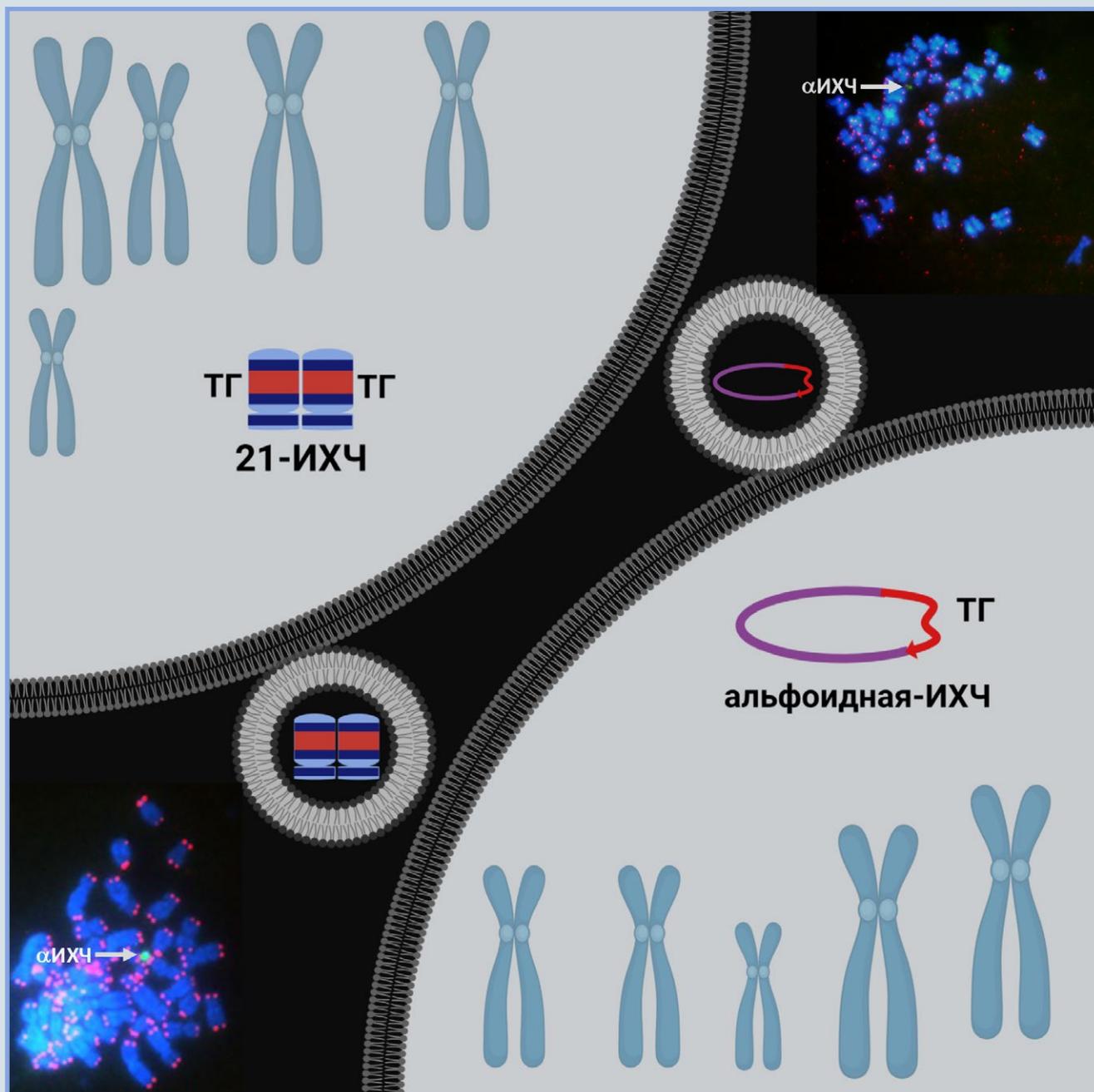


Acta Naturae

Искусственные хромосомы человека и способы их доставки в клетки-мишени



ВИЗУАЛИЗАЦИЯ
G-КВАДРУПЛЕКСОВ,
I-МОТИВОВ И ИХ АССОЦИАТОВ
СТР. 4

ИЗМЕНЕНИЕ ПРОФИЛЯ ЭКСПРЕССИИ
МИКРОРНК В ЛЕЙКОЦИТАХ ПАЦИЕНТОВ
С БОЛЕЗНЬЮ ПАРКИНСОНА
СТР. 79

Транскрипция специфичных для семенников генов *ZBTB32* и *ZNF473* подавлена в герминогенных опухолях

С. С. Буланенкова, О. Б. Филюкова, Е. В. Снежков, С. Б. Акопов, Л. Г. Николаев
Целью работы было выявление генов семейства C2H2 с тканеспецифичной транскрипцией и анализ изменений их активности при образовании опухолей. Для поиска таких генов использовали четыре базы данных, содержащие информацию о транскрипции генов в тканях человеческого организма, полученную в результате крупномасштабного секвенирования мРНК. Показано снижение транскрипции *ZBTB32* и *ZNF473* в герминогенных опухолях. Эти гены рассматриваются как потенциальные маркеры ракового перерождения клеток зародышевого типа.

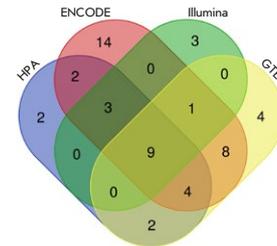


Диаграмма Венна, показывающая отобранные по заданным критериям гены, общие для четырех баз данных – Human Protein Atlas, ENCODE, Illumina Body Map и GTEx

ИФА-платформа для количественного анализа RBD-нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 как альтернатива мониторингу вируснейтрализующей активности

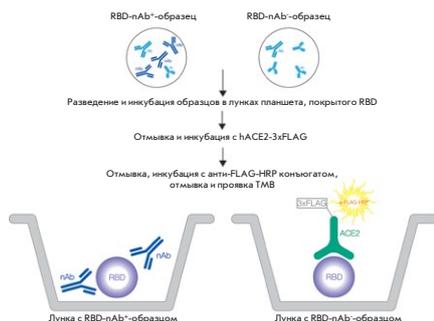


Схема количественного определения активности SARS-CoV-2 RBD-специфичных нейтрализующих антител в сыворотке или плазме крови методом ИФА

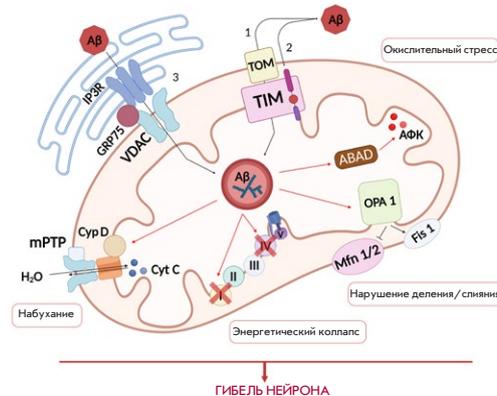
Н. Н. Костин, Т. В. Бобик, Г. А. Скрябин, М. А. Симонова, В. Д. Кнорре, В. А. Абрикосова, Ю. А. Мокрушина, И. В. Смирнов, Н. Л. Алешенко, Н. А. Круглова, Д. В. Мазуров, А. Э. Никитин, А. Г. Габитов

Разработана ИФА-платформа для количественного анализа уровня RBD-нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 как альтернатива мониторингу вируснейтрализующей активности псевдовирусами или «живыми» вирусами. Преимуществом платформы является возможность в кратчайшие сроки (1–2 недели) адаптировать методику к вновь появляющимся вариантам вируса и тем самым получать количественные данные по активности RBD-нейтрализующих антител к SARS-CoV-2. Платформа может быть использована для исследования популяционного иммунитета к SARS-CoV-2, мониторинга эффективности вакцинации (ревакцинации) населения и отбора потенциальных доноров иммунной плазмы.

Патологическое взаимодействие β -амилоида и митохондрий: роль в возникновении и развитии болезни Альцгеймера

Н. С. Николаева, Е. Ю. Яндулова, Ю. Р. Александрова, А. С. Стариков, М. Е. Неганова

Болезнь Альцгеймера – одно из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний, характеризующееся нарушением когнитивных функций из-за прогрессирующей потери нейронов в головном мозге. Основным патологическим признаком заболевания являются внеклеточные β -амилоидные (A β) бляшки. При болезни Альцгеймера наблюдаются не только нарушения в агрегации белка, но и усиление фрагментации митохондрий, изменения в экспрессии генов митохондриального биогенеза, а также взаимодействия эндоплазматического ретикулума и митохондрий, митофагии. В обзоре обобщены данные о патологическом действии A β на митохондрии, а также о потенциальных молекулярных мишенях, связанных с протеинопатией, для фармакологической коррекции болезни Альцгеймера.



Схематичное изображение путей поступления β -амилоида (A β) в митохондрии и его патологическое действие внутри данных органелл

Acta Naturae

ТОМ 14, № 3 (54), ИЮЛЬ—СЕНТЯБРЬ 2022
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

Корректура: 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, 2022

Номер подписан в печать 29 сентября 2022 г.

Тираж 25 экз. Цена свободная.

Отпечатано в типографии: НИУ ВШЭ,

г. Москва, Измайловское шоссе, 44, стр. 2

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

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

Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 2.204

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

- Е. В. Дубровин, Н. А. Баринев, Д. В. Клинов
Визуализация G-квадруплексов, i-мотивов
и их ассоциатов 4
- Н. С. Николаева, Е. Ю. Яндулова,
Ю. Р. Александрова, А. С. Стариков,
М. Е. Неганова
Патологическое взаимодействие
β-амилоида и митохондрий: роль
в возникновении и развитии
болезни Альцгеймера 19
- С. В. Пономарцев, С. А. Синенко,
А. Н. Томилин
Искусственные хромосомы человека
и способы их доставки в клетки-мишени 35
- А. В. Семенова, Г. Ф. Сиволобова,
А. А. Гражданцева, А. П. Агафонов,
Г. В. Кочнева
Репортерные трансгены
для мониторинга противоопухолевой
эффективности рекомбинантных
онколитических вирусов 46

И. Г. Гвазава, М. В. Каримова, А. В. Васильев,
Е. А. Воротеяк
**Сахарный диабет 2 типа: особенности
патогенеза и экспериментальные
модели на грызунах** 57

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

Ю. В. Абаленихина, А. В. Щулькин,
П. Ю. Мыльников, Е. Д. Рокунов,
Е. Н. Якушева
**Механизмы регуляции Р-гликопротеина
в условиях экзогенного и эндогенного
окислительного стресса *in vitro*** 69

Н. С. Ардаширова, Н. Ю. Абрамычева,
Е. Ю. Федотова, С. Н. Иллариошкин
**Изменение профиля экспрессии
микроРНК в лейкоцитах пациентов
с болезнью Паркинсона** 79

С. С. Буланенкова, О. Б. Филькова,
Е. В. Снежков, С. Б. Акопов, Л. Г. Николаев
**Транскрипция специфичных
для семенников генов *ZBTB32* и *ZNF473*
подавлена в герминогенных опухолях** 85

М. Л. Бычков, А. В. Кириченко,
И. Н. Михайлова, А. С. Парамонов,
М. П. Кирпичников, М. А. Шулепко,
Е. Н. Люкманова
**Внеклеточные везикулы
метастатической меланомы
переносят мРНК $\alpha 7$ -nAChR,
увеличивая поверхностную экспрессию
рецептора в нормальных кератиноцитах
и стимулируя их рост.** 95

Д. Н. Воронков, А. В. Ставровская,
А. С. Гущина, А. С. Ольшанский,
О. С. Лебедева, А. В. Еремеев,
М. А. Лагарькова

**Морфологическая характеристика
астроцитов в ксенотрансплантате
нейрональных предшественников,**

**полученных из индуцированных
плюрипотентных стволовых
клеток человека** 100

Н. Н. Костин, Т. В. Бобик, Г. А. Скрябин,
М. А. Симонова, В. Д. Кнорре,
В. А. Абрикосова, Ю. А. Мокрушина,
И. В. Смирнов, Н. Л. Алешенко,
Н. А. Круглова, Д. В. Мазуров,
А. Э. Никитин, А. Г. Габиров
**ИФА-платформа для количественного
анализа RBD-нейтрализующих
антител к SARS-CoV-2 как альтернатива
мониторингу вируснейтрализующей
активности** 109

Правила для авторов 120

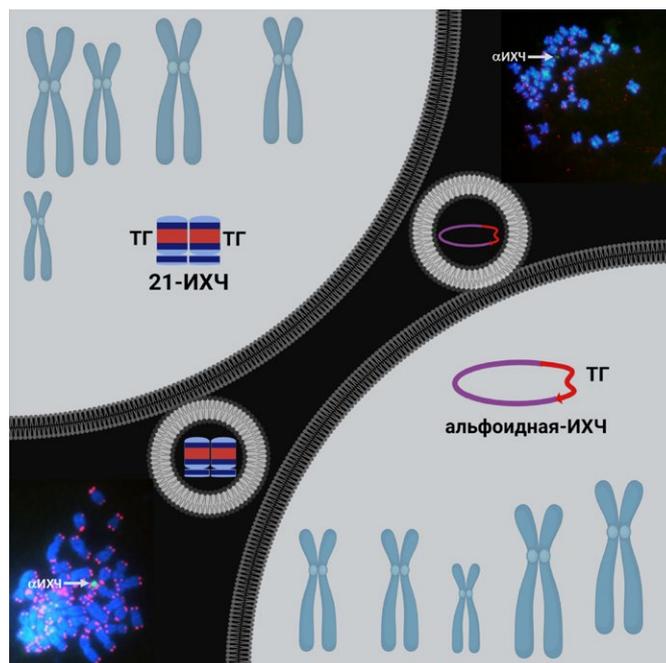


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью Пономарцева и др.)

УДК 577 543.4 543.5

Визуализация G-квадруплексов, i-мотивов и их ассоциатов

Е. В. Дубровин^{1*}, Н. А. Баринов¹, Д. В. Клинов^{2,3}¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, физический факультет, Москва, 119991 Россия²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины Федерального медико-биологического агентства, Москва, 119435 Россия³Российский университет дружбы народов, Москва, 117198 Россия

*E-mail: dubrovin@polly.phys.msu.ru

Поступила в редакцию 08.03.2022

Принята к печати 13.07.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11705

РЕФЕРАТ Образуемые G- или C-богатыми участками ДНК неканонические структуры, такие, как квадруплексы и i-мотивы, а также их ассоциаты, в последние годы привлекают все возрастающее внимание как из-за накопившихся аргументов в пользу их существования *in vivo*, так и возможности их потенциального использования в нанобиотехнологии. Важную роль в изучении структуры и свойств неканонических форм ДНК, а также в контроле искусственно создаваемых архитектур на их основе играет визуализация этих структур. В данном обзоре проанализированы методы, используемые для визуализации квадруплексов, i-мотивов и их ассоциатов с высоким пространственным разрешением, такие, как флуоресцентная микроскопия, просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ) и атомно-силовая микроскопия (АСМ). Представлены основные подходы к подготовке образцов для визуализации такого рода структур. Рассмотрены примеры визуализации неканонических структур ДНК различных морфологий, таких, как G-проволоки, G-петли, а также отдельных квадруплексов, i-мотивов и их ассоциатов. Продемонстрирован потенциал использования АСМ для визуализации неканонических структур ДНК.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА G-квадруплексы, i-мотивы, (иммуно)флуоресцентная микроскопия, атомно-силовая микроскопия, просвечивающая электронная микроскопия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ПЭМ – просвечивающая электронная микроскопия; БМВК – 3,6-бис(1-метил-4-винилпиридиний)карбазолдийодид; СЗМ – сканирующая зондовая микроскопия; АСМ – атомно-силовая микроскопия; DAPI – 4',6-диамидино-2-фенилиндол; GM – N,N'-(декан-1,10-диил)-бис(тетраглицинамид); ThT – тиофлавин Т.

ВВЕДЕНИЕ

Хугстеновское спаривание нуклеотидных оснований в ДНК приводит к образованию ряда неканонических структур, включая G-квадруплексы и i-мотивы [1, 2]. За последние годы накопились доказательства существования G-квадруплексов и i-мотивов в живых клетках разных организмов, включая человека [3, 4]. Эти неканонические структуры ДНК могут быть ответственны за регуляцию молекулярных процессов внутри клетки, включая репликацию ДНК, транскрипцию и поддержание генома [5, 6]. Большое число G-богатых (а значит, согласно принципу комплементарности ДНК и C-богатых) последовательностей в промоторных и теломерных областях онкогенов делает G-квадруплексы (и i-мотивы) потенциальной мишенью для доставки противоопухолевых средств в клетку [7–10]. Кроме того, ДНК-архитектуры на основе G-квадруплексов

и i-мотивов востребованы в бионанотехнологии: для создания молекулярных машин, разработки биосенсоров, устройств молекулярной электроники, молекулярной диагностики и др. [11–16].

К традиционным методам выявления и анализа неканонических структур ДНК относятся круговой дихроизм, спектроскопия ядерного магнитного резонанса и абсорбционная спектрофотометрия в ультрафиолетовой области при плавлении [17, 18]. Эти методы предоставляют усредненные по большому ансамблю молекул характеристики (например, такие, как абсорбция света или молярная эллиптичность на определенных длинах волн), позволяющие судить о структуре G-квадруплексов и i-мотивов. Не менее важным аспектом при изучении структуры и свойств неканонических форм ДНК является их визуализация. Кроме того, прямая визуализация необходима для контроля создаваемых

ДНК-архитектур. Однако нанометровые размеры гуанинового квартета квадруплекса или цитозин-цитозиновой пары *i*-мотива значительно ограничивают число методов, способных справиться с этой задачей.

Одно из решений этой проблемы – использование флуоресцентных меток на антители к неканоническим структурам ДНК (иммунофлуоресцентная микроскопия) или на сами неканонические структуры ДНК (флуоресцентная микроскопия). Такие метки позволяют установить наличие неканонических структур ДНК в исследуемом образце, например, внутри клетки, а также проанализировать их распределение. При таком способе неканонические структуры визуализируются по точечной метке, что не позволяет оценить морфологию самой структуры ДНК.

Достаточным для визуализации неканонических структур ДНК пространственным разрешением обладают методы электронной и сканирующей зондовой микроскопии. При этом сканирующая электронная микроскопия, в которой изображение формируется на основе обратно-рассеянных электронов, из-за ряда свойственных этому методу ограничений, таких, как необходимость исследования проводящих образцов и более низкое (по сравнению с просвечивающей электронной микроскопией) разрешение, практически не используется для целей визуализации структур ДНК. Напротив, просвечивающая электронная микроскопия (ПЭМ), которая основана на прохождении пучка электронов через ультратонкий (толщиной порядка 0.1 мкм) образец, широко распространена при изучении ДНК. В ПЭМ изображение, формируемое из электронов, прошедших сквозь образец, увеличивается электромагнитными линзами и фокусируется на матрице прибора с зарядовой связью.

Сканирующая зондовая микроскопия (СЗМ) представляет собой класс методов, получение изображения с помощью которых основано на локальном взаимодействии зонда с поверхностью образца в большом количестве точек. Наиболее распространенной разновидностью СЗМ является атомно-силовая микроскопия (АСМ), в основе функционирования которой лежит обменное взаимодействие между атомами зонда и образца [19].

СЗМ значительно отличается от ПЭМ не только принципом работы, но и процедурой приготовления образцов. Так, типичная процедура приготовления ДНК для исследования с помощью ПЭМ включает в себя фиксацию образца с использованием глутарового альдегида или формальдегида, а также создание контраста напылением на образец ионов тяжелых металлов или его обработкой контрастирующим

веществом. Кроме того, исследование с помощью электронной микроскопии обычно проводят в вакууме (низковакуумные модели просвечивающих электронных микроскопов, позволяющие проводить исследование образцов в водных парах или растворах, характеризуются значительно меньшим пространственным разрешением, сложными пробоподготовкой и подбором параметров работы [20, 21]). Перечисленные условия, при которых ДНК находится в процессе приготовления образца и его исследования, далеки от физиологических, из-за чего структуры ДНК, визуализированные с помощью электронной микроскопии, могут сильно отличаться от нативных. Кроме того, контрастирование уменьшает разрешение получаемых ПЭМ-изображений. Методы сканирующей зондовой микроскопии представляют собой более гибкий инструмент в контексте условий приготовления и среды сканирования образца, позволяя наносить ДНК из водных растворов без дополнительных, чуждых нативной среде, компонентов и проводить исследование в воздушных и жидких средах [22]. Дополнительным отличительным признаком АСМ является возможность визуализации динамических процессов в режиме реального времени [23]. Благодаря перечисленным факторам, АСМ является широко распространенным методом визуализации различных структур ДНК и их ассоциатов на уровне отдельных молекул.

В данном обзоре систематизированы основные методы и подходы, используемые для визуализации G-квадруплексов, *i*-мотивов и их ассоциатов, а также проанализированы основные научные достижения, связанные с визуализацией этих неканонических структур ДНК. Рассмотрены методические аспекты приготовления образцов ДНК для АСМ.

ФЛУОРЕСЦЕНТНАЯ МИКРОСКОПИЯ НЕКАНОНИЧЕСКИХ СТРУКТУР ДНК

В последние годы интенсивно развивается направление, связанное с разработкой небольших флуоресцирующих молекул (зондов), специфически связывающихся с G-квадруплексами и *i*-мотивами и позволяющих локализовать их по свечению флуоресценции. В случае G-квадруплекса такое специфическое связывание может осуществляться за счет π -стэкингового взаимодействия флуоресцентного красителя с внешней тетрадой G-квадруплекса, за счет взаимодействия зонда с петлями или бороздками G-квадруплекса, а также путем интеркаляции красителя между двумя квадруплексами [24]. Зачастую такие лиганды используются одновременно со специфическими к ДНК-дуплексу флуорофорами (например, такими, как Хёхст или йодид пропидия), что позво-

ляет сопоставлять локализацию канонических и неканонических структур ДНК на одном изображении. Одним из квадруплексных лигандов является 3,6-бис(1-метил-4-винилпиридиний)-карбазолдидодид (БМВК). Так, с его использованием установлено формирование квадруплексов на проксимальных (теломерных) участках хромосом [25, 26]. Другой флуоресцентный краситель, тиазоловый оранжевый, также применяется для визуализации G-квадруплексов [27] и i-мотивов [28] благодаря высокоспецифичному связыванию с ними, сопровождающемуся сильным увеличением флуоресценции. Недостатком данного красителя в контексте визуализации G-квадруплексов и i-мотивов является его низкая селективность, обусловленная способностью связываться также с другими структурами нуклеиновых кислот, включая двухцепочечную ДНК, трехцепочечную ДНК и РНК [27, 29, 30]. Обнаружено, что еще один флуоресцентный краситель, тиофлавин Т (ThT), широко применяющийся для специфического окрашивания амилоидов, также связывается с различными структурами ДНК, при этом усиление флуоресценции при связывании с G-квадруплексами особенно велико (в ~2100 раз в видимой области) [31, 32]. За последние годы разработан и изучен ряд новых соединений для использования в качестве флуоресцентных зондов

на G-квадруплексы и i-мотивы [33], в частности, производные бензотиазола [34, 35].

В связи с предполагаемым участием G-квадруплексов в экспрессии генов и патогенезе болезней большой интерес вызывает внутриклеточная визуализация этих структур. Долгое время такие исследования проводили, в основном, на фиксированных клетках. Так, в работе [36] разработан новый квадруплексный флуорофор S1, который продемонстрировал высокую селективность связывания с G-квадруплексами в экспериментах *in vitro*, а также сильное свечение в ядрышке фиксированных клеток HeLa и слабое – в остальной части ядра. Добавленный одновременно ДНК-краситель 4',6-диамидино-2-фенилиндола (DAPI) более равномерно окрашивал клеточное ядро. Это позволило предположить ядрышковую локализацию G-квадруплексов. С использованием флуоресцентного зонда диимида нафталина с удлинённым ядром (c_{ex} -NDI) выявлена локализация G-квадруплексов в ядрах раковых клеток линии MCF-7 (рис. 1) [37].

Наибольший интерес представляют зонды, позволяющие визуализировать квадруплексы в живых клетках. Такие зонды должны быть не только высокоспецифичными к G-квадруплексам, но также иметь низкую способность связываться с белками и другими биологическими молекулами, уметь про-

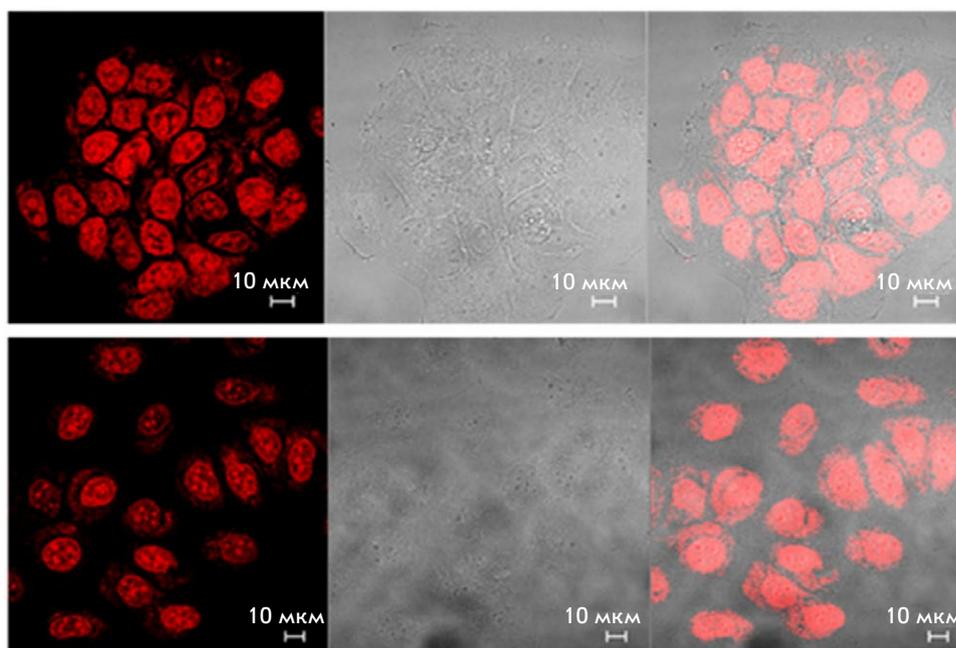


Рис. 1. Конфокальная лазерная сканирующая микроскопия фиксированных раковых клеток MCF-7, меченных (до фиксации) в течение 6 ч с помощью c_{ex} -NDI, демонстрирующая ядерную локализацию G-квадруплексов (слева – сигнал флуоресценции, в центре – наблюдение в светлом поле, справа – наложение двух сигналов). Воспроизведено из [37] согласно лицензии CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

ходить через плазматическую и ядерную мембраны, а также иметь низкую цитотоксичность [38].

Один из квадруплексных зондов, используемых в флуоресцентной микроскопии живых клеток, – изомер БМВК – о-БМВК. На модельных объектах показано разное время затухания флуоресценции о-БМВК при взаимодействии с G-квадруплексами. С помощью этого флуорофора G-квадруплексы были локализованы как в цитоплазме, так и в ядре живых клеток линии CL1-0 (клетки рака легких человека) [39]. Микроскопия визуализации времени жизни флуоресценции позволила не только отличить дуплексы от G-квадруплексов, но и выявить G-квадруплексы разных видов, различающиеся по времени затухания флуоресценции связанного с ними лиганда. Аналогичным методом, но с использованием другого флуоресцентного зонда, DAOTA-M2, определена ядерная локализация и стабильность G-квадруплексов в живых клетках линии остеосаркомы U2OS (рис. 2) [40, 41]. Недавно с использованием ThT в качестве флуоресцентного зонда была подтверждена ядрышковая локализация G-квадруплексов в живых клетках MCF-7 [42].

В последнее время разработаны новые флуорофоры, характеризующиеся высокой селективностью к G-квадруплексам, при этом обладающие высокой стабильностью и возможностью использоваться в живых клетках. В качестве примера можно привести такие лиганды, как N-TASQ [43], 2,6-бис((E)-2-(1H-индол-3-ил)винил)-1-метилпиридина-1 йодид [44], производные карбазола (4a–4c) [45] и другие [46, 47]. Использование этих зондов показало ядрышковую локализацию G-квадруплексов в живых клетках. N-TASQ также применили для визуализации G-квадруплексов на основе РНК в цитоплазме [48]. Наконец, с помощью флуоресцентной микроскопии показано существование митохондриальных G-квадруплексов в живых клетках [35, 49].

Альтернативным подходом к визуализации G-квадруплексов и i-мотивов с помощью флуоресцентной микроскопии является использование специфических антител, усиленных вторичными антителами с пришитыми к ним флуоресцентными метками (иммунофлуоресцентная микроскопия). С этой целью были синтезированы различные антитела, специфичные к ДНК- и РНК-G-квадруплексам (например, 1H6 и BG4), которые позволили визуализировать G-квадруплексы в различных клетках и тканях [50–53]. Эти результаты являются важными аргументами в пользу существования G-квадруплексов в клетках млекопитающих, включая ядро, цитоплазму и митохондрии. Например, с помощью иммунофлуоресцентной микроскопии на основе квадруплексных антител BG4 визуализи-

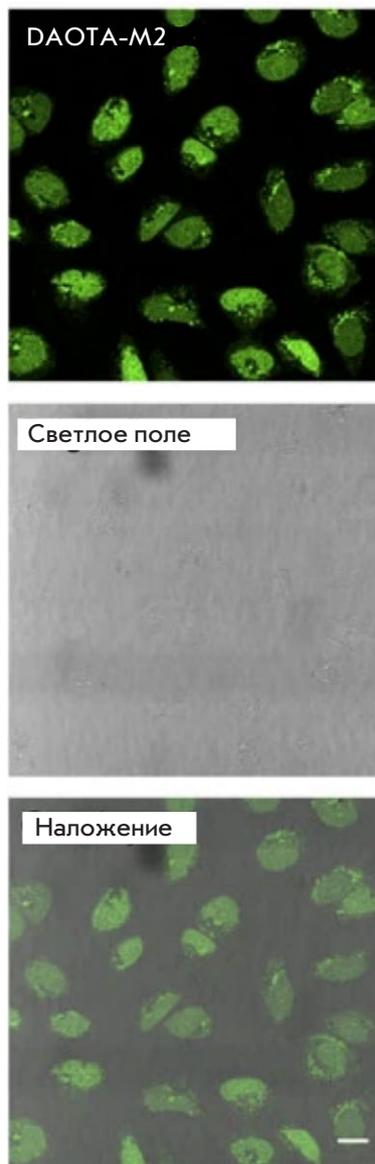


Рис. 2. Конфокальная микроскопия живых клеток линии U2OS, инкубированных с красителем DAOTA-M2, демонстрирующая ядерную локализацию G-квадруплексов (сверху – сигнал флуоресценции, в центре – наблюдение в светлом поле, снизу – наложение двух сигналов). Воспроизведено из [40] согласно лицензии CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

ровано распределение G-квадруплексов в ядре плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток hESC, а также выявлено значительное уменьшение количества G-квадруплексов при дифференцировке клеток (рис. 3) [54].

Недавно с помощью иммунофлуоресцентного окрашивания антителом, специфически распознающим эндогенный фактор транскрипции BmILF, высокоспецифичный к структуре i-мотивов, визуализированы i-мотивы *in vivo* в ядрах и хромосомах семенников гусениц тутового шелкопряда [55].

Вместе с тем, использование иммунофлуоресцентной микроскопии затрудняют такие факторы, как относительно высокая стоимость антител, их низкая стабильность и потенциальная иммуногенность [38]. Поэтому, разработка и применение специ-

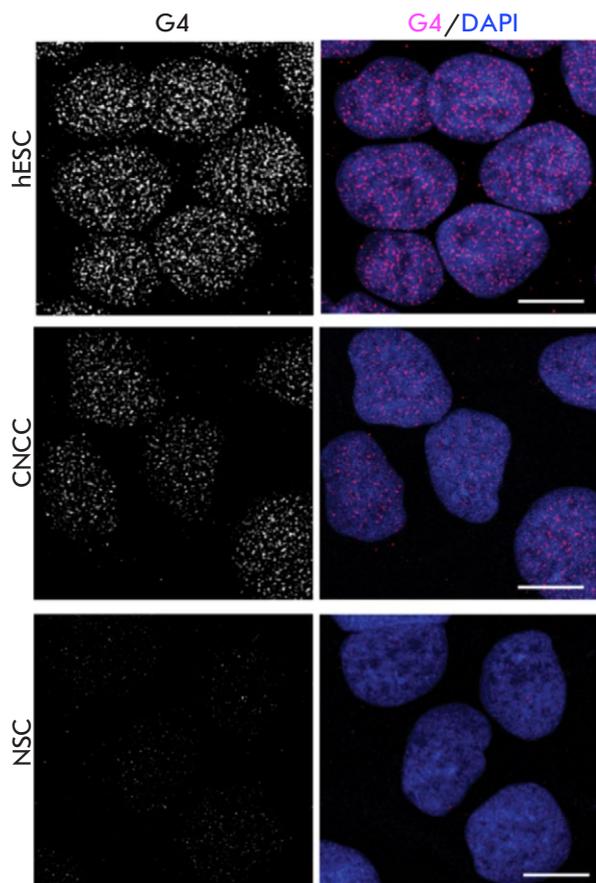


Рис. 3. Иммунофлуоресцентная микроскопия фиксированных плюрипотентных эмбриональных стволовых клеток hESC, клеток краниального нервного гребня (CNCC) и нейральных стволовых клеток (NSC), меченных специфическими к G-квадруплексам антителами BG4 после обработки РНКазой (вторичные антитела мечены флуоресцентным красителем AlexaFluor 488). Слева визуализированы только квадруплексы, справа ядра окрашены синим цветом из-за контрастирования ДНК-красителем DAPI. Масштабная метка 10 мкм. Воспроизведено из [54] согласно лицензии CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

фичных к G-квадруплексам флуорофоров остаются актуальными для визуализации этих структур в живых клетках.

ПЭМ-ВИЗУАЛИЗАЦИЯ НЕКАНОНИЧЕСКИХ СТРУКТУР ДНК

Несмотря на широкое использование ПЭМ для изучения ДНК и ДНК-содержащих структур в целом, неканонические структуры ДНК визуализировали этим методом достаточно редко. Как правило, объектом такой визуализации служат молекулы ДНК, имеющие неканоническим образом сложенный фрагмент. В частности, с помощью ПЭМ визу-

ализированы различные петли на двухцепочечных молекулах ДНК, ассоциированные с образованием G-квадруплексов на одной из цепей ДНК.

Один из видов таких петель, возникающих после внутриклеточной транскрипции G-богатых участков, получил название G-петель [56]. G-петли формируются на плазмидном геноме *in vitro* или в *Escherichia coli* и состоят из G-квадруплекса на некодирующей цепи ДНК и стабильного гибрида РНК/ДНК – на кодирующей цепи ДНК. Кроме того, визуализировано образование специфического комплекса между G-квадруплексом G-петли и фактором репарации ошибочно спаренных оснований, гетеродимером MutSα, а также формирование опосредованного MutSα синапсиса между двумя цепями ДНК. Наблюдение таких синапсисов позволило предположить механизм работы MutSα при рекомбинации на этапе переключения. Структуру, похожую на G-петли, имеют и так называемые R-петли, гибриды РНК/ДНК, возникающие при транскрипции повторяющихся мотивов (CTG)_n, (CAG)_n, (CGG)_n, (CCG)_n и (GAA)_n и связанные с некоторыми заболеваниями человека. R-петли были визуализированы с помощью ПЭМ [57], однако не приведено доказательств образования G-квадруплексов на некодирующей цепи R-петель. Формирование петель на G-богатых участках гена инсулина после денатурации и ренатурации молекулы ДНК, визуализированных с помощью ПЭМ [58], также объяснено формированием квадруплексов на одной из цепей ДНК.

ПЭМ также использовали для визуализации квадруплексов, формирующихся контролируемым способом за счет несущих G-повторы параллельных дуплексов [59]. На ПЭМ-изображениях зафиксировано узкое распределение длин таких структур, согласующихся с ожидаемым размером. Кроме того, визуализированы одномерные содержащие квадруплексы наноструктуры в виде нанопроволок различной длины.

Анализ РНК-транскриптов C- и G-богатой теломерной ДНК млекопитающих, проведенный с помощью ПЭМ, выявил принципиальные различия в их морфологии. C-богатые РНК-транскрипты обладают более вытянутой структурой с толщиной, типичной для одноцепочечной РНК, тогда как G-богатые транскрипты представляют собой круглые частицы и короткие, толстые палочкообразные структуры, преобладающие при повышенной концентрации соли (рис. 4). Наблюдаемая морфология позволила предложить модель, согласно которой G-богатая теломерная РНК собирается в цепочки частиц, каждая из которых состоит из четырех повторов UUAGGG, стабилизированных параллельными G-квартетами и соединенных UUA-линкерами [60].

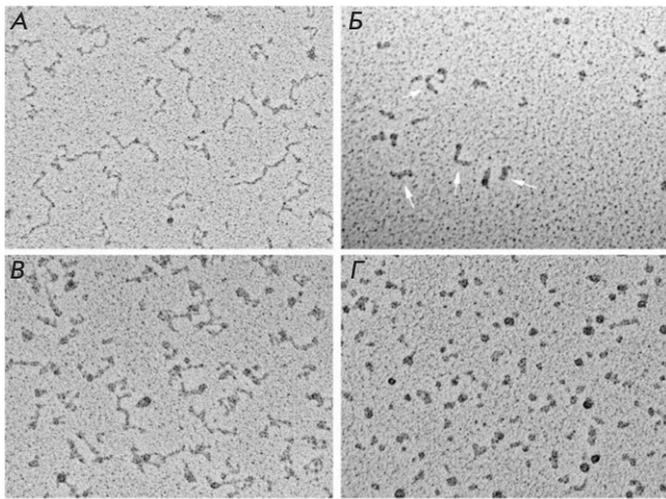


Рис. 4. Визуализация С- и G-богатых теломерных транскриптов. С-богатые (А) и G-богатые (Б) молекулы РНК в 100 мМ КСl наносили для ПЭМ на тонкие углеродные подложки, дегидратировали и оттеняли вольфрамом на вращающейся подложке. С-богатые РНК выглядят вытянутыми нитями с узлами. G-богатые РНК выглядят в виде смеси шариков и палочек (стрелки). Толщина палочек значительно больше, чем толщина С-богатых или дуплексных РНК. С-богатые (В) и G-богатые (Г) молекулы РНК нанесены из 10 мМ КСl таким же образом, как в (А) и (Б). С-богатая РНК выглядит расправленной с узлами, в то время как G-богатая РНК имеет, в основном, форму шариков. Масштабная метка составляет 100 нм. Воспроизведено из [60] согласно лицензии CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

С появлением антител на G-квадруплексы их стали изучать также с применением иммуноэлектронной микроскопии. В этом методе квадруплексы детектируют с помощью ПЭМ-визуализации меток (золотых наночастиц), конъюгированных с вторичными антителами к G-квадруплексам. Иммуноэлектронная микроскопия не достигает молекулярного разрешения самих квадруплексов, но позволяет наблюдать распределение G-квадруплексов внутри клетки, что важно для понимания роли квадруплексов во внутриклеточных процессах. Так, с помощью этого метода визуализировано образование G-квадруплексов в клетках, инфицированных вирусом простого герпеса типа 1. Образование G-квадруплексов зависело от стадии цикла инфицирования: вирусные G-квадруплексы, количество которых достигало максимума во время репликации вируса в ядре клетки, перемещались к ядерной мембране в момент выхода вируса из ядра (рис. 5) [61]. Похожим способом G-квадруплексы выявлены в гетерохроматине клеток млекопитающих [62]. Таким образом, накопленные с помощью имму-

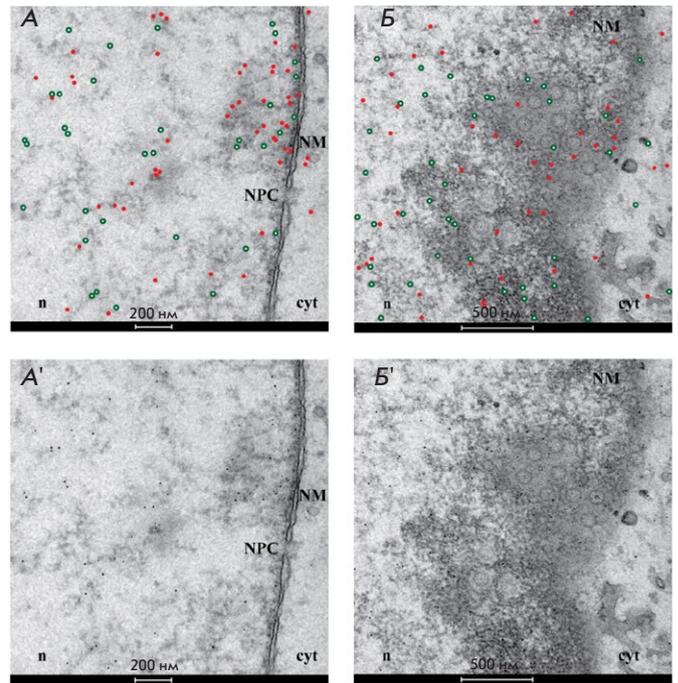


Рис. 5. Иммуноэлектронная микроскопия инфицированных вирусом простого герпеса типа 1 (ВПГ-1) клеток, фиксированных через 15 ч после инфицирования и инкубированных с анти-G-квадруплексным антителом (1Н6) и анти-ICP8-сывороткой. Первичные антитела 1Н6 и к ICP8 детектированы с помощью золотых частиц диаметром 5 и 10 нм соответственно. Для улучшения четкости изображения золотые частицы подсвечены красными точками (показывающими G-квадруплексы) и зелеными кружками (показывающими ICP8) на А и Б. Исходные изображения приведены на панелях А' и Б'. (А–А') G-квадруплексы и ICP8 концентрируются вблизи ядерной мембраны (NM), где находится комплекс ядерной поры (NPC). Выход из ядра через комплекс ядерной поры является одним из путей, используемых капсидами ВПГ-1 для выхода из ядра (n) в цитоплазму (cyt). (Б–Б') G-квадруплексы и ICP8 кластеризуются рядом с ядерной мембраной, где отпочковываются свежеформированные вирионы. Воспроизведено из [61] согласно лицензии CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

ноэлектронной микроскопии результаты не только свидетельствуют о существовании G-квадруплексов в клетках, но и предполагают значимую роль G-квадруплексов в биологических процессах.

ОБЩИЕ ПОДХОДЫ К АСМ-ИССЛЕДОВАНИЮ НУКЛЕИНОВЫХ КИСЛОТ

Ключевым элементом атомно-силового микроскопа [19] является упругая пластина, называемая кантилевером, на которой расположено острие (зонд). Взаимодействие зонда с поверхностью вызывает

изгиб кантилевера, который детектируется с помощью высокопрецизионной оптической системы, состоящей из лазера, фотодиода и зеркальной поверхности кантилевера. Контактный режим сканирования, при котором изгиб кантилевера служит сигналом обратной связи и поддерживается постоянным, мало используется для исследования ДНК из-за больших сил взаимодействия кантилевера с образцом, приводящих к деформации биомолекулы и ухудшению пространственного разрешения изображения. Обычно АСМ-исследование биомолекул проводят в режиме прерывистого контакта [63], при котором кантилевер совершает колебания вблизи резонансной частоты, а взаимодействие зонда с образцом определяется по вызванному этим взаимодействием изменению амплитуды колебаний, которая обратной связью поддерживается постоянной. В режиме прерывистого контакта нормальные силы между кантилевером и образцом существенно ниже, чем в контактном режиме сканирования, а связанные с адгезией латеральные силы не оказывают существенного влияния на формирование АСМ-изображения, так как кантилевер циклически «отрывается» от поверхности образца при его перемещении вдоль поверхности в процессе сканирования. В последнее десятилетие стали широко использоваться режимы, основанные на периодическом подводе и отводе кантилевера к/от поверхности (режим пиковой силы, «прыгающий» режим и т.п.), которые позволяют значительно снизить силу взаимодействия кантилевера с поверхностью образца [64].

Основопологающим условием для исследования ДНК с помощью АСМ является иммобилизация молекулы на подложке. Иммобилизация биомолекулы взаимосвязана с рядом факторов, таких, как состав, рН, концентрация компонентов раствора, из которого осуществляют нанесение, температура, способ нанесения, время адсорбции, свойства подложки и т.д. Поэтому приготовление образца играет важную роль в АСМ. Гладкость (малая шероховатость) является одним из требований, предъявляемых к поверхности подложки для нанесения биополимеров. Две наиболее распространенные для АСМ подложки, обладающие участками с атомарной гладкостью, – слюда и высокоориентированный пиролитический графит (ВОПГ), имеющие кристаллическую природу. Однако нанесение на эти поверхности ДНК из водного раствора не приводит к адсорбции отдельных молекул в расправленном состоянии и, как следствие, к возможности их исследования с помощью АСМ.

Причиной, затрудняющей адсорбцию ДНК на свежеосколотую слюду, является одноименный отрицательный заряд фосфатных групп биополимера

и поверхности слюды, приводящий к электростатическому отталкиванию ДНК от поверхности. Для преодоления этого разработано несколько стратегий, успешно применяемых уже многие годы. Наиболее распространено использование двухвалентных катионов, таких, как Mg^{2+} , Ca^{2+} , Zn^{2+} и др., которые служат электростатическими «мостиками» между атомной решеткой слюды и фосфатными группами ДНК [65, 66]. На практике для этого либо свежеосколотую слюду предварительно (до нанесения ДНК) модифицируют в соответствующем солевом растворе, либо небольшую его концентрацию (1–10 мМ) наносят на слюду одновременно с ДНК. Для нанесения ДНК на слюду используют и другой способ – предварительную модификацию ее поверхности аminosиланами, например, 3-аминопропилтриэтоксисиланом [67]. В этом случае к адсорбции ДНК на подложку приводит ее притяжение к положительно заряженным аминогруппам модификатора. Две описанные стратегии (с использованием двухвалентных катионов и аminosиланов) различаются между собой по силе адсорбции ДНК: опосредованная катионами двухвалентных металлов адсорбция молекул относительно слабая, что выражается в возможности теплового движения ДНК вблизи поверхности [68–71]. Напротив, слюда, модифицированная аminosиланами, как правило, представляет собой «кинетическую ловушку» для ДНК, т.е. адсорбированные молекулы ДНК оказываются неподвижными на поверхности, а их конформация отражает конформацию в растворе [72].

К настоящему времени накопилось большое количество доказательств образования карбоната калия на поверхности слюды при ее скалывании в лабораторных условиях [73]. При погружении в водный раствор образующаяся соль может формировать высокую ионную силу вблизи поверхности слюды, т.е. как раз в той области, в которой происходят основные взаимодействия биополимера с поверхностью при его адсорбции. Этот эффект, в частности, отмечен по интенсивной диссоциации ДНК-белковых комплексов, наносимых на слюду из раствора с низкой ионной силой [74]. Данная особенность слюды существенно затрудняет интерпретацию полученных на этой подложке результатов и, в частности, делает невозможным исследования на ее поверхности при низких ионных силах.

В отличие от слюды, ВОПГ электрически нейтрален, а также не формирует каких-либо солей на своей поверхности. Однако из-за слабого взаимодействия ДНК с графитом адсорбция молекул ДНК в расправленном состоянии на свежеосколотую поверхность графита также затруднительна: обычно ДНК адсорбируется на эту подложку лишь

в виде агрегатов или сетчатых структур [75, 76]. Для преодоления этой трудности разработан ряд подходов, основанных на модификации графита. Использование модифицированного графита позволяет исследовать ДНК при низкой или нулевой ионной силе, что немаловажно для изучения закономерностей образования неканонических структур ДНК.

Один из таких подходов – предварительная модификация графита в тлеющем разряде в присутствии паров пентиламина: модифицированная таким образом поверхность, насыщенная аминогруппами, приводит к адсорбции на нее отдельных расплавленных молекул ДНК, причем измеряемые из АСМ-изображений размеры биополимера, такие, как высота и ширина на полувысоте, значительно ближе к нативным размерам ДНК по сравнению с размерами ДНК, адсорбированной на слюду [77, 78]. Позднее предложен методически более простой способ модификации ВОПГ – из водного раствора производной олигоглицина N,N' -(декан-1,10-диил)бис(тетраглицинамид) ($[Gly_4-NHCH_2]C_8H_{16}[CH_2NH-Gly_4]$), получившего название модификатор графита или GM [79]. Модификация поверхности ВОПГ GM, проводимая обычно с помощью дропкастинга, приводит к формированию однородного, самоупорядоченного слоя этих молекул толщиной меньше 1 нм [80, 81]. Как и в случае модификации пентиламином, аминогруппы GM делают возможным адсорбцию отдельных молекул ДНК на поверхность и их дальнейшее исследование с помощью АСМ [82].

Кроме того, в последние годы для нанесения ДНК на ВОПГ используют целый ряд других самоорганизующихся на поверхности графита органических нанощаблонов. Такие нанощаблоны формируются на кристаллических поверхностях многими производными алканов, включая стеариновую кислоту, додециламин, октадециламин, стеариловый спирт и др. [83–86]. Как правило, молекулы ДНК упорядочиваются вдоль формирующих нанощаблон ламелей при адсорбции на такие поверхности [87, 88]. При этом химическая природа молекулы модификатора может значительно влиять на конформацию и свойства адсорбированной молекулы ДНК [89, 90].

Описанные подходы приготовления и нанесения образцов ДНК могут быть также применены и к неканоническим формам ДНК, включая G-квадруплексы и i-мотивы.

АСМ-ВИЗУАЛИЗАЦИЯ НЕКАНОНИЧЕСКИХ СТРУКТУР ДНК

Как отмечалось выше, основным фактором, осложняющим прямую визуализацию неканонических структур ДНК без использования меток, является

их малый размер. Стоит отметить, что гуаниновая тетрада или двойной хугстенковский цитозинный димер имеют фиксированный размер, а количество таких G-тетрад или двойных цитозинных димеров в стеке может варьировать в достаточно широких пределах. Наиболее длинной неканонической структурой ДНК является G-нанопроволока: она образуется из G-богатых (например, поли(G)) нуклеотидных последовательностей за счет спонтанного формирования длинного тетраплекса ДНК и достигает микронных длин. Полученные из АСМ-изображений морфологические характеристики G-нанопроволок, такие, как диаметр, длина, форма контура, позволяют определить их структуру (например, количество молекул ДНК, участвующих в образовании G-проволоки), персистентную длину, а также могут использоваться в качестве обратной связи при разработке процедур синтеза этих структур для биотехнологических применений. G-нанопроволока может образовываться из большого количества олигонуклеотидов, «сцепляющихся» между собой в тетраплекс [91–94] из четырех параллельных гуаниновых последовательностей (тетрамолекулярная нанопроволока) [95], а также из одной длинной молекулы одноцепочечной ДНК, сложенной в 4 раза (мономолекулярная нанопроволока) [96, 97]. В первом случае G-нанопроволоки характеризуются широким распределением длины, тогда как в остальных двух – узким. Диаметр G-нанопроволоки, измеренный по ее высоте на АСМ-изображениях, обычно составляет около 2 нм [91, 95, 96], что с учетом эффекта занижения высоты, вызванного взаимодействием кантилевера с мягким образцом [98], согласуется с размером 2.8 нм, полученного из рентгеноструктурного анализа G-тетрады [99]. Примеры АСМ-изображений G-нанопроволок приведены на рис. 6.

Описаны и другие нанопроволоки на основе неканонических структур. Так, синтезированы гибридные нанопроволоки, состоящие из фрагментов G-нанопроволок и i-мотивов [100]. АСМ выявила полиморфизм таких структур, который зависел от используемых олигонуклеотидов и ионного окружения, в частности, визуализирована супрамолекулярная конформация гибридов, а также V-образная, кольцевая и линейная конфигурация гибридов. Визуализировано также образование фибрилл высотой от 0.45 до 4 нм и длиной до 2 мкм из двух видов олигонуклеотидов SQ1A (CAGTAGAGATGCTGCTGAGGGGGGGGTGTGCTTCAAGCG) и SQ1B (CTCTACGACGACTGGGGGGGGACACGAAGTTCGCTACTG), которое объясняется формированием многочисленных синапсисов на основе квадруплексов [101].

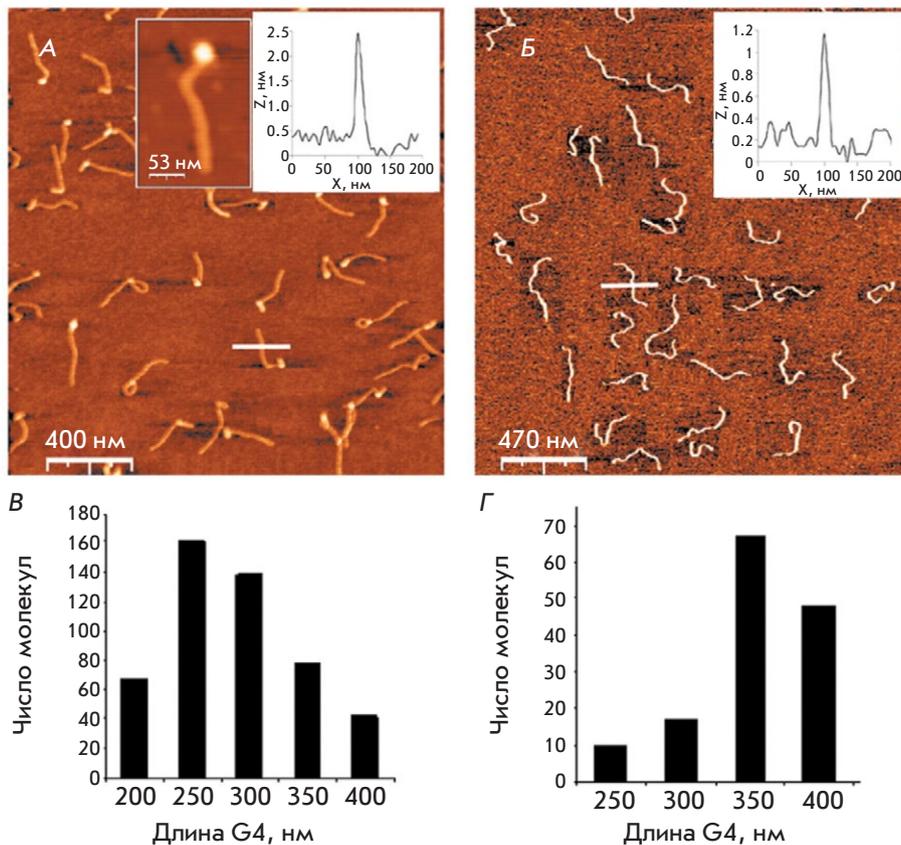


Рис. 6. Сравнение тетра- и мономолекулярных G-квадруплексов. АСМ-изображения тетрамолекулярных (вставка: увеличенный тетрамолекулярный комплекс) (А) и мономолекулярных (Б) G-квадруплексов. Тетрамолекулярные G-квадруплексы приготовлены с использованием комплекса четырех молекул 5'-биотин-поли(dG)-поли(dC) длиной 1400 п.н., связанных с авидином. Мономолекулярные G-квадруплексы приготовлены с использованием G-цепи длиной 5500 оснований. Молекулы обоих типов нанесены на слюду при одинаковых условиях. Статистический анализ контурных длин тетрамолекулярных (В) и мономолекулярных (Г) G-квадруплексов. Воспроизведено из [95] согласно лицензии CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

Возможность подачи электрического потенциала на кантилевер атомно-силового микроскопа и измерения силы тока позволили также записать вольт-амперные характеристики отдельных G-нанопроволок. В частности, показано, что G-нанопроволока способна пропускать ток от десятков до сотен пикоампер [11].

В природе склонные к формированию неканонических структур G- или C-богатые нуклеотидные последовательности, как правило, встроены в более длинные молекулы ДНК, например, в теломерных участках хромосом или вблизи промотора. В двухцепочечной ДНК G- и C-богатые мотивы всегда находятся друг напротив друга из-за комплементарности. Так, с помощью АСМ визуализировано одновременное образование G-квадруплекса и i-мотива на двухцепочечной ДНК, содержащей G-богатый VNTR-мотив: $CGC(GGGGCGGG)_n$. Эти структуры имели разветвленную форму и наблю-

дались лишь в кислой среде и в присутствии ионов K^+ . Образование G-квадруплекса и i-мотива на VNTR-последовательности может реализовываться при транскрипции или репликации, когда двухцепочечная ДНК переходит в одноцепочечную форму, и таким образом влиять на экспрессию соответствующего гена [102].

Для исследования образования неканонических структур и их визуализации G- и C-богатые мотивы зачастую «встраивают» в молекулу ДНК или основанную на ДНК наноструктуру, имеющую гораздо больший размер, чем сама неканоническая структура. Это позволяет идентифицировать отдельные G-квадруплексы или i-мотивы по изменению морфологии соединенных с ними более крупных структур ДНК.

Так, одноцепочечный участок ДНК, содержащий два C-тракта, встраивали в двухцепочечную кольцевую ДНК с противоположных сторон «кольца»

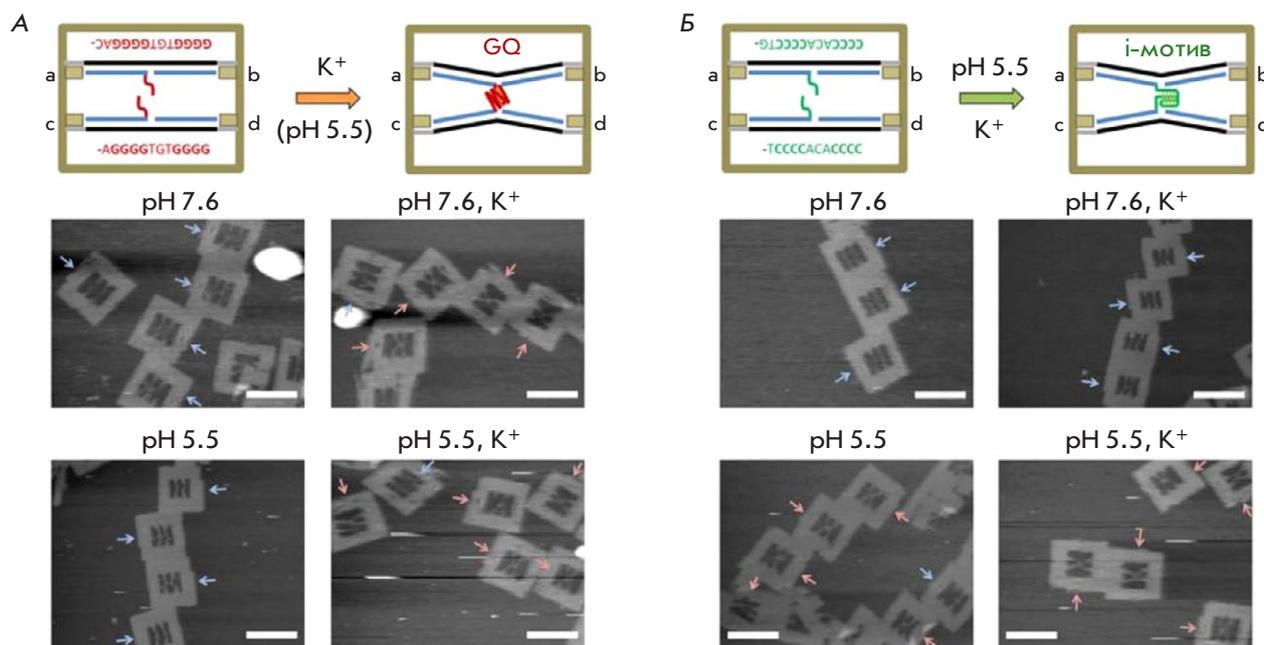


Рис. 7. А – наблюдение образования отдельного G-квадруплекса и i-мотива. АСМ-изображения ДНК-рамок, содержащих G-тракты, необходимые для образования межнитевого G-квадруплекса в присутствии K^+ . Б – АСМ-изображения ДНК-рамок, содержащих C-тракты, необходимые для образования межнитевого i-мотива в кислой среде. Голубые и красные стрелки показывают разъединенные и соединенные (X-образные) нити соответственно. Масштабные метки составляют 100 нм. Адаптировано с разрешения из [105].
Copyright (2015) American Chemical Society

[103]. Образование различных внутри- и межмолекулярных i-мотивов показано, в частности, с помощью АСМ-визуализации архитектуры ДНК-колец. Взаимное расположение этих колец позволило также определить роль длины C-повторов одноцепочечного участка ДНК в образовании внутри- или межмолекулярных i-мотивов: наличие двух трактов из шести или менее цитозиновых оснований приводило к образованию межмолекулярного i-мотива, тогда как большее количество повторов цитозиновых трактов – к формированию внутримолекулярного i-мотива.

Для АСМ-визуализации образования отдельных неканонических структур ДНК предложено встраивать G- и C-богатые последовательности олигонуклеотидов в прямоугольную ДНК-рамку, созданную на основе ДНК-оригами. С помощью высокоскоростной АСМ визуализированы образование, а также диссоциация G-квадруплекса внутри такой рамки в режиме реального времени. При этом формирование и диссоциацию G-квадруплексов идентифицировали по изменению контуров двух молекул ДНК, несущих G-квадруплексную последовательность, с параллельной на X-образную (при образовании G-квадруплекса) и наоборот (при его диссоциации) [104]. Топологически контролируемые

G-квадруплексы и i-мотивы были сформированы на основе ДНК-нанорамки с помощью перемещения цепи ДНК, добавления или изъятия ионов K^+ и использования кислой среды. Диссоциация двухцепочечной ДНК с формированием G-квадруплекса и i-мотива была визуализирована высокоскоростной АСМ (рис. 7) [105].

Не меньший научно-практический интерес представляет исследование отдельных коротких G- или C-богатых олигонуклеотидов, способных образовывать неканонические ДНК-структуры, а также их взаимодействия между собой. АСМ-визуализация таких последовательностей позволяет дополнить результаты традиционных методов исследования квадруплексов, таких, как круговой дихроизм, температурное плавление, ЯМР и др., морфологическими параметрами отдельных структур и их статистическим распределением. Тем не менее, АСМ-исследования неканонических структур ДНК из коротких олигонуклеотидов встречаются достаточно редко.

АСМ-исследование адсорбированного на поверхность слюды синтетического олигонуклеотида, содержащего G-богатый CpG-мотив, выявило наличие гетерогенных структур с высотой от 1 до 6 нм, которые, скорее всего, представляют со-

бой G-квадруплексы и их агрегаты [106]. АСМ-визуализация олигонуклеотидов, состоящих из 16 теломерных повторов TTAGGG, позволила сделать вывод о том, что большинство таких олигонуклеотидов образуют лишь два квадруплекса из четырех возможных, которые выглядели на АСМ-изображениях в виде бусин на нити [107]. G-квадруплексы из олигонуклеотидов $d(G)_{10}$, $d(TG_9)$ и $d(TG_8T)$ образовывались лишь в Na^+ -содержащем растворе при большом времени инкубации или в K^+ -содержащем растворе и выглядели как сферические агрегаты высотой 1.5–3 нм или нанопроволок (для $d(G)_{10}$) [94].

АСМ-визуализация может также применяться для исследования взаимодействия отдельных неканонических структур ДНК с различными лигандами. Изучение такого взаимодействия имеет большую актуальность в связи с предполагаемой ролью G-квадруплексов во многих внутриклеточных процессах, а также с их потенциальным использованием в качестве мишеней для противоопухолевых препаратов.

Например, при изучении взаимодействия G-квадруплексов с полиаминами была визуализирована агрегация G-квадруплексов: высота наблюдаемых структур при этом увеличивалась с 3 до 4–11 нм в зависимости от вида полиамина [108]. В другой серии АСМ-экспериментов показано, что связывающийся с G-квадруплексами триазол-акридиновый лиганд GL15 стабилизирует и ускоряет формирование квадруплексов в Na^+ - и K^+ -содержащих растворах [109]. Показано также, что производные пролинамида могут селективно связываться и стабилизировать G-квадруплексы. АСМ-исследование показало, что производная триспролинамида Pro-4 может направлять формирование структур из G-квадруплексов на основе с-МУС [110].

Из небольшого количества АСМ-исследований отдельных G-квадруплексов, образующихся из олигонуклеотидов, и их ассоциатов можно сделать вывод о том, что основным осложняющим такие исследования обстоятельством является размер таких структур, находящийся вблизи предела разрешения АСМ на мягких объектах. Пространственное разрешение атомно-силового микроскопа зависит от ряда факторов, в числе которых радиус острия используемого кантилевера. Поэтому одним из способов увеличения разрешения на АСМ-изображениях является использование сверхострых кантилеверов. В настоящее время коммерчески доступны кантилеверы, имеющие радиус кривизны до 1 нм [79, 111]. Следует отметить, что природа подложки тоже может ограничивать разрешение атомно-силового

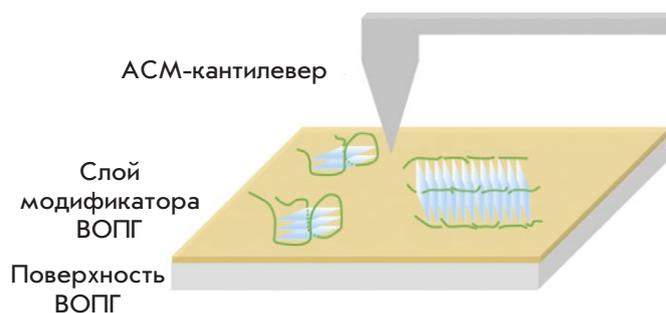


Рис. 8. Схематичное представление поверхности образца для АСМ-исследования квадруплексов и квадруплекссодержащих структур на поверхности ВОПГ, модифицированного GM

микроскопа: например, образование солевой пленки на поверхности слюды может приводить к уменьшению высоты адсорбированных структур ДНК на АСМ-изображениях и, как следствие, к ухудшению контраста и уменьшению пространственного разрешения.

Применение сверхострых кантилеверов и использование GM-модифицированной поверхности ВОПГ в качестве подложки зачастую позволяют улучшить качество структурного анализа биомолекул с помощью АСМ [79, 80]. Данный подход, проиллюстрированный на рис. 8, применен в нескольких исследованиях неканонических структур ДНК. С помощью АСМ проведен анализ полиморфизма квадруплексов, формирующихся в разных условиях из G-богатых олигонуклеотидов с разными длинами G-трактов и петель между ними [112]. Анализ морфологии и гистограмм распределения по высотам визуализированных структур позволил различить от одного до четырех видов квадруплексов, формируемых каждым из изучаемых олигонуклеотидов, и выявить закономерности формирования молекулярных ассоциатов (мультимеров G-квадруплексов) из внутримолекулярных G-квадруплексов (рис. 9).

На модельных олигонуклеотидах – фрагментах генома человека, содержащих посередине G/C-богатый участок, с помощью АСМ показано возникновение синаптических контактов между молекулами ДНК за счет образования межмолекулярных G-квадруплексов или i-мотивов [113]. Возникновением межмолекулярных i-мотивов объясняются структуры, формируемые одноцепочечными олигонуклеотидами C_nT_{25} ($n = 2, 5, 7, 9, 12, 25$) при pH 5.5, визуализированные с помощью АСМ (рис. 10) [114]. Такие структуры состоят из «ядра» (i-мотива) и выходящих из него «ножек». Эти структуры могут представлять интерес в биоинженерии для синтеза молекулярных архитектур на основе ДНК.

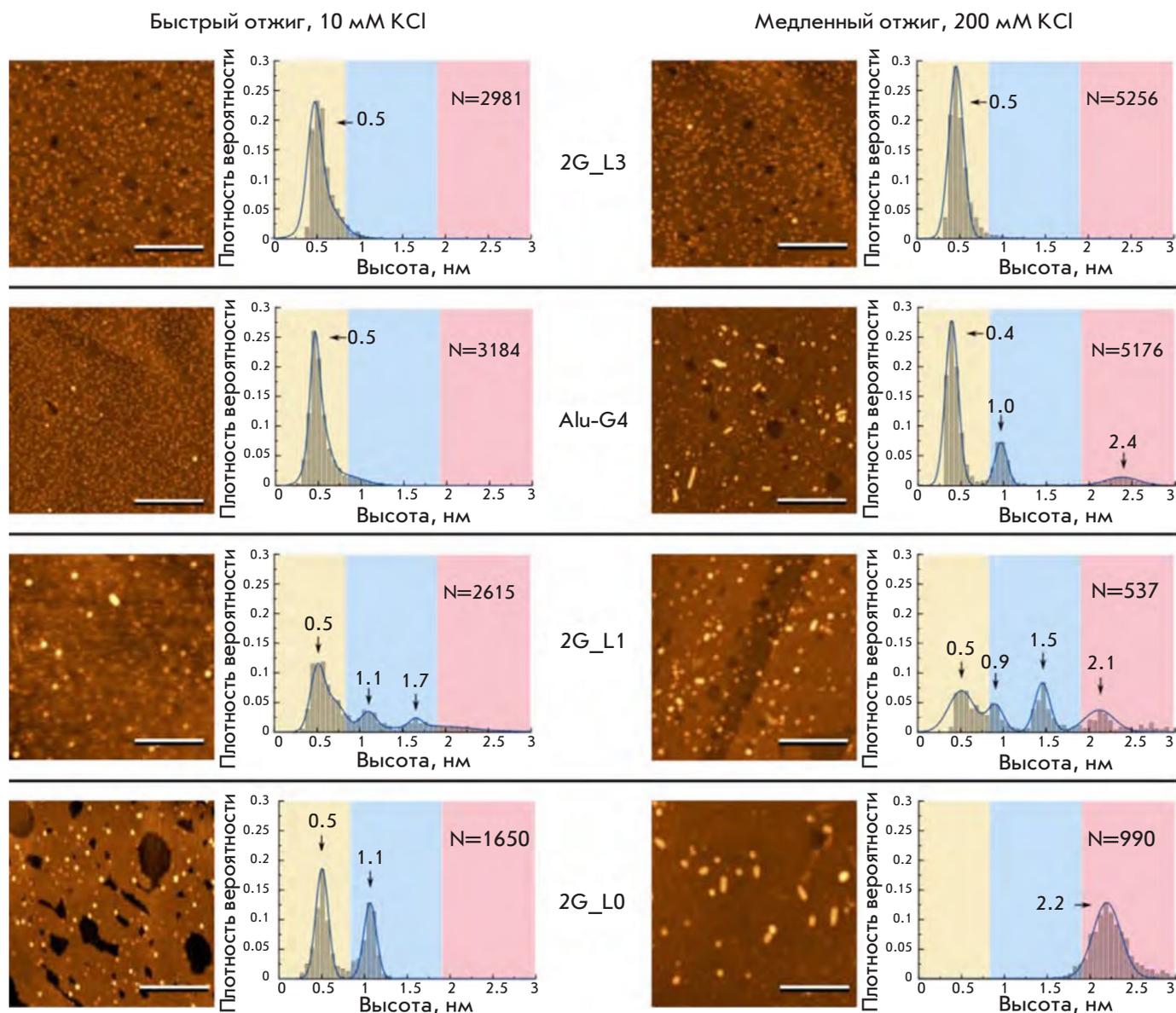


Рис. 9. АСМ-изображения и соответствующие гистограммы распределения по высотам двухтетрадных G-квадруплексов, сформированных после быстрого отжига в присутствии 10 мМ КСl (слева) и медленного отжига в присутствии 200 мМ КСl (справа). Масштабная метка 100 нм. Воспроизведено из [112] согласно лицензии CC BY 4.0 (<http://creativecommons.org/licenses/by/4.0/>)

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время для визуализации неканонических структур ДНК в основном используются такие методы, как флуоресцентная микроскопия, ПЭМ и АСМ. Флуоресцентная микроскопия позволяет визуализировать G-квадруплексы, в том числе и в живых клетках, при этом визуализация осуществляется за счет флуоресцентной метки, связывающейся с ДНК-квадруплексом. Поэтому большое внимание уделяется разработке флуорофоров, обладающих высокой селективностью

к G-квадруплексам и хорошими оптическими свойствами. Среди разновидностей флуоресцентной микроскопии, используемой для визуализации квадруплексов, стоит отметить микроскопию визуализации времени жизни флуоресценции и иммунофлуоресцентную микроскопию. В последнем случае используются антитела к G-квадруплексам, которые усиливаются вторичными антителами с пришитыми флуоресцентными метками. В последние несколько лет флуоресцентная микроскопия предоставила большое количество данных, доказывающих су-

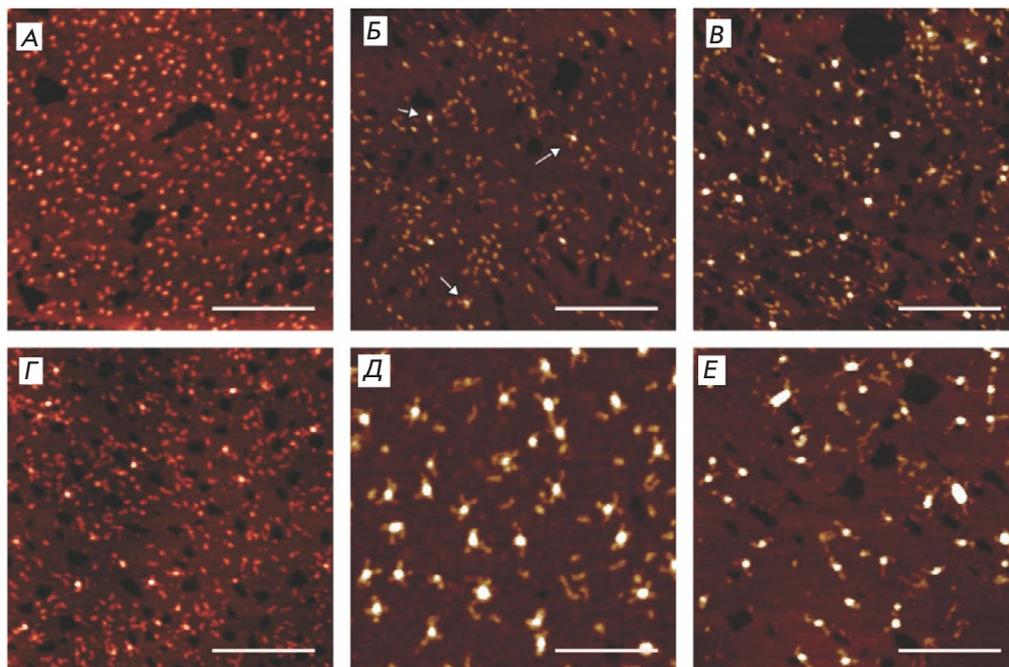


Рис. 10. АСМ-изображения наноструктур на основе *i*-мотивов, образованных следующими олигонуклеотидными последовательностями при pH 5.5: C₂T₂₅ (А); C₅T₂₅ (Б); C₇T₂₅ (В); C₉T₂₅ (Г); C₁₂T₂₅ (Д); C₂₅T₂₅ (Е). Масштабная метка 100 нм. Воспроизведено из [114] согласно лицензии CC BY-NC 3.0 (<https://creativecommons.org/licenses/by-nc/3.0/>)

ществование G-квадруплексов в живых клетках, при этом ДНК-квадруплексы локализованы в основном в ядрышке, а РНК-квадруплексы – в цитоплазме клетки.

В отличие от флуоресцентной микроскопии, ПЭМ и АСМ способны визуализировать неканонические структуры ДНК без использования меток. Оба метода имеют сравнимое латеральное разрешение, при этом АСМ, в отличие от ПЭМ, обладает высоким разрешением по высоте. С помощью ПЭМ и АСМ визуализирован ряд структур на основе неканонических структур, таких, как G- и R-петли, G-нанопроволоки. Для АСМ-визуализации образования и диссоциации отдельных квадруплексов и *i*-мотивов в режиме реального времени разработаны специальные подходы, использующие основанные на технологии ДНК-оригами ДНК-нанорамки, в которые встроены олигонуклеотиды, способные образовывать неканонические структуры ДНК. Эти исследования позволили лучше понять влияние условий, таких, как состав и концентрация ионов, pH,

расстояние между взаимодействующими фрагментами ДНК и пр., на образование G-квадруплексов или *i*-мотивов. АСМ- и ПЭМ-визуализация отдельных неканонических структур ДНК и их небольших ассоциатов являются наиболее сложной с методической точки зрения задачей, так как размер таких структур близок к разрешающей способности этих методов. Дальнейшее увеличение разрешающей способности АСМ в применении к исследованию неканонических структур ДНК представляется связанным с использованием специальных подложек (например, модифицированного графита), а также с применением сверхострых кантилеверов. С применением данного подхода визуализирован полиморфизм структур G-квадруплексов, а также обнаружено возникновение синаптического контакта олигонуклеотидов за счет образования межмолекулярных неканонических структур ДНК. ●

Данная работа поддержана Российским научным фондом (проект № 22-23-00395).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gellert M., Lipsett M.N., Davies D.R. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 1962. V. 48. № 12. P. 2013–2018.
- Gehring K., Leroy J.-L., Guéron M. // Nature. 1993. V. 363. № 6429. P. 561–565.
- Hänsel-Hertsch R., Di Antonio M., Balasubramanian S. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2017. V. 18. № 5. P. 279–284.
- Abou Assi H., Garavís M., González C., Damha M.J. // Nucl. Acids Res. 2018. V. 46. № 16. P. 8038–8056.
- Brown S.L., Kendrick S. // Pharmaceuticals. 2021. V. 14. № 2. P. 96.
- Varshney D., Spiegel J., Zyner K., Tannahill D., Balasubramanian S. // Nat. Rev. Mol. Cell Biol. 2020. V. 21. № 8. P. 459–474.
- Drygin D., Siddiqui-Jain A., O'Brien S., Schwaebe M., Lin A., Bliesath J., Ho C.B., Proffitt C., Trent K., Whitten J.P., et al. // Cancer Res. 2009. V. 69. № 19. P. 7653–7661.
- Ohnmacht S.A., Marchetti C., Gunaratnam M., Besser R.J., Haider S.M., Di Vita G., Lowe H.L., Mellinas-Gomez M., Diocou S., Robson M., et al. // Sci. Rep. 2015. V. 5. № 1. P. 11385.
- Shu B., Cao J., Kuang G., Qiu J., Zhang M., Zhang Y., Wang

- M., Li X., Kang S., Ou T.-M., et al. // *Chem. Commun.* 2018. V. 54. № 16. P. 2036–2039.
10. Kuang G., Zhang M., Kang S., Hu D., Li X., Wei Z., Gong X., An L.-K., Huang Z.-S., Shu B., et al. // *J. Med. Chem.* 2020. V. 63. № 17. P. 9136–9153.
11. Livshits G.I., Stern A., Rotem D., Borovok N., Eidelstein G., Migliore A., Penzo E., Wind S.J., Di Felice R., Skourtis S.S., et al. // *Nat. Nanotechnol.* 2014. V. 9. № 12. P. 1040–1046.
12. Xu J., Yan C., Wang X., Yao B., Lu J., Liu G., Chen W. // *Anal. Chem.* 2019. V. 91. № 15. P. 9747–9753.
13. Li C., Chen H., Chen Q., Shi H., Yang X., Wang K., Liu J. // *Anal. Chem.* 2020. V. 92. № 14. P. 10169–10176.
14. Alberti P., Mergny J.-L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2003. V. 100. № 4. P. 1569–1573.
15. Yang T., Peng S., Zeng R., Xu Q., Zheng X., Wang D., Zhou X., Shao Y. // *Spectrochim. Acta. A. Mol. Biomol. Spectrosc.* 2022. V. 270. P. 120845.
16. Huang J., Ying L., Yang X., Yang Y., Quan K., Wang H., Xie N., Ou M., Zhou Q., Wang K. // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. № 17. P. 8724–8731.
17. Burge S., Parkinson G.N., Hazel P., Todd A.K., Neidle S. // *Nucl. Acids Res.* 2006. V. 34. № 19. P. 5402–5415.
18. Karsisiotis A.I., Hessari N.M., Novellino E., Spada G.P., Randazzo A., Webba da Silva M. // *Angew. Chem. Int. Ed.* 2011. V. 50. № 45. P. 10645–10648.
19. Binnig G., Quate C., Gerber C. // *Phys. Rev. Lett.* 1986. V. 56. № 9. P. 930–933.
20. Mirsaidov U.M., Zheng H., Casana Y., Matsudaira P. // *Biophys. J.* 2012. V. 102. № 4. P. L15–L17.
21. *Transmission Electron Microscopy: Diffraction, Imaging, and Spectrometry* / Eds Carter B., Williams D.B. Cham: Springer International Publ., 2016.
22. Alessandrini A., Facci P. // *Meas. Sci. Technol.* 2005. V. 16. № 6. P. R65–R92.
23. Lyubchenko Y.L. // *J. Phys. Appl. Phys.* 2018. V. 51. № 40. P. 403001.
24. Largy E., Granzhan A., Hamon F., Verga D., Teulade-Fichou M.-P. // *Quadruplex Nucleic Acids* / Eds Chaires J.B., Graves D. Berlin: Heidelberg Springer, 2013. P. 111–177.
25. Chang C.-C., Kuo I.-C., Ling I.-F., Chen C.-T., Chen H.-C., Lou P.-J., Lin J.-J., Chang T.-C. // *Anal. Chem.* 2004. V. 76. № 15. P. 4490–4494.
26. Chan Y.-C., Chen J.-W., Su S.-Y., Chang C.-C. // *Biosens. Bioelectron.* 2013. V. 47. P. 566–573.
27. Lubitz I., Zikich D., Kotlyar A. // *Biochemistry.* 2010. V. 49. № 17. P. 3567–3574.
28. Xu L., Shen X., Hong S., Wang J., Zhou L., Chen X., Pei R. // *Asian J. Org. Chem.* 2015. V. 4. № 12. P. 1375–1378.
29. Nygren J., Svanvik N., Kubista M. // *Biopolymers.* 1998. V. 46. № 1. P. 39–51.
30. Lee L.G., Chen C.-H., Chiu L.A. // *Cytometry.* 1986. V. 7. № 6. P. 508–517.
31. Mohanty J., Barooah N., Dhamodharan V., Harikrishna S., Pradeepkumar P.L., Bhasikuttan A.C. // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V. 135. № 1. P. 367–376.
32. Hanczyc P., Rajchel-Mieldzioc P., Feng B., Fita P. // *J. Phys. Chem. Lett.* 2021. V. 12. № 22. P. 5436–5442.
33. Barooah N., Mohanty J., Bhasikuttan A.C. // *J. Indian Chem. Soc.* 2021. V. 98. № 6. P. 100078.
34. Turaev A.V., Tsvetkov V.B., Tankevich M.V., Smirnov I.P., Aralov A.V., Pozmogova G.E., Varizhuk A.M. // *Biochimie.* 2019. V. 162. P. 216–228.
35. Yu K.-K., Li K., He H.-Z., Liu Y.-H., Bao J.-K., Yu X.-Q. // *Sens. Actuators B Chem.* 2020. V. 321. P. 128479.
36. Yan J., Tian Y., Tan J., Huang Z. // *Analyst.* 2015. V. 140. № 21. P. 7146–7149.
37. Platella C., Gaglione R., Napolitano E., Arciello A., Pirola V., Doria F., Musumeci D., Montesarchio D. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 19. P. 10624.
38. Ma D.-L., Zhang Z., Wang M., Lu L., Zhong H.-J., Leung C.-H. // *Chem. Biol.* 2015. V. 22. № 7. P. 812–828.
39. Tseng T.-Y., Chien C.-H., Chu J.-F., Huang W.-C., Lin M.-Y., Chang C.-C., Chang T.-C. // *J. Biomed. Opt.* 2013. V. 18. № 10. P. 101309.
40. Shivalingam A., Izquierdo M.A., Marois A.L., Vyšniauskas A., Suhling K., Kuimova M.K., Vilar R. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 8178.
41. Summers P.A., Lewis B.W., Gonzalez-Garcia J., Porreca R.M., Lim A.H.M., Cadinu P., Martin-Pintado N., Mann D.J., Edel J.B., Vannier J.B., et al. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 162.
42. Zhang S., Sun H., Chen H., Li Q., Guan A., Wang L., Shi Y., Xu S., Liu M., Tang Y. // *Biochim. Biophys. Acta – Gen. Subj.* 2018. V. 1862. № 5. P. 1101–1106.
43. Yang S.Y., Amor S., Laguerre A., Wong J.M.Y., Monchaud D. // *Biochim. Biophys. Acta BBA – Gen. Subj.* 2017. V. 1861. № 5. Part B. P. 1312–1320.
44. Lu Y.-J., Hu D.-P., Zhang K., Wong W.-L., Chow C.-F. // *Biosens. Bioelectron.* 2016. V. 81. P. 373–381.
45. Kang Y., Wei C. // *Chem. Biodivers.* 2022. V. 19. № 3. e202101030.
46. Guo X., Chen H., Liu Y., Yang D., Li Q., Du H., Liu M., Tang Y., Sun H. // *J. Mater. Chem. B.* 2022. V. 10. № 3. P. 430–437.
47. Liu L.-Y., Liu W., Wang K.-N., Zhu B.-C., Xia X.-Y., Ji L.-N., Mao Z.-W. // *Angew. Chem.* 2020. V. 132. № 24. P. 9806–9813.
48. Laguerre A., Hukezalie K., Winckler P., Katranji F., Chanteloup G., Pirrotta M., Perrier-Cornet J.-M., Wong J.M.Y., Monchaud D. // *J. Am. Chem. Soc.* 2015. V. 137. № 26. P. 8521–8525.
49. Huang W.-C., Tseng T.-Y., Chen Y.-T., Chang C.-C., Wang Z.-F., Wang C.-L., Hsu T.-N., Li P.-T., Chen C.-T., Lin J.-J., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 21. P. 10102–10113.
50. Biffi G., Di Antonio M., Tannahill D., Balasubramanian S. // *Nat. Chem.* 2014. V. 6. № 1. P. 75–80.
51. Biffi G., Tannahill D., Miller J., Howat W.J., Balasubramanian S. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 7. P. e102711.
52. Henderson A., Wu Y., Huang Y.C., Chavez E.A., Platt J., Johnson F.B., Brosh R.M., Sen D., Lansdorp P.M. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 2. P. 860–869.
53. Biffi G., Tannahill D., McCafferty J., Balasubramanian S. // *Nat. Chem.* 2013. V. 5. № 3. P. 182–186.
54. Zyner K.G., Simeone A., Flynn S.M., Doyle C., Marsico G., Adhikari S., Portella G., Tannahill D., Balasubramanian S. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 142.
55. Tang W., Niu K., Yu G., Jin Y., Zhang X., Peng Y., Chen S., Deng H., Li S., Wang J., et al. // *Epigenetics Chromatin.* 2020. V. 13. № 1. P. 12.
56. Duquette M.L., Handa P., Vincent J.A., Taylor A.F., Maizels N. // *Genes Dev.* 2004. V. 18. № 13. P. 1618–1629.
57. Reddy K., Schmidt M.H.M., Geist J.M., Thakkar N.P., Panigrahi G.B., Wang Y.-H., Pearson C.E. // *Nucl. Acids Res.* 2014. V. 42. № 16. P. 10473–10487.
58. Hammondkosack M., Dobrinski B., Lurz R., Docherty K., Kilpatrick M. // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. № 2. P. 231–236.
59. Yatsunyk L.A., Piétrement O., Albrecht D., Tran P.L.T., Renčiuk D., Sugiyama H., Arbona J.-M., Aimé J.-P., Mergny J.-L. // *ACS Nano.* 2013. V. 7. № 7. P. 5701–5710.
60. Randall A., Griffith J.D. // *J. Biol. Chem.* 2009. V. 284. № 21. P. 13980–13986.

61. Artusi S., Perrone R., Lago S., Raffa P., Di Iorio E., Palù G., Richter S.N. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 21. P. 10343–10353.
62. Scotuzzi M., Kuipers J., Wensveen D.I., de Boer P., Hagen K.C.W., Hoogenboom J.P., Giepmans B.N.G. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. P. 45970.
63. Zhong Q., Inniss D., Kjoller K., Elings V. // *Surf. Sci.* 1993. V. 290. № 1–2. P. L688–L692.
64. Xu K., Sun W., Shao Y., Wei F., Zhang X., Wang W., Li P. // *Nanotechnol. Rev.* 2018. V. 7. № 6. P. 605–621.
65. Vesenka J., Guthold M., Tang C., Keller D., Delaine E., Bustamante C. // *Ultramicroscopy.* 1992. V. 42. P. 1243–1249.
66. Bustamante C., Vesenka J., Tang C., Rees W., Guthold M., Keller R. // *Biochemistry.* 1992. V. 31. № 1. P. 22–26.
67. Lyubchenko Y.L., Shlyakhtenko L.S. // *Methods.* 2009. V. 47. № 3. P. 206–213.
68. Rivetti C., Guthold M., Bustamante C. // *J. Mol. Biol.* 1996. V. 264. № 5. P. 919–932.
69. Vanderlinden W., De Feyter S. // *Nanoscale.* 2013. V. 5. № 6. P. 2264–2268.
70. Bustamante C., Guthold M., Zhu X.S., Yang G.L. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 24. P. 16665–16668.
71. Suzuki Y., Higuchi Y., Hizume K., Yokokawa M., Yoshimura S.H., Yoshikawa K., Takeyasu K. // *Ultramicroscopy.* 2010. V. 110. № 6. P. 682–688.
72. Valle F., Favre M., De Los Rios P., Rosa A., Dietler G. // *Phys. Rev. Lett.* 2005. V. 95. № 15. P. 158105.
73. Christenson H.K., Thomson N.H. // *Surf. Sci. Rep.* 2016. V. 71. № 2. P. 367–390.
74. Sorel I., Piétrement O., Hamon L., Baconnais S., Le Cam E., Pastré D. // *Biochemistry.* 2006. V. 45. № 49. P. 14675–14682.
75. Brett A.M.O., Chiorcea A.M. // *Langmuir.* 2003. V. 19. № 9. P. 3830–3839.
76. Jiang X.H., Lin X.Q. // *Electrochem. Commun.* 2004. V. 6. № 9. P. 873–879.
77. Klinov D.V., Dubrovin E.V., Yaminsky I.V. // *Phys. Low-Dimens. Struct.* 2003. V. 3–4. P. 119–124.
78. Klinov D.V., Dubrovin E.V., Yaminsky I.V. // *AIP Conf. Proc.* 2003. V. 696. P. 452–456.
79. Klinov D., Dwir B., Kapon E., Borovok N., Molotsky T., Kotlyar A. // *Nanotechnology.* 2007. V. 18. № 22. P. 225102.
80. Klinov D.V., Protopopova A.D., Andrianov D.S., Litvinov R.I., Weisel J.W. // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2020. V. 196. P. 111321.
81. Barinov N.A., Tolstova A.P., Bersenev E.A., Ivanov D.A., Dubrovin E.V., Klinov D.V. // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2021. V. 206. P. 111921.
82. Dubrovin E.V., Klinov D.V. // *Polym. Sci. Ser. A.* 2021. V. 63. № 6. P. 601–622.
83. Rabe J., Buchholz S. // *Science.* 1991. V. 253. № 5018. P. 424–427.
84. Cincotti S., Rabe J.P. // *Appl. Phys. Lett.* 1993. V. 62. № 26. P. 3531–3533.
85. van Hameren R., Schön P., van Buul A.M., Hoogboom J., Lazarenko S.V., Gerritsen J.W., Engelkamp H., Christianen P.C.M., Heus H.A., Maan J.C., et al. // *Science.* 2006. V. 314. № 5804. P. 1433–1436.
86. De Feyter S., De Schryver F.C. // *J. Phys. Chem. B.* 2005. V. 109. № 10. P. 4290–4302.
87. Adamcik J., Tobenas S., Di Santo G., Klinov D., Dietler G. // *Langmuir.* 2009. V. 25. № 5. P. 3159–3162.
88. Dubrovin E.V., Gerritsen J.W., Zivkovic J., Yaminsky I.V., Speller S. // *Colloids Surf. B Biointerfaces.* 2010. V. 76. № 1. P. 63–69.
89. Dubrovin E.V., Speller S., Yaminsky I.V. // *Langmuir.* 2014. V. 30. № 51. P. 15423–15432.
90. Dubrovin E.V., Schächtele M., Schäffer T.E. // *RSC Adv.* 2016. V. 6. № 83. P. 79584–79592.
91. Vesenka J., Marsh T., Miller R., Henderson E. // *J. Vac. Sci. Technol. B.* 1996. V. 14. № 2. P. 1413–1417.
92. Karimata H., Miyoshi D., Fujimoto T., Koumoto K., Wang Z.-M., Sugimoto N. // *Nucl. Acids Symp. Ser.* 2007. № 51. P. 251–252.
93. Ma'ani Hessari N., Spindler L., Troha T., Lam W.-C., Drevenšek-Olenik I., Webba da Silva M. // *Chem. – Eur. J.* 2014. V. 20. № 13. P. 3626–3630.
94. Chiorcea-Paquim A.-M., Santos P.V., Eritja R., Oliveira-Brett A.M. // *Phys. Chem. Chem. Phys. PCCP.* 2013. V. 15. № 23. P. 9117–9124.
95. Borovok N., Iram N., Zikich D., Ghabboun J., Livshits G.I., Porath D., Kotlyar A.B. // *Nucl. Acids Res.* 2008. V. 36. № 15. P. 5050–5060.
96. Kotlyar A.B., Borovok N., Molotsky T., Cohen H., Shapir E., Porath D. // *Adv. Mater.* 2005. V. 17. № 15. P. 1901–1905.
97. Borovok N., Molotsky T., Ghabboun J., Porath D., Kotlyar A. // *Anal. Biochem.* 2008. V. 374. № 1. P. 71–78.
98. Jiao Y., Schäffer T.E. // *Langmuir.* 2004. V. 20. № 23. P. 10038–10045.
99. Phillips K., Dauter Z., Murchie A.I.H., Lilley D.M.J., Luisi B. // *J. Mol. Biol.* 1997. V. 273. № 1. P. 171–182.
100. Cao Y., Gao S., Yan Y., Bruist M.F., Wang B., Guo X. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. № 1. P. 26–38.
101. Mendez M.A., Szalai V.A. // *Nanoscale Res. Lett.* 2013. V. 8. № 1. P. 210.
102. Li Y., Syed J., Suzuki Y., Asamitsu S., Shioda N., Wada T., Sugiyama H. // *ChemBioChem.* 2016. V. 17. № 10. P. 928–935.
103. Li T., Famulok M. // *J. Am. Chem. Soc.* 2013. V. 135. № 4. P. 1593–1599.
104. Sannohe Y., Endo M., Katsuda Y., Hidaka K., Sugiyama H. // *J. Am. Chem. Soc.* 2010. V. 132. № 46. P. 16311–16313.
105. Endo M., Xing X., Zhou X., Emura T., Hidaka K., Tiesuwan B., Sugiyama H. // *ACS Nano.* 2015. V. 9. № 10. P. 9922–9929.
106. Costa L.T., Kerkmann M., Hartmann G., Endres S., Bisch P.M., Heckl W.M., Thalhammer S. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 313. № 4. P. 1065–1072.
107. Wang H., Nora G.J., Ghodke H., Opresko P.L. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 9. P. 7479–7489.
108. Wen L.-N., Xie M.-X. // *Biochimie.* 2013. V. 95. № 6. P. 1185–1195.
109. Chiorcea-Paquim A.-M., Rodrigues Pontinha A.D., Eritja R., Lucarelli G., Sparapani S., Neidle S., Oliveira-Brett A.M. // *Anal. Chem.* 2015. V. 87. № 12. P. 6141–6149.
110. Chauhan A., Paladhi S., Debnath M., Dash J. // *Org. Biomol. Chem.* 2016. V. 14. № 24. P. 5761–5767.
111. Obratsova E.A., Basmanov D.V., Barinov N.A., Klinov D.V. // *Ultramicroscopy.* 2019. V. 197. P. 11–15.
112. Varizhuk A.M., Protopopova A.D., Tsvetkov V.B., Barinov N.A., Podgorsky V.V., Tankevich M.V., Vlasenok M.A., Severov V.V., Smirnov I.P., Dubrovin E.V., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. № 17. P. 8978–8992.
113. Severov V.V., Tsvetkov V.B., Barinov N.A., Babenko V.V., Klinov D.V., Pozmogova G.E. // *Polymers.* 2022. V. 14(10). P. 2118.
114. Protopopova A.D., Tsvetkov V.B., Varizhuk A.M., Barinov N.A., Podgorsky V.V., Klinov D.V., Pozmogova G.E. // *Phys. Chem. Chem. Phys.* 2018. V. 20. № 5. P. 3543–3553.

УДК 57.577.2

Патологическое взаимодействие β -амилоида и митохондрий: роль в возникновении и развитии болезни Альцгеймера

Н. С. Николаева*, Е. Ю. Яндулова, Ю. Р. Александрова, А. С. Стариков, М. Е. Неганова*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт физиологически активных веществ Российской академии наук, Черноголовка, 142432 Россия

*E-mail: nikolaevans@bk.ru; neganova83@mail.ru

Поступила в редакцию 27.04.2022

Принята к печати 05.07.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11723

РЕФЕРАТ Болезнь Альцгеймера – одно из наиболее распространенных нейродегенеративных заболеваний, характеризующееся нарушением когнитивных функций из-за прогрессирующей потери нейронов в головном мозге. Основным патологическим признаком заболевания являются внеклеточные β -амилоидные (А β) бляшки. При болезни Альцгеймера наблюдаются не только нарушения в агрегации белка, но и усиление фрагментации митохондрий, изменения в экспрессии генов митохондриального биогенеза, а также взаимодействия эндоплазматического ретикулума и митохондрий, митофагии. Известно, что на уровень экспрессии и процессы агрегации А β влияют активные кислородные радикалы. В свою очередь, олигомерные или агрегированные формы А β вызывают митохондриальные нарушения. В этом обзоре нами обобщены данные о патологическом действии А β на митохондрии, а также о потенциальных молекулярных мишенях, связанных с протеинопатией, для фармакологической коррекции болезни Альцгеймера.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА болезнь Альцгеймера, бета-амилоид, бета-секретаза, митохондрии, митофагия, эндоплазматический ретикулум.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БА – болезнь Альцгеймера; А β – бета-амилоидный пептид; APP – белок-предшественник бета-амилоида; МAM – мембрана эндоплазматического ретикулума, связанная с мембраной митохондрий; ЭПР – эндоплазматический ретикулум; TOM – транслоказа внешней мембраны; TIM – транслоказа внутренней мембраны; BACE1 – β -секретаза 1; NEP – неприлизин, нейтральная эндопептидаза; IDE – фермент, расщепляющий инсулин человека; PreP – протеаза препоследовательности; ECE – эндотелинпревращающий фермент; ABAD – алкогольдегидрогеназа, связывающая бета-амилоид; VDAC – потенциалзависимый анион-селективный канал; PGC-1 α – коактиватор гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом 1-альфа; PINK1 – рецептор-опосредованная киназа 1, индуцируемая PTEN; GSK-3 β – киназа гликогенсинтазы-3-бета; Fis1 – белок митохондриального деления 1; Drp1 – белок, подобный динамину-1, регулирует деление митохондрий; OPA1 – белок-продукт гена атрофии зрительного нерва 1; SOD – супероксид-дисмутаза; GPx – глутатионпероксидаза; CAT – каталаза; GSH – глутатион.

ВВЕДЕНИЕ

Нейродегенеративные заболевания – заболевания, характеризующиеся прогрессирующей гибелью нейронов, связанной с отложением белков с измененными физико-химическими свойствами, а также с выраженными когнитивными нарушениями. Согласно прогнозам, к 2050 году число людей с деменцией во всем мире увеличится до 131.5 млн [1]. Болезнь Альцгеймера (БА) является самой распространенной формой нейродегенеративных заболева-

ний, она возникает в основном у людей после 65 лет [2]. К основным патоморфологическим признакам БА относятся отложение и накопление аномально свернутого β -амилоидного (А β) пептида и укороченных гиперфосфорилированных тау-белков [3, 4]. Причина развития БА остается спорной и до конца неизвестной. Выдвинуты различные гипотезы патогенеза БА, среди которых наиболее распространены гипотезы амилоидного [5, 6] и митохондриального каскадов [7]. Предложены также холинергическая

[8] и тау [9] гипотезы, теория окислительного стресса [10, 11], гипотеза гомеостаза кальция [12], нейровоспаления [13], нейрососудистая гипотеза [14], гипотезы металлов с переменной степенью окисления [15] и вирусного происхождения [16]. К настоящему времени не существует лекарственного средства, способного предотвратить развитие БА. В клинической практике используют четыре препарата: три ингибитора холинэстеразы (галантамин, ривастигмин и донепезил) и мемантин (неконкурентный антагонист NMDA-рецепторов), однако они обладают лишь симптоматическим действием, поэтому на основании данных, постулируемых в современных гипотезах патогенеза БА, ведется интенсивный поиск новых потенциальных лекарственных средств.

Выделяют спорадическую (встречается в большинстве случаев) и семейную (наследуется по аутосомно-доминантному типу, имеет раннее начало) формы БА. Семейная форма БА возникает в результате мутаций в генах белка-предшественника β -амилоида (APP, расположен на 21-й хромосоме [17]), пресенилина 1 (PSEN1, расположен на 14-й хромосоме) [18] и пресенилина 2 (PSEN2, расположен на 1-й хромосоме [19]). Наличие одной или нескольких мутаций в этих генах приводит к нарушению расщепления APP, в результате чего увеличивается соотношение пептидов $A\beta_{1-42}/A\beta_{1-40}$ [20, 21], что, в свою очередь, приводит к отложению фибриллярного $A\beta$ и раннему началу заболевания [22, 23]. Спорадическая форма БА, имеющая позднее начало, представляет собой многофакторный патологический процесс, возникающий в результате мутаций в аллельных вариантах гена аполипопротеина E (APOE), сосудистых патологий, дефектов иммунной системы, митохондриальной дисфункции, дисгомеостаза металлов с переменной степенью окисления [24].

Один из важных патогенетических механизмов БА – нарушение работы основных энергетических органелл клетки – митохондрий. Митохондрии представляют собой двумембранные органеллы, которые подвергаются циклам деления и слияния, что приводит к изменению их перемещений, морфологии и функций [25]. Нарушение в работе митохондрий играет важную роль в патологии нейродегенеративных заболеваний [26–28]. Физиологическое состояние новообразованных митохондрий обычно контролируется балансом деления/слияния митохондрий, путей их биогенеза, убиквитиновых протеасомных путей и сигнальных белков митофагии и аутофагии. $A\beta$ и гиперфосфорилированный тау-белок вовлечены в процессы окислительного повреждения митохондриальных мембран, мтДНК, что в конечном итоге приводит к дисбалансу в дина-

мике митохондрий [29]. $A\beta$ -индуцированный окислительный стресс изменяет процесс слияния/деления митохондрий, в результате чего состояние органелл ухудшается, увеличивается уровень образования активных форм кислорода (АФК) – молекулярных маркеров окислительного стресса, что, в свою очередь, приводит к накоплению патологического $A\beta$. Основные пути поступления $A\beta$ в митохондрии – область эндоплазматического ретикулума, связанная с мембраной митохондрий (МММ), и комплекс транслоказ внешней и внутренней мембраны (ТОМ-ТИМ) [30, 31].

В нашем обзоре рассмотрены основные пути взаимодействия митохондрий и $A\beta$, связанные с поступлением, выведением, а также с влиянием $A\beta$ на различные функции митохондрий. Эти пути могут служить потенциальными мишенями воздействия нейропротекторных препаратов, сочетающих в себе способность препятствовать формированию отложений $A\beta$ и митохондриальной дисфункции, что, в итоге, приведет к замедлению прогрессирования БА.

ПУТИ ОБРАЗОВАНИЯ $A\beta$ ИЗ БЕЛКА-ПРЕДШЕСТВЕННИКА АМИЛОИДА

$A\beta$ -пептид образуется в результате последовательного расщепления APP α -/ β - и γ -секретазами [32]. APP представляет собой мембранный белок типа I (110–130 кДа), содержащий большой внеклеточный гликозилированный N-концевой домен и более короткую цитоплазматическую C-концевую область, расположенную в направлении внутриклеточного пространства. APP синтезируется в ЭПР, а затем транспортируется в комплекс Гольджи (АГ), где завершает созревание, и в зрелом виде переносится к плазматической мембране [33]. Расщепление APP происходит двумя путями: неамилоидогенным, который предотвращает отложение $A\beta$, и амилоидогенным – ведущим к образованию $A\beta$ (рис. 1).

При неамилоидогенном пути первое разрезание APP катализируется α -секретазой, ферментом, который принадлежит к семейству дезинтегринов, и металлопротеазами ADAM (Disintegrin and metalloproteinase domain-containing protein, в нейронах ADAM10 [EC 3.4.24.81] и ADAM17 [EC 3.4.24.86]). Основными местами расщепления APP α -секретазой считаются плазматическая мембрана и транс-сеть комплекса Гольджи [34]. Фермент α -секретаза расщепляет APP по 16–17 аминокислотным остаткам в последовательности $A\beta$ с образованием небольшого закрепленного в мембране 83 аминокислотного C-концевого фрагмента APP (α -CTF, C83) и растворимого белка APP- α (sAPP α) [35]. sAPP α известен многочисленными нейроза-

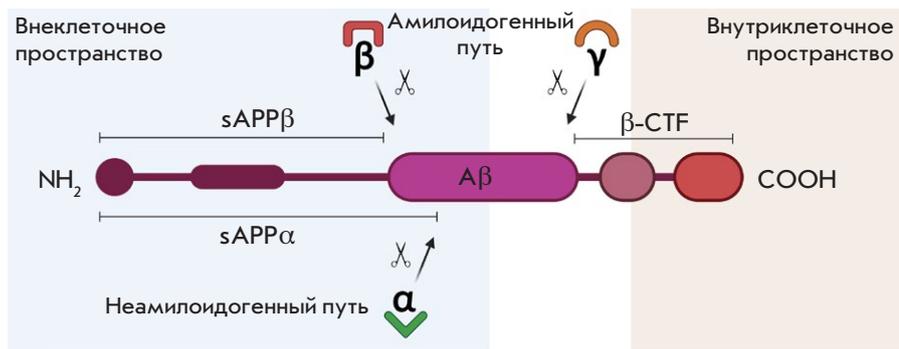


Рис. 1. Упрощенная схема структуры и расщепления APP. APP подвергается последовательному протеолизу β-секретазой (β), α-секретазой (α) и γ-секретазой (γ) для высвобождения Aβ из плазматической мембраны нейронов. sAPPα – растворимый альфа-фрагмент APP; sAPPβ – растворимый бета-фрагмент APP; фрагмент β-CTF (C99, связанный с мембраной)

щитными функциями, в частности, он противодействует токсическим эффектам Aβ [36, 37]. Затем α-CTF расщепляется γ-секретазой до гидрофобного фрагмента P3 (3 кДа) и внутриклеточного домена белка-предшественника амилоида (AICD) [38]. Функциональный γ-секретазный комплекс включает в себя следующие белки: пресенилин 1 (PS-1) или пресенилин 2 (PS-2), которые относятся к каталитическому домену, а также никастрин, служащий рецептором субстрата [39], усилитель пресенилина 1 (Pen-1, или aph-1, anterior pharynx-defective 1) и усилитель пресенилина 2 (Pen-2) [40]. Aph-1 и Pen-2 функционируют подобно трансмембранной аспартилпротеазе, играя важную роль в соотношении Aβ₁₋₄₀/Aβ₁₋₄₂ [41].

Амилоидогенный путь начинается с N-концевого расщепления APP β-секретазой (BACE1; фермент-1, расщепляющий APP по β-сайту [EC 3.4.23.46]) [42], в результате чего образуются растворимые sAPPβ и β-С-концевой фрагмент (β-CTF; С-концевой фрагмент APP из 99 аминокислотных остатков; C99). Впоследствии комплекс γ-секретазы расщепляет β-CTF с образованием Aβ (4 кДа) и AICD [35]. Форма Aβ₁₋₄₂ токсичнее, чем Aβ₁₋₄₀, за счет более высокой способности к агрегации [43]. Aβ₁₋₄₂ запускает сигнальные пути, которые приводят к развитию синаптической и митохондриальной дисфункции, нарушению гомеостаза Ca²⁺, окислительному стрессу и, в конечном итоге, к апоптозу нейронов [44]. Накопление Aβ и C99 стимулирует нейровоспаление в модели БА у мышей [45, 46]. Показано, что Aβ локализуется во внеклеточных и внутриклеточных компартментах, включая эндосомы, лизосомы и митохондриальную мембрану [47, 48].

Таким образом, Aβ образуется по патологическому амилоидогенному пути в случае мутаций в генах, кодирующих белки комплекса γ-секретазы, либо при нарушении экспрессии ферментов α- и β-секретаз, в результате чего и образуется более длинный Aβ, способный к агрегации.

ПУТИ ПОСТУПЛЕНИЯ Aβ В МИТОХОНДРИИ И ЕГО ВЛИЯНИЕ НА МИТОХОНДРИАЛЬНЫЙ ТРАНСПОРТ

Для нормального функционирования митохондрий необходимо большое количество белков, основная часть которых (около 99%) синтезируется в цитозольных рибосомах [49] и посттрансляционно импортируется в различные субкомпарменты органелл. В настоящее время известно несколько путей, посредством которых Aβ, как и многие митохондриальные белки, транспортируется непосредственно в митохондрии: с помощью транслоказ внешней (ТОМ) и внутренней (ТИМ) мембраны или в местах контактов митохондриальной мембраны с ЭПР (МАМ) (рис. 2). Кроме того, Aβ может образовываться непосредственно в митохондриях в результате расщепления APP γ-секретазой [50, 51].

Комплекс ТОМ состоит из центрального белка ТОМ40 и дополнительных ТОМ70, ТОМ22, ТОМ20 (больших) и ТОМ7, ТОМ6 и ТОМ5 (малых). Большие ТОМ участвуют в распознавании белков, тогда как малые – в образовании пор [52]. Для импорта белков со стороны внутренней мембраны необходимы комплексы ТИМ (ТИМ23 и ТИМ22) [53]. Снижение импорта Aβ₁₋₄₀ и Aβ₁₋₄₂ в присутствии антител к митохондриальным рецепторам ТОМ20, ТОМ70 или к общей поре импорта митохондрий внешней мембраны ТОМ40 подтверждает поступление Aβ в митохондрии через комплекс ТОМ–ТИМ [50]. Aβ-пептид не влияет на структуру транслоказных систем, но значительно затрудняет транспортную способность препротейнов, находящихся в митохондриях, посредством внемитохондриальной коагрегации [54].

Перемещение Aβ из мембраны ЭПР в митохондрии осуществляется через точки контакта между этими органеллами – МАМ [55], которые обладают характеристиками липидного рафта, богаты холестерином и сфингомиелином [56]. К физиологическим функциям МАМ относятся регуляция гомеостаза фосфолипидов и Ca²⁺, процессов сли-

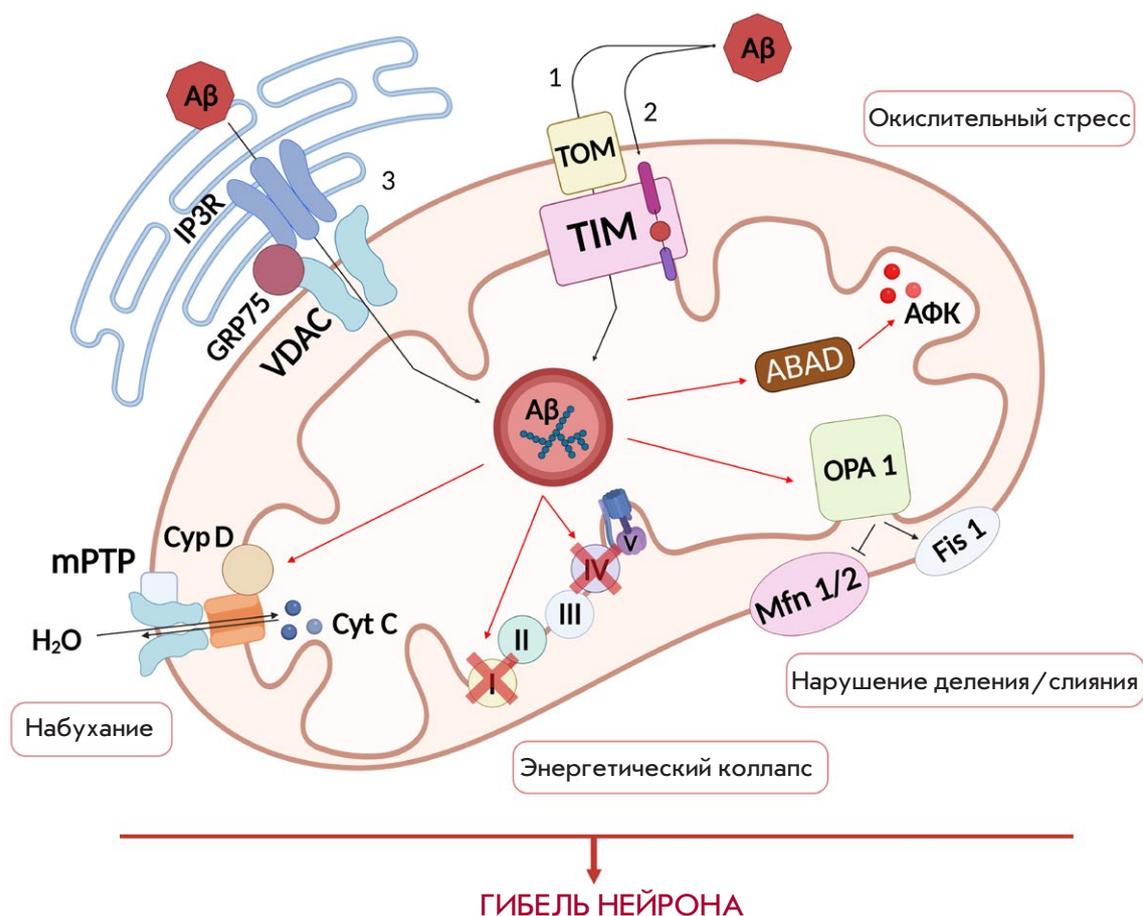


Рис. 2. Схематичное изображение путей поступления β-амилоида (Aβ) в митохондрии и его патологическое действие внутри данных органелл. Через комплекс TOM–TIM имеет два варианта: (1) Aβ проходит в матрицу митохондрий; (2) Aβ связывается с TIM, что нарушает импорт важных митохондриальных белков. Через места контактов митохондриальной мембраны с эндоплазматическим ретикуломом (ЭПР) – МЭП (3). Образование Aβ в МЭП усиливает поступление Ca²⁺ в митохондрии из ЭПР через канал IP3R–GRP75–VDAC. Комплекс Aβ–алкогольдегидрогеназа (ABAD) индуцирует образование АФК. Aβ блокирует белки слияния (OPA1 и Mfn1/2) и активирует белок деления (Fis1), что приводит к образованию дефектных митохондрий. Связывание Aβ с циклофилином D (CypD) приводит к открытию митохондриальной поры (mPTP). Накопление Aβ в митохондриях нарушает работу электрон-транспортной цепи, что приводит к образованию АФК и гибели нейрона

яния/деления митохондрий, апоптоза и аутофагии, а также этерификация холестерина [57, 58]. МЭП обогащены кальциевой АТФ-азой sarco-ЭПР (sarco/ER calcium ATPase (SERCA)) [59], рецепторами сигма-1 (Sig-1R) [60] и рецепторами инозитол-1,4,5-трифосфата (IP3R) [61]. Взаимодействие ЭПР и митохондрий осуществляется через митофузин-2 (Mfn-2) и цитозольный шаперон Grp75 (член семейства белков теплового шока 70), который связан с IP3R со стороны ЭПР и потенциалзависимым анион-селективным каналом 1 (VDAC1) со стороны митохондрий. VDAC1 представляет собой многофункциональный белок, который экспрессируется в митохондриях и других компартментах клетки,

включая плазматическую мембрану, и является ключевым регулятором гомеостаза Ca²⁺, окислительного стресса и апоптоза [62]. Комплекс IP3R–GRP75–VDAC регулирует перенос Ca²⁺ в митохондрии [63]. При развитии патологических состояний в клетке функции МЭП нарушаются, что приводит к повышению ЭПР-стресса (накопление в просвете ЭПР aberrantных несвернутых или неправильно свернутых белков с их последующей агрегацией) [64], нарушению гомеостаза кальция. Hedskog и соавт. показали способность Aβ-пептида в наномолярных концентрациях увеличивать экспрессию IP3Rs и VDAC, а также повышать количество точек контакта ЭПР–митохондрии

и увеличивать тем самым концентрацию кальция в органеллах [65]. Взаимодействие VDAC1 с A β приводит к прекращению работы митохондриальной поры, что нарушает транспорт митохондриальных белков и метаболитов массой до 150 кДа (ADP и неорганический фосфат), необходимых для завершения окислительного фосфорилирования и синтеза АТФ. Аномальный транспорт белков и метаболитов приводит к нарушению окислительного фосфорилирования и дисфункции митохондрий [66]. Сверхэкспрессия VDAC1 в коре головного мозга человека коррелирует со стадиями БА, а также наблюдается у старых трансгенных мышей по гену APP и в клетках нейробластомы, подвергнутых воздействию A β . Снижение экспрессии VDAC1 сопровождается уменьшением уровня мРНК APP, а также BACE1 [62].

Опубликованы данные о возможности образования A β непосредственно в МАМ [67]. Присутствие в МАМ пресенилинов и остатка С99 [68], который расщепляется γ -секретазой [69], может объяснить локализацию A β в митохондриях [50]. Кроме того, МАМ представляет собой липидный рафт-подобный домен [70], а, как известно, расщепление APP по амилоидогенному пути зависит от липидного рафта [71, 72]. Изменение активности γ -секретазы приводит к накоплению фрагмента С99 в МАМ, вызывая этерификацию холестерина и гидролиз сфинголипидов, а также митохондриальную дисфункцию [73]. Высказано предположение, что церамид, продукт гидролиза сфингомиелина, и A β могут синергически вызывать гибель нейронов при БА [74]. Мутации в генах *PSEN1*, *PSEN2* и *APP* приводят к усилению функции МАМ и значительному увеличению связи ЭПР-митохондрии [75].

Такума и соавт. показали, что перемещению A β_{1-40} из внеклеточного во внутриклеточное пространство также способствует рецептор конечных продуктов гликирования (RAGE, трансмембранный белок типа I), что, возможно, является одним из механизмов импорта A β в митохондрии [76]. Накопление A β в мозге приводит к увеличению экспрессии RAGE в пораженных сосудах, нейронах и микроглии [77], которая, в свою очередь, индуцирует образование АФК в основном за счет активности NADPH-оксидаз [78].

Накопление A β происходит на внутренней мембране митохондрий [79], что приводит к нарушению способности импорта белков-предшественников, необходимых для митохондриального биогенеза [54]. A β также взаимодействует с цитохром-с-оксидазой, F1 α АТФ-синтазой, субъединицами цепи переноса электронов, ингибируя при этом работу комплексов [80]. Так, у трансгенных мышей (pR5/A β PP/

PS2) выявлено нарушение регуляции 24 белков, треть из которых – митохондриальные белки, связанные в основном с комплексами I и IV системы окислительного фосфорилирования (OXPHOS) [81]. Примечательно, что нарушение регуляции комплекса IV зависело от количества и степени активности A β . Кроме того, накопление A β в митохондриях коррелирует с проявлениями раннего синаптического дефицита в модели БА у мышей [82, 83].

Показано, что поступление A β в митохондрии осуществляется через транслоказы митохондриальной мембраны и в местах контактов митохондриальной мембраны с ЭПР. Кроме того, A β синтезируется непосредственно в митохондриях в результате расщепления APP локализованной в них γ -секретазой, что приводит к транспортной дисфункции митохондрий.

ВЛИЯНИЕ A β НА ДИНАМИКУ И БИОГЕНЕЗ МИТОХОНДРИЙ

Биогенез митохондрий – это сложный процесс, в котором участвуют ядерные и митохондриальные геномы, приводящие к увеличению количества митохондрий в ответ на повышенную потребность в энергии. Коактиватор 1-альфа гамма-рецептора, активируемого пролифератором пероксисом (PGC-1 α), является главным регулятором биогенеза митохондрий, энергетического метаболизма и дыхания посредством взаимодействия с различными факторами транскрипции, включая ядерные респираторные факторы 1 (NRF-1) и 2 (NRF-2) [84]. Qin и соавт. впервые показали снижение экспрессии PGC-1 α у пациентов с БА и в модели БА у трансгенных мышей [85]. Введение PGC-1 α в гиппокамп и кору головного мозга трансгенных мышей APP23 привело к снижению количества отложений A β в результате снижения экспрессии BACE1 и сохранению большинства нейронов [86]. Экспрессия экзогенного PGC-1 α в клетках нейробластомы N2a вызывает подавление транскрипции BACE1, что, в свою очередь, снижает уровень секретируемого A β и увеличивает уровень sAPP α [87]. Активность PGC-1 α регулируется AMP-активируемой протеинкиназой (AMPK) и сиртуинами (SIRT). Обнаружено, что A β вызывает сверхэкспрессию поли(ADP-рибоза)полимеразы 1 (PARP1 [EC 2.4.2.30]), которая сопровождается истощением NAD⁺ с последующим подавлением активности SIRT1. Ингибирование PARP1 вызывает экспрессию SIRT1, что приводит к увеличению экспрессии α -секретазы, подавлению BACE1 и снижению A β [88]. На работу SIRT влияют также малые интерферирующие РНК (миРНК) – группа небольших одноцепочечных некодирующих РНК, участвующих в биогенезе митохондрий и посттранскрипци-

онной регуляции мРНК посредством подавления их трансляции или деградации [89]. миРНК вовлечены также в патогенез БА [90–93].

Митофагия – процесс, в результате которого поврежденные митохондрии специфически поглощаются аутофагосомами и подвергаются лизосомальному разрушению, что предотвращает накопление дисфункциональных митохондрий [94]. Основной путь митофагии это регулируемая убиквитином рецепторно-опосредованная митофагия, в которой важную роль играют РТЕН-индуцированная киназа 1 (PINK1) и белок Parkin. При БА наблюдается аномальное увеличение аутофагических вакуолей, содержащих дефектные (аберрантные) митохондрии с измененной активностью PINK1 [ЕС 2.7.11.1] и Parkin [ЕС 2.3.2.31] [95]. Аβ и гиперфосфорилированный тау вызывают окислительное повреждение митохондрий, в результате которого содержание данных белков снижается [96–98], что приводит к уменьшению количества завершенных процессов митофагии и способствует увеличению количества агрегатов Аβ и тау. Vaillant-Beuchot и соавт. показали, что независимо от Аβ С-концевые фрагменты APP запускают чрезмерную дезорганизацию митохондриальных крист, усиливают образование АФК и вызывают снижение митофагии, связанное с недостаточным слиянием митохондрий с лизосомами [99].

При БА наблюдаются не только изменения морфологии митохондрий, но также нарушается распределение этих органелл в клетках головного мозга. Антероградный транспорт (на основе кинезина) способствует доставке в аксоны новообразованных митохондрий; ретроградный транспорт (на основе динеина) способствует удалению поврежденных органелл и поддерживает их здоровую популяцию [100]. Нарушение транспортной системы и баланса между здоровыми/поврежденными митохондриями способно изменить распределение органелл, что, в свою очередь, оказывает значительное влияние на синаптическую и нейрональную функцию [101]. Показано, что Аβ снижает экспрессию антероградных моторных белков KIF5A [102], в то время как взаимодействие олигомерного Аβ с промежуточной цепью динеина негативно влияет на связывание динеин–снапин (адапторный белок) [103]. Мутации в гене *PSEN1* нарушают аксональный транспорт за счет активации киназы гликогенсинтазы-3β (GSK-3β), которая фосфорилирует легкую цепь кинезина и высвобождает его из мест встраивания в мембрану [104].

Транспорт митохондрий важен для выживания нейронов, учитывая необходимость правильного распределения митохондрий по областям с большей потребностью в АТФ и кальции. Кроме того, мито-

хондрии организованы в динамическую сеть через непрерывные циклы слияния и деления, необходимые для гомеостаза митохондрий и адаптации к клеточным потребностям [105, 106]. Слияние и деление митохондрий контролируют белки семейства динаминов, обладающие GTP-азной активностью. Деление митохондрий происходит с участием белков Fis1 (белок 1 деления митохондрий) и Drp1 (динаминоподобный белок 1, DLP1), а слияние – с помощью митофузинов (митофузины Mfn-1 и Mfn-2 участвуют в слиянии наружной мембраны) и белка, кодируемого геном *OPA1* [107, 108]. Нарушение баланса между слиянием и делением митохондрий подтверждено в исследованиях *in vivo* [109]. Сверхэкспрессия APP дикого типа (APPwt) и мутантного (APPswe) в клетках нейробластомы M17 и в первичных нейронах приводит к фрагментации митохондрий и их перинуклеарному распределению в результате снижения уровней белков слияния, в частности Drp1, OPA1, Mfn-1 и Mfn-2, и увеличению уровня митохондриального Fis1. Подобные эффекты блокируются ингибитором BACE1, указывая на то, что Аβ влияет на фрагментацию митохондрий [110, 111].

Митофузины, расположенные на внешней мембране митохондрий, вовлечены в процесс слияния путем формирования гомотипических и гетеротипических взаимодействий с белком OPA1 внутренней мембраны митохондрий [112]. Сообщалось также, что Mfn-2 присутствует в МАМ, регулирует аксональный транспорт [113], а также влияет на активность γ-секретазы и образование Аβ [114].

Drp1 является митохондриальным модулем деления, участвует во фрагментации, фосфорилировании, убиквитинировании и гибели клеток [115, 116]. Обнаружено взаимодействие олигомерного Аβ и гиперфосфорилированного тау с Drp1 в головном мозге пациентов с БА и трансгенных мышей [117]. При взаимодействии Аβ с Drp1 образуются АФК, которые способствуют фрагментации митохондрий [118] с последующим истощением митохондрий в аксонах и дендритах и, как результат, с потерей синапсов [119]. С другой стороны, индуцированный Аβ окислительный стресс и вход кальция в клетку приводят к фосфорилированию Drp1, вызывая повышение активности киназы, регулируемой внеклеточным сигналом (ERK), и Akt соответственно [120, 121].

Таким образом, патологический Аβ негативно влияет на многие важные функции митохондрий, что приводит к нарушению их биогенеза, работы транспортной системы, баланса между поврежденными и здоровыми митохондриями, и, как результат, изменяет распределение данных органелл в нейронах, что, в свою очередь, влияет на синаптическую и нейрональную функции.

ФЕРМЕНТЫ, РАСЩЕПЛЯЮЩИЕ А β

Нарушение баланса между образованием и выведением А β приводит к его аномальному отложению в ткани мозга [122, 123]. Основные пути, посредством которых происходит выведение А β , включает его удаление через гематоэнцефалический барьер, ферментативное расщепление, клеточное поглощение и последующее разрушение [124, 125]. К основным ферментам, участвующим во внеклеточном расщеплении А β , относятся представители цинковых металлопептидаз: неприлизин (NEP [EC 3.4.24.11]), фермент, расщепляющий инсулин (IDE [EC 3.4.24.56]), эндотелинпревращающий фермент (ECE [EC 3.4.24.71]), матриксная металлопротеиназа-9 (MMP-9 [EC 3.4.24.35]) [126, 127]. Каталитическую активность в отношении А β проявляют также пептидазы PreP [128] и транстиртин, способные выводить амилоид по механизму, подобному NEP [129]. В матриксе митохондрий млекопитающих обнаружена еще одна пептидаза, нейрוליзин (NLN [EC 3.4.24.16]), способная разрушать митохондриальные белки-предшественники (<20 аминокислотных остатков) и более длинные митохондриальные пептиды. Анализ расщепления пептидов *in vitro* выявил взаимодействие NLN с PreP в деградации длинных пептидов, в частности, гидрофобного фрагмента А β_{35-40} [130].

Фермент, расщепляющий инсулин (IDE), – внеклеточная цинк-металлопептидаза, способная регулировать уровень инсулина в плазме и внеклеточный А β . IDE локализуется преимущественно в цитозоле клетки [131], но также находится в митохондриях, эндосомах [132]. IDE избирательно взаимодействует с мономерами А β [133]. Ее активность опосредована динамическим равновесием между растворимыми мономерами А β и его агрегатами [134]. У трансгенных мышей СВ2R-/-А β_{1-42} , у которых отсутствует рецептор каннабиноидов типа 2 (CB2R), наблюдается снижение уровня IDE и ангиотензинпревращающего фермента (ACE [EC 3.4.15.1]) по сравнению с мышами WT-А β_{1-42} , а также повышение уровня А β в результате более медленного экзогенного расщепления белка [135]. Неприлизин (NEP) – это интегральный мембранный белок типа II, расположенный в плазматической мембране, большая часть которого, включая активный центр, расположена во внеклеточном пространстве [136]. Получены данные, показывающие, что активность NEP и IDE регулируется уровнем холестерина. Ферменты IDE и NEP чувствительны к окислительному стрессу, вызванному высоким уровнем холестерина. Кроме того, активность IDE и NEP была связана с геном APOE. В мозге людей, несущих ϵ 2-аллель APOE, отмечалась высокая активность NEP,

в то время как у пациентов с ϵ 4-аллелем – снижение уровней IDE и NEP [137]. На активность IDE и NEP влияют также протеинкиназы A и C (PKA, PKC), регулирующие прямое (ферментативное) расщепление APP, которое приводит к снижению количества А β . В эксперименте на первичной культуре астроцитов крыс [138] обнаружено, что активация PKA замедляет разрушение А β путем снижения уровней белка NEP, но не IDE, в то время как активация PKC стимулирует высвобождение NEP во внеклеточное пространство и повышение уровня белка IDE в мембранах астроцитов.

Митохондриальная пептидазома (PreP, или PITRM1) – это металлопептидаза 1, которая располагается в матриксе митохондрий и участвует в расщеплении препоследовательностей белков после их импорта в митохондрии. В головном мозге мышей, гетерозиготных по гену PITRM1, выявлено накопление А β [139]. Недавние исследования выявили роль PreP в метаболизме А β [140]. Так, PreP расщепляет А β_{1-40} , А β_{1-42} , А β Arctic (E22G) и митохондриальную препоследовательность pF1 β из 53 аминокислот [141, 142]. Важно отметить значительное снижение протеолитической активности PreP в отношении как А β , так и не-А β -пептидов в митохондриях головного мозга трансгенных мышей mAPP или mAPP/ABAD [143], при этом сверхэкспрессия и повышение активности PreP способствуют снижению уровня митохондриального А β [140]. Повышенная экспрессия PreP не только разрушает митохондриальный А β , но также влияет на общий уровень А β в головном мозге. Снижение активности PreP в митохондриях головного мозга связано с его функциональным изменением, например, в результате окисления белка [26]. Показано, что инактивация PreP в кислой среде обусловлена окислением остатков цистеина и последующей олигомеризацией через межмолекулярные дисульфидные связи [144]. Нарушения в работе PreP при окислительном стрессе подтверждаются полученными Teixeira и соавт. [145] данными, которые выявляют концентрационную зависимость ингибирования активности PreP пероксидом водорода. Таким образом, можно предположить, что в результате накопления А β в митохондриях [146] происходит увеличение образования АФК, что вызывает ингибирование активности PreP.

Кроме того, кислая среда в митохондриях препятствует выведению А β за счет его быстрого взаимодействия с циклофилином D (CypD) и/или с А β -связывающей алкогольдегидрогеназой (ABAD) [147]. ABAD – это митохондриальный белок, расположенный в митохондриях, способствующий токсичному действию А β в митохондриях пациентов

с БА и в модели БА у мышей за счет увеличения образования АФК и снижения уровней АТФ [148, 149]. Формирование комплекса АВАД–Аβ нарушает связывание NAD⁺ с АВАД, что приводит к изменению проницаемости митохондриальной мембраны [150] и, как результат, усиливает дисфункцию митохондрий [151]. СурD – важная часть mPTR, отвечающий за ее открытие [152]. Образование комплексов СурD–Аβ вызывает открытие mPTR, что приводит к набуханию матрикса, образованию АФК [153] с последующим разрывом внешней мембраны и неспецифическим высвобождением в цитозоль таких белков межмембранного пространства, как цитохром с, эндонуклеазы G и прокаспазы, Smac/DIABLO, которые активируют апоптоз [154, 155]. Снижение экспрессии СурD приводит к подавлению Аβ-связанных нарушений, в частности, кальций-зависимого набухания митохондрий, снижению захвата кальция и нарушения дыхательной функции митохондрий [156].

Таким образом, отмечена важность регуляции работы ферментов, расщепляющих Аβ как во внеклеточном, так и во внутриклеточном пространствах, а также факторов, ингибирующих их активность, с целью снижения токсического действия Аβ на нейроны.

ПОТЕНЦИАЛЬНЫЕ НЕЙРОПРОТЕКТОРНЫЕ ПРЕПАРАТЫ, ВОЗДЕЙСТВУЮЩИЕ ОДНОВРЕМЕННО НА ОТЛОЖЕНИЕ Аβ И МИТОХОНДРИАЛЬНУЮ ДИСФУНКЦИЮ

Одно из самых распространенных направлений поиска потенциальных лекарственных средств для лечения БА – синтез соединений, снижающих уровни отложений Аβ или предотвращающих их образование. Однако, как показано в различных исследованиях, недостаточно влиять лишь на одну мишень, чтобы получить перспективный нейропротектор, поэтому мы рассматриваем взаимосвязь Аβ и митохондрий в попытке объединить в одной молекуле и влияние на процесс агрегации Аβ, и митопroteкцию. Объединение и систематизация данных об исследуемых в настоящее время соединениях для терапии БА помогут определить перспективные направления и возможные модификации молекул для синтеза более эффективных соединений.

Принимая во внимание многофакторность БА, в частности, взаимосвязь Аβ, митохондрий и окислительного стресса, перспективным направлением представляется фармакологическая коррекция митохондриальной дисфункции с параллельным воздействием на образование, отложение или выведение Аβ. Некоторые потенциальные мультитаргетные соединения, воздействующие на перечис-

ленные патологические процессы, представлены в табл. 1.

Терапевтическими мишенями при БА являются модуляторы фермента NEP [157], способствующие выведению Аβ из внеклеточного пространства и, как следствие, предотвращающие поступление Аβ в митохондрии и нарушение митохондриальных функций, индуцированных Аβ. Введение известного антиоксиданта и ингибитора HDAC эпигаллокатехин-3-галлата (EGCG) снижает уровни Аβ и увеличивает экспрессию NEP в коре головного мозга мышей с ускоренным старением (SAMP8) [158] и крыс, подвергшихся пренатальной гипоксии [159]. Кроме того, EGCG подавляет экспрессию BACE1 и снижает уровень Аβ₁₋₄₂, улучшая обучаемость и память в модели БА у крыс [160]. Li и соавт. выяснили, что (E)-N-((6-аминопиридин-2-ил)метил)-3-(4-гидрокси-3-метоксифенил)-акриламид ингибирует активность BACE1 и проявляет сильную антиоксидантную активность в отношении 1,1-дифенил-2-пикрилгидразила (DPPH) и 2,2'-азинобис-(3-этилбензтиазолин-6-сульфоната) (ABTS), превышающую действие EGCG [161]. Другое потенциальное соединение – Kai-Xin-San (KXS, китайский травяной отвар, используемый для лечения амнезии), которое повышает уровни NEP в гиппокампе мышей [162]. В моделях окислительного стресса, вызванного доксорубицином [163] и скополамином [164], показана антиоксидантная активность KXS, вызывающего одновременное снижение уровней малонового диальдегида (МДА) и повышение активности супероксид-дисмутазы (SOD), глутатионпероксидазы (GPx) и каталазы (CAT). Антиоксидантная активность KXS показана также Guo и соавт. [165].

Потенциальным соединением для лечения БА является природный полифенол куркумин, обладающий сильной антиоксидантной активностью [166, 167]. Куркумин нейтрализует АФК и повышает уровни SOD, Na⁺-K⁺-АТФ-азы, глутатиона и ферментов митохондриального комплекса, защищает митохондрии от пероксинитрита [168–171]. Другое важное свойство куркумина – способность ингибировать олигомеризацию и образование фибрилл Аβ, а также Аβ-индуцированную нейротоксичность в мозге трансгенных мышей [172]. Куркумин прочно связывается с пептидами Аβ за счет широкого спектра межмолекулярных взаимодействий: водородных связей, гидрофобных взаимодействий, π-π-стекинга и катион-π-притяжения. Куркумин осуществляет π-π-взаимодействия с ароматическими остатками в Аβ (Phe4, Tyr10, Phe19 и Phe20) и катион-π-взаимодействия с катионными остатками (Arg5, Lys16 и Lys28) [173]. Zhao и соавт. изучали влияние

куркумина на стабильность димеров Аβ и обнаружили, что куркумин действует как разрушитель β-листо́в, снижая содержание β-слоев в олигомерах Аβ [174]. Кроме того, куркумин прочно связывается с преформой фибрилл Аβ, занимая связывающий карман внутри фибриллы, где образует водородные связи и гидрофобные взаимодействия с протофибриллами и вызывает структурные искажения [175–177]. В экспериментах *in vivo* и *in vitro* выявлен еще один механизм, с помощью которого куркумин снижает накопление и отложение Аβ, а именно, подавление экспрессии BACE1 [178, 179].

Гидроксированные производные монокарбонил-куркумина, содержащие циклогексанон, повышают уровень NER [180]. В совокупности эти данные позволяют предположить, что куркумин обладает многоцелевой активностью и требует дальнейшего изучения.

В качестве другого перспективного соединения можно рассмотреть флавоноид силибинин (силибин), обладающий антиоксидантной активностью [181]. Силибинин взаимодействует с митохондриальной мембраной, препятствуя дисфункции изолированных митохондрий [182]. Введение сили-

Таблица 1. Потенциальные химические соединения для лечения болезни Альцгеймера, обладающие мультитаргетным действием

Название	Мишени, связанные с Аβ	Митохондриальные мишени	Основное действие	Ссылка
Эпигалло-катехин-3-галлат (EGCG)	NER; BACE1	АФК и NO	↓ отложение Аβ; ↓ ОС; ↑ обучение и память	[158] [160] [193]
Kai-Xin-San	NER	ПОЛ; SOD, GPx, CAT	↓ уровни Аβ; ↑ обучение и память; ↑ антиоксидантную систему	[163, 164]
Куркумин	Фибриллы и олигомеры Аβ; BACE1	АФК; SOD, GSH	предотвращает отложение Аβ; ↑ антиоксидантную систему; ↓ ОС	[178, 179] [216]
Силибинин	Гены APP и BACE; NER	ПОЛ; CAT, SOD, NO, GSH	↑ антиоксидантную систему; улучшает память животных	[183–187]
Кверцетин	APP, BACE, APH1 и PSEN1; ADAM10 и ADAM17	АФК, МДА, GPx и SOD	↓ дисфункцию митохондрий; ↓ уровни Аβ	[190–194]
Байкалейн	Аβ; стимулирует нейрогенез	ОС	↓ гибель нейронов; улучшая; ↑ память мышей	[197, 198]
Берберин	BACE1	АФК; SOD	↓ уровни Аβ; улучшает когнитивные функции мышей	[202]
Ресвератрол	APP; Аβ; микроглия	CAT, SOD, NO, GSH; ионы переходных металлов; АФК; PGC-1α	↓ агрегацию Аβ в гиппокампе и коре трансгенных мышей APP/PS1pa	[208, 209]
Феруловая кислота	≠ активность BACE1	SOD; ПОЛ; Drp1; Mfn-2	↓ образование Аβ; поддерживает функциональное состояние митохондрий	[214–216]
Идебенон	ADAM17 и NER; RAGE/каспаза-3	АФК	↓ отложение Аβ у мышей 5xFAD; ↓ митохондриальную дисфункцию	[217, 218]
α-Липоевая кислота	Аβ-фибриллы	АФК CAT, SOD, NO, GSH	↓ образование Аβ <i>in vitro</i> ; ↓ ОС	[219]
SS31	Аβ	Drp1 и Fis1; Mfn-1/2 и OPA1; PGC-1α и Nrf1/2	↓ образование Аβ; ↓ митохондриальную дисфункцию; ↑ митохондриальный биогенез	[220]
SkQ1	Аβ ₁₋₄₀ и Аβ ₁₋₄₂	Drp1 и Mfn-2	↑ митохондриальный биогенез; ↑ память крыс OXYS; ↑ количество нейронов в областях CA1 и CA3 и в зубчатой извилине крыс OXYS; ↓ образование Аβ-отложений	[221]

Примечание: ↓ – снижает; ↑ – повышает; ≠ – ингибирует.

бинина снижает содержание МДА и повышает активность антиоксидантных ферментов CAT, SOD, оксида азота (NO) и глутатиона (GSH) [183–186]. Кроме антиоксидантной активности, силибинин способен уменьшать отложение Аβ в гиппокампе мышей APP/PS1, подавляя экспрессию генов APP и BACE1 и повышая уровень NER. Ранее обнаруженную неспособность силибинина проходить через ГЭБ удалось преодолеть инкапсулированием его в экзосомы, полученные из макрофагов (Exo-Slb). После проникновения в мозг мышей с БА Exo-Slb селективно взаимодействует с мономерами Аβ, препятствуя их агрегации, и эффективно улучшает память животных [187]. Изучено также действие силибинина, инкапсулированного в наночастицы сывороточного альбумина человека (САЧ). Показано, что нейропротекторная и антиоксидантная активность наночастиц силибинин-САЧ выше, чем у свободного силибинина [188]. Антиоксидантной и железохелатирующей активностями обладает еще один флавоноид – кверцетин, который также модулирует экспрессию генов и сигнальных путей [189]. Кверцетин защищает нейроны от действия H₂O₂ за счет снижения высвобождения лактатдегидрогеназы (ЛДГ), уровней АФК и МДА, одновременно повышая активность GPx и SOD [190]. Кверцетин уменьшает дисфункцию митохондрий, снижая образование АФК, восстанавливая потенциал митохондриальной мембраны и синтез АТФ; регулирует экспрессию AMP-активируемой протеинкиназы (АМРК), которая участвует в модулировании энергетического метаболизма; снижает отложение Аβ, способствует его выведению и регулирует процессинг APP [191]. Исследования на трансгенных мышках, моделирующих БА, показали, что кверцетин снижает уровни внеклеточного Аβ [192, 193]. Пероральное введение кверцетина крысам, у которых симптомы БА индуцировали AlCl₃, уменьшало агрегацию Аβ в гиппокампе в результате снижения уровней экспрессии генов APP, BACE1, APH1 и PSEN1 и повышения уровней экспрессии генов ADAM10 и ADAM17 [194]. Флавоноиды таксифолин и изорамнетин ингибируют активность BACE1 и проявляют антиоксидантное действие [195]. Таксифолин ингибирует образование фибрилл Аβ *in vitro*, а также улучшает мозговой кровоток, облегчая выведение Аβ [196]. Байкалейн обладает рядом важных для нейропротектора фармакологических свойств, а именно, снижает окислительный стресс, ингибирует агрегацию Аβ, стимулирует нейрогенез [197]. Байкалейн также предотвращает Аβ-индуцированную атрофию нейронов и улучшал память мышшей [198]. Комбинация байкалейна и *транс*-халкона значи-

тельно снижала уровни АФК и Аβ₁₋₄₂ в клетках дрожжей, экспрессирующих Аβ₁₋₄₂, не влияя на их рост [199]. Нейропротекторный механизм действия лютеолина заключается в прямом ингибировании АФК и активности ацетилхолинэстеразы (АХЭ), а также в предотвращении накопления Аβ₄₂ [200].

Многочисленные исследования *in vivo*, проведенные за последнее время, показали нейропротекторное действие алкалоида хинолина – берберина [201]. Берберин ингибирует активность BACE1 и АХЭ, снижает уровень АФК, повышает уровень глутатиона, препятствует апоптозу и улучшает когнитивные функции [202, 203]. Внесение берберина в наноструктурированные липидные носители повысило его биодоступность и эффективность в эксперименте *in vivo* [204]. Установлено также, что еще один природный алкалоид – пиперин и его метаболиты – обладают способностью ингибировать BACE1, а также снижают уровень АФК, уменьшая повреждение митохондрий [205]. Сесквитерпеновый алкалоид гуперзин А (HupA) также обладает полифункциональной активностью: уменьшает накопление отложений Аβ в коре и гиппокампе, улучшает митохондриальные функции и ингибирует активность АХЭ у трансгенных мышшей APP^{swe}/PS1^{dE9} с моделью БА [206]. Аналоги HupA, синтезированные в последние годы, продемонстрировали еще более высокую эффективность [207].

Полифенол ресвератрол, как показано в многочисленных исследованиях, проявляет различную биологическую активность, включая антиоксидантную и нейропротекторную. Ресвератрол повышает экспрессию и активность антиоксидантных ферментов, связывает ионы переходных металлов и инактивирует свободные радикалы, а также улучшает функции митохондрий за счет повышения экспрессии и активации основного индуктора биогенеза митохондрий PGC-1α [208]. Ресвератрол снижает агрегацию отложений Аβ через активацию неамилоидогенного пути расщепления APP и выведения Аβ, а также активирует микроглию в гиппокампе и коре трансгенных мышшей APP/PS1 [209]. Перспективные соединения, проявляющие одновременно антиоксидантную активность и способность ингибировать BACE1, выявлены среди производных стирилбензамида [210], N-циклогексилимидазо[1,2-а]пиридина [211] и галогенированных производных триметоксикалона [212, 213].

Нейропротекторное действие феруловой кислоты (ФК) может определяться несколькими механизмами. ФК проявляет антиоксидантное и митопротекторное действие. На модели БА у мышшей показано, что введение ФК повышает активность SOD и снижает содержание МДА [215]. Кроме того, ФК

восстанавливает баланс между делением и слиянием митохондрий, регулируя работу белков деления и слияния (уменьшает экспрессию Drp1, увеличивая при этом экспрессию Mfn-2) [216] и уровня белка PGC-1 α [222]. Поддержание уровня PGC-1 предотвращает потерю потенциала митохондриальной мембраны и уменьшает Drp1-зависимое деление митохондрий. Второе важное действие – способность ингибировать BACE1, что предотвращает образование A β [214]. Среди производных ФК также выявлены перспективные соединения с антиагрегационной и антиоксидантной активностями [223, 224].

Еще одно направление поиска препаратов от БА – исследование соединений, аналогичных эндогенным антиоксидантам. Так, антиоксидантом, одобренным FDA, является идебенон – аналог коэнзима Q10, способный проходить через гематоэнцефалический барьер. Идебенон ингибирует A β -индуцированное образование АФК и митохондриальную дисфункцию [217]. Показано, что введение идебенона значительно снижает накопление отложений A β у мышей 5xFAD за счет повышения уровней α -секретазы ADAM17 и NEP, а также подавляет передачу сигналов RAGE/каспазы-3 [218]. Предшественник глутатиона N-ацетилцистеин (NAC) в экспериментах *in vitro* и *in vivo* снижал уровни A β -пептида, фосфорилированного тау и маркеров окислительного стресса, улучшая когнитивные функции у животных [225]. α -Липоевая кислота (α -ЛК), синтез которой с возрастом снижается, рассматривается как многообещающее средство для профилактики или лечения БА. α -ЛК нейтрализует АФК, повышает уровень глутатиона, хелатирует переходные металлы, нарушает синтез A β и способствует его выведению [219]. Кроме того, α -ЛК действует как кофактор ферментов, способный регулировать метаболизм, выработку энергии и биогенез митохондрий [226]. Результаты рандомизированного плацебо-контролируемого исследования показали, что комбинация омега-3-жирной кислоты и α -ЛК замедляет снижение когнитивных функций у пациентов с БА при приеме препаратов в течение 12 месяцев [227].

Антиоксидантный пептид SS31 снижает образование A β -пептида и восстанавливает митохондриальные и синаптические функции в мышечной модели БА [228]. Совместное применение этого пептида и ингибитора 1 деления митохондрий (Mdivi1) оказывает положительное действие на культивируемые клетки. Этот результат позволяет предположить, что комбинированное лечение антиоксидантами, воздействующими на митохондрии, может иметь более высокую эффективность [229]. Соединение SkQ (10(6'-plastoquinonyl) decylrhodamine 19), ко-

торое накапливается в основном в митохондриях нейронов, улучшает структурное и функциональное состояние органелл, тем самым предотвращает потерю нейронов, синаптические повреждения, снижает уровни A β и гиперфосфорилирование тау-белка в гиппокампе, что, в свою очередь, приводит к улучшению обучаемости и памяти у животных [221].

Ингибиторы ABAD также являются перспективным направлением в поиске лекарственных средств от БА. Они предотвращают быстрое связывание A β с ABAD в митохондриальном матриксе, в результате чего нормализуется работа PreP [230–234].

Таким образом, подход к конструированию и созданию нейротекторных лекарственных препаратов, основанный на объединении в одной молекуле различных фармакофорных фрагментов, способных воздействовать на мишени, связанные с протеинопатией и митохондриальной дисфункцией, рассматривается как перспективная и востребованная стратегия медицинской химии и фармакологии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, ввиду отсутствия эффективных препаратов для лечения болезни Альцгеймера, способных оказывать не только симптоматическое действие, но и радикально влиять на патологические каскады, на сегодняшний день актуальным остается направленный поиск и создание лекарственных средств для фармакологической коррекции данного нейрозаболевания. Для этого необходимо понимать не отдельные процессы патогенеза, а их взаимосвязь и взаимное влияние. Так, взаимодействие между митохондриями и A β является тесно связанным процессом. Токсические формы A β приводят к митохондриальной дисфункции за счет нарушения гомеостаза Ca²⁺, процессов слияния и деления митохондрий, импорта белков, увеличения проницаемости мембраны митохондрий и ингибирования комплексов дыхательной цепи митохондрий. С другой стороны, нарушение функционирования митохондрий приводит к развитию окислительного стресса, энергетическому коллапсу, запуску каскадов гибели клетки, что, в свою очередь, способствует процессингу белка-предшественника APP и приводит к агрегации и формированию β -амилоидных отложений. Таким образом, более точное представление о свойствах, которыми должны обладать потенциальные лекарственные препараты нейротекторной направленности, указывает, что необходимо сфокусировать внимание на объединении в одной молекуле фармакофорных фрагментов, способных воздействовать одновременно на каскады, связанные с протеинопатией и препятствующие дисфункции митохондрий.

В данном обзоре мы постарались объединить и проанализировать имеющиеся на сегодняшний день данные о роли взаимодействия Аβ с митохондриями в патогенезе болезни Альцгеймера, и проиллюстрировали эффективность поиска потенциальных нейропротекторных препаратов, нацеленных

на патологические процессы, связанные с протеинопатией и митохондриальной дисфункцией. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РФФ (проект № 22-23-00995).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sengoku R. // *Neuropathology*. 2020. V. 40. № 1. P. 22–29.
- Lane C.A., Hardy J., Schott J.M. // *Eur. J. Neurol*. 2018. V. 25. № 1. P. 59–70.
- Chen S., Jiang Q., Huang P., Hu C., Shen H., Schachner M., Zhao W. // *Brain. Res. Bull*. 2020. V. 162. P. 141–150.
- Scheltens P., Blennow K., Breteler M.M.B., de Strooper B., Frisoni G.B., Salloway S., Vander Flier W.M. // *Lancet*. 2016. V. 388. P. 505–517.
- Hardy J., Allsop D. // *Trends Pharmacol. Sci*. 1991. V. 12. P. 383–388.
- Winblad B., Amouyel P., Andrieu S., Ballard C., Brayne C., Brodaty H., Cedazo Minguez A., Dubois B., Edvardsson D., Feldman H., et al. // *Lancet. Neurol*. 2016. V. 15. P. 455–532.
- Swerdlow R.H., Burns J.M., Khan S.M. // *Biochim. Biophys. Acta*. 2014. V. 1842. № 8. P. 1219–1231.
- Stanciu G.D., Luca A., Rusu R.N., Bild V., Chiriac S.I.B., Solcan C., Bild W., Ababei D.C. // *Biomolecules*. 2020. V. 10. № 1. P. 40.
- Arnsten A.F.T., Datta D., Tredici K.D., Braak H. // *Alzheimer's Dement*. 2021. V. 17. № 1. P. 115–124.
- Cheignon C., Tomas M., Bonnefont-Rousselot D., Faller P., Hureau C., Collin F. // *Redox. Biol*. 2018. V. 14. P. 450–464.
- Pohanka M. // *Bratisl. Lek. Listy*. 2018. V. 119. № 9. P. 535–543.
- Tong B.C., Wu A.J., Li M., Cheung K.H. // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Cell. Res*. 2018. V. 1865. № 11. Pt B. P. 1745–1760.
- Akiyama H., Barger S., Barnum S., Bradt B., Bauer J., Cole G.M., Cooper N.R., Eikelenboom P., Emmerling M., Fiebich B.L., et al. // *Neurobiol. Aging*. 2000. V. 21. № 3. P. 383–421.
- Scheffer S., Hermkens D.M.A., van der Weerd L., de Vries H.E., Daemen M.J.A.P. // *Arterioscler. Thromb. Vasc. Biol*. 2021. V. 41. P. 1265–1283.
- Ward R.J., Zucca F.A., Duyn J.H., Crichton R.R., Zecca L. // *Lancet. Neurol*. 2014. V. 13. № 10. P. 1045–1060.
- Seaks C.E., Wilcock D.M. // *PLoS Pathog*. 2020. V. 16. № 11. P. e1008596.
- Asai M., Kawakubo T., Mori R., Nobuhisa I. // *Yakugaku. Zasshi*. 2017. V. 137. № 7. P. 801–805.
- An S.S., Bagyinszky E., Kim H.R., Seok J.W., Shin H.W., Bae S., Kim S., Youn Y.C. // *BMC Neurol*. 2016. V. 16. P. 71.
- Cai Y., An S.S., Kim S. // *Clin. Interv. Aging*. 2015. V. 10. P. 1163–1172.
- Sun L., Zhou R., Yang G., Shi Y. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. № 4. P. E476–E485.
- Dai M.H., Zheng H., Zeng L.D., Zhang Y. // *Oncotarget*. 2018. V. 9. № 19. P. 15132–15143.
- Veugelen S., Saito T., Saido T.C., Chávez-Gutiérrez L., De Strooper B. // *Neuron*. 2016. V. 90. № 2. P. 410–416.
- Szaruga M., Munteanu B., Lismont S., Veugelen S., Horré K., Mercken M., Saido T.C., Ryan N.S., De Vos T., Savvides S.N., et al. // *Cell*. 2017. V. 170. № 3. P. 443–456.e14.
- Armstrong R.A. // *Folia. Neuropathol*. 2019. V. 57. № 2. P. 87–105.
- Tilokani L., Nagashima S., Paupe V., Prudent J. // *Essays Biochem*. 2018. V. 62. № 3. P. 341–360.
- Wang W., Zhao F., Ma X., Perry G., Zhu X. // *Mol. Neurodegener*. 2020. V. 15. № 1. P. 30.
- Wang Y., Xu E., Musich P.R., Lin F. // *CNS Neurosci. Ther*. 2019. V. 25. № 7. P. 816–824.
- Cheng H., Gang X., Liu Y., Wang G., Zhao X., Wang G. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab*. 2020. V. 318. № 5. P. E750–E764.
- Cai Q., Tamminen P. // *Front. Cell. Neurosci*. 2016. V. 10. P. 24.
- Del Prete D., Suski J.M., Oulès B., Debayle D., Gay A.S., Lacas-Gervais S., Bussiere R., Bauer C., Pinton P., Paterlini-Bréchet P., et al. // *Alzheimers Dis*. 2017. V. 55. № 4. P. 1549–1570.
- Heinemeyer T., Stemmet M., Bardien S., Neethling A. // *DNA Cell. Biol*. 2019. V. 38. № 1. P. 23–40.
- Cline E.N., Bicca M.A., Viola K.L., Klein W.L. // *J. Alzheimers Dis*. 2018. V. 64. P. 567–610.
- Chen G.F., Xu T.H., Yan Y., Zhou Y.R., Jiang Y., Melcher K., Xu H.E. // *Acta Pharmacol. Sin*. 2017. V. 38. № 9. P. 1205–1235.
- Tan J.Z.A., Gleeson P.A. // *J. Biol. Chem*. 2019. V. 294. № 5. P. 1618–1631.
- Nhan H.S., Chiang K., Koo E.H. // *Acta Neuropathol*. 2015. V. 129. № 1. P. 1–19.
- Habib A., Sawmiller D., Tan J. // *J. Neurosci. Res*. 2017. V. 95. № 4. P. 973–991.
- Fol R., Braudeau J., Ludewig S., Abel T., Weyer S.W., Roderer J.P., Brod F., Audrain M., Bemelmans A.P., Buchholz C.J., et al. // *Acta. Neuropathol*. 2016. V. 131. № 2. P. 247–266.
- Liu X., Liu Y., Ji S. // *Membranes (Basel)*. 2021. V. 11. № 12. P. 983.
- Bolduc D.M., Montagna D.R., Gu Y., Selkoe D.J., Wolfe M.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. № 5. P. E509–E518.
- Oikawa N., Walter J. // *Cells*. 2019. V. 8. № 3. P. 209.
- Bai X.C., Yan C., Yang G., Lu P., Ma D., Sun L., Zhou R., Scheres S.H., Shi Y. // *Nature*. 2015. V. 525. № 7568. P. 212–217.
- Hampel H., Vassar R., De Strooper B., Hardy J., Willem M., Singh N., Zhou J., Yan R., Vanmechelen E., De Vos A., et al. // *Biol. Psychiatry*. 2021. V. 89. № 8. P. 745–756.
- Anand B.G., Wu Q., Karthivashan G., Shejale K.P., Amidian S., Wille H., Kar S. // *Bioact. Mater*. 2021. V. 6. № 12. P. 4491–4505.
- Jarosz-Griffiths H.H., Noble E., Rushworth J.V., Hooper N.M. // *J. Biol. Chem*. 2016. V. 291. № 7. P. 3174–3183.
- Lauritzen I., Pardossi-Piquard R., Bourgeois A., Pagnotta S., Biferi M.G., Barkats M., Lacor P., Klein W., Bauer C., Checler F. // *Acta. Neuropathol*. 2016. V. 132. № 2. P. 257–276.
- van Gijsel-Bonnello M., Baranger K., Benesch P., Rivera S., Khrestchatsky M., de Reggi M., Gharib B. // *PLoS One*. 2017. V. 12. № 4. P. e0175369.
- Chadha S., Behl T., Sehgal A., Kumar A., Bungau S. // *Mitochondrion*. 2021. V. 56. P. 62–72.

48. Schützmann M.P., Hasecke F., Bachmann S., Zielinski M., Hänsch S., Schröder G.F., Zempel H., Hoyer W. // *Nat. Commun.* 2021. V. 12. № 1. P. 4634.
49. Avendaño-Monsalve M.C., Ponce-Rojas J.C., Funes S. // *Biol. Chem.* 2020. V. 401. № 6–7. P. 645–661.
50. Hansson Petersen C.A., Alikhani N., Behbahani H., Wiehager B., Pavlov P.F., Alafuzoff I., Leinonen V., Ito A., Winblad B., Glaser E., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2008. V. 105. № 35. P. 13145–13150.
51. Del Prete D., Suski J.M., Oulès B., Debayle D., Gay A.S., Lacas-Gervais S., Bussiere R., Bauer C., Pinton P., Paterlini-Bréchet P., et al. // *J. Alzheimers Dis.* 2017. V. 55. № 4. P. 1549–1570.
52. Araiso Y., Tsutsumi A., Qiu J., Imai K., Shiota T., Song J., Lindau C., Wenz L.S., Sakaue H., Yunoki K., et al. // *Nature.* 2019. V. 575. № 7782. P. 395–401.
53. Palmer C.S., Anderson A.J., Stojanovski D. // *FEBS. Lett.* 2021. V. 595. № 8. P. 1107–1131.
54. Cenini G., Rüb C., Bruderek M., Voos W. // *Mol. Biol. Cell.* 2016. V. 27. № 21. P. 3257–3272.
55. Zhang Z., Cui D., Zhang T., Sun Y., Ding S. // *Diabetes. Metab. Syndr. Obes.* 2020. V. 13. P. 1417–1428.
56. Area-Gomez E., Schon E.A. // *FASEB J.* 2017. V. 31. № 3. P. 864–867.
57. Yang S., Zhou R., Zhang C., He S., Su Z. // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2020. V. 8. P. 571554.
58. Luan Y., Luan Y., Yuan R.X., Feng Q., Chen X., Yang Y. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2021. V. 2021. P. 4578809.
59. Wang N., Wang C., Zhao H., He Y., Lan B., Sun L., Gao Y. // *Cells.* 2021. V. 10. № 3. P. 657.
60. Weng T.Y., Tsai S.A., Su T.P. // *J. Biomed. Sci.* 2017. V. 24. № 1. P. 74.
61. Mangla A., Guerra M.T., Nathanson M.H. // *Cell. Calcium.* 2020. V. 85. P. 102132.
62. Shoshan-Barmatz V., Nahon-Crystal E., Shteinifer-Kuzmine A., Gupta R. // *Pharmacol. Res.* 2018. V. 131. P. 87–101.
63. Veeresh P., Kaur H., Sarmah D., Mounica L., Verma G., Kotian V., Kesharwani R., Kalia K., Borah A., Wang X., et al. // *Ann. N.Y. Acad. Sci.* 2019. V. 1457. № 1. P. 41–60.
64. Giacomello M., Pellegrini L. // *Cell. Death. Differ.* 2016. V. 23. № 9. P. 1417–1427.
65. Hedskog L., Pinho C.M., Filadi R., Ronnback A., Hertwig L., Wiehager B., Larssen P., Gellhaar S., Sandebring A., Westerlund M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2013. V. 110. № 19. P. 7916–7921.
66. Manczak M., Reddy P.H. // *Hum. Mol. Genet.* 2012. V. 21. № 23. P. 5131–5146.
67. Schreiner B., Hedskog L., Wiehager B., Ankarcrona M. // *J. Alzheimers Dis.* 2015. V. 43. № 2. P. 369–374.
68. Pera M., Larrea D., Guardia-Laguarta C., Montesinos J., Velasco K.R., Agrawal R.R., Xu Y., Chan R.B., Paolo G.D., Mehler M.F., et al. // *EMBO J.* 2017. V. 36. № 22. P. 3356–3371.
69. Area-Gomez E., de Groof A., Bonilla E., Montesinos J., Tanji K., Boldogh I., Pon L., Schon E.A. // *Cell Death Dis.* 2018. V. 9. № 3. P. 335.
70. Annunziata I., Sano R., d'Azzo A. // *Cell Death Dis.* 2018. V. 9. № 3. P. 328.
71. Cho Y.Y., Kwon O.H., Chung S. // *Molecules.* 2020. V. 25. № 23. P. 5490.
72. Brandimarti R., Hill G.S., Geiger J.D., Meucci O. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 15103.
73. Montesinos J., Pera M., Larrea D., Guardia-Laguarta C., Agrawal R.R., Velasco K.R., Yun T.D., Stavrovskaya I.G., Xu Y., Koo S.Y., et al. // *EMBO J.* 2020. V. 39. № 20. P. e103791.
74. Di Pardo A., Maglione V. // *Front. Neurosci.* 2018. V. 12. P. 249.
75. Area-Gomez E., Del Carmen Lara Castillo M., Tambini M.D., Guardia-Laguarta C., de Groof A.J., Madra M., Ikenouchi J., Umeda M., Bird T.D., Sturley S.L., et al. // *EMBO J.* 2012. V. 31. № 21. P. 4106–4123.
76. Takuma K., Fang F., Zhang W., Yan S., Fukuzaki E., Du H., Sosunov A., McKhann G., Funatsu Y., Nakamichi N., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 47. P. 20021–20026.
77. Fang F., Yu Q., Arancio O., Chen D., Gore S.S., Yan S.S., Yan S.F. // *Hum. Mol. Genet.* 2018. V. 27. № 6. P. 1002–1014.
78. Piras S., Furfaro A.L., Domenicotti C., Traverso N., Marinari U.M., Pronzato M.A., Nitti M. // *Oxid. Med. Cell. Longevity.* 2016. V. 2016. P. 9348651.
79. Manczak M., Anekonda T.S., Henson E., Park B.S., Quinn J., Reddy P.H. // *Hum. Mol. Genet.* 2006. V. 15. № 9. P. 1437–1449.
80. Hu W., Wang Z., Zheng H. // *J. Biol. Chem.* 2018. V. 293. № 33. P. 12681–12689.
81. Rhein V., Song X., Wiesner A., Ittner L.M., Baysang G., Meier F., Ozmen L., Bluethmann H., Dröse S., Brandt U., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 47. P. 20057–20062.
82. Pickett E.K., Koffie R.M., Wegmann S., Henstridge C.M., Herrmann A.G., Colom-Cadena M., Lleo A., Kay K.R., Vaught M., Soberman R., et al. // *J. Alzheimers Dis.* 2016. V. 53. № 3. P. 787–800.
83. Spires-Jones T.L., Hyman B.T. // *Neuron.* 2014. V. 82. № 4. P. 756–771.
84. Grimm A., Eckert A. // *J. Neurochem.* 2017. V. 143. № 4. P. 418–431.
85. Qin W., Haroutunian V., Katsel P., Cardozo C.P., Ho L., Buxbaum J.D., Pasinetti G.M. // *Arch. Neurol.* 2009. V. 66. № 3. P. 352–361.
86. Katsouri L., Lim Y.M., Blondrath K., Eleftheriadou I., Lombardero L., Birch A.M., Mirzaei N., Irvine E.E., Mazarakis N.D., Sastre M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2016. V. 113. № 43. P. 12292–12297.
87. Katsouri L., Parr C., Bogdanovic N., Willem M., Sastre M. // *J. Alzheimers Dis.* 2011. V. 25. № 1. P. 151–162.
88. Motyl J., Wencel P.L., Cieslik M., Strosznajder R.P., Strosznajder J.B. // *Mol. Neurobiol.* 2018. V. 55. № 1. P. 727–740.
89. Mohamed J.S., Hajira A., Pardo P.S., Boriek A.M. // *Diabetes.* 2014. V. 63. № 5. P. 1546–1559.
90. Long J.M., Maloney B., Rogers J.T., Lahiri D.K. // *Mol. Psychiatry.* 2019. V. 24. № 3. P. 345–363.
91. Chen F.Z., Zhao Y., Chen H.Z. // *Int. J. Mol. Med.* 2019. V. 43. № 1. P. 91–102.
92. Kumar S., Reddy P.H. // *Biochim. Biophys. Acta. Mol. Basis. Dis.* 2020. V. 1866. № 12. P. 165937.
93. John A., Kubosumi A., Reddy P.H. // *Cells.* 2020. V. 9. № 6. P. 1345.
94. Wang Y., Liu N., Lu B. // *CNS. Neurosci. Ther.* 2019. V. 25. № 7. P. 859–875.
95. Pradeepkiran J.A., Reddy H.P. // *Ageing. Res. Rev.* 2020. V. 64. P. 101191.
96. Cai Q., Jeong Y.Y. // *Cells.* 2020. V. 9. № 1. P. 150.
97. Liu L., Liao X., Wu H., Li Y., Zhu Y., Chen Q. // *Antioxid. Redox Signal.* 2020. V. 32. № 12. P. 906–927.
98. Du F., Yu Q., Yan S., Hu G., Lue L.F., Walker D.G., Wu L., Yan S.F., Tieu K., Yan S.S. // *Brain.* 2017. V. 140. № 12. P. 3233–3251.
99. Vaillant-Beuchot L., Mary A., Pardossi-Piquard R., Bourgeois A., Lauritzen I., Eysert F., Kinoshita P.F., Cazareth J., Badot C., Fragaki K., et al. // *Acta. Neuropathol.* 2021. V. 141. № 1. P. 39–65.
100. Guillaud L., El-Agamy S.E., Otsuki M., Terenzio M. //

- Front. Mol. Neurosci. 2020. V. 13. P. 556175.
101. Cagin U, Duncan O.F, Gatt A.P, Dionne M.S., Sweeney S.T., Bateman J.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2015. V. 112. № 44. P. E6000–E6009.
102. Wang Q, Tian J, Chen H, Du H, Guo L. // Neurobiol. Dis. 2019. V. 127. P. 410–418.
103. Tammineni P, Ye X., Feng T, Aikal D, Cai Q. // Elife. 2017. V. 6. P. e21776.
104. Pigino G., Morfini G., Pelsman A., Mattson M.P., Brady S.T., Busciglio J. // J. Neurosci. 2003. V. 23. № 11. P. 4499–4508.
105. Yu S.B., Pekkurnaz G. // J. Mol. Biol. 2018. V. 430. № 21. P. 3922–3941.
106. Glancy B., Kim Y., Katti P., Willingham T.B. // Front. Physiol. 2020. V. 11. P. 541040.
107. Oliver D., Reddy P.H. // Cells. 2019. V. 8. № 9. P. 961.
108. Harland M., Torres S., Liu J., Wang X. // J. Neurosci. 2020. V. 40. № 8. P. 1756–1765.
109. Wang W., Yin J., Ma X., Zhao F., Siedlak S.L., Wang Z., Torres S., Fujioka H., Xu Y., Perry G., et al. // Hum. Mol. Genet. 2017. V. 26. № 21. P. 4118–4131.
110. Wang X., Su B., Siedlak S.L., Moreira P.I., Fujioka H., Wang Y., Casadesus G., Zhu X. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2008. V. 105. № 49. P. 19318–19323.
111. Pradeepkiran J.A., Reddy A.P., Yin X., Manczak M., Reddy P.H. // Hum. Mol. Genet. 2020. V. 29. № 1. P. 49–69.
112. Eysert F., Kinoshita P.F., Mary A., Vaillant-Beuchot L., Checler F., Chami M. // Int. J. Mol. Sci. 2020. V. 21. № 24. P. 9521.
113. Wang L., Gao J., Liu J., Siedlak S.L., Torres S., Fujioka H., Huntley M.L., Jiang Y., Ji H., Yan T., et al. // Cell Metab. 2018. V. 28. № 3. P. 400–414.e8.
114. Leal N.S., Schreiner B., Pinho C.M., Filadi R., Wiehager B., Karlström H., Pizzo P., Ankarcróna M. // J. Cell. Mol. Med. 2016. V. 20. № 6. P. 1686–1695.
115. Yu R., Liu T., Jin S.B., Ning C., Lendahl U., Nister M., Zhao J. // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 880.
116. Panes J.D., Godoy P.A., Silva-Grecchi T., Celis M.T., Ramirez-Molina O., Gavilan J., Munoz-Montecino C., Castro P.A., Moraga-Cid G., Yevenes G.E., et al. // Front. Pharmacol. 2020. V. 11. P. 709.
117. Manczak M., Reddy P.H. // Hum. Mol. Genet. 2012. V. 21. № 11. P. 2538–2547.
118. Kuruva C.S., Manczak M., Yin X., Ogunmokun G., Reddy A.P., Reddy P.H. // Hum. Mol. Genet. 2017. V. 26. № 17. P. 3375–3395.
119. Joshi A.U., Saw N.L., Shamloo M., Mochly-Rosen D. // Oncotarget. 2018. V. 9. № 5. P. 6128–6143.
120. Kim B., Park J., Chang K.T., Lee D.S. // Free. Radic. Biol. Med. 2016. V. 90. P. 184–194.
121. Kim D.I., Lee K.H., Gabr A.A., Choi G.E., Kim J.S., Ko S.H., Han H.J. // Biochim. Biophys. Acta. 2016. V. 1863. № 11. P. 2820–2834.
122. Kikuchi K., Kidana K., Tatebe T., Tomita T. // J. Cell. Biochem. 2017. V. 118. № 12. P. 4183–4190.
123. Jagust W. // Nat. Rev. Neurosci. 2018. V. 19. № 11. P. 687–700.
124. Tarasoff-Conway J.M., Carare R.O., Osorio R.S., Glodzik L., Butler T., Fieremans E., Axel L., Rusinek H., Nicholson C., Zlokovic B.V., et al. // Nat. Rev. Neurol. 2015. V. 11. № 8. P. 457–470.
125. Xin S.H., Tan L., Cao X., Yu J.T., Tan L. // Neurotox. Res. 2018. V. 34. № 3. P. 733–748.
126. Porter K.N., Sarkar S.N., Dakhllallah D.A., Vannoy M.E., Quintana D.D., Simpkins J.W. // Front. Aging. Neurosci. 2020. V. 12. P. 92.
127. Zuroff L., Daley D., Black K.L., Koronyo-Hamaoui M. // Cell. Mol. Life. Sci. 2017. V. 74. № 12. P. 2167–2201.
128. Brunetti D., Torsvik J., Dallabona C., Teixeira P., Stromwasser P., Fernandez-Vizarrá E., Cerutti R., Reyes A., Preziuso C., D'Amati G., et al. // EMBO. Mol. Med. 2016. V. 8. № 3. P. 176–190.
129. Ciccone L., Shi C., di Lorenzo D., van Baelen A.C., Tonali N. // Molecules. 2020. V. 25. № 10. P. 2439.
130. Teixeira P.F., Masuyer G., Pinho C.M., Branca R.M.M., Kmiec B., Wallin C., Wärmländer S.K.T.S., Berntsson R.P., Ankarcróna M., Gräslund A., et al. // J. Mol. Biol. 2018. V. 430. № 3. P. 348–362.
131. Song E.S., Rodgers D.W., Hersh L.B. // Sci. Rep. 2018. V. 8. № 1. P. 2335.
132. Song E.S., Jang H., Guo H.F., Juliano M.A., Juliano L., Morris A.J., Galperin E., Rodgers D.W., Hersh L.B. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2017. V. 114. № 14. P. E2826–E2835.
133. Kurochkin I.V., Guarnera E., Wong J.H., Eisenhaber F., Berezovsky I.N. // Biochemistry. 2017. V. 56. № 1. P. 228–239.
134. Deprez-Poulain R., Hennuyer N., Bosc D., Liang W.G., Enée E., Marechal X., Charton J., Totobenazara J., Berte G., Jahklal J., et al. // Nat. Commun. 2015. V. 6. P. 8250.
135. Wang L., Shi F.X., Xu W.Q., Cao Y., Li N., Li M., Wang Q., Wang J.Z., Tian Q., Yu L.K. // J. Alzheimers. Dis. 2018. V. 64. № 3. P. 957–971.
136. Nalivaeva N.N., Zhuravin I.A., Turner A.J. // Mech. Ageing. Dev. 2020. V. 192. P. 111363.
137. de Dios C., Bartolessis I., Roca-Agujetas V., Barbero-Camps E., Mari M., Morales A., Colell A. // Redox. Biol. 2019. V. 26. P. 101283.
138. Yamamoto N., Nakazawa M., Nunono N., Yoshida N., Obuchi A., Tanida M., Suzuki K., Ikeda-Matsuo Y., Sobue K. // Neurosci. Res. 2021. V. 166. P. 62–72.
139. Brunetti D., Catania A., Viscomi C., Deleidi M., Bindoff L.A., Ghezzi D., Zeviani M. // Biomedicines. 2021. V. 9. № 7. P. 833.
140. Fang D., Wang Y., Zhang Z., Du H., Yan S., Sun Q., Zhong C., Wu L., Vangavaragu J.R., Yan S., et al. // Hum. Mol. Genet. 2015. V. 24. № 18. P. 5198–5210.
141. Falkevall A., Alikhani N., Bhushan S., Pavlov P.F., Busch K., Johnson K.A., Eneqvist T., Tjernberg L., Ankarcróna M., Glaser E. // J. Biol. Chem. 2006. V. 281. № 39. P. 29096–29104.
142. Alikhani N., Ankarcróna M., Glaser E. // J. Bioenerg. Biomembr. 2009. V. 41. № 5. P. 447–451.
143. Alikhani N., Guo L., Yan S., Du H., Pinho C.M., Chen J.X., Glaser E., Yan S.S. // J. Alzheimers. Dis. 2011. V. 27. № 1. P. 75–87.
144. Chen J., Teixeira P.F., Glaser E., Levine R.L. // Free. Radic. Biol. Med. 2014. V. 77. P. 57–63.
145. Teixeira P.F., Pinho C.M., Branca R.M., Lehtiö J., Levine R.L., Glaser E. // Free. Radic. Biol. Med. 2012. V. 53. № 11. P. 2188–2195.
146. Xu Y.J., Mei Y., Qu Z.L., Zhang S.J., Zhao W., Fang J.S., Wu J., Yang C., Liu S.J., Fang Y.Q., et al. // Biomed. Res. Int. 2018. V. 2018. P. 4606752.
147. Hemmerová E., Špringer T., Křištofiková Z., Homola J. // Sci. Rep. 2019. V. 9. № 1. P. 16700.
148. Zakaria A., Hamdi N., Abdel-Kader R.M. // Mol. Neurobiol. 2016. V. 53. № 2. P. 1220–1228.
149. Xiao X., Chen Q., Zhu X., Wang Y. // Neurobiol. Aging. 2019. V. 81. P. 77–87.
150. Morsy A., Trippier P.C. // J. Med. Chem. 2019. V. 62. № 9. P. 4252–4264.
151. Reiss A.B., Arain H.A., Stecker M.M., Siegart N.M., Kas-

- selman L.J. // *Rev. Neurosci.* 2018. V. 29. № 6. P. 613–627.
152. Park I., Londhe A.M., Lim J.W., Park B.G., Jung S.Y., Lee J.Y., Lim S.M., No K.T., Lee J., Pae A.N. // *J. Comput. Aided. Mol. Des.* 2017. V. 31. № 10. P. 929–941.
153. Rottenberg H., Hoek J.B. // *Aging. Cell.* 2017. V. 16. № 5. P. 943–955.
154. Marroquin L., Swiss R., Will Y. // *Curr. Protoc. Toxicol.* 2014. V. 60. № 1. P. 25.4.1–25.4.17.
155. Bhatia V., Sharma S. // *J. Neurol. Sci.* 2021. V. 421. P. 117253.
156. Guo L., Du H., Yan S., Wu X., McKhann G.M., Chen J.X., Yan S.S. // *PLoS One.* 2013. V. 8. № 1. P. e54914.
157. Nalivaeva N.N., Turner A.J. // *Br. J. Pharmacol.* 2019. V. 176. № 18. P. 3447–3463.
158. Chang X., Rong C., Chen Y., Yang C., Hu Q., Mo Y., Zhang C., Gu X., Zhang L., He W., et al. // *Exp. Cell. Res.* 2015. V. 334. № 1. P. 136–145.
159. Zhuravin I.A., Dubrovskaya N.M., Vasilev D.S., Kozlova D.I., Kochkina E.G., Tumanova N.L., Nalivaeva N.N. // *Neurochem. Res.* 2019. V. 44. № 6. P. 1387–1398.
160. Nan S., Wang P., Zhang Y., Fan J. // *Drug. Des. Devel. Ther.* 2021. V. 15. P. 2013–2024.
161. Li H., Yu S., Fan T., Zhong Y., Gu T., Wu W., Wang X. // *Drug. Dev. Res.* 2020. V. 81. № 2. P. 206–214.
162. Wang N., Jia Y., Zhang B., Li Y., Murtaza G., Huang S., Liu X. // *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2020. V. 2020. P. 3862342.
163. Lyu W., Ouyang M., Ma X., Han T., Pi D., Qiu S. // *Evid. Based. Complement. Alternat. Med.* 2021. V. 2021. P. 5521739.
164. Xu Y.M., Wang X.C., Xu T.T., Li H.Y., Hei S.Y., Luo N.C., Wang H., Zhao W., Fang S.H., Chen Y.B., et al. // *Neural. Regen. Res.* 2019. V. 14. № 5. P. 794–804.
165. Guo S., Wang J., Wang Y., Zhang Y., Bi K., Zhang Z., Li Q. // *Oxid. Med. Cell Longev.* 2019. V. 2019. P. 1707218.
166. Farkhondeh T., Samarghandian S., Pourbagher-Shahri A.M., Sedaghat M. // *J. Cell. Physiol.* 2019. V. 234. № 10. P. 16953–16965.
167. Amalraj A., Pius A., Gopi S., Gopi S. // *J. Tradit. Complement. Med.* 2017. V. 7. № 2. P. 205–233.
168. Zia A., Farkhondeh T., Pourbagher-Shahri A.M., Samarghandian S. // *Biomed. Pharmacother.* 2021. V. 134. P. 111119.
169. Ege D. // *Materials (Basel).* 2021. V. 14. № 12. P. 3332.
170. Amato A., Terzo S., Mulè F. // *Antioxidants (Basel).* 2019. V. 8. № 12. P. 608.
171. Teter B., Morihara T., Lim G.P., Chu T., Jones M.R., Zuo X., Paul R.M., Frautschy S.A., Cole G.M. // *Neurobiol. Dis.* 2019. V. 127. P. 432–448.
172. Ege D. // *Materials (Basel).* 2021. V. 14. № 12. P. 3332.
173. Doytchinova I., Atanasova M., Salamanova E., Ivanov S., Dimitrov I. // *Biomolecules.* 2020. V. 10. № 9. P. 1323.
174. Zhao L.N., Chiu S.W., Benoit J., Chew L.Y., Mu Y. // *J. Phys. Chem. B.* 2012. V. 116. P. 7428–7435.
175. Ngo S.T., Li M.S. // *J. Phys. Chem B.* 2012. V. 116. P. 10165–10175.
176. Kundaikar H.S., Degani M.S. // *Chem. Biol. Drug Des.* 2015. V. 86. P. 805–812.
177. Tavanti F., Pedone A., Menziani M.C. // *Molecules.* 2018. V. 23. P. 1320.
178. Zheng K., Dai X., Xiao N., Wu X., Wei Z., Fang W., Zhu Y., Zhang J., Chen X. // *Mol Neurobiol.* 2017. V. 54. № 3. P. 1967–1977.
179. Huang P., Zheng N., Zhou H.B., Huang J. // *Mol. Cell. Biochem.* 2020. V. 463. № 1–2. P. 161–173.
180. Matiadis D., Ng S.T., Chen E.H., Nigianni G., Vidali V.P., Canko A., Chen R.P., Sagnou M. // *Biomedicines.* 2021. V. 9. № 8. P. 955.
181. Amato A., Terzo S., Mulè F. // *Antioxidants (Basel).* 2019. V. 8. № 12. P. 608.
182. Esselun C., Bruns B., Hagl S., Grewal R., Eckert G.P. // *Antioxidants (Basel).* 2021. V. 10. № 10. P. 1520.
183. Bai D., Jin G., Zhang D., Zhao L., Wang M., Zhu Q., Zhu L., Sun Y., Liu X., Chen X., et al. // *J. Physiol. Sci.* 2019. V. 69. № 4. P. 643–652.
184. Saravanan K., Sugarthi S., Suganya S., Kumaradhas P. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2021. V. 12. № 1. P. 15.
185. Shen L., Liu L., Li X.Y., Ji H.F. // *Appl. Microbiol. Biotechnol.* 2019. V. 103. № 17. P. 7141–7149.
186. Wang X.-L., Lin F.-L., Xu W., Wang C., Wang Q., Jiang R.W. // *Eur. J. Pharmacol.* 2022. V. 288. P. 114938.
187. Huo Q., Shi Y., Qi Y., Huang L., Sui H., Zhao L. // *Mater. Sci. Eng. C. Mater. Biol. Appl.* 2021. V. 129. P. 112365.
188. Pan Q., Ban Y., Xu L. // *J. Biomed. Nanotechnol.* 2021. V. 17. № 6. P. 1123–1130.
189. Alizadeh S.R., Ebrahimzadeh M.A. // *Phytother. Res.* 2022. V. 36. № 2. P. 778–807.
190. Ghafouri-Fard S., Shoorei H., Khanbabapour Sasi A., Taheri M., Ayatollahi S.A. // *Biomed. Pharmacother.* 2021. V. 141. P. 111847.
191. Khan H., Ullah H., Aschner M., Cheang W.S., Akkol E.K. // *Biomolecules.* 2020. V. 10. № 1. P. 59.
192. Zhang X.W., Chen J.Y., Ouyang D., Lu J.H. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 2. P. 493.
193. Maccioni R.B., Calfío C., González A., Lüttges V. // *Biomolecules.* 2022. V. 12. № 2. P. 249.
194. Elfiky A.M., Mahmoud A.A., Elreedy H.A., Ibrahim K.S., Ghazy M.A. // *Life. Sci.* 2021. V. 285. P. 119964.
195. Das S., Majumder T., Sarkar A., Mukherjee P., Basu S. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 165. P. 1323–1330.
196. Tanaka M., Saito S., Inoue T., Satoh-Asahara N., Ihara M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 6. P. 1992.
197. Li Y., Zhao J., Hölscher C. // *CNS Drugs.* 2017. V. 31. № 8. P. 639–652.
198. Shi J., Li Y., Zhang Y., Chen J., Gao J., Zhang T., Shang X., Zhang X. // *Front. Pharmacol.* 2021. V. 12. P. 794458.
199. Dhakal S., Ramsland P.A., Adhikari B., Macreadie I. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 17. P. 9456.
200. Ali F., Rahul, Jyoti S., Naz F., Ashafaq M., Shahid M., Siddique Y.H. // *Neurosci. Lett.* 2019. V. 692. P. 90–99.
201. Akbar M., Shabbir A., Rehman K., Akash M.S.H., Shah M.A. // *J. Food Biochem.* 2021. V. 45. № 10. P. e13936.
202. Liang Y., Ye C., Chen Y., Chen Y., Diao S., Huang M. // *ACS Chem. Neurosci.* 2021. V. 12. № 11. P. 1894–1904.
203. Fang Z., Tang Y., Ying J., Tang C., Wang Q. // *Chin. Med.* 2020. V. 15. P. 82.
204. Raju M., Kunde S.S., Auti S.T., Kulkarni Y.A., Wairkar S. // *Life Sci.* 2021. V. 285. P. 119990.
205. Azam S., Park J.Y., Kim I.S., Choi D.K. // *Biomedicines.* 2022. V. 10. № 1. P. 154.
206. Chetia P., Mazumder M.K., Mahanta S., De B., Choudhury M.D. // *Med. Hypotheses.* 2020. V. 142. № 2. P. 109839.
207. Miao S.X., Wan L.X., He Z.X., Zhou X.L., Li X., Gao F. // *J. Nat. Prod.* 2021. V. 84. № 8. P. 2374–2379.
208. Zhou D.D., Luo M., Huang S.Y., Saimaiti A., Shang A., Gan R.Y., Li H.B. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2021. V. 2021. P. 9932218.
209. Noori T., Dehpour A.R., Sureda A., Sobarzo-Sanchez E., Shirooie S. // *Eur. J. Pharmacol.* 2021. V. 898. P. 173974.
210. Mphahlele M.J., Agbo E.N., More G.K., Gildenhuys S. // *Antioxidants (Basel).* 2021. V. 10. № 5. P. 647.
211. Haghhighijoo Z., Akrami S., Saeedi M., Zonouzi A., Iraj A.,

- Larijani B., Fakherzadeh H., Sharifi F., Arzaghi S.M., Mahdavi M., et al. // *Bioorg. Chem.* 2020. V. 103. P. 104146.
212. Vishal P.K., Oh J.M., Khames A., Abdelgawad M.A., Nair A.S., Nath L.R., Gambacorta N., Ciriaco F., Nicolotti O., Kim H., et al. // *Pharmaceutics*. 2021. V. 13. № 6. P. 850.
213. Singh N.A., Bhardwaj V., Ravi C., Ramesh N., Mandal A.K.A., Khan Z.A. // *Front. Aging Neurosci.* 2018. V. 10. P. 244.
214. Mori T., Koyama N., Tan J., Segawa T., Maeda M., Town T. // *J. Biol. Chem.* 2019. V. 294. № 8. P. 2714–2731.
215. Yue W., Xu W., Song Y.U., Chun W. // *Nat. Prod. Res. Dev.* 2017. V. 29. P. 762–766.
216. Qian W., Wei-wei Q., Jie-wen Z. // *Chin. Pharm. J.* 2019. V. 54. P. 703–710.
217. Wang H., Li L., Jia K., Wang Q., Sui S., Lin Y., He Y. // *Neuroreport*. 2020. V. 31. P. 1104–1110.
218. Lee H.J., Jeong H.R., Park J.H., Hoe H.S. // *Biology (Basel)*. 2021. V. 10. № 9. P. 938.
219. Kaur D., Behl T., Sehgal A., Singh S., Sharma N., Chigurupati S., Alhowail A., Abdeen A., Ibrahim S.F., Vargas-De-La-Cruz C., et al. // *Life. Sci.* 2021. V. 284. P. 119899.
220. Reddy P.H., Manczak M., Kandimalla R. // *Hum. Mol. Genet.* 2017. V. 26. № 8. P. 1483–1496.
221. Stefanova N.A., Muraleva N.A., Maksimova K.Y., Rudnitskaya E.A., Kiseleva E., Telegina D.V., Kolosova N. // *Aging (Albany NY)*. 2016. V. 8. № 11. P. 2713–2733.
222. Zafeer M.F., Firdaus F., Anis E., Mobarak Hossain M. // *Neurotoxicology*. 2019. V. 73. P. 246–257.
223. Lan J.S., Zeng R.F., Jiang X.Y., Hou J.W., Liu Y., Hu Z.H., Li H.X., Li Y., Xie S.S., Ding Y., Zhang T. // *Bioorg. Chem.* 2020. V. 94. P. 103413.
224. Benčekroun M., Pachón-Angona I., Luzet V., Martin H., Oset-Gasque M.J., Marco-Contelles J., Ismaili L. // *Bioorg. Chem.* 2019. V. 85. P. 221–228.
225. Costa M., Bernardi J., Fiuza T., Costa L., Brandão R., Pereira M.E. // *Chem. Biol. Interact.* 2016. V. 253. P. 10–17.
226. Dos Santos S.M., Romeiro C.F.R., Rodrigues C.A., Cerqueira A.R.L., Monteiro M.C. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2019. V. 2019. P. 8409329.
227. Shinto L., Quinn J., Montine T., Dodge H.H., Woodward W., Baldauf-Wagner S., Waichunas D., Bumgarner L., Bourdette D., Silbert L., et al. // *J. Alzheimers. Dis.* 2014. V. 38. № 1. P. 111–120.
228. Reddy P.H., Manczak M., Kandimalla R. // *Hum. Mol. Genet.* 2017. V. 26. № 8. P. 1483–1496.
229. Reddy P.H., Manczak M., Yin X., Reddy A.P. // *J. Alzheimers Dis.* 2018. V. 62. № 4. P. 1549–1565.
230. Hroch L., Benek O., Guest P., Aitken L., Soukup O., Janockova J., Musil K., Dohnal V., Dolezal R., Kuca K., et al. // *Bioorg. Med. Chem. Lett.* 2016. V. 26. № 15. P. 3675–3678.
231. Aitken L., Benek O., McKelvie B.E., Hughes R.E., Hroch L., Schmidt M., Major L.L., Vinklarova L., Kuca K., Smith T.K., et al. // *Molecules*. 2019. V. 24. № 15. P. 2757.
232. Benek O., Hroch L., Aitken L., Dolezal R., Guest P., Benkova M., Soukup O., Musil K., Kuca K., Smith T.K., et al. // *Med. Chem.* 2017. V. 13. № 4. P. 345–358.
233. Xiao X., Chen Q., Zhu X., Wang Y. // *Neurobiol. Aging*. 2019. V. 81. P. 77–87.
234. Yao J., Du H., Yan S., Fang F., Wang C., Lue L.F., Guo L., Chen D., Stern D.M., Moore F.J., et al. // *J. Neurosci.* 2011. V. 31. № 6. P. 2313–2320.

УДК 577.218

Искусственные хромосомы человека и способы их доставки в клетки-мишени

С. В. Пономарцев¹, С. А. Синенко^{1*}, А. Н. Томилин^{1,2*}¹Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 194064 Россия²Институт трансляционной биомедицины, Санкт-Петербургский государственный университет, Санкт-Петербург, 199034 Россия

*E-mail: s.sinenko@incras.ru, a.tomilin@incras.ru

Поступила в редакцию 27.12.2021

Принята к печати 12.07.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11670

РЕФЕРАТ Искусственные хромосомы человека разработаны в качестве генетических векторов, позволяющих нести большие трансгенные конструкции или целые генные локусы. Такие векторы представляют собой либо редуцированные нативные хромосомы, либо новосинтезированные генетические конструкции. Общими важными особенностями искусственных хромосом человека являются их сверхвысокая емкость и способность поддерживаться в виде самостоятельных генетических элементов без интеграции в хромосомы клеток-хозяев. В обзоре рассмотрены способы получения, структурно-функциональные особенности и области применения основных известных на сегодняшний день типов искусственных хромосом человека. Отдельно описан один из технически наиболее сложных и трудоемких элементов технологии – перенос этих векторов из клеток-доноров в клетки-реципиенты.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА искусственные хромосомы человека, перенос хромосом, опосредованный микроклетками, тетрациклиновый оператор, рекомбинация, ассоциированная с трансформацией.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИХЧ – искусственная хромосома человека; ИХБ – искусственная хромосома бактерий; ИХД – искусственная хромосома дрожжей; ММСТ – перенос хромосом, опосредованный микроклетками (Microcell-Mediated Chromosome Transfer); TAR – рекомбинация, ассоциированная с трансформацией; CENP-B – центромерный белок B; ЭСК – эмбриональные стволовые клетки; ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; СНО – клетки яичника китайского хомячка; *tetO* – тетрациклиновый оператор; HSV-1 – вирус простого герпеса типа 1; HVJ-E – японский гемагглютинирующий вирус E; MLV – ретровирус лейкоза мышей; TACF – теломер-ассоциированная фрагментация хромосом; FSCT – перенос хромосом с помощью проточной сортировки; MWCF – слияние целых микроядерных клеток; iMCT – трансфекция изолированных метафазных хромосом; ПЭГ – полиэтиленгликоль; HPRT – гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансфераза; FACS – проточная цитометрия (fluorescence-activated cell sorting); GFP – зеленый флуоресцентный белок.

ВВЕДЕНИЕ

Искусственные хромосомы человека (ИХЧ, англ. human artificial chromosomes, HAC) были получены, в первую очередь, в качестве экспрессионных векторных систем для переноса трансгенов в эукариотические клетки. На сегодняшний день разработано множество векторных систем, различающихся по основным характеристикам: (1) способности встраиваться в хромосомы хозяйских клеток или оставаться в эписомной форме, (2) генетической емкости, определяющей максимальный размер трансгена, и (3) способу доставки. Интегрирующие векторы встраиваются в ДНК клеток-хозяев, в результате чего они наследуются дочерними клетками. К недостаткам таких векторных систем относятся случайный характер их встраивания в геном, ассо-

цированный с риском инсерционного мутагенеза, а также эпигенетическим подавлением экспрессии трансгенов. Интегрирующими векторами являются линейаризованные плазмиды, а также векторные системы на основе ретровирусов [1–3] и транспозонов, таких, как piggy-Bac, Sleeping Beauty, Tol2 [4–6].

Неинтегрирующие векторы находятся в хозийских клетках в эписомном состоянии. В процессе клеточного деления происходит неравномерное распределение таких векторов между дочерними клетками и их постепенная утрата. Подобные системы удобны для временной трансфекции клеток, однако они не подходят для длительной экспрессии трансгенов. Примерами таких векторных систем являются кольцевые плазмиды и векторы на основе аденовирусов, альфа-вирусов, герпесвирусов, баку-

ловирусов, поксвирусов и бактериофагов [1, 2, 7]. Важным параметром векторных систем является их емкость, определяемая максимальным размером встраиваемого трансгена. С помощью плазмид можно переносить трансгены длиной до 20 т.п.н. Использование векторов на основе транспозонов позволяет осуществлять доставку трансгенной ДНК размером до 9 т.п.н., в то время как векторные системы на основе вирусной ДНК могут вмещать трансгены до 150 т.п.н. [1, 2]. Существуют различные способы доставки экспрессионных векторных систем в клетки-мишени. Плазмиды и векторы на основе ДНК-транспозонов переносят с помощью кальций-фосфатной трансфекции, электропорации, липофекции, сонопорации, микроинъекции, магнитофекции, а также с помощью так называемой «генной пушки». Доставка векторов на основе вирусной ДНК, называемая трансдукцией, осуществляется посредством характерного для данного вируса механизма заражения клетки хозяина.

Искусственные хромосомы человека – это векторные конструкции, обладающие основными характеристиками хромосом: (1) способностью автономного существования в клетке как дополнительной хромосомы и (2) способностью реплицироваться и передаваться обеим дочерним клеткам в процессе клеточного деления. Таким образом, использование ИХЧ позволяет избежать рисков инсерционного мутагенеза и при этом обеспечивает устойчивую экспрессию трансгенов. Уникальной особенностью ИХЧ является их сверхвысокая емкость, позволяющая осуществлять перенос трансгенов длиной до нескольких миллионов пар нуклеотидов, в том числе целых генных локусов с *cis*-регуляторными участками, позволяя точно воспроизводить экспрессию эндогенных локусов. Хотя на сегодняшний день получено множество ИХЧ различной структуры, эти векторные системы продолжают интенсивно совершенствоваться и модифицироваться [8–13]. ИХЧ получают с помощью двух подходов. Первый – это так называемый подход «сверху-вниз» (англ. top-down), который позволяет получать ИХЧ из нативных хромосом путем их максимальной редукции, не затрагивающей только компоненты, необходимые для стабильной репликации в клетке, а именно, центромерный и теломерные участки [14–16]. Второй подход – синтетический, «снизу-вверх» (англ. bottom-up) – позволяет получать линейные или кольцевые ИХЧ посредством синтеза и сборки больших участков прицентромерной альфа-сателлитной ДНК *in vitro* [13, 17–19]. Необходимо отметить, что, несмотря на очевидные преимущества ИХЧ перед другими векторными системами, существует ряд технических ограничений для их

активного использования как в научных исследованиях, так и в биомедицинских приложениях. Одно из главных ограничений – неэффективность и трудоемкость методов переноса ИХЧ в клетки-мишени. В нашем обзоре описаны разные типы ИХЧ, способы их доставки в клетки, а также перспективы внедрения этих эпизомных векторов сверхвысокой емкости в практическую медицину.

ОСНОВНЫЕ ТИПЫ ИХЧ И СПОСОБЫ ИХ ПОЛУЧЕНИЯ

ИХЧ, получаемые путем редукции нативных хромосом человека

Укорочение хромосом эукариотических клеток стало возможным благодаря методу теломер-ассоциированной фрагментации хромосом (ТАСФ, англ. Telomere-Associated Chromosome Fragmentation) [20]. На сегодняшний день такие ИХЧ являются наиболее охарактеризованными и усовершенствованными в контексте их использования в качестве стабильных экспрессионных векторных систем. Подход top-down позволяет удалять плечи хромосом, заменяя их новыми теломерсодержащими участками, которые встраивают в выбранные локусы с помощью гомологичной рекомбинации. В полученных таким образом ИХЧ могут оставаться единичные криптические гены и некодирующие последовательности, однако всегда присутствуют элементы, необходимые для их стабильного поддержания в клеточном ядре (теломеры) и равномерного распределения между дочерними клетками в процессе деления (центромеры). Чтобы осуществлять сайт-специфическое встраивание трансгенов в такие конструкции, в них предварительно вводят соответствующие последовательности, например, *loxP*-сайты, которые опосредуют интеграцию трансгенов посредством Cre-зависимой рекомбинации. Также, в ИХЧ часто помещают селективные маркеры, которые позволяют проводить позитивный отбор клеток, содержащих ИХЧ. С помощью метода ТАСФ получены искусственные хромосомы на основе хромосом 14 [21] и 21 человека [16, 22, 23], а также хромосомы 11 мыши [24] – в последнем случае такие хромосомы называют искусственными хромосомами мыши. Наиболее технически продвинутой на сегодняшний день является ИХЧ на основе хромосомы 21 человека, или 21-ИХЧ [16], которую получали в несколько этапов (рис. 1). Нативную хромосому 21 человека сначала переносили в клеточную линию DT-40 курицы, удобную для осуществления гомологичной рекомбинации ДНК [25]. Далее с помощью метода ТАСФ из перенесенной хромосомы удаляли р-плечо, для чего с помощью гомологичной рекомбинации в участок, находящийся вблизи центромеры,

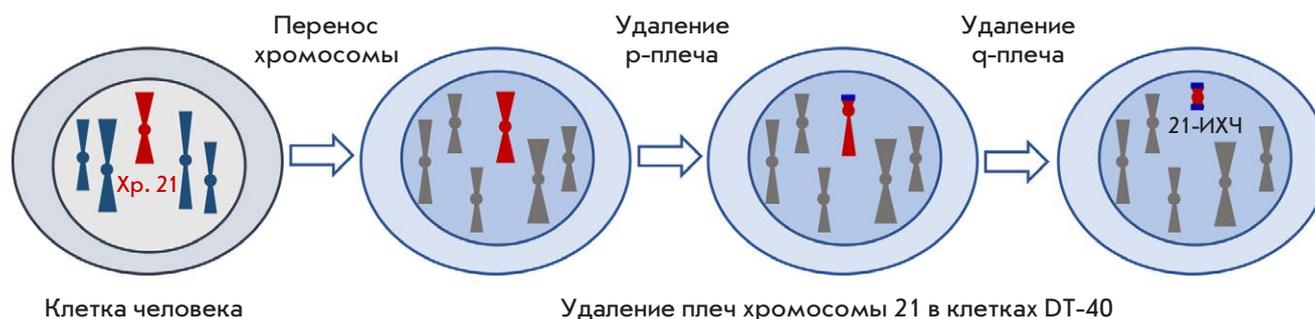


Рис. 1. Схема сборки 21-ИХЧ с помощью метода теломер-ассоциированной фрагментации хромосом. Хромосому 21 из клеток человека переносили в клетки линии DT-40. Затем с помощью гомологичной рекомбинации вблизи центromеры в нее встраивали теломерные последовательности (отмечены синим), что приводило к фрагментации хромосомы в районе вставки. Таким образом, в результате последовательного удаления плеч хромосомы с их заменой на теломерные участки получали 21-ИХЧ (21НАС)

встраивали теломерную последовательность. Вместе с теломерной последовательностью встраивали также селективный маркер, который позволяет отобрать клетки, в которых произошла рекомбинация. Аналогичным образом удаляли и q-плечо (рис. 1). Помимо теломерного участка, в 21-ИХЧ был внесен также сайт *loxP*, фрагмент гена гипоксантин-гуанин-фосфорибозилтрансферазы (*HPRT*), а также другие элементы. С помощью секвенирования показано, что, помимо центромерного участка и встроенных элементов, полученная 21-ИХЧ содержит незначительное количество остаточного генетически инертного материала [26]. Полученную ИХЧ переносили из клеток линии DT-40 в клетки линии СНО яичника китайского хомячка, в которых затем проводили финальный этап сборки ИХЧ, заключающийся в «загрузке» требуемого трансгена с помощью сайт-специфической рекомбинации, а также поддержание и наработку этой ИХЧ. Затем ИХЧ переносили в клетки-мишени с помощью описанного ниже метода ММСТ (англ. Microcell-Mediated Chromosome Transfer).

Создано несколько модификаций 21-ИХЧ, различия между которыми заключались в использовании различных селективных маркеров: гена зеленого флуоресцентного белка (*GFP*), гена тимидинкиназы (*tk*) вируса простого герпеса, а также генов устойчивости к неомицину, гигромицину и бластицидину [26]. Получена также 21-ИХЧ, содержащая мультиинтеграционный локус, включающий сайты *loxP*, *FRT*, *ΦC31attP*, *R4attP*, *TP901-1attP* и *Bxb1attP* [23]. Такую ИХЧ использовали в различных исследовательских и генотерапевтических моделях [8]. На основе этой ИХЧ созданы экспрессионные векторы для коррекции миодистрофии Дюшенна [22, 27, 28] и гемофилии А [29], с ее помощью проведено также репрограммирование эмбриональных фибробластов мыши [30].

ИХЧ на основе сателлитов

Еще один тип ИХЧ, получаемый по принципу top-down, образуется путем встраивания трансгена в кластер генов рибосомной ДНК на коротких плечах акроцентрических хромосом [31, 32] (рис. 2). При таком встраивании возможны ошибки репликации, в результате чего образуются длинные инвертированные повторы [33]. Наряду с этим происходит удвоение центromеры, хромосома «ломается», и фрагмент короткого плеча формирует отдельную хромосому, которая в дальнейшем ведет себя как самостоятельная репликативная единица [34, 35] и обеспечивает устойчивую экспрессию внедренного в нее трансгена [36]. Полученные таким способом ИХЧ, названные SATAC (от англ. Satellite-DNA-based Artificial Chromosome), выделяют из клеток-доноров с помощью проточной цитофлуориметрии, переносят в клетки-мишени с помощью дендримеров и катионных частиц [37], а также посредством микроинъекций [38, 39]. Эмбриональные стволовые клетки (ЭСК) мыши, в которые переносили SATAC, показывали способность участвовать в нормальном эмбриональном развитии [38, 40].

Альфоидные ИХЧ

Принципиально иной способ создания ИХЧ основан на синтезе протяженных нуклеотидных последовательностей, обладающих основными функциями хромосом. Основную сложность в случае подхода bottom-up представляет конструирование функциональной искусственной центромерной последовательности. Как известно, в хромосомах человека такая последовательность представляет собой тандемные повторы альфа-сателлитной ДНК общей длиной от 230 т.п.н. до нескольких миллионов пар нуклеотидов [41]. Клонирование таких последовательностей крайне затруднительно из-за спонтанной рекомбинации [42]. Первая успешная попытка

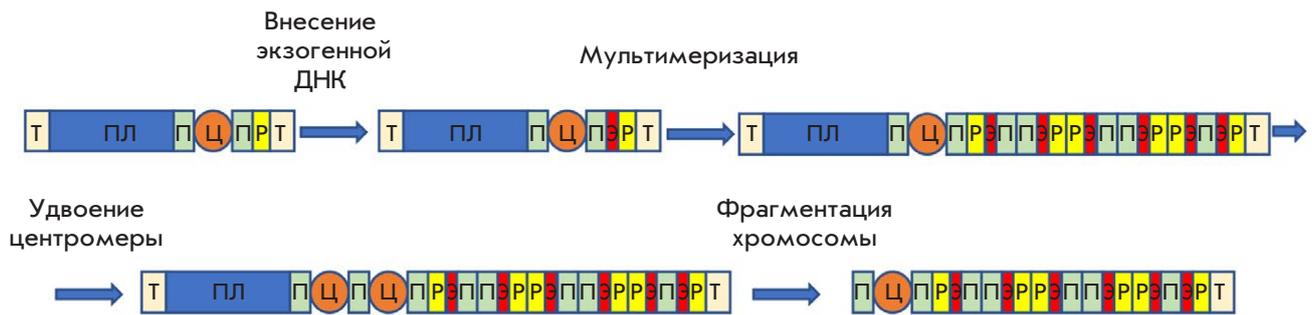


Рис. 2. Схема получения ИХЧ типа SATAC. В перичентромерную область акроцентрической хромосомы с помощью гомологичной рекомбинации вносят экзогенную ДНК, содержащую сайты для сайт-специфической рекомбинации, селективный маркер и другие последовательности. Вследствие такого встраивания происходит амплификация участков перичентромерной, рибосомной и экзогенной ДНК. После удвоения центромеры происходит фрагментация хромосомы, в результате чего формируется ИХЧ. Условные обозначения: Т – теломера, ПЛ – длинное плечо акроцентрической хромосомы, П – перичентромерный участок, Ц – центромера, Р – рибосомная ДНК, Э – экзогенная ДНК

клонирования центромерной ДНК человека была осуществлена в 1997 году [43]. С помощью последовательных раундов лигирования в бактериальную искусственную хромосому (ИХБ, англ. bacterial artificial chromosome) были клонированы тандемные повторы альфа-сателлитной ДНК из центромер хромосом 17 и Y человека длиной в несколько т.п.н., в результате чего получили повторы длиной до 173 т.п.н. Лигирование этих фрагментов позволило получить последовательности альфа-сателлитной ДНК человека длиной более 1 млн п.н. Клонированные таким образом центромерные повторы, а также теломерные последовательности и фрагменты геномной ДНК человека были перенесены в клетки линии HT1080 фибросаркомы человека, где они неспецифически рекомбинировали между собой. В некоторых случаях образовывались небольшие ИХЧ, которые оставались стабильными в клеточном ядре и наследовались обеими дочерними клетками. Таким образом впервые доказали принципиальную возможность сборки ИХЧ *de novo*, что дало импульс последующим работам в этом направлении.

Альфоидная^{tet^o}-ИХЧ

Для сборки ИХЧ такого типа используют метод амплификации альфа-сателлитной ДНК с помощью репликации по типу катящегося кольца и рекомбинации, ассоциированной с трансформацией (от англ. transformation-associated recombination, TAR) [44–46] (рис. 3). Посредством первого метода мультимеризуют ДНК-димер, один мономер которого представляет собой последовательность альфа-сателлитной ДНК длиной примерно 170 п.н. из хромосомы 17 человека, содержащей *CENP-B-бокс* (необходимый для сборки кинето-

хорного комплекса), а другой мономер – это та же последовательность, но *CENP-B-бокс* в ней заменен на сайт *tetO*. Далее мультимеризованные повторы альфа-сателлитной ДНК и линейаризованный вектор для TAR-клонирования переносили в клетки дрожжей *Saccharomyces cerevisiae*, где ДНК-повторы рекомбинировали между собой. В результате этого события образовывались еще более длинные последовательности, которые встраивались в TAR-вектор, содержащий ген устойчивости к бластицидину [47–50]. Полученные конструкции переносили в клетки фибросаркомы человека линии HT1080, где они дополнительно мультимеризовались и образовывали кольцевые молекулы ДНК размером 1–2.5 млн п.н. Таким образом, основной последовательностью этих молекул была центромерная альфа-сателлитная ДНК. Показано, что полученные генетические конструкции стабильны и ведут себя в клетках как самостоятельные генетические элементы, т.е. представляют собой ИХЧ [51, 52]. Чтобы производить дальнейшие генетические манипуляции, клетки линии HT1080, содержащие полученную ИХЧ, сливали с клетками линии DT-40, которая часто используется для проведения гомологичной рекомбинации генетических элементов. В результате образовывалась ИХЧ со встроенным сайтом *loxP* и 5'-фрагментом гена *HPRT*. С помощью процедуры ММСТ (см. ниже) ИХЧ переносили в мутантные по гену *HPRT* клетки яичника китайского хомячка линии CHO. В эти клетки с помощью Cre-опосредованной рекомбинации по сайту *loxP* можно встраивать желаемый трансген. С этой целью такой трансген с его регуляторными последовательностями и фланкирующими инсуляторами встраивают в ИХЧ вместе с 3'-фрагментом гена *HPRT* (рис. 3).

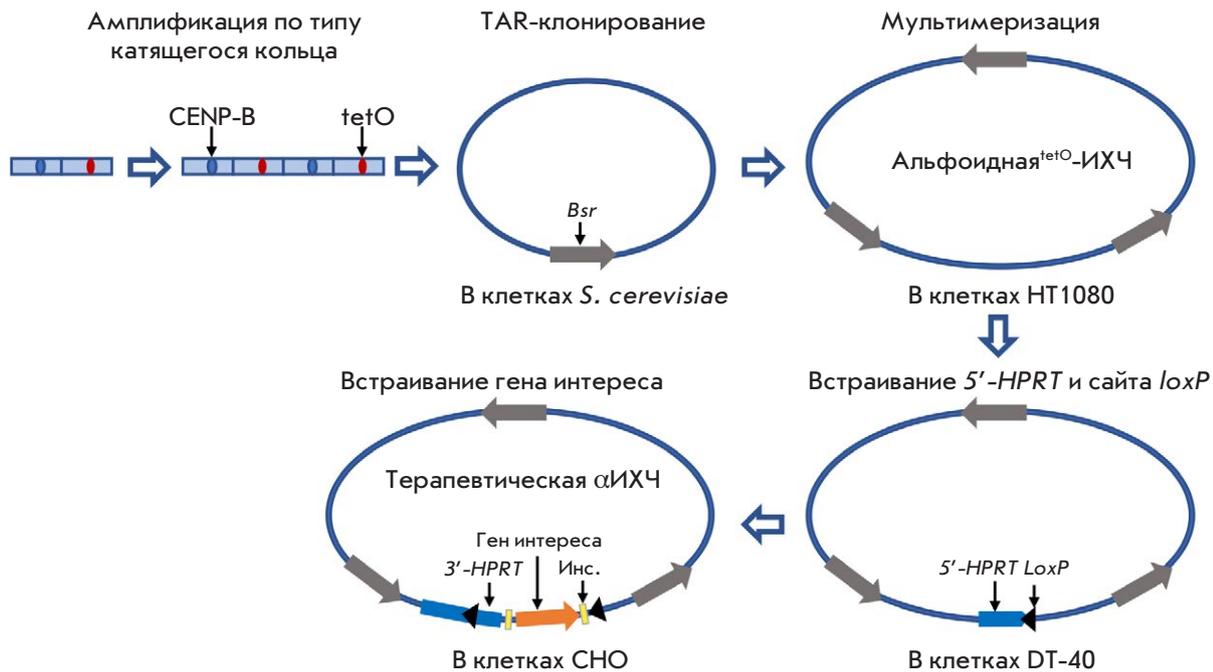


Рис. 3. Схема сборки альфоидной^{tetO}-ИХЧ. На первом этапе синтезируют димер, состоящий из двух единиц, одна из которых представляет собой альфа-сателлитный повтор из центромерного участка 17-й хромосомы человека, длиной 170 п.н., содержащий *CENP-B*-бокс (синий овал), а вторая – такой же повтор, у которого *CENP-B*-бокс заменен на тетрациклиновый оператор (*tetO* – красный овал). После амплификации такого димера по методу катящегося кольца образуется фрагмент длиной до 10 т.п.н. Затем в дрожжевых клетках осуществляется TAR-клонирование полученных фрагментов, в результате чего образуется кольцевая конструкция размером около 50 т.п.н., содержащая ген устойчивости к бластицидину (*Bsr*, серая стрелка). Мультимеризация кольцевой конструкции происходит в клетках линии HT1080, в результате чего образуется альфоидная^{tetO}-ИХЧ размером 1.1 млн п.н. Встраивание сайта *loxP* в ИХЧ происходит после слияния клеток HT1080 с клетками DT-40 (черная стрелка). Альфоидную^{tetO}-ИХЧ переносят в клетки линии CHO, в которых производят «загрузку» гена интереса (оранжевая стрелка) вместе с фланкирующими инсуляторными последовательностями (желтые прямоугольники) и 3'-фрагментом гена *HPRT* (синяя линия). Перенос альфоидной^{tetO}-ИХЧ в клетки-мишени осуществляют с помощью метода ММСТ

Таким образом, при корректной вставке трансгена в ИХЧ ген *HPRT* восстанавливается, что позволяет отбирать целевые клоны в присутствии НАТ (hypoxanthine-aminopterin-thymidine). Следует отметить, что наличие в альфоидных^{tetO}-ИХЧ сайтов *tetO* позволяет, при необходимости, удалять такие хромосомы в процессе клеточного деления. Для этого в клетках экспрессируют TetR-репрессоры, которые связывают *TetO*, репрессируют центромерный хроматин и тем самым ингибируют формирование кинетохорных комплексов [18, 52–54].

С помощью альфоидных^{tetO}-ИХЧ в клетки-мишени перенесли полноразмерные гены, содержащие свои *cis*-регуляторные последовательности, а затем показали стабильную экспрессию этих генов [19, 54–56]. В проведенных нами исследованиях GFP-экспрессирующие альфоидные^{tetO}-ИХЧ были перенесены в ЭСК мыши. Полученные с использованием этих клеток тератомы и химерные мыши

стабильно поддерживали эту ИХЧ и экспрессировали GFP в дифференцированных потомках ЭСК [57]. Альфоидная^{tetO}-ИХЧ была успешно перенесена нами также в ИПСК человека, которые сохраняли в присутствии этой ИХЧ плюрипотентные свойства [58]. Таким образом, мы показали, что внедрение альфоидных^{tetO}-ИХЧ не влияет на плюрипотентные свойства клеток мыши и человека. Наконец, нами была создана экспрессирующая фактор свертываемости крови VIII альфоидная^{tetO}-ИХЧ, которая может в дальнейшем использоваться для разработки комбинированных генно-терапевтических и клеточных методов лечения гемофилии А [56].

ИХЧ на основе искусственных хромосом бактерий и дрожжей

Первая работа по сборке ИХЧ на основе искусственных хромосом дрожжей (ИХД, англ. yeast artificial chromosome) была проведена в 1998 году

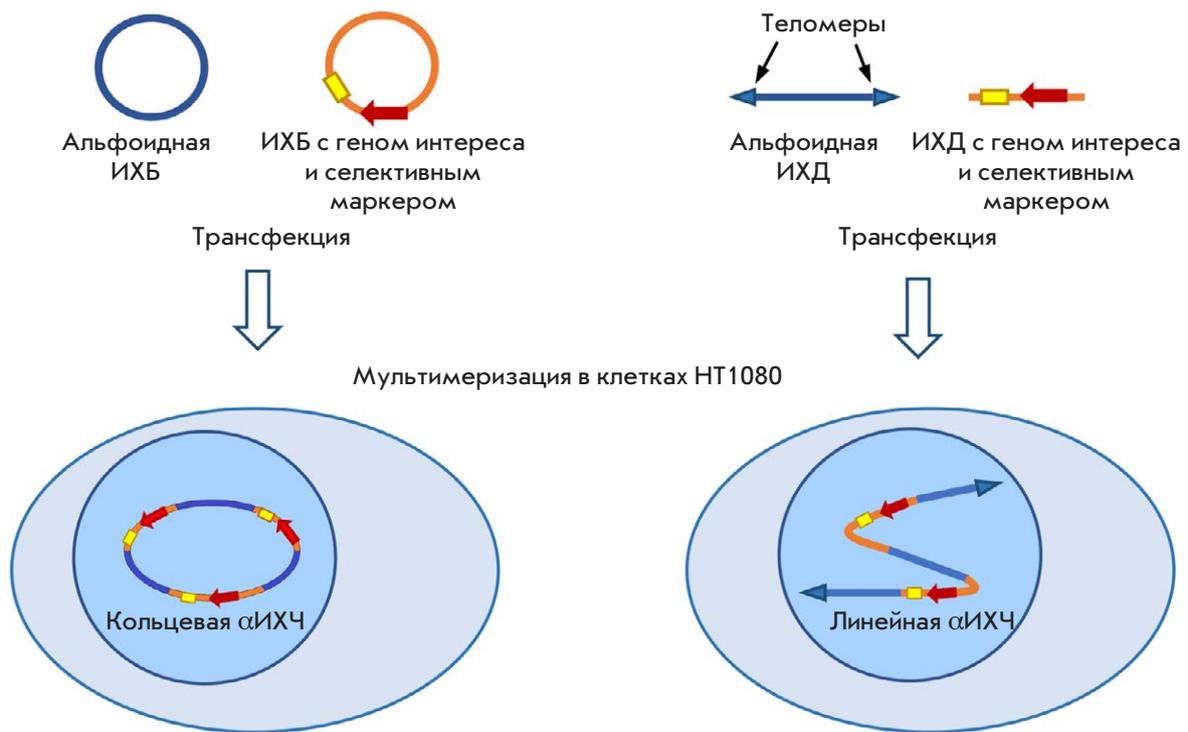


Рис. 4. Схема сборки ИХЧ на основе искусственных хромосом бактерий (ИХБ) и дрожжей (ИХД). На основе кольцевых ИХБ или линейных ИХД собирают два вектора, один из которых содержит альфоидную ДНК, а другой – целевой ген. В клетках линии HT1080 после котрансфекции этими конструкциями в результате рекомбинации и мультимеризации образуются кольцевые или линейные альфоидные ИХЧ (α ИХЧ)

[59]. В ИХД клонировали центромерную последовательность ДНК хромосомы 21 человека длиной около 100 т.п.н., содержащую мультиплицированные последовательности связывания белка CENP-B (*CENP-B-боксы*). Полученную конструкцию модифицировали в дрожжевых клетках, удалив дистальные участки и заменив их теломерными участками хромосом человека. Дополнительно встроили селективные маркеры, после чего конструкции перенесли с помощью липофекции в линию клеток фибросаркомы человека HT1080 (рис. 4). В этих клетках происходила дальнейшая мультимеризация ИХД, в результате чего образовывались ИХЧ длиной до 5 млн п.н., которые были стабильны в клетках линии HT1080 и устойчиво наследовались в ходе клеточных делений [13].

В дальнейшем оказались успешными попытки получения ИХЧ на основе ИХБ [60] (рис. 4). При таком подходе клетки HT1080 котрансфицировали ИХБ, содержащей центромерные участки хромосомы 21 человека, и последовательностями, включающими полноразмерные гены и их регуляторные элементы. В этих клетках происходила рекомбинация между внесенными молекулами ДНК с их последующей мультимеризацией. В результате

формировались кольцевые ИХЧ, которые стабильно реплицировались, наследовались дочерними клетками и поддерживали экспрессию целевых генов. Показано, что кольцевые ИХЧ, собранные с помощью ИХБ, а также линейные ИХЧ, собранные с помощью ИХД, могут успешно переноситься в ЭСК мыши. После инъекции таких клеток в бластоцисты получены химерные животные; в дифференцированных клетках-потомках ЭСК стабильно поддерживалась как сама ИХЧ, так и экспрессия внесенного с ней трансгена [60].

В 2009 году с помощью рассматриваемого подхода получена ИХЧ, несущая элементы, необходимые для ее использования в качестве экспрессионной векторной системы и включающие последовательность для сайт-специфической рекомбинации, селективный маркер, транскрипционные инсультаторы [61]. На основе данной ИХЧ разработаны также векторные конструкции с различными сайтами для сайт-специфической рекомбинации [62]. ИХЧ рассматриваемого типа использовали для решения ряда задач. С ее помощью осуществлен перенос кластера генов глобинов в клетки линии K562 [63], обеспечена иммортализация клеток [13, 64], получена трансгенная модель синдрома Дауна на мышах

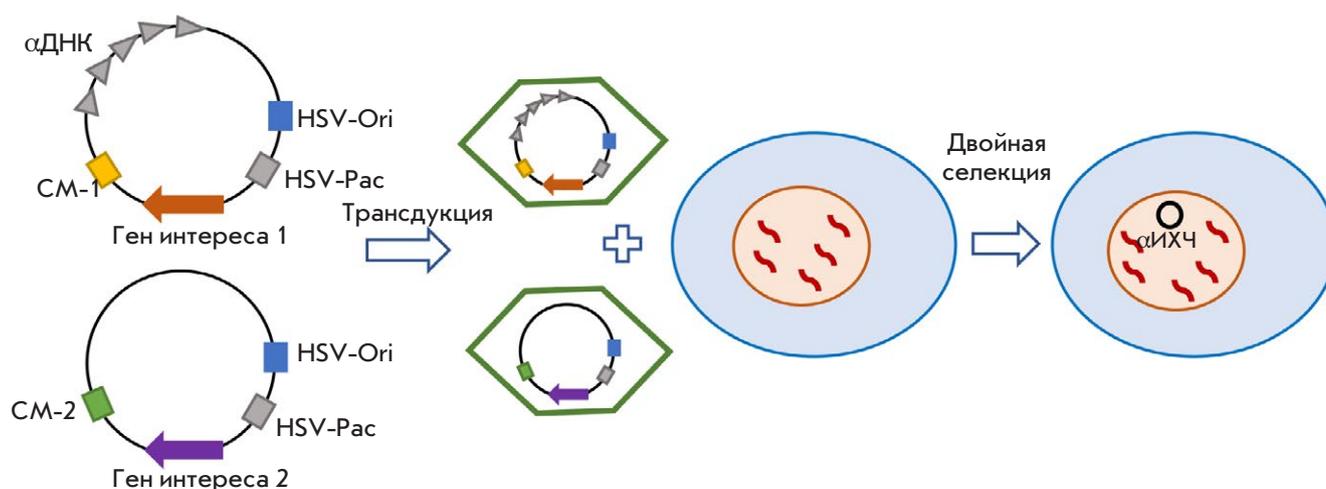


Рис. 5. Схема сборки ИХЧ с помощью ампликонов HSV-1. На основе ампликонов вируса простого герпеса (HSV-1) сконструированы два вектора, один из которых содержал вирусные сигналы – ориджин репликации (*Ori*), сигнал упаковки в вирусный капсид (*Pac*), селективные маркеры (СМ-1 и 2) и целевые гены. Второй вектор содержал последовательность длиной 120 т.п.н., состоящую из альфа-сателлитных повторов 17-й хромосомы человека (α ДНК). Полученными вирусами совместно трансдуцировали клетки-мишени. В ходе двойной селекции отбирали клетки, в которых в результате рекомбинации происходит объединение двух векторных конструкций с образованием целевой альфоидной ИХЧ (α ИХЧ)

[65], найден генетический элемент, обеспечивающий сайленсинг гена *HLA-G* в большинстве тканей [66]. Наконец, подтверждена возможность переноса данной ИХЧ в ИПСК человека, что указывает на ее перспективность в генной терапии [67].

ИХЧ на основе ампликона HSV-1

Предложен уникальный способ сборки ИХЧ с помощью вектора на основе ампликона вируса простого герпеса типа 1 (HSV-1, Herpes Simplex Virus-1) непосредственно в клетках млекопитающих [68]. Такой вектор несет сигнал *Pac*, необходимый для его сборки в вирусный капсид, а также сайт ордигина репликации вируса – *OriS* [69]. Чтобы получить необходимое для трансфекции количество вектора и упаковать его в вирусный капсид, вектор с трансгеном и две дополнительные генетические конструкции котрансфицировали в линию клеток зеленой мартышки. Эти дополнительные конструкции представляли собой экспрессионные векторы, один из которых содержал большинство генов HSV-1, необходимых для сборки вирусного капсида и упаковки в него вирусной ДНК. Другой вектор содержал ген *ICP27*, необходимый для регуляции экспрессии вирусных генов. Обе вспомогательные конструкции были лишены сигналов *Pac* и *OriS*, что не позволяло им реплицироваться и упаковываться в вирусный капсид. Векторы на основе вирусного ампликона способны вмещать трансген длиной до 152 т.п.н. [70, 71].

Для сборки ИХЧ, в ИХБ, содержащую сигналы *OriS* и *Pac*, вносили центромерные последовательности хромосом 17 и 21 человека, а также целевой ген и селективные маркеры [68]. Этот вектор переносили в клетки зеленой мартышки вместе с двумя вспомогательными плазмидами, в результате чего происходила наработка вектора и его упаковка в вирусный капсид, которым затем трансдуцировали клетки человека (рис. 5). Показано, что полученная генетическая конструкция ведет себя как ИХЧ, поддерживаясь в процессе клеточного деления и обеспечивая стабильную экспрессию трансгена. Также установлено, что для обеспечения митотической стабильности ИХЧ достаточно альфа-сателлитной последовательности в векторе длиной 40 т.п.н. Учитывая, что максимальная емкость векторов на основе HSV-1 составляет 152 т.п.н., а длина центромерного участка равна приблизительно 42 т.п.н., в рассматриваемую ИХЧ можно встраивать целевой трансген длиной до 110 т.п.н. Важным указанием на то, что ИХЧ, сконструированная на основе репликона HSV-1, может быть в перспективе использована в клеточной терапии, стал ее успешный перенос в ЭСК [72] и ИПСК [73] человека.

Недавно был усовершенствован метод сборки ИХЧ рассматриваемого типа. Клетки человека трансдуцировали двумя различными векторами, один из которых содержал альфа-сателлитную последовательность хромосомы 17 человека, а другой – целевые гены [73]. После попадания таких

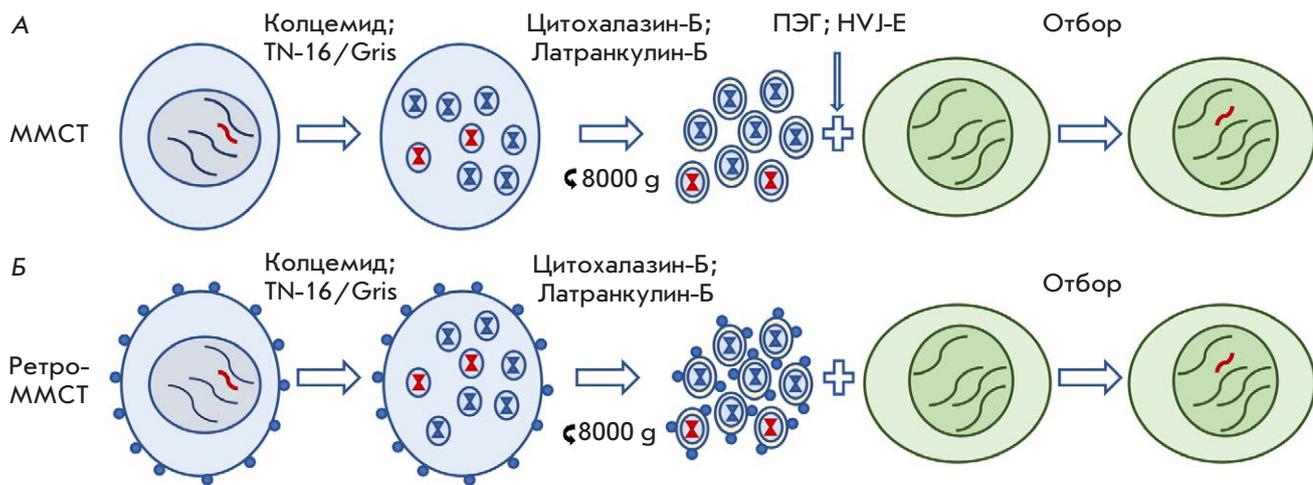


Рис. 6. Методы переноса ИХЧ из донорских клеток в реципиентные с помощью метода ММСТ. Донорские клетки изображены голубыми овалами, а реципиентные – зелеными овалами. ИХЧ обозначена красным цветом. А – оригинальный метод ММСТ. На первом этапе клетки обрабатывают колцемидом или цитостатиками TN-16 и гризеофульвином (Gris) для образования метафазных микроядер. После обработки цитохалазином-Б или латранкулином-Б собирают фракцию микроклеток с помощью центрифугирования и фильтрации. Микроклетки сливают с клетками-реципиентами с использованием ПЭГ или оболочек вируса НVJ-Е. Клетки, содержащие ИХЧ, отбирают на селективной среде. Б – метод ретро-ММСТ, в котором клетки-доноры предварительно трансдуцируют лентивирусами, кодирующими белок MLV (показан синими кружками на поверхности донорских клеток)

векторных конструкций в ядро клетки между ними происходила рекомбинация, образовывалась стабильная ИХЧ, размер которой был в 2 раза больше первоначальной (рис. 5). Таким образом, с помощью указанного подхода можно осуществлять перенос трансгенов длиной до 260 т.п.н. [11].

Способы переноса ИХЧ в целевые клетки

Основным способом переноса ИХЧ и других векторов, размер которых превышает 1 млн п.н., является метод ММСТ (microcell-mediated chromosome transfer), позволяющий переносить данные векторы от клеток-доноров в целевые клетки с помощью так называемых микроклеток (рис. 6А) [74]. В клетках-донорах инициируют образование «микроядер», представляющих собой отдельные хромосомы, окруженные ядерной оболочкой. Для этого клетки-доноры инкубируют с цитостатическими агентами – колцемидом [75] или гризеофульвином совместно с TN-16 [76, 77], вызывающими остановку клеточного цикла на стадии метафазы. В качестве клеток-доноров используют А9 (клетки подкожной клетчатки мыши) или СНО [8]. Клетки-доноры затем фрагментируют на микроклетки путем обработки блокаторами сборки актиновых филаментов (цитохалазин-Б [75] или латранкулин-Б [76, 77]) с последующим длительным центрифугированием. Фракцию «микроклеток» выделяют

с помощью фильтрации [75] или фракционирования в градиенте перкола [60]. «Микроклетки» затем сливают с клетками-мишенями с помощью полиэтиленгликоля (ПЭГ) [75] или с помощью липидных оболочек японского гемагглютинирующего вируса (НVJ-Е) [23, 56, 57]. Улучшенную по сравнению с оригинальным методом эффективность показал метод «ретро-ММСТ» (рис. 6Б), основанный на использовании белка оболочки вируса лейкемии мышей (MLV, murine leukemia virus). Белок MLV опосредует связывание несущих его микроклеток с белком плазмалеммы, который присутствует на поверхности практически всех типов клеток млекопитающих, увеличивая таким образом эффективность слияния клеток с микроклетками [78]. Используя этот вариант ММСТ, альфоидную^{tetO}-ИХЧ успешно перенесли в ИПСК человека [58]. Важно отметить, что можно совмещать различные модификации ММСТ на разных его стадиях, тем самым добиваясь повышения эффективности переноса ИХЧ [12, 56, 58, 77]. Клетки, содержащие целевую ИХЧ, выявляют с помощью культивирования в присутствии антибиотиков, резистентность к которым привносится вместе с ИХЧ (бластицидином, G418 и др.).

Помимо метода ММСТ, существуют и методы переноса ИХЧ без использования микроклеток. Так, в методе MWCF (Micronucleated Whole Cell

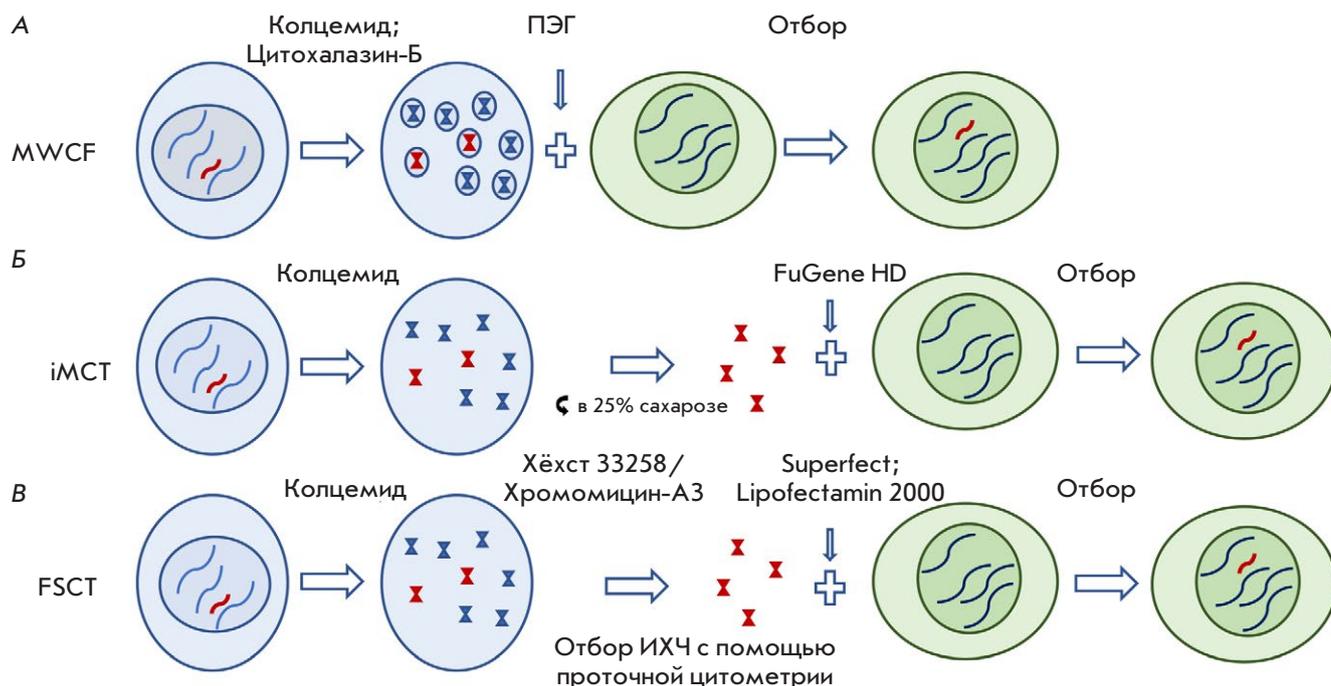


Рис. 7. Методы переноса ИХЧ без использования микроклеток. А – метод MWCF – слияние донорских клеток с клетками-реципиентами. Б – метод iMCT – трансфекция изолированных хромосом в целевые клетки с помощью липофекции. После обработки колцемидом донорские клетки лизируют и выделенные на градиенте сахарозы ИХЧ переносят в клетки-реципиенты с помощью реактива FuGene HD. В – в методе FSCT окрашенные Хёхст 33258 и хромомицином-А3 ИХЧ обогащают с помощью проточной цитофлуориметрии и трансфицируют в клетки-мишени с помощью липофекции

Fusion) клетки-доноры сливают с клетками-мишенями с использованием ПЭГ после последовательного воздействия колцемидом и цитохалазином-Б [79]. Метод разработан для переноса ИХЧ из клеток, неустойчивых к длительному воздействию цитостатиков. Преимуществом метода является высокая (в сравнении с ММСТ) эффективность и простота в исполнении. Однако существенный недостаток данного метода состоит в использовании для слияния клеток разных видов лабораторных животных. Метод iMCT (isolated Metaphase Chromosome Transfer) позволяет осуществлять перенос ИХЧ из клеток-доноров, неспособных к образованию микроядер. В этом методе ИХЧ выделяют из лизата клеток, предварительно обработанных колцемидом, используя разделение в градиенте концентрации сахарозы [80]. С помощью липофекции полученные ИХЧ трансфицируют в клетки-мишени. Этот метод не нашел широкого применения в связи с низкой эффективностью. Наконец, метод FSCT (Flow Sorted Chromosome Transfer), разработанный для ИХЧ, содержащих С-Г-богатые последовательности. В этом случае ИХЧ выделяют с помощью проточной цитофлуо-

риметрии после их обработки красителями Хёхст 33258 и хромомицином-А3 (рис. 7В). Выделенные ИХЧ затем трансфицируют в целевые клетки с помощью липофекции [37, 81].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

На сегодняшний день ИХЧ рассматриваются как многообещающие экспрессионные векторные системы. Уникальным свойством ИХЧ является их инертность и автономность в геноме клеток-мишеней, а также способность переносить трансгены большого размера. Эти свойства генетических векторов на основе ИХЧ востребованы во многих областях современной биологии и медицины. С помощью ИХЧ разработаны подходы к репрограммированию клеток в ИПСК, созданы трансгенные животные, разработаны экспериментальные модели лечения генетических заболеваний. ИХЧ активно используются также в изучении функций хромосом и хромосомной нестабильности.

Однако, несмотря на большую востребованность ИХЧ, очевидно, что требуется значительное совершенствование технологии их получения и методов переноса для внедрения и широкого применения

в лабораторной практике и биомедицине. В первую очередь, довольно трудоемким и низкоэффективным является процесс переноса ИХЧ в реципиентные клетки. Успешная оптимизация методов переноса ИХЧ в реципиентные клетки повысит востребованность данных генетических векторов в исследовательских и терапевтических приложениях. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке Санкт-Петербургского государственного университета в рамках научного проекта № 93024558, гранта Российского научного фонда № 20-14-00242 и Соглашения № 075-15-2021-1075 с Минобрнауки от 28.09.2021.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Bouard D., Alazard-Dany N., Cosset F.L. // *Brit. J. Pharmacol.* 2009. V. 157. № 2. P. 153–165.
- Ghosh S., Brown A.M., Jenkins C., Campbell K. // *Appl. Biosafety.* 2020. V. 25. № 1. P. 7–18.
- Lundstrom K. // *Genes (Basel).* 2019. V. 10. № 3. P. 1–15.
- Hackett P.B., Largaespada D.A., Cooper L.J. // *Mol. Therapy.* 2010. V. 18. № 4. P. 674–683.
- Ivics Z., Izsvák Z. // *Mob. DNA.* 2010. V. 1. № 25. P. 1–15.
- Skipper K.A., Andersen P.R., Sharma N., Mikkelsen J.G. // *J. Biomed. Sci.* 2013. V. 20. № 1. P. 92.
- Blanc F., Mondain M., Bemelmans A.-P., Affortit C., Puel J.-L., Wang J. // *J. Clin. Med.* 2020. V. 9. № 2. P. 589.
- Oshimura M., Kazuki Y., Iida Y., Uno N. // *eLS.* 2013. P. 1–12.
- Kouprina N., Larionov V. // *Chromosome Res.* 2015. V. 23. № 1. P. 1–5.
- Katona R.L. // *Chromosome Res.* 2015. V. 23. № 1. P. 143–157.
- Moralli D., Monaco Z.L. // *Exp. Cell Res.* 2020. V. 390. № 1. P. 111931.
- Sinenko S.A., Ponomartsev S.V., Tomilin A.N. // *Exp. Cell Res.* 2020. V. 389. № 1. P. 111882. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32017931>
- Ikeno M., Hasegawa Y. // *Exp. Cell Res.* 2020. V. 390. № 1. P. 111793. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31874174>
- Kazuki Y., Oshimura M. // *Mol. Therapy.* 2011. V. 19. № 9. P. 1591–1601. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/21750534>
- Koi M., Shimizu M., Morita H., Yamada H., Oshimura M. // *Jpn. J. Cancer Res.* 1989. V. 80. № 5. P. 413–418. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/2502516>
- Katoh M., Ayabe F., Norikane S., Okada T., Masumoto H., Horike S., Shirayoshi Y., Oshimura M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2004. V. 321. № 2. P. 280–290. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/15358173>
- Suzuki N., Nishii K., Okazaki T., Ikeno M. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 36. P. 26615–26623. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/16837455>
- Iida Y., Kim J.H., Kazuki Y., Hoshiya H., Takiguchi M., Hayashi M., Erliandri I., Lee H.S., Samoshkin A., Masumoto H., et al. // *DNA Res.* 2010. V. 17. № 5. P. 293–301. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20798231>
- Sinenko S.A., Ponomartsev S.V., Tomilin A.N. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2021. V. 78. № 4. P. 1207–1220.
- Farr C.J., Stevanovic M., Thomson E.J., Goodfellow P.N., Cooke H.J. // *Nat. Genet.* 1992. V. 2. № 4. P. 275–282.
- Kuroiwa Y., Tomizuka K., Shinohara T., Kazuki Y., Yoshida H., Ohguma A., Yamamoto T., Tanaka S., Oshimura M., Ishida I. // *Nat. Biotechnol.* 2000. V. 18. № 10 SUPPL. P. 1086–1090.
- Kazuki Y., Hiratsuka M., Takiguchi M., Osaki M., Kajitani N., Hoshiya H., Hiramatsu K., Yoshino T., Kazuki K., Ishihara C., et al. // *Mol. Therapy.* 2010. V. 18. № 2. P. 386–393.
- Yamaguchi S., Kazuki Y., Nakayama Y., Nanba E., Oshimura M., Ohbayashi T. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 2. P. 1–11.
- Takiguchi M., Kazuki Y., Hiramatsu K., Abe S., Iida Y., Takehara S., Nishida T., Ohbayashi T., Wakayama T., Oshimura M. // *ACS Synthetic Biol.* 2012. V. 3. № 12. P. 903–914.
- Buerstedde J.M., Takeda S. // *Cell.* 1991. V. 67. № 1. P. 179–188.
- Kazuki Y., Hoshiya H., Takiguchi M., Abe S., Iida Y., Osaki M., Katoh M., Hiratsuka M., Shirayoshi Y., Hiramatsu K., et al. // *Gene Therapy.* 2011. V. 18. № 4. P. 384–393.
- Tedesco F.S., Gerli M.F.M., Perani L., Benedetti S., Ungaro F., Cassano M., Antonini S., Tagliafico E., Artusi V., Longa E., et al. // *Sci. Translat. Med.* 2012. V. 4. № 140. P. 1–13.
- Benedetti S., Uno N., Hoshiya H., Ragazzi M., Ferrari G., Kazuki Y., Moyle L.A., Tonlorenzi R., Lombardo A., Chaouch S., et al. // *EMBO Mol. Med.* 2018. V. 10. № 2. P. 254–275.
- Yakura Y., Ishihara C., Kurosaki H., Kazuki Y., Komatsu N., Okada Y., Doi T., Takeya H., Oshimura M. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2013. V. 431. № 2. P. 336–341.
- Hiratsuka M., Uno N., Ueda K., Kurosaki H., Imaoka N., Kazuki K., Ueno E., Akakura Y., Katoh M., Osaki M., et al. // *PLoS One.* 2011. V. 6. № 10. P. 1–14.
- Lindenbaum M., Perkins E., Csonka E., Fleming E., Garcia L., Greene A., Gung L., Hadlaczy G., Lee E., Leung J., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2004. V. 32. № 21. P. 1–15.
- Csonka E. // *Mammal. Chromosome Engin.: Meth. Protocols, Meth. Mol. Biol.* 2011. V. 738. P. 141–149.
- Holló G., Kereső J., Praznovszky T., Cserpán I., Fodor K., Katona R., Csonka E., Fátyol K., Szeles A., Szalay A.A., et al. // *Chromosome Res.* 1996. V. 4. № 3. P. 240–247.
- Vanderbyl S., MacDonald G.N., Sidhu S., Gung L., Telenius A., Perez C., Perkins E. // *STEM CELLS.* 2004. V. 22. № 3. P. 324–333.
- Vanderbyl S.L., Sullenbarger B., White N., Perez C.F., MacDonald G.N., Stodola T., Bunnell B.A., Ledebur H.C., Lasky L.C. // *Exp. Hematol.* 2005. V. 33. № 12. P. 1470–1476.
- Kennard M.L., Goosney D.L., Monteith D., Roe S., Fischer D., Mott J. // *Biotechnol. Bioengin.* 2009. V. 104. № 3. P. 526–539.
- de Jong G., Telenius A., Vanderbyl S., Meitz A., Drayer J. // *Chromosome Res.* 2001. V. 9. № 6. P. 475–485. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/11592482>
- Co D.O., Borowski A.H., Leung J.D., van der Kaa J., Hengst S., Platenburg G.J., Pieper F.R., Perez C.F., Jirik F.R., Drayer J.I. // *Chromosome Res.* 2000. V. 8. № 3. P. 183–191.
- Blazso P., Sinko I., Katona R.L. // *Meth. Mol. Biol.* 2011. V. 738. № 2. P. 161–181.
- Katona R.L., Sinkó I., Holló G., Szucs K.S., Praznovszky T., Kereső J., Csonka E., Fodor K., Cserpán I., Szakál B., et al. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. V. 65. № 23. P. 3830–3838.
- Mehta G.D., Agarwal M.P., Ghosh S.K. // *Mol. Genet. Genom.* 2010. V. 284. № 2. P. 75–94.

42. Neil D.L., Villasante A., Fisher R.B., Vetric D., Cox B., Tyler-Smit C. // *Nucl. Acids Res.* 1990. V. 18. № 6. P. 1421–1428.
43. Harrington J.J., Van Bokkelen G., Mays R.W., Gustashaw K., Willard H.F. // *Nat. Genet.* 1997. V. 15. № 4. P. 345–355.
44. Kouprina N., Larionov V. // *Curr. Protocols Hum. Genet.* 2006. Chapter 5:Unit 5.17. doi: 10.1002/0471142905.hg0517s49.
45. Larionov V., Kouprina N., Graves J., Resnick M.A. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1996. V. 93. № 24. P. 13925–13930. <https://doi.org/10.1073/pnas.93.24.13925>
46. Kouprina N., Larionov V. // *Chromosoma.* 2016. V. 125. № 4. P. 621–632. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27116033>
47. Ebersole T., Okamoto Y., Noskov V.N., Kouprina N., Kim J.H., Leem S.H., Barrett J.C., Masumoto H., Larionov V. // *Nucl. Acids Res.* 2005. V. 33. № 15. P. 1–8.
48. Kouprina N., Larionov V. // *Mol. Ther. Methods Clin. Dev.* 2019. V. 14. P. 16–26. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/31276008>
49. Kouprina N., Kim J., Larionov V. // *Curr. Protocols.* 2021. V. 1. № 8. P. 1–27.
50. Kouprina N., Lee N.C.O., Kononenko A.V., Samoshkin A., Larionov V. // *Methods Mol. Biol.* 2015. V. 1227. P. 3–26. https://doi.org/10.1007/978-1-4939-1652-8_1
51. Nakano M., Cardinale S., Noskov V.N. // *Chemtracts.* 2008. V. 21. № 3. P. 87–88.
52. Kouprina N., Earnshaw W.C., Masumoto H., Larionov V. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2013. V. 70. № 7. P. 1135–1148.
53. Kononenko A.V., Lee N.C., Liskovykh M., Masumoto H., Earnshaw W.C., Larionov V., Kouprina N. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. № 9. P. 1–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25712097>
54. Lee N.C.O., Petrov N.S., Larionov V., Kouprina N. // *Curr. Protocols.* 2021. V. 1. № 12. P. 1–36.
55. Kim J.H., Kononenko A., Erliandri I., Kim T.A., Nakano M., Iida Y., Barrett J.C., Oshimura M., Masumoto H., Earnshaw W.C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2011. V. 108. № 50. P. 20048–20053.
56. Ponomartsev S.V., Sinenko S.A., Skvortsova E.V., Liskovykh M.A., Voropaev I.N., Savina M.M., Kuzmin A.A., Kuzmina E.Y., Kondrashkina A.M., Larionov V., et al. // *Cells.* 2020. V. 9. № 4. P. 1–17. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/32260189>
57. Liskovykh M., Ponomartsev S., Popova E., Bader M., Kouprina N., Larionov V., Alenina N., Tomilin A. // *Cell Cycle.* 2015. V. 14. № 8. P. 1268–1273. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/25695642>
58. Sinenko S.A., Skvortsova E.V., Liskovykh M.A., Ponomartsev S.V., Kuzmin A.A., Khudiakov A.A., Malashicheva A.B., Alenina N., Larionov V., Kouprina N., et al. // *Cells.* 2018. V. 7. № 12. P. 1–14. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/30544831>
59. Ikeno M., Grimes B., Okazaki T., Nakano M., Saitoh K., Hoshino H., McGill N.I., Cooke H., Masumoto H. // *Nat. Biotechnol.* 1998. V. 16. № 5. P. 431–439.
60. Suzuki N., Nishii K., Okazaki T., Ikeno M. // *J. Biol. Chem.* 2006. V. 281. № 36. P. 26615–26623.
61. Ikeno M., Suzuki N., Hasegawa Y., Okazaki T. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 37. № 6. P. 1–9.
62. Suzuki E., Nakayama M. // *Nucl. Acids Res.* 2011. V. 39. № 8. P. 1–11.
63. Suzuki N., Itou T., Hasegawa Y., Okazaki T., Ikeno M. // *Nucl. Acids Res.* 2009. V. 38. № 5. P. 1–9.
64. Ito M., Ito R., Yoshihara D., Ikeno M., Kamiya M., Suzuki N., Horiguchi A., Nagata H., Yamamoto T., Kobayashi N., et al. // *Cell Transplant.* 2008. V. 17. № 1–2. P. 165–171. <https://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/18468246>
65. Miyamoto K., Suzuki N., Sakai K., Asakawa S., Okazaki T., Kudoh J., Ikeno M., Shimizu N. // *Transgenic Res.* 2014. V. 23. № 2. P. 317–329.
66. Ikeno M., Suzuki N., Kamiya M., Takahashi Y., Kudoh J., Okazaki T. // *Nucl. Acids Res.* 2012. V. 40. № 21. P. 10742–10752.
67. Hasegawa Y., Ikeno M., Suzuki N., Nakayama M., Ohara O. // *Biol. Meth. Protocols.* 2018. V. 3. № 1. P. 1–10.
68. Moralli D., Simpson K.M., Wade-Martins R., Monaco Z.L. // *EMBO Repts.* 2006. V. 7. № 9. P. 911–918.
69. Frenkel N. // *Curr. Gene Therapy.* 2006. V. 6. № 3. P. 277–299.
70. Wade-Martins R., Smith E.R., Tyminski E., Chiocca E.A., Saeki Y. // *Nat. Biotechnol.* 2001. V. 19. № 11. P. 1067–1070.
71. Zaupa C., Revol-Guyot V., Epstein A.L. // *Hum. Gene Therapy.* 2003. V. 14. № 11. P. 1049–1063.
72. Moralli D., Monaco Z.L. // *Chromosome Res.* 2015. V. 23. № 1. P. 105–110.
73. Chan D.Y., Moralli D., Wheatley L., Jankowska J.D., Monaco Z.L. // *Exp. Cell Res.* 2020. V. 388. № 2. P. 111840.
74. Doherty A.M., Fisher E.M. // *Mamm. Genome.* 2003. V. 14. № 9. P. 583–592. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/14629108>
75. Fournier R.E.K., Ruddle F.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1977. V. 74. № 1. P. 319–323.
76. Liskovykh M., Lee N.C., Larionov V., Kouprina N. // *Mol. Therapy – Meth. Clin. Dev.* 2016. V. 3. P. 1–9.
77. Liskovykh M., Larionov V., Kouprina N. // *Curr. Protocols.* 2021. V. 1. № 9. P. 1–25.
78. Suzuki T., Kazuki Y., Oshimura M., Hara T. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 6. P. e0157187. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/27271046>
79. Paulis M., Bensi M., Orioli D., Mondello C., Mazzini G., D’Incalci M., Falcioni C., Radaelli E., Erba E., Raimondi E., et al. // *Stem Cells.* 2007. V. 25. № 10. P. 2543–2550.
80. Suzuki N., Itou T., Hasegawa Y., Okazaki T., Ikeno M. // *Nucl. Acids Res.* 2010. V. 38. № 5. P. e33. <http://www.ncbi.nlm.nih.gov/pubmed/20007595>
81. Klobutcher L.A., Miller C.L., Ruddle F.H. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1980. V. 77. P. 3610–3614.

УДК 57.087

Репортерные трансгены для мониторинга противоопухолевой эффективности рекомбинантных онколитических вирусов

А. В. Семенова*, Г. Ф. Сиволобова, А. А. Гражданцева, А. П. Агафонов, Г. В. Кочнева

Государственный научный центр вирусологии и биотехнологии «Вектор», Кольцово, Новосибирская обл., 630559 Россия

*E-mail: tkacheva_av@mail.ru

Поступила в редакцию 16.05.2022

Принята к печати 05.07.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11719

РЕФЕРАТ Точное измерение размеров опухоли, включая локализацию ее края, имеет существенное значение для успешной онкотерапии. За последнее десятилетие увеличилось число доступных неинвазивных методов визуализации внутренних структур организма, среди которых оптическая визуализация с использованием нерадиоактивных субстратов, визуализация глубоких тканей с использованием радиоактивных субстратов, магнитно-резонансная томография. Важнейшую роль среди инструментов визуализации играют репортерные гены, экспрессия которых в опухолях и метастазах позволяет отслеживать динамику опухолевого процесса, а также эффективность терапии. В качестве вектора для доставки репортерных генов в опухолевые клетки часто выбирают онколитические вирусы, поскольку они обладают онкоспецифичностью, инфицируют и лизируют опухолевые клетки, практически не повреждая нормальные. Выбор репортерных трансгенов для генно-инженерной модификации онколитических вирусов зависит от задач исследования и методов визуализации. Оптические методы визуализации подходят для исследований *in vitro* и на мелких животных, методы визуализации глубоких тканей применяют для оценки виротерапии у крупных животных и человека. Для оптической визуализации используются трансгены флуоресцентных белков, люцифераз и тирозиназ; для визуализации глубоких тканей наиболее перспективным считается трансген симпортера йодида натрия (NIS), который обеспечивает накопление радиоактивных изотопов в инфицированных вирусом опухолевых клетках. В настоящее время NIS является единственным репортерным трансгеном, показавшим свою эффективность в мониторинге виротерапии опухолей не только в доклинических, но также и в клинических исследованиях.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА онколитические вирусы, репортерные трансгены, оптическая визуализация, опухолевая клетка, визуализация глубоких тканей, NIS.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ADV – аденовирус; HSV-1 – вирус простого герпеса типа I; MV – вирус кори; NDV – вирус болезни Ньюкасла; NIS – симпортер йодида натрия; VACV – вирус осповакцины; VSV – вирус везикулярного стоматита; КТ – компьютерная томография; МРТ – магнитно-резонансная томография; ОФЭКТ – однофотонная эмиссионная компьютерная томография; ПЭТ – позитронно-эмиссионная томография.

ВВЕДЕНИЕ

На сегодняшний день использование онколитических вирусов является одним из наиболее многообещающих направлений в лечении онкологических заболеваний. Большое преимущество онколитической виротерапии состоит в том, что онколитические вирусы способны специфически нацеливаться на опухолевые клетки и лизировать их, не повреждая при этом здоровую ткань, в течение всего курса лечения [1]. Онколитические вирусы преодолевают

гетерогенность клеток опухоли, они способны лизировать опухолевые стволовые клетки, которые практически не поддаются другим видам онкотерапии [2]. Иммуносупрессивное микроокружение опухоли, которое препятствует эффективной иммунотерапии, напротив, способствует репликации вируса, как и нарушение сигнальных путей интерфероновой защиты в опухолевых клетках [3]. При этом успешная репликация вируса в опухоли непреднамеренно делает опухоль более иммуногенной за счет испускаемых

инфицированными клетками патогенассоциированных сигналов опасности (PAMP, DAMP). При лизисе опухолевых клеток происходит также высвобождение опухолеассоциированных неоантигенов и формирование адаптивного Т-клеточного ответа на эти антигены [4]. Онколитические вирусы могут действовать синергично с другими противоопухолевыми препаратами, в частности, с ингибиторами контрольных точек (ипилимумаб, атезолизумаб, ниволумаб и др.) и CAR Т-клеточной терапией [1, 5, 6].

Онколитическими свойствами обладают как природные, так и генетически модифицированные штаммы вирусов разных таксономических групп. Встройка трансгенов позволяет направленно изменять свойства онколитических вирусов, усиливая их онкоспецифичность [7], способность к распространению внутри опухоли [8], иммуностимулирующую [9–11] и цитолитическую активность [12, 13]. Особое место в генетической модификации вирусов принадлежит трансгенам репортерных белков, которые могут использоваться для неинвазивного инструментального мониторинга противоопухолевой и антиметастатической активности вируса, а также его безопасности для других органов и тканей организма [14, 15].

Неинвазивные визуализирующие исследования имеют важнейшее значение в диагностике и ведении пациентов с онкологическими заболеваниями [16]. Эффективность противоопухолевой терапии напрямую зависит от того, насколько своевременно и точно будут выявлены опухолевые узлы и метастазы, а мониторинг реакции опухоли на терапию может помочь в выборе оптимальной схемы лечения. Поскольку экспрессия репортерного трансгена связана с вирусной репликацией, визуализация может использоваться в доклинических и клинических исследованиях в качестве раннего индикатора терапевтического действия онколитических вирусов [17]. Неинвазивная визуализация всего организма экспериментального животного в нескольких временных точках поможет оценить эффективность доставки вируса в интересующие ткани, а также позволит контролировать и количественно оценивать инфекцию и экспрессию терапевтических трансгенов на протяжении всего курса лечения.

Методы визуализации можно разделить на следующие категории: оптическая визуализация с использованием нерадиоактивных субстратов, визуализация глубоких тканей с использованием радиоактивных субстратов, магнитно-резонансная томография (рис. 1). В следующих разделах мы сосредоточимся на наиболее изученных репортерных трансгенах онколитических вирусов, используемых в разных методах неинвазивной визуализации.

ОПТИЧЕСКАЯ ВИЗУАЛИЗАЦИЯ

Оптическая визуализация основана на использовании света в инфракрасном, видимом или ультрафиолетовом спектре, поэтому она лучше всего подходит для визуализации поверхности, а не глубоких тканей. Методы оптической визуализации, применяемые для детекции репортерных трансгенов онколитических вирусов, включают флуоресцентную, биолюминесцентную и фотоакустическую визуализацию (рис. 1). Глубина возможной визуализации при использовании оптических методов варьирует в достаточно широких пределах – от долей миллиметра до нескольких сантиметров – и зависит как от выбранного метода, так и от поглощения и рассеяния возбуждающего и/или испускаемого света окружающими тканями.

Флуоресцентная визуализация

Для флуоресценции необходимо, чтобы падающий свет с соответствующей длиной волны возбуждения достиг флуорофора, в результате чего флуорофор испускает фотон с определенной длиной волны излучения. Испускаемые фотоны обнаруживают с помощью высокочувствительной CCD-камеры, установленной в светонепроницаемом боксе.

В качестве репортерных генов для флуоресцентной визуализации используются гены, кодирующие флуоресцентные белки, такие, как зеленый флуоресцентный белок (GFP) и его усиленные варианты, красный флуоресцентный белок (RFP), желтый флуоресцентный белок (YFP), mCherry и многие другие [18, 19].

GFP, впервые выделенный из медузы *Aequorea victoria* в 1960 г. [20], быстро стал одним из белков, наиболее широко изучаемых и используемых в биохимии и клеточной биологии [21]. Использование этого белка обусловлено его способностью генерировать хорошо видимый, эффективно излучающий внутренний флуорофор. Однако чувствительность репортерной системы GFP ограничена отсутствием усиления, поскольку каждая молекула GFP, продуцируемая репортерной системой, производит только один флуорофор. Подсчитано, что концентрация природных немодифицированных молекул GFP должна составлять 1 мкМ для того, чтобы сравняться с эндогенной аутофлуоресценцией типичной клетки млекопитающих [22]. Мутантные (усовершенствованные) GFP с улучшенными коэффициентами угасания увеличивают эффективность визуализации в 6–10 раз [23], что позволяет преодолевать ограничения, связанные с клеточной аутофлуоресценцией.

Наибольшую прозрачность ткани млекопитающих имеют в так называемом «ближнем инфракрасном окне прозрачности» (near-infrared, NIR)

($\lambda \sim 650\text{--}900$ нм) [24]. Поглощение света гемоглобином, водой, липидами и меланином минимально в ближней инфракрасной области спектра, поэтому свет NIR-диапазона обладает большей проникающей способностью, чем видимый свет. Кроме того, аутофлуоресценция биологических тканей и светорассеяние также существенно меньше в области NIR по сравнению с видимой областью. В настоящее время получают флуоресцентные белки, излучающие свет NIR-диапазона, с целью улучшения глубины флуоресценции *in vivo* [25]. Один из примеров таких белков – новые флуоресцентные белки ближнего инфракрасного диапазона (iRFP), разработанные на основе бактериальных фитохромных фоторецепторов [26]. Белки iRFP обеспечивают тканеспецифический контраст без необходимости доставки каких-либо дополнительных веществ. По сравнению с обычными GFP-подобными флуоресцентными белками с красным смещением iRFP670 и iRFP720 демонстрируют более сильные фотоакустические сигналы на более длинных волнах, их можно спектрально отличить как друг от друга, так и от гемоглобина. Кроме того, для образования хромофоров белкам iRFP670 и iRFP720 не требуется кислород, что дает им преимущество при визуализации опухолей, для которых характерно состояние гипоксии [27, 28].

Сконструирован ряд рекомбинантных онколитических вирусов, включая вирус болезни Ньюкасла (NDV), вирус везикулярного стоматита (VSV), вирус простого герпеса I типа (HSV-1, в новой таксономии вирусов – *Human alphaherpesvirus 1*), вирус кори (MV), аденовирус (ADV) и вирус осповакцины (VACV), кодирующих трансгены флуоресцентных белков. Эти вирусы с целью непосредственной оценки эффективности вирусной онкотерапии протестировали на различных модельных опухолях, а также использовали в качестве дополнительного контроля для оценки эффектов других технологий визуализации [29–31]. Один из онколитических вирусов, а именно вирус осповакцины, кодирующий трансген GFP (GLV-1h68), в настоящее время проходит фазы I и II клинических исследований, в которых флуоресценция GFP используется для подтверждения локализации вируса в поверхностных опухолевых поражениях, а также в биопсийном материале внутренних опухолей (табл. 1) [32].

Группа японских ученых использовала онколитический аденовирус, экспрессирующий трансген GFP (штамм ОВР-401), с целью изучения новой технологии хирургии под флуоресцентным контролем (Fluorescence-guided surgery, FGS) для точной навигации опухоли у мышей [33]. Известно, что хирургическая резекция по-прежнему остается наиболее

эффективным методом при большинстве солидных опухолей, однако даже при радикальном удалении злокачественных опухолей часто возникают рецидивы, что в ряде случаев может быть обусловлено сложностью правильной визуализации края опухоли [34, 35]. Предварительное введение флуоресцирующего онколитического вируса может обеспечить интраоперационный флуоресцентный контроль в режиме реального времени и идеально подходит для точного и полного удаления злокачественных клеток, а также позволяет дополнительно уменьшить область резекции за счет лизиса опухоли. Kishimoto и соавт. использовали ОВР-401 для резекции методом FGS ксенотрансплантата глиобластомы человека в ортотопической мышинной модели. Показано, что использование флуоресцирующего онколитического вируса способно обеспечить точную резекцию глиобластомы с нечетким контуром методом FGS с сохранением функции головного мозга и отсутствием рецидивов в течение более 120 дней, в то время как у 85% мышей с опухолью, удаленной стандартным хирургическим путем, наблюдались рецидивы. Штамм ОВР-401 использовали также для исследования эффективности технологии FGS в мышинных моделях диссеминированного рака толстой кишки, легкого и саркомы мягких тканей [36].

Биолюминесцентная визуализация

В отличие от флуоресценции, биолюминесцентная визуализация не требует возбуждающего света для испускания фотонов флуорофором. Свет образуется при окислении субстратов биолюминесцентным репортерным ферментом, ген которого можно клонировать в геном онколитического вируса. Метод биолюминесценции в сравнении с флуоресценцией обладает более высокой чувствительностью (достаточно всего 10^{-17} М люциферазы) и более низкой фоновой люминесценцией [37, 38].

Люцифераза светлячка (*Photinus pyralis*, FLuc) является наиболее широко используемым репортерным ферментом для биолюминесценции [39]. В качестве субстрата FLuc используется *D*-люциферин вместе с кофакторами АТФ, Mg^{2+} и O_2 . FLuc катализирует образование комплекса люциферин–АТФ, окисление которого приводит к образованию высокоэнергетического оксилуциферина. Оксилуциферин испускает фотоны желто-зеленого спектра ($\lambda_{max} \sim 560$ нм) [40]. Световое излучение достигает пика через 10–12 мин после инъекции люциферина и постепенно снижается в течение следующих 60 мин [41]. Кроме этого, известны АТФ-независимые люциферазы, такие, как люцифераза морских анютиных глазок (*Renilla reniformis*, RLuc) [42], морской копеподы (*Gaussia princeps*, GLuc) и жука-щелкуна

(*Pyrophorus plagiophthalmus*) [43]. RLuc и GLuc используют в качестве субстрата коэлютеразин (CTZ), испускают в основном синий свет ($\lambda_{\text{max}} \sim 460\text{--}480$ нм), который хуже проникает в ткани, чем желто-зеленый свет FLuc [44]. К дополнительным недостаткам АТФ-независимых люцифераз относятся их ограниченное распространение, быстрая кинетика и более высокий фоновый шум [37]. Постоянно продолжается разработка новых вариантов ферментов и субстратов с улучшенной биолюминесценцией. Примером нового варианта фермента является NanoLuc ($\lambda_{\text{max}} \sim 460$ нм), ген которого имеет уменьшенную кодирующую последовательность. Это единственный вариант биолюминесцентного трансгена для онколитических вирусов с маленькой емкостью генома, таких, как аденоассоциированный вирус и другие парвовирусы [45]. Использование нескольких типов люцифераз позволяет одновременно отслеживать различные, но связанные между собой, биологические события. В частности, широко используется прием маркировки опухолевых клеток и онколитического вируса люциферазами разного типа с целью выявления противоопухолевой и антиметастатической активности вируса в экспериментах *in vivo* [46].

Первым онколитическим вирусом, для изучения свойств которого применили биолюминесценцию, стал вирус простого герпеса I типа (HSV-1) [47]. С использованием рекомбинантных вариантов HSV-1, экспрессирующих трансгены FLuc или RLuc, на мышинных моделях показано, что FLuc обеспечивает более эффективный мониторинг вирусной инфекции, чем RLuc [48]. Лечение инфицированных вирусом мышей противовирусным препаратом валацикловир вызывало дозозависимое снижение сигнала FLuc, что показало возможность количественной оценки эффективности противовирусной терапии с помощью биолюминесценции на животных моделях [48]. Для получения более полных количественных данных биолюминесценцию сочетают с визуализацией органов животных *ex vivo* и определением

в них абсолютной вирусной нагрузки методом ПЦР/ОТ-ПЦР в реальном времени [49].

Биолюминесцентную визуализацию успешно использовали для определения эффекта комбинированной терапии мышинных опухолей онколитическим вирусом осповакцины совместно с блокадой иммунных контрольных точек [50], а также для отслеживания внутриопухолевой репликации онколитических парвовирусов, аденовирусов, HSV-1, вируса осповакцины, вируса кори и вируса везикулярного стоматита на мышинных моделях (табл. 1) [37].

Фотоакустическая визуализация

Фотоакустическая, или оптоакустическая визуализация, представляет собой недавно разработанный метод визуализации, который использует фотоакустический эффект, полученный от облучения ткани-мишени короткоимпульсным лазером. Ткань в зависимости от ее физических свойств поглощает различное количество света, что вызывает молекулярную вибрацию и возникновение термоупругого расширения [24, 51]. Акустические волны, возникающие в результате этого процесса, подвергаются меньшему рассеянию, чем фотоны, когда они проходят через ткань, что значительно увеличивает глубину изображения [24]. Иногда для повышения молекулярной специфичности фотоакустической визуализации используют контрастные агенты [52].

На сегодняшний день в экспериментах с фотоакустической визуализацией использовали только один онколитический вирус, вирус осповакцины, экспрессирующий ключевые гены выработки меланина – ген тирозиназы (Tyr) и гены родственных тирозиназе белков 1 (Tyrp1) и 2 (Tyrp2) (табл. 1) [53]. Меланин является идеальным контрастным веществом для фотоакустической визуализации, а экспрессия и накопление меланина в опухолях позволяют использовать фотоакустическую визуализацию в экспериментах по онкотерапии на животных моделях [53]. Однако высокие концентрации

Таблица 1. Репортерные трансгены онколитических вирусов

Метод визуализации		Репортерный трансген	Онколитические вирусы, кодирующие репортерный трансген	Ссылка
Оптическая визуализация	Флуоресцентная визуализация	Флуоресцентные белки (GFP, eGFP, iRFP)	NDV, MV, HSV-1, ADV, VACV (GLV-1h68), VSV	[14, 29, 55]
	Биолюминесцентная визуализация	Люциферазы (FLuc, RLuc и GLuc)	HSV-1, VACV, ADV, MV	[47, 50, 56, 57]
	Фотоакустическая визуализация	Ферменты меланогенеза (Tyr, Tyrp1, Tyrp2)	VACV	[53]
Визуализация глубоких тканей	ОФЭКТ и ПЭТ	Ферменты (HSV1-tk)	VSV, ADV, HSV-1	[58–60]
	ПЭТ	Рецепторы (SSTR2)	ADV, VACV	[61, 62]
	ОФЭКТ и ПЭТ	Белки-переносчики (NET, NIS)	ADV, VACV, HSV-1, MV	[63–70]
	МРТ	Ферменты меланогенеза (Tyr)	VACV	[53]

меланина ингибируют репликацию вируса, поэтому с целью уменьшения этого ингибирующего эффекта при конструировании онколитических вирусов для экспрессии трансгенов группы Туг используется индуцибельная система, регулируемая доксициклином [54]. Сложность выбора трансгенов для фотоакустической визуализации пока ограничивает использование этого метода в области онколитической виротерапии, несмотря на его высокую разрешающую способность.

ВИЗУАЛИЗАЦИЯ ГЛУБОКИХ ТКАНЕЙ

Переход от *in vitro* исследований и доклинических исследований к клиническим испытаниям требует соответствующих трансляционных моделей на животных для адекватной оценки безопасности и эффективности. С этой целью необходимо использовать крупных животных, физиологически близких к человеку, таких, как собаки, свиньи, приматы, поскольку они лучше предсказывают клиническую картину терапии, чем мелкие животные, такие, как мыши и крысы [71]. Методы оптической визуализации, используемые на мелких животных, не применимы к крупным животным, потому что видимый свет не может проникать в ткани крупных животных [18, 72]. Необходимы методы визуализации глубоких тканей, такие, как однофотонная эмиссионная компьютерная томография (ОФЭКТ), позитронно-эмиссионная томография (ПЭТ) и магнитно-резонансная томография (МРТ) (рис. 1) [73].

Получение изображений методами ядерной визуализации (ПЭТ, ОФЭКТ) основано на распознавании и локализации гамма-лучей, испускаемых при распаде радиоактивного индикатора, введенного в организм пациента и специфически накапливающегося в различных органах и тканях [74]. В результате наблюдений за тем, как клетка реагирует на введение радиоактивного препарата, как этот препарат накапливается и как выводится, специалисты могут сделать вывод о состоянии здоровья исследуемого органа и о его метаболической активности. Пространственно-временная картина распределения радиофармпрепарата дает представление о форме, размерах и положении органа, а также о наличии в нем патологических очагов [16].

В ОФЭКТ применяются радиофармпрепараты, меченные радиоизотопами, ядра которых при каждом акте радиоактивного распада испускают только один гамма-квант (фотон). В ПЭТ используются радиоизотопы, испускающие позитроны, которые, в свою очередь, при аннигиляции с электроном испускают два гамма-кванта, разлетающиеся в разные стороны вдоль одной прямой, что увеличивает чувствительность ПЭТ по сравнению с ОФЭКТ

[75]. ОФЭКТ и ПЭТ часто сочетаются с компьютерной томографией (КТ) для совместной регистрации анатомических и функциональных изображений. При этом большой набор детекторов, расположенных вокруг исследуемого объекта при ПЭТ, и компьютерная обработка сигналов с них позволяют выполнить более точную трехмерную реконструкцию распределения радионуклида в сканируемом объекте по сравнению с ОФЭКТ [16].

В МРТ используются сильные магнитные поля и радиоволны для возбуждения ядерно-спинового энергетического перехода молекул водорода. Ядра атомов водорода присутствуют в огромном количестве в человеческом теле в составе воды и других веществ. Скорость релаксации ядерных атомов водорода из возбужденного состояния зависит от плотности ткани, и это различие позволяет получать изображения с достаточно высоким разрешением [76]. К недостаткам МРТ относятся высокая стоимость аппаратов и время, необходимое для получения изображений (15–90 мин).

Большинство трансгенов онколитических вирусов, используемых для визуализации глубоких тканей, можно тестировать различными методами в зависимости от субстрата. Эти трансгены кодируют тимидинкиназу вируса герпеса (HSV1-tk), рецептор соматостатина 2 (hSSTR2), ферменты, катализирующие синтез меланина (тирозиназа), а также такие белки-переносчики, как транспортер норэпинефрина человека (hNET) и симпортер йодида натрия (NIS) [14, 63, 73].

Репортерные трансгены ферментов

Одним из первых репортерных генов, предложенных для неинвазивной радионуклидной визуализации, был ген тимидинкиназы вируса простого герпеса 1-го типа (HSV1-tk), продукт которого, тимидинкиназа, фосфорилирует тимидин до тимидин-5'-монофосфата. В отличие от тимидинкиназы 1-го типа млекопитающих, которая имеет высокое сродство преимущественно к тимидину, HSV1-tk проявляет специфичность к различным нуклеозидам. Например, HSV1-tk способна фосфорилировать как пиримидиновые аналоги (5-йод-2-фтор-2'-дезоксид-β-D-арабинофуранозилурацил – FIAU, 2-фтор-2'-дезоксидарабинофуранозил-5-этилурацил – FEAU, бромвинилдезоксидуридин – BVdU), так и ациклоуанозиновые производные (ацикловир – ACV, ганцикловир – GCV, 9-[4-фтор-3-(гидроксиметил)-бутил]гуанин – FHBG). HSV1-tk специфически взаимодействует с радиоактивно мечеными аналогами пиримидина, превращая их в метаболит, не способный выйти из клетки, в результате чего происходит накопление преобразованного радиоактивного

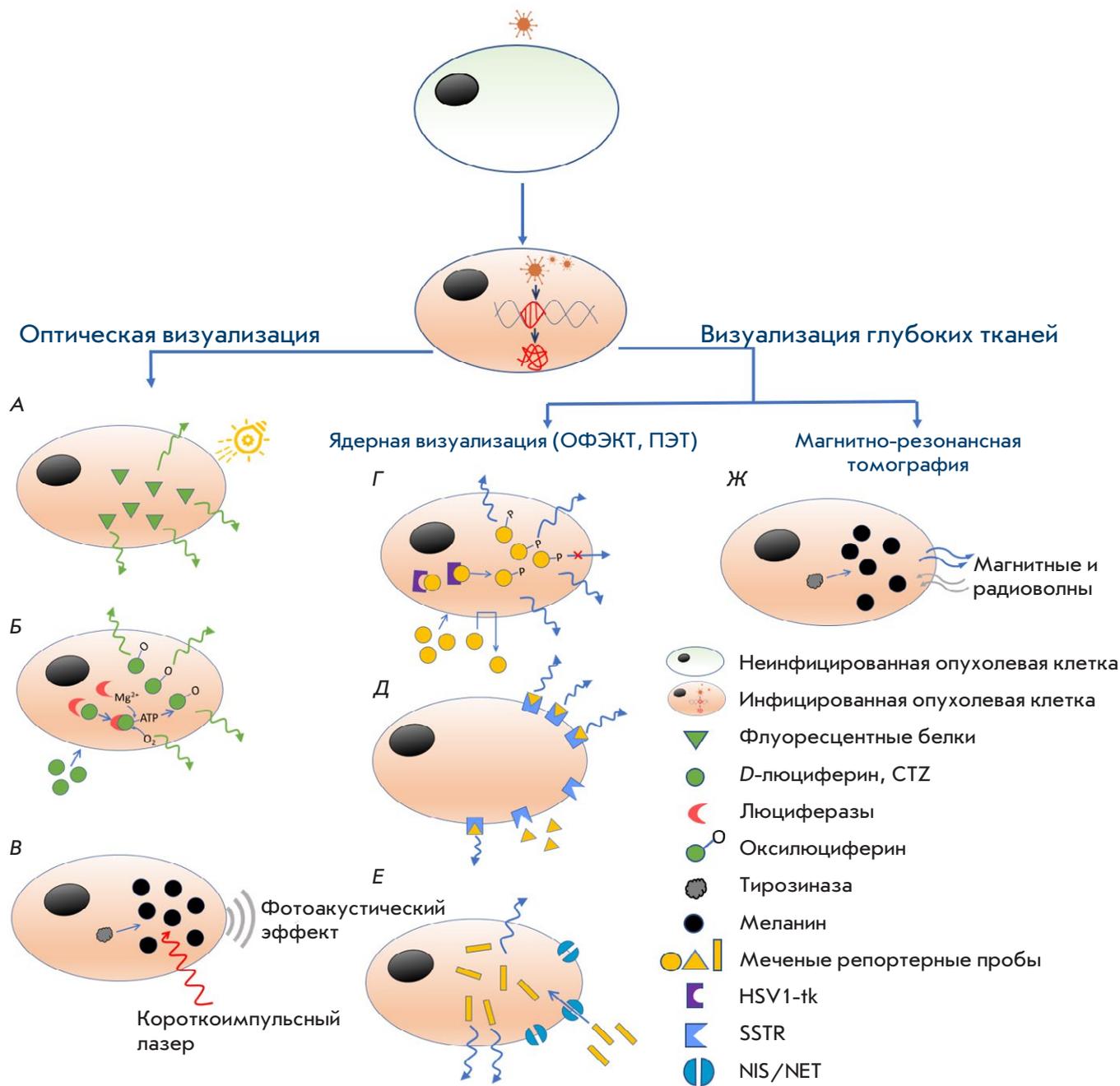


Рис. 1. Методы визуализации опухолевых клеток с использованием онколитических вирусов, экспрессирующих трансгены репортерных белков. Методы оптической визуализации: А – флуоресцентная визуализация, облучение светом с определенной длиной волны возбуждает флуоресценцию белка, способного испускать фотоны; Б – биолюминесцентная визуализация, свет испускается при окислении экзогенных субстратов биолюминесцентным репортерным ферментом; В – фотоакустическая визуализация, фотоакустический эффект, полученный от облучения ткани-мишени короткоимпульсным лазером. Методы визуализации глубоких тканей (Г–Е) – ОФЭКТ, ПЭТ; Ж – МРТ; Г – фермент HSV1-tk взаимодействует с радиоактивно мечеными субстратами, превращая их в метаболит, не способный выйти из клетки; Д – рецептор SSTR2 связывает радиоактивно меченные синтетические пептидные субстраты; Е – транспортеры NIS/NET обеспечивают поглощение и накопление радиоактивных субстратов внутри клетки; Ж – выработка меланина, индуцированная тирозиназой, приводит к существенному улучшению контрастности МРТ

субстрата в клетках, экспрессирующих HSV1-tk [77, 78]. Поскольку HSV1-tk – один из первых хорошо изученных репортерных генов, он имеет широкий спектр субстратов для ПЭТ и ОФЭКТ, а также мутантные формы, такие, как HSV1-sr39tk, которые обладают повышенной активностью *in vivo* [73].

Трансген HSV1-tk использовали для оценки биораспределения онколитического рекомбинантного вируса везикулярного стоматита в моделях гепатоцеллюлярной карциномы у крыс [58]. Также получен аденовирус, экспрессирующий HSV1-tk, способный отображать локализацию вируса с помощью сканирования ПЭТ (табл. 1) [59]. Проведены первые клинические исследования, в которых оценивали возможность использования HSV1-tk онколитического рекомбинантного штамма HSV1716 в качестве репортерного трансгена для мониторинга репликации вируса в ходе лечения пациентов с глиомами [60]. Однако методом ОФЭКТ повышенное накопление субстрата (^{123}I -FIAU) в опухолевых клетках не было зарегистрировано, что может быть связано как с недостаточной репликацией вируса, так и с низкой чувствительностью метода. Кроме того, HSV1-tk, как чужеродный белок, может вызывать иммунный ответ, что делает его мало пригодным для долгосрочной визуализации, которая требуется для генной терапии.

Репортерные трансгены белков-рецепторов

SSTR2 – один из рецепторов пептидного гормона соматостатина, экспрессируется на нейроэндокринных и других клетках, где он участвует в нейротрансмиссии, секреции гормонов и пролиферации клеток [3, 72]. Белок hSSTR2 человека использовали для ОФЭКТ-визуализации с применением синтетических пептидных субстратов, меченных индием-111, таких, как октреотид, пентетреотид и ланреотид, или ПЭТ-визуализации с пептидами, меченными галлием-68 [79]. Трансген SSTR2 встроили в геномы онколитического аденовируса и вируса осповакцины и показали возможность длительного отслеживания локализации и персистенции этих вирусов на мышинных сингенных моделях нескольких типов опухолей [62, 73]. Экспрессия трансгена SSTR2 в составе аденоассоциированного вируса позволяет получать изображения с помощью ПЭТ даже через 6 месяцев после окончания лечения [61]. К недостаткам SSTR2 относится эндогенная экспрессия, которая может снизить диагностическую эффективность, а также то, что каждый рецептор может связывать только один радиоактивно меченный лиганд, делая невозможным усиление сигнала и тем самым ограничивая чувствительность визуализации [3, 18].

Трансгены – контрастные агенты

В качестве репортерных генов для визуализации методом МРТ могут использоваться гены, отвечающие за меланогенез, такие, как ген тирозиназы (Tyr), который применяется также в фотоакустическом методе [73, 80]. Выработка меланина, индуцированная экспрессией Tyr, увеличивает хелатирование ионов металлов, что приводит к существенному улучшению контрастности МРТ. А за счет того, что контрастное вещество продуцируется непосредственно в трансдуцированных клетках, визуализация становится возможной без использования экзогенного контрастного вещества.

Использование рекомбинантного штамма вируса осповакцины, экспрессирующего трансгены сверхпродукции меланина, позволило провести МРТ-визуализацию опухоли и метастазов на модели ксенотрансплантатов линии клеток метастазирующего рака легкого человека A549, привитых иммунодефицитным мышам. Этот штамм вируса осповакцины также успешно применяли для фотоакустической визуализации (см. раздел «Фотоакустическая визуализация») [53].

Меланин представлен во всех царствах живых организмов, поэтому предполагается, что синтез меланина можно использовать в качестве диагностического/тераностического маркера для большинства известных видов, включая человека [14, 81].

Репортерные трансгены-транспортеры

Na^+/Cl^- -зависимый мембранный белок NET транспортирует норадреналин, адреналин, дофамин и другие структурно-родственные соединения в клетку. Известно, что большинство клеток нейробластомы (наиболее распространенная экстракраниальная солидная опухоль у детей, на которую приходится 15% смертей от всех детских онкологических заболеваний) экспрессируют на своей мембране белок NET [82]. Мета-иодобензилгуанидин (mIBG), также известный как иобенгуан, является структурным аналогом норадреналина (NE), естественного субстрата NET. mIBG был впервые разработан для визуализации мозгового вещества надпочечников методом сцинтиграфии в 1980-х годах [83]. Радиоактивно меченный mIBG (^{123}I -mIBG) можно эффективно использовать для визуализации нейробластом во всем теле. В настоящее время гамма-сканирование с использованием ^{123}I -mIBG считается предпочтительным для обнаружения первичных опухолей и идентификации метастатических клеток нейробластомы [84].

Трансген *NET* человека (*hNET*) ввели в геномы онколитических вирусов осповакцины, аденовируса и вируса герпеса и использовали для ядерной визу-

ализации не только нейроэндокринных, но и других опухолей человека на моделях мышей с иммунодефицитом [64–66]. Тем не менее, использование экзогенного NET для визуализации опухолей имеет пока крайне ограниченный характер, что, вероятно, связано с существованием других репортерных генов с лучшими профилями экспрессии и более доступными для радиоактивных индикаторов [85].

Симпортер йодида натрия (NIS) – это трансмембранный гликопротеин, который обеспечивает поглощение и концентрирование йодида для органификации в щитовидной железе, играет центральную роль в метаболизме гормонов щитовидной железы, а также экспрессируется в других тканях, включая слюнную железу, слизистую оболочку желудка и молочную железу [86]. Благодаря своей способности концентрировать йодид, NIS уже более 75 лет используется для выявления и лечения заболеваний щитовидной железы, демонстрируя клиническую универсальность и практичность опосредованного NIS-поглощения йодида [87]. Векторная доставка гена *NIS* позволяет сконцентрировать йодид в тканях других органов, в которых NIS обычно не экспрессируется. NIS переносит в клетки легкодоступные и одобренные к применению на человеке различные виды гамма-излучающих радиоизотопов, таких, как радиоактивный йод (^{123}I , ^{124}I , ^{125}I , ^{131}I), технеций в форме анионного пертехнетата ($^{99\text{m}}\text{TcO}_4^-$) и перрената (186 , ^{188}Re), которые подходят для неинвазивной визуализации методами ОФЭКТ и ПЭТ [14]. Эктопическая экспрессия NIS обеспечивает накопление радиоактивного йодида на таком же уровне, как в клетках щитовидной железы или выше, не влияя на основные биохимические процессы в клетке [88]. Это расширяет сферу применения радиотерапии и визуализации с помощью NIS за пределы щитовидной железы.

Использование NIS имеет потенциальные преимущества перед другими системами репортерных генов. В отличие от репортеров на основе рецепторов, таких, как *hSSTR2*, со стехиометрическими связями (когда рецептор может связывать только один радиоактивно меченный лиганд, предотвращая усиление сигнала и ограничивая чувствительность визуализации), такие переносчики, как NIS, обеспечивают усиление сигнала посредством опосредованного транспортом концентрированного внутриклеточного накопления субстрата, повышая тем самым чувствительность обнаружения [73, 89]. Визуализация с NIS также оказалась более чувствительной и продолжительной, чем визуализация с *HSV1-tk* [90]. NIS способен отражать жизнеспособность клеток, поскольку его концентрирующая функция теряется при апоптозе клеток, в то время как ферменты и рецепторы

по-прежнему могут сохранять свою функциональную активность [63]. NIS представлен у всех позвоночных, что делает возможным использование видоспецифичного трансгена *NIS* в подавляющем большинстве модельных систем [91, 92].

NIS не только обладает описанными преимуществами, но и является наиболее распространенным репортерным трансгеном человека. Создано множество рекомбинантных вирусов, экспрессирующих NIS. Первым получен нереплицирующийся аденовирус (Ad), кодирующий NIS, который протестировали на ксенографтах различных типов опухолей человека, включая рак шейки матки, рак молочной железы и рак предстательной железы (РПЖ), на моделях мышей с иммунодефицитом [67]. Вскоре после этого с помощью репликативно-компетентной платформы Ad (*Ad5-yCD/mutTK[SR39]rep-hNIS*), экспрессирующей симпортер NIS, получено изображение высокого разрешения тканей РПЖ собак методом ОФЭКТ [93]. Проведена также фаза 1 клинических испытаний *Ad5-yCD/mutTK[SR39]rep-hNIS* в группе мужчин с клинически локализованным РПЖ, что доказало возможность и безопасность неинвазивной визуализации методом ОФЭКТ для мониторинга эффективности опосредованной аденовирусами генной терапии у человека [94]. У мышей с трансплантированными подкожными миеломами 5TGM1 контролировали репликацию и распространение рекомбинантного онколитического вируса везикулярного стоматита (*VSVd51-NIS*) с помощью серийной ^{123}I - γ -сцинтиграфии после системной или внутриопухолевой инъекции [68]. В клинических испытаниях показана эффективность использования другого рекомбинантного штамма вируса везикулярного стоматита, *VSV-IFN β -NIS*, для визуализации метастатического колоректального рака и рака поджелудочной железы [95]. *VACV*, экспрессирующий трансген *hNIS*, успешно ингибировал рост несколько типов опухолей в доклинических моделях, включая рак поджелудочной железы, тройной негативный рак молочной железы, рак желудка и злокачественную мезотелиому плевры [96–98]. Рекомбинантный вирус кори (MV, штамм Edmonston), экспрессирующий трансген *hNIS*, прошел и проходит наибольшее количество клинических испытаний 1-й и 2-й фазы на различных типах опухолей, включая рак яичников (NCT02068794), плоскоклеточный рак головы и шеи и рак молочной железы (NCT01846091), злокачественную опухоль оболочки периферического нерва (NCT02700230), множественную миелому (NCT00450814) и уротелиальную карциному (NCT02364713) [3, 69, 70].

Основное ограничение для визуализации с помощью NIS – накопление радиоизотопов в тканях,

не являющихся мишенями, которые экспрессируют NIS, таких, как щитовидная железа, слюнные железы и желудок. Если трансдуцированная ткань находится рядом с эндогенными тканями, экспрессирующими NIS, то это технически затрудняет интерпретацию и количественное определение сигналов NIS. В нескольких работах изучены способы улучшения экспрессии NIS или блокирования экспрессии эндогенного NIS для решения указанных проблем [99, 100].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Как следует из представленных данных, введение репортерных трансгенов в геном онколитических вирусов представляет перспективный инструмент неинвазивной молекулярной визуализации опухолевой ткани для оценки ее локализации, размеров и эффективности терапии. Выбор репортерных трансгенов зависит от методов визуализации, которые можно разделить на две основных категории: оптическая визуализация и визуализация глубоких тканей.

Методы оптической визуализации привлекательны благодаря короткому времени сбора данных, низкой стоимости, высокой пропускной способности, отсутствию токсичности в моделях на животных, возможностям мультиспектральной визуализации и удобству использования по сравнению с радиоизотопами, которые необходимы для визуализации глубоких тканей. Эти свойства делают оптическую визуализацию чрезвычайно популярным подходом к исследованиям *in vitro* или доклиническим исследованиям у мелких животных.

Для оптической визуализации противоопухолевых свойств онколитических вирусов используют трансгены флуоресцентных белков (флуоресцентная визуализация), ферментов люциферазы (биолюминесцентная визуализация) и тирозиназы (фотоакустическая визуализация).

К ограничениям оптических методов формирования изображения относятся небольшая глубина пропускания света, поглощение и рассеяние возбуждающего и/или испускаемого света, особенно в глубоких тканях; аутофлуоресценция клеток, в том числе аутофлуоресценция мертвых клеток, что имеет особое значение при использовании онколитических вирусов, которые лизируют опухолевые клетки. Несмотря на то что процессы ослабления светового потока и аутофлуоресценции можно минимизировать в пределах инфракрасного «окна»; методы оптической визуализации имеют низкое пространственное разрешение и ограниченную чувствительность. Эти проблемы, а также возможность развития иммунных ответов на чужеродные репор-

терные белки, кодируемые трансгенами онколитических вирусов, препятствуют переносу оптической визуализации на модели крупных животных и человека и, соответственно, использованию в клинике.

Наибольшим трансляционным потенциалом обладают методы визуализации глубоких тканей (ОФЭКТ, ПЭТ и МРТ), которые обеспечивают тестирование животных любого размера, а также человека. Одни и те же репортерные трансгены онколитических вирусов могут использоваться для визуализации глубоких тканей различными методами в зависимости от контрастирующего субстрата. Идеальным контрастным субстратом для МРТ является меланин, поэтому в качестве трансгенов онколитических вирусов используются гены выработки меланина – тирозиназы. Однако меланин в высоких концентрациях ингибирует репликацию вируса, что существенно ограничивает использование данных методов визуализации в виротерапии опухолей. В методах ядерной визуализации (ОФЭКТ и ПЭТ) в качестве субстрата применяют радиоактивные изотопы, для накопления которых в опухолевых клетках разработан целый ряд трансгенов онколитических вирусов. Эти трансгены кодируют: ферменты (HSV1-tk и его модификации); рецепторы (hSSTR2); а также такие белки-переносчики, как транспортер норэпинефрина человека (hNET) и симпортер йодида натрия (NIS).

Один из старейших и наиболее успешных репортерных генов, NIS, применяется для молекулярной визуализации и направленной радионуклидной терапии. NIS присутствует у всех позвоночных, что делает возможным использование видоспецифичного трансгена NIS в подавляющем большинстве модельных систем. Не только доклинические, но и клинические исследования подтверждают, что NIS, экспрессируемый в составе онколитических вирусов, можно использовать для точного определения локализации опухоли, реакции опухоли на лечение, а также для обнаружения метастазов методами ядерной визуализации глубоких тканей. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (Соглашение от 12.10.2021 № 075-15-2021-1355, тема «Использование синхротронного излучения для вирусологических исследований») в рамках реализации отдельных мероприятий Федеральной научно-технической программы развития синхротронных и нейтронных исследований и исследовательской инфраструктуры на 2019–2027 годы.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Lawler S.E., Speranza M.-C., Cho C.-F., Chiocca E.A. // *JAMA Oncol.* 2017. V. 3. № 6. P. 841.
2. Romanenko M.V., Dolgova E.V., Osipov I.D., Ritter G.S., Sizova M.S., Proskurina A.S., Efremov Y.R., Bayborodin S.I., Potter E.A., Taranov O.S., et al. // *Anticancer Res.* 2019. V. 39. № 11. P. 6073–6086.
3. Pelin A., Wang J., Bell J., Le Boeuf F. // *Oncolytic Virotherapy.* 2018. V. 7. P. 25–35.
4. Кочнева Г.В., Сиволобова Г.Ф., Ткачева А.В., Горчаков А.А., Кулемзин С.В. // *Молекуляр. биология.* 2020. Т. 54. № 1. С. 3–16.
5. Watanabe N., McKenna M.K., Rosewell Shaw A., Suzuki M. // *Mol. Ther.* 2021. V. 29. № 2. P. 505–520.
6. Evgin L., Vile R.G. // *Cancers (Basel).* 2021. V. 13. № 5. P. 1106.
7. Montaña-Samaniego M., Bravo-Estupiñan D.M., Méndez-Guerrero O., Alarcón-Hernández E., Ibáñez-Hernández M. // *Front. Oncol.* 2020. V. 10. P. 60538.
8. Guedan S., Grases D., Rojas J.J., Gros A., Vilardell F., Vile R., Mercade E., Cascallo M., Alemany R. // *Gene Ther.* 2012. V. 19. № 11. P. 1048–1057.
9. Stephenson K.B., Barra N.G., Davies E., Ashkar A.A., Lichty B.D. // *Cancer Gene Ther.* 2012. V. 19. № 4. P. 238–246.
10. Li J., O'Malley M., Urban J., Sampath P., Guo Z.S., Kalinski P., Thorne S.H., Bartlett D.L. // *Mol. Ther.* 2011. V. 19. № 4. P. 650–657.
11. Zamarin D., Holmgaard R.B., Ricca J., Plitt T., Palese P., Sharma P., Merghoub T., Wolchok J.D., Allison J.P. // *Nat. Commun.* 2017. V. 8. № 1. P. 14340.
12. Kochneva G., Zonov E., Grazhdantseva A., Yunusova A., Sibolobova G., Popov E., Taranov O., Netesov S., Chumakov P., Ryabchikova E. // *Oncotarget.* 2014. V. 5. № 22. P. 11269–11282.
13. Kochneva G., Sivolobova G., Tkacheva A., Grazhdantseva A., Troitskaya O., Nushtaeva A., Tkachenko A., Kuligina E., Richter V., Koval O. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. № 45. P. 74171–74188.
14. Haddad D., Fong Y. // *Mol. Ther. – Oncolytics.* 2014. V. 1. P. 14007.
15. Kirn D.H., Thorne S.H. // *Nat. Rev. Cancer.* 2009. V. 9. № 1. P. 64–71.
16. Histed S.N., Lindenberg M.L., Mena E., Turkbey B., Choyke P.L., Kurdziel K.A. // *Nucl. Med. Commun.* 2012. V. 33. № 4. P. 349–361.
17. Luker K.E., Hutchens M., Schultz T., Pekosz A., Luker G.D. // *Virology.* 2005. V. 341. № 2. P. 284–300.
18. Serganova I., Blasberg R.G. // *J. Nucl. Med.* 2019. V. 60. № 12. P. 1665–1681.
19. Chudakov D.M., Lukyanov S., Lukyanov K.A. // *Trends Biotechnol.* 2005. V. 23. № 12. P. 605–613.
20. Shimomura O., Johnson F.H., Saiga Y. // *J. Cell. Comp. Physiol.* 1962. V. 59. № 3. P. 223–239.
21. Remington S.J. // *Protein Sci.* 2011. V. 20. № 9. P. 1509–1519.
22. Niswender K.D., Blackman S.M., Rohde L., Magnuson M.A., Piston D.W. // *J. Microsc.* 1995. V. 180. Pt 2. P. 109–116.
23. Patterson G.H., Knobel S.M., Sharif W.D., Kain S.R., Piston D.W. // *Biophys. J.* 1997. V. 73. № 5. P. 2782–2790.
24. Pirovano G., Roberts S., Kossatz S., Reiner T. // *J. Nucl. Med.* 2020. V. 61. № 10. P. 1419–1427.
25. Klohs J., Wunder A., Licha K. // *Basic Res. Cardiol.* 2008. V. 103. № 2. P. 144–151.
26. Shcherbakova D.M., Verkhusha V.V. // *Nat. Methods.* 2013. V. 10. № 8. P. 751–754.
27. Krumholz A., Shcherbakova D.M., Xia J., Wang L.V., Verkhusha V.V. // *Sci. Rep.* 2015. V. 4. № 1. P. 3939.
28. Wilson A., Wilson K., Bilandzic M., Moffitt L., Makanji M., Gorrell M., Oehler M., Rainczuk A., Stephens A., Plebanski M. // *Cancers (Basel).* 2018. V. 11. № 1. P. 32.
29. Rojas J.J., Thorne S.H. // *Theranostics.* 2012. V. 2. № 4. P. 363–373.
30. Patel M.R., Jacobson B.A., Ji Y., Drees J., Tang S., Xiong K., Wang H., Prigge J.E., Dash A.S., Kratzke A.K., et al. // *Oncotarget.* 2015. V. 6. № 32. P. 33165–33177.
31. Jun K.-H., Gholami S., Song T.-J., Au J., Haddad D., Carson J., Chen C.-H., Mojica K., Zanzonico P., Chen N.G., et al. // *J. Exp. Clin. Cancer Res.* 2014. V. 33. № 1. P. 2.
32. Khan K.H., Young A.-M., Mateo J., Tunariu N., Yap T.A., Tan D.S.P., Mansfield D., Wong M., Riisnaes R., Harrington K.J., et al. // *J. Clin. Oncol.* 2013. V. 31. № 15_suppl. P. 3062.
33. Yano S., Tazawa H., Kishimoto H., Kagawa S., Fujiwara T., Hoffman R.M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 2. P. 1–13.
34. Esposito I., Kleeff J., Bergmann F., Reiser C., Herpel E., Friess H., Schirmacher P., Büchler M.W. // *Ann. Surg. Oncol.* 2008. V. 15. № 6. P. 1651–1660.
35. Vos E.L., Gaal J., Verhoef C., Brouwer K., van Deurzen C.H.M., Koppert L.B. // *Eur. J. Surg. Oncol.* 2017. V. 43. № 10. P. 1846–1854.
36. Kishimoto H., Zhao M., Hayashi K., Urata Y., Tanaka N., Fujiwara T., Penman S., Hoffman R.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2009. V. 106. № 34. P. 14514–14517.
37. Coleman S.M., McGregor A. // *Future Virol.* 2015. V. 10. № 2. P. 169–183.
38. Sandhu G.S., Solorio L., Broome A.M., Salem N., Kolthammer J., Shah T., Flask C., Duerk J.L. // *Wiley Interdiscip. Rev. Syst. Biol. Med.* 2010. V. 2. № 4. P. 398–421.
39. de Wet J.R., Wood K.V., Helinski D.R., DeLuca M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1985. V. 82. № 23. P. 7870–7873.
40. Luker G.D., Luker K.E. // *J. Nucl. Med.* 2008. V. 49. № 1. P. 1–4.
41. Paroo Z., Bollinger R.A., Braasch D.A., Richer E., Corey D.R., Antich P.P., Mason R.P. // *Mol. Imaging.* 2004. V. 3. № 2. P. 117–124.
42. Lorenz W.W., McCann R.O., Longiaru M., Cormier M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 1991. V. 88. № 10. P. 4438–4442.
43. Venisnik K.M., Olafsen T., Gambhir S.S., Wu A.M. // *Mol. Imaging Biol.* 2007. V. 9. № 5. P. 267–277.
44. Love A.C., Prescher J.A. // *Cell Chem. Biol.* 2020. V. 27. № 8. P. 904–920.
45. Hall M.P., Unch J., Binkowski B.F., Valley M.P., Butler B.L., Wood M.G., Otto P., Zimmerman K., Vidugiris G., Machleidt T., et al. // *ACS Chem. Biol.* 2012. V. 7. № 11. P. 1848–1857.
46. Power A.T., Wang J., Falls T.J., Paterson J.M., Parato K.A., Lichty B.D., Stojdl D.F., Forsyth P.A.J., Atkins H., Bell J.C. // *Mol. Ther.* 2007. V. 15. № 1. P. 123–130.
47. Summers B.C., Leib D.A. // *J. Virol.* 2002. V. 76. № 14. P. 7020–7029.
48. Luker G.D., Bardill J.P., Prior J.L., Pica C.M., Piwnicka-Worms D., Leib D.A. // *J. Virol.* 2002. V. 76. № 23. P. 12149–12161.
49. Burgos J.S., Guzman-Sanchez F., Sastre I., Fillat C., Valdivieso F. // *Microbes Infect.* 2006. V. 8. № 5. P. 1330–1338.
50. Rojas J.J., Sampath P., Hou W., Thorne S.H. // *Clin. Cancer Res.* 2015. V. 21. № 24. P. 5543–5551.
51. Zhang H.F., Maslov K., Stoica G., Wang L.V. // *Nat. Biotechnol.* 2006. V. 24. № 7. P. 848–851.
52. Upputuri P.K., Pramanik M. // *WIREs Nanomed.*

- Nanobiotechnol. 2020. V. 12. № 4. P. e1618.
53. Stritzker J., Kirscher L., Scadeng M., Deliolanis N.C., Morscher S., Symvoulidis P., Schaefer K., Zhang Q., Buckel L., Hess M., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2013. V. 110. № 9. P. 3316–3320.
 54. Kirscher L., Deán-Ben X.L., Scadeng M., Zaremba A., Zhang Q., Kober C., Fehm T.F., Razansky D., Ntziachristos V., Stritzker J., et al. // *Theranostics*. 2015. V. 5. № 10. P. 1045–1057.
 55. Le Boeuf F., Diallo J.-S., McCart J.A., Thorne S., Falls T., Stanford M., Kanji F., Auer R., Brown C.W., Lichty B.D., et al. // *Mol. Ther.* 2010. V. 18. № 5. P. 888–895.
 56. Guse K., Dias J.D., Bauerschmitz G.J., Hakkarainen T., Aavik E., Ranki T., Pisto T., Särkioja M., Desmond R.A., Kanerva A., et al. // *Gene Ther.* 2007. V. 14. № 11. P. 902–911.
 57. Msaouel P., Opyrchal M., Domingo Musibay E., Galanis E. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2013. V. 13. № 4. P. 483–502.
 58. Muñoz-Álvarez K.A., Altomonte J., Laitinen I., Ziegler S., Steiger K., Esposito I., Schmid R.M., Ebert O. // *Mol. Ther.* 2015. V. 23. № 4. P. 728–736.
 59. Abate-Daga D., Andreu N., Camacho-Sánchez J., Alemany R., Herance R., Millán O., Fillat C. // *PLoS One*. 2011. V. 6. № 10. P. e26142.
 60. Dempsey M.F., Wyper D., Owens J., Pimlott S., Papanastassiou V., Patterson J., Hadley D.M., Nicol A., Rampling R., Brown S.M. // *Nucl. Med. Commun.* 2006. V. 27. № 8. P. 611–617.
 61. Cotugno G., Aurilio M., Annunziata P., Capalbo A., Faella A., Rinaldi V., Strisciuglio C., Tommaso M.Di, Aloj L., Auricchio A. // *Hum. Gene Ther.* 2011. V. 22. № 2. P. 189–196.
 62. Andrea McCart J., Mehta N., Scollard D., Reilly R.M., Carrasquillo J.A., Tang N., Deng H., Miller M., Xu H., Libutti S.K., et al. // *Mol. Ther.* 2004. V. 10. № 3. P. 553–561.
 63. Montiel-Equihua C.A., Martín-Duque P., de la Vieja A., Quintanilla M., Burnet J., Vassaux G., Lemoine N.R. // *Cancer Gene Ther.* 2008. V. 15. № 7. P. 465–473.
 64. Jia Z.-Y., Deng H.-F., Huang R., Yang Y.-Y., Yang X.-C., Qi Z.-Z., Ou X.-H. // *Cancer Gene Ther.* 2011. V. 18. № 3. P. 196–205.
 65. Chen N., Zhang Q., Yu Y.A., Stritzker J., Brader P., Schirbel A., Samnick S., Serganova I., Blasberg R., Fong Y., et al. // *Mol. Med.* 2009. V. 15. № 5–6. P. 144–151.
 66. Sorensen A., Mairs R.J., Braidwood L., Joyce C., Conner J., Pimlott S., Brown M., Boyd M. // *J. Nucl. Med.* 2012. V. 53. № 4. P. 647–654.
 67. Boland A., Ricard M., Opolon P., Bidart J.M., Yeh P., Filetti S., Schlumberger M., Perricaudet M. // *Cancer Res.* 2000. V. 60. № 13. P. 3484–3492.
 68. Goel A., Carlson S.K., Classic K.L., Greiner S., Naik S., Power A.T., Bell J.C., Russell S.J. // *Blood*. 2007. V. 110. № 7. P. 2342–2350.
 69. Msaouel P., Opyrchal M., Dispenzieri A., Peng K.W., Federspiel M.J., Russell S.J., Galanis E. // *Curr. Cancer Drug Targets*. 2018. V. 18. № 2. P. 177–187.
 70. Dispenzieri A., Tong C., LaPlant B., Lacy M.Q., Laumann K., Dingli D., Zhou Y., Federspiel M.J., Gertz M.A., Hayman S., et al. // *Leukemia*. 2017. V. 31. № 12. P. 2791–2798.
 71. Ribitsch I., Baptista P.M., Lange-Consiglio A., Melotti L., Patruno M., Jenner F., Schnabl-Feichter E., Dutton L.C., Connolly D.J., van Steenbeek F.G., et al. // *Front. Bioeng. Biotechnol.* 2020. V. 8. P. 972.
 72. Wu Z.J., Tang F.R., Ma Z.-W., Peng X.-C., Xiang Y., Zhang Y., Kang J., Ji J., Liu X.Q., Wang X.-W., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2018. V. 29. № 2. P. 204–222.
 73. Concilio S.C., Russell S.J., Peng K.-W. // *Mol. Ther.* – Oncolytics. 2021. V. 21. P. 98–109.
 74. Maurer A.H. // *Health Phys.* 2008. V. 95. № 5. P. 571–576.
 75. Cherry S., Sorenson J., Phelps M. *Physics in Nuclear Medicine*. 4th ed. Philadelphia: Saunders/Elsevier, 2012. 683 p.
 76. McRobbie D.W., Moore E.A., Graves M.J., Prince M.R. *MRI from picture to proton*. 3rd ed. Cambridge, UK: Cambridge University Press, 2017.
 77. Serganova I., Ponomarev V., Blasberg R. // *Nucl. Med. Biol.* 2007. V. 34. № 7. P. 791–807.
 78. Keshavarz M., Sabbaghi A., Miri S.M., Rezaeyan A., Arjeini Y., Ghaemi A. // *Cancer Cell Int.* 2020. V. 20. № 1. P. 1–17.
 79. Xu C., Zhang H. // *Biomed. Res. Int.* 2015. V. 2015. P. 1–14.
 80. Paproski R.J., Forbrich A.E., Wachowicz K., Hitt M.M., Zemp R.J. // *Biomed. Opt. Express*. 2011. V. 2. № 4. P. 771.
 81. Yang C., Tian R., Liu T., Liu G. // *Molecules*. 2016. V. 21. № 5. P. 580.
 82. Park J.R., Eggert A., Caron H. // *Hematol. Oncol. Clin. North Am.* 2010. V. 24. № 1. P. 65–86.
 83. Wieland D.M., Wu J., Brown L.E., Mangner T.J., Swanson D.P., Beierwaltes W.H. // *J. Nucl. Med.* 1980. V. 21. № 4. P. 349–353.
 84. Parisi M.T., Eslamy H., Park J.R., Shulkin B.L., Yanik G.A. // *Semin. Nucl. Med.* 2016. V. 46. № 3. P. 184–202.
 85. Zhang Y., Wang J. // *Acta Pharm. Sin. B*. 2020. V. 10. № 1. P. 79–90.
 86. Spitzweg C., Nelson P.J., Wagner E., Bartenstein P., Weber W.A., Schwaiger M., Morris J.C. // *Endocr. Relat. Cancer*. 2021. V. 28. № 10. P. T193–T213.
 87. Miller A., Russell S.J. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2016. V. 16. № 1. P. 15–32.
 88. Dadachova E., Carrasco N. // *Semin. Nucl. Med.* 2004. V. 34. № 1. P. 23–31.
 89. Haddad D., Chen N.G., Zhang Q., Chen C.-H., Yu Y.A., Gonzalez L., Carpenter S.G., Carson J., Au J., Mittra A., et al. // *J. Transl. Med.* 2011. V. 9. № 1. P. 36.
 90. Miyagawa M., Anton M., Wagner B., Haubner R., Souvatzoglou M., Gansbacher B., Schwaiger M., Bengel F.M. // *Eur. J. Nucl. Med. Mol. Imaging*. 2005. V. 32. № 9. P. 1108–1114.
 91. Concilio S.C., Zhekova H.R., Noskov S.Y., Russell S.J. // *PLoS One*. 2020. V. 15. № 2. P. 1–25.
 92. Portulano C., Paroder-Belenitsky M., Carrasco N. // *Endocr. Rev.* 2014. V. 35. № 1. P. 106–149.
 93. Barton K.N., Tyson D., Stricker H., Lew Y.S., Heisey G., Koul S., de la Zerda A., Yin F.-F., Yan H., Nagaraja T.N., et al. // *Mol. Ther.* 2003. V. 8. № 3. P. 508–518.
 94. Barton K.N., Stricker H., Brown S.L., Elshaikh M., Aref I., Lu M., Pegg J., Zhang Y., Karvelis K.C., Siddiqui F., et al. // *Mol. Ther.* 2008. V. 16. № 10. P. 1761–1769.
 95. Merchan J., Patel M.R., Powell S.F., Strauss J., Cripe T.P., Old M.O., Diaz R.M., Russell S.J., Bexon A.S., Suksanpaisan L., et al. // *Ann. Oncol.* 2018. V. 29. P. 479–480.
 96. Belin L.J., Ady J.W., Lewis C., Marano D., Gholami S., Mojica K., Eveno C., Longo V., Zanzonico P.B., Chen N.G., et al. // *Surgery*. 2013. V. 154. № 3. P. 486–495.
 97. Gholami S., Chen C.-H., Lou E., Belin L.J., Fujisawa S., Longo V.A., Chen N.G., Gönen M., Zanzonico P.B., Szalay A.A., et al. // *FASEB J.* 2014. V. 28. № 2. P. 676–682.
 98. Gholami S., Haddad D., Chen C.-H., Chen N.G., Zhang Q., Zanzonico P.B., Szalay A.A., Fong Y. // *Surgery*. 2011. V. 150. № 6. P. 1040–1047.
 99. Suksanpaisan L., Pham L., McIvor S., Russell S.J., Peng K.-W. // *Cancer Gene Ther.* 2013. V. 20. № 11. P. 638–641.
 100. Kim Y.-H., Youn H., Na J., Hong K.-J., Kang K.W., Lee D.S., Chung J.-K. // *Theranostics*. 2015. V. 5. № 1. P. 86–96.

УДК 616.379-008.64, 57.084.1, 612.349.1, 612.349.7

Сахарный диабет 2 типа: особенности патогенеза и экспериментальные модели на грызунах

И. Г. Гвазава^{1*}, М. В. Каримова¹, А. В. Васильев^{1,2}, Е. А. Воротеяк¹¹Институт биологии развития им. Н.К. Кольцова РАН, Москва, 119334 Россия²Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119991 Россия

*E-mail: gvazava.inessa@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.06.2022

Принята к печати 19.07.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11751

РЕФЕРАТ Наиболее распространенным эндокринным заболеванием в мире является сахарный диабет 2 типа (СД2). Патогенез этого заболевания сложен и не до конца выяснен. Основным инструментом изучения патофизиологии и терапии СД2 на сегодняшний день остаются исследования, проведенные на экспериментальных моделях. Грызуны считаются лучшими моделями, потому что имеют небольшой размер, отличаются легкостью индукции СД2, коротким индукционным периодом и экономической эффективностью. В данном обзоре собрана информация об используемых в настоящее время экспериментальных моделях СД2, оценены их преимущества и недостатки, подробно описаны факторы, которые следует учитывать при использовании моделей. Выбор модели, подходящей для решения конкретного вопроса, не всегда представляет тривиальную задачу и влияет на результаты исследования и их интерпретацию.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА сахарный диабет 2 типа, патогенез, инсулинорезистентность, бета-клетки, экспериментальные лабораторные животные, стрептозотоцин.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ СД – сахарный диабет; СТЗ – стрептозотоцин; ИР – инсулинорезистентность.

ВВЕДЕНИЕ

На протяжении многих десятилетий СД остается одной из первостепенных задач здравоохранения во всем мире в связи с ростом заболеваемости, инвалидизации и смертности. По данным Международной федерации диабета (IDF), в 2021 году насчитывалось 537 млн человек с диабетом, к 2030 году количество больных может достигнуть 643 млн, а фактическая распространенность сахарного диабета в разы превышает регистрируемую [1]. СД – хроническое заболевание, развивающееся в тех случаях, когда поджелудочная железа не вырабатывает достаточное количество инсулина, или когда организм не может эффективно использовать вырабатываемый им инсулин – гормон, регулирующий содержание сахара в крови. Распространенным следствием неконтролируемого СД является гипергликемия, или повышенный уровень сахара в крови, со временем приводящая к серьезному повреждению многих систем организма, особенно нервов и кровеносных сосудов [2].

Представленный обзор является логическим продолжением нашей работы, в которой обобщены данные о патогенезе СД 1 типа (СД1), как важнейший инструмент изучения СД рассмотрены наиболее часто используемые экспериментальные модели

на животных. Проанализированы и обсуждены механизмы стрептозотоциновой модели СД, как наиболее адекватной и легко воспроизводимой [3]. СД 2 типа (СД2) является наиболее распространенным эндокринным заболеванием, его диагностируют более чем у 90% больных СД. Симптомы СД2 могут быть сходными с симптомами СД1, но часто они менее выражены [2]. В этом обзоре речь пойдет о патогенетических механизмах возникновения и прогрессирования СД2 и моделировании различных звеньев этого заболевания на грызунах для использования их в поиске новых терапевтических соединений и способов лечения СД2.

СД1 и СД2 имеют многочисленные клинические, иммунологические и генетические различия. СД2 (инсулиннезависимый, или диабет взрослых) развивается в результате неэффективного использования инсулина организмом. Болезнь нередко диагностируется по прошествии нескольких лет после ее возникновения, уже после появления осложнений. СД этого типа до недавнего времени наблюдался лишь у взрослых, однако теперь он все чаще поражает и детей, поскольку детское ожирение, с которым ассоциирован СД, превратилось в эпидемию [2]. Долгое время существовало ошибочное мнение, что СД2 это

легкая форма заболевания, при которой осложнения могут и не возникнуть, но на сегодняшний день ученые твердо убеждены, что речь идет о тяжелом хроническом, постоянно прогрессирующем заболевании, при котором уже более 50% больных имеют поздние осложнения к моменту установления диагноза. Высокая распространенность СД2 среди некоторых этнических групп и родственников больных указывает на существование генетических факторов в развитии этого заболевания. За последние годы выявлено несколько вариантов генетического полиморфизма СД, однако не обнаружено какого-либо одного гена, ответственного за наиболее распространенную форму инсулиннезависимого СД. Считается, что существуют два типа СД2: с повреждением отдельных генов (10–15%) и с повреждением множества генов (85–90%), ответственных за связывание инсулина рецепторами клеток, а также за интернализацию гормон-рецепторного комплекса, за аутофосфорилирование бета-рецепторов или фосфорилирование других белковых компонентов мембран. Примером множественного повреждения может служить инсулинорезистентность (ИР) клеток, обусловленная множественными мутациями гена рецептора инсулина. В этом гене выявлено до 30 различных мутаций [4–9].

СД2 – это многофакторное заболевание, характеризующееся большой гетерогенностью метаболических нарушений, среди которых наиболее распространены недостаточная продукция инсулина, ИР и нарушение инкретиновой системы. Важно понимать мультипричинную природу СД2, которая определяется аддитивным действием генов и окружающей среды, поэтому не существует простой генетико-эпидемиологической модели, объясняющей характер наследования этого заболевания. Отсюда возникает необходимость установления доли заболевания, определяемой генами, и вклада факторов внешней среды, совокупность которых регулирует порог или уровень толерантности к развитию СД [6, 7].

Несмотря на доступность современных методов лечения, СД2 представляет актуальную проблему для системы здравоохранения во всем мире. В первую очередь, это обусловлено ростом заболеваемости, связанным с такими факторами, как старение населения и увеличение распространенности ожирения в популяции. Люди подвергаются потенциально более высокому риску развития СД2 по мере старения. Избыточная масса тела или ожирение способствуют развитию синдрома инсулинорезистентности и гипергликемии. Прогрессирующее течение СД2 означает, что для достижения и поддержания контроля гликемии недостаточно изменить образ жизни, большинству больных СД2 требуется медикаментозное лечение [4, 5].

СД2 относительно легко диагностировать при наличии симптомов. Однако, согласно данным Британского исследования диабета (UKPDS), СД2 остается не выявленным в течение многих лет. От момента начала СД2 до постановки клинического диагноза проходит от 3 до 6 лет. Поэтому раннее выявление СД2 остается актуальным, особенно у лиц, имеющих высокий риск развития этого заболевания. Более чем у половины больных на момент установления диагноза СД уже есть несколько осложнений. Выраженную ретинопатию имеют 20–40% больных. Развитие диабетических осложнений, таких, как ретинопатия, нефропатия, нейропатия, обусловлено длительно существующей гипергликемией. Этот факт указывает на необходимость и важность контроля уровня сахара в крови [2].

Патогенез СД2 сложен и не до конца выяснен. В настоящее время ключевыми звеньями патогенеза СД2 считают ИР, нарушение секреции инсулина, повышение продукции глюкозы печенью, а также наследственную предрасположенность и особенности образа жизни и питания, ведущие к ожирению. Когда секреция инсулина уже не в состоянии компенсировать ИР, развивается гипергликемия. Хотя для пациентов с СД2 и тех, кто находится в группе риска, характерна именно ИР, существуют данные о дисфункции β -клеток и связанной с этим нарушениями секреции инсулина, включая первую фазу секреции в ответ на внутривенное введение глюкозы, нарушение физиологической импульсной секреции инсулина, повышенную секрецию проинсулина, указывающую на нарушение процессинга инсулина, и накопление в островках поджелудочной железы амилоида (который в норме секретируется вместе с инсулином). Снижение массы и функции β -клеток имеет фундаментальное значение для патогенеза СД2. Потеря массы β -клеток плохо изучена, но предполагается, что ускоренная потеря β -клеток способствует развитию ИР. Предполагаемые механизмы, ответственные за потерю β -клеток при СД2, включают образование амилоида и стресс эндоплазматического ретикулума, но их относительный вклад неизвестен. Представляет интерес патология островков Лангерганса при СД2, отличающаяся поразительной гетерогенностью, так, например: многие островки Лангерганса выглядят совершенно нормально, некоторые содержат большие отложения амилоида, а другие их не содержат. Предполагается, что различный клеточный возраст β -клеток может быть одним из факторов, лежащих в основе их гетерогенности [10, 11]. Образование амилоида в островках Лангерганса, оказывая токсическое действие на гормонопродуцирующие островковые клетки, повреждает поджелудочную железу. В итоге, гиперпродукция гормонов при СД2 сменяется их

дефицитом [12–14]. Гипергликемия и сама по себе может нарушать секрецию инсулина, поскольку высокие уровни глюкозы снижают чувствительность клеток и/или нарушают их функцию (глюкозотоксичность). Эти изменения на фоне инсулинорезистентности развиваются обычно на протяжении многих лет [10, 11, 15, 16]. Важным условием развития ИР при СД2 являются ожирение и набор веса. В основе ожирения могут лежать генетические факторы, но важную роль играют также пищевые предпочтения, интенсивность физических нагрузок и образ жизни в целом. Организм не может подавить липолиз в жировой ткани, поэтому из нее высвобождаются свободные жирные кислоты, а повышение их уровня в плазме может нарушать стимулируемый инсулином транспорт глюкозы и активность гликогенсинтазы в мышцах. Жировая ткань функционирует и как эндокринный орган, секретировав в кровь множество факторов (адипоцитокинов), которые положительно (адипонектин) или отрицательно (фактор некроза опухолей-альфа, интерлейкин-6, лептин, резистин) влияют на метаболизм глюкозы. Внутривисцеральная задержка роста и низкий вес при рождении также ассоциированы с развитием инсулинорезистентности в более позднем возрасте, что может отражать неблагоприятное пренатальное влияние факторов внешней среды на метаболизм глюкозы. В настоящее время ИР в большей степени связывают с нарушением действия инсулина на пострецепторном уровне, в частности, со значительным снижением мембранной концентрации специфических транспортеров глюкозы (GLUT-4, GLUT-2, GLUT-1) [5–7, 17, 18].

Итак, согласно современным представлениям о клеточно-молекулярных механизмах СД2, ИР, или снижения биологического ответа клеток на один или несколько эффектов инсулина при его нормальной концентрации в крови, является первым звеном патогенеза этого заболевания. ИР приводит к неспособности инсулинзависимых тканей (мышечной и жировой) поглощать глюкозу плазмы крови и нарушению синтеза гликогена (полимера глюкозы) в печени. Тонкие механизмы развития инсулинорезистентности при СД2 на сегодняшний день изучены не до конца. Хотя точная основная причина инсулинорезистентности не полностью выяснена, предполагается существование ряда основных механизмов, включая окислительный стресс, воспаление, мутации рецепторов инсулина, стресс эндоплазматического ретикулума и митохондриальную дисфункцию [19–24]. Известно, что ИР влияет на активность ферментов гликолиза и глюконеогенеза, синтеза гликогена и гликогенолиза, β -окисления жирных кислот и липогенеза. Инсулин тормозит мобилизацию жиров и захват циркулирующих в крови свободных жир-

ных кислот клетками, потенцирует синтез белков практически во всех тканях, в первую очередь, в скелетных мышцах, миокарде, печени, влияет на захват и транспорт аминокислот, из которых состоят все белки, и основных ионов. В норме двухцепочечная молекула инсулина связывается со специальным рецептором, расположенным на мембране клетки и имеющим тирозинкиназный фрагмент, обладающий ферментативной активностью, что запускает процесс аутофосфорилирования тирозина с последующей активацией белков, участвующих во вторичной передаче сигнала (IRS-1 – субстрат-1 рецептора инсулина, Shc-1, SIRP- α , Gab-1, Cbl-b и др.). Белки IRS-1 активируют фосфатидилинозитолкиназу-3, которая, в свою очередь, инициирует эффект протеинкиназ В. Протеинкиназы В и С запускают каскад ферментов, регулирующих углеводный и жировой обмен, и вызывают встраивание белков-переносчиков глюкозы (GLUT-4) в мембраны инсулинзависимых клеток (адипоцитов и миоцитов). Так происходит транспорт молекул глюкозы из плазмы крови внутрь клеток [18, 19, 24, 25]. Параллельно с активацией поступления глюкозы запускаются механизмы синтеза оксида азота в эндотелиальных клетках сосудов мышечной ткани, а также интенсивного захвата аминокислот и синтеза клеточных белков, торможения процессов апоптоза. Другая группа белков вторичной передачи сигнала от рецептора инсулина (Shc-, Sos-, Ras-, Raf-, Map-) регулирует механизмы митоза и пролиферации клеток, активирует синтез медиаторов воспаления. Подробное изучение пути действия инсулина на внутриклеточные процессы позволяет представить многогранность возможных факторов развития инсулинорезистентности. Молекулярными причинами утраты способности передавать сигнал может быть подавление активности тирозинкиназы IRS-1 или фосфатидилинозитолкиназы-3, обусловленное различными мутациями гена, кодирующего рецептор инсулина. Нарушение процесса поступления глюкозы в клетку может быть вызвано снижением эффективности протеинкиназ В и С или структурной неполноценностью трансмембранного переносчика глюкозы (GLUT-4). Все перечисленные механизмы возникновения инсулинорезистентности могут быть врожденными, генетически детерминированными, они описаны для определенных синдромов. Гораздо чаще нарушение реализации биологических эффектов инсулина возникает в течение жизни под действием дополнительных факторов. Ключевым механизмом развития приобретенной инсулинорезистентности в настоящее время считается снижение тирозинкиназой активности рецептора инсулина. Доказанным фактором нарушения тирозинкиназного звена передачи внутриклеточного сигнала является мембран-

ный гликопротеин – белок РС-1, избыточно вырабатываемый клетками мышечной и жировой ткани. Блокаторы эффектов тирозинкиназы – протеинкиназа С и фактор некроза опухоли- α (ФНО- α), также интенсивно синтезируются адипоцитами [5, 18, 19].

Еще один фактор развития инсулинорезистентности – снижение активности фосфатидилинозитолкиназы-3, обусловленное дисбалансом ее субъединиц при воздействии некоторых гормонов (глюкокортикоидов, половых стероидов) или избыточного поступления в клетки свободных жирных кислот и триглицеридов, приводящего к накоплению диацилглицерина. Жировая ткань играет важную роль в энергетическом гомеостазе всего организма и регуляции метаболических функций. Она служит хранилищем избыточной энергии в виде триглицеридов в адипоцитах и контролирует мобилизацию липидов во время голодания, высвобождая свободные жирные кислоты [24, 26, 27]. С открытием таких факторов, продуцируемых адипоцитами, как лептин, адипонектин и резистин, жировая ткань признается сложным эндокринным органом. Через передачу сигналов адипокинов жировая ткань способна связываться со многими органами (печенью, поджелудочной железой, мышцами и мозгом) и модулировать системный метаболизм [27–31]. Таким образом, дисфункция жировой ткани играет важную роль в патогенезе таких метаболических нарушений, как ожирение, резистентность к инсулину и СД [32].

Помимо описанных общих механизмов нарушения реализации эффектов инсулина, важнейшую роль в возникновении инсулинорезистентности при избыточном развитии жировой ткани начинают играть биологически активные вещества, вырабатываемые адипоцитами, оказывающие глубокое влияние на системный метаболизм. Метаболиты адипоцитарного происхождения (адипоцитокины) способны влиять на различные биохимические процессы во многих органах и тканях. В настоящее время известно более 100 химических соединений подобного происхождения, многие из которых имеют прямое или опосредованное отношение к развитию инсулинорезистентности [27, 33, 34].

Пептидный гормон лептин (Lep) – один из первых идентифицированных адипоцитокинов, кодируется геном *ob* (ген ожирения) [35, 28]. Помимо адипоцитов, лептин продуцируют многие ткани и органы (печень, мышцы, яичники и др.), что свидетельствует о многообразии его биологических эффектов. Лептин занимает центральное место в контроле энергетического гомеостаза и массы тела. Наиболее изученный механизм действия гормона – стимуляция центра насыщения, расположенного в гипоталамусе. В норме Lep у млекопитающих оказывает анорексигенное, катабо-

лическое, липолитическое и гипогликемическое действие, благодаря которому формируется механизм отрицательной обратной связи. При ожирении действие Lep нарушается в результате ослабления его нормального переноса через гематоэнцефалический барьер или связывания с циркулирующей в крови формой рецептора [36, 37].

При повышении концентрации лептина в крови снижается или исчезает чувство голода. Однако при длительном и стойком повышении уровня гормона развивается лептинорезистентность – невосприимчивость клеток-мишеней гипоталамуса к его воздействию. Лептинорезистентность приводит к избыточному поступлению триглицеридов и свободных жирных кислот в клетки инсулинзависимых тканей. Таким образом возникает ИР [38].

Адипонектин вырабатывается исключительно адипоцитами и играет важную роль в регуляции метаболизма липидов и углеводов (глюкозы), повышая чувствительность жировой и мышечной ткани к инсулину. Внутриклеточные эффекты адипонектина реализуются посредством активации АМР-киназы и фосфатидилинозитолкиназы-3, регулирующих окисление свободных жирных кислот. Адипонектин снижает продукцию медиаторов воспаления (интерлейкина-6, интерлейкина-8, ФНО- α и др.), а также тканевых металлопротеаз, угнетающих функцию тирозинкиназы рецептора инсулина (IRS-1) [39–41]. Снижение уровня адипонектина при избыточном развитии жировой ткани по механизму обратной связи (уменьшение выработки гормона при достижении необходимого уровня его эффекта – создания энергетического запаса клеток) является одним из факторов развития инсулинорезистентности [42, 43].

На чувствительность жировой и мышечной ткани к инсулину влияет также адипоцитокин с изученным механизмом действия – резистин. Аналогичным эффектом обладает ангиотензиноген и ряд других гормоноподобных соединений, вырабатываемых клетками жировой ткани [44, 45].

Утрата чувствительности тканей к действию инсулина приводит к компенсаторной гиперпродукции гормона β -клетками поджелудочной железы. Повышение концентрации инсулина в плазме крови в течение какого-то времени позволяет преодолевать барьер инсулинорезистентности, сохраняя необходимый уровень поступления глюкозы в клетки. Однако постепенно резервные возможности инсулярного аппарата поджелудочной железы исчерпываются и развивается декомпенсация – СД [46].

Большое внимание уделяется развитию инновационных технологий в борьбе с распространением СД. Несмотря на огромный прогресс молекулярно-генетических исследований в области СД2 [47–52], вопро-

сы его профилактики и патогенетического лечения до сих пор не разработаны на должном уровне.

Как известно, успех теоретических исследований и разработки методов профилактики и лечения заболевания невозможен без моделирования болезни на экспериментальных животных и обусловлен правильным выбором животного. Только с помощью экспериментальных моделей, максимально соответствующих этиологии и патогенезу заболевания, можно получить сведения, ценные для понимания механизма антидиабетического действия различных агентов, с целью направленного их применения. Объективный анализ достоинств и недостатков каждой модели в соответствии с поставленной целью позволит избежать ошибочных результатов [3].

Итак, СД2 признан одним из сложных, генетически гетерогенных заболеваний человека, в патогенез которого вовлечены как наследственность, так и факторы окружающей среды в целом. СД2 изучают, моделируя заболевание на мышах и крысах. Грызуны считаются лучшим выбором среди животных моделей, потому что они относительно недороги в содержании, быстро размножаются, что позволяет изучать генетические эффекты через несколько поколений в течение разумного периода времени и, что очень важно, геном грызунов имеет более 90% сходства с геномом человека [53]. Причем, крысы более предпочтительны, чем мыши, поскольку на крысах проще проводить операции за счет их большего размера; к тому же они более устойчивы к различным заболеваниям.

В данной работе мы продолжим анализ существующих экспериментальных моделей с целью выявления наиболее адекватной и доступной модели для изучения СД, а именно СД2. Патогенез СД1 и его лабораторные модели описаны в предыдущей работе [3].

Модели СД2 на грызунах подразделяются на два основных класса: генетические, или спонтанно индуцированные, и негенетические, или экспериментально индуцированные. Как известно, негенетические модели более популярны, чем генетические, в силу их более низкой стоимости, большей доступности, более легкой индукции диабета и, конечно же, более простого содержания [3].

Поскольку СД2 характеризуется резистентностью к инсулину и неспособностью β -клеток к достаточной компенсации, модели СД2 на животных, как правило, включают моделирование резистентности к инсулину и/или недостаточности β -клеток. Многие животные модели страдают ожирением, что отражает состояние человека, при котором ожирение тесно связано с развитием СД2. Ожирение может быть результатом природных мутаций или генетических манипуляций, а также употребления пищи с высоким содержанием жиров.

ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МОДЕЛИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

Моногенные модели с ожирением

Для тестирования новых методов лечения СД2 в качестве моногенных моделей ожирения наиболее широко используются грызуны – крысы *Zucker* с диабетом и ожирением (*Zucker diabetic fatty, ZDF*) и мыши линии *Lep ob/ob*, *Lepr db/db*, характеризующиеся дефицитом рецептора лептина [36, 37]. У этих моделей при ожирении наблюдается нарушение рецепции *Lep*. Мутация гена в *LEPR* при гомозиготном состоянии делает соответствующий рецептор нефункциональным. У этих животных, с одной стороны, отсутствует влияние запасов жира на объем потребляемой пищи, что приводит к быстрому развитию ожирения даже при стандартном сбалансированном рационе. С другой стороны, нарушение процессов рецепции и интернализации *Lep* клетками ослабляет его клиренс, что приводит к резкому повышению уровня этого гормона в крови и развитию не свойственных ему в норме иммунотропных эффектов, обусловленных частичной гомологией структуры *Lep* и ряда цитокинов и хемокинов [54, 55]. В органах и тканях таких животных изменяется экспрессия большого числа генов, отвечающих за функционирование разнообразных метаболических путей, определяющих гомеостаз организма. В организме устанавливается метаболический дисбаланс. Поскольку лептин вызывает чувство сытости, недостаток функционального гормона вызывает у этих животных гиперфагию и последующее ожирение [56–58]. Эти изменения в значительной степени соответствуют изменениям у больных с алиментарным ожирением.

Линия мышей *Lep ob/ob* происходит от мышей со спонтанной мутацией, обнаруженной в беспородной колонии в лаборатории Джексона в 1949 году. Мышей с этим фенотипом скрестили с мышами C57BL/6, но только в 1994 году мутантный белок был идентифицирован как лептин [59]. К двухнедельному возрасту у этих мышей увеличивается вес и развивается гиперинсулинемия. К 4-м неделям становится очевидной гипергликемия, при этом концентрация глюкозы в крови продолжает расти, достигая пика к 3–5 месяцам, после чего снижается по мере взросления мыши. Также у них наблюдается гиперлипидемия, нарушение терморегуляции и снижение физической активности. Поджелудочная железа гипертрофирована. Несмотря на нарушение выведения инсулина, островки поддерживают секрецию, что не делает модель полностью репрезентативной для СД2 у человека. Однако у мышей линии *C57Bl/KS* развивается гораздо более тяжелый диабет с регрессом островков и ранней смертностью. Кроме того, эти мыши бесплодны [60, 61].

Линия мышей *Lepr db/db* получена в лаборатории Джексона в результате аутосомно-рецессивной мутации в рецепторе лептина. В 2-недельном возрасте у этих мышей наблюдается гиперинсулинемия, ожирение и гиперфагия проявляются с 3–4-недельного возраста, а гипергликемия развивается в 4–8-недельном возрасте. Наиболее часто используется линия мышей *C57BLKS/J*, в возрасте нескольких месяцев у них развивается кетоз, они имеют относительно короткую продолжительность жизни [62, 63].

Классической моделью для исследования ожирения, СД2, гипертонии и нарушений функции сердца служат крысы линии *Zucker*, названные так в честь патологов Луиса и Теодора Цукеров из Колумбийского университета, обнаруживших в 1961 году ген, ответственный за ожирение у крыс. Цукеры впервые после скрещивания линии крыс *Merck M* и *Sherman* выявили спонтанную рецессивную мутацию *fa* (*fatty* – жирный) в гене *Lepr*, кодирующем рецептор гормона насыщения – лептина. Мутантный рецептор лептина вызывает у этих крыс в 4-недельном возрасте ожирение [64], для них также характерны гиперинсулинемия, гиперлипидемия и гипертензия, а также нарушение толерантности к глюкозе [63]. Мутация у крыс этого штамма привела к возникновению подштамма с диабетогенным фенотипом: инбредные крысы линии *ZDF* – диабетические крысы *Zucker* с ожирением. Эти крысы менее тучны, чем крысы *Zucker* с ожирением, но имеют более выраженную резистентность к инсулину. Компенсировать резистентность из-за повышенного уровня апоптоза в β -клетках этих животных не удается [65]. Наблюдается гиперинсулинемия в возрасте примерно 8 недель с последующим снижением уровня инсулина [66]. Диабет обычно развивается в возрасте около 8–10 недель у самцов, у самок явный диабет не развивается. У этих крыс также обнаруживаются признаки диабетических осложнений [63].

Полигенные модели с ожирением

Полигенные модели ожирения, в отличие от описанных моногенных моделей, могут дать более точную модель состояния человека. Известны многочисленные полигенные мышинные модели ожирения, непереносимости глюкозы и диабета, что дает возможность детального изучения различных генотипов и их восприимчивости. Однако у полигенных моделей (в отличие от моногенных) нет контролей дикого типа и наблюдается половой диморфизм с предпочтением мужских особей [67]. Полигенные модели: мыши *KK* и *KK AY*, крысы *OLETF*, мышь *NZO* и др. характеризуются гипергликемией, вызванной ожирением, тяжелой гиперинсулинемией и резистентностью к инсулину как в мышечной, так и в жировой ткани, выраженными изменениями в панкреатических остров-

ках – от гипертрофии и дегрануляции до фиброза и замещения их соединительной тканью [67–70]. Ряд работ, посвященных устранению симптомов СД2, изучению взаимосвязи ожирения и гомеостаза глюкозы, а также диабетических осложнений, сделаны с использованием полигенных моделей [71–86].

Модели с индуцированным ожирением

Диета с высоким содержанием жира приводит к ожирению. Впервые модель кормления мышей *C57BL/6* пищей с высоким содержанием жира была описана в 1988 году [87]. Показано, что мыши, получавшие корм с высоким содержанием жиров (около 60%), уже через неделю могут весить больше, чем контрольная группа, получавшая стандартный корм. Использование этой диеты в течение нескольких недель вызывает более выраженное увеличение веса, связанное с резистентностью к инсулину, а отсутствие компенсации β -клеток приводит к нарушению толерантности к глюкозе [88]. Считается, что в этой модели ожирение обусловлено внешним воздействием, а не генами, поэтому оно более точно соответствует заболеванию у людей, чем генетические модели диабета, вызванного ожирением. Показано, что у трансгенных или нокаутных моделей, которые могут не проявлять явного диабетического фенотипа в нормальных условиях, корм с высоким содержанием жиров приводит к тому, что β -клетки как бы «подталкиваются» и ген приобретает значение. Восприимчивость к метаболическим изменениям, вызванная диетой, зависит от линии мышей. Так, при использовании более устойчивого штамма эффекты могут быть упущены [89–95]. Например, для инбредной линии мышей *C57BL/6* характерна гетерогенность реакции на корм с высоким содержанием жиров. Но дифференциальные ответы на рацион с высоким содержанием жиров не являются обязательными даже в случае чисто генетических крыс и мышей [96].

Для изучения СД2 используют грызунов, определяемых как **полезные модели**. К ним относятся пустынная песчанка (*Psammomys obesus* – впервые обнаруженная в 1960 году) и недавно описанная нильская травяная крыса (*Arvicanthis niloticus*) [97]. У большинства из этих животных, содержащихся в неволе на обычной диете в течение года, спонтанно развивается диабет, который прогрессирует от стадии легкой гипергликемии с гиперинсулинемией до тяжелой гипергликемии с гипoinsулинемией и кетоацидозом. Прогрессирование от стадии к стадии можно предотвратить, ограничивая потребление пищи, но восстановление после финальной гипергликемической и инсулинопенической стадии невозможно. У этих грызунов, несмотря на то, что они не гиперфагичны, постоянная доступность высоко-

калорийного корма приводит к развитию ожирения, дислипидемии, гипергликемии и другим признакам диабета и метаболического синдрома, таким, как снижение массы β -клеток, атеросклероз и стеатоз печени. Предполагается, что из-за плохой адаптации к избыточному питанию *P. obesus* может представлять собой идеальную модель эффекта «гена бережливости», благодаря которому у животного после быстрого перехода от дефицита корма к избытку часто развивается ИР и метаболический синдром. Эти животные являются ценной спонтанной моделью для исследований, направленных на предотвращение диабета, вызванного пищевым рационом, и представляют собой новую систему взаимодействий между генами и рационом, влияющую на использование энергии. Эта модель позволит лучше понять подходы к профилактике и лечению СД2 и метаболического синдрома [97–101].

Модели без ожирения

Однако не все пациенты с СД2 страдают ожирением и, конечно, в этой связи необходимо моделирование СД2 на животных без ожирения с нарушениями в функционировании β -клеток [102]. Наиболее известной моделью СД2 без ожирения являются крысы *Гото-Какидзаки* (*GK*) [103]. Эта модель получена путем многократного скрещивания крыс *Wistar*, характеризующихся наихудшей толерантностью к глюкозе. Предполагается, что развитие резистентности к инсулину не является основным инициатором гипергликемии в этой модели, а нарушение метаболизма глюкозы считается следствием aberrантной массы β -клеток [104] и/или их функции [105]. Влияние морфологии островков Ларгенганса поджелудочной железы на их метаболизм в разных колониях этих крыс различается. Так, например, в некоторых из них (колонии крыс из Стокгольма и Далласа) объем и плотность β -клеток сходны с контролем, по видимому, гипергликемия у них вызвана дефектами секреции инсулина, в парижской же колонии крыс *GK* наблюдалось снижение массы β -клеток [105]. *GK* является одной из наиболее хорошо охарактеризованных животных моделей спонтанного СД2, пригодной для изучения важных аспектов заболевания. Предполагается, что дефектная масса и функция β -клеток в модели *GK* отражают сложные взаимодействия множества патогенных факторов. В число этих факторов входят несколько независимых локусов, содержащих гены, ответственные за некоторые диабетические признаки (но не снижение массы β -клеток); гестационное метаболическое нарушение, индуцирующее эпигенетическое программирование поджелудочной железы (снижение неогенеза и/или пролиферации β -клеток), которое передается следующему поколению; и потеря дифференцировки

β -клеток из-за хронического воздействия гипергликемии/гиперлипидемии, медиаторов воспаления, окислительного стресса и нарушенной микроархитектоники островков [101]. Крыс *GK* использовали как для изучения дисфункции β -клеток при СД2 [106–109], так и диабетических осложнений [110, 111]

Мыши *hIAPP*. Для СД2 человека характерно образование амилоида в ткани островков, происходящих из амилоидного полипептида островков (*IAPP*) [10, 112, 113]. Кроме человека и макаков, амилоид образуется в ткани островков поджелудочной железы у кошек, что делает их хорошей моделью для изучения амилоидоза островков. Этот аспект заболевания на грызунах обычно не моделируют, поскольку *IAPP* грызунов не является амилоидогенным [11, 12, 114, 115]. Однако созданы трансгенные мыши, экспрессирующие *IAPP* (*hIAPP*) человека под инсулиновым промотором, у которых амилоид может образовываться внутри островков. С использованием большого количества моделей *hIAPP* показано, что повышение экспрессии *hIAPP* увеличивает токсичность β -клеток [116]. Кроме того, реплицирующиеся β -клетки более восприимчивы к токсичности *hIAPP*, поэтому в этой модели ограничена адаптация β -клеток к повышенной потребности в инсулине [117].

Нокаутные и трансгенные мыши также используются для создания специфических моделей СД2. Эти модели стали мощным инструментом в выяснении влияния специфических генов на метаболизм глюкозы и патогенез заболевания [63, 118]. С помощью нокаутных и трансгенных мышей получено понимание того, какие факторы транскрипции участвуют в развитии поджелудочной железы и каковы пути передачи сигналов инсулина. Тканеспецифические нокауты оказались особенно полезными при изучении передачи сигналов инсулина, поскольку мыши с глобальным нокаутом рецептора инсулина нежизнеспособны [119–123].

Хотя СД2 является наиболее распространенной формой диабета, однако проблем с разработкой модели на животных при СД2 больше, чем при СД1. Генетические модели, как например, диабетическая крыса *Zucker* с ожирением и мышь *db/db*, возможно, наиболее близки к заболеванию у человека. Тем не менее, использование этих моделей ограничено, поскольку они имеют некоторые важные отличия и не точно моделируют СД2 у человека [124], а, кроме того, имеют высокую стоимость.

СТРЕПТОЗОТОЦИНОВЫЕ МОДЕЛИ САХАРНОГО ДИАБЕТА 2 ТИПА

Стрептозотоциновые модели (СТЗ СД2) являются наиболее часто используемыми моделями СД2 на жи-

вотных. Разработаны две потенциально полезные модели СТЗ СД2. Модель с одновременным введением никотинамида крысам для частичной защиты β -клеток от СТЗ [125] основана на том, что никотинамид защищает от диабетогенного эффекта СТЗ [126, 127]. Эта комбинация создает модель инсулиндефицитного, но не инсулинрезистентного СД2, характеризующегося стабильной умеренной гипергликемией, связанной примерно с 60% потерей функции β -клеток [125, 128]. При использовании этого протокола у 75–80% животных развивается умеренная гипергликемия не натощак, а у остальных животных либо через 2–3 недели развивается сильная гипергликемия, либо они остаются нормогликемическими, но с нарушенной толерантностью к глюкозе. Тот же протокол можно использовать для мышей. Необходимо помнить, что решающее значение имеют доза СТЗ и время между введением никотинамида и СТЗ. Так, если доза СТЗ слишком высока или задержка времени между введением никотинамида и СТЗ слишком велика, то будет наблюдаться большой дефицит инсулина [129].

Поскольку у большинства пациентов с СД2 в дополнение к нарушенной секреции инсулина наблюдается резистентность к инсулину, была разработана другая модель, позволяющая более точно имитировать состояние человека. В этом случае для развития резистентности к инсулину животные получали корм с высоким содержанием жиров с последующим введением умеренных доз СТЗ для снижения функции β -клеток [130]. В результате получали гипергликемию, связанную с гиперинсулинемией и резистентностью к инсулину [131]. Рекомендуемая диета обеспечивает 60% своей калорийности в виде жира; следует использовать коммерческую сбалансированную диету, а не добавлять жиры к стандартному корму [132]. Использование диеты с высоким содержанием жиров для индукции резистентности к инсулину с последующим приемом малых и средних доз СТЗ для развития дефицита инсулина от легкой до умеренной степени в настоящее время может быть наиболее полезной из моделей СД2. Животные, содержащиеся на диете с высоким содержанием жиров, обычно считаются лучшей моделью для характеристики многих осложнений, связанных с диабетом человека [133].

Доза СТЗ должна вызывать стабильную гипергликемию у крыс, получавших высокожировую диету в течение по крайней мере 130 дней. Если доза СТЗ слишком велика, то получается модель, более похожая на СД1, и смертность крыс увеличивается [134]. Использование двух более низких доз СТЗ (30 мг/кг, внутривентриально), вводимых с недельными интервалами, приводит к развитию диабета у 85% животных со средним уровнем глю-

козы в крови натощак ~14 ммоль/л (~252 мг/дл) [134]. Другие экспериментаторы рекомендуют вводить 30 мг/кг СТЗ внутривентриально в качестве оптимальной дозы для 12-недельных крыс *Sprague-Dawley*, получавших диету с высоким содержанием жиров в течение 8 недель [135].

Как известно, попадая в кровоток, СТЗ переносится в β -клетки поджелудочной железы с помощью белка-транспортера глюкозы 2 (GLUT-2). Внутри β -клеток СТЗ прерывает ряд важных клеточных процессов и, если повреждение достаточно, достигает кульминации в повреждении ДНК и гибели клеток [3, 136, 137]. Конечным результатом введения СТЗ является снижение функциональной массы β -клеток, что проявляется дефицитом инсулина и последующей неспособностью обрабатывать глюкозу [137]. Сочетание недостаточности инсулина с высокожированной диетой, при которой требуется повышенное содержание инсулина для учета клеточной резистентности к инсулину [138, 139], приводит к состоянию непереносимости глюкозы [140], характерному для СД2 у человека. Непрерывное слабо выраженное поражение β -клеток вызывает более устойчивые и последовательные высокоточные эффекты, чем однократная большая доза. Так, введение СТЗ с помощью осмотических мини-насосов, в отличие от внутривентриального или внутривенного введения, обеспечивает значительно больший контроль над результирующим уровнем гипергликемии при сохранении фенотипа ожирения [141]. Авторы заключили, что наблюдаемое общее повышение эффективности связано, вероятнее всего, с длительным воздействием на β -клетки. Кроме того, дозозависимый эффект СТЗ обусловлен реципрокным снижением секреторной способности инсулина и морфологическими изменениями поджелудочной железы. Считается, что эта модель способна воспроизводить различные стадии СД2, определяемые дозозависимым действием СТЗ на непереносимость глюкозы. Этот метод требует меньшего количества животных для наблюдения значительных эффектов, чем методы, использованные ранее [142, 143], где животные либо не реагируют на СТЗ, либо умирают в зависимости от дозы препарата [141].

Как замечено нами ранее, несмотря на большое разнообразие описанных на сегодняшний день животных моделей СД, предпочтение отдается СТЗ-индуцированному диабету. Механизм действия СТЗ, дозы и способы введения, видовые и гендерные различия в чувствительности к СТЗ подробно описаны в первой части нашей работы [3]. Преимущество индуцированного СТЗ диабета заключается в относительной простоте воспроизведения, высокой избирательности воздействия, возможности «получения»

диабета различной степени тяжести и длительности, что позволяет смоделировать как постепенно развивающуюся дисфункцию β -клеток, так и нарушение толерантности к глюкозе, и развитие связанных с ней расстройств [3].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, важно подчеркнуть, что длительное течение СД2 у человека затрудняет моделирование болезни, необходимы дополнительные модели и методологии на животных. Очень важна разработка моделей на животных, которые точно воспроизводят патогенез СД2 у человека, поскольку это позволит определить профилактические и терапевтические стратегии, направленные на СД2 и на связанные с ним осложнения. При СД2 важно учитывать механизмы, лежащие в основе гипергликемии, и их отношение к исследованию. Эти механизмы могут включать резистентность к инсулину и/или недостаточность β -клеток. В самом деле, определение того, может ли медикаментозное вмешательство уменьшить симптомы в любой данной модели, может зависеть от того, отказали ли β -клетки. Модели также различаются по своей физиологической значимости, при этом некоторые из них больше напоминают развитие болезни, чем другие. Такие модели, как регенерация поджелудочной железы, довольно экстремальны, и еще предстоит выяснить, могут ли механизмы экспансии β -клеток в этих моделях иметь значение в развитии СД у человека.

Выбор модели зависит от цели исследования. Модели на лабораторных животных, полезные для оценки потенциальных антидиабетических средств, а также для изучения осложнений, вызванных диабетом, имеют ограниченную конструктивную валидность, поэтому они менее применимы в качестве инструментов для определения этиологии состояния [144].

Моделирование диабета на крысах и мышках имеет явные преимущества перед другими видами, включая размер животных, короткий индукционный период, легкость индукции состояния и экономическую эффективность [145]. Мыши как экспериментальные животные внесли огромный вклад в понимание биологии человека. Мышиные модели широко используются для изучения заболеваний человека из-за генетической гомологии [107]. Что касается диабета, то мышиные модели являются бесценными для изучения ожирения и СД2, определения роли воспаления, резистентности к инсулину, потенциальных методов лечения [146–148]. Крыс часто используют в качестве модели для понимания метаболического профиля и патологий, связанных с разными стадиями СД2 [149]. Крыса как экспе-

риментальная модель болезней человека обладает большими преимуществами перед мышами и другими грызунами [150]. За физиологией грызунов проще следить и накапливать объем информации [142]. Однако, чтобы получить представления о разнообразных проявлениях диабета у пациентов, крайне желательно использовать множество различных моделей. Следует исследовать более одного вида или штамма грызунов, а также учитывать пол животного, поскольку многие модели, описанные выше, например, крысы *Zucker* и *OLETF* или мышь *NZO*, а также многие нокаутные и трансгенные модели диабета характеризуются половым диморфизмом, что не наблюдается у людей [151]. Высказано предположение, что в некоторых случаях это связано с действием половых гормонов [152], хотя точный механизм полового диморфизма не выяснен. В самом деле, эффекты половых гормонов могут различаться в разных моделях мышей, например, гонадэктомия у самцов защищает от диабета в одних моделях и неэффективна или увеличивает заболеваемость в других [151]. Половой диморфизм может также включать различия в митохондриях и реакциях на стресс [151]. При использовании нокаутных и трансгенных мышей следует исключить наличие гипоталамического синдрома и его влияние на фенотип, необходимы соответствующие контроли.

Экспериментальные модели широко используются для изучения лекарственных препаратов и механизмов, лежащих в основе нарушения обмена веществ. Поскольку распространенность и осложнения СД постоянно увеличиваются во всем мире, модели диабета играют ключевую роль в изучении патогенеза диабета и таких его осложнений у человека, как ретинопатия, нефропатия, кардиомиопатия и невропатия. Несмотря на все преимущества этих животных в разработке новых лекарственных средств, они обладают индивидуальными ограничениями, которые также будут ограничивать разработку новых лекарств и терапевтических вмешательств. Для изучения СД2 обычно используют животных с ожирением и без ожирения, с гипергликемией, резистентностью к инсулину и резистентностью β -клеток. Поскольку экспериментальные модели различаются по своему физиологическому назначению и используются для изучения различных осложнений СД2 у человека, необходимо с большой осторожностью подходить к выбору модели для конкретного исследования. Наряду с моделями, используемыми для выяснения механизмов, лежащих в основе СД, при разработке и уточнении новых методов лечения в настоящее время применяют различные животные модели, большинство из которых позволяют изучать некоторые специфические аспекты диабета,

но могут быть малоприменимы в других исследованиях. У всех моделей есть свои плюсы и минусы, и выбор модели, подходящей в конкретном случае, не всегда прост, поскольку влияет на результаты исследования и их интерпретацию. При выборе модели для СД крайне желательно, чтобы множество различных моделей использовалось для представления разнообразия, наблюдаемого у пациентов с диабетом. Число доступных моделей постоянно растет, и важно учитывать их потенциальную роль в различных аспектах изучения диабета.

Таким образом, несмотря на многообразие биологических моделей, открытой остается проблема точного соответствия большинства экспериментальных моделей процессам, протекающим в организме человека. Важно, чтобы результаты, полученные при экс-

периментальном моделировании с использованием лабораторных животных, представляли собой систему доказательств, которые с определенной степенью вероятности могли быть распространены на человека.

Тем не менее, необходимо подчеркнуть, что, хотя вопрос о том, в какой степени результаты, полученные на биомоделях, можно экстраполировать на организм человека, является одновременно и важнейшим, и сложнейшим, основным инструментом изучения патофизиологии и подходов к терапии СД остается использование экспериментальных моделей [153]. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке
Министерства высшего образования
и науки Российской Федерации, соглашение
№ 075-15-2021-1075 от 28.09.2021 г.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. IDF Diabetes Atlas 10 th Edition.
2. Информационный бюллетень ВОЗ № 312, апрель 2016 г.
3. Гвазава И.Г., Петракова О.С., Роговая О.С., Борисов М.А., Терских В.В., Воротеляк Е.А., Васильев А.В. // *Acta Naturae*. 2018. Т. 10. № 1 (36). С. 25–35.
4. Дедов И.И., Шестакова М.В., Галстян Г.Р. // *Сахарный диабет*. 2016. Т. 19. № 2. С. 104–112.
5. Дедов И.И., Ткачук В.А., Гусев Н.Б., Ширинский В.П., Воротников А.В., Кочегура Т.Н., Майоров А.Ю., Шестакова М.В. // *Сахарный диабет*. 2018. Т. 21. № 5. С. 364–375.
6. Балаболкин М.И. // *Медицинская кафедра*. 2004. Т. 1. № 9. С. 48–57.
7. Zheng Y., Ley S.H., Hu F.B. // *Nat. Rev. Endocrinol*. 2018. V. 14. P. 88–98.
8. Permutt M.A., Wasson J., Cox N. // *J. Clin. Invest*. 2005. V. 115. № 6. P. 1431–1439.
9. De Rosa M.C., Glover H.J., Stratigopoulos G., LeDuc C.A., Su Q., Shen Y., Sleeman M.W., Chung W.K., Leibel R.L., Altarejos J.Y. // *JCI Insight*. 2021. V. 6. № 16. P. 149137–149155.
10. Weir G.C., Bonner-Weir S. // *Ann. N.Y. Acad. Sci*. 2013. V. 1281. P. 92–105.
11. Aguayo-Mazzucato C., van Haaren M., Mruk M., Lee Jr. T., Crawford C., Hollister-Lock J., Sullivan B.A., Johnson J.W., Ebrahimi A., Dreyfuss J.M., Deursen J.V., Weir G.C., Bonner-Weir S. // *Cell Metab*. 2017. V. 25. № 4. P. 898–910.
12. Gudkova A.Y., Antimonova O.I., Shavlovsky M.M. // *Med. Acad. J*. 2019. V. 19. № 2. P. 27–36.
13. Sevcuka A., White K., Terry C. // *Life (Basel)*. 2022. V. 12. № 4. P. 583–602.
14. Bhowmick D.C., Singh S., Trikha S., Jeremic A.M. // *Handb. Exp. Pharmacol*. 2018. V. 245. P. 271–312.
15. Mukherjee N., Lin L., Contreras C.J., Templin A.T. // *Metabolites*. 2021. V. 11. № 11. P. 796–825.
16. Hu F., Qiu X., Bu S. // *Arch. Physiol. Biochem*. 2020. V. 126. № 3. P. 235–241.
17. Tokarz V.L., MacDonald P.E., Klip A. // *J. Cell. Biol*. 2018. V. 217. № 7. P. 2273–2289.
18. Thurmond D.C., Pessin J.E. // *Mol. Membr. Biol*. 2001. V. 18. № 4. P. 237–245.
19. Yaribeygi H., Farrokhi F.R., Butler A.E., Sahebkar A. // *J. Cell. Physiol*. 2019. V. 234. № 6. P. 81528161–81528170.
20. Bitar M.S., Al-Saleh E., Al-Mulla F. // *Life Sci*. 2005. V. 77. № 20. P. 2552–2573.
21. Sarparanta J., Garcia-Macia M., Singh R. // *Curr. Diabetes Rev*. 2017. V. 13. № 4. P. 352–369.
22. Latouche C., Natoli A., Reddy-Luthmoodoo M., Heywood S.E., Armitage J.A., Kingwell B.A. // *PLoS One*. 2016. V. 11. № 5. P. e0155108.
23. Hasnain S.Z., Prins J.B., McGuckin M.A. // *J. Mol. Endocrinol*. 2016. V. 56. № 2. P. 33–54.
24. Ткачук В.А., Воротников А.В. // *Сахарный диабет*. 2014. Т. 17. № 2. С. 29–40.
25. Hirabara S.M., Gorjão R., Vinolo M.A., Rodrigues A.C., Nachbar R.T., Curi R. // *J. Biomed. Biotechnol*. 2012. V. 2012. P. 379024–379040.
26. Rosen E.D., Spiegelman B.M. // *Cell*. 2014. V. 156. № 1–2. P. 20–44.
27. Luo L., Liu M. // *J. Endocrinol*. 2016. V. 31. № 3. P. 77–99.
28. Friedman J.M., Halaas J.L. // *Nature*. 1998. V. 395. № 6704. P. 763–770.
29. Giralt M., Cereijo R., Villarroya F. // *Handb. Exp. Pharmacol*. 2016. V. 233. P. 265–282.
30. Scherer P.E. // *Diabetes*. 2006. V. 6. P. 1537–1545.
31. Stern J.H., Rutkowski J.M., Scherer P.E. // *Cell Metab*. 2016. V. 23. № 5. P. 70–84.
32. Flenkenthaler F., Ländström E., Shashikadze B., Backman M., Blutke A., Philippou-Massier J., Renner S., Hrabe de Angelis M., Wanke R., et al. // *Front. Med*. 2021. V. 8. P. 751277–751289.
33. Rajala M.W., Lin Y., Ranalletta M., Yang X.M., Qian H., Gingerich R., Barzilai N., Scherer F.E. // *Mol. Endocrinol*. 2002. V. 16. № 8. P. 1920–1930.
34. Kharitonov A., Shiyanova T.L., Koester A., Ford A.M., Micanovic R., Galbreath E.J., Sandusky G.E., Hammond L.J., Moyers J.S., Owens R.A., et al. // *J. Clin. Invest*. 2005. V. 115. № 6. P. 1627–1635.
35. Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M. // *Nature*. 1994. V. 372. № 6505. P. 425–532.
36. Schaab M., Kratzsch J. // *Best Pract. Res. Clin. Endocrinol. Metab*. 2015. V. 29. № 5. P. 661–670.
37. Trusov N.V., Apryatin S.A., Gorbachev A.Yu., Naumov V.A., Mzhelskaya K.V., Gmoshinski I.V. // *Problems Endocrinol*. 2018. V. 64. № 6. P. 371–382.
38. Scherer P.E. // *Diabetes*. 2016. V. 65. № 6. P. 1452–1461.
39. Chawla A., Nguyen K.D., Goh Y.P. // *Nat. Rev. Immunol*. 2011. V. 11. P. 738–749.
40. Hotamisligil G.S., Shargill N.S., Spiegelman B.M. // *Science*.

1993. V. 259. P. 87–91.
41. Cai Z., Huang Y., He B. // *Cells*. 2022. V. 11. № 9. P. 1424–1437.
 42. Turer A.T., Khara A., Ayers C.R., Turer C.B., Grundy S.M., Vega G.L., Scherer P.E. // *Diabetologia*. 2011. V. 54. № 10. P. 2515–2524.
 43. Ahl S., Guenther M., Zhao Sh., James R., Marks J., Szabo A., Kidambi S. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2015. V. 100. № 11. P. 4172–4180.
 44. Rajala M.W., Lin Y., Ranalletta M., Yang X.M., Qian H., Gingerich R., Barzilay N., Philipp E., Scherer Ph.E. // *Mol. Endocrinol.* 2002. V. 16. № 8. P. 1920–1930.
 45. Stepan C.M., Bailey S.T., Bhat S., Brown E.J., Banerjee R.R., Wright C.M., Patel H.R., Ahima R.S., Lazar M.A. // *Nature*. 2001. V. 409. № 6818. P. 307–312.
 46. Aguilar-Salinas C.A., García E., Robles L., Riaño D., Ruiz-Gomez D.G., García-Ulloa A.C., Melgarejo M.A., Zamora M., Guillen-Pineda L., Mehta R., et al. // *J. Clin. Endocrinol. Metab.* 2008. V. 93. № 10. P. 4075–4079.
 47. Stefan N. // *Lancet Diabetes Endocrinol.* 2020. V. 8. № 7. P. 616–627.
 48. Schleinitz D., Krause K., Wohland T., Gebhardt C., Linder N., Stumvoll M., Blüher M., Bechmann I., Kovacs P., Gericke M., Tönjes A. // *Eur. J. Hum. Genet.* 2020. V. 28. № 12. P. 1714–1725.
 49. Raajendiran A., Krisp C., De Souza D.P., Ooi G., Burton P., Taylor R.A., Molloy M.P., Watt M.J. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2021. V. 320. № 6. P. 1068–1084.
 50. Gastaldelli A., Gaggini M., DeFronzo R. // *Curr. Opin. Clin. Nutr. Metab. Care*. 2017. V. 20. № 4. P. 300–309.
 51. Guilherme A., Henriques F., Bedard A.H., Czech M.P. // *Nat. Rev. Endocrinol.* 2019. V. 15. № 4. P. 207–225.
 52. Duvnjak L., Duvnjak M. // *J. Physiol. Pharmacol.* 2009. V. 60. Suppl. 7. P. 19–24.
 53. Gibbs R.A., Weinstock G.M., Metzker M.L., Muzny D.M., Sodergren E.J., Scherer S., Scott G., Steffen D., Worley K.C., Burch P.E., et al. // *Nature*. 2004. V. 428. P. 493–521.
 54. Lopez-Jaramillo P., Gomez-Arbelaes D., Lopez-Lopez J., López-López C., Martínez-Ortega J., Gómez-Rodríguez A., Triana-Cubillos S. // *Horm. Mol. Biol. Clin. Investig.* 2014. V. 18. № 1. P. 37–45.
 55. Perez-Perez A., Vilarino-Garcia T., Fernandez-Riejos P., Martín-González J., Segura-Egea J.J., Sánchez-Margalet V. // *Cytokine Growth Factor Rev.* 2017. V. 35. P. 71–84.
 56. Yoshida S., Tanaka H., Oshima H., Yamazaki T., Yonetoku Y., Ohishi T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2010. V. 400. № 4. P. 745–751.
 57. Gault V.A., Kerr B.D., Harriott P., Flatt P.R. // *Clin. Sci. (London)*. 2011. V. 121. P. 107–117.
 58. Park J.S., Rhee S.D., Kang N.S., Jung W.H., Kim H.Y., Kim J.H. // *Biochem. Pharmacol.* 2011. V. 81. P. 1028–1035.
 59. Zhang Y., Proenca R., Maffei M., Barone M., Leopold L., Friedman J.M. // *Nature*. 1994. V. 372. P. 425–432.
 60. Lindstrom P. // *Scientificworld Journal*. 2007. V. 7. P. 666–685.
 61. Fang J.Y., Lin C.H., Huang T.H., Chuang S.Y. // *Nutrients*. 2019. V. 11. P. 530–573.
 62. Chen H., Charlat O., Tartaglia L.A., Woolf E.A., Weng X., Ellis S.J., Lakey N.D., Culpepper J., Moore K.J., Breitbart R.E. // *Cell*. 1996. V. 84. P. 491–495.
 63. King A.J.F. // *Br. J. Pharmacol.* 2012. V. 166. № 3. P. 877–894.
 64. Phillips M.S., Liu Q., Hammond H.A., Dugan V., Hey P.J., Caskey C.J., Hess J.F. // *Nat. Genet.* 1996. V. 13. P. 18–19.
 65. Pick A., Clark J., Kubstrup C., Levisetti M., Pugh W., Bonner-Weir S., Polonsky K.S. // *Diabetes*. 1998. V. 47. P. 358–364.
 66. Shibata T., Takeuchi S., Yokota S., Kakimoto K., Yonemori F., Wakitani K. // *Br. J. Pharmacol.* 2000. V. 130. P. 495–504.
 67. Leiter E.H. // *Methods Mol. Biol.* 2009. V. 560. P. 1–17.
 68. Chakraborty G., Thumpayil S., Lafontant D.E., Woubneh W., Toney J.H. // *Lab. Anim. (N.Y.)*. 2009. V. 38. P. 364–368.
 69. Kawano K., Hirashima T., Mori S., Natori T. // *Diabetes. Res. Clin. Pract.* 1994. V. 24. (Suppl.). P. 317–320.
 70. Clee S.M., Attie A.D. // *Endocr. Rev.* 2007. V. 28. P. 48–83.
 71. Chen W., Zhou X.B., Liu H.Y., Xu C., Wang L.L., Li S. // *Br. J. Pharmacol.* 2009. V. 157. P. 724–735.
 72. Fukaya N., Mochizuki K., Tanaka Y., Kumazawa T., Jiuxin Z., Fuchigami M., Toshinao Goda T. // *Eur. J. Pharmacol.* 2009. V. 624. P. 51–57.
 73. Mochizuki K., Fukaya N., Tanaka Y., Fuchigami M., Goda T. // *Metabolism*. 2011. V. 60. № 116. P. 1560–1565.
 74. Guo K., Yu Y.H., Hou J., Zhang Y. // *Nutr. Metab. (London)*. 2010. V. 7. P. 57–68.
 75. Jia D., Yamamoto M., Otani M., Otsuki M. // *Metabolism*. 2004. V. 53. № 4. P. 405–413.
 76. Ishiyama S., Kimura M., Nakagawa T., Fujimoto Y., Uchimura K., Kishigami S., Mochizuki K. // *Front. Endocrinol. (Lausanne)*. 2021. V. 1. P. 746838–746845.
 77. Kottaisamy C.P.D., Raj D.S., Prasanth Kumar V., Sankaran U. // *Lab. Anim. Res.* 2021. V. 37. № 1. P. 23–35.
 78. Loza-Rodríguez H., Estrada-Soto S., Alarcón-Aguilar F.J., Huang F., Aquino-Jarquín G., Fortis-Barrera Á., Giacomán-Martínez A., Almanza-Pérez J.C. // *Eur. J. Pharmacol.* 2020. V. 883. P. 173252–173260.
 79. Yoshinari O., Igarashi K. // *Br. J. Nutr.* 2011. V. 106. P. 995–1004.
 80. Xu T.Y., Chen R.H., Wang P., Zhang R.Y., Ke S.F., Miao C.Y. // *Clin. Exp. Pharmacol. Physiol.* 2010. V. 37. № 4. P. 441–446.
 81. Itoh T., Kobayashi M., Horio F., Furuichi Y. // *Nutrition*. 2009. V. 25. № 2. P. 134–141.
 82. Kluth O., Mirhashemi F., Scherneck S., Kaiser D., Kluge R., Neschen S., Joost H.G., Schürmann A. // *Diabetologia*. 2011. V. 54. P. 605–616.
 83. Lee M.Y., Shim M.S., Kim B.H., Hong S.W., Choi R., Lee E.Y., Nam S.M., Kim G.W., Shin J.Y., Shin Y.G., et al. // *Diabetes. Metab. J.* 2011. V. 35. P. 130–137.
 84. Choi R., Kim B.H., Naowaboot J., Lee M.Y., Hyun M.R., Cho E.J., Lee E.S., Lee E.Y., Yang Y.C., Chung C.H., et al. // *Exp. Mol. Med.* 2011. V. 43. № 12. P. 676–683.
 85. Fang R.C., Kryger Z.B., Buck D.W., De la Garza M., Galiano R.D., Mustoe T.A. // *Wound. Repair. Regen.* 2010. V. 18. P. 605–613.
 86. Rai V., Moellmer R., Agrawal D.K. // *Mol. Cell. Biochem.* 2022. V. 477. № 4. P. 1239–1247.
 87. Surwit R.S., Kuhn C.M., Cochrane C., McCubbin J.A., Feinglos M.N. // *Diabetes*. 1988. V. 37. P. 1163–1167.
 88. Winzell M.S., Ahren B. // *Diabetes*. 2004. V. 53. Suppl. 3. P. 215–219.
 89. Surwit R.S., Feinglos M.N., Rodin J., Sutherland A., Petro A.E., Opara E.C., Kuhn C.M., Rebuffé-Scrive M. // *Metabolism*. 1995. V. 44. P. 645–651.
 90. Bachmanov A.A., Reed D.R., Tordoff M.G., Price R.A., Beauchamp G.K. // *Physiol. Behav.* 2001. V. 72. P. 603–613.
 91. Scalfani A. // *Physiol. Behav.* 2007. V. 16. № 90 (4). P. 602–611.
 92. Almindi K., Kahn C.R. // *Diabetes*. 2004. V. 53. P. 3274–3285.
 93. Torre-Villalvazo I., Cervantes-Pérez L.G., Noriega L.G., Jiménez J.V., Uribe N., Chávez-Canales M., Tovar-Palacio C., Marfil-Garza B.A., Torres N., Bobadilla N.A., et al. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2018. V. 314. № 1. P. 53–65.
 94. Lackey D.E., Lazaro R.G., Li P., Johnson A., Hernandez-Carretero A., Weber N., Vorobyova I., Tsukomoto H., Osborn O. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2016. V. 311. № 6. P. 989–997.
 95. Pereira-Silva D.C., Machado-Silva R.P., Castro-Pinheiro C., Fernandes-Santos C. // *Int. J. Exp. Pathol.* 2019. V. 100. № 3. P. 153–160.

96. Burcelin R., Crivelli V., Dacosta A., Roy-Tirelli A., Thorens B. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2002. V. 282. P. 834–842.
97. Noda K., Melhorn M.I., Zandi S., Frimmel S., Tayyari F., Hisatomi T., Almulki L., Pronczuk A., Hayes K.C., Hafezi-Moghadam A., et al. // *FASEB J.* 2010. V. 24. P. 2443–2453.
98. Noda K., Nakao S., Zandi S., Sun D., Hayes K.C., Hafezi-Moghadam A. // *FASEB J.* 2014. V. 28. № 5. P. 2038–2046.
99. Sinasac D.S., Riordan J.D., Spiezio S.H., Yandell B.S., Croniger C.M., Nadeau J.H. // *Int. J. Obes. (London)*. 2016. V. 40. № 2. P. 346–355.
100. Pirmardan R.E., Barakat A., Zhang Y., Naseri M., Hafezi-Moghadam A. // *FASEB J.* 2021. V. 35. № 6. P. 21593–21600.
101. Chaabo F., Pronczuk A., Maslova E., Hayes K. // *Nutr. Metab. (London)*. 2010. V. 7. P. 29–35.
102. Weir G.C., Marselli L., Marchetti P., Katsuta H., Jung M.H., Bonner-Weir S. // *Diabetes. Obes. Metab.* 2009. V. 11. Suppl. 4. P. 82–90.
103. Goto Y., Kakizaki M., Masaki N. // *Tohoku J. Exp. Med.* 1976. V. 119. P. 85–90.
104. Portha B., Giroix M.H., Serradas P., Gangnerau M.N., Movassat J., Rajas F., Bailbe D., Plachot C., Mithieux G., Marie J.C., et al. // *Diabetes*. 2001. V. 50. Suppl. 1. P. 89–93.
105. Ostenson C.G., Efendic S. // *Diabetes. Obes. Metab.* 2007. V. 9. Suppl. 2. P. 180–186.
106. Portha B., Lacraz G., Kergoat M., Homo-Delarche F., Giroix M.H., Bailbe D., Gangnerau M.N., Dolz M., Tourrel-Cuzin C., Movassat J., et al. // *Mol. Cell. Endocrinol.* 2009. V. 297. P. 73–85.
107. Kottaisamy C.P.D., Raj D.S., Kumar P.V., Sankaran U. // *Lab. Anim. Res.* 2021. V. 37. № 1. P. 23–29.
108. Zhao J.D., Li Y., Sun M., Yu C.J., Li J.Y., Wang S.H., Yang D., Guo C.L., Du X., Zhang W.J., et al. // *World. J. Gastroenterol.* 2021. V. 2. № 8. P. 708–724.
109. Szkudelska K., Deniziak M., Sassek M., Szkudelski I., Noskowiak W., Szkudelski T. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 5. P. 2469–2476.
110. Eshes J.A., Lacraz G., Giroix M.H., Schmidlin F., Coulaud J., Kassis N., Irminger J.C., Kergoat M., Portha B., Homo-Delarche F., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2009. V. 106. P. 13998–14003.
111. Okada S., Saito M., Kinoshita Y., Satoh I., Kawaba Y., Hayashi A., Oite T., Satoh K., Kanzaki S. // *Biomed. Res.* 2010. V. 31. P. 219–230.
112. Burillo J., Marqués P., Jiménez B., González-Blanco C., Benito M., Guillén C. // *Cells*. 2021. V. 10. № 5. P. 1236–1247.
113. Asiri M.M.H., Engelsman S., Eijkelkamp N., Höppener J.W.M. // *Cells*. 2020. V. 9. № 6. P. 1553–1563.
114. Hoppener J.W., Oosterwijk C., van Hulst K.L., Verbeek J.S., Capel P.J., de Koning E.J., Clark A., Jansz H.S., Lips C.J. // *J. Cell. Biochem.* 1994. V. 55. Suppl. P. 39–53.
115. Zhang X.X., Pan Y.H., Huang Y.M., Zhao H.L. // *World. J. Diabetes*. 2016. V. 7. № 9. P. 189–197.
116. Matveyenko A.V., Butler P.C. // *ILAR. J.* 2006. V. 47. P. 225–233.
117. Matveyenko A.V., Gurlo T., Daval M., Butler A.E., Butler P.C. // *Diabetes*. 2009. V. 58. P. 906–916.
118. Hara M., Wang X., Kawamura T., Bindokas V.P., Dizon R.F., Alcoser S.Y., Magnuson M.A., Bell G.I. // *Am. J. Physiol. Endocrinol. Metab.* 2003. V. 284. P. 177–183.
119. Sanavia T., Huang C., Manduchi E., Xu Y., Dadi P.K., Potter L.A., Jacobson D.A., Di Camillo B., Magnuson M.A., Stoeckert C.J. Jr., Gu G. // *Front. Cell. Dev. Biol.* 2021. V. 9. P. 648791–64801.
120. Sasaki S., Lee M.Y.Y., Wakabayashi Y., Suzuki L., Winata H., Himuro M., Matsuoka T.A., Shimomura I., Watada H., Lynn F.C., et al. // *Diabetologia*. 2022. V. 65. № 5. P. 811–828.
121. Habener J.F., Kemp D.M., Thomas M.K. // *Endocrinology*. 2005. V. 146. P. 1025–1034.
122. Oliver-Krasinski J.M., Kasner M.T., Yang J., Crutchlow M.F., Rustgi A.K., Kaestner K.H., Stoffers D.A. // *J. Clin. Invest.* 2009. V. 119. № 7. P. 1888–1898.
123. Wang Q., Jin T. // *Islets*. 2009. V. 1. P. 95–101.
124. Wang B., Chandrasekera P.C., Pippin J.J. // *Curr. Diabetes. Rev.* 2014. V. 10. № 2. P. 131–145.
125. Masiello P., Broca C., Gross R., Roye M., Manteghetti M., Hillaire-Buys D., Novelli M., Ribes G. // *Diabetes*. 1998. V. 47. P. 224–229.
126. Junod A., Lambert A.E., Stauffacher W., Renold A.E. // *J. Clin. Invest.* 1969. V. 48. P. 2129–2139.
127. Schein P.S., Cooney D.A., Vernon M.L. // *Cancer Res.* 1967. V. 27. P. 2324–2332.
128. Ghasemi A., Khalifi S., Jedi S.S. // *Acta. Physiologica Hungarica*. 2014. V. 101. P. 408–420.
129. Masiello P. // *Int. J. Biochem. Cell. Biol.* 2006. V. 38. № 5. P. 873–893.
130. Reed M.J., Meszaros K., Entes L.J., Claypool M.D., Pinkett J.G., Gadbois T.M., Reaven G.M. // *Metabolism*. 2000. V. 49. P. 1390–1394.
131. Chao P.C., Li Y., Chang C.H., Shieh J.P., Cheng J.T., Cheng K.C. // *Biomed. Pharm.* 2018. V. 101. P. 155–161.
132. Gheibi S., Kashfi K., Ghasemi A. // *Biomed. Pharm.* 2017. V. 95. P. 605–613.
133. Furman B.L. // *Curr. Protoc.* 2021. V. 1. P. 78–99.
134. Zhang M., Lv X.Y., Li J., Xu Z.G., Chen L. // *Exp. Diab. Res.* 2008. V. 2008. P. 704045–704054.
135. Yorek M.A. // *Int. Rev. Neurobiol.* 2016. V. 127. P. 89–112.
136. Elsner M., Tiedge M., Guldbakke B., Munday R., Lenzen S. // *Diabet.* 2002. V. 45. P. 1542–1549.
137. Lenzen S. // *Diabetologia*. 2008. V. 51. P. 216–226.
138. Olefsky J., Crapo P.A., Ginsberg H., Reaven G.M. // *Metabolism*. 1975. V. 24. № 4. P. 495–503.
139. Kibenge M.T., Chan C.B. // *Metabolism*. 2002. V. 51. № 6. P. 708–715.
140. Srinivasan K., Viswanad B., Asrat L., Kaul C., Ramarao P. // *Pharm. Res.* 2005. V. 52. P. 313–320.
141. Premilovac D., Gasperini R.J., Sawyer S., West A., Keske M.A., Taylor B.V., Foa L. // *Sci. Rep.* 2017. V. 7. № 1. P. 14158–14169.
142. Skovsø S. // *J. Diab. Inv.* 2014. V. 5. P. 349–358.
143. de la Garza-Rodea A.S., Knaän-Shanzer S., den Hartigh J.D., Verhaegen A.P., van Bekkum D.W. // *J. Am. As. Lab. Anim. Science*. 2010. V. 49. P. 40–44.
144. Furman B.L., Candasamy M., Bhattamisra S.K., Veetil S.K. // *J. Ethnopharmacol.* 2020. V. 30. № 247. P. 112264–112274.
145. Wu K.K., Huan Y. // *Atherosclerosis*. 2007. V. 191. № 2. P. 2419–2426.
146. Heydemann A. // *J. Diabetes Res.* 2016. V. 2016. P. 2902351–2902360.
147. Islam M.S., du Loots T. // *Meth. Find. Exp. Clin. Pharmacol.* 2009. V. 31. № 4. P. 249–261.
148. Iannaccone P.M., Jacob H.J. // *Dis. Model Mech.* 2009. V. 2. № 5–6. P. 206–210.
149. Sharma P., Garg A., Garg S., Singh V. // *Asian J. Biomat. Res.* 2016. V. 2. P. 99–110.
150. Bryda E.C. // *Mol. Med.* 2013. V. 110. № 3. P. 207–211.
151. Franconi F., Seghieri G., Canu S., Straface E., Campesi I., Malorni W. // *Pharm. Res.* 2008. V. 57. № 1. P. 6–18.
152. Arai I., Miyazaki N., Seino Y., Fukatsu A. // *Biosci. Biotech. Biochem.* 2007. V. 71. P. 1920–1926.
153. Mestas J., Hughes C.C. // *J. Immunol.* 2004. V. 172. № 5. P. 2731–2738.

УДК 577.122:615.355

Механизмы регуляции Р-гликопротеина в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса *in vitro*

Ю. В. Абаленихина*, А. В. Щулькин, П. Ю. Мыльников, Е. Д. Рокунов, Е. Н. Якушева
Рязанский государственный медицинский университет имени академика И.П. Павлова
Министерства здравоохранения Российской Федерации, Рязань, 390026 Россия

*E-mail: abalenihiina88@mail.ru

Поступила в редакцию 28.06.2022

Принята к печати 11.08.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11759

РЕФЕРАТ На клетках линии Caco-2 изучены механизмы регуляции белка-транспортера Р-гликопротеина (Pgp) в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса (ОС). Экзогенный ОС моделировали, добавляя в питательную среду пероксид водорода в концентрации 0,1, 0,5 и 1 мкМ на 24 ч и 10 мкМ на 72 ч. Эндогенный ОС моделировали, инкубируя клетки с DL-бутионинсульфоксимином (БСО, ингибитор γ -глутамилцистеин-синтетазы) в концентрации 10, 50 и 100 мкМ в течение 24 ч. Уровень внутриклеточных активных форм кислорода оценивали с помощью флуоресцентных зондов MitoTracker Red CM-H₂ XRos, относительное количество Pgp анализировали методом вестерн-блоттинга. Показано, что развитие экзогенного и эндогенного ОС приводит к увеличению относительного количества Pgp. С использованием специфических ингибиторов установлена важная роль сигнального пути Nrf2-Keap1 в повышении количества Pgp в условиях моделирования экзогенного ОС пероксидом водорода. Транскрипционный фактор HIF1 участвует в регуляции количества Pgp в условиях 24-часового экзогенного ОС, а транскрипционный фактор CAR – при 72-часовом ОС, PXR, видимо, не вносит существенного вклада в регуляцию белка-транспортера в данной модели. В условиях эндогенного ОС все протестированные транскрипционные факторы и сигнальные пути участвуют в индукции Pgp. Скорее всего, это связано с бимодальным влиянием БСО на Pgp. С одной стороны, БСО вызывает развитие ОС, с другой, будучи ксенобиотиком, может стимулировать PXR и CAR, которые, в свою очередь, повышают количество Pgp.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА Р-гликопротеин, окислительный стресс, вестерн-блоттинг, клетки линии Caco-2, Nrf2, HIF1a, CAR, PXR.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АФК – активные формы кислорода; БСО – DL-бутионинсульфоксимиин; ОС – окислительный стресс; CAR – конститутивный андростановый рецептор; HIF1a – фактор 1a, индуцируемый гипоксией; Nrf2 – ядерный фактор эритроидного происхождения 2; PXR – X-рецептор прегнана; Pgp – Р-гликопротеин.

ВВЕДЕНИЕ

Р-гликопротеин (Pgp, ABCB1) – продукт гена множественной лекарственной устойчивости (*MDR1*) – АТР-зависимый белок-транспортер, локализованный на цитоплазматических мембранах энтероцитов кишечника, гепатоцитов, эпителиальных клеток почечных канальцев, эндотелиальных клеток гистоматических барьеров [1].

Pgp обладает широкой субстратной специфичностью и работает как транспортер оттока, ограничивая проникновение в клетку веществ, служащих его субстратами, таких, как противоопухолевые, гипотензивные, антигистаминные лекарственные средства, сердечные гликозиды, антиагреганты,

антикоагулянты, стероидные и тиреоидные гормоны, антибиотики, ингибиторы протеиназы ВИЧ, иммунодепрессанты. Учитывая эти свойства, принято считать, что Pgp играет важную роль в защите опухолевых клеток от цитостатиков (формирование множественной лекарственной устойчивости опухоли), в ограничении транспорта субстратов в ткани плода и забарьерные органы (головной мозг, тестисы), а также участвует в фармакокинетике (всасывании, распределении, выведении) лекарственных веществ [2, 3].

Активность и экспрессия Pgp могут изменяться под воздействием ряда веществ и факторов. Например, изменение экспрессии Pgp наблюдается

в гематоэнцефалическом барьере при неврологических (эпилепсия) заболеваниях [4] и в клетках рака желудка, остеосаркомы [5, 6].

Окислительный стресс (ОС) – типовой патологический процесс, возникающий в результате сдвига баланса между оксидантами и антиоксидантами в пользу оксидантов, что приводит к нарушению окислительно-восстановительной сигнализации и контроля и/или к повреждению биомолекул [7]. ОС играет важную роль в патогенезе широкого спектра заболеваний, включая сердечно-сосудистые, онкологические, бронхолегочные, офтальмологические и т.д. [8]. Показано, что инкубация культуры гепатоцитов крысы с H_2O_2 (0.5–1 мМ, 72 ч) вызывает повышение экспрессии гена *Pgp*, количества и активности кодируемого им белка-транспортера [9]. Установлено также, что воздействие H_2O_2 в концентрации до 500 мкМ в течение 48 ч на первичную культуру клеток эндотелия крыс приводит к повышению экспрессии *Pgp* и в меньшей степени влияет на активность белка-транспортера [10]. В то же время обработка клеток hCMC/D3 (модель гематоэнцефалического барьера *in vitro*) H_2O_2 (0.5–5 мМ, 20 мин) снижает транспортную активность *Pgp* [11]. На культуре эндотелиальных клеток сосудов головного мозга крыс показано, что H_2O_2 в концентрации 200 мкМ вызывает развитие ОС и повышает экспрессию мРНК генов *mdr1a* и *mdr1b*, кодирующих *Pgp*, а также синтез самого белка *Pgp*. Предварительная обработка клеток полиэтиленгликоль-каталазой нивелировала данные изменения [12]. Воздействие ингибитора каталазы 3-амино-1,2,4-триазола (2–4 мМ в течение 72 ч или 10 мМ, 1 ч) на гепатоциты крысы приводило к усилению экспрессии мРНК *mdr1b* и *Pgp* [9]. Напротив, антиоксиданты (1 мМ аскорбат, 10 мМ маннит) заметно подавляли экспрессию мРНК *mdr1b* и избыточную экспрессию *Pgp* [13, 14]. Культивирование клеток Caco-2 в среде, содержащей 1 мкмоль/л H_2O_2 , повышало экспрессию в них *Pgp*, тогда как H_2O_2 в концентрации 10 ммоль/л приводила к снижению экспрессии транспортера [15]. H_2O_2 усиливал экспрессию *Pgp* в митохондриях клеток D407 (эпителиальный сегмент сетчатки), в то время как антиоксиданты ее подавляли [16].

В исследованиях, выполненных в нашей лаборатории на клетках линии Caco-2, показано, что кратковременное (3 ч) воздействие H_2O_2 в концентрации 10 и 50 мкМ приводило к понижению активности *Pgp*, а в концентрации 100 мкМ – еще и к снижению количества белка-транспортера. Увеличение длительности экспозиции до 24 и 72 ч выявило индукцию *Pgp* при низких концентрациях H_2O_2 (0.1–1 мкМ, 24 ч и 10 мкМ, 72 ч), а также

снижение количества и активности *Pgp* при повышении концентрации H_2O_2 до 100 мкМ и выше [17].

Таким образом, в большинстве исследований показано, что воздействие прооксидантов повышает экспрессию и активность *Pgp*, которые могут подавляться при срыве адаптационных процессов и развитии декомпенсированного ОС.

Считается, что снижение количества *Pgp* в условиях ОС связано с повреждением молекулы белка-транспортера активными формами кислорода (АФК), однако механизмы повышения экспрессии *Pgp* не установлены. Предполагается, что в этом процессе могут участвовать транскрипционные факторы Nrf2 и HIF1 [17, 18]. Цель нашей работы состояла в изучении механизмов регуляции *Pgp* при развитии ОС.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Культивирование клеток

В работе использовали линию клеток Caco-2 аденокарциномы ободочной кишки человека (ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», Санкт-Петербург, Россия). Клетки культивировали при 37°C и 5% содержании CO_2 в инкубаторе WS-189C (World Science, Корея) в модифицированной по способу Дульбекко среде Игла (DMEM) с высоким содержанием глюкозы (4500 мг/л) с добавлением L-глутамин (4 мМ), 15% эмбриональной бычьей сыворотки, 100 ед./мл и 100 мкг/мл пенициллина и стрептомицина (все Sigma-Aldrich, США). Клетки высевали в шестилуночные планшеты (Corning, США), площадь поверхности лунки 9.6 см², количество клеток в лунке – 1.8–2.0 × 10⁶, рабочий объем питательной среды – 1.5 мл. Клетки культивировали в течение 21 сут, поскольку на данном сроке происходит их спонтанная дифференцировка в энтероцитоподобные клетки, сверхэкспрессирующие *Pgp* [19].

В ходе исследования были сформированы следующие экспериментальные группы:

1) контроль ($n = 3$) – клетки инкубировали в питательной среде с добавлением в эквивалентном объеме воды для инъекций (растворитель H_2O_2 и БСО);

2) индукция *Pgp* в условиях моделирования ОС. Экзогенный ОС моделировали, добавляя в питательную среду H_2O_2 в концентрации 0.1, 0.5, 1 мкМ на 24 ч ($5–50 \times 10^{-17}$ моль/клетка) и 10 мкМ на 72 ч (5×10^{-15} моль/клетка).

Эндогенный ОС воспроизводили с помощью ингибитора синтеза глутатиона – DL-бутионинсульфоксимида (БСО, ингибитор γ -глутамилцистеинсинтазы) [20] в конечной концентрации 10,

50 и 100 мкМ в питательной среде ($5-50 \times 10^{-15}$ моль/клетка).

Концентрации прооксидантов и длительность экспозиции выбирали в соответствии с результатами предварительных экспериментов, в которых было доказано их индуцирующее действие на Pgr [17, 21].

3) Ингибирование ОС – одновременно с добавлением прооксидантов в питательную среду вносили глутатион в концентрации 1 мМ [22].

4) Оценка роли Nrf2-опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления H_2O_2 /BCO вносили ингибитор N-(1,3-бензодиоксол-5-илметил)-5-(4-фторфенил)-тиено[2,3-d]пиримидин-4-амин (AEM1, Sigma-Aldrich) в концентрации 5 мкМ [23].

5) Оценка роли NIF1-опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления H_2O_2 /BCO вносили N,N'-(дисульфандиилбис(этан-2,1-диил))-бис(2,5-дихлорбензолсульфонамид) (KC7F2, Sigma-Aldrich) в концентрации 7.5 мкМ [24].

6) Оценка роли CAR-опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления H_2O_2 /BCO вносили ингибитор этиловый эфир [5-[(диэтиламино)ацетил]-10,11-дигидро-5Н-дibenzo[b,f]азепин-3-ил]-карбаминовой кислоты (CINPA1, TOCRIS, Великобритания) в концентрации 10 мкМ [25].

7) Оценка роли PXR-опосредованного механизма в индукции Pgr при развитии ОС – к клеткам в питательную среду за 30 мин до добавления H_2O_2 /BCO вносили кетоконазол, 10 мкМ (Sigma-Aldrich) [26].

Каждый эксперимент выполняли в трех повторностях. При экспозиции в течение 72 ч смену питательной среды, содержащей прооксидант и ингибитор, проводили каждые 24 ч.

Сверхпродукцию АФК под действием прооксидантов подтверждали с помощью флуоресцентных зондов

Клетки культивировали в 24-луночных планшетах. После инкубации с H_2O_2 в течение 3 ч и с BCO в течение 24 ч в тестируемых концентрациях уровень внутриклеточных АФК оценивали с помощью окрашивания клеток MitoTracker Red CM-H₂ XRos (Invitrogen, США). Зонды MitoTracker Red (нефлуоресцентная форма) содержат восстановленный дигидроксиразамин, который проникает в живые клетки, связывается с тиоловыми группами в митохондриях и флуоресцирует при окислении АФК.

Клетки визуализировали с помощью инвертированного микроскопа Olympus СКХ-53 (Olympus,

Япония), затем снимали с лунок и лизировали с помощью 0.2% Triton X-100 (Sigma-Aldrich; <https://www.thermofisher.com/order/catalog/product/M7513>). Уровень свободных радикалов в лизате клеток определяли по интенсивности флуоресценции ($\lambda_{ex} = 579$ нм, $\lambda_{em} = 599$ нм) с помощью спектрофлуориметра (Shimadzu RF-6000, Япония) и пересчитывали на количество клеток (счетчик и анализатор жизнеспособности клеток Countess 3 Automated Cell Counter, США).

В остальных экспериментах клетки культивировали в шестилуночных планшетах.

Получение полных клеточных лизатов

После окончания экспозиции с H_2O_2 и BCO клетки снимали с лунок шестилуночных планшетов раствором трипсин-EDTA (0.25% трипсина и 0.2% EDTA, Sigma-Aldrich), трижды промывали раствором фосфатного буфера (BioRad, США) и лизировали в NP40 Cell Lysis Buffer Thermo (Thermo Fisher Scientific, США) с добавлением смеси ингибиторов протеиназ 4-(2-аминоэтил)бензолсульфонилфторид гидрохлорид (AEBSF) 2 мМ, апротинин 0.3 мкМ, бестатин 130 мкМ, EDTA 1 мМ, *транс*-эпоксисукцинил-L-лейциламидо(4-гуанидино)бутан (E-64) 14 мкМ, лейпептин 1 мкМ, Sigma-Aldrich) в течение 30 мин при +4°C и постоянном перемешивании из расчета 10^7 клеток на 100 мкл буфера. Полученный лизат центрифугировали при 5000 g (CM-50, Eppendorf, Германия). Супернатант использовали для выполнения биохимических анализов.

Количество белка в пробах анализировали методом Брэдфорд (Pierce Coomassie Plus (Bradford) Assay Kit, ThermoFisher, США) [27].

Определение относительного количества Pgr в клетках линии Caco-2 методом вестерн-блоттинга

Белки супернатанта (20 мкг) подвергали электрофорезу с использованием 7.5% TGX Stain-Free FastCast Acrylamide Kit (BioRad, США) в буферной системе Laemmli (BioRad). Образцы смешивали с буфером Laemmli, содержащим 50 мМ β-меркаптоэтанол (Helicon, США) в соотношении 1:3, инкубировали в течение 10 мин при 70°C. Электрофорез проводили при 100 В в течение 90 мин.

Белки переносили на нитроцеллюлозную мембрану (Trans-Blot Turbo Mini-Size nitrocellulose, BioRad) с использованием Mini Trans-Blot (BioRad) в течение 10 мин при 25 В и 1.3 А.

Белки на мембране блокировали 1% раствором Casein Blocker (BioRad), содержащим 0.1% Tween-20 (Sigma, Германия), в течение 1 ч и комнатной температуре.

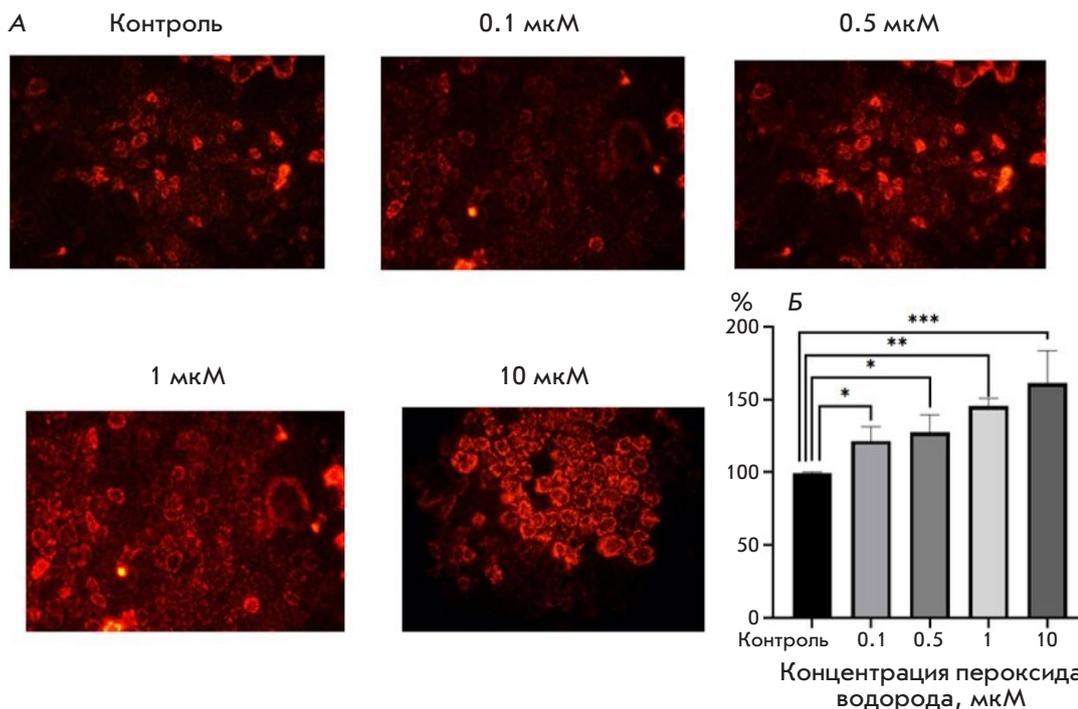


Рис. 1. Изменение уровня АФК под действием пероксида водорода (H₂O₂) в клетках линии Caco-2. А – окрашивание с помощью MitoTracker Red CM-H₂ XRos, увеличение ×400 раз. Б – интенсивность флуоресценции в лизате клеток. **p* ≤ 0.05; ***p* < 0.01; ****p* ≤ 0.001 по сравнению с контролем (тест Даннетта)

Белок Pgp детектировали с использованием первичных моноклональных антител мыши (P-Glycoprotein Antibody MA5-13854, Invitrogen) в концентрации 1:200 в блокирующем растворе Casein blocker (BioRad) в течение 2 ч при 37°C. Первичные антитела визуализировали с использованием вторичных антител кролика (Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP, Invitrogen) в разведении 1:4000 и инкубации в течение 1 ч при комнатной температуре. Хемилюминесценцию фиксировали с использованием ChemiDocXRS+ (BioRad). Интенсивность полос определяли денситометрически с помощью программного обеспечения ImageLab (BioRad).

Молекулярная масса Pgp подтверждена путем сравнения с маркерами молекулярной массы (Precision plus protein standards Dual Color, BioRad).

Содержание Pgp нормировали по содержанию белка домашнего хозяйства GAPDH (первичные антитела GAPDH Loading Control Monoclonal Antibody (GA1R), DyLight 68 (Invitrogen), разведение 1:1000, вторичные кроличьи антитела – Rabbit-anti-Mouse IgG (H+L) Secondary Antibody, HRP (Invitrogen), разведение 1:4000).

Статистический анализ

Полученные результаты анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8. Результаты представлены как среднее значение ± стандартное отклонение (M±SD). Статистическую значимость различий оценивали с помощью диспер-

сионного анализа (ANOVA), попарные сравнения выполняли с помощью теста Даннетта. Статистически значимыми считали различия при *p* < 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Продукция АФК при моделировании окислительного стресса

Экспозиция клеток линии Caco-2 с H₂O₂ в диапазоне концентраций 0.1, 0.5, 1.0, 10 мкМ в течение 3 ч приводила к повышению интенсивности флуоресценции клеток после окраски MitoTracker Red CM-H₂ XRos на 21.5 (*p* = 0.05), 27.3 (*p* = 0.046), 45.4 (*p* = 0.004), 61.1% (*p* = 0.001) соответственно по сравнению с контролем, принятым за 100% (рис. 1).

Аналогичным образом при воздействии БСО в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ в течение 24 ч интенсивность флуоресценции клеток Caco-2 после окраски MitoTracker Red CM-H₂ XRos возрастала на 38.8 (*p* = 0.001), 46.5 (*p* = 0.0004) и 70.2% (*p* = 0.0001) соответственно по сравнению с контролем (рис. 2).

Полученные результаты свидетельствуют о повышении продукции АФК в используемых экспериментальных моделях.

Изменение относительного количества Pgp в клетках линии Caco-2 в условиях экзогенного и эндогенного окислительного стресса

Воздействие H₂O₂ (моделирование экзогенного ОС) в течение 24 ч в концентрации 0.1, 0.5 и 1 мкМ вызывало повышение количества

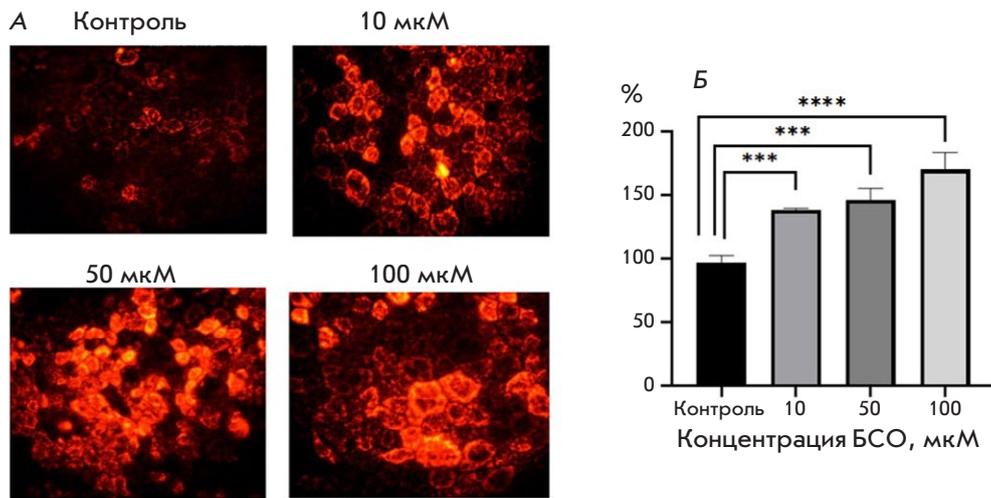


Рис. 2. Изменение уровня АФК под действием DL-бутионинсульфоксимины в клетках линии Сасо-2. А – окрашивание с помощью MitoTracker Red CM-H₂XRos, увеличение ×400 раз. Б – интенсивность флуоресценции в лизате клеток. *** $p \leq 0.001$; **** $p \leq 0.0001$ по сравнению с контролем (тест Даннетта)

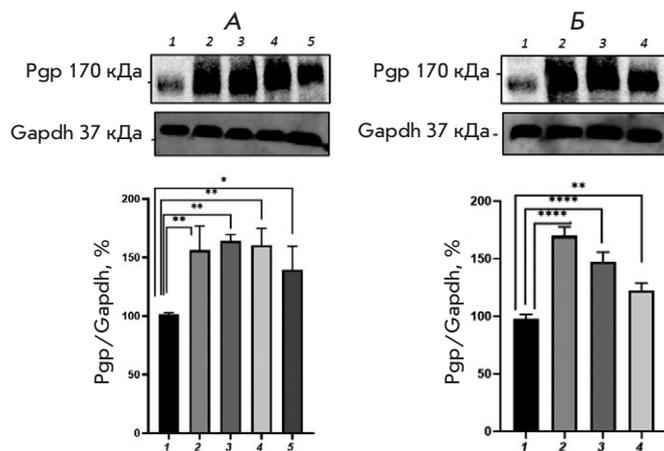


Рис. 3. Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии H₂O₂ (А, экзогенный окислительный стресс) и DL-бутионинсульфоксимины (Б, эндогенный окислительный стресс). А) 1 – контроль; 2, 3, 4, 5 – перексид водорода в концентрации 10 мкМ (72 ч), 0,1, 0,5 и 1 мкМ (24 ч) соответственно; Б) 1 – контроль; 2, 3, 4 – DL-бутионинсульфоксимин в концентрации 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно. * $p < 0.05$; ** $p < 0.01$; **** $p < 0.0001$, статистически значимые отличия от контроля (тест Даннетта)

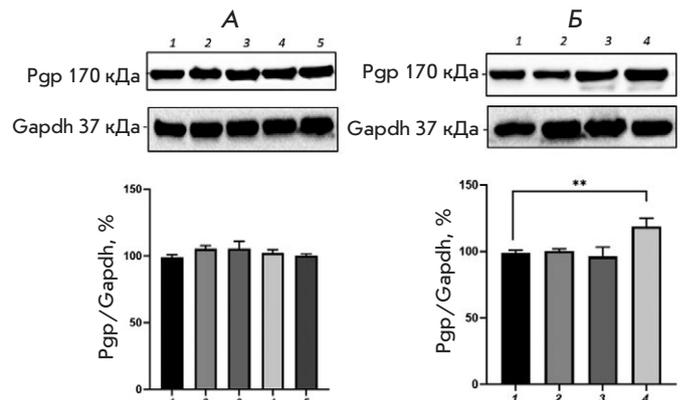


Рис. 4. Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии H₂O₂ (А, экзогенный окислительный стресс) и DL-бутионинсульфоксимины (Б, эндогенный окислительный стресс) в сочетании с глутатионом (1 мМ). А) 1 – контроль; 2, 3, 4, 5 – перексид водорода в концентрации 10 мкМ (72 ч), 0,1, 0,5 и 1 мкМ (24 ч) соответственно; Б) 1 – контроль; 2, 3, 4 – DL-бутионинсульфоксимин в концентрации 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно. ** $p < 0.01$, статистически значимые отличия от контроля (тест Даннетта)

Рgp на 78.9 ($p = 0.0013$), 67.1 ($p = 0.0019$) и 44.6% ($p = 0.029$) соответственно (рис. 3А) по сравнению с контролем. Увеличение длительности экспозиции до 72 ч приводило к повышению уровня Рgp при концентрации H₂O₂ 10 мкМ – на 68.9% ($p = 0.0033$) по сравнению с контролем (рис. 3А).

Инкубация клеток линии Сасо-2 с БСО (моделирование эндогенного стресса) в концентрации 10, 50 и 100 мкМ в течение 24 ч приводила к увеличению относительного количества Рgp на 71.6 ($p < 0.0001$),

51.6 ($p < 0.0001$) и 25.4% ($p = 0.007$) соответственно (рис. 3Б).

При увеличении экспозиции до 72 ч эффект БСО нивелировался и количество Рgp не отличалось значительно от показателей в контроле.

Добавление GSH в концентрации 1 мМ в питательную среду с H₂O₂ при всех концентрациях и сроках инкубации предотвращало повышение количества Рgp; его уровень не отличался значительно от показателей в контроле (рис. 4А).

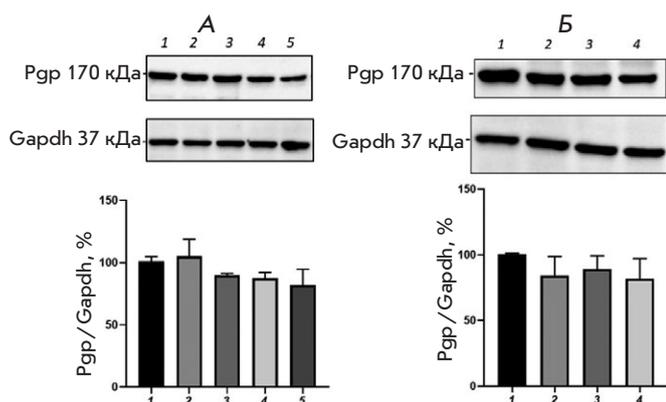


Рис. 5. Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при одновременном воздействии ингибитора ядерного фактора эритроидного происхождения 2 (АЕМ1, 5 мкМ) и H₂O₂ (А) или DL-бутионинсульфоксимины (Б): А) 1 – контроль; 2, 3, 4, 5 – пероксид водорода в концентрации 10 мкМ (72 ч), 0.1, 0.5 и 1 мкМ (24 ч) соответственно; Б) 1 – контроль; 2, 3, 4 – DL-бутионинсульфоксимины в концентрации 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно

При сочетанном использовании 1 мМ глутатиона и БСО в концентрации 100 мкМ и инкубации в течение 24 ч относительное количество Рgp возросло на 19.7% ($p = 0.003$) по сравнению с контролем, однако это повышение было менее выраженным, чем при изолированном применении прооксиданта. При этом GSH предотвращал повышение уровня Рgp, вызванное воздействием БСО в течение 24 ч в более низких концентрациях 10 и 50 мкМ (рис. 4Б).

Таким образом, воздействие H₂O₂ и БСО на клетки линии Сасо-2 (моделирование экзогенного и эндогенного ОС) приводит к повышению количества Рgp, а применение эндогенного антиоксиданта глутатиона нивелирует данную индукцию, за исключением воздействия БСО (100 мкМ) в течение 24 ч.

Изучение механизмов повышения количества Рgp под действием пероксида водорода и DL-бутионинсульфоксимины

Механизмы, приводящие к повышению количества Рgp в условиях экзогенного и эндогенного ОС, изучали с использованием ингибиторов транскрипционных факторов Nrf2 – АЕМ1, HIF1a – КС7F2, CAR – СИНРА1, PXR – кетоконазола, стимулирующих экспрессию гена MDR1, кодирующего Рgp.

Ингибитор Nrf2 – АЕМ1 (5 мкМ) при совместной инкубации с H₂O₂ при всех концентрациях и сроках экспозиции предотвращал повышение относительного количества Рgp, его уровень не отличался ста-

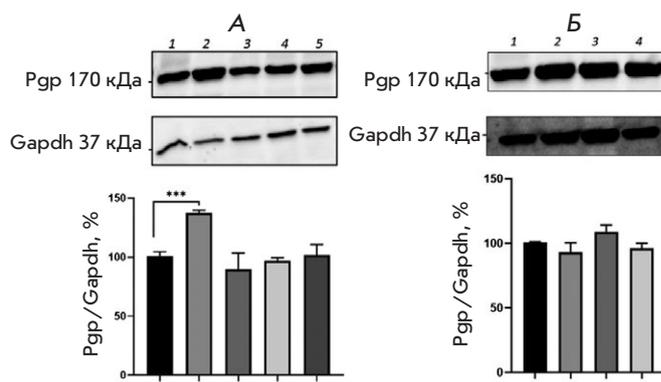


Рис. 6. Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии ингибитора фактора, индуцируемого гипоксией HIF1a (КС7F2, 7.5 мкМ) в сочетании с H₂O₂ (А) и DL-бутионинсульфоксимином (Б): А) 1 – контроль; 2, 3, 4, 5 – пероксид водорода в концентрации 10 мкМ (72 ч), 0.1, 0.5 и 1 мкМ (24 ч) соответственно; Б) 1 – контроль; 2, 3, 4 – DL-бутионинсульфоксимины в концентрациях 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно. *** $p < 0.001$, статистически значимые отличия от значений в контроле (тест Даннетта)

тистически значимо от уровня в контроле (рис. 5А).

Добавление к клеткам АЕМ1 в сочетании с БСО (10, 50 и 100 мкМ) и инкубации в течение 24 ч также препятствовало повышению относительного количества Рgp (уровень белка-транспортера не отличался от значений в контроле) (рис. 5Б).

Ингибитор HIF1a КС7F2 (7.5 мкМ) препятствовал повышению уровня транспортера в присутствии H₂O₂ (24 ч, все использованные концентрации) – относительное количество Рgp не отличалось статистически значимо от значений в контроле. При инкубации в течение 72 ч КС7F2 не влиял значимо на относительное количество Рgp – его содержание увеличивалось на 37% относительно значений в контроле ($p = 0.0004$) (рис. 6А).

Добавление КС7F2 к клеткам, инкубируемым с БСО (10, 50 и 100 мкМ), также приводило к нормализации относительного количества Рgp, его уровень не отличался статистически значимо от уровня в контроле (рис. 6Б).

Добавление ингибитора CAR СИНРА1 (10 мкМ) к клеткам, инкубируемым в присутствии 0.1, 0.5 и 1 мкМ H₂O₂ в течение 24 ч, не подавляло эффект прооксиданта: относительное количество Рgp увеличивалось на 51.5 ($p = 0.0008$), на 46.5 ($p = 0.0019$), на 31.3% ($p = 0.02$) соответственно по сравнению со значениями в контроле (рис. 7А).

Однако при длительности воздействия 72 ч СИНРА1 препятствовал повышению уровня Рgp под действием 10 мкМ H₂O₂ (рис. 7А).

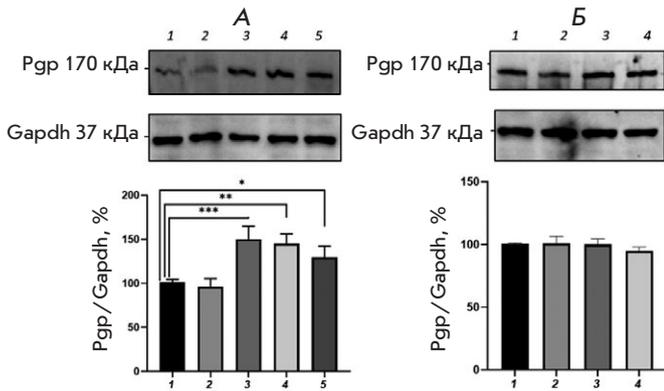


Рис. 7. Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии ингибитора конститутивного андростанового рецептора CAR (CINPA1, 10 мкМ) в сочетании с H₂O₂ (А) и DL-бутионинсульфоксимином (Б): А) 1 – контроль; 2, 3, 4, 5 – пероксид водорода в концентрации 10 мкМ (72 ч), 0.1, 0.5 и 1 мкМ (24 ч) соответственно; Б) 1 – контроль; 2, 3, 4 – DL-бутионинсульфоксимином в концентрации 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; ****p* < 0.001, статистически значимые отличия от контроля (тест Даннетта)

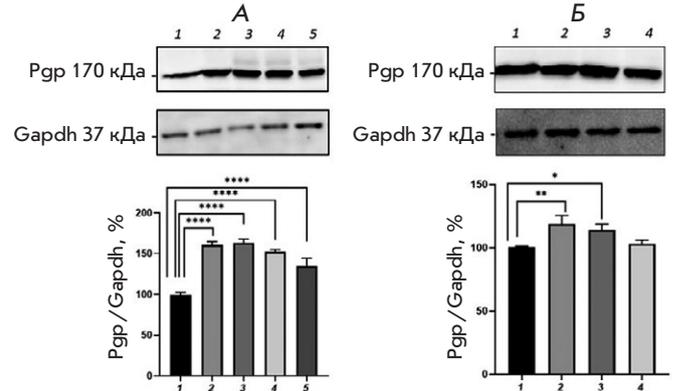


Рис. 8. Относительное количество Р-гликопротеина в клетках линии Сасо-2 при воздействии ингибитора X-рецептора прегнана (кетоконазол, 10 мкМ) в сочетании с H₂O₂ (А) и DL-бутионинсульфоксимином (Б): А) 1 – контроль; 2, 3, 4, 5 – пероксид водорода в концентрации 10 мкМ (72 ч), 0.1, 0.5 и 1 мкМ (24 ч) соответственно; Б) 1 – контроль; 2, 3, 4 – DL-бутионинсульфоксимином в концентрации 10, 50 и 100 мкМ (24 ч) соответственно. **p* < 0.05; ***p* < 0.01; *****p* < 0.0001, статистически значимые отличия от контроля (тест Даннетта)

CINPA1 при его совместном применении с БСО (10, 50 и 100 мкМ) предотвращал повышение относительного количества Рgr, уровень белка-транспортера не отличался значимо от показателей в контроле (рис. 7Б).

Ингибитор PXR кетоконазол (10 мкМ) при его совместном применении с H₂O₂ не подавлял эффект индуктора окислительного стресса. Относительное количество Рgr возрастало на 64.6, 53.5 и 36.4% при воздействии H₂O₂ (24 ч, 0.1, 0.5 и 1 мкМ) и на 62.6% при воздействии H₂O₂ (72 ч, 10 мкМ) соответственно. *p* < 0.0001 в каждой серии опытов, рис. 8А.

В то же время кетоконазол предотвращал повышение количества Рgr под действием БСО в концентрации 100 мкМ и не влиял на эффекты прооксиданта в концентрациях 10 и 50 мкМ, уровень Рgr повышался на 18.8 (*p* = 0.0027) и 14.1% (*p* = 0.015) соответственно по сравнению с контролем (рис. 8Б).

Таким образом, при развитии экзогенного ОС (H₂O₂) регуляция Рgr осуществляется в основном через сигнальный путь Nrf2-Keap1, тогда как в случае эндогенного ОС (БСО) в регуляции Рgr принимают участие все изученные транскрипционные факторы.

ОБСУЖДЕНИЕ

Окислительный стресс – это редокс-зависимый процесс, на фоне которого протекает множество пато-

логий различного генеза. Причина развития ОС может быть экзогенной (воздействие прооксиданта) и/или эндогенной (подавление внутриклеточной антиоксидантной защиты) [28].

В настоящем исследовании экзогенный ОС моделировали добавлением к клеткам линии Сасо-2 пероксида водорода. H₂O₂ способен проникать через клеточные мембраны. При взаимодействии с металлами переменной валентности (Fe²⁺ или Cu⁺) в ходе реакций Фентона и Хабера–Вайса H₂O₂ образует в клетках кислородсодержащие высокотоксичные свободные радикалы (гидроксильный радикал OH и супероксид-анион O₂⁻), которые могут вызывать окислительные повреждения биомолекул клетки [29]. Учитывая использованный в работе микромолярный диапазон концентраций H₂O₂ и быструю скорость элиминации H₂O₂ клетками [30], выявленные изменения количества Рgr, скорее всего, обусловлены сигнальными каскадами, которые запустил прооксидант.

Эндогенный ОС воспроизводили инкубацией клеток с БСО, который ингибирует фермент γ-глутамилцистеин-синтетазу (γ-GCS), играющий ключевую роль в синтезе и поддержании клеточного уровня глутатиона. Глутатион (GSH) – тиолсодержащий трипептид, обладающий собственной антиоксидантной активностью и необходимый для функционирования антиоксидантных ферментов (глутатионпероксидазы, глутатион-S-

трансферазы). Снижение уровня эндогенного глутатиона уменьшает емкость эндогенной антиоксидантной системы, что провоцирует развитие ОС [31].

Динамика развития ОС подтверждена в нашем исследовании путем детекции АФК по интенсивности флуоресценции MitoTracker Red CM-H₂ XRos. При воздействии H₂O₂ повышение АФК наблюдалось уже через 3 ч, в то время как БСО повышал концентрацию АФК через 24 ч экспозиции, когда происходило истощение эндогенного пула глутатиона.

Развитие как экзогенного, так и эндогенного ОС приводило к повышению относительного количества Pgr. При этом добавление антиоксиданта глутатиона к клеткам вместе с используемыми прооксидантами предотвращало индукцию Pgr под действием H₂O₂ и снижало (100 мкМ) или подавляло (10 и 50 мкМ) ее под действием БСО.

Частичное подавление индукции Pgr под действием глутатиона может быть связано с тем, что БСО, будучи ксенобиотиком, сам может повышать количество Pgr за счет стимуляции экспрессии гена *MDR1*.

На данный момент известно несколько механизмов регуляции Pgr, основным из которых является изменение экспрессии гена *MDR1*, кодирующего белок-транспортер [31].

В ходе настоящего исследования была оценена роль транскрипционных факторов Nrf2, HIF1 α , CAR и PXR, которые активируются при окислительном стрессе [17, 33–35] и гипотетически могут повышать экспрессию Pgr.

Сигнальный путь Nrf2 считается основным механизмом регуляции антиоксидантной защиты клетки при ОС. В физиологических условиях ядерный фактор транскрипции Nrf2 входит в состав комплекса Keap1-Nrf2-Cullin-3, что обеспечивает его локализацию в цитозоле и блокирует специфическую активность. Nrf2 является редокс-чувствительным транскрипционным фактором, при окислении SH-групп в составе Keap1 происходит активация фактора, его транслокация в ядро и изменение биологических эффектов – индукция антиоксидантных ферментов [36].

Фактор, индуцируемый гипоксией (HIF1) – это транскрипционный фактор, играющий ключевую роль в адаптации клеток к снижению содержания кислорода в тканях [37]. HIF1 представляет собой гетеродимер, состоящий из двух белковых субъединиц – HIF1 α и HIF1 β . Функциональный статус HIF1 определяется экспрессией и активностью его α -субъединицы, регуляция которой осуществляется на нескольких уровнях: транскрипции, трансля-

ции, посттрансляционных изменений, транслокации в ядро [38]. В условиях нормоксии кислород-зависимые пролингидроксилазы модифицируют пролин в структуре HIF1 α . При ОС пролингидроксилазы неактивны, в этих условиях α - и β -субъединицы способны связываться друг с другом, проникать в ядро и активировать экспрессию целевых генов.

Конститутивный андростановый рецептор (CAR, NR1I3, подсемейство 1, группа I, член 3) и X-рецептор прегнана (PXR, steroid and xenobiotic receptor – SXR, R1I2 – Nuclear Receptor Subfamily 1, Group I, Member 2) – входят в суперсемейство ядерных рецепторов, представленное в основном факторами транскрипции [39].

Эти рецепторы локализуются преимущественно в печени и кишечнике, где регулируют экспрессию ферментов I фазы биотрансформации, таких, как изоферменты CYP3A и CYP2B цитохрома P450, а также белков-транспортеров, в частности Pgr.

Относительное количество CAR и PXR увеличивается в условиях ОС в ответ на накопление продуктов перекисидации [34, 35].

Роль Nrf2 в регуляции Pgr оценивали с использованием AEM1 (ARE expression modulator 1), блокирующим взаимодействие Nrf2 с ARE (antioxidant responsive element) и подавляющим экспрессию генов, контролируемых данным транскрипционным фактором. В ходе исследования показано, что AEM1 блокировал способность H₂O₂ и БСО (во всех применяемых концентрациях и сроках экспозиции) индуцировать Pgr.

Таким образом, Nrf2 принимает участие в регуляции Pgr в условиях как экзогенного, так и эндогенного ОС.

Ингибитор HIF1 α KC7F2 (controls the biological activity of HIF1 α) представляет собой симметричное соединение, которое избирательно подавляет клеточный синтез белка HIF1 α , но не HIF1 β , не влияя на транскрипцию мРНК HIF1 α или стабильность белка HIF1 α . KC7F2 при воздействии H₂O₂ и БСО в течение 24 ч нормализовал количество Pgr (препятствовал индуцирующему действию прооксидантов), а при воздействии в сочетании с H₂O₂ в течение 72 ч не оказывал значимого эффекта (относительное количество Pgr возрастало под действием пероксида водорода).

Таким образом, известны два транскрипционных фактора – Nrf2 и HIF1, которые принимают участие в регуляции Pgr при развитии как эндогенного, так и экзогенного ОС. Можно предположить, что оба фактора могут связываться с промотором гена *MDR1*, кодирующего Pgr, и повышать его экспрессию. Ранее нами было показано, что при развитии ОС Nrf2 вызывает повышение экспрессии

HIF1 α [33], т.е. действие Nrf2 может реализоваться через HIF1 α . Поскольку ингибирование Nrf2, в отличие от HIF1 α , препятствовало индукции Pgr во всех при инкубации 24 и 72 ч в условиях экзогенного и эндогенного ОС, то в клетке, видимо, одновременно функционируют два описанных механизма.

В представленной работе в качестве ингибитора CAR использовали CINPA1 (CAR inhibitor not PXR activator 1), который взаимодействует и блокирует лигандсвязывающий домен CAR и подавляет его связывание с коактиваторами [40]. Для ингибирования PXR использовали противогрибковый препарат группы азолов – кетоконазол, который связывается с областью AF-2 (activation function) на N-концевом лигандсвязывающем домене PXR и таким образом подавляет его активацию [41].

CINPA1 не подавлял индукцию Pgr под действием H₂O₂ при инкубации в течение 24 ч, а при воздействии в течение 72 ч препятствовал повышению уровня Pgr. Показано, что H₂O₂ вызывает индукцию CAR [34], который, в свою очередь, видимо, повышает экспрессию Pgr при экспозиции 72 ч.

Сочетанное применение БСО и CINPA1 предотвращало повышение относительного количества Pgr; уровень белка-транспортера не отличался достоверно от показателей в контроле.

Ингибитор PXR кетоконазол, применяемый совместно с H₂O₂, не подавлял эффект индуктора ОС. В то же время кетоконазол полностью предотвращал повышение количества Pgr под действием БСО в концентрации 100 мкМ и лишь частично – при концентрациях 10 и 50 мкМ. CAR и PXR являются основными ксеносенсорными внутриклеточными рецепторами, т.е. они взаимодействуют с ксенобиотиками и запускают внутриклеточный ответ, направленный на их обезвреживание и выведение.

Можно предположить, что БСО, являясь ксенобиотиком, самостоятельно активирует CAR и PXR, а они, в свою очередь, повышают экспрессию Pgr. Сохранение повышенного уровня Pgr при совместном применении БСО и глутатиона, выявленное в нашем исследовании, подтверждает данное предположение.

Интересно отметить, что при моделировании как экзогенного, так и эндогенного окислительного стресса, несмотря на одновременное участие в индукции Pgr разных транскрипционных факторов, ингибирование только одного из них приводило к подавлению повышения количества Pgr, что свидетельствует о том, что для индукции Pgr в определенных ситуациях необходимо совместное действие нескольких механизмов.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, в повышении количества Pgr при развитии экзогенного ОС, вызванного инкубацией клеток линии Сасо-2 с H₂O₂, вероятно, первоочередная роль принадлежит сигнальному пути Nrf2-Keap1, который участвует в регуляции белка-транспортера при длительности воздействия 24 и 72 ч. Транскрипционный фактор HIF принимает участие в регуляции Pgr при воздействии H₂O₂ в течение 24 ч, а транскрипционный фактор CAR – при времени инкубации 72 ч. PXR, видимо, не вносит существенный вклад в регуляцию белка-транспортера при данной модели ОС.

При моделировании эндогенного ОС на клетках Сасо-2 с помощью ингибитора синтеза глутатиона – БСО – установлено, что все протестированные транскрипционные факторы и сигнальные пути участвуют в индукции Pgr. Скорее всего, это связано с бимодальным влиянием БСО на Pgr. С одной стороны, он вызывает развитие ОС, с другой – будучи ксенобиотиком, может стимулировать PXR и CAR. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yakusheva E.N., Titov D.S. // *Biochemistry (Moscow)*. 2018. V. 83. № 8. P. 907–929.
2. Han L.W., Gao C., Mao Q. // *Expert Opinion on Drug Metabolism & Toxicology*. 2018. V. 14. № 8. P. 817–829.
3. Chai A.B., Leung G.K.F., Callaghan R., Gelissen I.C. // *FEBS J*. 2020. V. 287. № 4. P. 612–625.
4. Wang G.X., Wang D.W., Liu Y., Ma Y.H. // *Int. J. Neurosci*. 2016. V. 126. № 5. P. 385–392.
5. Xu H.W., Xu L., Hao J.H., Qin C.Y., Liu H. // *J. Int. Med. Res*. 2010. V. 38. № 1. P. 34–42.
6. Gao Y., Liao Y., Shen J.K., Feng Y., Choy E., Cote G., Harmon D., Mankin H.J., Hornicek F.J., Duan Z. // *J. Orthop. Res*. 2016. V. 34. № 9. P. 1606–1612.
7. Sies H., Jones D.P. Oxidative stress. In *Encyclopedia of stress*. Amsterdam: Elsevier, 2007. P. 45–48.
8. Cabello-Verrugio C., Simon F., Trollet C., Santibañez J.F. // *Oxid. Med. Cell. Longev*. 2017. 4310469.
9. Ziemann C., Bürkle A., Kahl G.F., Hirsch-Ernst K.I. // *Carcinogenesis*. 1999. V. 20. № 3. P. 407–414.
10. Felix R.A., Barrand M.A. // *J. Neurochem*. 2002. V. 80. № 1. P. 64–72.
11. Hoshi Y., Uchida Y., Tachikawa M., Ohtsuki S., Couraud P., Suzuki T., Terasaki T. // *J. Cerebral Blood Flow Metabolism*. 2019. V. 40. № 2. P. 420–436.
12. Robertson S.J., Kania K.D., Hladky S.B., Barrand M.A. // *J. Neurochem*. 2009. V. 111. № 1. P. 132–141.
13. Hirsch-Ernst K.I., Ziemann C., Foth H., Kozian D., Schmitz-Salue C., Kahl G.F. // *J. Cell Physiol*. 1998. V. 176. № 3. P. 506–515.
14. Miyata Y., Asano Y., Muto S. // *Am. J. Physiol. Renal Physiol*. 2002. V. 282. № 4. P. 718–729.
15. Terada Yu., Ogura J., Tsujimoto T., Kuwayama K., Koizumi T., Sasaki Sh., Maruyama H., Kobayashi M., Yamaguchi H.,

- Iseki K. // *J. Pharm. Pharm. Sci.* 2014. V. 17. № 2. P. 266–276.
16. Zhang Yu., Li Ju., Yang W., Xian Zh., Feng Q., Ruan X. // *Int. J. Ophthalmol.* 2017. V. 10. № 7. P. 1055–1063.
17. Shchulkin A.V., Abalenikhina Y.V., Erokhina P.D., Chernykh I.V., Yakusheva E.N. // *Biochemistry (Moscow)*. 2021. V. 86. № 2. P. 197–206.
18. Seebacher N.A., Richardson D.R., Jansson P.J. // *Br. J. Pharmacol.* 2015. V. 172. № 10. P. 2557–2572.
19. Hilgers A.R., Conradi R.A., Burton P.S. // *Pharmac. Res.* 1990. V. 7. № 9. P. 902–910.
20. Haddad J.J. // *Eur. Cytokine Netw.* 2001. V. 12. № 4. P. 614–624.
21. Abalenikhina Yu.V., Erokhina P.D., Mylnikov P.Yu., Shchulkin A.V., Yakusheva E.N. // *Appl. Biochem. Microbiol.* 2022. V. 58. № 3. P. 232–242.
22. Rao R.K., Li L., Baker R.D., Baker S.S., Gupta A. // *Am. J. Physiol. Gastrointest. Liver Physiol.* 2000. V. 279. № 2. P. 332–340.
23. Bollong M.J., Yun H., Sherwood L., Woods A.K., Lairson L.L., Schultz P.G. // *ACS Chem. Biol.* 2015. V. 10. P. 2193–2198.
24. Ke Q., Costa M. // *Mol. Pharmacol.* 2006. V. 70. № 5. P. 1469–1480.
25. Cherian M.T., Lin W., Wu J., Chen T. // *Mol. Pharmacol.* 2015. V. 87. № 5. P. 878–889.
26. Kota B.P., Tran V.H., Allen J., Bebawy M., Roufogalis B.D. // *Pharmacol. Res.* 2010. V. 62. № 5. P. 426–431.
27. Bradford M.M. // *Anal. Biochem.* 1976. V. 7. № 72. P. 248–254.
28. Liguori I., Russo G., Curcio F., Bulli G., Aran L., Della-Morte D., Gargiulo G., Testa G., Cacciatore F., et al. // *Clin. Interv. Aging.* 2018. V. 26. № 13. P. 757–772.
29. Sies H. // *Redox Biol.* 2017. V. 11. P. 613–619.
30. Wagner B.A., Witmer J.R., van't Erve T.J., Buettner G.R. // *Redox Biol.* 2013. V. 1. № 1. P. 210–217.
31. Adeoye O., Olawumi J., Opeyemi A., Christiania O. // *JBRA Assist. Reprod.* 2018. V. 1. № 22. P. 61–66.
32. Li S., Yang Y., Ding X., Yang M., She S., Peng H., Xu X., Ran X., Li S., Hu P., et al. // *Oncotarget.* 2017. V. 17. № 8 (3). P. 4549–4562.
33. Абаленихина Ю.В., МЫЛЬНИКОВ П.Ю., ШУЛЬКИН А.В., Черных И.В., Якушева Е.Н. // *Бюл. эксп. биол. мед.* 2022. T. 173. № 3. С. 301–306.
34. Shchul'kin A.V., Abalenikhina Y.V., Seidkulieva A.A., Ryabkov A.N., Yakusheva E.N. // *Bull. Exp. Biol. Med.* 2021. V. 171. № 5. P. 615–618.
35. Abalenikhina Y.V., Sudakova E.A., Slepnev A.A., Seidkulieva A.A., Erokhina P.D., Shchulkin A.V., Yakusheva E.N. // *Biochemistry (Moscow), Suppl. Ser. A: Membrane Cell Biol.* 2022. V. 16. № 1. P. 21–28.
36. Bellezza I., Giambanco I., Minelli A., Donato R. // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Cell. Res.* 2018. V. 1865. № 5. P. 721–733.
37. Schofield C.J., Ratcliffe P.J. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2005. V. 338. № 1. P. 617–626.
38. Ke Q., Costa M. // *Mol. Pharmacol.* 2006. V. 70. № 5. P. 1469–1480.
39. di Masi A., De Marinis E., Ascenzi P., Marino M. // *Mol. Aspects Med.* 2009. V. 30. № 5. P. 297–343.
40. Cherian M.T., Lin W., Wu J., Chen T. // *Mol. Pharmacol.* 2015. V. 87. № 5. P. 878–889.
41. Wang H., Huang H., Li H., Teotico D.G., Sinz M., Baker S.D., Staudinger J., Kalpana G., Redinbo M.R., Mani S. // *Clin. Cancer Res.* 2007. V. 13. № 8. P. 2488–2495.

УДК 616.858-008.6

Изменение профиля экспрессии микроРНК в лейкоцитах пациентов с болезнью Паркинсона

Н. С. Ардаширова*, Н. Ю. Абрамычева, Е. Ю. Федотова, С. Н. Иллариошкин

ФГБНУ «Научный центр неврологии», Москва, 125367 Россия

*E-mail: ardashirova.n@yandex.ru

Поступила в редакцию 16.05.2022

Принята к печати 04.07.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11729

РЕФЕРАТ Болезнь Паркинсона (БП) – одно из наиболее распространенных двигательных расстройств, диагностика которого до настоящего времени остается, главным образом, клинической. Для разработки патогенетического лечения БП важна точная диагностика БП на самых ранних стадиях, в связи с чем необходим поиск потенциальных биомаркеров заболевания. Нами оценена диагностическая значимость ряда микроРНК и их взаимосвязь с клиническими характеристиками БП. В исследование включены 70 пациентов с БП и 40 здоровых добровольцев. В лейкоцитах крови оценивали экспрессию 15 микроРНК, отобранных на основании опубликованных данных и современных представлений о молекулярном патогенезе БП. Всем пациентам проведена оценка по клиническим шкалам Hoehn–Yahr, UPDRS, NMSQ, PDQ-39. По результатам исследования выявлено статистически значимое повышение экспрессии miR-7-1-5p, miR-29c-3p и miR-185-5p и снижение экспрессии miR-29a-3p и miR-30c-1-5p в лейкоцитах при БП. Однако показано, что измененный профиль микроРНК обладает умеренной диагностической значимостью. Изменения экспрессии микроРНК были ассоциированы с моторными и немоторными фенотипическими особенностями БП и изменялись на фоне приема противопаркинсонических препаратов. Также показана связь ряда изученных микроРНК с длительностью и тяжестью БП, что потенциально может использоваться в мониторинге прогрессирования заболевания.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА болезнь Паркинсона, микроРНК, биомаркеры.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ БП – болезнь Паркинсона; REM-фаза – фаза быстрых движений глаз (rapid eye movement); UPDRS – унифицированная рейтинговая шкала оценки болезни Паркинсона (Unified Parkinson's Disease Rating Scale); NMSQ – опросник немоторных симптомов (Non-Motor Symptoms Questionnaire); HADS – госпитальная шкала тревоги и депрессии (Hospital Anxiety and Depression Scale); MoCA – Монреальская шкала когнитивной оценки (Montreal Cognitive Assessment); PDQ-39 – опросник качества жизни пациентов с болезнью Паркинсона (Parkinson's Disease Questionnaire).

ВВЕДЕНИЕ

Болезнь Паркинсона (БП) – одно из наиболее распространенных двигательных расстройств, представляющее серьезную медицинскую и социальную проблему. Согласно современным представлениям, БП относится к синуклеинопатиям – заболеваниям, которые характеризуются формированием патологических агрегатов альфа-синуклеина в центральной и периферической нервной системе [1]. К синуклеинопатиям относятся, помимо БП, деменция с тельцами Леви, мультисистемная атрофия, изолированная вегетативная недостаточность. Важным предиктором развития синуклеинопатий является нарушение поведения в REM-фазу сна [1].

Диагностика БП до настоящего времени остается, в первую очередь, клинической. При этом по данным патоморфологической верификации даже специалисты в области двигательных расстройств ставят правильный клинический диагноз БП лишь примерно в 80% случаев [2]. Существующие методы радиоизотопной нейровизуализации (позитронно-эмиссионная и однофотонно-эмиссионная компьютерная томография) позволяют точно оценить состояние дофаминергических проводящих путей и тем самым значительно улучшить точность диагностики БП [3]. Однако это дорогостоящие методы, связанные с лучевой нагрузкой, и они не позволяют дифференцировать БП с синдромами атипичного

паркинсонизма [4]. Недостаточная точность прижизненной диагностики, особенно на ранних стадиях заболевания, считается одной из важных причин неудач в испытаниях препаратов для патогенетического лечения БП [5]. Таким образом, весьма актуальна разработка информативных и доступных диагностических биомаркеров БП.

Молекулярный патогенез БП носит сложный характер. Одним из его компонентов предположительно является нарушение эпигенетической регуляции экспрессии генов, в том числе с участием микроРНК [6]. На данный момент в геноме человека выявлено более 5000 различных микроРНК (<http://www.mirbase.org>). Изученный механизм действия микроРНК заключается в реализации РНК-сайленсинга. В составе РНК-индуцируемого комплекса сайленсинга (RISC) микроРНК связывается с 3'-концом комплементарной мРНК, что приводит к ее деградации и предотвращению трансляции белка [7]. Описаны и другие механизмы регуляции экспрессии с участием микроРНК [8]. Немаловажно, что одна микроРНК может связываться более чем с 200 различными мРНК, индуцируя таким образом сдвиги в регуляции целых белковых ансамблей [9]. Подобные изменения могут быть основой для развития самых разнообразных патологических процессов, в том числе, приводящих к нейродегенерации.

При БП сдвиги концентраций микроРНК, определяемых в крови, могут в значительной степени отражать вовлечение в патологический процесс множества органов и систем – именно с полиорганный патологией связывают развитие столь характерных для БП немоторных проявлений (желудочно-кишечных, кардиальных и др.). Таким образом, знание особенностей концентраций микроРНК в крови позволило бы создать новый информативный биомаркер БП, в том числе для ранней и дифференциальной диагностики заболевания, прогнозирования характера его течения, более точной оценки соотношения моторных и немоторных проявлений и т.д.

Изучена возможность использования тех или иных микроРНК в диагностике БП [10–12]. В некоторых работах в качестве биомаркера БП изучали панели из нескольких микроРНК [13–16]. При этом следует учитывать, что профиль микроРНК достаточно динамичен и подвержен изменениям под воздействием различных факторов. Так, показано, что на профиль микроРНК влияет текущая противопаркинсоническая терапия [17–20] и проводимая пациенту глубинная стимуляция мозга [21]. По результатам анализа опубликованных данных мы выбрали 15 микроРНК, экспрессия которых в крови и головном мозге пациентов с БП

значимо отличалась от экспрессии в контрольной группе, как минимум, в двух исследованиях.

В нашей работе оценена значимость выбранных микроРНК для диагностики БП и их взаимосвязь с клиническими характеристиками заболевания.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

В исследование были включены 70 пациентов с БП и 40 здоровых добровольцев. Группа БП состояла из 35 мужчин и 35 женщин (средний возраст 60.5 ± 11.8 лет). Пациенты контрольной группы были сопоставимы по полу и возрасту с основной группой. Проведение исследования одобрено локальным этическим комитетом Научного центра неврологии, все участники исследования подписывали информированное согласие.

Диагноз БП устанавливали в соответствии с критериями Международного общества по болезни Паркинсона и расстройствам движений – MDS [22]. Возраст дебюта – 53 ± 13 лет, длительность заболевания 6.4 ± 7.0 лет. Смешанная форма БП отмечена у 52 пациентов (74.3%), акинетико-ригидная форма – у 18 (25.7%). Средняя оценка выраженности клинических проявлений по унифицированной рейтинговой шкале оценки болезни Паркинсона (UPDRS) составила 65.6 ± 27.1 балла, средняя стадия заболевания по функциональной шкале Hoehn–Yahr – 2.4 ± 0.9 .

Все пациенты заполняли опросник немоторных симптомов – NMSQ; средняя сумма баллов составила 9.0 ± 5.2 . Проведено тестирование по госпитальной шкале тревоги и депрессии – HADS (средняя сумма баллов 6.4 ± 4.0 и 7.0 ± 4.6 для тревоги и депрессии соответственно), а также по Монреальской шкале когнитивной оценки – MoCA (23.1 ± 4.2 балла). Пациенты заполняли опросник качества жизни для пациентов с болезнью Паркинсона – PDQ-39 (44 ± 30 баллов).

Большинство пациентов с БП получали противопаркинсонические препараты, в том числе: леводопу (41 пациент, 58.6%), агонисты дофаминовых рецепторов (30 пациентов, 42.6%), препараты амантадина (20, 28.6%). Двадцать три пациента (32.9%) не получали какой-либо терапии на момент включения в исследование.

В работе исследованы следующие 15 микроРНК: miR-7-1-5p, miR-24-1-3p, miR-29a-3p, miR-29c-3p, miR-30c-1-5p, miR-106a-5p, miR-126-3p, miR-129-1-5p, miR-132-3p, miR-135b-5p, miR-146a-5p, miR-185-5p, miR-214-3p, miR-221-3p, miR-520d-5p.

Из венозной крови всех обследуемых выделяли лейкоцитарную фракцию. Далее с помощью набора для выделения РНК RNeasy mini kit (Qiagen) выделяли тотальную РНК по стандартному прото-

колу производителя. После выделения РНК проводили специфичную для каждой микроРНК обратную транскрипцию с использованием праймеров stem-loop и набора для обратной транскрипции («Синтол»). Относительную концентрацию каждой РНК определяли при проведении полимеразной цепной реакции в реальном времени с помощью соответствующего набора (ООО «Синтол»), в качестве референсной РНК использовали miR-191-5p. Концентрацию РНК рассчитывали по методу 2(-ΔΔC(T)).

Статистическую обработку проводили в программе IBM SPSS и Statistica 10.0. Нормальность распределения значений проверяли с помощью теста Шапиро–Уилка. В связи с тем, что распределение значений микроРНК не соответствовало нормальному, использовали непараметрические критерии: критерий Манна–Уитни, критерий Краскила–Уоллиса, коэффициент корреляции Спирмена. Также использовали логистический регрессионный анализ и ROC-анализ. Статистический уровень значимости принимали равным 0.05.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В группе БП по сравнению с контрольной группой выявлено статистически значимое повышение уровня экспрессии трех микроРНК – miR-7-1-5p, miR-29c-3p и miR-185-5p, и снижение экспрессии двух микроРНК – miR-29a-3p и miR-30c-1-5p (табл. 1). Однако, несмотря на статистическую значимость

выявленных различий, наблюдалось значительное перекрытие значений относительной экспрессии в исследованных группах.

Далее оценили возможность использования отдельных микроРНК в качестве биомаркеров БП. При проведении ROC-анализа установили, что некоторые микроРНК позволяют дифференцировать БП от контроля: miR-7-1-5p (AUC = 0.63, $p = 0.024$; 95% CI 0.517–0.742), miR-185-5p (AUC = 0.638; $p = 0.016$; 95% CI 0.53–0.744), miR-29c-3p (AUC = 0.673; $p = 0.003$; 95% CI 0.56–0.778). Однако очевидно, что чувствительность и специфичность этих биомаркеров недостаточны для применения в диагностике БП. Для поиска наиболее оптимальной комбинации микроРНК, которая могла иметь наибольшую информативность в качестве биомаркера, использовали логистический регрессионный анализ с помощью обратного метода Вальда. Наиболее информативной оказалась комбинация miR-29c-3p и miR-185-5p. При последующем проведении ROC-анализа площадь под кривой составила 0.715 (рис. 1). Таким образом, данная модель с двумя микроРНК позволяет с вероятностью 71.5% дифференцировать пациентов с БП от здоровых лиц.

Нами изучена взаимосвязь экспрессии микроРНК с клиническими характеристиками БП. Не выявлено значимых корреляций уровней микроРНК с возрастом дебюта, тогда как выявлена одна корреляционная связь слабой силы ($R < |0.3|$) возраста на момент исследования с miR-135b-5p. Исследование

Таблица 1. Экспрессия микроРНК у пациентов с болезнью Паркинсона и в контрольной группе

МикроРНК	Болезнь Паркинсона	Контрольная группа	p (U)
miR-7-1-5p	0.68 [0.19; 1.7]	0.2 [0.04; 1.5]	0.024*
miR-24-1-3p	455.72 [0.43; 654.6]	480.88 [0.83; 602.4]	0.684
miR-29a-3p	0.63 [0.41; 1.01]	0.97 [0.66; 1.4]	0.003**
miR-29c-3p	1.76 [0.93; 3.58]	0.77 [0.59; 1.98]	0.003**
miR-30c-1-5p	0.53 [0.34; 1.43]	1.03 [0.46; 1.77]	0.043*
miR-106a-5p	1.41 [0.43; 3.5]	1.39 [0.76; 2.8]	0.691
miR-126-3p	0.23 [0.15; 0.44]	0.4 [0.11; 0.8]	0.194
miR-129-1-5p	0.47 [0.2; 2.21]	0.4 [0.23; 0.71]	0.403
miR-132-3p	1.01 [0.4; 2.01]	0.87 [0.37; 1.39]	0.209
miR-135b-5p	54.5 [4.02; 2479.78]	284.29 [1.02; 149791.83]	0.946
miR-146a-5p	0.11 [0.03; 1.37]	0.07 [0.03; 0.34]	0.337
miR-185-5p	13631.02 [380.56; 21875.07]	863.02 [0.17; 14684.43]	0.017*
miR-214-3p	15.23 [6.97; 22.65]	15.75 [6.01; 27.3]	0.709
miR-221-3p	0.63 [0.42; 1.04]	0.72 [0.49; 0.99]	0.443
miR-520d-5p	0.27 [0.05; 1.02]	0.52 [0.04; 1.77]	0.374

* $p < 0.05$; ** $p < 0.01$. Жирным шрифтом выделены все случаи, где $p < 0.05$.

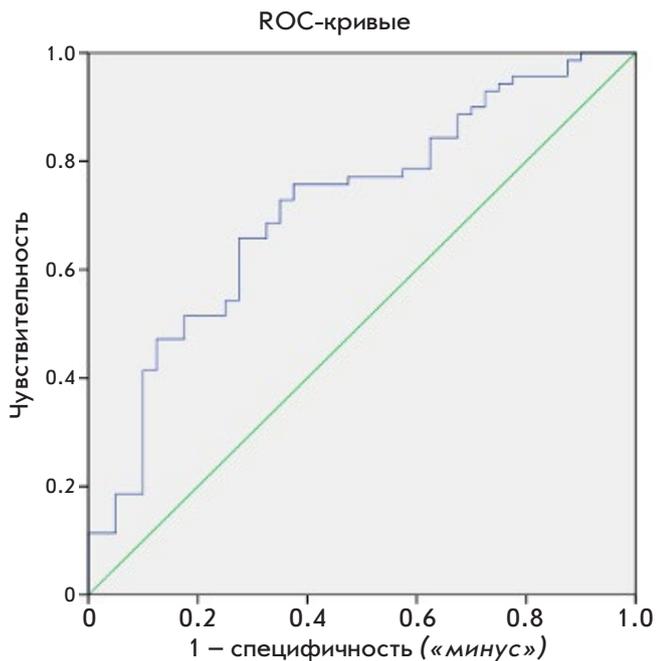


Рис. 1. ROC-анализ модели логистической регрессии с miR-29с-3р и miR-185-5р для диагностики болезни Паркинсона

корреляций уровней микроРНК с длительностью заболевания выявило шесть слабых, но значимых корреляций (miR-132-3р, miR-146а-5р, miR-106а-5р, miR-24-1-3р, miR-29а-3р, miR-30с-1-5р), а также две корреляции умеренной силы – с miR-126-3р ($R = 0.316$; $p = 0.07$) и miR-129-1-5р ($R = 0.385$; $p = 0.001$). Указанные микроРНК могут служить маркерами прогрессирования заболевания.

Анализ экспрессии микроРНК при разных формах БП показал, что при акинетико-ригидной форме уровень miR-29а-3р был значимо выше, чем при смешанной форме – 1.06 [0.6; 1.59] и 0.6 [0.43; 0.85] ($p = 0.018$) соответственно. Выявлена отрицательная корреляция между уровнем miR-30с-1-5р и стадией заболевания по шкале Hoehn–Yahr ($R = -0.303$; $p = 0.19$). При этом обнаружена дифференциальная экспрессия обеих указанных микроРНК (см. табл. 1) при БП и в контрольной группе. Корреляции уровней микроРНК с суммой баллов по шкале UPDRS и ее подшкалами не обнаружено. Выявлена отрицательная корреляция уровня miR-106а-5р с суммой баллов по шкале немоторных симптомов NMSQ ($R = -0.358$, $p = 0.011$). Не выявлено корреляций с баллами по шкалам тревоги и депрессии HADS. Корреляций с выраженностью когнитивных нарушений по шкале MoCA также не найдено.

Экспрессия miR-29а-3р ($p = 0.045$) была статистически значимо снижена в группе пациентов,

которые получали терапию леводопой, у пациентов, принимавших как агонисты дофаминовых рецепторов, так и амантадин, наблюдалось снижение miR-7-1-5р ($p = 0.0048$ и $p = 0.037$ соответственно). Интересно, что экспрессия и miR-7-1-5р, и miR-29а-3р при БП отличается от экспрессии в контрольной группе (см. табл. 1).

ОБСУЖДЕНИЕ

В настоящее время проведено значительное количество исследований биомаркерной роли микроРНК при БП, однако их результаты во многом противоречивы: это связано с тем, что разные исследователи изучают разные компоненты крови (плазма, лейкоциты, сыворотка, везикулы), а также с большим разнообразием изучаемых микроРНК и различиями в методах их детекции [23].

В настоящей работе мы использовали 15 микроРНК, экспрессия которых при БП, как показано в предшествующих исследованиях, значимо отличалась от экспрессии в контроле. По нашим данным, наибольшей диагностической значимостью при БП обладает комбинация двух микроРНК – miR-29с-3р и miR-185-5р. Отмечено также значимое повышение уровня miR-7-1-5р и снижение miR-29а-3р при БП, однако на уровень этих микроРНК, как показано в нашей работе, существенно влияет противопаркинсоническая терапия. Кроме того, показано значимое снижение miR-30с-1 при БП. Уровень этой микроРНК неуклонно снижается по мере течения болезни и нарастания ее тяжести по функциональной шкале Hoehn–Yahr, поэтому он может использоваться как маркер прогрессирования заболевания (т.е. маркер развернутых стадий БП).

Ряд других микроРНК, уровень которых был таким же, как в контрольной группе, тем не менее оказался связанным с немоторными проявлениями БП (miR-106а-5р) и с длительностью заболевания (miR-126-3р, miR-129-1-5р). Таким образом, эти микроРНК, не являясь биомаркерами непосредственно заболевания, могут быть полезными для более точного определения немоторных фенотипов БП и более объективного мониторинга течения болезни.

Роль miR-185 при БП анализировали в нескольких работах. На обработанной МРТР культуре дофаминергических клеток нейробластомы SH-SY5Y показано снижение уровня miR-185, а повышение экспрессии miR-185 уменьшало МРТР-индуцированный апоптоз и аутофагию [24]. В работе Rahimmi и соавт. на культурах клеток SH-SY5Y и крысах линии Wistar, у которых паркинсонизм вызывали с помощью инъекций ротенона, показано, что ингибирование экспрессии miR-185 специально подобранной малой интерферирующей РНК приво-

дит к значительному повышению экспрессии гена *LRRK2*. Этот ген играет важную роль в патогенезе БП: мутации в нем приводят к развитию наследственных форм БП [25]. На животных моделях показано снижение miR-185 и увеличение экспрессии *LRRK2* в черной субстанции и стриатуме. В работе Briggs и соавт. также наблюдали изменение экспрессии miR-185 в черной субстанции, но в противоположном направлении [26]. Возможность использования miR-185 в качестве биомаркера изучали в нескольких работах и в двух из них выявили снижение экспрессии уровня этой микроРНК при БП по сравнению с контрольной группой [15, 27], тогда как в нашей работе обнаружено повышение экспрессии данного потенциального маркера. Таким образом, результаты определения уровня экспрессии miR-185 при БП остаются противоречивыми.

Семейство miR-29 состоит из трех микроРНК: miR-29a, miR-29b и miR-29c. При изучении использования этих микроРНК в качестве биомаркеров неоднократно наблюдали снижение экспрессии miR-29a и miR-29c в крови пациентов с БП, причем снижение уровня miR-29a и miR-29c нарастало по мере прогрессирования заболевания по шкале Hoehn–Yahr [28]. В проспективном исследовании пациентов группы риска синуклеинопатий – пациентов с нарушениями поведения в REM-фазу сна, которым впоследствии установлен диагноз синуклеинопатии, выявлено снижение уровней miR-29a и miR-29c [29]. Отдельно miR-29a изучали в нескольких работах и показали снижение ее уровня, что соответствует нашим результатам [14, 30, 31]. Serafin и соавт. описали повышение экспрессии miR-29a только у пациентов, получающих терапию леводопой, но не выявили изменений у пациентов, не получавших лечения [19]. В нашей работе также показано снижение уровня miR-29a при назначении препаратов леводопы.

Увеличение экспрессии miR-29c, обнаруженное у пациентов с БП в турецкой популяции [32], соответствует нашим результатам, но противоречит большинству имеющихся данных [12, 14, 31]. В число мишеней этого весьма перспективного с патогенетической точки зрения семейства микроРНК входят выявленные с помощью предсказательных алгоритмов мРНК гена *PARK-7 (DJ-1)*, мутации в котором могут приводить к развитию БП, мРНК *GPR37*, субстратом которой является белок паркин, ассоциированный с развитием ранней БП, а также различные регуляторы процессов апоптоза (*Puma, Bim, Bak, Bcl2, IGF1, AKT1*). Мишени отдельных микроРНК семейства miR-29 могут значительно

перекрываться, но их роль в патогенезе различных форм БП не вызывает сомнений.

Согласно имеющимся данным, miR-7 снижает экспрессию альфа-синуклеина [33, 34], нарушение процессинга которого считается одним из ключевых звеньев патогенеза БП. В одной из работ показано снижение экспрессии miR-7 в головном мозге пациентов с БП, за счет чего, вероятно, увеличивается экспрессия альфа-синуклеина [6]. Показано также, что снижение экспрессии miR-7 увеличивает вероятность апоптоза и ухудшает рост дофаминергических нейронов в культуре [35]. В нашей работе, наоборот, уровень экспрессии miR-7 в группе БП был значимо выше, чем в контроле. В работе Alieva и соавт. также показано многократное увеличение экспрессии miR-7 в подгруппе пациентов с БП, получающих противопаркинсонические препараты [18]. В нашей работе не отмечено влияния леводопы-терапии на уровень miR-7, тогда как назначение агонистов дофаминовых рецепторов и амантадинов ассоциировано со снижением экспрессии miR-7. Противоречивые результаты в отношении уровня miR-7 при БП и влияния на него противопаркинсонической терапии требуют дальнейших уточнений.

Снижение уровня miR-30c-1 при БП, описанное в работах Vallelunga и соавт. и Martins и соавт., соответствует полученным нами результатам [31, 36]. Не установлено прямого влияния miR-30c-1 на экспрессию генов, ответственных за развитие БП, однако с помощью различных баз данных показано, что предполагаемые мишени данной микроРНК (*Notch1, HDAC4, BECN1, UBE2I, HSPA4* и *DNMT1*) играют роль в регуляции аутофагии и апоптоза дофаминергических клеток [37].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, нами показано, что комбинация двух микроРНК (miR-29c-3p и miR-185-5p) может рассматриваться как потенциальный биомаркер БП, хотя и с умеренной диагностической значимостью. Показано, что уровень экспрессии ряда микроРНК отражает клинические характеристики БП, изменяется с длительностью и стадией заболевания, а также под воздействием проводимой терапии, может быть маркером формы заболевания и связан с выраженностью немоторных проявлений и качеством жизни пациентов с БП. Согласно опубликованным данным, некоторые из диагностических микроРНК связаны с определенными звеньями патогенеза БП. Полученные нами результаты являются предварительными и требуют дальнейших исследований.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Coon E.A., Singer W. // CONTINUUM: Lifelong Learning in Neurology. 2020. V. 26. № 1. P. 72–92.
2. Rizzo G., Copetti M., Arcuti S., Martino D., Fontana A., Logroscino G. // Neurology. 2016. V. 86. № 6. P. 566–576.
3. Gerasimou G., Costa D.C., Papanastasiou E., Bostanjiopoulou S., Arnaoutoglou M., Moralidis E., Aggelopoulou T., Gotzamani-Psarrakou A. // Ann. Nucl. Med. Japan. 2012. V. 26. № 4. P. 337–344.
4. Arena J.E., Stoessl A.J. // Parkinsonism and Related Disorders. 2016. V. 22. P. S47–S51.
5. Lang A.E., Espay A.J. // Movement Disorders. 2018. V. 33. № 5. P. 660–677.
6. Tatura R., Kraus T., Giese A., Arzberger T., Bucholz M., Höglinger G., Müller U. // Parkinsonism and Related Disorders. 2016. V. 33. P. 115–121.
7. Wahid F., Shehzad A., Khan T., Kim Y.Y. // Biochim. Biophys. Acta – Mol. Cell Res. 2010. V. 1803. № 11. P. 1231–1243.
8. Mathonnet G., Fabian M.R., Svitkin Y.V., Parsyan A., Huck L., Murata T., Biffo S., Merrick W., Darzynkiewicz E., Pillai R.S., et al. // Science. 2007. V. 317. № 5845. P. 1764–1767.
9. Leggio L., Vivareli S., L'Episcopo F., Tirolo C., Caniglia S., Testa N., Barchetti B., Iraci N. // Int. J. Mol. Sci. 2017. V. 18. P. 2698.
10. Ma F., Zhang X., Yin K.-J. // Exp. Neurol. 2020. V. 323. P. 113094.
11. Cao X., Lu J.-M., Zhao Z.-Q., Li M.-C., Lu T., An X.-S., Xue L.-J. // Neurosci. Lett. 2017. V. 644. P. 94–99.
12. Ma W., Li Y., Wang C., Xu F., Wang M., Liu Y. // Cell. Biochem. Funct. 2016. V. 34. P. 511–515.
13. Kean S., Petillo D., Kang U.J., Resau J.H., Berryhill B., Linder J., Forsgren L., Neuman L.A., Tan A.C. // J. Parkinson's Dis. 2012. V. 2. P. 321–331.
14. Botta-orfila T., Morato X., Compta Y., Lozano J.J., Falgas N., Valldeoriola F., Pont-Sunyer C., Vilas D., Mengual L., Fernandez M., et al. // J. Neurosci. Res. 2014. V. 92. № 8. P. 1–7.
15. Ding H., Huang Z., Chen M., Wang C., Chen X., Chen J., Zhang J. // Parkinsonism Related Disorders J. 2016. V. 22. P. 68–73.
16. Dong H., Wang C., Lu S., Yu C., Huang L., Feng W., Xu H., Chen X., Zen K., Yan Q., et al. // Biomarkers. 2016. V. 21. № 2. P. 129–137.
17. Margis R.R., Margis R.R., Rieder C.R.M. // J. Biotechnol. 2011. V. 152. № 3. P. 96–101.
18. Alieva A., Filatova E.V., Karabanov A.V., Illarioshkin S.N., Limborska S.A., Shadrina M.I., Slominsky P.A. // Parkinsonism Related Disorders J. 2014. V. 21. № 1. P. 14–16.
19. Serafin A., Foco L., Zanigni S., Blankenburg H., Picard A., Zanon A., Gianni G., Pichler I., Maurizio F.F., Cortell P., Pramstaller P.P., Hicks A.A., Domingues F.S., Schwienbacher C. // Neurology. 2015. V. 84. P. 1–9.
20. Caggiu E., Paulus K., Mameli G., Arru G., Sechi G.P., Sechi L.A. // eNeurologicalSci. 2018. V. 13. P. 1–4.
21. Soreq L., Salomonis N., Bronstein M., Greenberg D.S., Israel Z., Bergman H., Soreq H. // Front. Mol. Neurosci. 2013. V. 6. P. 1–20.
22. Postuma R., Berg D., Stern M., Poewe W., Olanow C.W., Oertel W., Obeso J., Marek K., Litvan I., Lang A., et al. // Mov. Disord: Official J. Mov. Disord. Soc. 2015. V. 30. № 12. P. 1591–1601.
23. Nies Y.H., Mohamad Najib N.H., Lim W.L., Kamaruzzaman M.A., Yahaya M.F., Teoh S.L. // Front. Neurosci. 2021. V. 15. P. 660379.
24. Wen Z., Zhang J., Tang P., Tu N., Wang K., Wu G. // Mol. Med. Rep. 2018. V. 17. № 1. P. 131–137.
25. Rahimmi A., Peluso I., Rajabi A., Hassanzadeh K. // Oxid. Med. Cell. Longev. Hindawi. 2019. V. 2019. P. 5019815.
26. Briggs C.E., Wang Y., Kong B., Woo T.U., Iyer L.K., Sonntag K.C. // Brain Res. 2015. V. 1618. P. 111–121.
27. Chen L., Yu Z. // Brain Behav. 2018. V. 8. № 4. P. e00941.
28. Bai X., Tang Y., Yu M., Wu L., Liu F., Ni J., Wang Z., Wang J., Fei J., Wang W., et al. // Sci. Rep. 2017. V. 7. № 1. P. 5411.
29. Fernández-Santiago R., Iranzo A., Gaig C., Serradell M., Fernández M., Tolosa E., Santamaría J., Ezquerro M. // Ann. Neurol. 2015. V. 77. № 5. P. 895–901.
30. Barbagallo C., Mostile G., Baglieri G., Giunta F., Luca A., Raciti L., Zappia M., Purrello M., Ragusa M., Nicoletti A. // Cell. Mol. Neurobiol. 2020. V. 40. № 4. P. 531–546.
31. Martins M., Rosa A., Guedes L.C., Fonseca B.V., Gotovac K., Violante S., Mestre T., Coelho M., Rosa M.M., Martin E.R., et al. // PLoS One. 2011. V. 6. № 10. P. e25443.
32. Ozdilek B., Demircan B. // Int. J. Neurosci. 2020. V. 131. № 12. P. 1181–1189.
33. Doxakis E. // J. Biol. Chem. 2010. V. 285. № 17. P. 12726–12734.
34. Junn E., Lee K.W., Jeong B.S., Chan T.W., Im J.Y., Mouradian M.M. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2009. V. 106. № 31. P. 13052.
35. Li S., Lv X., Zhai K., Xu R., Zhang Y., Zhao S., Qin X., Yin L., Lou J. // Am. J. Transl. Res. 2016. V. 8. № 2. P. 993–1004.
36. Vallelunga A., Ragusa M., Di Mauro S., Iannitti T., Pilleri M., Biundo R., Weis L., Di Pietro C., De Iuliis A., Nicoletti A., et al. // Front. Cell. Neurosci. 2014. V. 8. P. 1–10.
37. Vallelunga A., Iannitti T., Dati G., Capece S., Maugeri M., Tocci E., Picillo M., Volpe G., Cozzolino A., Squillante M., et al. // Mol. Biol. Rept. 2019. V. 46. № 2. P. 1661–1666.

УДК 577.214.6+616-006.88

Транскрипция специфичных для семенников генов *ZBTB32* и *ZNF473* подавлена в герминогенных опухолях

С. С. Буланенкова, О. Б. Филюкова, Е. В. Снежков, С. Б. Акопов*, Л. Г. Николаев

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

* E-mail: sergeyakopov@mail.ru

Поступила в редакцию 28.10.2021

Принята к печати 22.08.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11620

РЕФЕРАТ Одним из самых многочисленных в геноме является семейство генов, содержащих домены «цинковый палец» типа C2H2, которое насчитывает более 700 членов. Особый интерес среди них представляют гены с предполагаемой тканеспецифичной транскрипцией, определяющие функциональные свойства отдельных типов клеток и обуславливающих их специфичный ответ на внешние и внутренние воздействия, в том числе при патологических процессах. Целью работы было выявление генов семейства C2H2 с тканеспецифичной транскрипцией и анализ изменений их активности при образовании опухолей. Для поиска таких генов мы воспользовались четырьмя базами данных, содержащими информацию о транскрипции генов в тканях человеческого организма, полученную в результате крупномасштабного секвенирования мРНК. Показано, что основная часть генов семейства C2H2 транскрибируется практически во всех тканях, однако для небольшой группы генов была характерна тканеспецифичная транскрипция, при этом основная часть транскриптов приходилась на семенники. При сопоставлении всех четырех баз данных выявлено 9 таких генов. Специфичную для семенников транскрипцию двух из них – *ZBTB32* и *ZNF473* – мы подтвердили методом количественной ПЦР на матрицах кДНК из разных органов. Показано снижение транскрипции *ZBTB32* и *ZNF473* в герминогенных опухолях. Эти гены рассматриваются как потенциальные маркеры ракового перерождения клеток зародышевого типа.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА белки с доменами цинковых пальцев, семенники, герминогенные опухоли, транскрипция.

ВВЕДЕНИЕ

Семейство генов, содержащих домены «цинковый палец» типа C2H2, насчитывает более 700 членов и является одним из самых многочисленных [1, 2]. Одна из основных функций структуры типа «цинковый палец» – связывание с ДНК, поэтому многие белки этого семейства обладают свойствами факторов транскрипции [1]. Помимо цинковых пальцев, разные члены семейства могут содержать дополнительные N-концевые домены, такие, как KRAB, SCAN, VTB/POZ, которые определяют регуляторные функции белков [3]. Несмотря на эволюционную распространенность этого семейства у млекопитающих [4], его значение для клеточной активности пока не вполне ясно. В целом, исследования сфокусированы на детальном анализе структуры и функций отдельных членов семейства, таких, как CTCF [5, 6]. Некоторые гены упоминаются в связи с рядом заболеваний [7]. Учитывая многочисленность семей-

ства, продолжаются попытки определения более общих и глобальных функций его членов. Например, рассматривается их участие в организации структуры хроматина [8], в частности предполагается, что они могут обеспечивать сближенность удаленных участков генома за счет связывания цинковых пальцев с ДНК и белок-белковых контактов [5]. Одна из функций белков семейства, несущих репрессорный домен KRAB, состоит в подавлении активности ретротранспозонов, большое количество которых объясняет широкое распространение семейства C2H2 в геноме человека [9, 10]. Дополнительную сложность в изучение семейства вносит тот факт, что возможности цинковых пальцев не ограничиваются связыванием с ДНК, и ряд доменов этого типа взаимодействует с РНК и белками [7, 11, 12]. Таким образом, изучение данного семейства представляется масштабной и многоступенчатой задачей, направленной на выяснение того, связаны ли разные чле-

ны семейства общим функциональным единством, выполняют узкие специфические функции или же являются многофункциональными белками.

Принимая во внимание разнообразие белков семейства, логично предположить, что они могут участвовать в регуляции различных биологических процессов как общих для всех типов клеток, так и характерных для отдельных типов клеток. Возникает естественный вопрос об активности членов семейства C2H2 при различных патологиях, включая злокачественную трансформацию клеток. Учитывая, что число тканеспецифичных генов на порядок меньше числа генов с повсеместной экспрессией и при этом большая их часть приходится на семенники [13, 14], можно предположить, что эта тенденция сохраняется и у генов семейства C2H2.

В настоящей работе мы провели анализ нескольких баз данных, содержащих информацию о транскрипции генов в разных тканях человеческого организма, и выявили несколько специфичных для семенников генов семейства C2H2. Мы экспериментально подтвердили высокоспецифичную транскрипцию двух из этих генов в семенниках по сравнению с другими тканями. Анализ опухолевых и нормальных тканей семенников показал подавление транскрипции этих генов в опухолях герминогенного происхождения.

Исследования специфичных для семенников генов в перспективе поможет пониманию процессов опухолеобразования и возможному практическому их применению для прогнозирования, диагностики и лечения онкологических заболеваний.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Источники данных

Усредненные данные по уровням транскрипции генов в разных тканях, представленные в TPM (Transcripts Per Million, см. [15]), получены из <https://proteinatlas.org> (Human Protein Atlas, HPA), <https://gtexportal.org/home/> (The Genotype-Tissue Expression, GTEx, версия файла GTEx_Analysis_2017-06-05_v8_RNASeQCv1.1.9_gene_median_tpm.gct.gz, без трансформированных лимфоцитов), <https://www.ebi.ac.uk/> (использовали данные E-MTAB-513 (Illumina Body Map), E-MTAB-4344 (ENCODE project), E-MTAB-2836 (HPA), E-MTAB-5214 (GTEx)). Полные данные по транскрипции генов во всех образцах разных тканей, представленные в TPM, получены с сайта GTEx (<https://gtexportal.org/home/>), версия файла GTEx_Analysis_2017-06-05_v8_RNASeQCv1.1.9_gene_tpm.gct.

Тканеспецифичные гены отбирали для каждой базы данных следующим образом. Сначала были

отобраны все гены каждой ткани с уровнем экспрессии не менее 5 TPM. Дальнейший анализ проведен для каждого выбранного гена. Уровень экспрессии гена в определенной ткани сравнивали с уровнем его экспрессии в каждой из оставшихся тканей. Для каждой ткани подсчитывали соотношение уровня экспрессии гена в TPM к уровням его экспрессии в других тканях. Затем из набора значений, полученных для каждой ткани, выбирали минимальное, и если это значение было не менее 3, то считали, что ген специфически экспрессируется в этой ткани.

Коллекция тканей

Образцы легкого, почки, толстого и тонкого кишечника, скелетной мышцы, лимфоузла, селезенки и передней коры головного мозга получены от здоровых взрослых пациентов, погибших вследствие травм, несовместимых с жизнью. Образцы опухолей семенников (31) получены в результате орхиэктомии, среди них 27 образцов герминогенного происхождения и 11 образцов прилегающих нормальных тканей, среди них 7 герминогенного происхождения (паренхима яичка). 18 образцов были парными (6 пар герминогенного происхождения и три пары негерминогенного происхождения). Два образца нормальной ткани семенников, полученные в ходе хирургической кастрации пациентов с раком простаты, далее использовали в качестве контроля (подробности см. в дополнительной таблице Table_S1, доступна по запросу). Все репрезентативные образцы были немедленно заморожены в жидком азоте. Забор образцов производился в соответствии с федеральным законом № 180 «О биомедицинских клеточных продуктах» (приказ Министерства здравоохранения Российской Федерации от 11.08.2017 № 517н, приложение 2, см. <http://publication.pravo.gov.ru/Document/View/0001201709290030>) и утверждался этически комитетами Института биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук и Национального медицинского исследовательского центра онкологии имени Н.Н. Блохина Министерства здравоохранения Российской Федерации.

Выделение РНК

Тотальную РНК выделяли с использованием гуанидинизотиоцианата согласно [16]. Все препараты РНК обрабатывали ДНКазой I (Promega, США) в соответствии с рекомендациями фирмы-производителя. Итоговые образцы очищали с использованием RNeasy MINI RNA kit (Qiagen, США). Качество и чистоту образцов РНК определяли при помощи электрофореза в 1% агарозном геле. Количество РНК определяли спектрофотометрически.

Таблица 1. Последовательности праймеров для количественной ПЦР

Ген	Прямой	Обратный	Длина продукта, п.н.
18S	TGAGAAACGGCTACCACATC	GCTATTGGAGCTGGAATTACC	203
<i>GAPDH</i>	ACTCCTCCACCTTTGACGCT	TCTTCCTCTTGTGCTCTTGCT	179
<i>ZBTB32</i>	GCCCTATGCGTGCTCTGTCT	GGTCATGGCCGAGAAGTCC	139
<i>ZNF473</i>	GGAAGCCCAGAAGCAACAAG	TTCTGGATCGCCTAGCAAAC	189
<i>ZNF446</i>	AATAGAGGGGTCTGTCCAGC	CCGTACTTCTCCAGCATCGC	231

Количественная ПЦР на матрице кДНК (ОТ-ПЦР)

Синтез первых цепей осуществляли с использованием рассеянной гексануклеотидной затравки (Promega) и обратной транскриптазы PowerScript (Clontech, США) согласно рекомендациям фирмы-производителя. Количество кДНК-матрицы в каждой реакции ПЦР было эквивалентно 10 нг тотальной РНК. Последовательности использованных в работе праймеров приведены в табл. 1. Подбор праймеров проводили с использованием программного обеспечения Primer-Blast (<https://www.ncbi.nlm.nih.gov/tools/primer-blast/index.cgi>), при этом одним из критериев было расположение праймеров в разных экзонах. Реакцию проводили в буферной системе qPCR-HS SYBR («Евроген», Россия) на ПЦР-амплификаторе LightCycler 480 (Roche, США) с использованием следующего температурного режима: 95°C, 3 мин; затем 40 циклов: 95°C, 20 с; 65°C, 20 с; 72°C, 40 с. Уровень транскрипции оценивали относительно среднего геометрического представления транскриптов генов 18S рРНК и *GAPDH*. Все эксперименты ставили в трех технических повторях.

Статистическая обработка экспериментальных результатов

Сравнение двух групп данных проводили с использованием критерия Манна–Уитни для независимых выборок и с применением критерия Вилкоксона для связанных выборок. Для анализа согласованности транскрипции рассчитывали значение коэффициента корреляции Спирмена. Уровень значимости принимали равным 0.05. Все вычисления на основе баз данных производили с использованием Excel2010, программной среды R [17] и дополнительных пакетов stats, openxlsx (<https://github.com/ycphs/openxlsx>). При расчете тканеспецифичности транскрипции генов рассчитывали отношение уровня транскрипции каждого гена в ТРМ во всех тканях, кроме исследуемой, к его транскрипции в исследуемой ткани, что позволяло избежать случаев деления на ноль при отсутствии транскрипции в других органах. Для каждого гена определяли максимальное из по-

лученных отношений и, если оно не превышало 0.3, то этот ген отбирали для последующего анализа.

Для построения корреляционных матриц использовали пакеты stats, cluster (<https://CRAN.R-project.org/package=cluster>), corrplot (<https://github.com/taiyun/corrplot>). При проведении кластерного анализа, построении дендрограмм и расчете оптимального количества кластеров использовали пакеты stats, cluster, dendextend [18], NbClust [19], clValid [20]. В качестве меры расстояния между генами использовали величину, равную (1 – модуль коэффициента корреляции Спирмена). Кластеры выделяли согласно алгоритму иерархической классификации по методу полной связи. Скрипты доступны по запросу.

Дополнительные онлайн-ресурсы

Построение диаграмм Венна – <http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>,

GePIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis – <http://gepia.cancer-pku.cn/>) [21] – сопоставление уровней транскрипции генов в нормальных и опухолевых образцах, основанное на данных GTEx (<https://gtexportal.org/home/>) и TCGA (The Cancer Genome Atlas Program – <https://portal.gdc.cancer.gov/>),

HGNC (HUGO Gene Nomenclature Committee) – <https://www.genenames.org/>,

Ensembl – <https://www.ensembl.org/index.html>,

Онлайн-конвертер идентификационных номеров генов – <https://www.biotools.fr/>,

Human genome browser [22] – <https://genome.ucsc.edu/>

РЕЗУЛЬТАТЫ

Девять генов семейства C2H2 тканеспецифично транскрибируются в семенниках

В анализе использовали данные крупномасштабного секвенирования РНК, предоставленные проектами Illumina Body Map, Encyclopedia of DNA Elements (ENCODE) [23], The Genotype-Tissue Expression (GTEx) [24] и Human Protein Atlas (HPA) [25]. Приведенные источники данных различаются

Таблица 2. Представленность тканей и генов в базах данных

База данных	Ткани, число	Гены семейства C2H2, число
Illumina Body Map	16	717
ENCODE	13	718
GTE _x	53	718
HPA	43	709

по количеству тканей, количеству образцов, приходящихся на каждую ткань (от одного до нескольких сотен) и по способу получения биоматериала (в результате хирургической операции или при посмертном вскрытии). Более подробное описание баз данных приведено в работе [13].

Мы анализировали усредненные по нескольким образцам уровни транскрипции, представленные в TPM (Transcripts Per Million). Из каждого набора данных отбирали гены семейства C2H2; отбор проводили на основании принадлежности к группе 28 в базе генов человека HGNC [26], используя идентификационные номера Ensembl. Количество тканей и генов семейства C2H2, представленных в разных базах, приведено в табл. 2.

Далее мы оценили общее количество генов данного семейства, транскрибирующихся в разных тканях на уровне не менее 3 TPM. За исключением нескольких тканей, где количество генов, транскрибируемых на таком уровне, находится в диапазоне 200–300 (например, печень и скелетная мышца), в других тканях количество таких генов превышает 450, при этом наибольшее число генов транскрибируется на таком уровне в семенниках (более 600). Таким образом, можно заключить, что большая часть генов семейства активна практически во всех представленных тканях (см. дополнительную таблицу Table_S2, доступна по запросу).

Далее проводили поиск генов семейства C2H2, специфичных для каждой ткани. Сначала отбирали гены с уровнем транскрипции в данной ткани не менее 5 TPM. Ген считали активным преимущественно в данной ткани, если уровень его транскрипции в ней превышал минимум в 3 раза его транскрипцию в любой из других тканей или органов.

Результаты по тканеспецифичной транскрипции генов, представленные в каждой из баз данных, приведены в дополнительной таблице Table_S3 (доступна по запросу). Отметим, что во всех четырех базах приведены данные только для тканей надпочечников, семенников, яичников, печени и легкого. Во всех случаях наибольшее число генов с тканеспецифичной транскрипцией (16 и более) обнаруже-

но в семенниках. Также тканеспецифично транскрибирующиеся гены C2H2 (не более 10) обнаружены в яичниках, мозге, селезенке, коре головного мозга, костном мозге, предстательной железе. Однако в отличие от семенников сопоставление результатов, представленных в разных базах данных, практически не выявило общих генов. Это наблюдение согласуется с результатами работы [14], в которой найдено 35 генов, специфично транскрибирующихся в семенниках, тогда как в других органах и тканях число специфичных для них генов семейства C2H2 не превышало шести. Таким образом, в то время как в большинстве тканей основная часть генов семейства C2H2 транскрибируется неспецифично, в семенниках транскрибируется численно наибольшая тканеспецифичная фракция генов.

В дальнейшем мы сосредоточились на этой фракции генов. Суммарно во всех базах данных обнаружено 52 гена этого типа. Стоит отметить, что при использовании разных версий сборок баз данных количество и набор генов незначительно меняются. Это связано с тем, что при пополнении баз новыми данными усредненные значения уровней транскрипции генов изменяются, и гены, находящиеся на границе заданных нами условий, могут оказаться на любой из сторон. Стоит также отметить, что в таких базах данных, как Illumina и ENCODE, представлено незначительное количество тканей (и наименьшее количество образцов, приходящееся на ткань – от одного до трех) по сравнению с HPA и GTE_x, что повышает вероятность ложного выбора гена как семенник-специфичного в связи с отсутствием информации о его транскрипции в тканях, которые не представлены в базе. Поэтому далее мы анализировали 25 генов, уровень транскрипции которых в семенниках превышал максимальный уровень в других органах более чем в 1.5 раза во всех рассмотренных базах данных. Из них 13 генов совпали с данными [14] по 35 семенник-специфичным генам. Расхождения могут объясняться использованием разных баз данных (GTE_x, HPA в этой работе и TiGER в [14]) и различных алгоритмов поиска тканеспецифичных генов. Таким образом, видно, что отбор генов зависит от алгоритма поиска и состояния базы данных. Все это указывает на огромную значимость непосредственного экспериментального подтверждения анализируемых данных.

Из наборов генов, выделенных из каждой базы данных, мы отобрали общие для всех баз (рис. 1). Всего таким образом отобрано 9 генов: ZBTB32, CTCFL, ZNF560, ZNF541, ZNF473, ZNF165, PRDM9, ZSCAN5A, ZNF487. Все остальные гены, за исключением PRDM9, ZSCAN5A и ZNF487, выявляются как семенник-специфичные при использовании раз-

Таблица 3. Транскрипция отобранных генов в семенниках согласно четырем базам данных (в ТРМ)*

Ген	HPA	ENCODE	GTEX	Illumina
ZNF473	76.4 (11.1/4.25)	79 (8/2.5)	49.1 (8.3/3.25)	46 (8/4)
ZBTB32	43.3 (7.5/0.15)	84 (4/0)	109.3 (6.5/0.3)	32 (5/0.4)
ZNF541	19.2 (1.7/0.1)	40 (1/0.3)	45.7 (2.7/0.3)	18 (2/0.3)
ZSCAN5A	34.6 (11.3/3.4)	12 (2/0.95)	14.4 (2.3/1.2)	12 (3/1)
ZNF487	51.4 (9.9/2.95)	28 (7/2)	23.2 (4.4/2.1)	21 (5/2)
PRDM9	7 (1.7/0)	9 (0/0)	6.9 (0/0)	6 (0/0)
ZNF560	11.9 (1.2/0)	15 (0.2/0)	15.5 (0.6/0)	12 (0.3/0)
CTCF	20.4 (0.8/0.3)	14 (0.2/0)	7.5 (0.1/0)	17 (0.5/0.2)
ZNF165	35.8 (7.4/1.55)	46 (15/2)	45.6 (7.6/1.35)	49 (9/2)

*В скобках через косую черту также указаны максимальное и медианное значение транскрипции отобранных генов в других тканях (в ТРМ) согласно той же базе данных.

Таблица 4. Данные по белковым доменам и положению генов

Ген	Число С2H2	Другие домены	Расположение
CTCF	11	Нет	20q13.31
PRDM9	14	SET, KRAB	5p14.2
ZBTB32	3	BTB/POZ	19q13.12
ZNF165	6	SCAN	6p22.1
ZNF473	20	KRAB	19q13.33
ZNF541	5	ELM2, SANT	19q13.33
ZNF560	15	KRAB+KRAB	19p13.2
ZSCAN5A	5	SCAN	19q13.43
ZNF487	3	KRAB	10q11.21

личных сборок баз данных, а также представлены в группе генов, специфичных для семенников [14]. Данные по транскрипции 9 генов в семенниках согласно четырем рассмотренным базам данных, медианные и максимальные значения транскрипции генов в тканях, отличных от семенников, представлены в табл. 3, а структурные характеристики генов – в табл. 4 (аналогичные данные по всем 52 генам представлены в дополнительной таблице Table_S4, доступна по запросу).

В то же время существуют различия в профилях транскрипции отобранных генов. Гены *CTCF*,

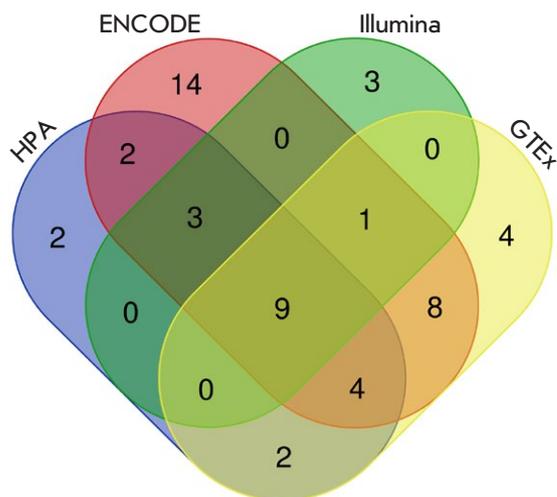


Рис. 1. Диаграмма Венна, показывающая отобранные по заданным критериям гены, общие для четырех баз данных – Human Protein Atlas, ENCODE, Illumina Body Map и GTEX. Диаграмма построена с помощью онлайн-программы (<http://bioinformatics.psb.ugent.be/webtools/Venn/>)

PRDM9, *ZNF560* – это сугубо специфичные гены семенников, уровень их транскрипции в других тканях не превышает 0.6 ТРМ. Кроме того, уровень транскрипции этих генов в семенниках приблизительно в 2–3 раза ниже, чем у генов *ZBTB32*, *ZNF165*, *ZNF473* и *ZNF541*. Гены *ZBTB32* и *ZNF541* имеют практически недетектируемый уровень транскрипции в большинстве тканей (медиана варьирует в пределах 0–0.6 ТРМ), однако в ряде органов и клеток, таких, как В-клетки, лимфоузлы, аппендикс, селезенка, миндалина, Пейеровы бляшки, транскрипция *ZBTB32* может достигать 7.5 ТРМ, а уровень транскрипции *ZNF541* в надпочечниках составляет 2–3 ТРМ. Гены *ZNF165*, *ZSCAN5A*, *ZNF487* и *ZNF473* на низком уровне транскрибируются практически во всех тканях, но уровень их транскрипции в семенниках минимум в 3 раза выше, чем в любой из остальных тканей.

Для дальнейшего анализа мы отобрали два гена – *ZNF473* и *ZBTB32*, важные для определения тканевой идентичности семенников [27].

Транскрипция генов *ZBTB32* и *ZNF473* понижена в герминогенных опухолях семенников

Мы экспериментально определили содержание транскриптов *ZBTB32* и *ZNF473* в образцах семенников, легкого, почки, толстого и тонкого кишечника, скелетной мышцы, лимфоузла, селезенки и передней коры головного мозга человека. Уровень транскрипции оценивали с помощью ПЦР в реальном времени

с использованием матрицы кДНК и среднего геометрического содержания транскриптов *GAPDH* и 18S рРНК для нормализации. Результаты представлены на *рис. 2А,Б*. Как видно, транскрипция *ZNF473* в семенниках превышает уровень транскрипции в других органах минимум в 5 раз, а *ZBTB32* – в 4 раза. Не высокий, но заметный уровень транскрипции этих генов наблюдался в лимфоидных тканях (селезенка и лимфоузлы), в остальных проверенных тканях уровень транскрипции этих генов незначителен, что согласуется с рассмотренными выше результатами анализа баз данных.

Для сравнения профилей транскрипции двух исследуемых генов и подтверждения их независимости от особенностей подготовки образцов, постановки реакций и т.п. мы параллельно провели анализ транскрипции случайно выбранного гена *ZNF446*, также принадлежащего семейству С2Н2. Этот ген не был отобран из баз данных согласно указанным выше критериям и транскрибировался в семенниках и других тканях на низком уровне (1–10 TPM) без выраженной тканевой специфичности. Полученные нами результаты подтверждают отсутствие тканевой специфичной транскрипции гена *ZNF446* (*рис. 2В*).

Мы определили содержание транскриптов тех же генов на панели кДНК, полученной из образцов опухолей и нормальных тканей семенников. Уровни транскрипции оценивали как описано выше. Результаты показаны на *рис. 3*. Панель представлена образцами паренхимы здоровых семенников (контроль – образцы 17N, 19N), образцами опухолей и прилегающих к ним нормальных тканей. Ряд образцов представлен парами опухоль/прилегающая условно нормальная ткань (норма), полученными от одного пациента. Опухоли (и прилегающие к ним нормы) представлены как образцами, имеющими герминогенное происхождение (семинома, тератома, опухоль желточного мешка, эмбриональный рак и смешанные типы), так и негерминогенными образцами, представленными стромальными и паратестикулярными опухолями (лейдигомы, рабдомиосаркомы, лейомиосаркомы).

В герминогенных опухолях транскрипция гена *ZBTB32* (*рис. 3А*) подавляется до практически недетектируемого уровня, а транскрипция гена *ZNF473* – до значений, характерных для транскрипции в других тканях (*рис. 3Б*). Четких закономерностей изменения транскрипции гена *ZNF446* при опухолеобразовании не выявлено (*рис. 3В*).

Образцы нормальных тканей, прилегающих к опухолям герминогенного происхождения, характеризуются большим разбросом уровней транскрипции генов *ZBTB32* и *ZNF473* от значений, сравни-

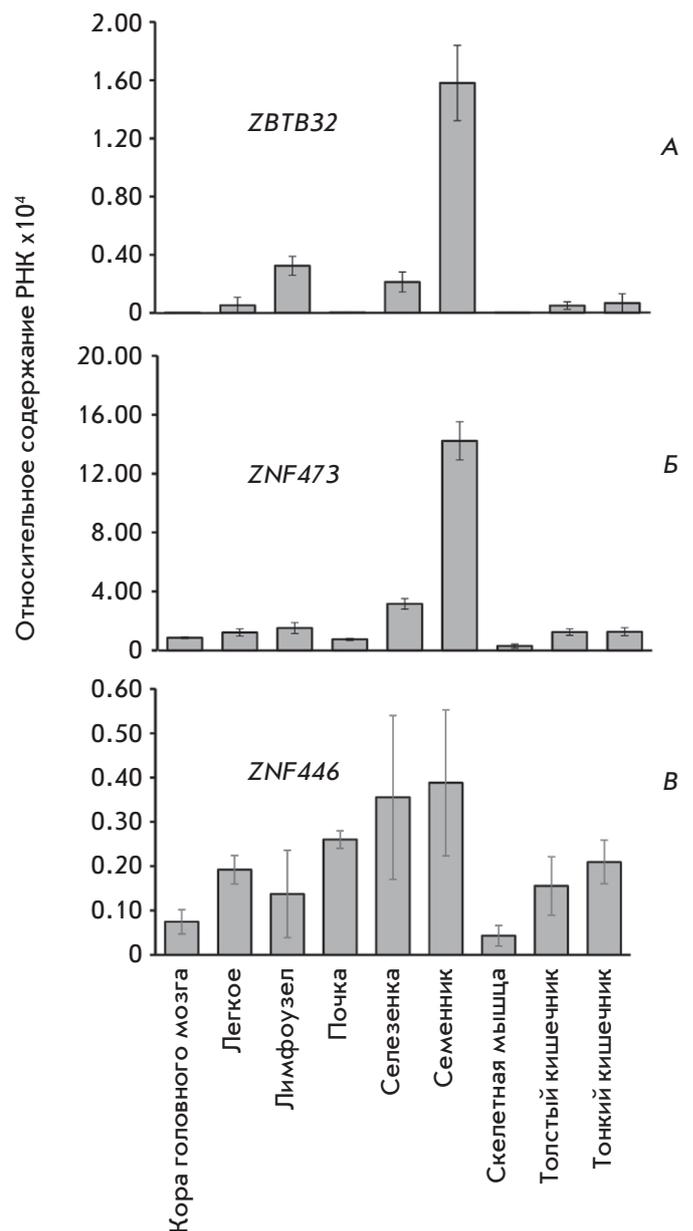


Рис. 2. Относительное содержание транскриптов генов *ZBTB32* (А), *ZNF473* (Б) и *ZNF446* (В) в различных тканях. Содержание РНК нормализовали относительно среднего геометрического содержания транскриптов генов домашнего хозяйства 18S рРНК и *GAPDH*

мых с контрольными образцами (образцы 5N, 8N и 14N), до значений, характерных для опухолей (образцы 7N, 21N). У парных образцов с высоким уровнем транскрипции в норме (пары № 8, 14 и 32) происходит снижение уровня транскрипции гена *ZBTB32* в опухоли минимум в 8 раз, а *ZNF473* – в 3 раза. Стоит отметить, что в этих же образцах транскрипция *ZNF446* может как повышаться, так и понижаться. Одной из причин разброса уров-

лено. Изучение влияния опухолей различного типа на свойства прилегающих тканей может быть перспективной задачей будущих исследований.

Наблюдается разброс в уровнях экспрессии генов *ZNF473*, *ZBTB32* и *ZNF446* в негерминогенных тканях. Сопоставление содержания транскриптов этих генов в негерминогенных опухолях (образцы 10Т, 12Т, 20Т, 33Т) и прилегающих нормальных тканях (образцы 10N, 12N, 13N, 33N) выявляет разнонаправленность изменений экспрессии всех трех генов при образовании негерминогенных опухолей и не обнаруживает четких закономерностей изменения уровней транскрипции всех трех генов.

В целом, наблюдается достоверное снижение уровня транскрипции генов *ZNF473* и *ZBTB32* в опухоли по сравнению с нормой (*p*-значение по Манну–Уитни менее 0.02 в обоих случаях и более 0.4 у *ZNF446*). Эти гены могут выступать в качестве маркеров опухолей, происходящих из клеток зародышевого пути.

Для подтверждения этих данных мы при помощи онлайн-ресурса GePIA [21] сопоставили уровни транскрипции 25 выявленных нами ранее генов в нормальных и опухолевых образцах семенников (табл. 5). Уровень транскрипции большинства генов (за исключением *ZNF728*, *ZNF560* и *ZFP42*) в опухоли снижен более чем в 3 раза до значений, сопоставимых с уровнями их транскрипции в других тканях. Уровень транскрипции гена *ZNF728* в опухоли снижается менее чем в 2 раза, уровень транскрипции гена *ZNF560* остается практически неизменным, а гена *ZFP42*, напротив, возрастает в 17 раз.

Результаты, полученные нами для генов *ZBTB32* и *ZNF473*, согласуются с данными GePIA. Это позволяет рассматривать другие гены со сходным, согласно GePIA, поведением в качестве потенциальных маркеров опухолеобразования в семенниках. Можно предположить, что большая часть рассматриваемых генов входит в состав сетей межгенных взаимодействий, которые отвечают за основные клеточные процессы, определяющие функции семенников, подавление этих процессов происходит при опухолеобразовании.

В связи с этим, важным является сходство профилей транскрипции генов *ZBTB32* и *ZNF473* в герминогенных образцах в норме и в опухоли, что предполагает согласованность их транскрипции. Согласованность транскрипции 25 отобранных семенник-специфичных генов мы проанализировали с использованием базы данных GTEx, содержащей данные крупномасштабного секвенирования РНК в 361 образце семенников в норме и построили для них и контрольного гена *ZNF446* корреляционную матрицу (рис. 4А).

Таблица 5. Уровни транскрипции генов семейства C2H2, специфически транскрибирующихся в семенниках, в нормальных и опухолевых образцах семенников согласно данным GePIA*

Ген	Норма, TPM	Опухоль, TPM	Соотношение норма/опухоль, раз	Приведенное <i>p</i> -значение
<i>ZBTB32</i>	93.0	0.93	100.0	1.78e-77
<i>PRDM9</i>	4.52	0.05	90.4	7.58e-78
<i>ZNF541</i>	27.4	0.36	76.2	1.19e-99
<i>KLF17</i>	15.8	0.31	51.0	5.38e-24
<i>CTCF</i>	9.11	0.20	45.6	1.60e-77
<i>ZNF479</i>	3.34	0.13	25.7	6.61e-39
<i>ZFHX2</i>	17.7	1.09	16.2	4.19e-56
<i>ZNF487</i>	33.0	2.48	13.3	4.01e-63
<i>ZNF433</i>	32.9	2.61	12.6	1.77e-75
<i>ZSCAN5B</i>	2.25	0.18	12.5	7.78e-45
<i>ZNF165</i>	21.3	2.20	9.68	2.25e-44
<i>ZNF563</i>	15.3	1.98	7.71	2.93e-70
<i>ZNF473</i>	39.1	6.37	6.14	3.95e-47
<i>ZSCAN5A</i>	34.6	5.94	5.83	1.09e-59
<i>ZNF628</i>	31.7	5.45	5.82	7.35e-45
<i>ZNF233</i>	9.55	1.68	5.68	1.84e-32
<i>ZNF829</i>	12.6	3.28	3.85	5.86e-20
<i>ZNF646</i>	32.7	8.83	3.70	3.21e-38
<i>ZNF689</i>	22.4	6.40	3.50	1.54e-33
<i>ZNF318</i>	46.8	14.3	3.27	7.26e-34
<i>BNC1</i>	19.6	6.45	3.04	3.99e-9
<i>ZNF574</i>	37.0	15.7	2.36	2.47e-22
<i>ZNF728</i>	5.86	3.44	1.70	1.94e-7
<i>ZNF560</i>	8.89	7.53	1.18	4.09e-2
<i>ZFP42</i>	2.54	43.0	0.06	2.86e-34

*Приведены медианы транскрипции в TPM. Гены расположены в порядке уменьшения соотношения уровней их транскрипции в норме и в опухоли. Девять генов, отобранных одновременно из четырех баз данных, выделены жирным.

Используя коэффициенты корреляции в качестве меры расстояния между генами по формуле (1 – модуль коэффициента корреляции), мы построили иерархическое дерево, применив алгоритм иерархической классификации (рис. 4Б). Следует отметить, что при таком подходе наиболее «близко расположенными» генами оказываются гены с повышенным значением коэффициента корреляции независимо от знака. Оптимальное количество кластеров раз-

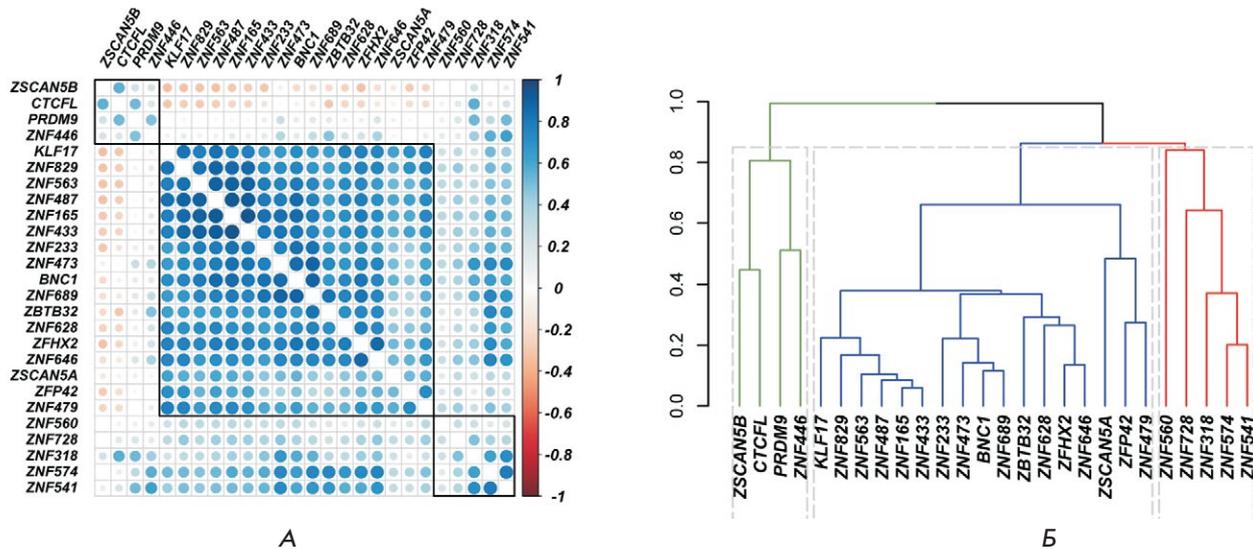


Рис. 4. Корреляционная матрица уровней транскрипции 25 генов, отобранных на основании их специфичной экспрессии в семенниках, и контрольного гена *ZNF446* в 361 образце семенников, содержащихся в коллекции GTEh (А). Гены расположены согласно иерархической кластеризации методом полной связи. Границы кластеров обведены черным. Рассчитаны коэффициенты корреляции Спирмена, значение которых обозначено цветом. Дендрограмма, отображающая согласованность экспрессии генов (Б). В качестве меры различия использована величина, равная (1 – модуль коэффициента корреляции Спирмена). Выделены три кластера, которые обозначены разными цветами, пунктирная линия серого цвета показывает границы кластеров

ными алгоритмами определяется числом от 2 до 3. Между разными способами иерархической классификации наблюдается хорошее соответствие (коэффициенты корреляции при кофенетическом анализе превышают 0.51). При кластеризации разными методами большая часть генов, включая *ZNF473* и *ZBTB32*, попадает в один кластер, и только четыре гена – *CTCF*, *ZSCAN5B*, *PRDM9* и контрольный ген *ZNF446* – в другой. Таким образом, большая часть отобранных генов согласованно транскрибируется в семенниках. Уровни транскрипции генов в пределах одного кластера положительно коррелируют между собой. Гены, входящие в разные кластеры, могут входить в состав разных ветвей специфичной для семенников генной сети и, как следствие, быть участниками разных биологических процессов, происходящих в семенниках. Установление положения рассмотренных генов в иерархии межгенных взаимодействий и их взаимосвязи с внутриклеточными процессами в семенниках является масштабной и перспективной задачей будущих исследований.

ОБСУЖДЕНИЕ

Изучение экспрессии генов представляет особый интерес в случае патологических процессов, включая злокачественное перерождение клеток. Важным этапом является поиск генов, которые в дальнейшем предполагается использовать как диагностические маркеры или как объекты направленной

генной терапии. Особый интерес представляют гены с выраженной тканеспецифичной экспрессией, так как именно они обеспечивают специфический ответ клеток на внешние и внутренние воздействия. В данной работе в качестве объекта исследования мы выбрали семейство генов, содержащих домены цинковый палец типа C2H2, представляющее особый интерес в связи с тем, что, во-первых, большинство его членов из-за наличия ДНК-связывающего домена относятся к факторам транскрипции, т.е. к регуляторным генам, во-вторых, многочисленность членов его семейства может позволить выявить ряд любопытных закономерностей их экспрессии.

В настоящий момент в связи с развитием технологии массивированного секвенирования создано несколько крупных баз данных по экспрессии генов в разных тканях и органах. Применяя заданные пользователем алгоритмы поиска генов с тканеспецифичной экспрессией, можно производить отбор генов-кандидатов. Базы данных различаются по количеству и способу получения образцов, поэтому при поиске и дальнейшем анализе генов-кандидатов важно правильное сопоставление получаемых результатов. В данной работе мы провели одновременный анализ четырех баз данных, беря за основу средний уровень экспрессии гена в ткани/органе в каждой базе данных. В результате было отобрано 9 генов семейства C2H2 с потенциально тканеспецифичной транскрипцией в семенниках. Для даль-

нейшего анализа было выбрано два гена – *ZBTB32* и *ZNF473*, тканеспецифичность транскрипции которых в клетках паренхимы семенников мы подтвердили экспериментально.

К важным параметрам экспрессии генов относится ее изменение при злокачественном перерождении клеток. Такого рода данным посвящен онлайн-ресурс GePIA (Gene Expression Profiling Interactive Analysis). В его основе лежит алгоритм, позволяющий сопоставлять данные массивированного секвенирования, полученные из двух источников – коллекции нормальных тканей GTEx и коллекции опухолевых тканей TCGA. Согласно этому ресурсу, транскрипция генов *ZBTB32*, *ZNF473*, *PRDM9*, *CTCF*, *ZNF165*, *ZNF541* и ряда других понижена в герминогенных опухолях семенников, поэтому они могут рассматриваться как потенциальные маркеры онкотрансформации клеток зародышевого типа. Мы экспериментально подтвердили снижение уровня транскрипции двух выбранных генов (*ZBTB32* и *ZNF473*) в герминогенных опухолях. Четких закономерностей по экспрессии этих генов в негерминогенных опухолях и в прилегающих нормальных тканях выявить не удалось. Уровень экспрессии этих генов в негерминогенных нормальных тканях

изначально низок, таким он остается в негерминогенных опухолях. Уменьшение уровня транскрипции этих генов в клетках зародышевого пути может служить маркером риска развития герминогенных опухолей. Отсутствие транскрипции *ZBTB32* может также служить доказательством отсутствия примесей прилегающих нормальных тканей при получении опухолевого образца в экспериментах, где важна чистота опухолевого препарата. В последнем случае, однако, необходимы дополнительные маркеры, позволяющие отличить герминогенные опухоли от негерминогенных тканей.

Таким образом, накопленный в базах данных материал по экспрессии генов служит существенным подспорьем при поиске генов-кандидатов, отвечающих за развитие патологических процессов. Дальнейший анализ в виде экспериментального подтверждения выявленных *in silico* закономерностей, установление функций генов и их положения в иерархии генных сетей представляют собой интересную и масштабную задачу будущих исследований. ●

Авторы благодарны М.В. Зиновьевой за предоставленные препараты кДНК.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Alba M.M. // *Genome Biol.* 2017. V. 18. P. 168.
- Tupler R., Perini G., Green M.R. // *Nature.* 2001. V. 409. P. 832–833.
- Collins T., Stone J.R., Williams A.J. // *Mol. Cell. Biol.* 2001. V. 21. P. 3609–3615.
- Tadepally H.D., Burger G., Aubry M. // *BMC Evol. Biol.* 2008. V. 8. P. 176.
- Kotova E.S., Akopov S.B., Sverdlov E.D., Nikolaev L.G. // *Biopol. Cell.* 2014. V. 30. P. 260–272.
- Kim S., Yu N.K., Kaang B.K. // *Exp. Mol. Med.* 2015. V. 47. P. e166.
- Cassandri M., Smirnov A., Novelli F., Pitolli C., Agostini M., Malewicz M., Melino G., Raschella G. // *Cell Death Discov.* 2017. V. 3. P. 17071.
- Fedotova A.A., Bonchuk A.N., Mogila V.A., Georgiev P.G. // *Acta Naturae.* 2017. V. 9. P. 47–58.
- Lukic S., Nicolas J.C., Levine A.J. // *Cell Death Differ.* 2014. V. 21. P. 381–387.
- Najafabadi H.S., Mnaimneh S., Schmitges F.W., Garton M., Lam K.N., Yang A., Albu M., Weirauch M.T., Radovani E., Kim P.M., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2015. V. 33. P. 555–562.
- Brayer K.J., Segal D.J. // *Cell. Biochem. Biophys.* 2008. V. 50. P. 111–131.
- Burdach J., O'Connell M.R., Mackay J.P., Crossley M. // *Trends Biochem. Sci.* 2012. V. 37. P. 199–205.
- Aguet F., Ardlie K.G. // *Curr. Genet. Med. Repts.* 2016. V. 4. P. 163–169.
- Kim P., Park A., Han G., Sun H., Jia P., Zhao Z. // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. P. D1031–D1038.
- Wagner G.P., Kin K., Lynch V.J. // *Theory Biosci.* 2012. V. 131. P. 281–285.
- Sambrook J., Maniatis T., Fritsch E.F. *Molecular Cloning: A Laboratory Manual.* Cold Spring Harbor, N.Y.: Cold Spring Harbor Lab. Press, 1987.
- R CoreTeam. R: A language and environment for statistical computing. Vienna, Austria: R. Fdn for Statistical Computing, 2014.
- Galili T. // *Bioinformatics.* 2015. V. 31. P. 3718–3720.
- Charrad M., Ghazzali N., Boiteau V., Niknafs A. // *J. Stat. Softw.* 2014. V. 61. P. 1–36.
- Brock G., Pihur V., Datta S., Datta S. // *J. Stat. Softw.* 2008. V. 25. P. 1–22.
- Tang Z., Li C., Kang B., Gao G., Zhang Z. // *Nucl. Acids Res.* 2017. V. 45. P. W98–W102.
- Kent W.J., Sugnet C.W., Furey T.S., Roskin K.M., Pringle T.H., Zahler A.M., Haussler D. // *Genome Res.* 2002. V. 12. P. 996–1006.
- ENCODE Project Consortium // *Nature.* 2012. V. 489. P. 57–74.
- GTEx Consortium // *Science.* 2015. V. 348. P. 648–660.
- Uhlen M., Hallstrom B.M., Lindskog C., Mardinoglu A., Ponten F., Nielsen J. // *Mol. Syst. Biol.* 2016. V. 12. P. 862.
- Gray K.A., Yates B., Seal R.L., Wright M.W., Bruford E.A. // *Nucl. Acids Res.* 2015. V. 43. P. D1079–D1085.
- Pierson E., Koller D., Battle A., Mostafavi S., Ardlie K.G., Getz G., Wright F.A., Kellis M., Volpi S., Dermitzakis E.T. // *PLoS Comput Biol.* 2015. V. 11. P. e1004220.
- Gainetdinov I.V., Kondratieva S.A., Skvortsova Y.V., Zinov'yeva M.V., Stukacheva E.A., Klimov A., Tryakin A.A., Azhikina T.L. // *Oncotarget.* 2016. V. 7. P. 22439–22447.

УДК 576.32/.36

Внеклеточные везикулы метастатической меланомы переносят мРНК $\alpha 7$ -nAChR, увеличивая поверхностную экспрессию рецептора в нормальных кератиноцитах и стимулируя их рост

М. Л. Бычков¹, А. В. Кириченко^{1,2}, И. Н. Михайлова³, А. С. Парамонов¹, М. П. Кирпичников^{1,4}, М. А. Шулепко¹, Е. Н. Люкманова^{1,4*}

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

²Московский физико-технический институт (национальный исследовательский университет), Долгопрудный, Московская область, 141701 Россия

³Национальный медицинский исследовательский центр онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России, Москва, 115548 Россия

⁴Междисциплинарная научно-образовательная школа «Молекулярные технологии живых систем и синтетическая биология», Биологический факультет Московского государственного университета им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

*E-mail: ekaterina-lyukmanova@yandex.ru

Поступила в редакцию 29.04.2022

Принята к печати 27.07.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11734

РЕФЕРАТ Ранее нами было показано, что внеклеточные везикулы, секретируемые клетками метастатической меланомы кожи, стимулируют рост, миграцию и стволовость нормальных кератиноцитов. В работе мы впервые показываем, что внеклеточные везикулы, секретируемые клетками метастатической меланомы линий mel H, mel Kog и mel P, содержат как на уровне мРНК, так и на уровне белка никотиновый ацетилхолиновый рецептор $\alpha 7$ типа ($\alpha 7$ -nAChR), который участвует в регуляции онкогенных сигнальных путей в эпителиальных клетках. Инкубация с везикулами, секретируемыми клетками mel H и имеющими наибольшее содержание мРНК $\alpha 7$ -рецептора, приводит к увеличению поверхностной экспрессии $\alpha 7$ -nAChR в нормальных кератиноцитах Het-1A, а также к стимуляции их роста. При этом наблюдается отмена обоих этих эффектов в присутствии ингибитора $\alpha 7$ -nAChR – α -бунгаротоксина. Биоинформатический анализ выявил корреляцию между повышенной экспрессией гена $\alpha 7$ -nAChR у пациентов с метастатической меланомой и неблагоприятным прогнозом выживаемости. Таким образом, внеклеточные везикулы метастатической меланомы могут переносить мРНК $\alpha 7$ -nAChR, усиливая поверхностную экспрессию этого рецептора и стимулируя рост нормальных кератиноцитов, а таргетирование этого рецептора может стать новой стратегией контроля злокачественной трансформации кератиноцитов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА $\alpha 7$ -nAChR, везикулы, метастатическая меланрома, кератиноциты, онкотерапия, рак.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ $\alpha 7$ -nAChR – никотиновый рецептор ацетилхолина типа $\alpha 7$; BEBM – среда роста бронхиального эпителия; α -Bgtx – α -бунгаротоксин; HRP – пероксидаза хрена; WST-1 – водорастворимая соль тетразолия 1.

ВВЕДЕНИЕ

Меланрома – агрессивная опухоль, развивающаяся из меланоцитов [1]. Прогрессия меланом опосредуется секрецией опухолевыми клетками внеклеточных везикул – покрытых мембраной структур, включающих в себя различные белки и нуклеиновые кислоты. Внеклеточные везикулы осуществляют передачу онкогенных сигналов между клетками

опухоли, а также между опухолью и окружающими ее тканями [2, 3]. Фибробласты, иммунные клетки и кератиноциты регулируют физиологию меланоцитов, а также контролируют пролиферацию, инвазию и ангиогенез меланомы за счет секреции паракринных факторов роста и межклеточной коммуникации [4, 5]. Однако в стрессовых условиях, например при фотоповреждении, кератиноциты могут секре-

тировать митогенные и провоспалительные факторы [6].

Ранее мы показали, что внеклеточные везикулы, секретлируемые клетками метастатических меланом, стимулируют рост, миграцию и стволовость нормальных кератиноцитов [7]. Процессы дифференцировки и роста нормальных кератиноцитов регулируются с участием никотинового рецептора ацетилхолина типа $\alpha 7$ ($\alpha 7$ -nAChR) [8], активация которого никотином или его производными, содержащимися в табаке (нитрозаминами), приводит к злокачественной трансформации кератиноцитов [9]. Однако возможное вовлечение $\alpha 7$ -nAChR в стимуляцию роста кератиноцитов под действием внеклеточных везикул меланом ранее не изучалось.

В настоящей работе мы впервые показали, что внеклеточные везикулы, секретлируемые клетками метастатической меланомы кожи, содержат $\alpha 7$ -nAChR на уровне мРНК и белка. При инкубации с везикулами, полученными из клеток линии mel H, наблюдались увеличение поверхностной экспрессии $\alpha 7$ -nAChR в нормальных кератиноцитах и стимуляция их роста, которые отменялись в присутствии ингибитора $\alpha 7$ -nAChR – α -бунгаротоксина (α -Bgtx). Полученные данные позволяют по-новому взглянуть на роль внеклеточных везикул метастатической меланомы и $\alpha 7$ -nAChR в злокачественной трансформации кератиноцитов.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клетки метастатической меланомы кожи линий mel H, mel Kog и mel P получены от пациентов НМИЦ онкологии им. Н.Н. Блохина Минздрава России (Москва, Россия) и охарактеризованы ранее [10]. Клетки выращивали в среде RPMI-1640 («ПанЭко», Россия) с добавлением 10% эмбриональной телячьей сыворотки (Cytiva, Великобритания) и 1% пенициллина/стрептомицина («ПанЭко»). Для удаления эндогенных экзосом эмбриональную телячью сыворотку центрифугировали (70 мин, 120000 g), после чего фильтровали и смешивали со средой. Кератиноциты

человека Het-1A (ATCC, США) культивировали в среде BEBM (Lonza, Швейцария) как описано ранее [7]. Внеклеточные везикулы выделяли из клеток метастатической меланомы как в [7]: клетки выращивали в среде без экзосом, культуральную среду центрифугировали последовательно при 10000 g (15 мин, 4°C) и при 120000 g (70 мин, 4°C). Белковые комплексы удаляли с помощью гель-фильтрации, используя сорбент Superdex G-250 (GE Healthcare, США). Размер везикул оценивали с помощью динамического светорассеяния на приборе DynaPro Titan (Wyatt Technology, США). Экспрессию экзосомального маркера TSG101 в везикулах подтверждали Вестерн-блотингом.

Анализ экспрессии мРНК субъединиц nAChR проводили с помощью ПЦР в реальном времени как описано ранее [7]. Анализировали экспрессию генов *CHRNA3*, *CHRNA4*, *CHRNA5*, *CHRNA7*, *CHRNA9*, *CHRNA2* и *CHRNA4* (праймеры указаны в табл. 1) на амплификаторе Roche LightCycler 96 (Roche, Швейцария). Уровень мРНК нормировали на экспрессию рРНК S18.

Наличие $\alpha 7$ -nAChR на белковом уровне во внеклеточных везикулах анализировали с помощью Вестерн-блотинга [7]. Нитроцеллюлозные мембраны, заблокированные 5% молоком после гель-электрофореза и переноса лизатов везикул, инкубировали в течение ночи при 4°C с первичными антителами кролика против TSG101 (1:1000, ABIN2780037, Antibodies-Online, Германия) или $\alpha 7$ -nAChR (1:1000, ABIN5611363, Antibodies-Online), промывали и инкубировали с HRP-конъюгированными анти-кроличьими антителами (1 : 5000, 111-035-003, Jackson ImmunoResearch, США) в течение 1 ч при 20°C. После этого мембраны промывали и регистрировали сигнал HRP с помощью ECL-субстрата (Bio-Rad, США) с использованием хемидокументера ImageQuant LAS 500 (GE Healthcare, США).

Для изучения влияния внеклеточных везикул на пролиферацию кератиноцитов клетки высевали в 96-луночные планшеты (5×10^3 клеток/луночку),

Таблица 1. Праймеры, использованные в работе

Ген	Праймер		Ампликон, п.н.
	Прямой	Обратный	
<i>S18 SSU RNA</i>	CTC AAC ACG GGA AAC CTC AC	CGC TCC ACC AAC TAA GAA CG	110
<i>CHRNA3</i>	TGT CCC TCT CTG CTT TGT CAC	CCC AGG TTC TTG ATC GGA TGT T	169
<i>CHRNA4</i>	TCG TCC TCT ACA ACA AGT GAG	GGT CCA GGA GCC GAA TTT CA	199
<i>CHRNA5</i>	CGT CTG GTT GAA ACA GGA ATG G	ACA GTG CCA TTG TAC CTG ATG A	185
<i>CHRNA7</i>	TTT ACA GTG GAA TGT GTC AGA	TGT GGA ATG TGG CGT CAA G	88
<i>CHRNA9</i>	GGA GGC CAG ACA TCG TCT TA	CAC TGC TGG TTG TCA AAA GGG	168
<i>CHRNA2</i>	ATC TCC TGG ATC CTT CCC GC	AGA AGG ACA CCT CGT ACA TGC C	290
<i>CHRNA4</i>	CGC CTT CCC TGG TCC TTT TC	TGT TCA CAC CCT CGT AGC GG	381

через 24 ч к ним добавляли везикулы (50 мкг/мл по общему белку) и/или 10 мкМ α -бунгаротоксина (α -Bgtx, – ингибитор $\alpha 7$ -nAChR, Tocris, Великобритания) и дополнительно инкубировали в течение 72 ч без смены среды. Концентрация общего везикулярного белка соответствовала таковой в плазме крови онкологических больных (20–100 мкг/мл) [7]. Жизнеспособность клеток анализировали с использованием колориметрического теста WST-1 (Santa Cruz, США) [11]. Данные нормировали на усредненные показания контрольных лунок с необработанными клетками.

Влияние везикул и α -Bgtx на экспрессию $\alpha 7$ -nAChR в кератиноцитах исследовали после окрашивания клеток TRITC-меченым α -Bgtx (Sigma-Aldrich, США) с помощью проточного цитофлуориметра Attune NxT (Life Technologies, США) как описано ранее [11]. Медиану флуоресценции нормировали на аутофлуоресценцию неокрашенных клеток.

Корреляцию уровня экспрессии *CHRNA7* у пациентов с метастатической меланомой из базы данных TCGA (исследование SKCM) с их выживаемостью анализировали при помощи программы Xena [12].

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Внеклеточные везикулы, секретируемые клетками меланомы, содержат микроРНК, мРНК и белки, способствующие усилению пролиферации, миграции и стволовости нормальных кератиноцитов [7]. Однако вопрос о включении nAChR, регулирующих многие онкогенные процессы в эпителиальных клетках, в со-

став внеклеточных везикул ранее не исследовали.

Методом ПЦР в реальном времени мы впервые показали, что внеклеточные везикулы, секретируемые клетками метастатической меланомы линий mel H, mel Kor и mel P, полученных от пациентов, содержат мРНК *CHRNA7*, кодирующую субъединицу гомопентамерного рецептора $\alpha 7$ -nAChR (рис. 1А). Наибольший уровень *CHRNA7* содержали везикулы, секретируемые клетками mel H. При этом не обнаружены мРНК, кодирующие $\alpha 3$, $\alpha 4$, $\alpha 5$, $\alpha 9$, $\beta 2$ и $\beta 4$ -субъединицы nAChR. С помощью Вестерн-блоттинга подтвердили присутствие белка $\alpha 7$ -nAChR в составе везикул, секретируемых клетками всех исследованных в работе линий метастатической меланомы (рис. 1Б). Примечательно, что ранее проведенный анализ белкового состава внеклеточных везикул, секретируемых первичными меланомами, не выявил в них $\alpha 7$ -nAChR [3]. Возможно, экспрессия этого рецептора может быть специфическим свойством внеклеточных везикул метастатической меланомы.

Ранее мы показали, что внеклеточные везикулы, секретируемые клетками метастатической меланомы mel P, содержат мРНК, кодирующую рецептор эпидермального фактора роста (EGFR), и инкубация нормальных кератиноцитов с этими везикулами приводит к увеличению экспрессии EGFR на поверхности кератиноцитов и стимуляции их пролиферации [7]. В данной работе мы изучили влияние внеклеточных везикул метастатической меланомы mel H, mel Kor и mel P на экспрессию $\alpha 7$ -nAChR в нормальных кератиноцитах. С помощью проточной цитофлуориметрии установлено, что только инкубация

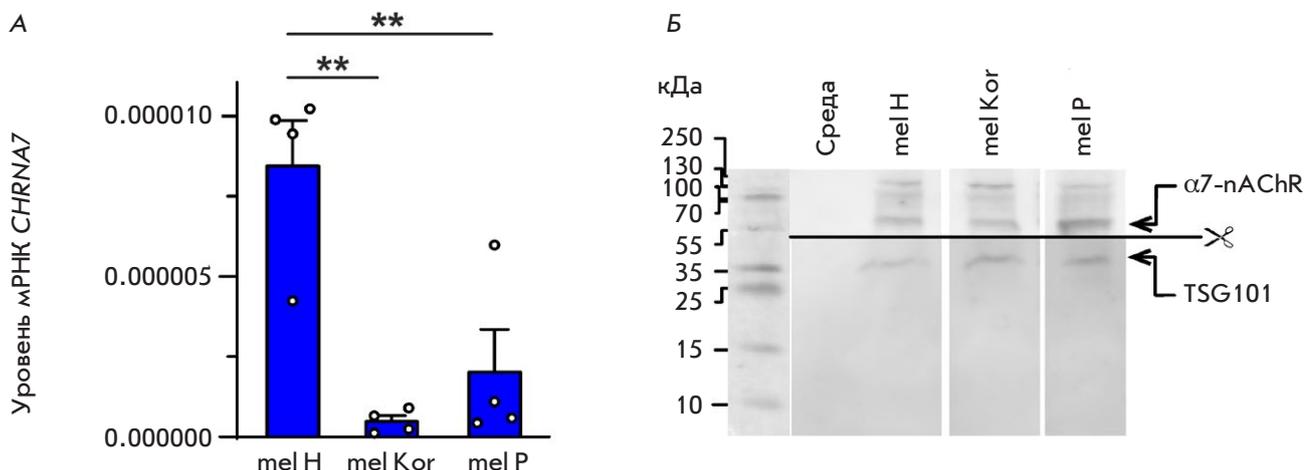
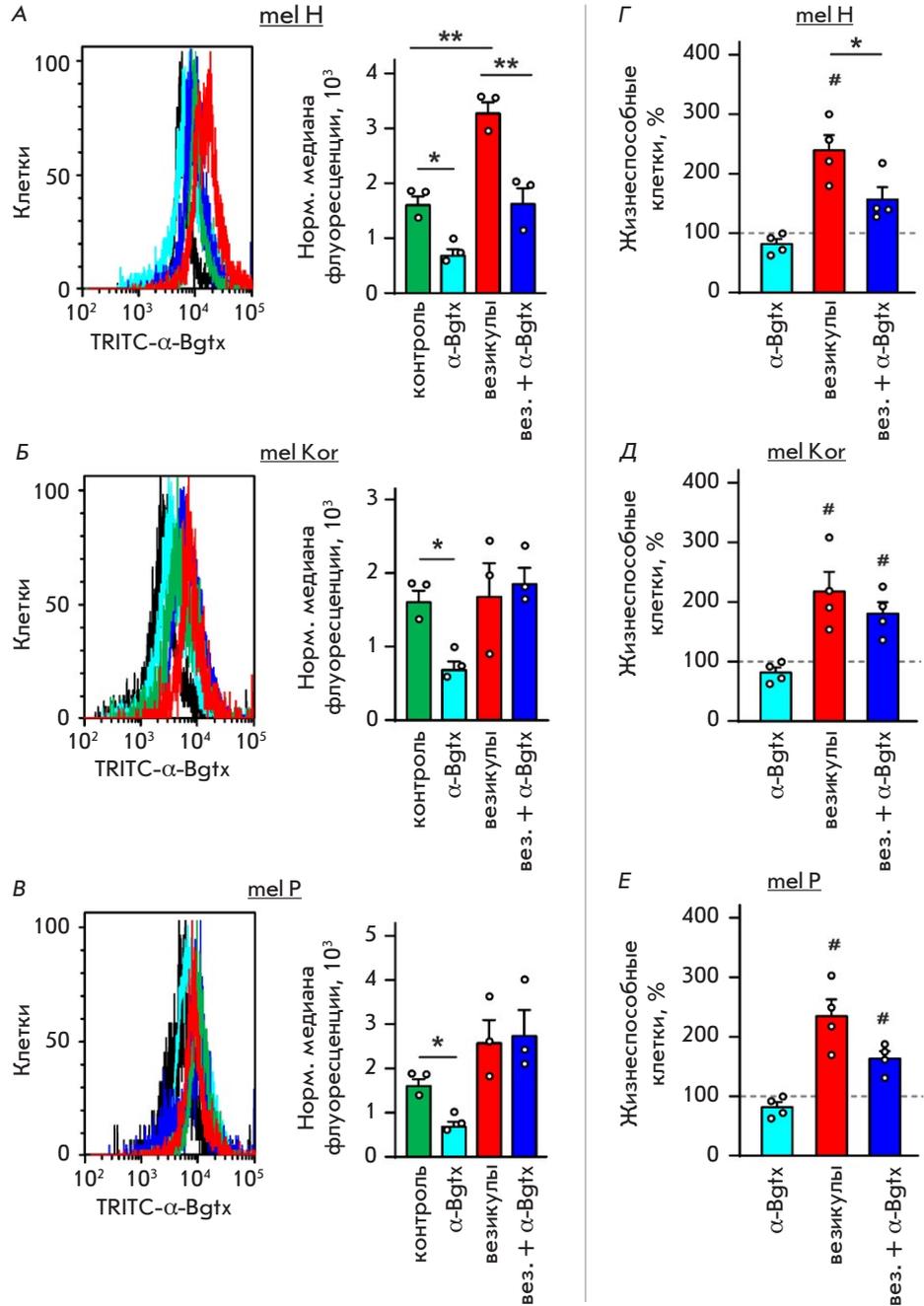


Рис. 1. Анализ экспрессии $\alpha 7$ -nAChR в везикулах, секретируемых клетками метастатической меланомы. А – анализ экспрессии гена *CHRNA7* в везикулах клеток линий mel H, mel Kor и mel P. Данные ПЦР в реальном времени нормированы на экспрессию мРНК S18 и приведены как среднее \pm среднеквадратичная ошибка ($n = 4$). ** ($p < 0.01$) означает статистически значимое отличие групп данных согласно тесту One-way ANOVA/Tukey. Б – анализ содержания $\alpha 7$ -nAChR в везикулах клеток mel H, mel Kor и mel P с помощью Вестерн-блоттинга. Белок TSG101 использовали в качестве эксосомального маркера

Рис. 2. Анализ влияния везикул, секретируемых клетками метастатической меланомы, и α -Bgtx на экспрессию α 7-nAChR и пролиферацию кератиноцитов. А–В – экспрессия α 7-nAChR на поверхности нормальных кератиноцитов, инкубированных с внеклеточными везикулами клеток линий mel H (А), mel Kor (Б) и mel P (В) и/или α -Bgtx. Данные приведены как нормализованная медиана флуоресценции \pm среднеквадратичная ошибка ($n = 3$). * ($p < 0.05$) и ** ($p < 0.01$) означают статистически значимые различия между группами данных согласно тесту One-way ANOVA/Tukey. Г–Е – влияние везикул клеток линий mel H (Г), mel Kor (Д) и mel P (Е) и/или α -Bgtx на пролиферацию нормальных кератиноцитов. Данные представлены как % от контроля (необработанные клетки, пунктирная линия) \pm среднеквадратичная ошибка ($n = 4$). # ($p < 0.05$) означает значимое отличие от контроля согласно One-sample *t*-тесту. * ($p < 0.05$) означает достоверное различие между группами данных согласно тесту One-way ANOVA/Tukey



с внеклеточными везикулами клеток mel H вызывает достоверное увеличение экспрессии α 7-nAChR на поверхности нормальных кератиноцитов. Обработка кератиноцитов везикулами mel Kor и mel P не влияла на уровень экспрессии рецептора (рис. 2А–В). Полученные результаты находятся в соответствии с данными ПЦР, согласно которым наибольший уровень экспрессии гена *CHRNA7* наблюдается именно в везикулах клеток mel H (рис. 1А). Возможно, везикулы клеток метастатической меланомы линии mel H переносят мРНК, кодирующую α 7-nAChR, в кератиноциты, увеличивая таким образом экспрессию

этого рецептора в нормальных клетках. Интересно отметить, что инкубация с ингибитором α 7-nAChR – α -Bgtx, приводила к снижению экспрессии этого рецептора на поверхности кератиноцитов (рис. 2А–В) как в присутствии везикул mel H, так и в их отсутствие, что подтверждает существование положительной обратной связи между активностью рецептора и его экспрессией.

Инкубация с везикулами клеток mel H, mel Kor и mel P во всех случаях приводила к значительному увеличению числа жизнеспособных кератиноцитов (рис. 2Г–Е). Однако только везикулы mel H

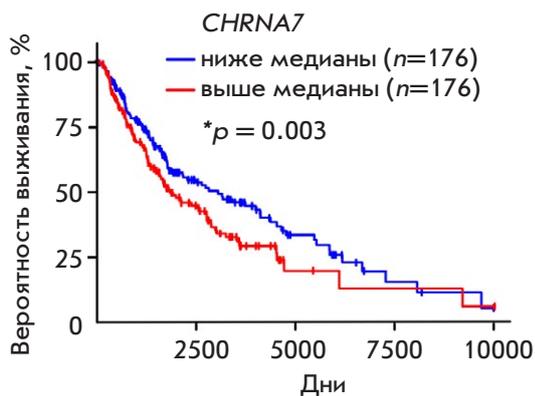


Рис. 3. Биоинформатический анализ корреляции выживаемости пациентов с метастатической меланомой с уровнем экспрессии *CHRNA7*. Пациентов делили на две группы – с уровнем экспрессии гена выше и ниже медианного значения. Статистический анализ выживаемости пациентов проводили по методу Каплана–Мейера с помощью log-rank теста

вызывали отмену митогенного эффекта в присутствии α -Vgtx, что коррелирует с отсутствием изменения экспрессии $\alpha 7$ -nAChR в кератиноцитах под действием везикул mel Kor и mel P (рис. 2Б,В). Примечательно, что инкубация с α -Vgtx в отсутствие везикул не приводила к существенному снижению числа жизнеспособных кератиноцитов (рис. 2Г–Е), несмотря на значительное снижение экспрессии рецептора под действием токсина (рис. 2А–В). Это указывает на то, что рост кератиноцитов в нормальных условиях не зависит от регуляции $\alpha 7$ -nAChR, но перенос везикулами mel H гена *CHRNA7* приводит к значительному увеличению экспрессии рецептора в кератиноцитах и, как следствие, к дополнительной стимуляции их пролиферации. Видимо, несмотря на сравнимую экспрессию $\alpha 7$ -рецептора во всех типах исследованных везикул (рис. 1Б), именно мРНК *CHRNA7* является основным переносимым компонен-

том, обеспечивающим усиление роста кератиноцитов под влиянием везикул. При этом, увеличение пролиферации кератиноцитов при инкубации с везикулами mel Kor и mel P, вероятно, происходит за счет других факторов, не связанных с $\alpha 7$ -nAChR, например таких, как мРНК EGFR [7].

Чтобы понять, как уровень экспрессии *CHRNA7* может влиять на развитие онкогенных процессов и, в частности, коррелировать со злокачественностью клеток, мы провели биоинформатический анализ экспрессии этого рецептора в образцах биопсии пациентов с метастатической меланомой кожи. Анализ по Каплану–Мейеру показал, что повышенная экспрессия *CHRNA7* связана с неблагоприятным прогнозом выживаемости пациентов (рис. 3). Полученные данные свидетельствуют, что $\alpha 7$ -nAChR, возможно, вовлечен в патогенез метастатической меланомы и перенос мРНК этого рецептора в составе внеклеточных везикул может представлять собой один из механизмов стимуляции прогрессии опухоли.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В составе внеклеточных везикул, секретлируемых клетками метастатической меланомы разных линий, впервые обнаружена экспрессия $\alpha 7$ -nAChR на уровне как мРНК, так и белка. Показано, что внеклеточные везикулы клеток mel H, демонстрирующие наибольшую экспрессию *CHRNA7*, переносят мРНК рецептора в нормальные кератиноциты, увеличивая экспрессию $\alpha 7$ -nAChR на их поверхности и стимулируя их рост. Отмена эффекта везикул mel H в присутствии α -Vgtx указывает на перспективность таргетирования $\alpha 7$ -nAChR для контроля злокачественной трансформации нормальных кератиноцитов. ●

Работа выполнена при поддержке РФФ (проект № 17-74-20161).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Dratkiewicz E., Simiczyjew A., Mazurkiewicz J., Ziętek M., Matkowski R., Nowak D. // *Cells*. 2021. V. 10. № 4. P. 862.
2. Tucci M., Mannavola F., Passarelli A., Stucci L.S., Cives M., Silvestris F. // *Oncotarget*. 2018. V. 9. № 29. P. 20826–20837.
3. Boussadia Z., Lamberti J., Mattei F., Pizzi E., Puglisi R., Zanetti C., Pasquini L., Fratini F., Fantozzi L., Felicetti F., et al. // *J. Exp. Clin. Cancer Res*. 2018. V. 37. № 1. P. 245.
4. Falcone I., Conciatori F., Bazzichetto C., Ferretti G., Cognetti F., Ciuffreda L., Milella M. // *Cancers (Basel)*. 2020. V. 12. № 10. P. 2870.
5. Villanueva J., Herlyn M. // *Curr. Oncol. Rep*. 2008. V. 10. № 5. P. 439–446.
6. Hachiya A., Kobayashi A., Yoshida Y., Kitahara T., Takema Y., Imokawa G. // *Am. J. Pathol*. 2004. V. 165. № 6. P. 2099–2109.
7. Bychkov M.L., Kirichenko A.V., Mikhaylova I.N., Paramonov A.S., Yastremsky E.V., Kirpichnikov M.P., Shulepko M.A., Lyukmanova E.N. // *Biomedicines*. 2022. V. 10. № 3. P. 660.
8. Shulepko M., Bychkov M., Kulbatskii D., Lyukmanova E. // *Rus. J. Bioorg. Chem*. 2019. V. 45. № 2. P. 66–75.
9. Arredondo J., Chernyavsky A.I., Grando S.A. // *Life Sci*. 2007. V. 80. № 24–25. P. 2243–2247.
10. Михайлова И.Н., Лукашина М.И., Барышников А.Ю., Морозова Л.Ф., Бузова О.С., Панкина Т.Н., Козлов А.М., Голубева В.А., Черемушкин Е.А., Дорошенко М.Б., Демидов Л.В., Киселев С.Л., Ларин С.С., Георгиев Г.П. // *Вестник РАМН*. 2005. Т. 7. С. 37–40.
11. Lyukmanova E., Bychkov M., Sharonov G., Efremenko A., Shulepko M., Kulbatskii D., Shenkarev Z., Feofanov A., Dolgikh D., Kirpichnikov M. // *Br. J. Pharmacol*. 2018. V. 175. № 11. P. 1973–1986.
12. Goldman M.J., Craft B., Hastie M., Repečka K., McDade F., Kamath A., Banerjee A., Luo Y., Rogers D., Brooks A.N., et al. // *Nat. Biotechnol*. 2020. V. 38. № 6. P. 675–678.

УДК 616.8-091.8:602.9

Морфологическая характеристика астроцитов в ксенотрансплантате нейрональных предшественников, полученных из индуцированных плюрипотентных стволовых клеток человека

Д. Н. Воронков^{1*}, А. В. Ставровская¹, А. С. Гущина¹, А. С. Ольшанский¹, О. С. Лебедева²,
А. В. Еремеев², М. А. Лагарькова²

¹Научный центр неврологии, Москва, 125367 Россия

²Федеральный научно-клинический центр физико-химической медицины ФМБА РФ, Москва, 119435 Россия

*E-mail: voronkov@neurology.ru

Поступила в редакцию 28.03.2022

Принята к печати 22.08.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11710

РЕФЕРАТ Трансплантация смешанной астроцитарной и нейрональной культуры представляет интерес для разработки методов клеточной терапии нейродегенеративных заболеваний. Вместе с тем, для оценки развития трансплантата необходима подробная морфологическая характеристика, включающая анализ нейрональных и глиальных популяций. В проведенном эксперименте трансплантированные нейрональные предшественники, полученные из ИПСК человека, к шестому месяцу после трансплантации в стриатум крысы давали *in vivo* смешанную популяцию нейронов и астроцитов. Ксенотрансплантированные астроциты по морфологическим характеристикам и нейрохимическому профилю были сходны с зрелой астроглией человека. В отличие от нейронов, астроциты мигрировали в окружающие структуры, причем плотность и характер их распределения в стриатуме и коре головного мозга различались, что свидетельствует о влиянии микроокружения на интеграцию глии человека. В трансплантате выявляли зональные особенности морфологии глиальных клеток, отражающие их созревание в центральной зоне, формирование глиального вала вокруг трансплантированных нейронов и миграцию в окружающие структуры.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ИПСК, нейрональные предшественники, трансплантация, стриатум, астроциты.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ ИПСК – индуцированные плюрипотентные стволовые клетки; PBS – фосфатно-солевой буфер; 6-OHDA – 6-гидроксидофамин.

ВВЕДЕНИЕ

Трансплантация экспериментальным животным нейронов и астроцитов, полученных из ИПСК человека, помимо разработки методов клеточной терапии, активно используется для изучения патогенеза нейродегенеративных заболеваний и разных аспектов межклеточных взаимодействий [1, 2].

Для направленной дифференцировки нейральных стволовых клеток, полученных из ИПСК человека, в нейроны с заданным фенотипом, в том числе в дофаминергические нейроны среднего мозга, разработано большое количество протоколов с разной степенью эффективности [3–8]. Вариации во вре-

мени воздействия, различные сочетания и соотношение факторов значительно влияют на эффективность дифференцировки и процент получаемых дофаминовых нейронов [8, 9]. Причем эффективно трансплантировать в мозг лабораторных животных можно только клетки на стадии нейрональных предшественников, поскольку зрелые нейроны легко повреждаются. Вместе с тем, ранние нейральные предшественники еще не коммитированы в необходимый тип нейронов, их дифференцировка плохо предсказуема, возможна также неконтролируемая пролиферация трансплантата. Кроме того, дифференцировка даже гомогенных клонов в области

трансплантации зависит от микроокружения хозяина [10]. Все это обуславливает необходимость контроля дифференцировки нейронов, полученных из ИПСК, и морфологического анализа пролиферации и миграции клеток трансплантата.

Трансплантация смешанной астроцитарной и нейрональной культуры (co-grafting) представляет значительный интерес, так как в ряде работ показана лучшая приживаемость трансплантата и увеличение терапевтического эффекта при таком подходе [11, 12]. Астроциты необходимы для формирования окружения (scaffold) трансплантированных клеток, они способствуют росту их нейритов, участвуют в синаптогенезе и энергетическом обеспечении трансплантата [13]. Помимо этого, опубликованы данные о положительном эффекте трансплантации монокультуры астроцитов на моделях нейродегенеративных заболеваний, что обусловлено, по-видимому, действием ростовых факторов, продуцируемых астроглией [13–16].

В настоящем исследовании использованы культуры нейрональных предшественников, полученные в лаборатории клеточной биологии ФКНЦ физико-химической медицины ФМБА. Трансплантация животным была проведена в рамках серии экспериментов по трансплантации коммитированных в дофаминергические нейроны нейрональных предшественников при моделировании болезни Паркинсона.

Целью настоящей работы была морфологическая характеристика и оценка миграции глиальных клеток, присутствовавших в культуре нейрональных предшественников, полученных из ИПСК человека на длительном сроке (6 месяцев), после их трансплантации в мозг крыс.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Получение клеточных культур

Нейрональная культура для трансплантации была дифференцирована из ИПСК здорового донора (без неврологических патологий), полученных из фибробластов кожи донора мужского пола (возраст 60 лет), после подписания донором информированного согласия. Используемая линия ИПСК IPSRG4S имела нормальный кариотип и была ранее охарактеризована согласно общепринятым стандартам [17].

Дифференцировка ИПСК

ИПСК снимали с подложки раствором трипсина и высевали в плотности 40000 клеток/см² в среде mTeSR1 в присутствии 5 мкМ ингибитора ROCK. По достижении плотности около 80–90% среду

mTeSR1 заменяли средой для нейрональной дифференцировки (14 дней, смена среды через день). Образовавшиеся нейрональные предшественники снимали с подложки раствором Версена, инкубируя клетки 10 мин в CO₂-инкубаторе при 37°C. Центрифугировали в течение 5 мин при 240 g. Клетки рассеивали (из расчета 4 × 10⁵ клеток/см²) на чашки Петри, покрытые матригелем, и культивировали в течение 10 дней в среде для культивирования нейрональных предшественников (смена среды через день). Через 10 дней клетки пересевали (4 × 10⁵ клеток/см²) и продолжали культивировать в той же среде. На втором пассаже клетки снимали с подложки 0.01% раствором трипсина, который инактивировали средой DMEM с 10% фетальной сыворотки крупного рогатого скота. Клетки в суспензии подсчитывали, промывали физиологическим раствором (центрифугировали 5 мин при 240 g), ресуспендировали в физиологическом растворе до концентрации 0.35 × 10⁶ клеток в 10 мкл и использовали для трансплантации. Выбранная для трансплантации в стриатум крыс доза клеток согласуется с опубликованной ранее [3]. Среда для нейрональной дифференцировки ИПСК: DMEM/F12, 2% заменителя сыворотки, 1% добавки N2, 21-мМ глутамин, 50 ед/мл пенициллин-стрептомицина, 10-мкМ SB431542, 2-мкМ дорсоморфин, 0.5-мкМ LDN-193189. Среда для культивирования нейрональных предшественников: DMEM/F12 1 : 1 Neurobasal, 2% B27-добавка, 2-мМ глутамин, 50 ед/мл пенициллин-стрептомицина, 100 нг/мл Shh, 100 нг/мл FGF8 и 2 мкМ пурморфамин.

Животные и стереотаксические операции

Для анестезии применяли золетил-100 в дозе 30 мг/кг массы тела и ксиланит в дозе 3 мг/кг внутримышечно, для премедикации использовали атропин в дозе 0.04 мг/кг подкожно за 10–15 мин до введения ксиланита. В работе использованы 6 самцов крыс Вистар (3.5 месяца, массой тела 300–350 г), полученных из питомника «Столбовая». До введения суспензии клеток крысы получали односторонние стереотаксические интранигральные инъекции 12 мкг 6-OHDA в 3 мкл 0.05% раствора аскорбиновой кислоты в соответствии с координатами атласа мозга крысы Paxinos (AP = -4.8; L = 2.2; V = 8.0) для моделирования паркинсонического синдрома. Через 21 день после введения 6-OHDA в стриатум (AP = -0.9; L = 2.5; V = 5.5) на стороне повреждения дофаминергических окончаний вводили суспензию 0.35 × 10⁶ клеток в 10 мкл физиологического раствора. Суспензию набирали в 10-мкл микрошприц Гамильтона с иглой ga26S/51mm и вводили с постоянной скоростью в течение 7 мин (около

Таблица 1. Использованные антитела

Аббревиатура	Белок, название, синонимы	Специфичность*	Локализация
GFAP	Кислый глиофибрилярный белок	Hm, Rt	Астроциты
AQP4	Аквaporин-4	Hm, Rt	Концевые ножки астроцитов
ALDH1L1	10-формилтетрагидрофолатдегидрогеназа	Hm, Rt	Астроциты
Vim	Виментин	Hm, Rt	Незрелые астроциты, активированная астроглия
PGP 9.5	Убиквитингидролаза-1 карбокси-терминальная	Hm, Rt	Нейроны
IBA1	Воспалительный фактор аллогрфта (AIF1)	Hm, Rt	Микроглия
C3	Компонент C3 комплемента	Hm, Rt	Глия, нейроны
Ki67	Маркер пролиферации (MKI-67)	Hm, Rt	Делящиеся клетки
GS-r	Глутаминсинтетаза	Rt	Астроциты, олигодендроглия
MHC-I	Главный комплекс гистосовместимости, класс I	Hm	Клетки человека
MTC-h	Маркер наружной мембраны митохондрий 80 кДа, MTC02	Hm	Клетки человека
HNA	Ядерный антиген человека	Hm	Клетки человека

*Hm – человек, Rt – крыса.

1.5 мкл/мин). После инъекции иглу оставляли в месте введения на 1 мин, затем медленно извлекали. В противоположное хвостатое ядро вводили тот же объем физиологического раствора. За один день до операции по трансплантации клеток и далее ежедневно в течение всего эксперимента животные получали циклоспорин в дозе 15 мг/кг.

Иммуногистохимия

Для иммуноморфологической оценки трансплантата животных выводили из эксперимента через 6 месяцев после введения клеток. Мозг извлекали и фиксировали в течение 24 ч в 10% формалине. Образцы пропитывали сахарозой и замораживали в среде О.С.Т. Фронтальные срезы толщиной 10 мкм готовили с помощью криостата Tissue Tek Sakura. Перед нанесением антител срезы нагревали в пароварке (15 мин, цитратный буфер, pH 6.0). Остывшие срезы промывали буфером (PBS, 0.01 M, pH 7.2) и инкубировали с первичными антителами во влажной камере в течение 18 ч при комнатной температуре (табл. 1).

Для подтверждения дифференцировки нейронов в трансплантате также использовали антитела к нейрональной енолазе человека (NSE, Leica) и тирозингидроксилазе (TH, Sigma, США, T8700). Культуру клеток окрашивали на бета-3-тубулин (антитела к TUJ1, Nordic Biosite, Швеция) для выявления нейрональных предшественников.

Проверку специфичности антител и оценку морфологии астроцитов среднего мозга проводили на аутопсийных образцах среднего мозга ($n = 4$, возраст от 52 до 82 лет) без неврологической патологии в анамнезе, полученных из архива лаборатории нейроморфологии Научного центра неврологии.

Связывание антител на срезах выявляли флуоресцентным и пероксидазным методом. Для иммунофлуоресцентного метода использовали антитела козы или осла против иммуноглобулинов кролика или мыши, меченные флуорохромами Atto 488 или Atto 555 (Invitrogen, США). Срезы заключали в среду Fluoroshield с DAPI. Для иммунопероксидазного метода использовали набор AntiMouse-HRP-Detection System (Nordic Biosite).

Морфометрия

Для исследования использовали флуоресцентные микроскопы Nikon Eclipse Ni-u или Nikon SMZ-18 с соответствующим набором фильтров. Морфометрию проводили в программе ImageJ. Использовали 6–12 серийных срезов в области трансплантата от каждого животного, взятых с интервалом 70–100 мкм. Для подсчета клеток брали не менее 5 полей зрения на срез в области интереса. Размеры астроцитов оценивали не менее чем на 50 клетках от каждого образца. Для подсчета плотности астроцитов клетки выделяли на изображении вручную, их число подсчитывали в поле зрения микроскопа (48000 мкм²). Для анализа распределения отмечали все глиальные клетки на изображениях срезов, после чего определяли средние значения по шести животным. Диаграмму пространственного распределения выводили, используя набор библиотек Plotly для языка программирования Python. Площадь, занимаемую отростками астроцитов, определяли как выпуклый многоугольник (convex hull area), построенный по точкам дистальных концов отростков. Распределение астроглии в пространстве оценивали, используя индекс агрегации

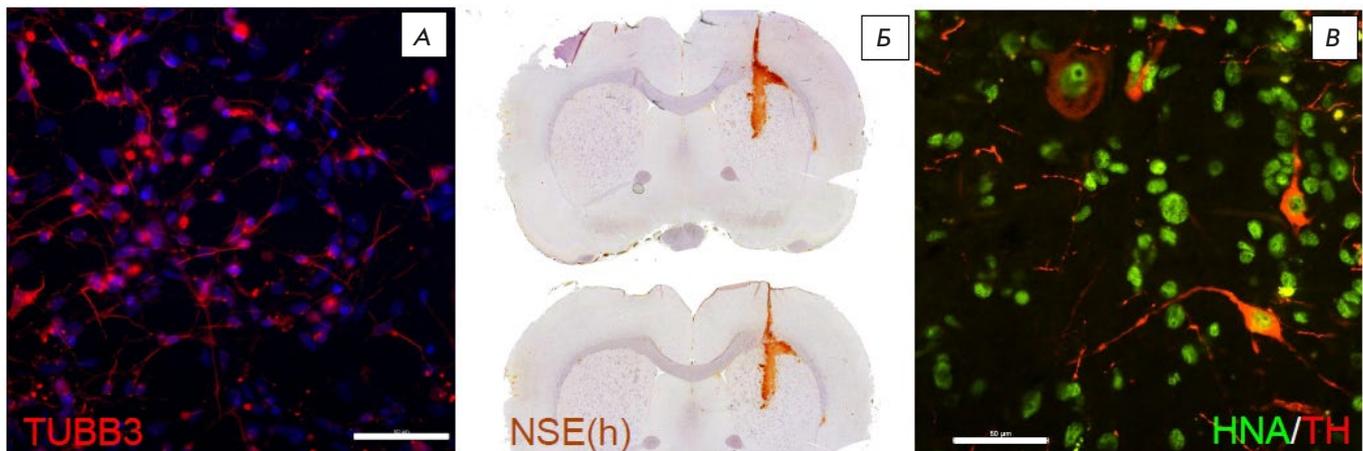


Рис. 1. Выявление нейрональных маркеров в культуре клеток и трансплантате. А – выявление бета-3-тубулина (TUBB3 красным) в культуре; Б – выявление нейрон-специфической енолазы (NSE) человека в области трансплантации (иммунопероксидазное окрашивание); В – выявление нейронов человека, содержащих тирозингидроксилазу, в трансплантате (HNA – зеленый, TH – красный). Линейка на микрофотографиях А, В – 50 мкм

Кларка–Эванса (СЕ) [18], основанный на оценке расстояния до ближайших соседних клеток таким образом, что при случайном распределении $CE = 1$, при кластеризации объектов $CE < 1$ и при равномерном распределении $CE > 1$. Расчет индекса агрегации выполняли с использованием языка программирования R и библиотеки spatstat.

Статистический анализ

Данные, полученные от каждого животного, усредняли. Для сравнения групп использовали дисперсионный анализ ANOVA с повторными измерениями и апостериорным тестом Тьюки, различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$. Статистическую обработку проводили в программе Statistica 7.0 и GraphPad Prism. Данные представлены как среднее \pm SD (среднеквадратичное отклонение).

Биоэтика

Эксперименты проводили в соответствии с международными правилами по работе с лабораторными животными с соблюдением биоэтических норм и возможным сокращением числа использованных животных. Разрешение этического комитета на проведение эксперимента – Протокол № 10-7/20 от 27.11.2020.

РЕЗУЛЬТАТЫ

В культуре обнаруживали как клетки, позитивные на бета-3-тубулин, так и клетки, не содержащие этот белок (рис. 1А). Во всех случаях подтверждено

присутствие в трансплантате зрелых нейронов, содержащих NSE человека, и нейронов, содержащих тирозингидроксилазу (рис. 1Б,В), что свидетельствует о дифференцировке трансплантированных нейрональных предшественников в нейроны среднего мозга.

Двойное окрашивание с использованием видоспецифичных антител к митохондриальному белку MTC02(hm) позволило выявлять на срезах как тела, так и отростки не нейрональных клеток в трансплантате. Кроме того, чтобы различить клетки человека и крысы, использовали антитела к ядерному антигену человека (HNA) и видоспецифичные антитела к глутаминсинтетазе (GS-r), которые связывались с белком крысы.

Трансплантированные нейроны человека (экспрессирующие маркеры зрелых нейронов PGP 9.5, NSE, TH и имеющие HNA-позитивные ядра) выявляли на протяжении всего трека иглы в коре головного мозга, стриатуме и в области мозолистого тела. При этом в области мозолистого тела и на границе структур обнаруживали объемные скопления нейронов (рис. 1Б), что, вероятно, связано с «растеканием» при введении суспензии клеток по границам серого и белого вещества, ввиду их разной плотности. В области трансплантации выделяли три зоны (рис. 2А,Б): 1) центральная часть, содержащая плотно расположенные нейроны человека, направляющие свои отростки преимущественно по ходу иглы или по ходу нервных волокон в мозолистом теле; 2) область глиального вала, сформированная редкими нейронами и плот-

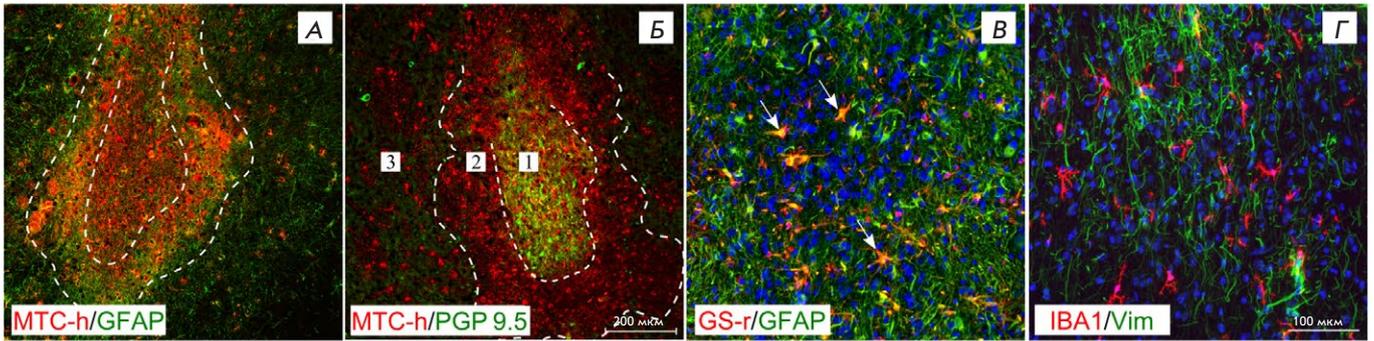


Рис. 2. Глио-нейронная организация трансплантата через 6 месяцев после операции. А – область введения клеток человека в стриатуме, выявление GFAP (зеленый) и МТС-н (красный); Б – область введения клеток человека в стриатуме, выявление PGP 9.5 (зеленый) и МТС-н (красный); В – астроциты человека (зеленый, GFAP) и крысы (оранжевый, GFAP/GS-позитивные клетки, показаны стрелками) в области трансплантации в стриатуме; Г – виментин-позитивная астроглия (зеленый) и микроглия (красный) в области трансплантации. Пунктиром на А, Б показаны границы выделенных областей: 1 – центральная зона, 2 – зона глиального рубца, 3 – периферическая зона. Линейка на микрофотографиях, общая на А, Б – 200 мкм, на В, Г – 100 мкм

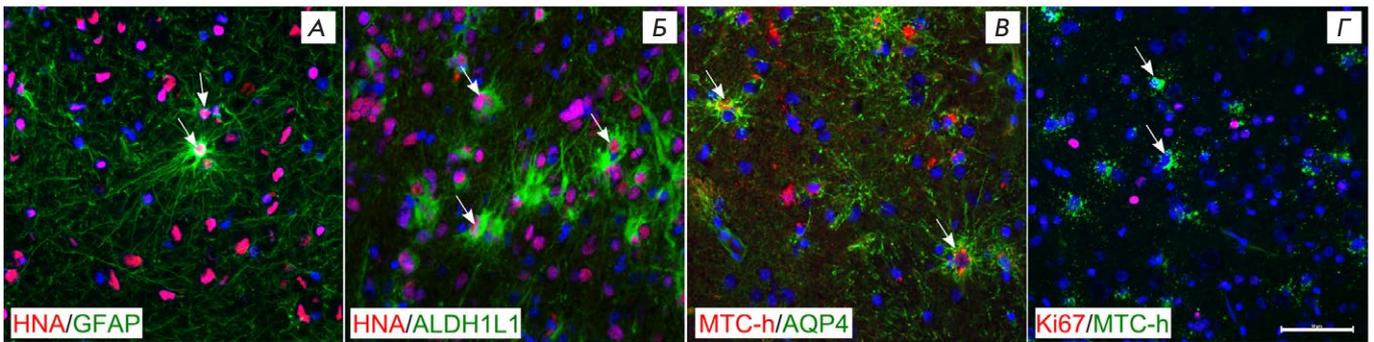


Рис. 3. Экспрессия глиальных маркеров в трансплантированных клетках. А – GFAP-содержащий астроцит в центральной зоне трансплантата; Б – ALDH1L1-содержащая астроглия в центральной зоне трансплантата; В – локализация AQP4 на отростках астроцитов человека в периферической зоне; Г – отсутствие Ki67-позитивных клеток человека в периферической зоне трансплантата. Стрелки указывают на астроциты человека. Линейка на микрофотографиях общая – 100 мкм

но расположенными астроцитами и переплетением их многочисленных отростков; 3) периферическая зона, где нейроны человека не выявляли.

В центральной зоне трансплантата и в окружающем ее астроцитарном валу обнаруживали астроциты как человека, так и крысы (рис. 2В), причем доля астроцитов человека (GFAP-позитивные, GS-r-негативные) составила $58.7 \pm 9.9\%$ от общего их числа в поле зрения. Кроме того, в центральной зоне выявляли виментин-позитивные астроциты, причем их отростки были направлены преимущественно по ходу трека иглы (рис. 2Г). Поскольку эти клетки не обнаруживались по периферии трансплантата, мы предполагаем, что их наличие свидетельствует о продолжающейся дифференцировке пересаженных клеток даже к шестому месяцу после трансплантации. В центральной зоне выявлено и умеренное ко-

личество активированной микроглии с утолщенными отростками, и единичные макрофаги (рис. 2Г).

За пределами центральной области трансплантата выявленные клетки человека (HNA- и МТС-н-позитивные) экспрессировали маркеры зрелых астроцитов – GFAP, ALDH1L1, AQP4 (рис. 3А,Б,В).

При оценке пролиферативной активности мы не обнаружили Ki67-позитивных, GFAP-содержащих клеток (рис. 3Г). В центральной и краевой области трансплантата найдены единичные (на срез) Ki67-позитивные клетки человека (содержащие МТС-н). В целом, как нейрохимический профиль, так и морфология выявляемых астроцитов человека соответствовали функциональным зрелым астроцитам.

Астроциты человека морфологически отличались от астроцитов крысы – они имели большее количе-

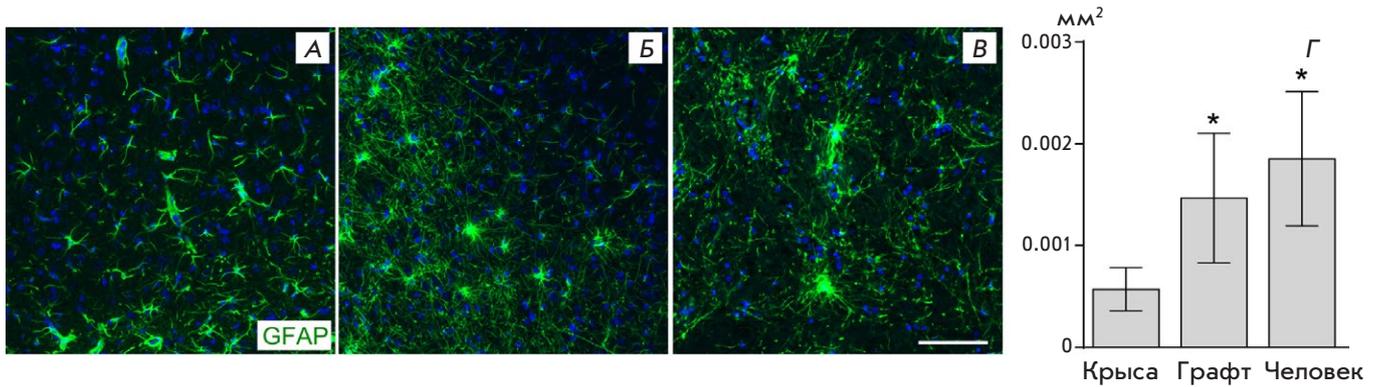


Рис. 4. Сравнение размеров и морфологии GFAP-содержащих астроцитов крысы (А), трансплантированных астроцитов (Б) и астроглии среднего мозга человека (В) и оценка площади, занимаемой их отростками (Г). Линейка общая — 100 мкм. *ANOVA, апостериорный тест Тьюки, $p < 0.05$ по сравнению с астроцитами крысы

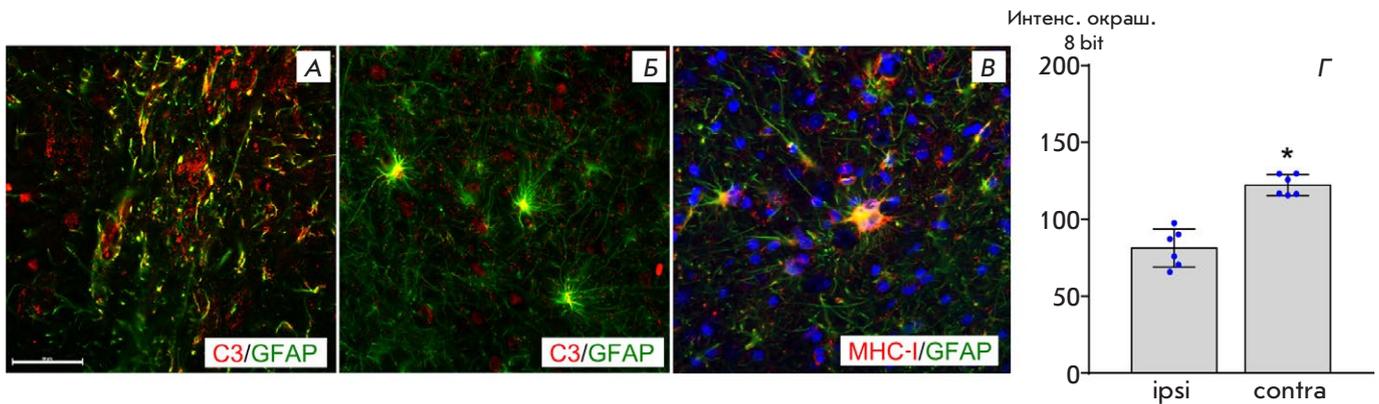


Рис. 5. Экспрессия маркеров нейровоспаления астроцитами. А — локализация С3-компонента комплемента в отростках реактивных астроцитов крысы в области введения физраствора (противоположное полушарие), GFAP — зеленый, С3 — красный; Б — локализация С3-компонента комплемента в телах трансплантированных астроцитов человека; В — окрашивание на МНС-I человека в трансплантированных астроцитах; Г — интенсивность окрашивания на С3-компонент комплемента значительно ниже в области глиального вала, окружающего трансплантат (ipsi-), по сравнению с реактивными астроцитами крысы в области введения физраствора на противоположной стороне (contra-). * $p < 0.05$, Т-тест Стьюдента. Линейка общая — 100 мкм

ство тонких отростков (рис. 4А,Б,В) без выраженной поляризации. Их концевые ножки часто оплетали сосуды. Морфология трансплантированных астроцитов была сходной с астроцитами человека в среднем мозге (рис. 4Г). Площадь, занимаемая отростками трансплантированных астроцитов человека (конвекс), была значительно выше, чем у астроцитов крысы, и близка по значению к астроцитам среднего мозга (в области черной субстанции) в аутопсийном мозге человека (рис. 4А,Б,В).

Для оценки выраженности реактивных изменений мы провели окрашивание на компонент С3 комплемента, которое показало, что астроциты крысы в области рубца (на стороне контралатеральной области трансплантации) имели высокую экспрессию

С3, который локализовался в утолщенных деформированных отростках. Кроме того, в области глиального вала тела астроцитов человека часто были гипертрофированы, а отростки утолщены, что свидетельствует о реактивных изменениях. Однако на расстоянии от глиального вала большинство астроцитов имело меньший размер тел и тонкие отростки. Интенсивное окрашивание на МНС-I человека наблюдали у части астроцитов (рис. 5В) в области глиального вала, что свидетельствует об их реактивных изменениях. Трансплантированные астроциты в области глиального вала часто содержали С3, однако он локализовался преимущественно в их телах (рис. 5А,Б). Оценка интенсивности флуоресценции показала, что в области реактивного

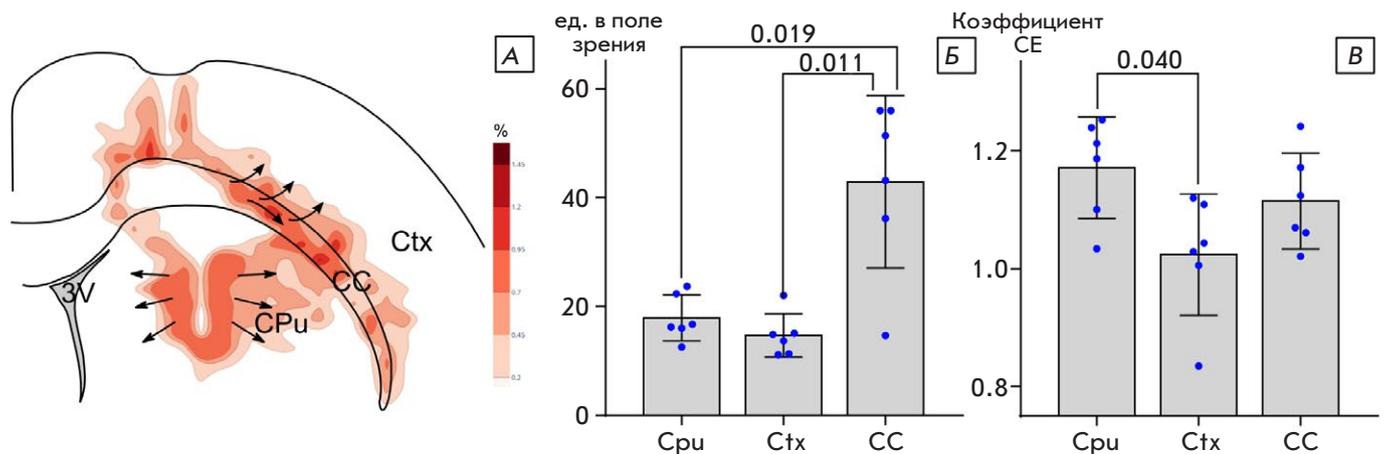


Рис. 6. Распределение ксенотрансплантированной астроглии человека в структурах мозга крысы. А – карта распределения плотности астроглии (темнее – выше); Б – средняя плотность (число клеток в поле зрения) распределения астроцитов человека в стриатуме (Cpu), коре головного мозга (Ctx), мозолистом теле (CC); В – изменения индекса агрегации Кларка-Эванса (CE). На графиках указано значение p в тесте RM ANOVA, апостериорный тест Тьюки

глиоза интенсивность окрашивания на СЗ в астроцитах крысы (на стороне введения физраствора в стриатуме) была значимо выше ($p < 0.05$, тест Стьюдента) по сравнению с окрашиванием на СЗ в зоне глиального вала, окружавшего трансплантат. Помимо экспрессии маркеров нейровоспаления астроцитами в области глиального вала, следует отметить распределение AQP4 по всей поверхности отростков, а не только в области контактов концевых ножек с сосудами.

Оценка распределения МТС-h-позитивных астроцитов человека за пределами глиального вала показала, что наибольшая плотность астроцитов обнаруживалась в латеральных отделах мозолистого тела (рис. 6Б).

В коре астроциты человека обнаруживались до слоя V, а в стриатуме – преимущественно в дорсолатеральной его части. Картирование распределения астроцитов человека выявило разные направления их миграции в зависимости от микроокружения. Так, наблюдаются два основных пути распространения трансплантированной астроглии – один фронт движется в латеральном направлении по мозолистому телу и радиально в нижние слои коры, а второй распространяется от области трансплантации в стриатум (рис. 6А). Для оценки характера распределения трансплантированной астроглии в мозге крысы применяли индекс Кларка-Эванса, который значимо различался в стриатуме и коре (рис. 6В) и выявил равномерное распределение астроцитов без образования кластеров в хвостатом ядре и соответствие случайному распределению в коре. Это свидетель-

ствует о том, что трансплантированные клетки не склонны образовывать кластеры (группы), что, по-видимому, связано с отсутствием пролиферации или ее низкой частотой на удалении от трансплантата.

Таким образом, в проведенном нами эксперименте трансплантированные клетки, полученные из ИПСК человека, к шестому месяцу после трансплантации давали *in vivo* смешанную популяцию нейронов и астроцитов. Ксенотрансплантированные астроциты по размерам и экспрессируемым белкам (ALDH1L1, GFAP, AQP4) соответствовали зрелой астроглии, за исключением виментин-позитивных клеток, обнаруживаемых в центральной зоне, что свидетельствует о продолжающемся к шестому месяцу созреванию астроглии. Глиальный вал вокруг трансплантата был сформирован как астроцитами крысы, так и астроцитами человека. В отличие от нейронов, астроциты человека мигрировали в окружающие структуры, причем их плотность и характер распределения в стриатуме и коре головного мозга значимо различались, что свидетельствует о влиянии микроокружения на интеграцию глии человека.

ОБСУЖДЕНИЕ

Показано, что при трансплантации глиальных предшественников и нейральных стволовых клеток человека в спинной мозг мыши астроциты человека мигрируют вдоль миелинизированных трактов и частично замещают астроциты хозяина, формируя функциональные связи друг с другом и контактируют с сосудами [19, 20]. Обнаруженный нами

высокий уровень экспрессии AQP4 в трансплантированных астроцитах человека ассоциирован, по-видимому, с их миграцией, ремоделированием ткани и со структурной пластичностью глии. Увеличение экспрессии AQP4 и потеря его локализации в концевых ножках астроцитов ассоциированы с подвижностью клеток, в том числе в патологических условиях и при опухолевом росте [21, 22].

В ранних работах по трансплантации фетальной ткани среднего мозга в стриатум обнаружили, что астроциты трансплантата участвуют в аксональном наведении (axon guidance) и образовании нервных связей с нейронами трансплантата [23]. Кроме того, с помощью паракринных механизмов астроглия влияет на рост, дифференцировку нейронов и образование синаптических контактов. Например, сокультивирование и совместная трансплантация животным астроцитов, полученных из эмбрионального вентрального среднего мозга, и нейрональных предшественников увеличивают количество дофаминовых нейронов в трансплантате и повышают их выживаемость и синаптическую интеграцию [12]. Астроциты человека имеют большее фенотипическое разнообразие, чем астроциты крысы, более развитое дерево отростков и способны к более эффективному распространению кальциевых волн [24], что в эксперименте с трансплантацией астроцитов человека в мозг мыши приводило к увеличению эффективности синаптической передачи в гиппокампе [25].

С точки зрения оценки безопасности трансплантации клеточных продуктов необходимо оценивать степень зрелости клеток трансплантата и возможность образования тератом. Оценка только индекса пролиферации не позволяет дифференцировать опухолевый рост от нормального развития трансплантированных клеток [26]. По гистологическим особенностям трансплантат в нашем исследовании отвечает предложенным Sugai [26] критериям дифференцированной нервной ткани, в том числе ограниченному росту, характеру распределения клеток и зональной структуре, отражающей созревание глиальных клеток, формирование глиального вала вокруг трансплантированных нейронов и миграцию клеток глии за пределы трансплантата. Наши результаты согласуются с данными, указывающими на миграцию трансплантированных астроцитов в зрелом мозге. Так, миграция астроцитов трансплантата отмечалась при ксенотрансплантации фетальной ткани стриатума человека в мозг крысы, причем высокий на ранних сроках индекс пролиферации снижался к шестому месяцу [27]. Позже

была показана возможность массивного расселения астроцитов при ксенотрансплантации глиальных предшественников, в том числе полученных из ИПСК, и создания таким образом химерных модельных животных с высокой плотностью астроглии человека [25, 28–30] для изучения разных аспектов патогенеза нейродегенеративных заболеваний.

Помимо положительных эффектов, ксенотрансплантированные астроциты могут, по-видимому, оказывать и негативное влияние, провоцируя нейровоспаление и оказывая токсический эффект. В настоящей работе отмечена гипертрофия астроцитов в области глиального вала, показана экспрессия трансплантированными реактивными астроцитами компонента C3 комплемента, а отдельные клетки имели интенсивное окрашивание на MHC-I, что в комплексе свидетельствует о провоспалительных изменениях глии. Экспрессия C3 отмечается как признак нейротоксических астроцитов [31, 32], вместе с тем, представление о бинарном делении реактивной астроглии на нейротоксическую и нейропротективную подвергается в последнее время критике [33]. Выделяются различные фенотипы активированной глии, что подчеркивает необходимость более детальной функциональной оценки трансплантированных астроцитов. Хотя реактивные изменения астроцитов и образование глиального рубца могут замедлять аксональный рост, в то же время активация астроцитов связана с ремоделированием окружающей ткани и интеграцией трансплантата. Так, по данным Томов, глиальная реакция вокруг трансплантата отличается от формирования типичного глиального рубца и связана с формированием окружения (glial scaffold) вокруг трансплантированных клеток, в том числе с реваскуляризацией трансплантата [13].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенная нами работа показывает, что морфологические особенности и распределение трансплантированных астроцитов отражают их сложные взаимодействия с клетками хозяина и трансплантированными нейронами. Помимо расселения и интеграции трансплантированных астроцитов в структуры мозга, трансплантация сопровождается формированием глиального вала и реактивными изменениями астроглии. Особенности распределения ксенотрансплантированных астроцитов необходимо учитывать при планировании экспериментов, а контроль глиального компонента необходим при анализе состояния трансплантата. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Doss M.X., Sachinidis A. // *Cells*. 2019. V. 8. № 5. P. 403.
2. Bigarreau J., Rouach N., Perrier A.L., Mouthon F., Charvériat M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 3. P. 1684.
3. Kriks S., Shim J.-W., Piao J., Ganat Y.M., Wakeman D.R., Xie Z., Carrillo-Reid L., Auyeung G., Antonacci C., Buch A., et al. // *Nature*. 2011. V. 480. № 7378. P. 547–551.
4. Antonov S.A., Novosadova E.V. // *Int. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 7. P. 3381.
5. Bianchi F., Malboubi M., Li Y., George J.H., Jerusalem A., Szele F., Thompson M.S., Ye H. // *Stem Cell Res.* 2018. V. 32. P. 126–134.
6. Muñoz S.S., Engel M., Balez R., Do-Ha D., Cabral-da-Silva M.C., Hernández D., Berg T., Fifita J.A., Grima N., Yang S., et al. // *Cells*. 2020. V. 9. № 9. P. 2018.
7. Liu Y., Liu H., Sauvey C., Yao L., Zarnowska E.D., Zhang S.-C. // *Nat. Protoc.* 2013. V. 8. № 9. P. 1670–1679.
8. Arenas E., Denham M., Villaescusa J.C. // *Development*. 2015. V. 142. № 11. P. 1918–1936.
9. Engel M., Do-Ha D., Muñoz S.S., Ooi L. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2016. V. 73. № 19. P. 3693–3709.
10. Tanimoto Y., Yamasaki T., Nagoshi N., Nishiyama Y., Nori S., Nishimura S., Iida T., Ozaki M., Tsuji O., Ji B., et al. // *Stem Cells Transl. Med.* 2020. V. 9. № 4. P. 465–477.
11. Kondo T., Funayama M., Tsukita K., Hotta A., Yasuda A., Nori S., Kaneko S., Nakamura M., Takahashi R., Okano H., et al. // *Stem Cell Repts.* 2014. V. 3. № 2. P. 242–249.
12. Song J.-J., Oh S.-M., Kwon O.-C., Wulansari N., Lee H.-S., Chang M.-Y., Lee E., Sun W., Lee S.-E., Chang S., et al. // *J. Clin. Invest.* 2017. V. 128. № 1. P. 463–482.
13. Tomov N. // *Neural Regen. Res.* 2020. V. 15. № 7. P. 1173–1178.
14. Proschel C., Stripay J.L., Shih C., Munger J.C., Noble M.D. // *EMBO Mol. Med.* 2014. V. 6. № 4. P. 504–518.
15. Nicaise C. // *World J. Stem Cells.* 2015. V. 7. № 2. P. 380–398.
16. Izrael M., Slutsky S.G., Admoni T., Cohen L., Granit A., Hasson A., Itskovitz-Eldor J., Krush Paker L., Kuperstein G., Lavon N., et al. // *Stem Cell Res. Ther.* 2018. V. 9. № 1. P. 152.
17. Holmqvist S., Lehtonen Š., Chumarina M., Puttonen K.A., Azevedo C., Lebedeva O., Ruponen M., Oksanen M., Djelloul M., Collin A., et al. // *NPJ Park. Dis.* 2016. V. 2. № 1. P. 16009.
18. Kendall T.J., Duff C.M., Thomson A.M., Iredale J.P. // *Sci. Rep.* 2020. V. 10. № 1. P. 17572.
19. Lu P., Ceto S., Wang Y., Graham L., Wu D., Kumamaru H., Staufenberg E., Tuszynski M.H. // *J. Clin. Invest.* 2017. V. 127. № 9. P. 3287–3299.
20. Chen H., Qian K., Chen W., Hu B., Blackburn L.W., Du Z., Ma L., Liu H., Knobel K.M., Ayala M., et al. // *J. Clin. Invest.* 2015. V. 125. № 3. P. 1033–1042.
21. Smith A.J., Duan T., Verkman A.S. // *Acta Neuropathol. Commun.* 2019. V. 7. № 1. P. 74.
22. Vandebroek A., Yasui M. // *Int. J. Mol. Sci.* 2020. V. 21. № 5. P. 1603.
23. Petit A., Pierret P., Vallée A., Doucet G. // *J. Neurosci.* 2001. V. 21. № 18. P. 7182–7193.
24. Sosunov A.A., Wu X., Tsankova N.M., Guilfoyle E., McKhann G.M., Goldman J.E. // *J. Neurosci.* 2014. V. 34. № 6. P. 2285–2298.
25. Han X., Chen M., Wang F., Windrem M., Wang S., Shanz S., Xu Q., Oberheim N.A., Bekar L., Betstadt S., et al. // *Cell Stem Cell.* 2013. V. 12. № 3. P. 342–353.
26. Sugai K., Fukuzawa R., Shofuda T., Fukusumi H., Kawabata S., Nishiyama Y., Higuchi Y., Kawai K., Isoda M., Kanematsu D., et al. // *Mol. Brain.* 2016. V. 9. № 1. P. 85.
27. Hurelbrink C.B., Armstrong R.J.E., Dunnett S.B., Rosser A.E., Barker R.A. // *Eur. J. Neurosci.* 2002. V. 15. № 7. P. 1255–1266.
28. Windrem M.S., Schanz S.J., Morrow C., Munir J., Chandler-Militello D., Wang S., Goldman S.A. // *J. Neurosci.* 2014. V. 34. № 48. P. 16153–16161.
29. Benraiss A., Wang S., Herrlinger S., Li X., Chandler-Militello D., Mauceri J., Burm H.B., Toner M., Osipovitch M., Jim Xu Q., et al. // *Nat. Commun.* 2016. V. 7. № 1. P. 11758.
30. Preman P., Tcw J., Calafate S., Snellinx A., Alfonso-Triguero M., Corthout N., Munck S., Thal D.R., Goate A.M., De Strooper B., et al. // *Mol. Neurodegener.* 2021. V. 16. № 1. P. 68.
31. Liddelov S.A., Guttenplan K.A., Clarke L.E., Bennett F.C., Bohlen C.J., Schirmer L., Bennett M.L., Münch A.E., Chung W.-S., Peterson T.C., et al. // *Nature*. 2017. V. 541. № 7638. P. 481–487.
32. Bombeiro A.L., Hell R.C.R., Simões G.F., de Castro M.V., de Oliveira A.L.R. // *Neurosci. Lett.* 2017. V. 647. P. 97–103.
33. Escartin C., Galea E., Lakatos A., O’Callaghan J.P., Petzold G.C., Serrano-Pozo A., Steinhäuser C., Volterra A., Carmignoto G., Agarwal A., et al. // *Nat. Neurosci.* 2021. V. 24. № 3. P. 312–325.

УДК 578.083.33

ИФА-платформа для количественного анализа RBD-нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 как альтернатива мониторингу вируснейтрализующей активности

Н. Н. Костин¹, Т. В. Бобик¹, Г. А. Скрябин¹, М. А. Симонова¹, В. Д. Кнорре¹,
В. А. Абрикосова¹, Ю. А. Мокрушина¹, И. В. Смирнов¹, Н. Л. Алешенко², Н. А. Круглова³,
Д. В. Мазуров³, А. Э. Никитин², А. Г. Габиров^{1*}

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

²Центральная клиническая больница РАН, Москва, 117593 Россия

³Институт биологии гена РАН, Москва, 119334 Россия

*E-mail: gabirov@mx.ibch.ru

Поступила в редакцию 25.07.2022

Принята к печати 22.08.2022

DOI: 10.32607/actanaturae.11776

РЕФЕРАТ Определение уровня вируснейтрализующей активности сывороточных иммуноглобулинов позволяет надежно оценивать защищенность человека от заражения SARS-CoV-2. В случае инфекции SARS-CoV-2 RBD-ACE2-нейтрализующая активность сывороток практически эквивалентна вируснейтрализующей активности их антител и может использоваться для оценки уровня нейтрализующих антител к SARS-CoV-2. Нами предложена ИФА-платформа для количественного анализа уровня RBD-нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 как альтернатива мониторингу вируснейтрализующей активности псевдовирусами или «живыми» вирусами. Преимуществом разработанной платформы является возможность в кратчайшие сроки (1–2 недели) адаптировать методику к вновь появляющимся вариантам вируса и тем самым получать количественные данные по активности RBD-нейтрализующих антител к SARS-CoV-2. Разработанная платформа может быть использована для исследования популяционного иммунитета к SARS-CoV-2, мониторинга эффективности вакцинации (ревакцинации) населения и отбора потенциальных доноров иммунной плазмы. С использованием этой платформы детально изучены защитные свойства гуморального иммунного ответа у госпитализированных и амбулаторных пациентов, а также после профилактики двумя самыми популярными в РФ вакцинами против SARS-CoV-2. Наибольшая RBD-нейтрализующая активность наблюдалась в группе госпитализированных пациентов. Защитный эффект в группе вакцинированных Гам-КОВИД-Вак на 25% превышал эффект в группе амбулаторных пациентов и был почти в 4 раза выше, чем у вакцинированных КовиВак.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА Гам-КОВИД-Вак, Спутник V, КовиВак, вируснейтрализующая активность, антитела, SARS-CoV-2, COVID-19.

ВВЕДЕНИЕ

По состоянию на июль 2022 года коронавирус SARS-CoV-2 инфицировал более 564 млн человек, число погибших от COVID-19 во всем мире превысило 6.3 млн человек [1]. С начала пандемии разработаны десятки вакцин, одобренных ВОЗ [2, 3], и терапевтических антител [4–6]. Вакцины конструировали на основе различных платформ: белковых субъединичных, вирусных векторов, РНК, ДНК,

инактивированных вирусов и ряда других. К сожалению, оценка эффективности разрабатываемых вакцин затруднялась различиями в платформах, антигенах, иммунологических анализах и показателях, используемых для оценки иммунных ответов. В конце 2020 года ВОЗ, Национальный институт биологических стандартов и контроля (NIBSC) и Коалиция за инновации в области обеспечения готовности к эпидемиям (CEPI) создали и распростра-

нили Международный стандарт человеческих анти-SARS-CoV-2 иммуноглобулинов (NIBSC code: 20/136) [7]. Стандарт представляет собой лиофилизированный пул плазмы 11 переболевших доноров, который обладает активностью нейтрализующих антител, равной 1000 международных единиц в миллилитре (IU/ml, international units), и содержит 1000 ед. связывающих антител (BAU/ml, binding antibody units). Появление этого стандарта уменьшило межлабораторную вариативность и создало общий язык для представления данных, что важно для разработки диагностики, вакцин, терапевтических антител и отбора доноров [8]. Надежным контролем защищенности индивида от заражения SARS-CoV-2 является уровень вируснейтрализующей активности сывороточных иммуноглобулинов. Для получения достоверных данных требуется достаточно много времени и проведение финансово-затратных исследований с применением живого вируса. Усилия многих исследователей в последнее время направлены на разработку количественных методик, альтернативных существующим платформам, использующим образцы живого вируса SARS-CoV-2 [9–13].

В настоящей работе мы изучали гуморальный ответ у людей, прошедших профилактику наиболее популярными в Российской Федерации вакцинами: Гам-КОВИД-Вак (rAd26/rAd5, торговое название Sputnik V) [14] и КовиВак (инактивированный вирус) [15], сравнили его с антительным ответом у легко и тяжело переболевших COVID-19 пациентов и провели корреляцию между нейтрализацией RBD и вируса. В результате проведенных исследований нами предложена платформа для количественного анализа RBD-нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 как альтернатива мониторингу вируснейтрализующей активности.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Количественное определение IgG, специфичных к RBD, и определение их изотипов методом ИФА

Для количественного определения IgG к RBD в лунки 96-луночных планшетов MaxiSorp (Nunc, Дания) вносили по 100 мкл раствора рекомбинантного RBD (аминокислотные остатки 320–537), полученного в клетках CHO, в PBS в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали планшет в течение ночи при 2–8°C. После этого блокировали свободные сайты связывания, внося в каждую лунку планшета по 150 мкл блокирующего буфера (PBS, 0.05% Tween-20, 0.1% казеинат натрия) и инкубируя планшет в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого готовили образцы сыворотки в блокирующем буфере в трех разведениях (1:10, 1:50,

1:250) и трех повторностях в отдельном 96-луночном планшете с низкой сорбционной способностью. В этом же планшете готовили растворы первичного стандарта ВОЗ (NIBSC code: 20/136) и вторичного стандарта (получен в лаборатории из пула сывороток переболевших индивидов и охарактеризован относительно первичного) в блокирующем буфере в семи последовательных трехкратных серийных разбавлениях. После этого исследуемые образцы сывороток и стандарты в объеме 100 мкл/лунку вносили в лунки планшета с сорбированным RBD и инкубировали в течение 30 мин в термостатируемом шейкере на скорости 700 об/мин при 37°C. После инкубации планшет промывали 5 раз, внося в каждую лунку по 350 мкл PBST (PBS, 0.05% Tween-20), и в каждую лунку вносили по 100 мкл конъюгата антител к IgG человека с пероксидазой хрена («Биосан», Новосибирск, Россия, кат. № I-3021), разбавленного 1:10000 в блокирующем буфере. После 30-минутной инкубации (37°C, 700 об/мин) и промывки в лунки планшета добавляли по 100 мкл субстратного раствора ТМВ и инкубировали в темноте в течение 15 мин. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 10% раствора фосфорной кислоты и измеряли величины оптического поглощения (ОП) в лунках планшета при длине волны 450 нм (ОП₄₅₀) на планшетном спектрофотометре. Строили кривые зависимости среднего значения величин ОП от концентрации RBD-специфичных IgG в стандартах (BAU/мл) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8 (США). Эти кривые использовали для вычисления концентраций RBD-специфичных IgG в образцах сывороток: выбирали разведение образца, среднее значение величины ОП₄₅₀ которого попадает в диапазон ОП₄₅₀ кривой стандарта, и полученное значение в BAU/мл умножали на соответствующее разведение. Изотипы RBD-специфичных IgG анализировали согласно протоколу, описанному выше, но не строили калибровочные кривые и использовали следующие конъюгаты антител с пероксидазой: к человеческим IgG1 (HyTest, Финляндия, Cat. # 1G2cc), к человеческим IgG2 (HyTest, Финляндия, Cat. # 1G5), к человеческим IgG3 (HyTest, Финляндия, Cat. # 1G3cc), к человеческим IgG4 (HyTest, Финляндия, Cat. # 1G4cc). ИФА IgG к нуклеокапсидному и линейным антигенам проводили согласно [16]. Предел обнаружения в количественном и качественном анализе IgG к RBD определяли следующим образом: среднее значение ОП₄₅₀ в отрицательных образцах плюс три стандартных отклонения от среднего в отрицательных образцах.

Определение нейтрализующей активности на живом вирусе

Нейтрализующую активность сывороток крови определяли в реакции нейтрализации (РН) по подавлению образования негативных колоний, формируемых вирусом SARS-CoV-2 в односуточном монослое клеток Vero C1008 под агаровым покрытием. Разведения сывороток готовили в физиологическом растворе с добавлением антибиотиков (стрептомицина сульфат и бензилпенициллина натриевая соль) по 100 ЕД/мл. Рабочее разведение вирусосодержащей суспензии на основе вируса SARS-CoV-2 готовили в растворе Хенкса с 2% фетальной телячьей сывороткой (FBS) и антибиотиками. В приготовленном разведении концентрация SARS-CoV-2 составила 100–150 БОЕ/мл (40–60 бляшек во флаконе). В эксперименте использовали односуточный монослой клеток Vero C1008 во флаконах T25. Смесь равных объемов сыворотки и культуры вируса SARS-CoV-2 инкубировали в течение 1 ч при 37°C. На каждое разведение сыворотки брали не менее четырех флаконов. В каждый из флаконов вносили по 0,5 мл смеси сыворотки и культуры вируса, равномерно распределяли инокулят по всему монослою клеток. Затем флаконы укладывали горизонтально и оставляли при температуре 37°C. После адсорбции комплекса антитела–вирус на клетках в течение 1 ч инокулят декантировали, затем наносили первичное агаровое покрытие, разработанное для вируса SARS-CoV-2 (по 10,0 мл во флакон), и инкубировали монослой при температуре 37°C в течение 2 сут. Через 2 сут на инфицированный монослой наносили вторичное агаровое покрытие с 0,1% раствором нейтрального красного с целью окрашивания клеток и инкубировали в течение 24 ч при комнатной температуре в темноте, затем проводили учет негативных колоний во флаконах. За титр антител исследуемой сыворотки принимали высшее ее разведение, в котором выявляют подавление образования негативных колоний, формируемых вирусом SARS-CoV-2 на 50% и более по сравнению с отрицательным контролем (FBS, заведомо не содержащая специфических антител к вирусу SARS-CoV-2).

Определение нейтрализующей активности в псевдовиральной системе

Тесты с rVNT проводили с использованием рекомбинантных лентивирусов, несущих S-белок SARS-CoV-2 и кодирующих люциферазу светлячка (Luc) [17]. Для получения псевдовиральных частиц клетки HEK293T растили во флаконах T75 до достижения 50–70% конfluence и трансфицировали смесью плазмид (15 мкг pLuc, 15 мкг pGAG, 5 мкг pRev и 2 мкг SARS-CoV-2 S на флакон) с ис-

пользованием PEI (75 мкг на флакон) в качестве трансфицирующего агента. Далее клетки инкубировали при 37°C, 5% CO₂ в течение 72 ч в среде DMEM с 10% FBS. Через 72 ч культуральный супернатант центрифугировали сначала при 150 g и далее при 3900 g, а затем фильтровали через фильтр с порами размером 0,20 мкм. Полученные таким образом аликвоты супернатанта хранили при –80°C. Клетки HEK293T-ACE2 засеивали в 96-луночные планшеты в плотности 2×10^4 клеток/лунку и инкубировали в течение ночи. Готовили серийные разведения сывороток крови в среде DMEM с 10% FBS. Далее разбавленные образцы сывороток (5 мкл) смешивали со средой с псевдовиральными (50 мкл) в 96-луночных планшетах и инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 1 ч. Затем из лунок планшетов с клетками HEK293T-ACE2 удаляли по 50 мкл среды, и клетки инфицировали смесями вирус–сыворотка (50 мкл/лунку). Инокулированные клетки HEK293T-ACE2 далее инкубировали при 37°C и 5% CO₂ в течение 48 ч. Контроли тестировали в трех повторностях, исследуемые образцы тестировали однократно, 1 раз. После 48-часовой инкубации отбирали среду из лунок с клетками, в лунки добавляли по 100 мкл лизирующего буфера (25 мМ Трис-фосфат, pH 7,8, 1% Triton X-100, 10% глицерин, 2 мМ DTT) и инкубировали в течение 5 мин при комнатной температуре. Далее добавляли по 20 мкл реагента Bright-Glo™ Luciferase Assay Substrate (Promega, США) и измеряли величины люминесцентных сигналов в 96-луночных белых планшетах, содержащих по 80 мкл клеточных лизатов. С помощью ПО GraphPad Prism 8 строили кривые зависимости величин люминесцентных сигналов от разведений сывороток и вычисляли титры сывороток, обеспечивающие 50% нейтрализацию псевдовируса.

Количественное определение RBD-специфических нейтрализующих антител методом конкурентного ИФА

В лунки 96-луночных планшетов MaxiSorp (Nunc, Дания) вносили по 100 мкл раствора рекомбинантного, полученного экспрессией в клетках CHO, RBD (аминокислотные остатки 320–537) в PBS в концентрации 1 мкг/мл и инкубировали планшет в течение ночи при 2–8°C. После этого проводили блокировку свободных сайтов связывания, внося в каждую лунку планшета по 150 мкл блокирующего буфера (PBS, 0,05% Tween-20, 0,1% БСА) и инкубируя планшет в течение 1 ч при комнатной температуре. После этого готовили образцы сыворотки в блокирующем буфере в трех разведениях (1:10, 1:50, 1:250) и трех повторностях в отдельном 96-луночном планшете с низкой сорбционной способностью. В этом же

планшете готовили растворы первичного стандарта ВОЗ и вторичного стандарта (получен в лаборатории из пула сывороток переболевших индивидов и охарактеризован относительно первичного) в блокирующем буфере в конечных концентрациях 10, 20 и 40 IU/мл. После этого исследуемые образцы сывороток и стандарты в объеме 100 мкл/лунку вносили в лунки планшета с сорбированным RBD и инкубировали в течение 30 мин в термостатируемом шейкере на скорости 700 об/мин при 37°C. После инкубации планшет промывали 5 раз, внося в каждую лунку по 350 мкл PBST (PBS, 0.05% Tween-20), в лунки планшета вносили по 100 мкл раствора рекомбинантного hACE2-3xFLAG (0.2 мкг/мл) в блокирующем буфере. После 30-минутной инкубации при 37°C на 700 об/мин и промывки в лунки планшета добавляли по 100 мкл раствора антител к FLAG, конъюгированных с пероксидазой хрена (Sigma Aldrich, США, Cat. # A8592), в разведении 1:10 000 в блокирующем буфере, планшет инкубировали в течение еще 30 мин как описано выше. После промывки планшета в лунки добавляли по 100 мкл субстратного раствора ТМВ и инкубировали в темноте в течение 15 мин. Ферментативную реакцию останавливали добавлением 10% раствора фосфорной кислоты, измеряли величины ОП₄₅₀ в лунках планшета на планшетном спектрофотометре. Строили кривые зависимости величин ОП₄₅₀ от концентрации RBD-специфичных нейтрализующих антител в стандартах IU (IU/мл) с использованием программного обеспечения GraphPad Prism 8. Эти кривые использовали для вычисления концентраций RBD-специфичных нейтрализующих антител в образцах сывороток, для чего выбирали разведение образца, попадающее в диапазон ОП₄₅₀ кривой стандарта, и полученное значение в IU/мл умножали на соответствующее разведение. Предел обнаружения определяли следующим образом: среднее значение ОП₄₅₀ в отрицательных образцах минус три стандартных отклонения от среднего в отрицательных образцах.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Разработка иммуноферментной тест-системы для количественного определения SARS-CoV-2 S1 RBD-нейтрализующей активности сывороток человека

К настоящему моменту существует несколько методов количественного определения вируснейтрализующей активности сывороток: стандартный тест с «живыми» вирусами (сVNT), тест с псевдовирусами (pVNT) и конкурентные ИФА-тесты на основе иммунохимических методов (sVNT). Стандартные

тесты (в случае SARS-CoV-2) должны проводиться в помещениях с классом биобезопасности не ниже второго. Тесты с псевдовирусами (PV) трудоемки, для их проведения требуется значительное время. Конкурентные ИФА-тесты удобны для проведения рутинной серодиагностики и занимают сравнительно немного времени. Однако их необходимо валидировать относительно тестов другого типа.

Нами разработана тест-система для количественного определения активности SARS-CoV-2 RBD-специфичных нейтрализующих антител в сыворотке или плазме крови [18]. Метод основан на использовании конкурентного твердофазного иммуноферментного анализа (КИФА) для измерения взаимодействия рекомбинантного рецепторсвязывающего домена (RBD) поверхностного гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2 с рекомбинантным рецептором ACE2 человека (ACE2) в присутствии образца. На первой стадии происходит взаимодействие SARS-CoV-2 RBD-нейтрализующих антител (при их наличии в исследуемом образце) с RBD, сорбированным на поверхности лунок разборного полистиролового планшета. На второй стадии происходит взаимодействие RBD с рекомбинантным человеческим рецептором ACE2. Если исследуемый образец не содержит RBD-нейтрализующие антитела, то происходит образование комплекса «RBD-ACE2». Если образец содержит RBD-нейтрализующие антитела, то комплекс «RBD-ACE2» образуется частично или не образуется. На третьей стадии образовавшийся комплекс «RBD-ACE2» выявляют с помощью иммуноферментного конъюгата (рис. 1).

Суммарное время анализа составляет 2–2.5 ч. Определение проводят относительно международного стандарта ВОЗ, предел обнаружения равен 4 IU/мл.

RBD-нейтрализующая активность сывороток, измеренная методом КИФА, высоко коррелирует с нейтрализацией вируса

Мы провели успешную валидацию разработанной тест-системы КИФА, сравнивая результаты активности анти-RBD-антител с показателями нейтрализации вируса, полученными с помощью стандартного теста с «живыми» вирусами (сVNT) и теста с псевдовирусами (pVNT). Показатели достоверности линейной аппроксимации (r^2) составили 0.97 и 0.90 соответственно (рис. 2).

Характеристика групп образцов сывороток и анализ их протективных свойств

Мы исследовали 134 образца сывороток, полученных от четырех групп людей (табл. 1): тяжело переболевшие COVID-19 (Госпитализированные

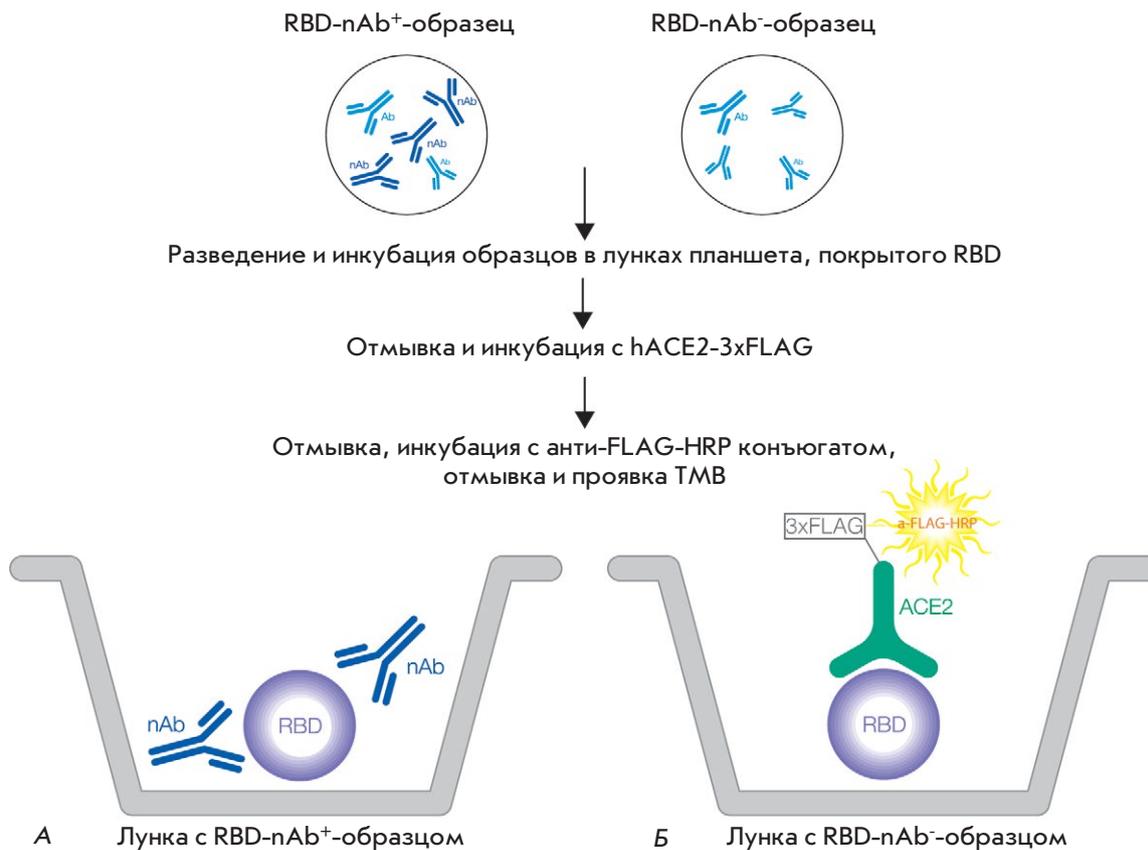


Рис. 1. Схема количественного определения активности SARS-CoV-2 RBD-специфичных нейтрализующих антител в сыворотке или плазме крови методом ИФА. С рекомбинантным RBD, сорбированным в лунках планшета, взаимодействуют антитела из анализируемого образца сыворотки. Если в образце содержатся RBD-нейтрализующие антитела (А), то они блокируют связывание RBD с ACE2. Если образце не содержат нейтрализующие антитела (Б), то RBD, сорбированный на планшете, связывается с рекомбинантным ACE2 из раствора. Это связывание детектируется мечеными пероксидазой антителами к 3×FLAG-последовательности (3×FLAG), которая содержится в рекомбинантном ACE2. Таким образом, регистрируемый колориметрический сигнал обратно пропорционален концентрации нейтрализующих антител в образце. Ab – антитела, не обладающие нейтрализующей активностью; ACE2 – рекомбинантный человеческий рецептор ACE2; HRP – антитела к эпитутопу FLAG, меченные пероксидазой хрена; nAb – антитела, обладающие RBD-нейтрализующей активностью; RBD – рекомбинантный рецепторсвязывающий домен S-белка коронавируса SARS-CoV-2

пациенты); легко переболевшие COVID-19 (Амбулаторные пациенты); не болевшие ранее COVID-19 и вакцинированные двумя дозами Гам-КОВИД-Вак (Вакцинированные Гам-КОВИД-Вак); не болевшие ранее COVID-19 и вакцинированные двумя дозами КовиВак (Вакцинированные КовиВак).

Все образцы сывороток тестировали как с помощью разработанного нами метода ИФА, определяющего активность RBD-нейтрализации (RBD-nAb) – способность сывороток ингибировать (нейтрализовать) связывание RBD с ACE2, так и с помощью разработанного нами метода количественного ИФА, определяющего общую кон-

центрацию SARS-CoV-2 RBD-специфичных иммуноглобулинов класса G (IgG). В последнем случае определение так же проводят относительно международного стандарта ВОЗ, предел обнаружения составляет 1 ВАУ/мл.

Частота встречаемости IgG-положительных сывороток среди групп: Госпитализированные пациенты, Амбулаторные пациенты и Вакцинированные Гам-КОВИД-Вак варьировала от 85 до 93%. В группе Вакцинированные КовиВак частота составила всего 26% (рис. 3А). Среди этих IgG-серопозитивных сывороток частота встречаемости RBD-nAb-положительных сывороток варьировала от 67 до 95% (рис. 3Б). Частота встречаемости RBD-nAb-

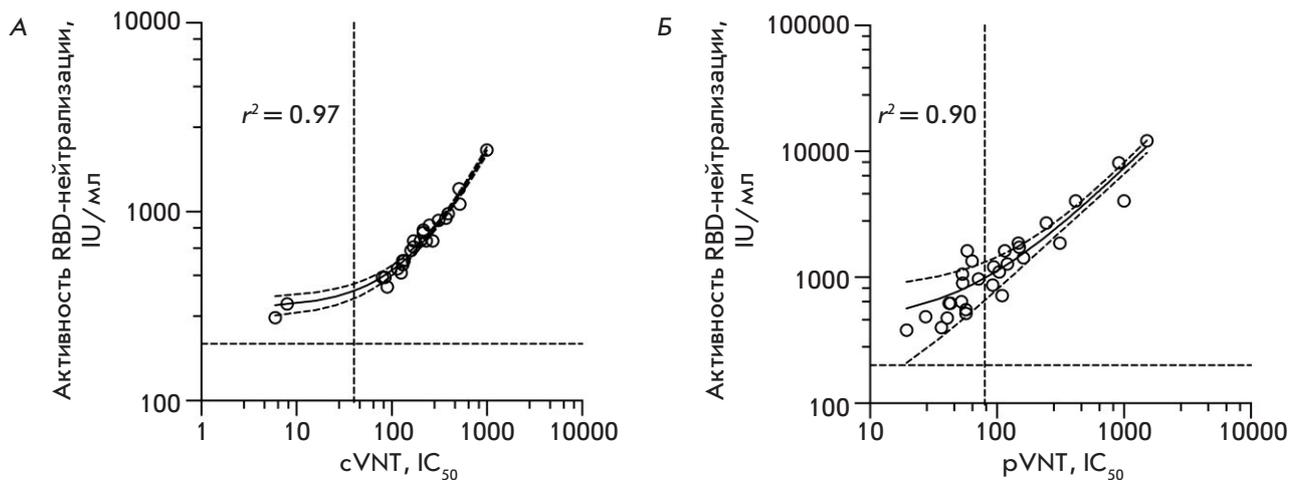


Рис. 2. Валидация теста RBD-нейтрализации путем сравнения с показателями нейтрализации вируса. А – график зависимости активности SARS-CoV-2 RBD-специфичных нейтрализующих антител в сыворотках крови, полученных в КИФА, от титров сывороток, обеспечивающих нейтрализацию 50% вируса (IC_{50}), полученных с помощью теста сVNT (26 образцов). Б – график зависимости активности SARS-CoV-2 RBD-специфичных нейтрализующих антител в сыворотках крови, полученных в КИФА, от титров сывороток, обеспечивающих нейтрализацию 50% псевдовируса (IC_{50}), полученных с помощью теста pVNT (29 образцов). r^2 – показатель достоверности линейной аппроксимации. Во всех образцах сывороток, где анти-RBD-нейтрализующие антитела не обнаружены (25 образцов), нейтрализация SARS-CoV-2-инфекции во всех тестах не обнаружена

Таблица 1. Характеристика групп образцов сывороток

Группа	Кол-во	Пол, м/ж	Возраст, медиана (минимум, максимум)	Время (дни) после появления симптомов или введения второй дозы вакцины, медиана (минимум, максимум)
Госпитализированные пациенты	27	15/12	57 (37, 69)	23 (19, 47)
Амбулаторные пациенты	41	21/20	39 (27, 61)	25 (17, 44)
Вакцинированные Гам-КОВИД-Вак	43	20/23	41 (25, 62)	21 (14, 28)
Вакцинированные КовиВак	23	11/12	36 (28, 58)	20 (14, 30)

положительных сывороток в группе, отражающая проективные свойства сывороток, варьировала от 22 до 81% (рис. 3В).

Концентрации SARS-CoV-2 RBD-специфичных IgG в серопозитивных образцах в разных группах различались незначительно (рис. 4А). С другой стороны, несмотря на практически идентичные концентрации RBD-специфичных IgG в серопозитивных образцах всех групп, активность RBD-специфичных вируснейтрализующих антител была значительно выше в группе *Госпитализированные пациенты* по сравнению с другими группами (рис. 4Б).

С целью дальнейшего прояснения природы гуморального ответа дважды серопозитивные (RBD-IgG⁺ и RBD-nAb⁺) образцы тестировали с помощью изотип-специфичных конъюгатов. Анализ изотипов IgG, кроме переключения на изотип IgG1 во всех группах, выявил также повышенную продукцию

антител изотипа IgG3 в группе вакцинированных Гам-КОВИД-Вак (рис. 5).

Взаимосвязь RBD-нейтрализующей активности антител и концентрации анти-RBD IgG

Для характеристики взаимосвязи между активностью SARS-CoV-2 RBD-специфичных nAb и концентрацией SARS-CoV-2 RBD-специфичных IgG мы провели линейный регрессионный анализ каждой группы образцов сывороток. Выявлены различия в активности RBD-nAb (нормированной по концентрации RBD-специфичных IgG) в исследуемых образцах из различных групп. Активность RBD-nAb может быть выражена через тангенс угла наклона линии регрессии (рис. 6). Активность RBD-nAb была значительно выше в образцах сывороток группы *Госпитализированные пациенты* по сравнению с другими группами.

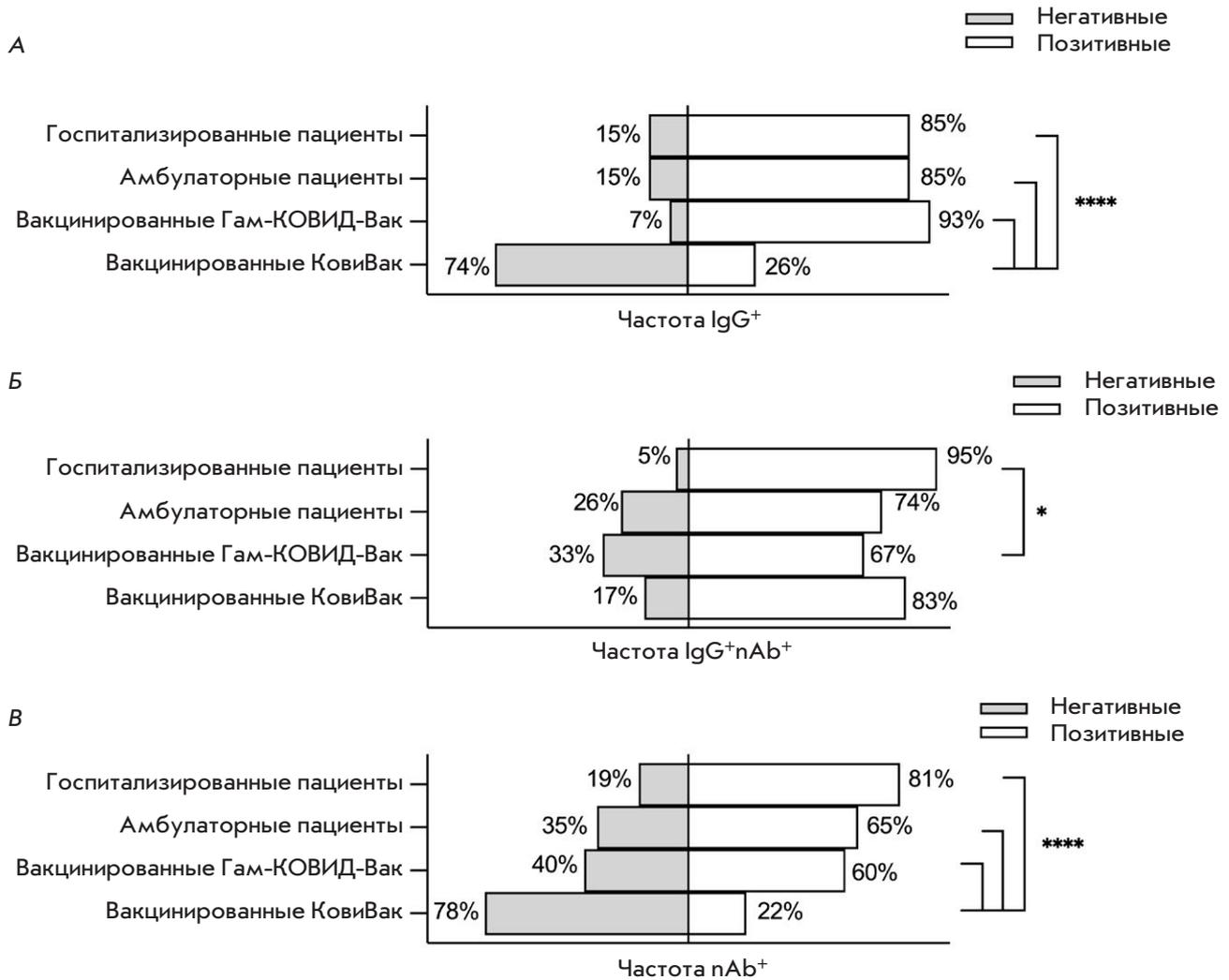


Рис. 3. Частота встречаемости серопозитивных образцов сывороток в анализируемых группах. **А** – частота встречаемости анти-RBD IgG-позитивных образцов сывороток в группе. **Б** – частота встречаемости RBD-nAb-серопозитивных сывороток среди RBD-IgG-серопозитивных образцов. **В** – частота встречаемости RBD-nAb-серопозитивных образцов. Статистическую значимость различий между группами определяли с помощью точного критерия Фишера (* $p < 0.05$, **** $p < 0.0001$)

RBD-нейтрализующие свойства сывороток, полученных от представителей разных групп

Для правильной оценки RBD-нейтрализующей активности гуморального иммунитета (индекс протективности) необходимо, кроме RBD-нейтрализующей активности, также учитывать частоту формирования иммунного ответа в исследуемой группе. Поэтому индекс протективности сывороток групп рассчитывали как значение тангенса угла наклона линии регрессии (K) в группе (рис. 6), приведенного на частоту встречаемости SARS-CoV-2 RBD-специфичных nAb-позитивных образцов сывороток в группе (рис. 3В). Полученные данные приведены на рис. 7.

ОБСУЖДЕНИЕ

Возникновение, развитие и сохранение защитного гуморального иммунитета к коронавирусу SARS-CoV-2 после заболевания и/или вакцинации очень важны и в значительной степени определяют меры, применяемые государством в борьбе с коронавирусной инфекцией. Нейтрализующие антитела имеют огромное значение для защиты организма от вируса. Механизм действия вируснейтрализующих антител разнообразен: ингибирование связывания вирионов с клеточными рецепторами, подавление проникновения вирусных геномов в цитоплазму клетки, блокирование проникновения вирусных геномов из эндосомы

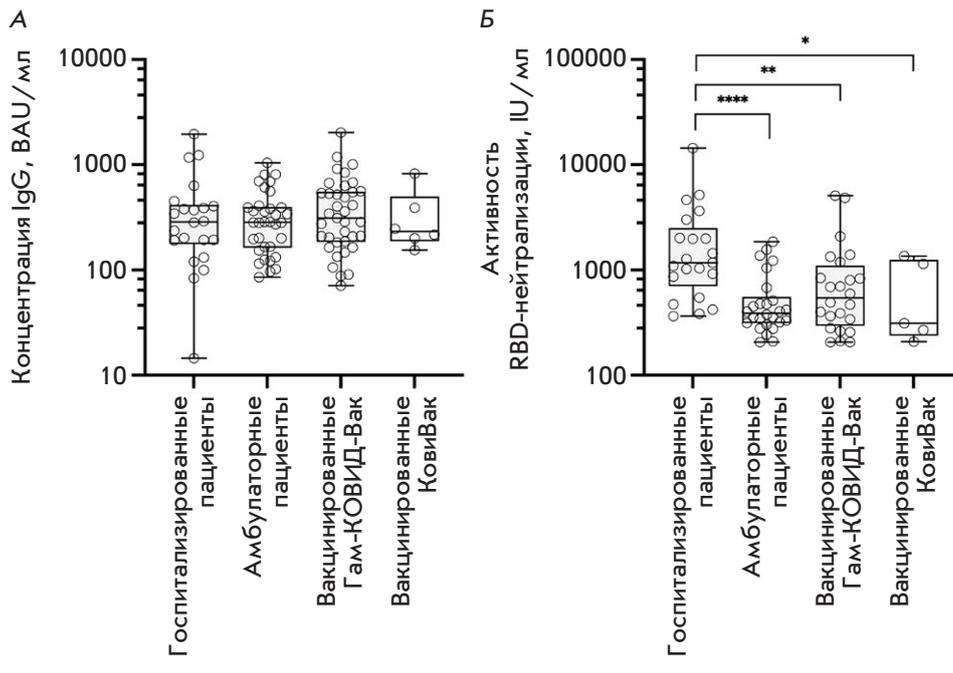


Рис. 4. Концентрация SARS-CoV-2 RBD-специфичных IgG и активность RBD-ACE2-нейтрализующих антител в серопозитивных образцах сывороток, измеренных методом ИФА. А – концентрация SARS-CoV-2 RBD-специфичных IgG в серопозитивных образцах сывороток. Б – нейтрализующая активность RBD-специфичных антител (RBD-nAb) в серопозитивных образцах сывороток. Статистическую значимость различий между группами определяли с помощью критерия Краскела–Уоллиса (* $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, **** $p < 0.0001$)

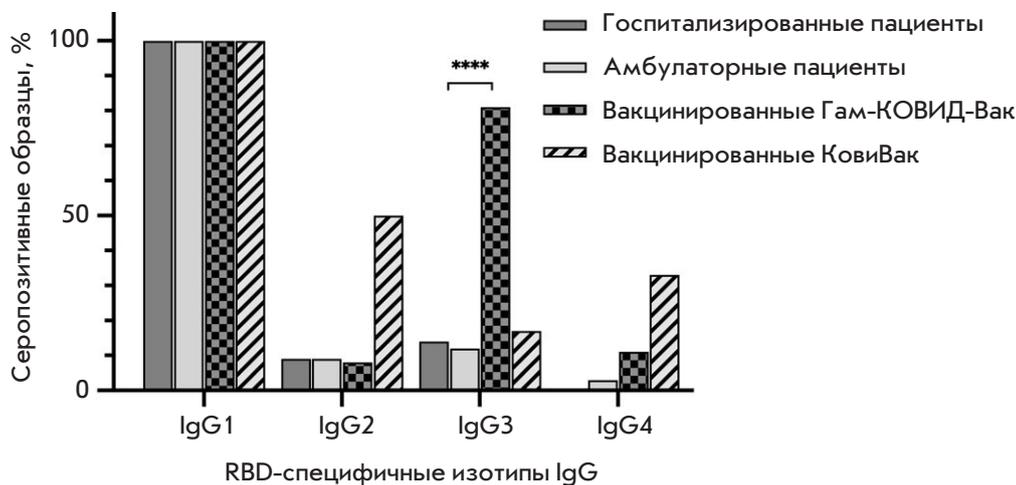


Рис. 5. Частота встречаемости SARS-CoV-2 RBD-специфичных изоформ IgG среди серопозитивных образцов сывороток, способных нейтрализовать взаимодействия RBD-ACE2. Статистическую значимость различий между группами определяли с помощью точного критерия Фишера. **** $p < 0.0001$

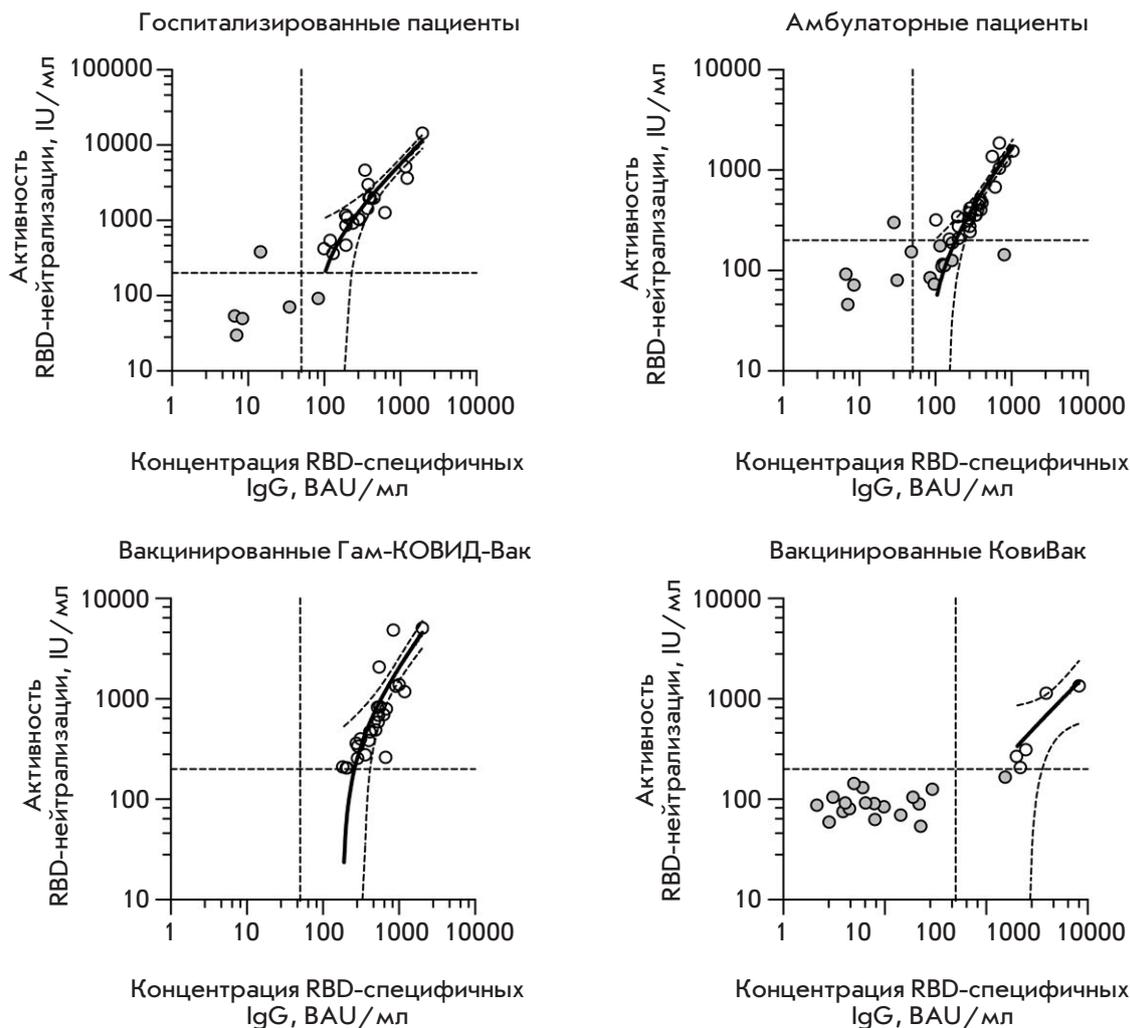
в цитоплазму клеток и, наконец, просто агрегация вирусных частиц. Основным типом нейтрализующих антител при коронавирусной инфекции SARS-CoV-2 являются антитела, препятствующие взаимодействию рецепторсвязывающего домена S-белка вируса с клеточным ACE2-рецептором. Проведено множество исследований, демонстрирующих корреляцию уровня защиты организма с наличием SARS-CoV-2 анти-RBD-иммуноглобулинов класса G в сыворотке крови человека [19–22].

Отдельный пул исследований посвящен адаптивной иммунотерапии COVID-19, а именно, созданию рекомбинантных терапевтических вируснейтрализующих антител к SARS-CoV-2 [23–25]. В этом случае особый интерес представляет потенциа-

льная возможность защиты от новых вариантов вируса, и вопрос нейтрализации вируса стоит весьма остро.

В случае SARS-CoV-2 в определенной степени можно говорить о том, что RBD-ACE2-нейтрализующая активность сывороток практически эквивалентна вируснейтрализующей активности антител и может использоваться в качестве аналога для определения нейтрализующих антител к SARS-CoV-2.

Целью данной работы было детальное изучение защитных свойств гуморального иммунного ответа у госпитализированных и амбулаторных пациентов, а также после профилактики двумя самыми популярными в РФ вакцинами против SARS-CoV-2.



Группа	R (CI)	K (CI)
Госпитализированные пациенты	0.89 (0.74-0.96)	6.0 (4.5-7.5)
Амбулаторные пациенты	0.88 (0.74-0.94)	1.8 (1.4-2.2)
Вакцинированные Гам-КОВИД-Вак	0.77 (0.53-0.89)	2.5 (1.6-3.4)
Вакцинированные КовиВак	0.88 (-0.002-0.99)	1.8 (0.03-3.6)

Рис. 6. Линейный регрессионный анализ RBD-ACE2-нейтрализующей активности сывороточных антител и концентрации RBD-специфичных IgG. Дважды серопозитивные (RBD-IgG⁺ и RBD-nAb⁺) образцы сывороток обозначены белыми кругами, негативные образцы – серыми кругами. 95% доверительные интервалы (CI) и предел обнаружения активности и концентрации обозначены пунктирными линиями. R – коэффициент корреляции Пирсона. K – тангенс угла наклона линии регрессии

Для изучения гуморального иммунитета к SARS-CoV-2 нами созданы две простые, быстрые и удобные ИФА-тест-системы: для количественного измерения концентрации SARS-CoV-2 анти-RBD-IgG и для количественного определения SARS-CoV-2 S1 RBD-ACE2-нейтрализующей активности антител (RBD-nAb). Эти системы образуют платформу, которая, благодаря своей модульной

структуре, может быть в кратчайшие сроки (до 1–2 недель) адаптирована к новым штаммам (заменой RBD белка) или даже к новым вирусам (заменой рецептора ACE2).

Используя эти тест-системы, мы определили (в разрезе изучаемых групп) следующие параметры сывороток крови: частоту встречаемости SARS-CoV-2 анти-RBD-IgG положительных сыворо-

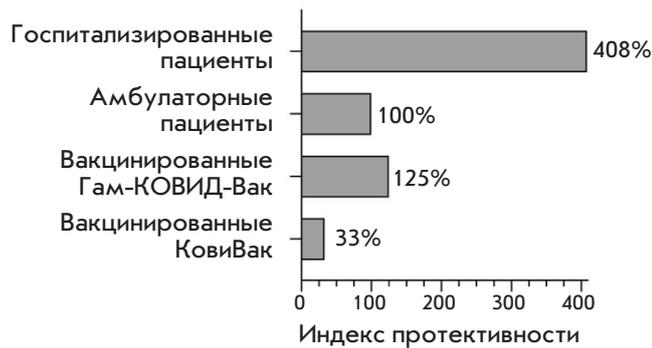


Рис. 7. Вируснейтрализующая активность гуморального иммунитета в разных группах. Индекс протективности группы Амбулаторные пациенты принят за 100%

ток, концентрацию IgG в сыворотках, частоту встречаемости SARS-CoV-2 RBD-nAb-положительных сывороток, нейтрализующую активность RBD-nAb в сыворотках.

Концентрация SARS-CoV-2 анти-RBD-IgG-антител была примерно одинакова среди всех серопозитивных сывороток, однако частота встречаемости IgG-положительных сывороток в группе вакцинированных препаратом КовиВак, сделанным на основе инактивированного вируса, была более чем в 3 раза ниже, чем в остальных группах. Ранее мы показали, что большинство SARS-CoV-2 анти-RBD-антител у переболевших COVID-19 пациентов были конформационно-зависимыми [16, 26]. По-видимому, препарат КовиВак обладает достаточно низкой иммуногенностью, причиной которой, возможно, является частичное разрушение структуры эпитопов S-белка в процессе инактивации вируса или при его хранении. Частота встречаемости RBD-nAb-положительных сывороток и их активность были наибольшими в группе Госпитализированные пациенты.

Нами также исследован профиль образования изомеров IgG-антител в различных группах. Антитела изомера IgG1 обнаружены в образцах сывороток из всех групп. Следует отметить, что только в группе Вакцинированные Гам-КОВИД-Вак также обнаружены антитела изомера IgG3. Переключение на продукцию антител изомеров IgG1 и IgG3, по-видимому, происходит под воздействием IL-21 [27]. Антитела изомера IgG3 образуются на ранних стадиях иммунного ответа и характеризуются высокой способностью к активации комплемента и высокой аффинностью к клеточным рецепторам Fcγ. Все перечисленные свойства антител данного изомера, в дополнение к RBD-нейтрализующей активности,

приводят к активации антителозависимого фагоцитоза и опосредованной антителами цитотоксичности [28–30]. Переключение на продукцию антител изомеров IgG1 и IgG3 в группе Вакцинированные Гам-КОВИД-Вак может быть объяснено природой аденовирусного вектора, используемого в вакцине Гам-КОВИД-Вак.

Мы также рассчитали RBD-нейтрализующую активность гуморального иммунитета в исследуемых группах. Индекс протективности в группе Вакцинированные Гам-КОВИД-Вак на 25% превышал индекс в группе Амбулаторные пациенты и почти в 4 раза превышал индекс в группе Вакцинированные КовиВак. Наибольшая RBD-нейтрализующая активность наблюдалась в группе Госпитализированные пациенты (в 4 раза выше, чем в группе Амбулаторные пациенты), что говорит о наличии высокоаффинных и высокоспецифичных антител наряду с высокой частотой развития иммунного ответа. По-видимому, это объясняется долговременной вирусной нагрузкой госпитализированных пациентов, которая приводит к образованию вируснейтрализующих антител с высокой константой связывания с вирусными эпитопами [16, 31–33].

ВЫВОДЫ

1. Разработана релевантная платформа для количественного анализа RBD-нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 как альтернатива мониторингу вируснейтрализующей активности, позволяющая количественно определять концентрации SARS-CoV-2 анти-RBD IgG-антител, а также SARS-CoV-2 RBD-ACE2-нейтрализующую активность антител.
2. Проведено сравнительное исследование 134 образцов сывороток от тяжело и легко переболевших COVID-19 пациентов и лиц, вакцинированных препаратами Гам-КОВИД-Вак и КовиВак.
3. В группе Госпитализированные пациенты наблюдался наибольший индекс протективности.
4. Защитные свойства гуморального иммунитета после вакцинации препаратом Гам-КОВИД-Вак были в 4 раза выше, чем после вакцинации препаратом КовиВак.
5. Преимуществом разработанной платформы является возможность в кратчайшие сроки (1–2 недели) адаптировать методику к вновь появляющимся вариантам вируса и тем самым получить количественные данные по защищенности индивидов, прошедших вакцинацию предыдущими типами вакцин. ●

Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования, проект № 075-15-2021-1049.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. WHO Coronavirus (COVID-19) Dashboard <https://covid19.who.int>
2. Calina D., Docea A.O., Petrakis D., Egorov A.M., Ishmukhametov A.A., Gabibov A.G., Shtilman M.I., Kostoff R., Carvalho F., Vinceti M., et al. // *Int. J. Mol. Med.* 2020. V. 46. P. 3–16.
3. WHO COVID-19 vaccine tracker and landscape <https://www.who.int/publications/m/item/draft-landscape-of-covid-19-candidate-vaccines>
4. Shang J., Ye G., Shi K., Wan Y., Luo C., Aihara H., Geng Q., Auerbach A., Li F. // *Nature.* 2020. V. 581. P. 221–224.
5. 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. P. 2623.
6. Zhou X., Wang H., Ji Q., Du M., Liang Y., Li H., Li F., Shang H., Zhu X., Wang W., et al. // *Protein & Cell.* 2021. V. 12. № 10. P. 818–823.
7. WHO/BS.2020.2403 Establishment of the WHO International Standard and Reference Panel for anti-SARS-CoV-2 antibody <https://www.who.int/publications/m/item/WHO-BS-2020.2403>
8. Kristiansen P.A., Page M., Bernasconi V., Mattiuzzo G., Dull P., Makar K., Plotkin S., Knezevic I. // *Lancet.* 2021. V. 397. P. 1347–1348.
9. Cantoni D., Mayora-Neto M., Temperton N. // *Oxf. Open Immunol.* 2021. V. 2. № 1. iqab005.
10. Ferrara F., Temperton N. // *Methods Protoc.* 2018. V. 1. № 1. P. 8.
11. Muruato A.E., Fontes-Garfias C.R., Ren, P., Garcia-Blanco M., Menachery V., Xie X., Shi. P. // *Nat. Commun.* 2020. V. 11. № 1. P. 4059.
12. Tan C.W., Chia W.N., Qin X., Liu P., Chen M.I., Tiu C., Hu Z., Chen V.C., Young B.E., Sia W.R., et al. // *Nat. Biotechnol.* 2020. V. 38. № 9. P. 1073–1078.
13. Byrnes J.R., Zhou X.X., Lui I., Elledge S.K., Glasgow J.E., Lim S.A., Loudermilk R.P., Chiu C.Y., Wang T.T., Wilson M.R., et al. // *mSphere.* 2020. V. 5. № 5. P. e00802–20.
14. Logunov D.Y., Dolzhenkova I.V., Zubkova O.V., Tukhvatulin A.I., Shcheblyakov D.V., Dzharullaeva A.S., Grousova D.M., Erokhova A.S., Kovyrshina A.V., Botikov A.G., et al. // *Lancet.* 2020. V. 396. P. 887–897.
15. Kozlovskaya L.I., Piniaeva A.N., Ignatyev G.M., Gordeychuk I.V., Volok V.P., Rogova Y.V., Shishova A.A., Kovpak A.A., Ivin Y.Y., Antonova L.P., et al. // *Emerging Microbes & Infections.* 2021. V. 10. № 1. P. 1790–1806.
16. Bobik T.V., Kostin N.N., Skryabin G.A., Tsbai P.N., Simonova M.A., Knorre V.D., Stratienco O.N., Aleshenko N.L., Vorobiev I.I., Khurs E.N., et al. // *Acta Naturae.* 2021. V. 13. P. 102–115.
17. Kruglova N., Siniavin A., Gushchin V., Mazurov D. // *Viruses.* 2021. V. 13. P. 1133.
18. Костин Н.Н., Бобик Т.В., Скрябин Г.А., Симонова М.А., Мокрушина Ю.А., Смирнов И.В., Балмасова И.П., Аleshenko Н.Л., Никитин А.Э., Чехонин В.П., Габибов А.Г. Заявка на изобретение РФ № 2021140129 «Способ определения активности нейтрализующих антител к SARS-CoV-2 в сыворотке или плазме крови людей, перенесших COVID-19 или привитых вакцинами для профилактики новой коронавирусной инфекции COVID-19, с использованием набора реагентов для иммуноферментного анализа, содержащего рекомбинантный рецепторсвязывающий домен (RBD) поверхностного гликопротеина S коронавируса SARS-CoV-2 и рекомбинантный человеческий рецептор ACE2» (приоритет изобретения от 31.12.21).
19. Lumley S.F., O'Donnell D., Stoesser N.E., Matthews P.C., Howarth A., Hatch S.B., Marsden B.D., Cox S., James T., Warren F., et al. // *N. Engl. J. Med.* 2021. V. 384(6). P. 533–540.
20. Williams D.E. // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. P. 9379.
21. Murugesan M., Mathews P., Paul H., Karthik R., Mammen J.J., Rupali P. // *PLoS One.* 2022. V. 17. № 5. P. e0268797.
22. Tomic A., Skelly D.T., Ogbe A., O'Connor D., Pace M., Adland E., Alexander F., Ali M., Allott K., Azim Ansari M., et al. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 1251.
23. 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. 2623.
24. Zhou X., Wang H., Ji Q., Du M., Liang Y., Li H., Li F., Shang H., Zhu X., Wang W., et al. // *Protein Cell.* 2021. V. 12. № 10. P. 818–823.
25. Chen D., Zhao Y., Li M., Shang H., Li N., Li F., Wang W., Wang Y., Jin R., Liu S., et al. // *Theranostics.* 2021. V. 11. № 4. P. 1901–1917.
26. Bobik T.V., Kostin N.N., Skryabin G.A., Tsbai P.N., Simonova M.A., Knorre V.D., Mokrushina Y.A., Smirnov I.V., Kosolapova J.A., Vtorushina V.V., et al. // *Pathogens.* 2021. V. 10. P. 705.
27. Avery D.T., Bryant V.L., Ma C.S., de Waal Malefyt R., Tangye S.G. // *J. Immunol.* 2008. V. 181. № 3. P. 1767–1779.
28. Damelang T., Rogerson S.J., Kent S.J., Chung A.W. // *Trends Immunol.* 2019. V. 40. P. 197–211.
29. Collins A.M., Jackson K.J.L. // *Front. Immunol.* 2013. V. 4. P. 235.
30. Chu T.H., Patz E.F., Ackerman M.E. // *MAbs.* 2021. V. 13. P. 1882028.
31. Bošnjak B., Stein S.C., Willenzon S., Cordes A.K., Puppe W., Bernhardt G., Ravens I., Ritter C., Schultze-Florey C.R., Gödecke N., et al. // *Cell. Mol. Immunol.* 2021. V. 18. № 4. P. 936–944.
32. Chia W.N., Zhu F., Ong S.W.X., Young B.E., Fong S.-W., Le Bert N., Tan C.W., Tiu C., Zhang J., Tan S.Y., et al. // *Lancet Microbe.* 2021. V. 2. P. e240–e249.
33. Moriyama S., Adachi Y., Sato T., Tonouchi K., Sun L., Fukushima S., Yamada S., Kinoshita H., Nojima K., Kanno T., et al. // *Immunity.* 2021. V. 54. P. 1841–1852.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

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

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

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

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

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

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

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

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

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

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

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

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

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

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

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

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

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

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

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

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

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

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

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

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

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

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

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

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

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

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

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

Шкурников М.Ю. Влияние нагрузок различной интенсивности на концентрацию белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа. Дис. ... канд. мед. наук. 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.