и с FITC-меченым ПА, предварительно обработанным МКАТ 1E10 (В). Сравнительный анализ цитофлуорограмм свидетельствует об идентичности распределения клеток линии J774A.1 на рис. 2Б и 2В. В обоих случаях после инкубации с рПА-FITC, обработанным МКАТ 1E10 или нет, наблюдали одинаково высокий уровень флуоресценции клеток, что свидетельствовало об адгезии к их поверхности рПА-FITC. На основании полученных результатов можно сделать вывод, что МКАТ 1E10 не блокирует связывание рПА с поверхностью эукариотических клеток.

### Оценка способности МКАТ 1E10 блокировать образование олигомеров ПА

Влияние моноклональных антител 1E10 на олигомеризацию ПА изучали с применением вестерн-

блотинга. Добавление МКАТ 1Е10 к расщепленному ПА63 в молярных соотношениях антиген : МКАТ = 1:1, 1:2, 1:3 не влияло на формирование олигомера (рис. 3). Таким образом, МКАТ 1Е10 не препятствует олигомеризации ПА и формированию препоры.

**Влияние МКАТ 1Е10 на взаимодействие рЛФ с рПА и эндоцитоз ЛТ**

На рис. 4 представлены цитофлуорограммы клеток линии J774А.1. Видно, что все клетки линии J774А.1, к которым были добавлены меченные флуорохромом рПА и рЛФ, обработанные МКАТ 1Е10, имели высокий уровень внутриклеточной флуоресценции FITС и Су5 (рис. 4Г), что свидетельствует об отсутствии способности МКАТ 1Е10 блокировать взаимодействие рПА и рЛФ и эндоцитоз ЛТ.

**Влияние МКАТ 1Е10 на проявление специфической активности ЛТ**

ЛФ – это цинк-зависимая эндопептидаза, которая расщепляет МАРКК, в том числе МЕК1 и МЕК2, с отщеплением пептида с молекулярной массой около 1.2 кДа. На рис. 5А и 5Б (дорожки 3, 5, 7, 9) показано, что под влиянием ЛТ происходит расщепление МЕК1 и МЕК2, тогда как при предварительной обработке ЛТ моноклональным антителом 1Е10 МЕК1 и МЕК2 остаются целыми. При длительной инкубации (240 мин) пробы, приготовленные из клеточной культуры, которую инкубировали с ЛТ без добавления МКАТ, содержали очевидно меньшее количество МЕК1 и МЕК 2 (рис. 5А и 5Б, дорожка 9), что, вероятно, свидетельствует о прохождении рЛФ через истинную пору в цитозоль клетки и проявлении ферментативной активности рЛФ в отношении МЕК1 и МЕК2, приводящей клетки к апоптозу. Таким образом, установлено, что взаимодействие МКАТ 1Е10 с рПА приводит к ингибированию ферментативной активности ЛТ в отношении МЕК1 и МЕК2.

**ОБСУЖДЕНИЕ**

В России для лечения больных сибирской язвой применяют антибиотики и противосибирезвенный лошадиный иммуноглобулин (ЗЗ ЦНИИ Минобороны РФ ФБУ, Россия), который содержит поликлональные антитела к антигенам вакцинного штамма *B. anthracis* СТИ-1 и сибирезвенным токсинам. При генерализованной форме заболевания антибиотики не эффективны, а применение противосибирезвенного лошадиного иммуноглобулина может вызвать побочные эффекты, включая анафилактический шок и сывороточную болезнь [20, 21]. Применение моноклональных антител позволяет обеспечить предсказуемую эффективность

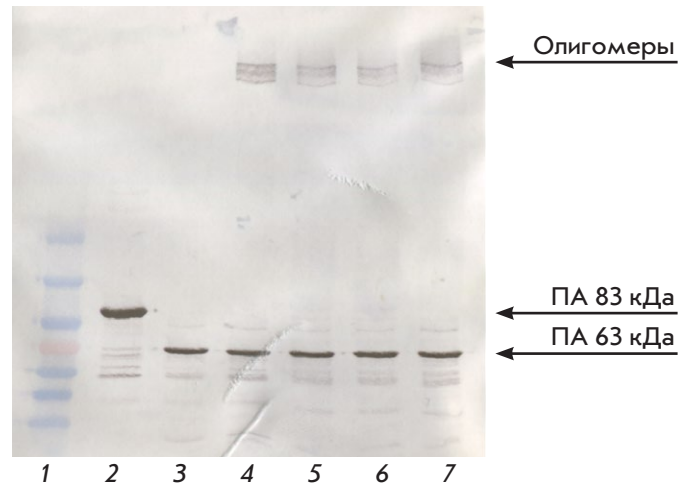


Рис. 3. Оценка способности МКАТ 1Е10 блокировать образование олигомеров ПА63. 1 – маркеры молекулярных масс SM0671 (Fermentas, США); 2 – контроль рПА (83 кДа); 3 – ПА63; 4 – ПА63 + рЛФ; 5 – ПА63 + МКАТ 1Е10 (1:1) + рЛФ; 6 – ПА63 + МКАТ 1Е10 (1:2) + рЛФ; 7 – ПА63 + МКАТ 1Е10 (1:3) + рЛФ

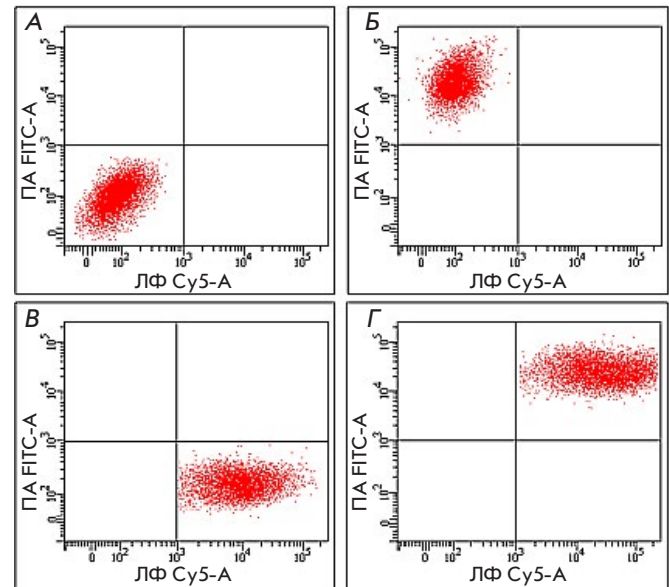
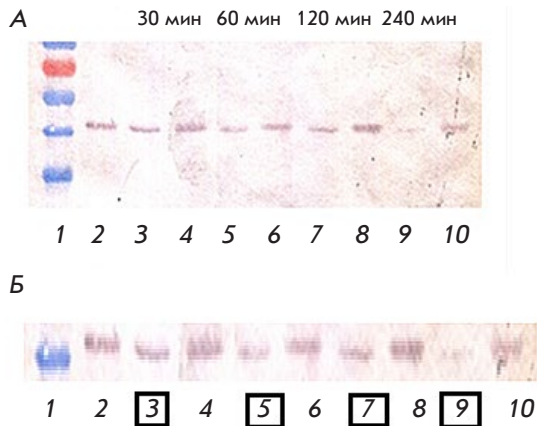


Рис. 4. Оценка влияния МКАТ 1Е10 на взаимодействие рЛФ с рПА и эндоцитоз ЛТ. Гистограмма А – образцы клеток, проинкубированные в среде без добавления ЛТ или МКАТ. Гистограмма Б – образцы клеток, проинкубированные с рПА-FITC и немеченым рЛФ. Гистограмма В – образцы клеток, проинкубированные с немеченым ПА и рЛФ-Су5. Гистограмма Г – образцы клеток, проинкубированные с рПА-FITC и рЛФ-Су5, предварительно обработанные МКАТ 1Е10





**Рис. 5.** Влияние МКАТ 1Е10 на проявление ферментативной активности рЛФ в отношении МЕК1 и МЕК2. А – результаты вестерн-блотинга, соотнесенные с маркерами молекулярных масс. Б – увеличенное изображение результатов вестерн-блотинга. 1 – маркеры молекулярных масс SM0671 (Fermentas, США); 2 – контроль – интактные клетки J774А.1; 3 – клетки J774А.1 + ЛТ, инкубация 30 мин; 4 – клетки J774А.1 + (ЛТ + МКАТ 1Е10), инкубация 30 мин; 5 – клетки J774А.1 + ЛТ, инкубация 60 мин; 6 – клетки J774А.1 + (ЛТ + 1Е10), инкубация 60 мин; 7 – клетки J774А.1 + ЛТ, инкубация 120 мин; 8 – клетки J774А.1 + (ЛТ + 1Е10), инкубация 120 мин; 9 – клетки J774А.1 + ЛТ, инкубация 240 мин; 10 – клетки J774А.1 + (ЛТ + 1Е10), инкубация 240 мин

нейтрализации сибиреязвенного токсина, а использование химерных антител снизит аллергизацию организма. Использование МКАТ против ПА считается наиболее перспективным направлением для терапии сибирской язвы, обеспечивающим ингибирование токсического действия сибиреязвенных токсинов. Это обусловлено тем, что ПА необходим для проявления токсичности субъединицей ЛТ, обеспечивающей проникновение ЛФ и ОФ в цитозоль клетки. Полученное нами ранее МКАТ 1Е10 к домену IV ПА показало свою токсиннейтрализующую эффективность в отношении ЛТ, что позволяет рассматривать его в качестве основы для получения химерного терапевтического МКАТ. В представленной работе проанализированы стадии, на которых возможно проявление нейтрализующей активности МКАТ 1Е10 в отношении ЛТ.

Анализ взаимодействия рПА с поверхностной мембраной макрофагоподобной клеточной линии J774А.1, формирования олигомерных структур рПА с образованием препоры, взаимодействия рЛФ и рПА и эндоцитоза ЛТ в присутствии МКАТ 1Е10 показал отсутствие ингибирующей активности МКАТ 1Е10 в отношении перечисленных процессов.

Мы предположили, что МКАТ 1Е10, связываясь с ПА, могло нарушать конформационные перестройки ПА в процессе формирования истинной поры для проникновения ЛФ в цитозоль, где и проявляется ферментативная активность ЛФ. Как известно, ЛФ гидролизует МЕК1 и МЕК2 в N-концевой области с отщеплением пептида массой около 1.2 кДа. МЕК1 и МЕК2 относятся к митоген-активируемым протеинкиназам (МАРКК), которые участвуют во множестве клеточных процессов. Используя специфическое к МЕК1 + МЕК2 антитело, мы показали, что опсонизация ПА моноклональным антителом 1Е10 приводит к ингибированию ферментативной активности ЛТ в отношении МЕК1 и МЕК2.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, механизм ингибирования ЛТ моноклональным антителом 1Е10 заключается в подавлении ферментативной активности ЛФ в отношении МЕК1 и МЕК2, что, по всей видимости, связано с нарушением формирования истинной поры и невозможностью выхода ЛФ в цитозоль.

Данное исследование, на наш взгляд, с очевидностью показало потенциал использования терапевтических антител в борьбе с инфекциями. Необходимо отметить, что пандемия, вызванная COVID 19, подтвердила этот вывод. Наряду с большими успехами в создании вакцин, оправданным признано использование вируснейтрализующих антител для некоторых категорий пациентов [22]. Получение человеческих нейтрализующих антител основано на селекции отдельных В-клеток с использованием цитометрических микрофлюидных технологий [23, 24]. С помощью этих технологий осуществлен реальный прорыв в создании SARS-CoV-2-нейтрализующих терапевтических антител [25, 26]. Полученное нами мышинное моноклональное антитело против летального токсина *B. anthracis* может быть преобразовано в химерное моноклональное антитело или гуманизированное, что позволит использовать его в качестве терапевтического препарата. ●

*Работа выполнена в рамках отраслевой программы Роспотребнадзора.*

*Конфликт интересов.*

*Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов. Соблюдение этических норм.*

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



СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Bradley K.A., Mogridge J., Mourez M., Collier R.J., Young J.A. // *Nature*. 2001. V. 414. № 6860. P. 225–229.
2. Mock M., Fouet A. // *Annu. Rev. Microbiol.* 2001. V. 55. № 1. P. 647–671.
3. Маринин Л.И. Сибирская язва человека: эпидемиология, профилактика, диагностика, лечение. Оболенск: Гигиена, 2008. 408 с.
4. Hu K., Olsen B.R., Besschetnova T.Y. // *Matrix Biology*. 2017. V. 62. P. 105–114.
5. Носков А.Н. // *Журн. микробиологии, эпидемиологии и иммунобиологии*. 2014. № 4. С. 92–101.
6. Jiang J., Pentelute B.L., Collier R.J., Zhou Z.H. // *Nature*. 2015. V. 521. № 7553. P. 545549.
7. Petosa C., Collier R.J., Klimpel K.R., Leppla S.H., Liddington R.C. // *Nature*. 1997. V. 385. № 6619. P. 833–838.
8. Wickner W., Schekman R. // *Science*. 2005. V. 310. № 5753. P. 1452–1456.
9. Hardenbrook N.J., Liu S., Zhou K., Ghosal K., Zhou Z.H., Krantz B.A. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 1–10.
10. Krantz B.A., Finkelstein A., Collier R.J. // *J. Mol. Biol.* 2006. V. 355. № 5. P. 968–979.
11. Фирстова В.В., Шемякин И.Г., Дятлов И.А. // *Инфекция и иммунитет*. 2019. Т. 9. № 5–6. С. 639–647.
12. Belogurov A., Kozyr A., Ponomarenko N., Gabibov A. // *Bioessays*. 2009. V. 31. № 11. P. 1161–1171.
13. Durova O.M., Vorobiev I.I., Smirnov I.V., Reshetnyak A.V., Telegin G.B. // *Mol. Immunol.* 2009. V. 47. № 1. P. 87–95.
14. Stepanov A.V., Belogurov A.A., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V. // *PLoS One*. 2011. V. 6. e20991.
15. Glinka E.M., Edelweiss E.F., Sapozhnikov A.M., Deyev S.M. // *Gene*. 2006. V. 366. № 1. P. 97–103.
16. Белова Е.В., Дубилей С.А., Кравченко Т.Б., Колесников А.В., Захарова М.Ю. // *Молекуляр. генетика, микробиология и вирусология*. 2004. № 3. С. 21–26.
17. Колесников А.В., Рябко А.К., Шемякин И.Г., Козырь А.В. // *Вестн. Росс. акад. мед. наук*. 2015. Т. 70. № 4. С. 428–434.
18. Dixon T.C., Fadl A.A., Koehler T.M., Swanson J.A., Hanna P.C. // *Cell. Microbial.* 2000. V. 2. № 6. P. 453–463.
19. Белова Е.В., Колесников А.В., Захарова М.Ю., Дубилей С.А., Дятлов И.А., Шемякин И.Г. // *Биоорган. химия*. 2008. Т. 34. № 5. С. 639–644.
20. Zakharova M.Yu., Kuznetsov N.A., Dubiley S.A., Kozyr A.V., Fedorova O.S., Chudakov D.M., Knorre D.G., Shemyakin I.G., Gabibov A.G., Kolesnikov A.V. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 27. P. 17902–17913.
21. Popescu N.I., Keshari R.S., Cochran J., Coggeshall K.M., Lupu F. // *Microorganisms*. 2020. V. 8. № 7. P. 1039.
22. Weinreich D.M., Sivapalasingam S., Norton T., Ali S., Gao H., Bhoire R., Musser B. J., Soo Y., Rofail D., Im J., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2021. P. 238–251.
23. Terekhov S.S., Smirnov I.V., Malakhova M.V., Samoilov A.E., Manolov A.I., Nazarov A.S., Danilov D.V., Dubiley S.A., Osterman I.A., Rubtsova M.P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. № 38. P. 9551–9556.
24. Wine Y., Horton A.P., Ippolito G.C., Georgiou G. // *Curr. Opin. Immunol.* 2015. V. 35. P. 89–97.
25. Rappazzo C.G., Longping V.T., Kaku C.I., Wrapp D., Sakharkar M., Huang D., Deveau L.M., Yockachonis T.J., Herbert A.S., Battles M.B., et al. // *Science*. 2021. V. 371. № 6531. P. 823–829.
26. Guo Y., Huang L., Zhang G., Yao Y., Zhou H., Shen S., Shen B., Li B., Li X., Zhang Q., et al. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 263. doi: 10.1038/s41467-021-22926-2.

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

## ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

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

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

## РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

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

- Десятичные цифры набираются только через точку, а не через запятую (0.25 вместо 0,25).
- Сокращения единиц измерений пишутся только русскими буквами (мкМ, но не  $\mu\text{M}$ ; нм, но не nm).
- Знак «–» (тире) отбивается пробелами, знаки «минус», «интервал» или «химическая связь» пробелами не отбиваются.
- В качестве знака умножения используется только « $\times$ ». Знак « $\times$ » ставится только в том случае, если справа от него стоит число. Символом « $\cdot$ » обозначаются 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.**