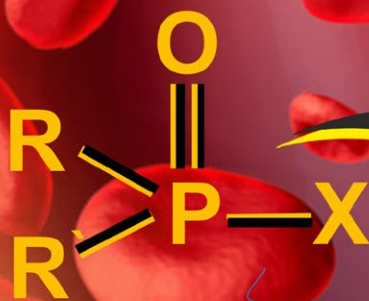


# Acta Naturae

## Наноустройства для *in vivo* детоксикации



АНАЛИЗ ГЕНЕТИЧЕСКОЙ  
ПРЕДРАСПОЛОЖЕННОСТИ  
К НАСЛЕДСТВЕННОЙ  
КАТАЛЕПСИИ  
С ИСПОЛЬЗОВАНИЕМ  
ПОЛНОГЕНОМНЫХ ДАННЫХ  
СТР. 26

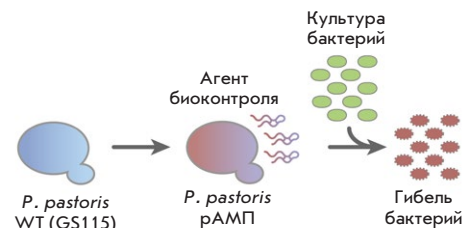
ГЕНЕТИЧЕСКИЕ ВАРИАНТЫ,  
АССОЦИИРОВАННЫЕ  
С БРОНХИАЛЬНОЙ АСТМОЙ,  
СПЕЦИФИЧНЫЕ  
ДЛЯ НАСЕЛЕНИЯ РФ  
СТР. 31



## Генетическое программирование дрожжей для создания рекомбинантных агентов биоконтроля

С. О. Пипия, Н. З. Мирзоева, М. Н. Баранова, И. Е. Елисеев, Ю. А. Мокрушина, О. В. Шамова, А. Г. Габиев, И. В. Смирнов, С. С. Терехов

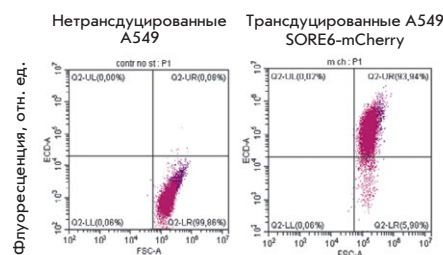
На основе метилотрофных дрожжей *Pichia pastoris* создан рекомбинантный агент биоконтроля, активным компонентом которого выступает рАМП протегрин-1. Полученный штамм дрожжей ингибировал рост репортерной мишени как на агаризованной среде, так и в условиях кокультивирования в каплях микрофлюидной двойной эмульсии. Разработанная стратегия получения рекомбинантных агентов биоконтроля является важным этапом создания альтернативных способов борьбы с патогенами. Кроме того, рассмотренные подходы могут применяться для поиска новых антимикробных соединений с использованием технологий глубокого функционального профилирования.



Схематическое представление генетического программирования штаммов дрожжей *P. pastoris* и создания рекомбинантного агента биоконтроля

## Оценка эффективности действия различных ингибиторов аутофагии на опухолевые стволовые клетки A549

К. В. Александрова, И. И. Суворова



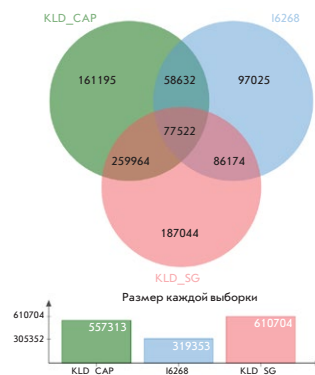
Влияние ингибиторов аутофагии на уровень экспрессии белков Sox2 и Oct4 в опухолевых клетках линии A549

На линии опухолевых клеток A549, способных экспрессировать коровые факторы стволовости Oct4 и Sox2, изучено воздействие ингибиторов аутофагии (Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921, IPTZ-01) на выживаемость и сохранение исходных свойств опухолевых стволовых клеток. Показано, что из выбранных препаратов только Autophinib обладает эффективным токсичным действием на опухолевые стволовые клетки. Ингибирование аутофагии посредством Autophinib приводит к снижению экспрессии белка Sox2 в клетках A549, что коррелирует со значительной индукцией апоптоза. Более того, обработанные Autophinib клетки A549 не способны к формированию сфероидов, что свидетельствует об ослаблении свойств стволовости. Таким образом, из числа исследованных препаратов только Autophinib может быть рассмотрен в качестве потенциального средства для элиминации раковых стволовых клеток.

## Искажение популяционной статистики как результат различных методических подходов к приготовлению геномных библиотек древней ДНК

Ф. С. Шарко, К. В. Жур, В. А. Трифонов, Е. Б. Прохорчук

Проведено сравнение результатов секвенирования библиотек дДНК образца эпохи бронзы из погребений кавказского могильника Клады. Библиотеки были приготовлены с применением трех различных подходов: метода дробовика (shotgun sequencing), отбора целевых районов генома и отбора целевых районов генома с предварительной обработкой ДНК смесью урацил-ДНК-гликозилазы и эндонуклеазы VIII. Проанализировано влияние этих подходов на результаты вторичного статистического анализа данных, а именно F4-статистики, ADMIXTURE и метода главных компонент (PCA). Показано, что при приготовлении геномных библиотек без использования урацил-ДНК-гликозилазы возможно искажение результатов статистической обработки, связанное с помертными химическими модификациями дДНК. Для уменьшения влияния методических подходов рекомендуется увеличивать экспедиционные выборки костных останков представителей одной культуры/популяции, а также унифицировать пробоподготовку в рамках одного исследования.



Диаграммы Венна для ОНП трех библиотек KLD\_CAP, KLD\_SG и I6268

# Acta Naturae

ТОМ 15, № 1 (56), ЯНВАРЬ—МАРТ 2023  
издается с апреля 2009 года

## Учредители:

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

## Редакционный совет:

Главные редакторы: А.Г. Габибов, С.Н. Кочетков

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

## Редакционная коллегия:

Ответственный секретарь: В.Д. Кнорре

К.В. Анохин (Москва, Россия),  
И. Безпрозванный (Даллас, Техас, США),  
И.П. Биленкина (Москва, Россия),  
М. Блэкбёрн (Шеффилд, Великобритания),  
Дж. Ву (Шанхай, Китай),  
В.М. Говорун (Москва, Россия),  
С.М. Деев (Москва, Россия),  
О.А. Донцова (Москва, Россия),  
К. Драуз (Ганау-Вольфганг, Германия),  
М. Зуали (Париж, Франция),  
М. Исагулянц (Стокгольм, Швеция),  
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, 2023

Номер подписан в печать 29 марта 2023 г.

Тираж 25 экз. Цена свободная.

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



Основатель и председатель  
редакционного совета (с 2009 по 2023 г.)  
журнала *Acta Naturae*  
академик Григорьев Анатолий Иванович

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

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

Выходит 4 раза в год

Импакт-фактор: 2.204

## СОДЕРЖАНИЕ

### ОБЗОРЫ

Т. Н. Паширова, З. М. Шайхутдинова,  
В. Ф. Миронов, П. Массон

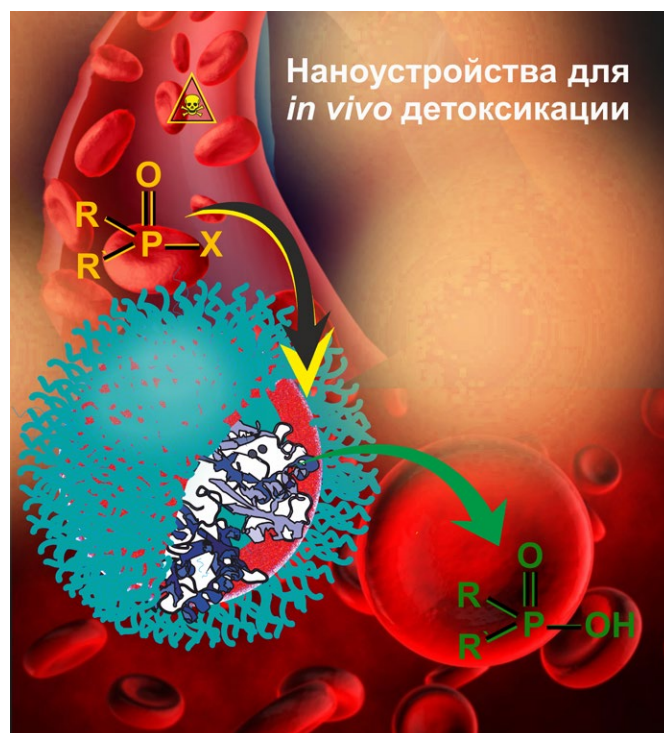
Биомедицинские наносистемы для *in vivo*  
детоксикации: от пассивных систем доставки  
к функциональным наноустройствам  
и нанороботам ..... 4

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

В. А. Абрикосова, Ю. А. Мокрушина,  
Л. А. Овчинникова, Е. Н. Ларина,  
С. С. Терехов, М. Н. Баранова, Я. А. Ломакин,  
Д. С. Балабашин, Т. В. Бобик, Е. Н. Калиберда,  
В. Д. Кнорре, М. В. Шпилевая, Т. К. Алиев,  
Д. Г. Дерябин, А. Э. Карамова, А. А. Кубанов,  
М. П. Кирпичников, И. В. Смирнов

Профилирование В-лимфоцитов пациентов  
с аутоиммунной пузырчаткой..... 13

К. В. Александрова, И. И. Суворова Оценка эффективности действия различных ингибиторов аутофагии на опухолевые стволовые клетки <b>A549</b> ..... 19	С. О. Пипия, Н. З. Мирзоева, М. Н. Баранова, И. Е. Елисеев, Ю. А. Мокрушина, О. В. Шамова, А. Г. Габиров, И. В. Смирнов, С. С. Терехов Генетическое программирование дрожжей для создания рекомбинантных агентов биоконтроля ..... 74
Т. В. Андреева, Ф. Е. Гусев, Н. А. Синякова, А. В. Куликов, А. П. Григоренко, И. Ю. Адрианова, Д. В. Базовкина, Е. И. Рогаев Анализ генетической предрасположенности к наследственной катаlepsии в мышечной модели нейропсихических заболеваний с использованием полногеномных данных ..... 26	Я. О. Романенко, М. В. Силкина, А. С. Карцева, М. А. Марьин, М. А. Шкуратова, М. А. Макарова, А. К. Рябко, Д. А. Коньшкова, Н. А. Зенинская, А. Е. Хлынцова, И. Г. Шемякин, В. В. Фирстова Характеристика человеческого моноклонального антитела <b>C6D7-RBD</b> , специфичного к рецепторсвязывающему домену <b>S</b> белка вируса <b>SARS-CoV-2</b> ..... 81
Ю. Н. Ахмерова, Т. А. Шпакова, К. С. Грамматикати, С. И. Митрофанов, П. Г. Казакова, А. А. Мкртчян, П. Ю. Земский, М. Н. Пилипенко, Н. В. Фелиз, Л. В. Фролова, А. А. Фроловская, В. С. Юдин, А. А. Кескинов, С. А. Краевой, С. М. Юдин, В. И. Скворцова Генетические варианты, ассоциированные с бронхиальной астмой, специфичные для населения <b>РФ</b> ..... 31	Ф. С. Шарко, К. В. Жур, В. А. Трифонов, Е. Б. Прохорчук Искажение популяционной статистики как результат различных методических подходов к приготовлению геномных библиотек древней <b>ДНК</b> ..... 87
Е. А. Иванова, А. И. Матюшкин, Т. А. Воронина Анализ участия <b>NMDA</b> -рецепторов в анальгезии и гипотермии, вызванной активацией ионных каналов <b>TRPV1</b> ..... 42	Правила для авторов ..... 97
С. Д. Маргасюк, М. А. Власенок, Г. Ли, Ч. Као, Д. Д. Первушин <b>RNAcontacts</b> , вычислительный конвейер для предсказания РНК-РНК-контактов по данным конформационного секвенирования РНК <i>in situ</i> ..... 51	
М. А. Марченкова, А. С. Бойкова, К. Б. Ильина, П. В. Конарев, Ю. В. Писаревский, Ю. А. Дьякова, М. В. Ковальчук Связь концентрации кластеров-прекурсоров в насыщенном кристаллизационном растворе с дальним порядком при переходе к твердой фазе ..... 58	
И. А. Морозова, Д. Ф. Гуранда, Н. В. Панин, В. К. Швядас Специфичность пенициллинацилаз в реакции снятия защитной группы в <b>N</b> -бензилокси-карбонильных производных аминокислот ..... 69	



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

УДК 615

# Биомедицинские наносистемы для *in vivo* детоксикации: от пассивных систем доставки к функциональным наноустройствам и нанороботам

Т. Н. Паширова<sup>1\*</sup>, З. М. Шайхутдинова<sup>1,2</sup>, В. Ф. Миронов<sup>1</sup>, П. Массон<sup>2</sup><sup>1</sup>Институт органической и физической химии им. А.Е. Арбузова, ФИЦ Казанский научный центр РАН, Казань, 420088 Россия<sup>2</sup>Казанский (Приволжский) федеральный университет, Казань, 420000 Россия

\*E-mail: tatyana\_pashirova@mail.ru

Поступила в редакцию 15.02.2023

Принята к печати 21.03.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.15681

**РЕФЕРАТ** В обзоре рассматривается решение проблемы низкой эффективности нанотерапевтических препаратов путем создания альтернативных биомедицинских наносистем – роботизированных наноустройств, обладающих не только инкапсулирующими свойствами, но и способных выполнять различные биомедицинские функции, такие, как прецизионная хирургия, детектирование, визуализация и биозондирование, адресная доставка, а также нейтрализация эндогенных токсинов и ксенобиотиков. Наноустройства обеспечивают удаление токсикантов из биологических тканей с помощью как пустых, так и загруженных химическими веществами и/или ферментами наноносителей. Этот подход противоположен стратегии создания систем доставки, сосредоточенной на инкапсулировании лекарств и их обязательному высвобождению под действием внешних факторов. В обзоре представлен широкий спектр наноустройств, предназначенных для детоксикации, а именно, по виду отравлений и методам их лечения (неспецифические антидоты, нанодиализные системы), типу материала и токсикантов. Заключительная часть обзора посвящена зарождающейся области исследований – ферментным наносистемам, обеспечивающим быструю и эффективную нейтрализацию токсинов *in vivo*.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** детоксикация, наноустройства, системы доставки, ферменты.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ЛЭ – липидные эмульсии; RM-PL – эритролипосома; LSPD – перитонеальный диализ с липосомами; ФОС – фосфорорганические соединения; E – фермент; T – токсикант.

## ВВЕДЕНИЕ

Долгое время методы профилактики и лечения заболеваний человека основывались исключительно на введении химических или биологических лекарственных препаратов. Начиная с момента открытия в 1964 году первых липосомальных систем, современная стратегия наномедицины направлена на инкапсулирование и стабилизацию низкомолекулярных лекарственных веществ или макромолекул с помощью различных типов наноносителей для преодоления биологических барьеров, повышения биодоступности, снижения нежелательной токсичности для здоровых тканей и адресной доставки [1, 2]. Несмотря на то, что нанотерапевтические препараты уже одобрены для применения в клинике и/или проходят клинические испытания [3, 4], наномедицина по-прежнему сталкивается с низкой эффективностью во многих приложениях, так, например,

в среднем только 0.7% цитотоксических препаратов, инкапсулированных в наноносители, достигают солидных опухолевых образований [5]. Начиная с 2008 года наблюдается значительный рост публикаций, описывающих получение нанотерапевтических препаратов нового поколения, так называемых «интеллектуальных наноносителей», модифицированных различными лигандами, обеспечивающими адресную доставку и чувствительность к различным стимулам [6, 7].

На сегодняшний день возникла потребность в альтернативных биомедицинских системах, таких, как роботизированные наноустройства, которые в отличие традиционных пассивных нанотерапевтических препаратов способны выполнять различные биомедицинские функции, включая прецизионную хирургию, биозондирование, детектирование и визуализацию *in vivo*, адресную достав-

ку лекарств, а в последнее время и детоксикацию [8, 9]. Наноробототехника долгое время была лишь фантастикой, впервые выдвинутой в 1959 году концепцией Ричарда Фейнмана, лауреата Нобелевской премии по физике, о микроскопических механических хирургах, продвигающихся по кровеносному сосуду. Вскоре, в 1966 году, концепция «хирурга» была представлена в научно-фантастическом фильме «Фантастическое путешествие», где миниатюрная подводная лодка использовалась для очистки кровеносного сосуда от тромба. За последние несколько десятилетий область научной фантастики стала реальностью. С использованием различных материалов, технологий и методов управления разработаны нанороботы разнообразной формы и размеров. В качестве нанороботов часто упоминаются микро/наномоторы [10], микро/нанопловцы [11], микро/наномашинки [12], микро/нанонасосы [13], микро/наноракеты [14] и т.д. [15].

Существуют следующие определения нанороботов. Наномашинки – это наноразмерные механические устройства, способные преобразовывать энергию в точное механическое движение [16]. Микро/нанобиомедицинские устройства – это структуры, которыми можно управлять и приводить в движение в живом организме с помощью химических или биогибридных источников [17]. Это миниатюрные структуры на основе наноматериалов, спроектированные таким образом, чтобы автономно двигаться и эффективно выполнять запрограммированные задачи даже в труднодоступных местах органов/тканей/клеток [18]. Таким образом, роботизированные нанороботы представляют собой инструменты нового поколения, которые могут продвигаться и/или направляться эндогенными и экзогенными стимулами для целенаправленного и персонализированного терапевтического применения. Решение проблем в практических клинических приложениях с использованием нанороботов все еще находится в зачаточном состоянии [19]. К ключевым факторам, которые необходимо учитывать при разработке и успешном применении идеальных биомедицинских терапевтических нанороботов в клинике, относятся:

- биосовместимость с телом пациента;
- способность загрузки/выгрузки лекарств, визуализирующих агентов и т.д.;
- контролируемое движение и возможность отслеживания во времени с помощью методов медицинской визуализации;
- контролируемая деградация без образования каких-либо токсичных метаболитов в теле пациента.

Номенклатура микро/нанороботов основана на их конструкции, геометрии, механизме движения

и характере вращения. Как правило, самодвижение нанороботов осуществляется за счет:

а) преобразования энергии химических и ферментативных [20, 21] реакций в механическую [22]. Такие нанороботы движутся в определенном направлении за счет энергии ферментативных или различных химических реакций [23, 24], например, i) нанороботы, передвигающиеся за счет образования пузырьков газа (водорода, кислорода и т.д.); ii) самоэлектрофоретические нанороботы, работающие по принципу разницы окислительно-восстановительного потенциала; iii) самодиффузионные нанороботы, где механизм движения осуществляется за счет градиента концентрации при образовании продуктов реакции;

б) влияния внешних стимулов [25] (магнитное, акустическое, световое поле), т.е. это стимул-чувствительные нанороботы;

в) биологические/биогибридные нанороботы, где движение обусловлено микроорганизмами и клеточными компонентами, например, ресничками, жгутиками и т.д. [26–29].

Совсем недавно началось исследование биомедицинских наносистем, предназначенных для детоксикации/нейтрализации, а именно, способных улавливать токсичные молекулы и снижать их концентрацию в организме благодаря большой площади поверхности и высокому сродству к активным компонентам. Известны примеры их использования в терапии опухолевых и воспалительных заболеваний [30–32], при передозировке лекарств [33], ксенобиотиков, включая промышленные токсиканты и боевые отравляющие вещества, и т.д. Как правило, адресные системы доставки лекарств направлены на инкапсулирование терапевтического агента и его высвобождение в тканях-мишенях под контролем внешних стимулов. Совершенно противоположный подход предполагается для нанодетоксицирующих устройств – наноносители обеспечивают удаление лекарств и ксенобиотиков из биологических тканей [34]. В обзоре представлены результаты «доказательства концепции» и потенциальные перспективы применения микро/нанороботов для детоксикации.

## ТИПЫ НАНОРОБОТОВ ДЛЯ ДЕТОКСИКАЦИИ В МЕДИЦИНЕ

Исходя из общих принципов, для детоксикации используют:

- а) антидотную терапию или обезвреживание токсических веществ;
- б) ускорение выведения токсинов из организма (гемодиализ, перитонеальный диализ и гемосорбция);
- в) симптоматическую терапию, т.е. восстановление нарушенных функций.

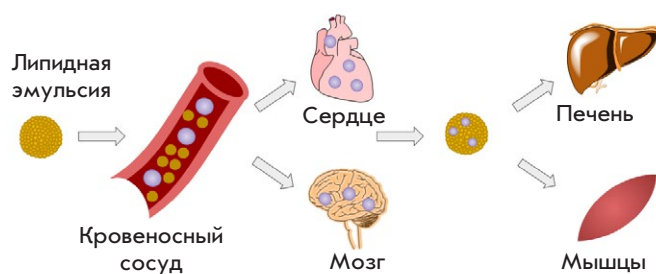
### Наносистемы как неспецифические антидоты

В настоящее время востребованы соединения и составы, способные предотвращать или уменьшать побочные эффекты передозировки лекарств или наркотических веществ, так называемые антидоты. Эффективными могут быть и такие неспецифические антидоты, как липидные эмульсии, липосомы и наногубки, способные захватывать молекулы лекарственных веществ за счет неспецифических взаимодействий (водородное связывание, гидрофобный эффект, электростатические взаимодействия). Таким образом, неспецифические антидоты будут обладать широким спектром действия при детоксикации и при передозировке наркотиков.

**Наноэмульсии.** Известно, что при передозировке липофильных препаратов рекомендуется применение липидной реанимационной терапии, а именно, использование в качестве неспецифических антидотов липидных эмульсий (ЛЭ) – внутривенно вводимых наноразмерных капель типа «масло в воде» [35]. ЛЭ применяют при передозировке и для снижения концентрации липофильных антиаритмических, психотропных, противомаларийных препаратов, местных анестетиков, блокаторов кальциевых каналов, таких, как пропранолол [36], кокаин [37, 38], дилтиазем [39], бупренорфин, фентанил и буторфанол [40], бупивакаин [41], ивермектин [42, 43], ропивакаин [44, 45]. Использование ЛЭ быстро снижает порог судорожной активности, токсичности амоксицилина [46], улучшает сердечную деятельность при трансплантации сердца [47]. ЛЭ применяют при остром отравлении нейротоксическими фосфорорганическими соединениями [48]. Недавно был представлен подход, при котором активные токсичные молекулы удаляют из биологических тканей с помощью наноносителя – липофильного амина, способного реагировать с токсином (карго-альдегидом) внутри ЛЭ, образуя липофильный конъюгат имина в масляном ядре. Успешное выведение из клеток высокотоксичного алифатического альдегида 4-гидроксиноненаля позволило получить доказательство в пользу концепции детоксикации живых клеток [34].

Схема механизма действия ЛЭ в организме представлена на *рис. 1*. Видно, что ЛЭ захватывают хорошо растворимые в жирах препараты из органов с высокой перфузией, таких, как сердце, мозг и почки, а в дальнейшем транспортируют их в печень и мышцы, что приводит к усиленному перераспределению токсинов.

В настоящее время принят динамический мультимодальный механизм действия ЛЭ. ЛЭ не только захватывают токсины/лекарства, но и изменяют



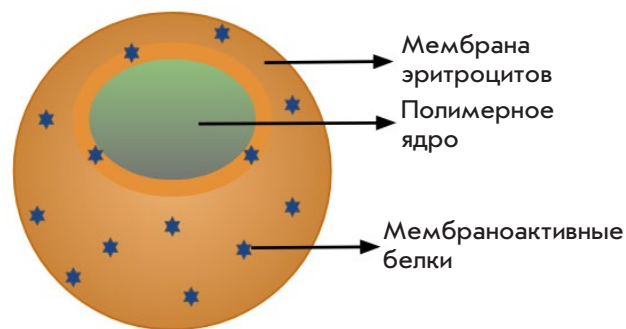
**Рис. 1.** Механизм действия ЛЭ в организме, а именно, извлечение токсинов из органов с высокой перфузией, таких, как сердце, мозг и их дальнейший транспорт в печень и мышцы, что приводит к их усиленному перераспределению. Адаптировано из [49]

их фармакокинетические характеристики, а также проявляют эффект посткондиционирования наряду с кардиотоническими и сосудосуживающими свойствами, оказывают положительный инотропный эффект, снижают высвобождение оксида азота, ослабляют митохондриальную дисфункцию, фосфорилирование киназы-3β-гликогенсинтазы и т.д. [50]. Влияние ЛЭ на фармакокинетические характеристики лекарственных средств может быть ориентиром для их клинического применения [33]. Несмотря на то, что ЛЭ используются для купирования широкого спектра интоксикаций липофильными препаратами, тем не менее, к настоящему моменту не определены оптимальная дозировка, продолжительность введения, порядок начала лечения и введения ЛЭ [51].

**Нанокapsулы.** Нанокapsулы (масляное ядро/оболочка из диоксида кремния) были синтезированы с целью детоксикации [52]. Авторы [52] обнаружили, что нанокapsулы меньшего диаметра более эффективно поглощали токсины, чем нанокapsулы большего размера, т.е. распределение лекарственного вещества/токсина в нанокapsулах пропорционально площади межфазной поверхности и не зависит от концентрации масляной фазы. Кроме того, распределение препарата уменьшалось по мере увеличения толщины оболочки, так как при более толстой оболочке происходило снижение проникновения лекарства в нанокapsулу [52]. С целью лечения алкогольной интоксикации разработаны имитирующие гепатоциты антидоты-нанокapsулы для доставки ферментов (алкогольоксидазы, каталазы и альдегид-дегидрогеназы) в печень. Алкогольоксидаза и каталаза обеспечивали быстрое удаление спирта, а образующийся ацетальдегид эффективно окислялся альдегид-дегидрогеназой. Введение разработанного антидота мышцам в состоянии алкогольного опьянения обеспечивало значительное снижение концентрации алкоголя в крови без накопления ацетальдегида [53].

**Наногубки.** Наногубки представляют собой разлагающийся естественным образом трехмерный каркас, образованный в растворе небольшими молекулами, называемыми швивающими агентами [54]. Впервые подход с наночастицами-наногубками, покрытыми природной клеточной мембраной и функционирующими посредством биомимикрии (рис. 2), был предложен Zhang L. [55]. «Наногубка действует как приманка для токсина *in vivo* и это новый способ удаления токсинов из кровотока», – сообщает Zhang L. «Вместо того, чтобы создавать специальные средства для лечения отдельных токсинов, мы разрабатываем платформу, которая может нейтрализовать токсины, продуцируемые широким спектром патогенов». Наногубка, созданная Zhang L. и его коллегами, представляет собой полимерное ядро из сополимера молочной кислоты с гликолевой кислотой (PLGA) с внешней оболочкой мембраны из эритроцитов, притягивающих токсины как приманка. В тестах на мышах профилактическое введение наногубок приводило к снижению уровня смертности до 11%, по сравнению со 100% уровнем смертности без лечения. Введение наногубок после инъекции токсина снижало смертность до 56%. Наногубки с изолированным токсином, предположительно, накапливались в печени, где в отсутствие каких-либо повреждений токсин безопасно метаболизировался и удалялся из организма [55, 56].

Наногубки эффективно применялись для детоксикации бактериальных токсинов [57, 58]. Кроме того, такие наносистемы эффективно связывают и нейтрализуют низкомолекулярные соединения [59], аутоиммунные антитела [60], воспалительные цитокины [61], бактерии и вирусы [62, 63], нейротоксины (тетродотоксин, ботулинический токсин и сакситоксин) [64]. Наногубки, обеспечивающие нейтрализацию нейротоксинов, состоят из полимеров, покрытых мембраной нейронов, а именно клеток Neuro-2a; применение этой клеточной линии, полученной из нервного гребня мыши, повышало выживаемость мышей при лечении и профилактике при отсутствии острой токсичности [64]. Более эффективным был механизм двухмодальной детоксикации с наногубками, содержащими масляное ядро и покрытие эритроцитарной мембраной (Oil-NS) [65]. Полученная конструкция Oil-NS сочетает в себе специфическую связывающую способность биологических рецепторов, присутствующих на клеточной мембране, с неспецифической абсорбционной функцией масляного ядра, которые совместно повышают общую детоксикационную способность. Таким образом, нейтрализация токсинов осуществляется благодаря совместной работе мембраны и масляного ядра. Гибридная система наногубка-гель способна нейтрализовать токсины,



**Рис. 2.** Структура наногубки, представляющая собой полимерное ядро с мембранной оболочкой из эритроцитов. Адаптировано из [55]

а ее применение как в терапевтических, так и в профилактических целях приводит к значительному улучшению при поражении кожи токсинами [66]. Предметом дальнейшего изучения является стратегия биомиметической детоксикации, основанная на создании наночастиц, покрытых мембраной тромбоцитов, перспективных в качестве дополнительной терапии пациентов с инфекцией MRSA (метициллинрезистентный золотистый стафилококк) [67].

**Эритролипосомы.** Эритролипосомы (RM-PL) представляют собой биомиметическую платформу, сконструированную из искусственных липидных мембран и природных мембран эритроцитов. Такие системы успешно применяют для нейтрализации различных гемолитических порообразующих токсинов [68]. Токсины, поглощенные RM-PL, попадали в печень и селезенку, а затем подвергались эндоцитозу и перевариванию макрофагами. В результате утрачивалась первоначальная токсичность для органов-мишеней, что позволяло животным выжить.

**Биомиметические гибридные системы.** Микромоторы Янус – частицы магния и золота, покрытые мембранами эритроцитов (RBC-Mg), действующие как приманки и обладающие способностью поглощать и нейтрализовать биологические токсины в воде и биологических средах. Показана возможность применения наномоторов RBC-Mg для быстрой детоксикации  $\alpha$ -токсина и метилпараоксона – моделей мембраноповреждающих токсинов и боевых отравляющих веществ соответственно [69, 70]. Гибридные биомембранные нанороботы с акустическим приводом и мембраной, состоящей из двух типов клеток (эритроциты и тромбоциты), эффективно связывались и с токсинами, и с патогенами в крови. Для одновременного элиминирования патогенных бактерий и токсинов были применены белки, находящиеся в гибридной мембране. Последние способствовали связыванию с патогенами и нейтрализации поро-



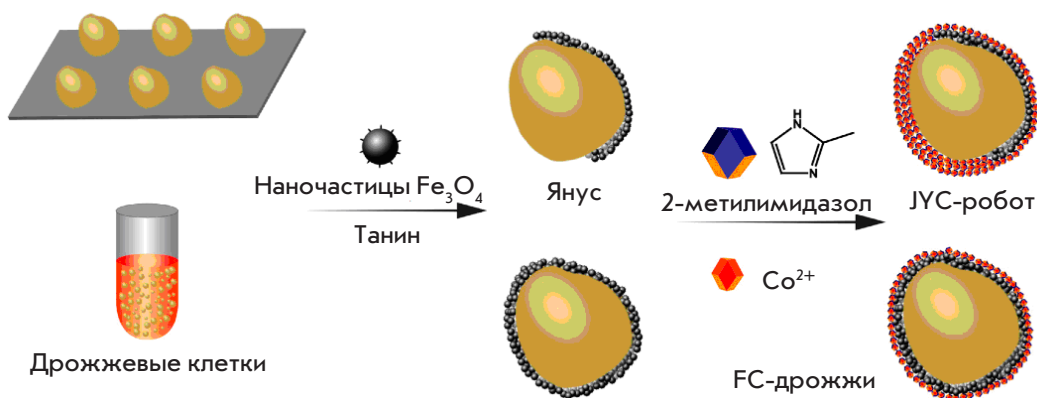


Рис. 3. Схема получения биомиметических гибридных систем для нейтрализации микотоксинов. Адаптировано из [73]

образующих токсинов [71, 72]. Опубликованы примеры [73] получения микророботов с наночастицами  $Fe_3O_4$ , покрывающими дрожжевые клетки, и создания цеолитного имидзольного каркаса-67 (ZIF-67) для нейтрализации микотоксинов (рис. 3).

### Нанодиализные системы для улучшения выведения токсинов

**Липосомы.** Использование липосомальных диализатов – это зарождающаяся область исследований. Липосомы, не загруженные лекарством, – «пустые» липосомы, использовали в качестве поглотителей экзогенных и эндогенных токсичных молекул, и часть из этих исследований достигла клинических испытаний. Вполне возможно, что в следующем десятилетии липосомы будут использоваться в качестве наноантидотов в клинике [74]. При введении «пустых» липосом *in vitro* происходит образование резервуара для связывания токсина. Липосомы обладают способностью связывать токсин за счет электростатических взаимодействий и гидрофобного эффекта в мембране или посредством захвата ионов в гидрофильном ядре. Внелипосомальные неионизированные молекулы проникают в липосомы и захватываются гидрофильным ядром с регулируемым значением pH. Например, слабоосновная лекарственная молекула, попадая в гидрофильное ядро липосомы с кислым значением pH, ионизируется и теряет способность диффундировать через липидный бислой (рис. 4).

Впервые гемодиализный метод, включающий липосомы и антиоксиданты, был представлен как уникальная стратегия удаления токсинов. *In vitro* наблюдали более заметное снижение содержания продуктов окисления и удаления тромбоцитов и билирубина по сравнению с обычным гемодиализом [75]. Эксперименты *in vivo* на крысах с уремией подтвердили, что добавление липосом в диализат в качестве дополнения к обычному гемодиализу может способствовать удалению связанных с белком уремиических растворенных веществ. Разработанная

наносистема обладает уникальными преимуществами в сравнении с альбумином и другими альтернативными методами с применением сорбентов [76]. Липосомы, модифицированные линолевой кислотой [77], и декорированные полиэтиленгликолем, продемонстрировали значительно более высокие скорости связывания и быстрый клиренс уремиических токсинов, связанных с белками [78]. Доклиническая оценка трансмембранных липосом с градиентом pH для концентрирования аммиака подтвердила способность перитонеального диализа с липосомами снижать уровень аммиака в плазме у свиней с искусственно индуцированной гипераммониемией [79].

Перитонеальный диализ с липосомами (LSPD), а именно диализат, обогащенный pH-градиентными липосомами, т.е. имеющими градиент pH между внутренней и внешней средой липосом (кислая – внутри, нейтральная – снаружи), облегчал симптомы отравления на моделях животных [80, 81]. На крысах показано заметное повышение концентрации галоперидола, верапамила и амитриптилина в диализате при использовании LSPD по сравнению с перитонеальным диализатом без аугментации [80, 81]. LSPD применяли для удаления токсинов – препаратов, обладающих способностью сильно связываться с белками крови. Амитриптилин был выбран в качестве препарата, обладающего высокой способностью связываться с белками крови. Установлено, что диализаты, обогащенные липосомами, увеличивают экстракцию амитриптилина *in vivo* [82].

Липосомы, модифицированные полиэтиленгликолем с инкапсулированным фосфатсвязывающим цитратом железа (III), представляли собой ловушки для ионов фосфата в кровотоке во внутреннем липосомальном ядре и снижали концентрацию свободных ионов фосфата в растворе и в сыворотке [83] (табл. 1).

### ФЕРМЕНТАТИВНЫЕ НАНОУСТРОЙСТВА ДЛЯ ДЕТОКСИКАЦИИ

Подробное описание наночастиц с инкапсулированными ферментами представлено в недавно опу-

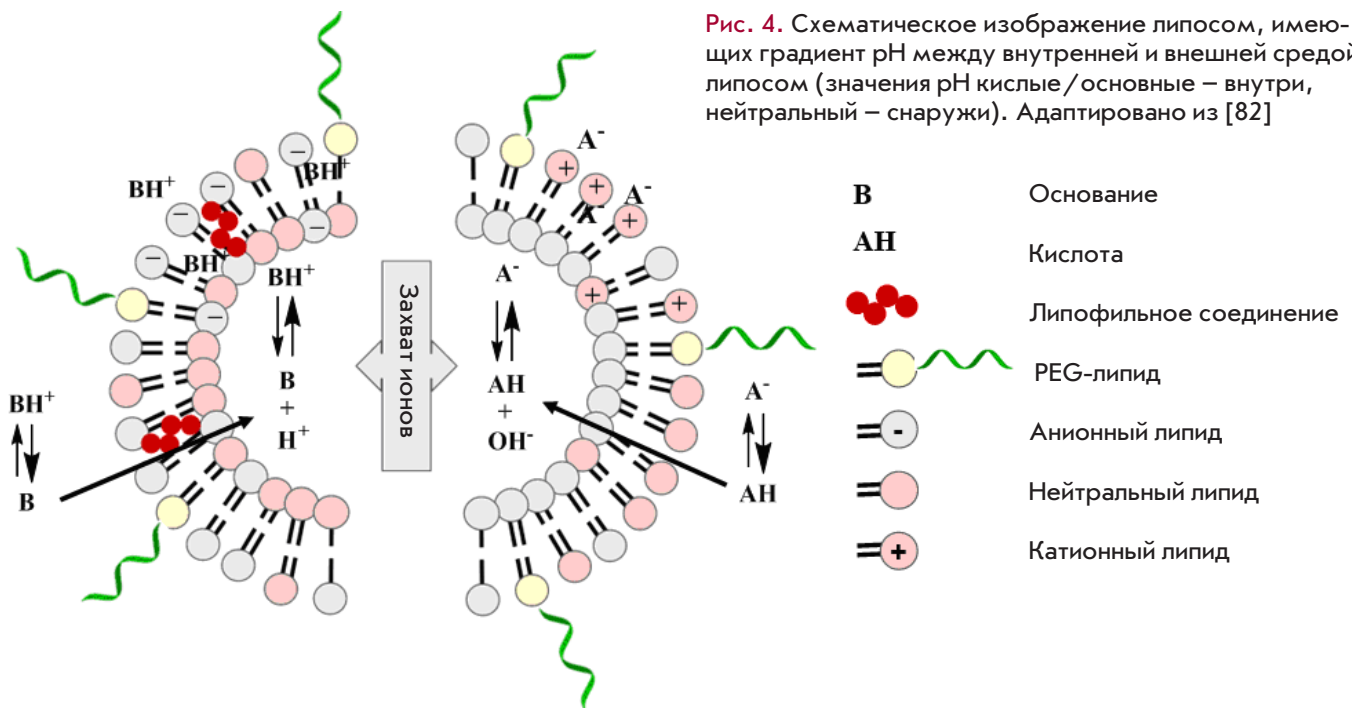


Рис. 4. Схематическое изображение липосом, имеющих градиент pH между внутренней и внешней средой липосом (значения pH кислые/основные – внутри, нейтральный – снаружи). Адаптировано из [82]

бликованном нами обзоре, где рассмотрены типы и материал наночастиц, результаты клинических исследований и т.д. [85]. Поэтому в этой части обзора сосредоточимся на системах – ферментативных наноустройствах для нейтрализации токсинов. Инкапсулирование ферментов в наноносители открывает возможность для создания наноустройств – нанореакторов, содержащих молекулы, осуществляющие аномальную диффузию и кинетические законы. Такие системы способны осуществлять одиночные и/или каскадные реакции, биосинтез, деградацию токсичных молекул [86]. Нанобиотехнология ферментных нанореакторов – это новая, активно развивающаяся область исследований. Например, недавно была исследована возможность перитонеального диализа с липосомами, содержащими ферменты (алкогольоксидазу и каталазу). Удаление этанола дополнительно ускорялось добавлением  $H_2O_2$ , который быстро разлагался до  $O_2$  с помощью каталазы. В модели интоксикации грызунов этанолом ферментные липосомы усиливали метаболизм этанола, о чем свидетельствовала повышенная продукция основного метаболита этанола – ацетальдегида [84].

Работы нашей группы сосредоточены, в частности, на проектировании и разработке инъекционных терапевтических ферментных нанореакторов для нейтрализации таких токсинов, как фосфорорганические соединения (ФОС) [87]. Известно, что ферменты, способные нейтрализовать ФОС, могут быть использованы в качестве стехиометрических, псевдокаталитических или каталитических

«биоловущек» [88, 89]. Такие ферменты, как фосфотриэстеразы и холинэстеразы, могут быть активными компонентами терапевтических наноустройств. Инкапсулирование ферментов в наноносители предназначено, в первую очередь, для преодоления быстрого клиренса и иммунного ответа после инъекции гетерологичных терапевтических ферментов. Во-вторых, инкапсулирование фермента обеспечивает высокую концентрацию каталитического фермента в стабильных наноконтейнерах. Определение концентрации инкапсулированного фермента внутри наноносителей является важным этапом при конструировании эффективного нанореактора *in vivo*. В условиях инъекционного нанореактора токсикант, присутствующий в кровотоке, диффундирует через мембрану нанореактора, где далее в его герметичном отсеке проходит ферментативная реакция детоксикации [90]. Концентрация фермента (E) внутри наноносителя может быть как низкой, так и значительно превышать концентрацию токсиканта (T). Реакция внутри нанореактора протекает в условиях либо первого ((E) << (T)), либо второго порядка, когда (E) ≈ (T). Возможны случаи, когда происходит лишь частичная инкапсуляция фермента, и на внешней поверхности нанореакторов образуется ферментная «корона», что может осложнить процесс и привести к нежелательному быстрому клиренсу и возможным неблагоприятным иммунным ответам на гетерологичные ферменты. Таким образом, проницаемость мембраны нанореактора для субстратов и продуктов реакции, возможные осмотические эффекты, эффекты вязкости

Таблица 1. Типы наноустройств для детоксикации, тип материала и библиотека ферментов / лекарственных веществ

Наноустройство	Материал	Нейтрализация	<i>In vivo</i> модель	Ссылка
ЛЭ	Липоамин	Карго-альдегиды	-	[34]
	Интралипид	Пропранолол	Белые кролики	[36]
	Интралипид	Кокаин	Клинические	[37]
	Интралипид	Кокаин	Собака	[38]
	Интралипид	Дилтиазем	Клинические	[39]
	Интралипид	Бупренорфин, фентанил, буторфанол	-	[40]
	Интралипид	Бупивакаин	Свиньи	[41]
	Интралипид	Ивермектин	<i>Pogona vitticeps</i>	[42]
	Интралипид	Ропивакаин	Свиньи	[44]
	Интралипид	Севофлуран, изофлуран	Крысы	[45]
Нанокапсулы	Полисилоксан, октадецилтриметоксисилан, этилбутират, лецитин, Tween-80	Хинолин	-	[52]
	Акриламид, N-(3-аминопропил)-метакриламид, N,N'-метиленбисакриламид, ферменты (алкооксидаза, каталаза, альдегид-дегидрогеназа)	Этанол	Мыши C57BL/6	[53]
Наногубки	Мембрана эритроцитов, PLGA	Бактериальные токсины ( $\alpha$ -гемолизин, листериолизин O, стрептолизин O)	-	[57]
	Мембрана эритроцитов, PLGA	Бактериальные токсины	Мыши CD-1	[58]
	Мембрана эритроцитов, PLGA	Дихлофос	Мыши CD-1	[59]
	Мембрана эритроцитов, PLGA	Аутоиммунные антитела	Мыши CD-1	[60]
	Мембрана нейтрофилов, PGLA	Воспалительные цитокины	Мыши ICR	[61]
	Бактериальная мембрана, PLGA	Бактерии	Мыши C57BL/6	[62]
	Мембрана легочных эпителиальных клеток/ мембрана макрофагов, PLGA	SARS-CoV-2	Мыши C57BL/6NHsd	[63]
	Мембрана клеток Neuro-2a, PLGA	Тетродотоксин	Мыши ICR	[64]
	Мембрана эритроцитов, оливковое масло	ФОС (параоксон, диизо-пропил флуорофосфат, дихлофос)	Мыши ICR	[65]
Эритролипосома	Мембрана эритроцитов, PLGA, Pluronic F127	Порообразующие токсины	Мыши ICR	[66]
	Мембрана тромбоцитов, PLGA	<i>S. aureus</i>	Мыши CD-1	[67]
Микромоторы Янус	Мембрана эритроцитов, холестерин, фосфатидилхолин, mPEG-DSPE	Порообразующие токсины	Мыши ICR	[68]
	Мембрана эритроцитов, Mg, Au, хитозан	$\alpha$ -токсин	-	[69]
Гибридные биомембранные нанороботы	Мембрана эритроцитов, Au, лимонная кислота	Мелиттин	-	[70]
	Мембрана эритроцитов, Au	Порообразующие токсины	-	[71]
Микророботы Янус	Мембрана эритроцитов и тромбоцитов, Au	Порообразующие токсины	-	[72]
	Мембрана дрожжевых клеток, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , 2-метилимидазол	Микотоксины	-	[73]
Липосомы	Мембрана эритроцитов, Fe <sub>3</sub> O <sub>4</sub> , 2-метилимидазол	Микотоксины	-	[73]
	Лецитин, холестерин, дезоксихолат натрия	Связанные с белками уремические токсины	Крысы Sprague Dawley	[76]
	Лецитин, холестерин, Tween-80, линолевая кислота	Связанные с белками уремические токсины	-	[77]
LSPD	Лецитин, холестерин, линолевая кислота, полиэтиленимин, Tween-80	Связанные с белками уремические токсины	-	[78]
	DPFC, холестерин, mPEG-DSPE, лимонная кислота	Аммиак	Минипиг Göttingen	[79]
	DPPC, холестерин, DSPE-mPEG	Аммиак	Крысы Sprague Dawley	[80]
	DPPC, холестерин, DSPE-mPEG	Амитриптилин	Крысы Sprague Dawley	[81]
	DOPG, холестерин	Амитриптилин	Крысы Sprague Dawley	[82]
	Фосфатидилхолин, холестерин, DSPE-mPEG, цитрат железа	Ионы фосфата	-	[83]
DOPE-NHS, $\beta$ -октилглюкозид, ферменты (алко-гольоксидаза, каталаза)	Этанол	Крысы Sprague Dawley	[84]	

и краудинга, образование ферментативной короны являются важными, еще не до конца решенными технологическими проблемами [90].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В настоящее время наблюдается рост числа публикаций, посвященных созданию альтернативных, эффективных, многофункциональных, биомедицинских систем, таких, как роботизированные наноустройства для детоксикации. Обзор опубликованных данных показывает, что для доказательства выдвинутой концепции нанодетоксикации необходимы, прежде всего, междисциплинарный подход и объединение знаний в области создания и технологии наносистем, биохимии, биотехнологии, микро- и оптоэлектроники и т.д. Тем не менее, одним из возможных направлений в терапии острых отравлений является создание наномедицинских препаратов без наполнителей, состоящих из материалов и веществ, одобренных к клиническому применению. Кроме того, использование наноустройств открывает

новые возможности для детоксикации при бактериальных и вирусных инфекциях.

Однако необходимо преодолеть еще долгий путь для создания высокочувствительных, легкоуправляемых и безопасных наноустройств и решить такие проблемы, как движение в узких и труднодоступных местах, например, капилляры кровеносных сосудов, выполнять сложные функции, быть гибкими и экономически эффективными. ●

*Работа Т.Н. Пашировой, З.М. Шайхутдиновой и В.Ф. Миронова выполнена за счет государственного задания ФИЦ КазНЦ РАН.*

*Работа П. Массона (Ферментативные устройства для детоксикации) выполнена за счет средств субсидии, выделенной в рамках государственной поддержки Казанского (Приволжского) федерального университета в целях повышения его конкурентоспособности среди ведущих мировых научно-образовательных центров.*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Zhang C., Yan L., Wang X., Zhu S., Chen C., Gu Z., Zhao Y. // *Nano Today*. 2020. V. 35. P. 101008.
- Shan X., Gong X., Li J., Wen J., Li Y., Zhang Z. // *Acta Pharm. Sin. B*. 2022. V. 12. № 7. P. 3028–3048.
- Moosavian S.A., Bianconi V., Pirro M., Sahebkar A. // *Semin. Cancer Biol.* 2021. V. 69. P. 337–348.
- Halwani A.A. // *Pharmaceutics*. 2022. V. 14. № 1. P. 106.
- Wilhelm S., Tavares A.J., Dai Q., Ohta S., Audet J., Dvorak H.F., Chan W.C.W. // *Nat. Rev. Mater.* 2016. V. 1. № 5. P. 16014.
- Chen Z., Wang Z., Gu Z. // *Acc. Chem. Res.* 2019. V. 52. № 5. P. 1255–1264.
- Wicki A., Witzigmann D., Balasubramanian V., Huwyler J. // *J. Control. Release*. 2015. V. 200. P. 138–157.
- Sun Z., Hou Y. // *Adv. Ther.* 2022. V. 5. № 7. P. 2100228.
- Li J., Esteban-Fernández de Ávila B., Gao W., Zhang L., Wang J. // *Sci. Robot.* 2017. V. 2. № 4. P. eaam6431.
- Gao W., Wang J. // *Nanoscale*. 2014. V. 6. № 18. P. 10486–10494.
- Li T., Li J., Zhang H., Chang X., Song W., Hu Y., Shao G., Sandraz E., Zhang G., Li L., et al. // *Small*. 2016. V. 12. № 44. P. 6098–6105.
- Wang H., Pumera M. // *Adv. Funct. Mater.* 2018. V. 28. № 25. P. 1705421.
- Wong F., Dey K.K., Sen A. // *Annu. Rev. Mater. Res.* 2016. V. 46. № 1. P. 407–432.
- Li J., Rozen I., Wang J. // *ACS Nano*. 2016. V. 10. № 6. P. 5619–5634.
- Halder A., Sun Y. // *Biosens. Bioelectron.* 2019. V. 139. P. 111334.
- Pedrero M., Gamella M., Serafín V. The Detection of Biomarkers. Past, Present and the Future Prospects. Chapter 19 – Nanomachines and nanorobotics: improving cancer diagnosis and therapy. Academic Press, 2022. P. 503–543.
- Agrahari V., Agrahari V., Chou M.-L., Chew C.H., Noll J., Burnouf T. // *Biomaterials*. 2020. V. 260. P. 120163.
- Shivalkar S., Chowdhary P., Afshan T., Chaudhary S., Roy A., Samanta S.K., Sahoo A.K. // *Colloids Surfaces B Biointerfaces*. 2023. V. 222. P. 113054.
- Sitti M. // *Nat. Rev. Mater.* 2018. V. 3. № 6. P. 74–75.
- Jimenez-Falcao S., Joga N., García-Fernández A., Llopis Lorente A., Torres D., de Luis B., Sancenón F., Martínez-Ruiz P., Martínez-Mañez R., Villalonga R. // *J. Mater. Chem. B*. 2019. V. 7. № 30. P. 4669–4676.
- Zhao X., Gentile K., Mohajerani F., Sen A. // *Acc. Chem. Res.* 2018. V. 51. № 10. P. 2373–2381.
- Arqué X., Patiño T., Sánchez S. // *Chem. Sci.* 2022. V. 13. № 32. P. 9128–9146.
- Wu H., Greydanus B., Schwartz D.K. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2021. V. 118. № 27. P. e2101807118.
- Cai L., Xu D., Chen H., Wang L., Zhao Y. // *Eng. Regen.* 2021. V. 2. P. 109–115.
- Magdanz V., Khalil I.S.M., Simmchen J., Furtado G.P., Mohanty S., Gebauer J., Xu H., Klingner A., Aziz A., Medina-Sánchez M., et al. // *Sci. Adv.* 2020. V. 6. № 28. P. aba5855.
- Xu W., Qin H., Tian H., Liu L., Gao J., Peng F., Tu Y. // *Appl. Mater. Today*. 2022. V. 27. P. 101482.
- Li D., Liu C., Yang Y., Wang L., Shen Y. // *Light Sci. Appl.* 2020. V. 9. № 1. P. 84.
- Abdelmohsen L.K.E.A., Nijemeisland M., Pawar G.M., Janssen G.J.A., Nolte R.J.M., van Hest J.C.M., Wilson D.A. // *ACS Nano*. 2016. V. 10. № 2. P. 2652–2660.
- Luo M., Li S., Wan J., Yang C., Chen B., Guan J. // *Langmuir*. 2020. V. 36. № 25. P. 7005–7013.
- Yang J., Su T., Zou H., Yang G., Ding J., Chen X. // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2022. V. 61. № 47. P. e202211136.
- Feng Y., Liao Z., Zhang H., Xie X., You F., Liao X., Wu C., Zhang W., Yang H., Liu Y. // *Chem. Eng. J.* 2023. V. 452. P. 139506.
- Ouyang Y., Fadeev M., Zhang P., Carmieli R., Li J., Sohn Y.S., Karmi O., Nechushtai R., Pikarsky E., Fan C., et al. // *ACS Nano*. 2022. V. 16. № 11. P. 18232–18243.
- Li Z., Li M., Sun H., Yang Z., Huo Q., Bai Y., Mei Y., Li Y., Quan P., Zhang J., et al. // *J. Control. Release*. 2022. V. 346. P. 148–157.
- Liu F., Anton N., Niko Y., Klymchenko A.S. // *ACS Appl.*

- Bio Mater. 2023. V. 6. № 1. P. 246–256.
35. Fettiplace M.R., Weinberg G. // *Reg. Anesth. Pain Med.* 2018. V. 43. № 2. P. 138–149.
36. Harvey M.G., Cave G.R. // *J. Med. Toxicol.* 2008. V. 4. № 2. P. 71–76.
37. Jakkala-Saibaba R., Morgan P.G., Morton G.L. // *Anaesthesia.* 2011. V. 66. № 12. P. 1168–1170.
38. Royle K., Bandt C. // *Can. Vet. J.* 2020. V. 61. № 1. P. 49–52.
39. Montiel V., Gougnard T., Hantson P. // *Eur. J. Emerg. Med.* 2011. V. 18. № 2. P. 121–123.
40. Tikhomirov M., Jajor P., Śniegocki T., Poźniak B. // *Sci. Rep.* 2022. V. 12. № 1. P. 18683.
41. De Diego C., Zaballos M., Quintela O., Sevilla R., Callejo D., González-Panizo J., Anadón M.J., Almendral J. // *Cardiovasc. Toxicol.* 2019. V. 19. № 5. P. 432–440.
42. DeMel D., Gleeson M., Schachterle K., Thomer A. // *J. Vet. Emerg. Crit. Care.* 2022. V. 32. № 5. P. 680–684.
43. Sohn J.-T. // *Am. J. Emerg. Med.* 2022. V. 58. P. 331–332.
44. Zaballos M., Fernández I., Rodríguez L., García S., Varela O., Quintela O., Anadón M.-J., Almendral J. // *Clin. Toxicol.* 2022. V. 60. № 8. P. 902–911.
45. Hori K., Matsuura T., Tsujikawa S., Hino H., Kuno M., Oda Y., Nishikawa K., Mori T. // *Clin. Toxicol.* 2022. V. 60. № 6. P. 716–724.
46. Matsuoka M., Imai T., Iwabuchi S., Kinoshita K. // *J. Emerg. Med.* 2023. V. 64. № 1. P. 62–66.
47. Cobey F.C., Kawabori M., Schumann R., Couper G., Bonney I., Fettiplace M.R., Weinberg G. // *J. Cardiothorac. Vasc. Anesth.* 2021. V. 35. № 10. P. 3139–3141.
48. Pannu A.K., Garg S., Bhalla A., Dhibar D.P., Sharma N. // *Clin. Toxicol.* 2022. V. 60. № 5. P. 602–608.
49. Liu Y., Zhang J., Yu P., Niu J., Yu S. // *Front. Med.* 2021. V. 8. P. 756866.
50. Sohn J.-T. // *J. Emerg. Med.* 2021. V. 60. № 5. P. e137–e138.
51. Mégarbane B., Oberlin M., Alvarez J.-C., Balen F., Beaune S., Bédry R., Chauvin A., Claudet I., Danel V., Debatty G., et al. // *Ann. Intensive Care.* 2020. V. 10. № 1. P. 157.
52. Jovanovic A.V., Underhill R.S., Bucholz T.L., Duran R.S. // *Chem. Mater.* 2005. V. 17. № 13. P. 3375–3383.
53. Xu D., Han H., He Y., Lee H., Wu D., Liu F., Liu X., Liu Y., Lu Y., Ji C. // *Adv. Mater.* 2018. V. 30. № 22. P. 1707443.
54. Shanuja J., Singh K., Sai Nandhini R., Palanivelu J. // *Nanotechnol. Life Sci.* 2021. P. 87–104.
55. Hu C.-M.J., Fang R.H., Copp J., Luk B.T., Zhang L. // *Nat. Nanotechnol.* 2013. V. 8. № 5. P. 336–340.
56. Wang S., Wang D., Duan Y., Zhou Z., Gao W., Zhang L. // *Adv. Mater.* 2022. V. 34. № 13. P. 2107719.
57. Chen Y., Chen M., Zhang Y., Lee J.H., Escajadillo T., Gong H., Fang R.H., Gao W., Nizet V., Zhang L. // *Adv. Health. Mater.* 2018. V. 7. № 13. P. 1701366.
58. Chen Y., Zhang Y., Chen M., Zhuang J., Fang R.H., Gao W., Zhang L. // *Small.* 2019. V. 15. № 6. P. 1804994.
59. Pang Z., Hu C.M.J., Fang R.H., Luk B.T., Gao W., Wang F., Chuluun E., Angsantikul P., Thamphiwatana S., Lu W., et al. // *ACS Nano.* 2015. V. 9. № 6. P. 6450–6458.
60. Copp J.A., Fang R.H., Luk B.T., Hu C.-M.J., Gao W., Zhang K., Zhang L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2014. V. 111. № 37. P. 13481–13486.
61. Zhang Q., Dehaini D., Zhang Y., Zhou J., Chen X., Zhang L., Fang R.H., Gao W., Zhang L. // *Nat. Nanotechnol.* 2018. V. 13. № 12. P. 1182–1190.
62. Zhang Y., Chen Y., Lo C., Zhuang J., Angsantikul P., Zhang Q., Wei X., Zhou Z., Obonyo M., Fang R.H., et al. // *Angew. Chemie Int. Ed.* 2019. V. 58. № 33. P. 11404–11408.
63. Zhang Q., Honko A., Zhou J., Gong H., Downs S.N., Vasquez J.H., Fang R.H., Gao W., Griffiths A., Zhang L. // *Nano Lett.* 2020. V. 20. № 7. P. 5570–5574.
64. Wang D., Ai X., Duan Y., Xian N., Fang R.H., Gao W., Zhang L. // *ACS Nano.* 2022. V. 16. № 11. P. 19145–19154.
65. Chen Y., Zhang Y., Zhuang J., Lee J.H., Wang L., Fang R.H., Gao W., Zhang L. // *ACS Nano.* 2019. V. 13. № 6. P. 7209–7215.
66. Zou S., He Q., Wang Q., Wang B., Liu G., Zhang F., Cheng X., Wang B., Zhang L. // *Int. J. Nanomed.* 2021. V. 16. P. 4239–4250.
67. Kim J.-K., Uchiyama S., Gong H., Stream A., Zhang L., Nizet V. // *Engineering.* 2021. V. 7. № 8. P. 1149–1156.
68. Liu C., Ruan S., He Y., Li X., Zhu Y., Wang H., Huang H., Pang Z. // *Acta Pharm. Sin. B.* 2022. V. 12. № 11. P. 4235–4248.
69. Wu Z., Li J., de Ávila B.E.-F., Li T., Gao W., He Q., Zhang L., Wang J. // *Adv. Funct. Mater.* 2015. V. 25. № 48. P. 7497–7501.
70. Wu Z., Li T., Gao W., Xu T., Jurado-Sánchez B., Li J., Gao W., He Q., Zhang L., Wang J. // *Adv. Funct. Mater.* 2015. V. 25. № 25. P. 3881–3887.
71. Esteban-Fernández de Ávila B., Angsantikul P., Ramírez-Herrera D.E., Soto F., Teymourian H., Dehaini D., Chen Y., Zhang L., Wang J. // *Sci. Robot.* 2018. V. 3. № 18. P. eaba6137.
72. Refaai M.R.A., Manjunatha M.N., Radjarejesri S., Ramesh B., Subbiah R., Adugna N. // *Adv. Mater. Sci. Eng.* 2022. V. 2022. P. 1–12.
73. Lu D., Tang S., Li Y., Cong Z., Zhang X., Wu S. // *Micromachines.* 2021. V. 12. № 7. P. 797.
74. Hart K., Harvey M., Tang M., Wu Z., Cave G. // *Pharmaceutics.* 2021. V. 13. № 3. P. 395.
75. Wratten M., Lou, Sereni L., Tetta C. // *Artif. Organs.* 2000. V. 24. № 9. P. 685–690.
76. Shi Y., Wang Y., Ma S., Liu T., Tian H., Zhu Q., Wang W., Li Y., Ding F. // *Artif. Organs.* 2019. V. 43. № 5. P. 490–503.
77. Shen Y., Shen Y., Bi X., Li J., Chen Y., Zhu Q., Wang Y., Ding F. // *Int. J. Artif. Organs.* 2021. V. 44. № 6. P. 393–403.
78. Shen Y., Shen Y., Li J., Ding F., Wang Y. // *J. Biomed. Mater. Res. Part A.* 2022. V. 110. № 4. P. 976–983.
79. Matoori S., Forster V., Agostoni V., Bettschart-Wolfensberger R., Bektas R.N., Thöny B., Häberle J., Leroux J.-C., Kabbaj M. // *J. Control. Release.* 2020. V. 328. P. 503–513.
80. Forster V., Signorell R.D., Roveri M., Leroux J.-C. // *Sci. Transl. Med.* 2014. V. 6. № 258. P. 258ra141. doi: 10.1126/scitranslmed.3009135.
81. Chapman R., Harvey M., Davies P., Wu Z., Cave G. // *J. Liposome Res.* 2019. V. 29. № 2. P. 114–120.
82. Cave G., Kee R., Harvey M., Wu Z. // *Int. J. Mol. Sci.* 2022. V. 23. № 19. P. 11577.
83. Tzror-Azankot C., Anaki A., Sadan T., Motiei M., Popovtzer R. // *Materials (Basel).* 2022. V. 15. № 21. P. 7779.
84. Pratsinis A., Zuercher S., Forster V., Fischer E.J., Luciani P., Leroux J.-C. // *Biomaterials.* 2017. V. 145. P. 128–137.
85. Pashirova T.N., Bogdanov A., Masson P. // *Chem. Biol. Interact.* 2021. V. 346. P. 109577.
86. Chauhan K., Zárate Romero A., Sengar P., Medrano C., Vazquez-Duhalt R. // *ChemCatChem.* 2021. V. 13. № 17. P. 3732–3748.
87. Pashirova T., Shaihtudinova Z., Mansurova M., Kazakova R., Shambazova D., Bogdanov A., Tatarinov D., Daudé D., Jacquet P., Chabrière E., et al. // *ACS Appl. Mater. Interfaces.* 2022. V. 14. № 17. P. 19241–19252.
88. Masson P., Rochu D. // *Acta Naturae.* 2009. V. 1. № 1. P. 68–79.
89. Masson P., Lushchekina S.V. // *Chem. Biol. Interact.* 2016. V. 259. P. 319–326.
90. Shajhutdinova Z., Pashirova T., Masson P. // *Biomedicines.* 2022. V. 10. № 4. P. 784.

УДК 577.151.45

# Профилирование В-лимфоцитов пациентов с аутоиммунной пузырчаткой

В. А. Абрикосова<sup>1</sup>, Ю. А. Мокрушина<sup>1,2</sup>, Л. А. Овчинникова<sup>1</sup>, Е. Н. Ларина<sup>1</sup>, С. С. Терехов<sup>1</sup>, М. Н. Баранова<sup>1</sup>, Я. А. Ломакин<sup>1</sup>, Д. С. Балабашин<sup>1</sup>, Т. В. Бобик<sup>1</sup>, Е. Н. Калиберда<sup>1</sup>, В. Д. Кнорре<sup>1</sup>, М. В. Шпилева<sup>3</sup>, Т. К. Алиев<sup>1,2</sup>, Д. Г. Дерябин<sup>3</sup>, А. Э. Карамова<sup>3</sup>, А. А. Кубанов<sup>3</sup>, М. П. Кирпичников<sup>1,4</sup>, И. В. Смирнов<sup>1,5\*</sup>

<sup>1</sup>Институт биоорганической химии им. академиков М.М. Шемякина и Ю.А. Овчинникова Российской академии наук, Москва, 117997 Россия

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

<sup>3</sup>Государственный научный центр дерматовенерологии и косметологии Минздрава России, Москва, 107076 Россия

<sup>4</sup>Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, биологический факультет, Москва, 119234 Россия

<sup>5</sup>Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии Минздрава России, Москва, 117292 Россия

\*E-mail: smirnov.mx.ibch@gmail.com

Поступила в редакцию 20.12.2022

Принята к печати 10.03.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11890

**РЕФЕРАТ** Аутоиммунная пузырчатка – тяжелое социально значимое заболевание, обусловленное появлением антител к десмоглеину 3-го типа. Пузырчатка встречается преимущественно у пациентов старше 18 лет, а летальность при этом заболевании может достигать 50% в зависимости от возраста пациента и ряда других факторов. На сегодняшний день отсутствует высокоселективная или персонализированная терапия пузырчатки. Одним из известных средств терапии пузырчатки является ритуксимаб – анти-CD20-антитело, которое приводит к истощению В-лимфоцитов в периферической крови. Для селективной элиминации В-лимфоцитов у пациентов с пузырчаткой целесообразно использовать специфические иммунолиганды, выбор которых основан на определении уровня аутоантител к различным фрагментам десмоглеина. В представленной работе установлено, что доля аутореактивных В-клеток у пациентов с диагностированной пузырчаткой составляет 0.09–0.16%, обнаружена положительная корреляция между уровнем антител к различным фрагментам десмоглеина и количеством аутореактивных В-клеток.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** десмоглеин, пузырчатка, таргетная терапия, иммунолиганды.

## ВВЕДЕНИЕ

Вульгарная пузырчатка – наиболее распространенная форма буллезных дерматозов, при которой на видимо неизменной коже и/или слизистых оболочках возникают пузыри с серозным содержимым и тонкой вялой покрывкой, которые после вскрытия образуют длительно незаживающие болезненные эрозии.

По данным официального государственного статистического наблюдения ежегодно в Российской Федерации выявляют 1.9–2.4 новых случая пузырчатки на 100000 взрослого населения (18 лет и старше), а распространенность этого заболева-

ния варьирует от 4.8 до 6.3 случая на 100000 населения [1].

Ключевую патогенетическую роль в развитии пузырчатки играют аутоантитела класса IgG, направленные против основного структурного белка десмосом многослойного плоского эпителия – десмоглеина 3 типа (Dsg3) [2]. В результате взаимодействия аутоантител с внеклеточными доменами десмоглеина происходит разрушение десмосом с последующим развитием акантолиза (дегенеративного изменения шиповатого слоя эпидермиса, проявляющегося разрушением межклеточных мостиков и приводящего к образованию интраэпидермальных пузырей) [3].

Основной метод терапии пузырчатки в настоящее время состоит в длительном применении системных кортикостероидов в виде монотерапии или в комбинации с другими иммуносупрессивными препаратами, что вызывает ряд серьезных нежелательных эффектов и неэффективно при резистентных к системной терапии глюкокортикостероидами (ГКС) формах заболевания [4].

С целью снижения курсовых доз ГКС разрабатываются препараты моноклональных антител, позволяющие проводить таргетную терапию пузырчатки и других аутоиммунных заболеваний, воздействуя на клетки-продуценты аутоантител (В-лимфоциты). Первый и пока единственный подобный препарат, рекомендованный к применению в клинической практике при пузырчатке – ритуксимаб, действующим началом которого являются химерные моноклональные антитела к CD20-антигену В-лимфоцитов [5]. Однако серьезную проблему при использовании ритуксимаба представляет системное подавление как патологических (аутореактивных), так и нормальных В-лимфоцитов, что ведет к формированию системного иммунодефицита, связанного с недостатком циркулирующих иммуноглобулинов. Описан ряд случаев использования специфических иммуноактивных агентов для направленной элиминации патологических лимфоцитов [6, 7]. Специфичность терапии определяется эффективностью взаимодействия иммуноактивного препарата с целевой популяцией аутореактивных В-клеток. Существуют данные о различиях в уровне специфических антител к разным доменам десмоглеина у пациентов с диагностированной пузырчаткой [8, 9]. Этот факт может быть использован для увеличения специфичности иммунотерапии при адресной доставке иммуноактивных агентов, имеющих в своем составе заданный вариант фрагмента десмоглеина. В качестве одного из вариантов терапии предложен метод иммуносорбции, основанный на элиминации из крови больных пузырчаткой аутореактивных антител с помощью высоко-селективных иммуносорбентов [10]. Таким образом, возникает необходимость в определении корреляции уровня антител и количества аутореактивных В-клеток к фрагментам десмоглеина и определении профиля специфичности аутореактивных В-клеток у пациентов с пузырчаткой.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Рекомбинантный полноразмерный внеклеточный фрагмент Dsg3 (EC1-EC5) человека и одиночные домены EC1, EC2, EC3-EC4, слитые с Fc-фрагментом IgG1 человека, были получены в системе экспрессии клеток линии CHO с использованием генетических

конструкций на основе вектора pcDNA3.4 (Thermo Scientific, США). Рекомбинантные белки очищали из культуральной среды на колонке MabSelect SuRe (GE Healthcare, США). Чистоту белков подтверждали методами эксклюзионной хроматографии и электрофореза.

Суммарный уровень антител к Dsg3 в сыворотках пациентов был охарактеризован с использованием тест-системы «Набор реагентов для определения антител IgG к десмоглеину 3» (оригинальное название – Anti-Desmoglein 3 ELISA IgG; Euroimmun; Германия) и выражен в относительных единицах активности (RU/мл) по значениям оптического поглощения референсной сыворотки из комплектации набора. Полученные рекомбинантные белки использовали для оценки иммунореактивности сывороток больных обычной пузырчаткой двухэтапным конкурентным иммуноферментным анализом (ИФА) [11]. Dsg3, а также его фрагменты EC1, EC2, EC3-EC4, слитые с Fc-фрагментом IgG1 человека, в концентрации 1 мкг/мл, а также бычий сывороточный альбумин (БСА) в той же концентрации для контроля неспецифического связывания сорбировали в лунках полистиролового планшета (Greiner Bio-One GmbH, Германия) в течение ночи при +4°C. После удаления сорбционных объемов лунки отмывали 1 раз фосфатно-солевым буфером (PBS) и блокировали 0.1% раствором казеина. После блокировки лунки однократно отмывали фосфатно-солевым буфером, содержащим 0.005% Tween-20 (PBST). Исследуемые сыворотки крови разводили в соотношении 1 : 100 в PBS, содержащем 1% БСА и инкубировали в течение 18 ч в термостатируемом шейкере при +24°C и скорости 200 об/мин. После завершения инкубации образцы исследуемых сывороток в полном объеме переносили в лунки планшета из комплекта референсной тест-системы для повторной оценки непрореагировавших антител в отношении полноразмерного Dsg3. В дополнительные лунки вносили калибровочные образцы с активностями 20 и 200 RU/мл и инкубировали в том же режиме как описано выше (18 ч, +24°C, 200 об/мин). После инкубации планшет промывали 3 раза раствором PBST и вносили антитела к каппа и лямбда легким цепям антител человека, конъюгированных с пероксидазой хрена. В планшет из комплекта референсной тест-системы вносили входящий в набор конъюгат кроличьих антител к полноразмерному IgG человека. После 60 мин инкубации (+24°C, 200 об/мин) лунки планшета промывали 3 раза, добавляли субстратный раствор (тетраметилбензидин, ТМБ) и инкубировали в темноте в течение 30 мин. Реакцию останавливали, добавляя 4 н раствор фосфорной кислоты, оптическое поглощение (ОП) в лунках

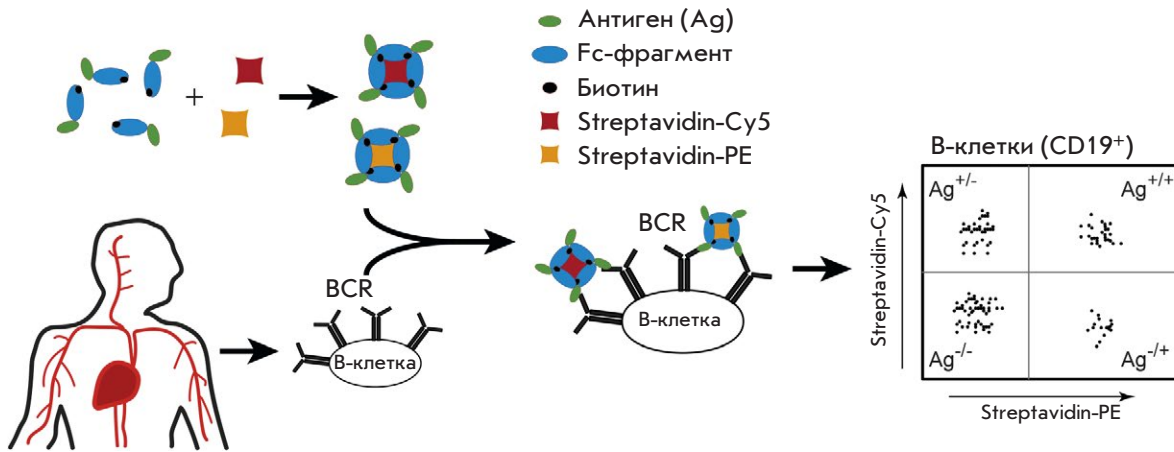


Рис. 1. Схема анализа профиля антигенспецифичности В-клеток с использованием метода «двойной положительной» окраски

регистрировали при длине волны 450 нм ( $OP_{450}$ ) на планшетном спектрофотометре. На основе ОП калибровочных образцов с активностями 20 и 200 RU/мл референсного планшета строили калибровочную кривую, позволяющую определить активность каждой исследуемой сыворотки в относительных единицах активности (RU/мл). Полученные результаты использовали для расчета доли (%) аутореактивных антител, специфически взаимодействующих с отдельными эпитопами молекулы Dsg3 и выявляемых при постановке конкурентного ИФА:

$$[1 - (A_{Pos} - A_R) / (A_{Pos} - A_{Neg})] \times 100,$$

где  $A_R$  – активность сыворотки после преинкубации в планшете с иммобилизированным белком-эпитопом;  $A_{Pos}$  – активность сыворотки после преинкубации с Dsg3 в референсной тест-системе;  $A_{Neg}$  – активность после преинкубации с БСА.

В данном исследовании использовали образцы венозной крови, полученные от трех пациентов с клинически и лабораторно верифицированным диагнозом "L10.0 Пузырчатка обыкновенная". Все пациенты дали письменное информированное согласие на участие в исследованиях, работа проведена с соблюдением действующих правовых и этических норм.

Количество аутореактивных В-клеток оценивали методом проточной цитометрии с использованием биотинилированных рекомбинантных белков – субдоменов EC1, EC2, EC3 и EC4, слитых с константным доменом иммуноглобулина человека.

Мононуклеарные клетки периферической крови больных и здоровых доноров выделяли в градиенте плотности фиколла (Ficoll-Paque PLUS (GE Healthcare)). Клетки отмывали, подсчитывали, ресуспендировали в фосфатно-солевом буфере с добавлением агента, блокирующего Fc-рецепторы

(Human Seroblock, Bio-Rad, США), 0.5% БСА и 2 mM EDTA (2 миллиона клеток в 100 мкл раствора) и инкубировали в течение 30 мин во льду. Для формирования тетрамерного комплекса очищенные и химически биотинилированные с использованием Sulfo-NHS-LC-Biotin реагента (Thermo Fisher Scientific, США) препараты антигенов EC1-Fc, EC2-Fc, EC3-4-Fc и Dsg3-Fc смешивали со Streptavidin-PE (Invitrogen, США) и Streptavidin-Cy5 (Abcam, Великобритания) в молярном соотношении 4 : 1 и инкубировали в течение 30 мин при +4°C в темноте. Тетрамерный иммунокомплекс со Streptavidin-PE добавляли к окрашиваемым клеткам до концентрации 4 нМ, тетрамерный иммунокомплекс со Streptavidin-Cy5 – до концентрации 10 нМ, инкубировали в течение 15 мин при +4°C и постоянном помешивании. Далее к анализируемым пробам добавляли флуоресцентные антитела анти-CD45-APC-Cy7 (в разведении 1 : 300 (Sony, США)), антитела анти-CD19-PE-Cy7 (в разведении 1 : 1000 (Biolegend, США)) и флуоресцентный маркер мертвых клеток SYTOX™Green (в разведении 1 : 1000 (Biolegend, США)). Инкубировали дополнительно в течение 30 мин при +4°C в темноте. Далее образцы отмывали 0.5 мл PBS с 2 mM EDTA. Интенсивность флуоресценции оценивали с помощью проточного флуориметра ACEA Novocyte (ACEA Biosciences, США).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Количество аутореактивных к десмоглеину 3 В-клеток определяли в венозной крови пациентов с диагностированной пузырчаткой (П1–П3), в качестве контрольного образца использовали кровь здорового донора (ЗД). Из всех образцов выделяли мононуклеарные клетки для последующего окрашивания и цитометрического анализа (рис. 1).



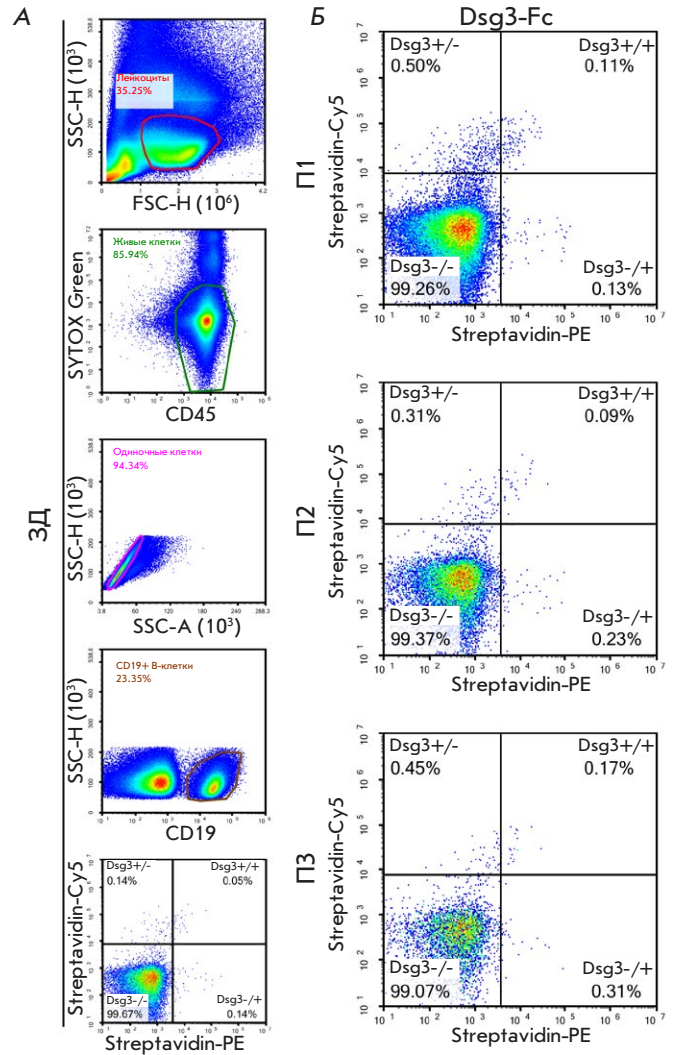
**Таблица 1.** Результаты иммуноферментного анализа сывороток пациентов с пузырчаткой с использованием полноразмерного десмоглеина и его фрагментов в качестве антигена, выраженные в RU/мл

Антиген	П1	П2	П3
Dsg3	700	20	1500
EC1	588	-	300
EC2	203	-	450
EC3-4	98	-	750

Отдельно отбирали сыворотку крови для определения уровня антител к Dsg3 и его фрагментам (табл. 1).

Как видно из представленных в табл. 1 данных, пациенты имели различный профиль антительного ответа на полноразмерный белок и домены десмоглеина 3. При этом у пациента П2 был констатирован только слабый иммунный ответ на полноразмерный Dsg3, равный диагностически значимому пороговому значению 20 RU/мл, а пациенты П1 и П3 характеризовались выраженным иммунным ответом, по-разному распространяющимся на дистальные (EC1, EC2) или проксимальные (EC3-4) внеклеточные домены этого белка.

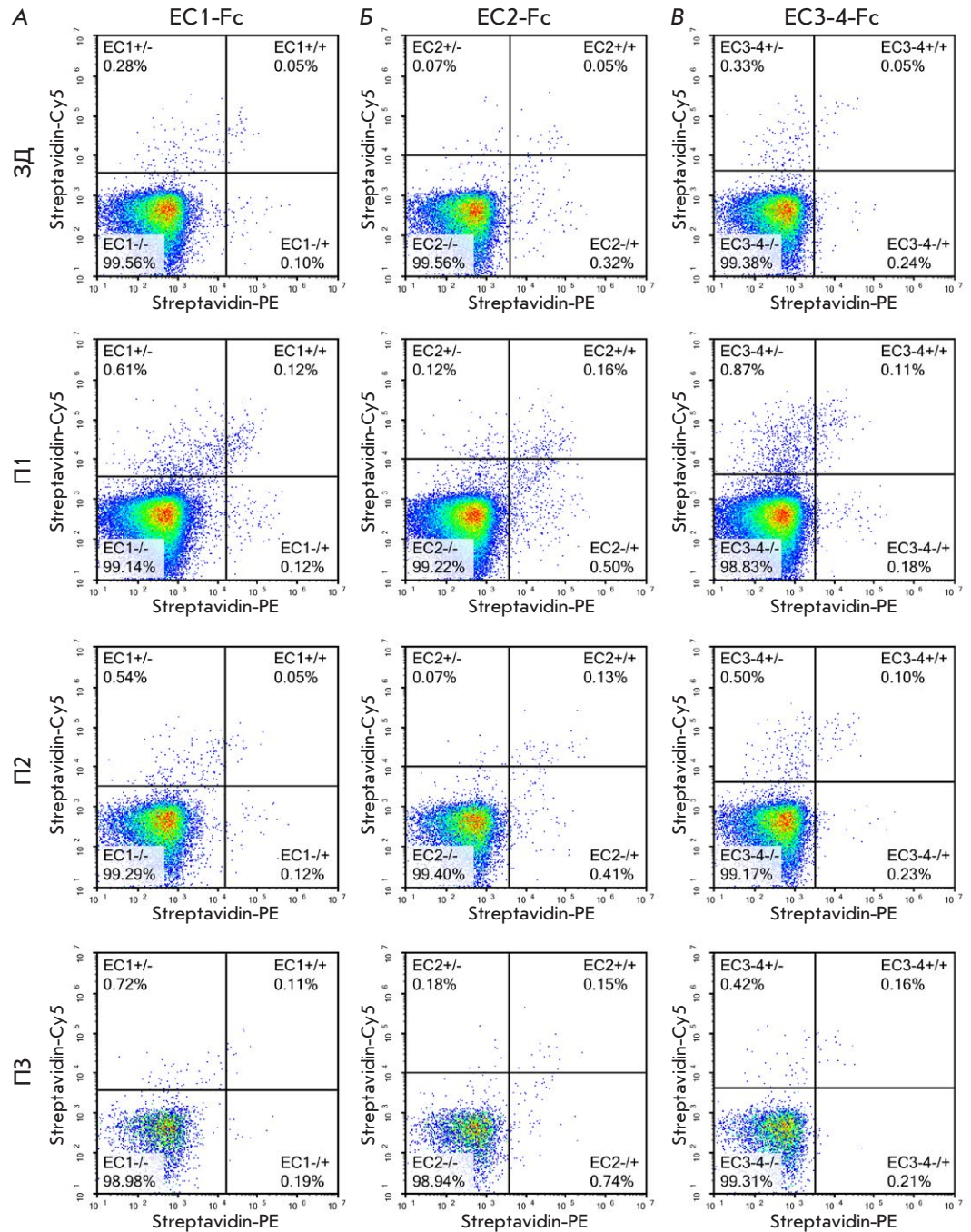
Для поиска корреляции между уровнями антител к различным вариантам десмоглеина и количеством антигенспецифических аутореактивных В-клеток проведено окрашивание фракции мононуклеаров иммуноактивными лигандами и специфическими антителами к поверхностным антигенам В-клеток – CD19. Ранее было показано, что количество антигенспецифических В-клеток находится в пределах 0.05–0.5% от всего пула В-лимфоцитов [12]. В ходе исследования применяли методику создания тетрамерной формы иммуолиганда с использованием молекулы стрептавидина, конъюгированного с флуоресцентным красителем (рис. 1). При этом одна молекула комплекса взаимодействует с несколькими молекулами В-клеточного рецептора, повышая авидность лиганда и, как следствие, увеличивая эффективность окрашивания. Другой ключевой особенностью было использование подхода «двойной положительной» окраски. В этом случае использовали два стрептавидин-антигенных комплекса, содержащих различные флуоресцентные метки: фикоэритрин (PE) и цианиновый краситель Cy5. Такой подход позволил существенно снизить степень неспецифического окрашивания В-клеток. Представленный в данной работе принцип окрашивания может применяться для эффективного вы-



**Рис. 2.** Выбор параметров (А) и цитометрический анализ В-клеток, специфичных к полноразмерному Dsg3 (Б). Параметры граничных условий для графика в координатах Streptavidin-Cy5 и Streptavidin-PE выбирали таким образом, чтобы количество положительных событий в сегменте с «двойным положительным» сигналом (+/+) составляло 0.05% в контрольном образце (здоровый донор, ЗД)

явления В-клеток к любым идентифицированным антигенам, в том числе при поиске антител к возбудителям вирусных инфекций. Финальная схема окрашивания/анализа каждого образца включала: (i) выделение области по размеру клеток; (ii) выделение области, соответствующей живым лейкоцитам, после совместного окрашивания красителем SYTOX™Green и анти-CD45-APC-Cy7; (iii) выделение области одиночных клеток; (iv) выделение области CD19<sup>+</sup> В-клеток; (v) оценку двойных положительных антигенспецифических В-клеток (рис. 2).

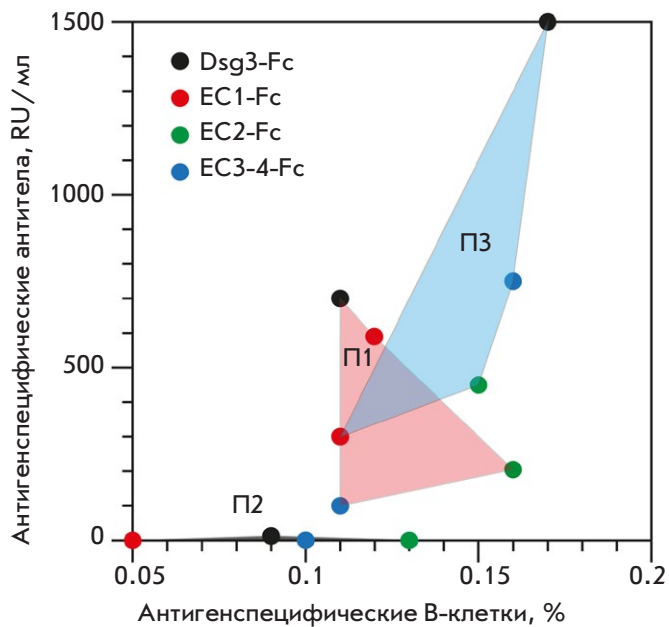
Рис. 3. Цитометрический анализ В-клеток, специфичных к субдоменам десмоглеина 3 EC1 (А), EC2 (Б) и EC3-4 (В). Параметры граничных условий для графика в координатах Streptavidin-Cy5 и Streptavidin-PE выбирали таким образом, чтобы количество положительных событий в сегменте с «двойным положительным» сигналом (+/+) составляло 0.05% в контрольном образце (здоровый донор, ЗД)



Согласно результатам, представленным на рис. 2Б, наибольшая доля В-клеток, специфичных к полноразмерному десмоглеину, обнаружена у пациента П3, наименьшая – у пациента П2, что в целом соотносится с результатами ИФА (табл. 1). Доля В-клеток, специфичных к различным доменам десмоглеина, у всех пациентов также различалась (рис. 3).

У пациента П1 выявлено наибольшее количество В-клеток, специфичных к домену EC2

(0.16%), при этом количество клеток к доменам EC1 и EC3-4 ниже – 0.12 и 0.11% соответственно. У пациента П2 отсутствовали EC1-специфичные клетки (на уровне контроля), при этом доля клеток к доменам EC2 и EC3-4 составила 0.13 и 0.10%. У пациента П3 доля В-клеток, специфичных ко всем доменам, была сравнимой с долей у пациента П1, однако наибольшей была доля В-клеток, специфичных к домену EC2 (0.15 и 0.16%).



**Рис. 4.** Анализ профиля специфичности антител и В-клеток. Образцы, проанализированные на полном-размерный десмоглеин 3 и его домены, отмечены цветом. Линиями соединены значения, относящиеся к одному и тому же пациенту

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Таким образом, анализ профиля специфичности антител и В-клеток показал в целом положительную корреляцию между титром специфических антител

в крови и долей антигенспецифических В-клеток (рис. 4).

При этом доля аутореактивных В-клеток у пациентов с пузырчаткой составила 0.09–0.16%. Также обнаружен заметный уровень неспецифического окрашивания у здорового донора (0.05%), однако использование «двойного положительного» подхода к окрашиванию клеток позволило детерминировать профиль антигенспецифичности В-клеток у пациентов с пузырчаткой. Полученные результаты важны для разработки стратегии персонализированной терапии пузырчатки цитотоксическими иммунолигандами на основе рекомбинантных доменов десмоглеина, слитых с константным доменом иммуноглобулина человека. Вероятно, что пациент П2 будет нечувствителен к терапии EC1-Fc, в то же время можно ожидать элиминацию аутореактивных В-клеток при использовании EC2-Fc и EC3-4-Fc у пациентов П1 и П3 соответственно. Применение профилирования В-лимфоцитов у пациентов с аутоиммунными заболеваниями, в частности обыкновенной пузырчаткой, открывает широкие перспективы в выборе стратегии персонализированной терапии. ●

*Исследование выполнено в рамках Соглашения № 05.607.21.0325 (уникальный идентификатор проекта RFMEFI60719X0325). Результаты исследований по дифференциальному окрашиванию и анализу количества аутореактивных В-клеток к фрагментам десмоглеина 3 получены за счет средств гранта РФФИ (проект № 20-04-60468).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Александрова Г.А., Кубанов А.А., Мелехина Л.Е., Богданова Е.В., Поликарпов А.В., Огрызко Е.В., Голубев Н.А., Пронина Т.В., Гладких Т.Е., Гринчева А.В. Ресурсы и деятельность медицинских организаций дерматовенерологического профиля. Заболеваемость инфекциями, передаваемыми половым путем, заразными кожными заболеваниями и болезнями кожи: статистические материалы. М.: Министерство здравоохранения Российской Федерации, 2015. 212 с.
- Satyam A., Khandpur S., Sharma V.K., Sharma A. // Immunol. Invest. 2009. V. 38. № 6. P. 498–509.
- Herrero-González J.E., Iranzo P., Benítez D., Lozano F., Herrero C., Mascaró J.M., Jr. // Acta Derm. Venereol. 2010. V. 90. № 4. P. 401–405.
- Leventhal J.S., Sanchez M.R. // J. Drugs Dermatol. 2012. V. 11. № 10. P. 1200–1206.
- Sorce M., Aricò M., Bongiorno M.R. // Dermatol. Ther. 2008. V. 21. № S1. P. S6–S9.
- Stepanov A.V., Belogurov A.A., Jr., Ponomarenko N.A., Stremovskiy O.A., Kozlov L.V., Bichucher A.M., Dmitriev S.E., Smirnov I.V., Shamborant O.G., Balabashin D.S., et al. // PLoS One. 2011. V. 6. № 6. P. e20991.
- Степанов А.В., Белогуров А.А., Kothapalli P., Шамборант О.Г., Кнорре В.Д., Телегин Г.Б., Овсепян А.А., Пономаренко Н.А., Деев С.М., Kaveri S.V. и др. // Acta Naturae. 2015. Т. 7. № 2. С. 79–85.
- Cho A., Caldara A.L., Ran N.A., Menne Z., Kauffman R.C., Affer M., Llovet A., Norwood C., Scanlan A., Mantus G., et al. // Cell Rep. 2019. V. 28. № 4. P. 909–922. e1–e6.
- Müller R., Svoboda V., Wenzel E., Gebert S., Hunzelmann N., Müller H.-H., Hertl M. // Exp. Dermatol. 2006. V. 15. № 8. P. 606–614.
- Абрамова Т.В., Шпилева М.В., Кубанов А.А. // Acta Naturae. 2020. Т. 12. № 2. С. 63–69.
- Кубанов А.А., Дерябин Д.Г., Шпилева М.В., Карамова А.Э., Никоноров А.А., Ларина Е.Н., Алиев Т.К., Долгих Д.А., Бобик Т.В., Смирнов И.В. и др. // Бюл. эксп. биол. мед. 2021. Т. 171. № 4. С. 490–495.
- Franz B., May K.F., Jr., Dranoff G., Wucherpennig K. // Blood. 2011. V. 118. № 2. P. 348–357.

УДК 576.32/.36

# Оценка эффективности действия различных ингибиторов аутофагии на опухолевые стволовые клетки A549

К. В. Александрова, И. И. Суворова\*

Институт цитологии РАН, Санкт-Петербург, 199034 Россия

\*E-mail: irsuvorov@yandex.ru

Поступила в редакцию 20.12.2022

Принята к печати 20.02.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11891

**РЕФЕРАТ** Аутофагия – важная часть общего механизма, обеспечивающего внутриклеточный протеостаз, который определяет физиологические и фенотипические характеристики клеток. Многочисленными исследованиями установлено, что аутофагия играет центральную роль в поддержании жизнеспособности всех типов клеток, включая злокачественные. Опубликованы данные, показывающие, что аутофагия во многом поддерживает стволовые черты опухолевых клеток. Исходя из этого, модулирование аутофагии рассматривается как одна из перспективных фармакологических мишеней для элиминации опухолевых стволовых клеток в процессе терапии. Однако аутофагия представляет собой многостадийный внутриклеточный процесс, в котором участвуют многочисленные белки и который может параллельно активироваться различными сигнальными модулями. Все это затрудняет выбор эффективного фармакологического препарата для воздействия на аутофагию. По этой причине продолжается поиск препаратов, направленных на элиминацию опухолевых стволовых клеток с помощью фармакологического ингибирования аутофагии. В настоящей работе нами отобрана панель ингибиторов аутофагии (Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921, ITZ-01). Используя линию опухолевых клеток A549, способных экспрессировать коровые факторы стволовости Oct4 и Sox2, мы оценили воздействие этих препаратов на выживаемость и сохранение исходных свойств опухолевых стволовых клеток. Показано, что из выбранных препаратов только Autophinib обладает эффективным токсичным действием на опухолевые стволовые клетки. Согласно полученным результатам, ингибирование аутофагии посредством Autophinib приводит к снижению экспрессии белка Sox2 в клетках A549, что коррелирует со значительной индукцией апоптоза. Более того, обработанные Autophinib клетки A549 не способны к формированию сфероидов, что свидетельствует об ослаблении свойств стволовости. Таким образом, из числа исследованных препаратов только Autophinib может быть рассмотрен в качестве потенциального средства для элиминации раковых стволовых клеток.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** опухолевые клетки, раковые стволовые клетки, аутофагия, Sox2, Oct4, Autophinib.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** Vps34 (phosphatidylinositol 3-kinase catalytic subunit type 3, hVps34) – каталитическая субъединица фосфатидилинозит-3-киназы класса 3.

## ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время аутофагия рассматривается как перспективная молекулярная мишень для терапии раковых клеток. Известно, что аутофагия играет критическую роль на всех стадиях онкогенеза, а именно, при диссоциации опухолевых клеток от первичной опухоли и, соответственно, при образовании диссоциированных опухолевых клеток; в процессе эпителиально-мезенхимального перехода и, таким образом, в метастазировании; а также поддерживает фенотип опухолевых стволовых клеток, обеспечивая резистентность опухоли и ее возобнов-

ление. С учетом того, что аутофагия лежит в основе различных фенотипических и физиологических проявлений злокачественных клеток, в рамках настоящей работы исследованы последствия ингибирования аутофагии на элиминацию опухолевых клеток *in vitro*. На основе опубликованных данных определена панель плохо изученных фармакологических препаратов, которые блокируют аутофагию в клетках и в настоящее время рассматриваются как агенты, перспективные для терапии опухолей различных типов. Фармакологический агент Autophinib, синтезированный в 2017 году, представляет интерес как но-

вый перспективный ингибитор аутофагии ( $IC_{50} = 90$  и  $40$  нМ), действующий посредством ингибирования липидной киназы Vps34 ( $IC_{50} = 19$  нМ *in vitro*) [1, 2]. Липид-киназа Vps34 участвует в образовании преаутофагосомальной мембраны, на основе которой формируются будущие аутофагосомы, и регулируется киназами Ulk1 и Ulk2 [3]. Киназы Ulk1 и Ulk2 инициируют процесс аутофагии и, таким образом, подавление как Ulk1/2, так и Vps34 ингибирует аутофагию на самом раннем этапе. В нашей работе использованы два ингибитора киназ Ulk1 и Ulk2 – SBI-0206965 ( $IC_{50} = 108$  и  $711$  нМ для Ulk1 и Ulk2 соответственно) и MRT68921 ( $IC_{50} = 2.9$  и  $1.1$  нМ, для Ulk1 и Ulk2 соответственно). В 2015 году обнаружили, что MRT68921 и SBI-0206965 являются специфичными ингибиторами аутофагии, далее они были определены как потенциальные противоопухолевые препараты [4–8]. В 2018 году показали, что IPTZ-01 действует как эффективный ингибитор аутофагии [9]. В опытах на моделях рака молочной железы *in vitro* и *in vivo* препарат IPTZ-01 показал высокую противоопухолевую активность с ингибированием аутофагии посредством дестабилизации лизосом [9]. Препарат Siramesine был впервые синтезирован в 1995 году в качестве анксиолитика, так как он является селективным агонистом сигма-2-рецепторов, с которыми эффективно связываются различного класса психотропные соединения в мозге [10]. В настоящее время показано, что Siramesine эффективно блокирует аутофагию посредством дестабилизации лизосом в опухолевых клетках [11]. Таким образом, Siramesine и IPTZ-01 супрессируют аутофагию на поздних этапах ее развития, когда зрелые аутофагосомы не способны слиться с лизосомами из-за повреждений последних для дальнейшей деградации внутриклеточного материала. Как правило, клетки, в которых аутофагия блокируется на поздних стадиях, характеризуются высокой аккумуляцией аутофагосомных структур в цитоплазме.

Таким образом, согласно немногочисленным данным, указанные ингибиторы аутофагии способны эффективно элиминировать раковые клетки *in vitro* и *in vivo*, однако до сих пор эти препараты не изучены в достаточной степени для того, чтобы можно было на основе критической массы научных данных сделать вывод об их перспективе в использовании в терапии рака. Способность выбранных фармакологических агентов эффективно элиминировать опухолевые клетки проверили на опухолевой линии A549, которая обладает свойствами стволовости. Опухолевые стволовые клетки очень устойчивы к химиотерапии, по этой причине они являются хорошей модельной системой *in vitro* для скрининга потенциальных противоопухолевых агентов.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Культивирование клеток

Клетки опухолевой линии A549 культивировали при  $37^{\circ}\text{C}$  и  $5\%$   $\text{CO}_2$  в среде DMEM («Биолот», Россия), содержащей  $10\%$  сыворотки (FBS, Hyclone, США). Клетки этой линии получены из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных». В работе использовали следующие ингибиторы (Selleckhem, США): Autophinib ( $5$  мкМ), SBI-0206965 ( $1$  мкМ), Siramesine ( $0.5$  мкМ), MRT68921 ( $1$  мкМ), IPTZ-01 ( $1$  мкМ).

### Трансдукция клеток и их анализ

Лентивирусный вектор, несущий репортер SORE6-mCherry, любезно предоставлен Гордеевым С.А. (Институт цитологии РАН). Трансдукция клеток A549 лентивирусным вектором осуществлена согласно протоколу [12]. Флуоресценцию белка mCherry детектировали на проточном цитометре Becton Dickinson FACScan (США) на канале ECD-A.

### Образование сфероидов

Клетки A549 культивировали в висячих каплях в планшетах без адгезивного покрытия Sarstedt (Германия). Предварительно клетки обрабатывали ингибиторами аутофагии в указанных концентрациях в течение 3 дней. Далее клетки снимали с чашек с помощью раствора трипсина–версена ( $1 : 1$ ) и высевали в плотности  $4000$  клеток в капле. Сфероидные колонии размером не менее  $50$  мкм анализировали через 7 дней с помощью инвертированного микроскопа TS100-F (Nicon, Япония).

### Оценка жизнеспособности

Количество живых и мертвых клеток оценивали методом проточной цитометрии. Клетки снимали с чашек с помощью раствора трипсина–версена ( $1 : 1$ ) и центрифугировали. Далее к суспензии живых клеток добавляли DAPI ( $1$  мкг/мкл), инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре и анализировали на проточном цитометре Becton Dickinson FACScan (США). Краситель DAPI проникал в пермеабелизованные клетки, что позволяло идентифицировать мертвые клетки.

### ОТ-ПЦР

Тотальную РНК выделяли с использованием реагента TRIZOL («Евроген», Россия) согласно протоколу производителя. Реакцию обратной транскрипции проводили согласно протоколу производителя («Евроген»), используя ревертазу MMLV,  $2.5$  мкг РНК и  $1$  мкг случайных гексапраймеров. Количественную ОТ-ПЦР проводили с использованием набора для ПЦР («Евроген») в реальном време-

ни, содержащего краситель SYBR Green, на приборе 7500 Real-time PCR System (Applied Biosystems, США). Были использованы следующие праймеры: *sox2* (F) – TTGCTGCCTCTTTAAGACTAGGA, *sox2* (R) – CTGGGGCTCAAACCTTCTCTC; *gapdh* (F) – GAGGTCAATGAAGGGGTCAT, *gapdh* (R) – AGTCAACGGATTTGGTCGTA.

### Анализ активности каспазы-3 *in vitro*

Клетки лизировали в буфере, содержащем 50 мМ HEPES (ICN, США) pH 7.4, 0.1% CHAPS (Sigma), 0.5% IGEPAL-100 (ICN), 5 мМ DTT (Sigma), в течение 30 мин при 4°C. В реакционную смесь (40 мМ HEPES pH 7.4, 0.1% CHAPS, 1 мМ DTT и 40 мкМ флуорогенного субстрата AcDEVD-AMC (Sigma)) добавляли равное количество белка из лизатов, инкубировали в течение 1 ч при 37°C. Флуоресценцию измеряли на флуориметре GloMax®-Multi Jr.

### Иммуноблоттинг

Клетки лизировали в PBS, содержащем 1% NP-40, 0.5% дезоксихолата натрия, 0.1% SDS, ингибиторы протеаз и фосфатаз, и далее центрифугировали. Количество белка в пробах измеряли по методу Брэдфорда; на гель наносили равное количество белка в каждой пробе. В качестве первичных антител использовали антитела к Oct4, Sox2 (Santa Cruz, США), LC3 (Cell Signaling, США),  $\alpha$ -тубулин (Sigma). В качестве вторичных антител использовали антитела кролика против иммуноглобулинов мыши и антитела козла против иммуноглобулинов кролика, конъюгированные с пероксидазой хрена. Белки выявляли методом усиленной хемилюминесценции (ECL, Amersham, Англия). Полученные результаты денситометрировали с использованием программы ImageJ. Значения нормированы на контроль нагрузки ( $\alpha$ -тубулин) и приведены к относительным единицам измерения.

### Статистический анализ

Полученные результаты анализировали с помощью программного обеспечения GraphPad Prism 8. Результаты представлены как среднее значение  $\pm$  стандартная ошибка среднего. Средние значения сравнивали с использованием критерия Стьюдента с поправкой Бонферрони.

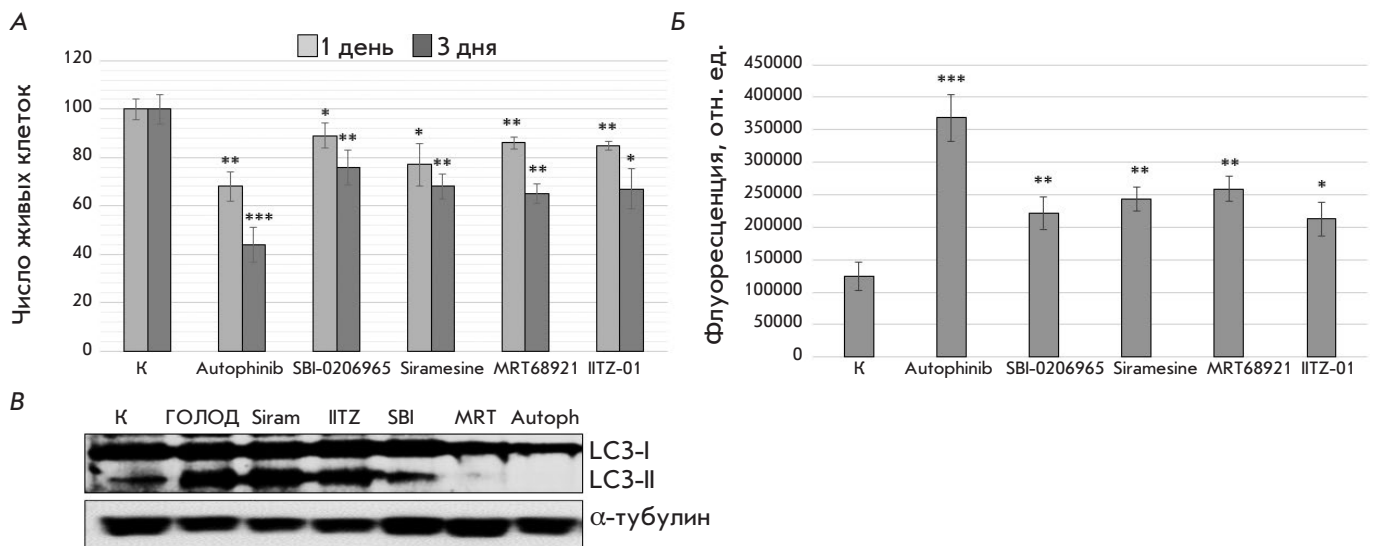
## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Фармакологический агент Autophinib оказывает выраженный цитотоксический эффект на опухолевые клетки A549

Рабочие концентрации фармакологических агентов Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921,

IITZ-01 были подобраны на основании опубликованных данных таким образом, чтобы (1) выбранная концентрация не вызывала гибель более 50% клеток в течение суток; (2) выбранная концентрация позволяла исследовать стволовые свойства выживших клеток после 3 дней обработки. Согласно полученным данным, Autophinib (5 мкМ), SBI-0206965 (1 мкМ), Siramesine (0.5 мкМ), MRT68921 (1 мкМ) и IITZ-01 (1 мкМ) вызывали гибель не более 30% клеток A549 после одного дня обработки (рис. 1А). Через 3 дня после обработки препаратами SBI-0206965, Siramesine, MRT68921 и IITZ-01 число погибших клеток A549 увеличилось до 40% (рис. 1А). Ингибитор аутофагии Autophinib проявил ярко выраженный цитотоксический эффект как на первые (чуть больше 30% мертвых клеток), так и на третьи сутки обработки (около 60% мертвых клеток) (рис. 1А). Анализ активности каспазы-3 *in vitro* показал, что все указанные модуляторы аутофагии вызывают активацию апоптоза в клетках A549, при этом наиболее сильным про-апоптотическим действием обладает Autophinib (рис. 1Б). В то время как SBI-0206965, Siramesine, MRT68921 и IITZ-01 усиливали активацию каспазы-3 приблизительно в 2 раза по сравнению с контролем через 1 сут после обработки, Autophinib увеличивал уровень активности каспазы-3 приблизительно в 3 раза (рис. 1Б). Таким образом, из всех отобранных нами препаратов наибольшую способность элиминировать опухолевые клетки A549 показал Autophinib.

Чтобы выяснить, насколько фармакологические агенты Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921, IITZ-01 эффективно подавляют аутофагию в диапазоне выбранных концентраций, были использованы антитела против белка LC3. Известно, что вторая форма этого белка LC3-II образуется путем конъюгации цитозольного белка LC3 (LC3-I) с фосфатидилэтаноламином на поверхности зарождающихся аутофагосом. По этой причине считается, что LC3-II относительно специфично маркирует аутофагосомы и аутофаголизосомы и может свидетельствовать об интенсификации аутофагии в клетках. Согласно полученным результатам, аутофагическая активность в клетках A549, индуцированная сывороточным голоданием в течение 4 ч, эффективно подавляется агентами Autophinib, SBI-0206965 и MRT68921 (рис. 1В). При действии препаратами Siramesine и IITZ-01 вторая форма белка LC3 накапливалась в клетках, так же как и при сывороточном голодании в отсутствие указанных агентов. Вероятно, это связано с тем, что механизм ингибирования аутофагии агентами Siramesine и IITZ-01 преимущественно связан с дестабилизацией лизосом и по этой причине не препятствует активации аутофагии на ранних стадиях вплоть до аккумуляции



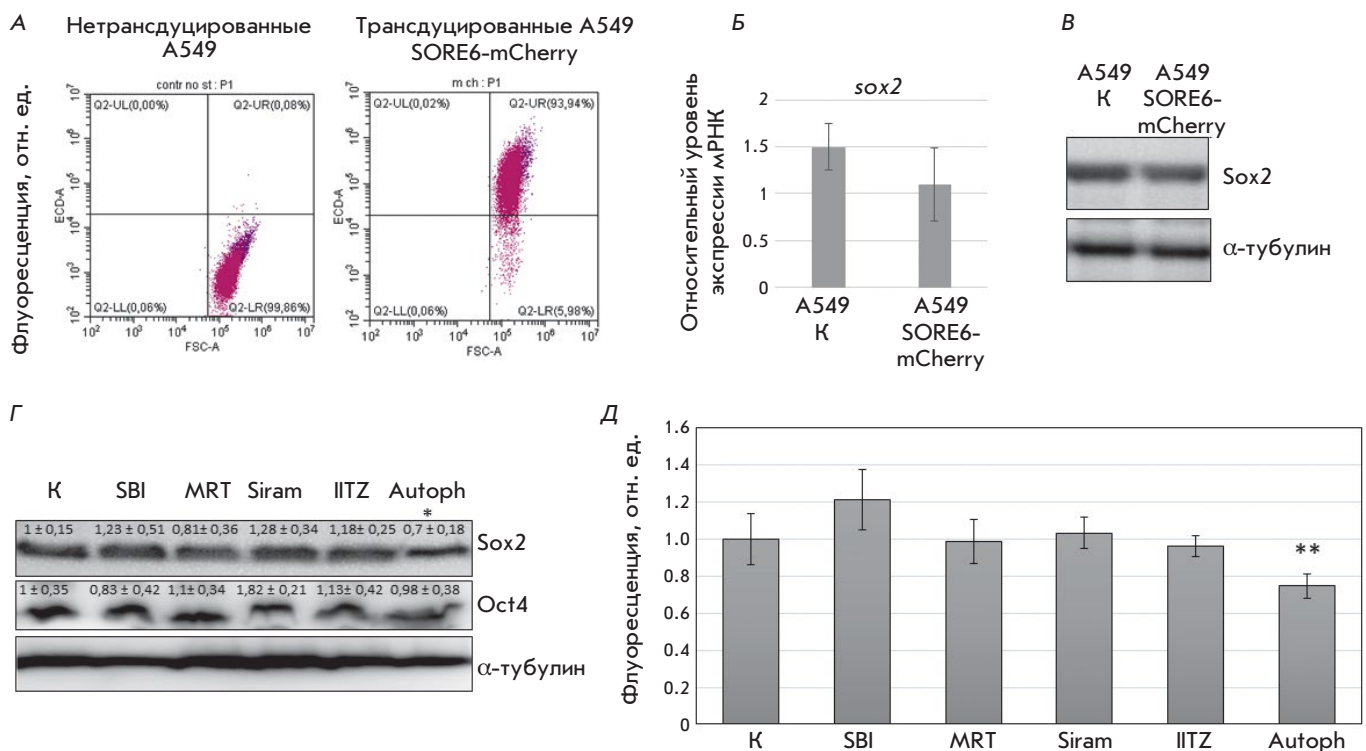
**Рис. 1.** Влияние ингибиторов аутофагии на выживаемость раковых клеток A549. А – анализ числа живых клеток линии A549 в норме и при действии ингибиторов аутофагии Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921, IITZ-01. Представлены результаты проточной цитометрии с использованием красителя DAPI, который проникает только в пермеабилizованные клетки. Подсчет клеток проводили на 1-й и 3-й дни обработки указанными агентами ( $n = 10000$  событий). Планки погрешности отражают стандартную ошибку среднего ( $n = 3$ ), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.05$ , \*\*\* $p < 0.005$ . Б – анализ активности каспазы-3 *in vitro* в контрольных клетках линии A549 и через сутки после обработки ингибиторами аутофагии Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921, IITZ-01. Планки погрешности отражают стандартную ошибку среднего ( $n = 3$ ), \* $p < 0.05$ , \*\* $p < 0.025$ , \*\*\* $p < 0.005$ . В – иммуноблоттинг клеточных лизатов, полученных из клеток A549 в норме и при действии сывороточного голодания в течение 4 ч. A549 были обработаны агентами Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921, IITZ-01 в течение 4 ч в условиях сывороточного голодания. Использованы антитела против белков LC3-I/II и α-тубулин

аутофагосом, маркированных LC3-II. Интересно отметить, что среди используемых ингибиторов киназы Ulk1/Ulk2 агент MRT68921 лучше подавлял аутофагию в клетках A549 в условиях голодания, чем SBI-0206965 (рис. 1B). Фармакологический агент Autophinib полностью препятствует накоплению второй формы белка LC3 (LC3-II), что свидетельствует об эффективной супрессии этого процесса в клетках.

### В опухолевых клетках A549 Autophinib вызывает снижение экспрессии фактора Sox2

Транскрипционные факторы, обильно экспрессирующиеся в эмбриональных стволовых клетках, считаются драйверами стволовых свойств опухолевых клеток. Кроме того, уровень экспрессии Sox2 и Oct4 коррелирует с гистологической злокачественностью опухоли соответственно; эти белки часто служат прогностическими маркерами ответа злокачественных клеток на терапию и исход заболевания [13, 14]. Для того, чтобы в полной степени охарактеризовать уровень экспрессии факторов Sox2 и Oct4 в линии опухолевых клеток A549, эти клетки трансдуцировали лентивирусной конструкцией, несущей флуоресцентный репортер SORE6-mCherry [12]. Флуоресцентный репортер SORE6-mCherry

содержит шесть повторов промоторных регионов для связывания транскрипционных факторов Sox2 и Oct4 с последующей индукцией транскрипции красного флуоресцентного белка mCherry. Он был сконструирован для детекции опухолевых стволовых клеток [12]. Как видно на рис. 2A, трансдуцированные клетки линии A549 имеют значительный уровень флуоресценции в красной области спектра, идентифицирующей активность белков Oct4 и Sox2. Согласно полученным результатам, лентивирусная трансдукция не изменяет уровень экспрессии фактора Sox2 как на уровне гена, так и на уровне белка, что свидетельствует об адекватности используемой модели (рис. 2B и B). Далее изучено влияние фармакологических агентов Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921 и IITZ-01 на уровень белков Oct4 и Sox2 в клетках линии A549 после трех дней обработки. Показано, что количество белка Oct4 остается постоянным при воздействии всех типов фармакологических агентов, в то время как уровень Sox2 снижается в клетках A549, обработанных препаратом Autophinib, и остается постоянным при действии SBI-0206965, Siramesine, MRT68921 и IITZ-01 (рис. 2Г). Оценка уровня экспрессии факторов Oct4 и Sox2 в A549, трансдуцирован-



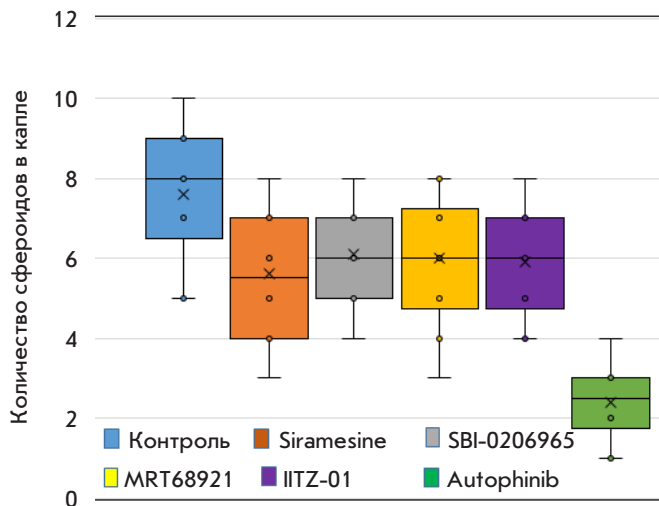
**Рис. 2.** Влияние ингибиторов аутофагии на уровень экспрессии белков Sox2 и Oct4 в опухолевых клетках линии A549. **А** – результаты проточной цитометрии нетрансдуцированных и трансдуцированных клеток линии A549 репортерной конструкцией SORE6-mCherry. Флуоресценция детектирована на канале ECD-A. **Б** – анализ экспрессии мРНК Sox2 методом количественной ОТ-ПЦР контрольных и обработанных клеток A549 в течение 1 и 3 дней указанными агентами. Экспрессия нормализована по GAPDH. **В** – иммуноблотинг клеточных лизатов на содержание белка Sox2 в клетках линии A549, нетрансдуцированных и трансдуцированных генетической конструкцией SORE6-mCherry. α-Тубулин приведен в качестве контроля нагрузки. **Г** – иммуноблотинг клеточных лизатов на содержание белков Sox2, Oct4, α-тубулин в клетках линии A549 в норме и после обработки указанными агентами в течение 3 дней. Результаты денситометрии представлены в виде среднего значения ± стандартная ошибка среднего ( $n = 3$ ), \* $p < 0.05$ . **Д** – анализ флуоресцентного свечения репортерной конструкции методом проточной цитометрии в клетках линии A549 в норме и после обработки указанными агентами в течение 3 дней. Результаты представлены в виде диаграммы. Среднее значение флуоресценции определено на основе трех независимых экспериментов с учетом клеточной аутофлуоресценции. Планки погрешности отражают стандартную ошибку среднего ( $n = 3$ ), \*\* $p < 0.05$

ных лентивирусной конструкцией SORE6-mCherry, подтвердила ослабление свойств стволовости в опухолевых клетках при действии Autophinib (рис. 2Д). Трансформированные клетки A549 культивировали в течение 3 дней в присутствии ингибиторов аутофагии Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921 и IITZ-01 и далее анализировали с помощью проточной цитометрии. Согласно полученным данным, уровень флуоресценции репортерной конструкции SORE6-mCherry заметно снижается в клетках A549, обработанных Autophinib (рис. 2Д). На основании результатов вестерн-блотинга (рис. 2Г) можно предположить, что снижение флуоресцентного свечения связано с уменьшением активности Sox2, но не Oct4, белковый уровень которого остается постоянным при действии Autophinib. При этом можно предположить, что цитотоксическое действие Autophinib

сопряжено с ослаблением свойств стволовости и по этой причине имеет ярко выраженный эффект. Таким образом, полученные данные демонстрируют, что из всей панели выбранных ингибиторов аутофагии только препарат Autophinib изменяет стволовые характеристики клеток A549.

**Обработка клеток A549 агентом Autophinib препятствует образованию опухолевых сфероидов**  
 Опухолевые сфероиды – это формируемые опухолевыми клетками трехмерные структуры, которые имитируют солидные опухоли *in vivo* во многих ключевых аспектах, как например, гетерогенная архитектура, внутренние градиенты сигнальных факторов, питательных веществ и оксигенации. Опухолевые сфероиды представляют собой более адекватную модель лекарственной устойчивости по сравнению





**Рис. 3.** Влияние ингибиторов аутофагии на способность клеток линии A549 к образованию сфероидов. Результаты представлены в виде диаграмм размаха. Сферы размером не менее 50 мкм подсчитывали в одной капле

с монослойными культурами [15]. Для того, чтобы оценить злокачественный потенциал выживших клеток A549 после обработки ингибиторами аутофагии Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921 и IITZ-01, оценили способность опухолевых клеток образовывать сфероиды. Клетки линии A549 предварительно культивировали в присутствии указанных агентов в течение 3 дней, затем диссоциировали и культивировали в условиях, необходимых для образования 3D-структур. Согласно полученным данным, клетки A549, обработанные препаратами SBI-0206965, Siramesine, MRT68921 и IITZ-01, способны к формированию сфероидных структур размером не менее 50 мкм, хотя и в меньшей степени по сравнению с контролем (рис. 3). По всей видимости, уменьшенное количество сфероидов, образованных из предобработанных A549, может быть следствием инициируемой этими агентами апоптотической программы, которая сохранилась в пересаженных для образования 3D-структур клетках. Напротив, фармакологический агент Autophinib способен в значительной степени блокировать потенциал раковых клеток к формированию сфероидов, что может быть связано с серьезным нарушением внутриклеточного протеостаза A549. По всей видимости, влияние препарата Autophinib может иметь необратимые последствия для опухолевых клеток, ведущие к неспособности восстановить гомеостаз и последующей элиминации.

### ОБСУЖДЕНИЕ

В последние годы разрабатывается множество ингибирующих аутофагию химических соединений, применение которых, как ожидается, приведет к об-

ширной гибели раковых клеток и низкой токсичности в отношении нормальных клеток человека [16, 17]. Некоторые препараты, воздействующие на аутофагию, уже применяются в клинике (рапамицин, хлорохин, гидроксихлорохин), в то время как другие находятся на стадии клинических испытаний, как например, ингибиторы киназы mTOR [17, 18]. Тот факт, что около 70% клинических исследований сосредоточены на роли аутофагии в онкогенезе, указывает на многообещающую роль модуляции аутофагии в лечении рака [19].

В настоящей работе предпринята попытка оценить потенциальную терапевтическую значимость препаратов Autophinib, SBI-0206965, Siramesine, MRT68921, IITZ-01 в элиминации опухолевых стволовых клеток A549. Показано, что среди указанных ингибиторов аутофагии только Autophinib обладает выраженными противоопухолевыми свойствами, ослабляя стволовые свойства злокачественных клеток, индуцируя в них апоптоз и препятствуя возобновлению популяции. По всей видимости, детектируемые противоопухолевые эффекты препарата Autophinib достигаются посредством серьезного нарушения клеточного протеостаза, вызванного ингибированием белка Vps34 и последующей блокадой не только аутофагии. Дело в том, что липид-киназа Vps34 является одним из основных продуцентов фосфатидилинозитол-3-фосфата в клетке, который в свою очередь рекрутирует соответствующие белки на мембраны. По этой причине Vps34 не только играет ключевую роль в индукции аутофагии и образовании первичной мембраны с привлечением мембранных белковых комплексов, но и имеет решающее значение для осуществления эндоцитоза [20, 21]. Таким образом, ингибирование белка Vps34 приводит к подавлению образования мембранных везикул, необходимых как для осуществления аутофагии, так и для эндоцитоза, что в целом повреждает внутриклеточный гомеостаз. Кроме того, эндоцитоз во многом опосредует взаимодействие между опухолевыми клетками, и его нарушение может разобщать раковые клетки [22]. По всей видимости, неспособность клеток линии A549 образовывать сфероиды после обработки агентом Autophinib также связана с повреждением межклеточной коммуникации. Таким образом, противоопухолевое действие Autophinib связано не только с ингибированием аутофагии, но затрагивает и другие сигнальные пути. По этой причине фармакологические агенты SBI-0206965 и MRT68921, которые блокируют аутофагию посредством целенаправленной супрессии белков Ulk1 и Ulk2, оказались менее токсичными для опухолевых стволовых клеток A549 по сравнению с Autophinib. Интересно, что препараты Siramesine и IITZ-01 также прояви-

ли слабый элиминирующий эффект против клеток A549, хотя их действие связано с дестабилизацией лизосом, которые необходимы как для аутофагии, так и для эндоцитарных путей. Тем не менее, ингибирование киназы Vps34 оказалось более эффективной стратегией в устранении опухолевых стволовых клеток в рамках проведенной работы, а также в других описанных экспериментах. Показано, что активность киназы Vps34 необходима для экспансии опухолевых стволовых клеток печени, соответственно, РНК-интерференция этого белка приводит к противоположному эффекту, препятствуя росту опухоли *in vivo* [23]. Кроме того, фармакологическое ингибирование Vps34 эффективно устраняет популяцию опухолевых стволовых клеток в печени, а также ингибирует рост опухолей *in vivo* [23]. Более того, подавление активности киназы Vps34 эффективно устраняет опухолевые стволовые клетки в условиях комбинированной терапии в модели опухолевых сфероидов [24]. Показано, что комбинированное лечение с использованием 5-фторурацила и препарата 36-077, являющегося ингибитором Vps34, вызывает преимущественное разрушение опухолевых клеток со стволовым фенотипом [24].

На основе полученных результатов и опубликованных данных становится очевидным, что фармако-

логический подход к ингибированию аутофагии в раковых клетках должен затрагивать перекрестные сигнальные пути. Монотерапия на основе блокады аутофагии в настоящее время уже признается неэффективной [19]. Основными причинами являются: (1) дуальная роль аутофагии в раке; (2) отсутствие терапевтически подходящих ингибиторов аутофагии; (3) не до конца изученные перекрестные взаимодействия между аутофагией и другими сигнальными путями в клетке. Показано, что совместное ингибирование аутофагии и эндоцитарных путей на основе блокады Vps34 может быть хорошей стратегией в элиминации опухолевых стволовых клеток, и, соответственно, изучение аутофагии в контексте везикулярного транспорта можно рассматривать как перспективную исследовательскую задачу. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке Министерства науки и высшего образования Российской Федерации (грантовое соглашение № 075-15-2020-773). Клеточные линии получены из ЦКП «Коллекция культур клеток позвоночных», поддержанного грантом Минобрнауки Российской Федерации (соглашение № 075-15-2021-683).*

#### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Robke L., Laraia L., Corrales M.A., Konstantinidis G., Muroi M., Richters A., Winzker M., Engbring T., Tomassi S., Watanabe N., et al. // *Angew. Chem. Int. Ed. Engl.* 2017. V. 56. № 28. P. 8153–8157.
- Li H., Li M., Chen K., Li Y., Yang Z., Zhou Z. // *Med. Oncol.* 2022. V. 39. № 12. P. 244.
- Russell R.C., Tian J., Yuan H., Park H.W., Chang Y-Y., Kim J., Kim H., Neufeld T.P., Dillin A., et al. // *Nat. Cell. Biol.* 2013. V. 15. № 7. P. 741–750.
- Petherick K.J., Conway O.J.L., Mparamhanga C., Osborne S.A., Kamal A., Saxty B., Ganley I.G. // *J. Biol. Chem.* 2015. V. 290. № 18. P. 11376–11383.
- Egan D.F., Chun M.G.H., Vamos M., Zou H., Rong J., Miller C.J., Lou H.J., Raveendra-Panickar D., Yang C.-C., Sheffler D.J., et al. // *Mol. Cell.* 2015. V. 59. № 2. P. 285–297.
- Chen Y., Xie X., Wang C., Hu Y., Zhang H., Zhang L., Tu S., He Y., Li Y. // *Cell. Death Dis.* 2020. V. 11. № 8. P. 712.
- Singha B., Laski J., Ramos Valdés Y., Liu E., DiMattia G.E., Shepherd T.G. // *Am. J. Cancer Res.* 2020. V. 10. № 5. P. 1384–1399.
- Zheng Y., Liu L., Wang Y., Xiao S., Mai R., Zhu Z., Cao Y. // *Cell Biosci.* 2021. V. 11. № 1. P. 63.
- Guntuku L., Gangasani J.K., Thummuri D., Borkar R.M., Manavathi B., Ragampeta S., Vaidya J.R., Sistla R., Vegi N.G.M. // *Oncogene.* 2019. V. 38. № 4. P. 581–595.
- Perregaard J., Moltzen E.K., Meier E., Sánchez C. // *J. Med. Chem.* 1995. V. 38. № 11. P. 1998–2008.
- Ostenfeld M.S., Høyer-Hansen M., Bastholm L., Fehrenbacher N., Olsen O.D., Groth-Pedersen L., Puustinen P., Kirkegaard-Sørensen T., Nylandsted J., Farkas T., et al. // *Autophagy.* 2008. V. 4. № 4. P. 487–499.
- Tang B., Raviv A., Esposito D., Flanders K.C., Daniel C., Nghiem B.T., Garfield S., Lim L., Mannan P., Robles A.I., et al. // *Stem Cell Reports.* 2015. V. 4. № 1. P. 155–169.
- Zhao X., Lu H., Sun Y., Liu L., Wang H. // *Medicine (Baltimore).* 2020. V. 99. № 42. P. e22804.
- Yuan D., Wang J., Yan M., Xu Y. // *Int. J. Biol. Markers.* 2021. V. 36. № 4. P. 45–53. <https://doi.org/10.1177/17246008211042899>
- Ishiguro T., Ohata H., Sato A., Yamawaki K., Enomoto T., Okamoto K. // *Cancer Sci.* 2017. V. 108. № 3. P. 283–289.
- Ariosa A.R., Lahiri V., Lei Y., Yang Y., Yin Z., Zhang Z., Klionsky D.J. // *Biochim. Biophys. Acta Mol. Basis Dis.* 2021. V. 1867. № 12. P. 166262.
- Mohsen S., Sobash P.T., Algwaiz G.F., Nasef N., Al-Zeidaneen S.A., Karim N.A. // *Curr. Oncol.* 2022. V. 29. № 3. P. 1695–1708.
- Amaravadi R.K. // *Autophagy.* 2022. V. 18. № 6. P. 1470–1471.
- Marinković M., Šprung M., Buljubašić M., Novak I. // *Oxid. Med. Cell. Longev.* 2018. V. 2018. P. 8023821.
- Lindmo K., Stenmark H. // *J. Cell. Sci.* 2006. V. 119. № Pt 4. P. 605–614.
- Nascimbeni A.C., Codogno P. // *FEBS J.* 2017. V. 284. № 9. P. 1267–1278.
- Wu B., Wang Q., Shi X., Jiang M. // *Cell Commun. Signaling.* 2022. V. 20. № 1. P. 161.
- Liu F., Wu X., Qian Y., Jiang X., Wang Y., Gao J. // *Cell Death Dis.* 2020. V. 11. № 6. P. 427.
- Kumar B., Ahmad R., Sharma S., Gowrikumar S., Primeaux M., Rana S., Natarajan A., Oupicky D., Hopkins C.R., Dhawan P., et al. // *Cancers (Basel).* 2021. V. 13. № 9. P. 2168.

УДК 575.1, 616.8

# Анализ генетической предрасположенности к наследственной каталепсии в мышинной модели нейропсихических заболеваний с использованием полногеномных данных

Т. В. Андреева<sup>1,2\*</sup>, Ф. Е. Гусев<sup>1,2</sup>, Н. А. Синякова<sup>3</sup>, А. В. Куликов<sup>3</sup>, А. П. Григоренко<sup>2</sup>, И. Ю. Адрианова<sup>2</sup>, Д. В. Базовкина<sup>4</sup>, Е. И. Рогов<sup>2,5\*</sup>

<sup>1</sup>Научный центр генетики и наук о жизни, Университет «Сириус», Сочи, 354340 Россия

<sup>2</sup>Институт общей генетики имени Н.И. Вавилова РАН, Отдел геномики и генетики человека, Москва, 119991 Россия

<sup>3</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Сектор генетических коллекций нейропатологий, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>4</sup>Институт цитологии и генетики СО РАН, Лаборатория нейрогеномики поведения, Новосибирск, 630090 Россия

<sup>5</sup>Медицинская школа Чан Массачусетского университета, Департамент психиатрии, Шрусбери, 01545 США Массачусетс, США

\*E-mail: an\_tati@vigg.ru, Evgeny.Rogaev@umassmed.edu

Поступила в редакцию 12.12.2022

Принята к печати 23.01.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11875

**РЕФЕРАТ** Каталепсия – это особое состояние организма, сопровождающее тяжелые нейропсихические патологии, включая шизофрению, депрессивные расстройства, болезнь Паркинсона. У некоторых линий мышей каталепсия может быть вызвана зажиманием кожи загривка. Ранее методом анализа сцепления участок 105–115 млн п.н. на хромосоме 13 был определен как главный локус наследственной щипковой каталепсии у мышей. С целью поиска вероятных генов-кандидатов каталепсии мы провели полногеномное секвенирование мышей из линий, склонных и устойчивых к щипковой каталепсии. Нами установлено, что главный локус каталепсии ограничен участком 103.92–106.16 млн п.н. Гомологичный локус в геноме человека расположен на хромосоме 5 и содержит генетические и эпигенетические маркеры, ассоциированные с шизофренией. Кроме того, нами выявлен миссенс-вариант в гене *Nln* у мышей из линий, склонных к каталепсии. *Nln* кодирует фермент нейролизин, участвующий в расщеплении нейротензина – пептида, индуцирующего эпилепсию у мышей. Полученные данные указывают на *Nln* как на наиболее вероятный ген-кандидат, связанный со щипковой каталепсией у мышей, и на общие механизмы развития каталепсии у мышей и нейропсихических патологий у человека.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** каталепсия, мышшь, геном, мозг, нейролизин.

## ВВЕДЕНИЕ

Каталепсия – естественное состояние организма, характеризующееся длительной реакцией замирания и неспособностью изменить принятую позу, представляет собой одну из форм пассивно-оборонительного поведения и встречается у большинства позвоночных. У человека каталепсия утратила свою защитную функцию и является симптомом ряда тя-

желых нейропсихических патологий, таких, как шизофрения и депрессия [1, 2].

Каталепсия у грызунов может быть вызвана блокадой дофаминовых D2-рецепторов нейролептиками, такими, как галоперидол или морфин [3–6]. Немедикаментозная (щипковая) каталепсия у мышей (Дополнительный файл 1. Мышь со щипковой каталепсией (видеофайл) см. по ссылке <https://>

evolgenomics.org/catalepsy/) может быть вызвана зажиманием кожи загривка [7], при этом предрасположенность разных линий мышей к данному типу катаlepsии значительно различается. Мыши наиболее распространенных инбредных линий, таких, как C57BL/6J, DBA/2, AKR/J, устойчивы к щипковой катаlepsии, тогда как около 50% мышей линии CBA/Lac демонстрируют наследственную катаlepsию [8–11].

Главный локус наследственной катаlepsии у мышей был недавно картирован методами QTL-анализа в дистальной части (61–70 cM) хромосомы 13 [12]. Генетическое сцепление подтверждено экспериментами по селективному скрещиванию [13] и путем переноса дистального фрагмента хромосомы 13, расположенного между генетическими маркерами D13Mit74 и D13Mit214, из линии CBA в геном устойчивой к катаlepsии линии AKR. Около 50% мышей конгенной линии AKR.CBA-D13Mit76 проявляли выраженную катаlepsию, как и мыши линии CBA [10]. Линия ASC/Icg (антидепрессант-чувствительная катаlepsия) была создана путем селективного возвратного скрещивания CBA × (CBA × AKR) и отбора мышей, склонных к катаlepsии. Показано, что наследственная катаlepsия у мышей линии CBA ассоциирована с депрессивноподобными чертами и чувствительностью к хронической терапии антидепрессантами [2, 9, 11, 14]. Около 80–85% мышей ASC проявляют катаlepsию [13], но гены, ответственные за щипковую катаlepsию, в этой линии все еще не выявлены.

Мы провели полногеномное секвенирование устойчивых к катаlepsии (AKR/J) и склонных к катаlepsии линий мышей (CBA, AKR.CBA-D13Mit76 и ASC) для поиска предполагаемых генов-кандидатов или хромосомных локусов, связанных с развитием наследственной щипковой катаlepsии у мышей.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Животные

В работе использовали мышей из устойчивых (AKR/J) и предрасположенных к катаlepsии (CBA/LacJ) линий, более 50 лет содержавшихся в Институте цитологии и генетики (Новосибирск, Россия), а также животных из конгенной AKR.CBA-D13Mit76 линии с CBA-производным фрагментом хромосомы 13, содержащим главный ген катаlepsии, который был перенесен в геном AKR, и мышей из линии ASC с наследственной предрасположенностью к катаlepsии. Проведение исследований одобрено Этическим комитетом Института цитологии и генетики РАН, все экспери-

ментальные процедуры соответствовали Директиве Совета Европейских сообществ от 24 ноября 1986 года (86/609/ЕЕС). Животных тестировали на катаlepsию (в том числе AKR/J на отсутствие катаlepsии), как описано ранее [15]: тест считали положительным, если мышь сохраняла неизменной позу не менее 20 с. Для анализа отбирали животных с положительной реакцией на щипок (за исключением контрольной линии AKR).

### Полногеномное секвенирование

Геномную ДНК выделяли из фрагментов длиной 3–4 мм хвостов мышей. По фрагменту хвоста от одного животного использовали для выделения ДНК из линий AKR и D13Mit76C; по два хвоста использовали для выделения ДНК из животных линий ASC и CBA. ДНК очищали с использованием колонок QIAamp DNA Mini (QIAGEN, Hilden, ФРГ). 1.5 мкг геномной ДНК использовали для подготовки фрагментных геномных библиотек с использованием набора TruSeq DNA Sample Preparation kit v2 (Illumina, Сан-Диего, Калифорния, США). Приготовленные фрагментные библиотеки со средней длиной вставки 350 п.н. были секвенированы на платформе Illumina HiSeq2000 в режиме парных прочтений длиной 101 н. Полученные в результате секвенирования геномные данные депонированы в базу NCBI SRA (<http://www.ncbi.nlm.nih.gov/sra>, PRJNA900682).

### Анализ данных секвенирования и статистика

Прочтения, полученные в результате секвенирования, картировали на референсный геном мыши (GRCm38/mm10) с использованием программ BWA v. 0.7.17 [16] и Sarek v.2.7.1 [17]. ПЦР-дубликаты маркировали с помощью инструмента Picard (<http://broadinstitute.github.io/picard/>). Генетические варианты были предсказаны с использованием программного пакета GATK v.4.1.7.0 [18] и аннотированы с помощью VEP [19]. Предсказание структурных вариантов выполнено с помощью Manta 1.6.0 [20]. В результате секвенирования получено среднее геномное покрытие каждого образца 17–33× (табл. 1).

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Точное картирование главного локуса щипковой катаlepsии мышей

Наследственная катаlepsия, как показано ранее, является гомозиготным рецессивным состоянием [8], поэтому для поиска генов-кандидатов катаlepsии мы использовали только гомозиготные варианты, обнаруженные в дистальном фрагменте хромосомы 13 у мышей всех трех линий, предрасположенных

**Таблица 1.** Статистика геномного секвенирования мышей четырех линий

Образец (линия)	Число прочтений	Прочтения, картированные на геном мыши (Grem38/mm10), %	Среднее геномное покрытие
HT76	561995272	99.56	19 ×
ASC	720038088	99.35	23 ×
СВА	555706906	97.95	17 ×
AKR	986011514	99.49	33 ×

к катаlepsии (СВА, D13Mit76С и ASC), и отсутствующие у мышей линии АКР.

Ранее показали, что основной локус, связанный со щипковой катаlepsией у мышей, расположен на дистальном конце хромосомы 13 мыши. Этот фрагмент, маркированный D13Mit76, был перенесен из линии СВА в линию АКР, что привело к созданию рекомбинантной линии АКР.СВА-D13Mit76. С помощью метода микросателлитного картирования основной ген катаlepsии был картирован между 105.8 и 115.3 млн п.н. хромосомы 13 мыши [10]. Однако границы перенесенного фрагмента могут быть определены неточно в связи с недостаточно высокой разрешающей способностью использованного метода. Чтобы уточнить координаты основного локуса катаlepsии, мы проанализировали распределение родительских (АКР и СВА-специфических) гомозиготных вариантов в линиях ASC и АКР.СВА-D13Mit76 на дистальном фрагменте хромосомы 13 с использованием данных геномного секвенирования и обнаружили гомозиготные варианты, специфичные для линии СВА, на участке 103.92–106.16 млн п.н. как в линии ASC, так и у мыши из линии АКР.СВА-D13Mit76.

Нами определено, что этот локус на хромосоме 13 мыши гомологичен участку 63.24–65.93 млн п.н. на хромосоме 15 человека (в соответствии с версией GRCh38 генома человека). С использованием данных полногеномного анализа ассоциаций, представленных в базе GWAS Catalog [21], мы выявили статистически строго значимые ассоциации полиморфных вариантов в этом локусе с когнитивными и образовательными способностями ( $P < 5 \times 10^{-8}$ ), а также нестрогие значимые ассоциации ( $P < 10^{-6}$ ) с шизофренией и депрессивными расстройствами (Дополнительная таблица S1. Генетические ассоциации хромосомного локуса в геноме человека, гомологичного главному локусу катаlepsии у мыши).

Нами также проведен анализ данных ацетилирования маркера активного энхансера – гистона H3K27ac – в мозге пациентов с шизофренией [22]. Обнаружено изменение эпигенетического статуса пяти из 76 энхансеров в нейрональных клетках префронтальной коры в локусе хромосомы 15 человека при шизофрении, а также семи из 114 энхансеров тотальной ткани префронтальной коры человека (Дополнительная таблица S2. Изменения эпигенетического статуса энхансеров (H3K27ac), выявленные при шизофрении в локусе, гомологичном главному локусу катаlepsии у мышей). В целом, эти данные позволяют предположить общие молекулярные механизмы щипковой катаlepsии у мышей и нейропсихических патологий у человека.

### Кодирующие варианты в локусе хромосомы 13, сцепленном с катаlepsией

Всего в главном локусе наследственной щипковой катаlepsии мышей выявлены 13147 полиморфных геномных позиций, содержащих однонуклеотидные замены или короткие инсерционно-делеционные варианты. Среди них 6087 вариантов представлены в гомозиготном состоянии во всех трех секвенированных геномах линий мышей, склонных к катаlepsии, и отсутствуют в некатаlepsической линии (Дополнительная таблица S3. Однонуклеотидные варианты, выявленные в главном локусе катаlepsии у мыши). В этом локусе обнаружены также 239 структурных вариантов, из которых 21 вариант специфичен для мышей из линий, склонных к катаlepsии (обнаружены во всех трех линиях и отсутствуют в геноме мыши АКР), но ни один из структурных вариантов не изменяет белок-кодирующую последовательность (Дополнительная таблица S4. Структурные варианты, выявленные в главном локусе катаlepsии у мыши).

Мы проанализировали однонуклеотидные замены в белок-кодирующих участках локуса, сцепленного с катаlepsией, и обнаружили, что девять из них приводят к изменению аминокислотной последовательности соответствующих белков у мышей, склонных к катаlepsии, по сравнению с мышью линии АКР без катаlepsии (табл. 2). Дополнительно мы провели анализ этих девяти вариантов в референсных геномах 14 линий мышей, представленных в GenBank (линии DBA\_2J\_v3, BALB\_cJ\_v3, A\_J\_v3, СВА\_J\_v3, C3H\_HeJ\_v3, АКР\_J\_v3, NOD\_ShiLtJ\_v3, FVB\_NJ\_v3, Mm\_Celera, LP\_J\_v1, PWK\_PhJ\_v3, WSB\_EiJ\_v3, CAST\_EiJ\_v3, C57BL/6J), включая известные линии устойчивых (C57BL/6J, DBA/1J) и склонных к катаlepsии (C3H/HeJ, A/He, BALB/cLac) мышей [8]. В геноме линии C3H/HeJ, мыши которой склонны к катаlepsии, выявлены все

**Таблица 2.** Гомозиготные миссенс-варианты в главном локусе щипковой каталепсии мышей на хромосоме 13, выявленные в секвенированных геномах мышей трех линий, предрасположенных к каталепсии, и отсутствующие в геноме мыши из устойчивой к каталепсии линии

Вариант	Идентификатор	Ген	Аминокислотная замена	Эффект, предсказанный с помощью SIFT [23]
13:104069202 T/C	rs50518036	<i>Nln</i>	H148R	tolerated(0.35)
13:104111134 G/A	rs51459950	<i>Sgtb</i>	C7Y	deleterious(0.01)
13:104111173 A/G	rs50301687	<i>Sgtb</i>	N20S	tolerated(0.99)
13:104174454 T/C	rs51569005	<i>Shld3</i>	I150V	tolerated(0.41)
13:104174470 G/T	rs219600951	<i>Shld3</i>	S144R	tolerated(0.68)
13:104220239 T/C	rs221133823	<i>Ppwd1</i>	E256G	tolerated(0.23)
13:104220303 A/G	rs49763463	<i>Ppwd1</i>	Y235H	tolerated(0.11)
13:104230784 G/T	rs48594661	<i>Cenpk</i>	V43L	tolerated(1)
13:104312759 T/A	rs45772491	<i>Adamts6</i>	S226T	tolerated(0.29)

девять миссенс-вариантов, как и в линии СВА, однако в двух других линиях мышей с каталепсией (А/Не, BALB/cJ) присутствует только один из этих вариантов – замена His146Arg в гене *Nln*. Таким образом, в главном локусе щипковой каталепсии мышей на хромосоме 13 выявлена единственная замена T > C (rs50518036) в кодирующей области гена нейрוליрина *Nln*, присутствующая у всех исследованных мышей из линий СВА, АКР.СВА-D13Mit76 и ASC, а также в геномах мышей из линий СЗН/HeJ, А/Не, BALB/cJ из GenBank, склонных к каталепсии, и отсутствующая в геномах мышей, устойчивых к каталепсии (линии АКР/J, С57BL/6J, DBA/1J).

Нейрוליзин – это металлоэндопептидаза, участвующая в деградации нейротензина и брадикинина, которые являются фармакологическими индукторами каталепсии у мышей [24–27]. Во всех линиях мышей, склонных к каталепсии, в положении 146 продукта гена *Nln* присутствует гистидин, в то время как устойчивые к каталепсии линии, включая АКР, содержат аргинин. Данные, свидетельствующие о связи вариантов в гене *Nln* с каталепсией, ранее не были получены, однако продукт этого гена участвует в расщеплении нейротензина, который может вызывать каталепсию у мышей [24]. Таким образом, ген *Nln* является наиболее вероятным кандидатом на роль основного гена наследственной щипковой каталепсии у мышей.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В результате полногеномного секвенирования склонных и устойчивых к каталепсии линий мы-

шей мы показали, что связанный со щипковой каталепсией участок хромосомы 13 расположен в области 103.92–106.16 млн п.н., а также выявили мутацию в гене нейрוליрина *Nln*, сцепленную с каталепсией. Главный ген каталепсии, по результатам проведенных ранее исследований, определяет около 20% пенетрантности признака [10]. Принимая во внимание, что каталепсия проявляется у 50% мышей рекомбинантной линии D13Mit76 и у 80% животных склонной к каталепсии линии ASC, оставшаяся пенетрантность признака, вероятно, является результатом влияния генов и/или регуляторных локусов на других хромосомах. Полученные нами на мышинных моделях полногеномные данные наследуемых особенностей поведения, которые у человека являются характерными симптомами таких заболеваний, как шизофрения и депрессивные расстройства, могут в дальнейшем использоваться для идентификации генетических и эпигенетических факторов психических расстройств у человека. ●

*Работа выполнена при частичной поддержке гранта РФФ № 19-75-30039 (биоинформатический анализ баз данных и регуляторных локусов генома человека).*

*Дополнительный материал к этой статье можно найти онлайн по ссылке <https://evolgenomics.org/catalepsy/>*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Singerman B., Raheja R. // *Ann. Clin. Psychiatry*. 1994. V. 6. № 4. P. 259–266.
2. Kolpakov V.G., Gilinsky M.A., Alekhina T.A., Barykina N.N., Nikulina E.M., Voitenko N.N., Kulikov A.V., Shtilman N.I. // *Behav. Processes*. 1987. V. 14. № 3. P. 319–341.
3. Sanberg P.R., Bunsey M.D., Giordano M., Norman A.B. // *Behav. Neurosci*. 1988. V. 102. № 5. P. 748–759.
4. Klemm W.R. // *Prog. Neurobiol*. 1989. V. 32. № 5. P. 403–422.
5. VanderWende C., Spoerlein M.T. // *Neuropharmacology*. 1979. V. 18. № 7. P. 633–637.
6. de Ryck M., Teitelbaum P. // *Behav. Neurosci*. 1984. V. 98. № 2. P. 243–261.
7. Ornstein K., Amir S. // *J. Comp. Physiol. Psychol*. 1981. V. 95. № 5. P. 827–835.
8. Kulikov A.V., Kozlachkova E.Y., Maslova G.B., Popova N.K. // *Behav. Genet*. 1993. V. 23. № 4. P. 379–384.
9. Базовкина Д.В., Куликов А.В., Кондаурова Е.М., Попова Н.К. // *Генетика*. 2005. Т. 41. № 9. С. 1222–1228.
10. Kulikov A.V., Bazovkina D.V., Kondaurova E.M., Popova N.K. // *Genes. Brain. Behav*. 2008. V. 7. № 4. P. 506–512.
11. Tikhonova M.A., Kulikov A.V. // *Chin. J. Physiol*. 2012. V. 55. № 4. P. 284–293.
12. Куликов А.В., Базовкина Д.В., Муазан М.П., Мормэд П. // Доклады РАН. 2003. Т. 293. С. 134–137.
13. Kondaurova E.M., Bazovkina D.V., Kulikov A.V., Popova N.K. // *Genes. Brain. Behav*. 2006. V. 5. № 8. P. 596–601.
14. Куликов А.В., Козлачкова Е.Ю., Попова Н.К. // *Генетика*. 1989. Т. 25. № 8. С. 1402–1408.
15. Kulikov A.V., Kozlachkova E.Y., Kudryavtseva N.N., Popova N.K. // *Pharmacol. Biochem. Behav*. 1995. V. 50. № 3. P. 431–435.
16. Li H., Durbin R. // *Bioinformatics*. 2009. V. 25. № 14. P. 1754–1760.
17. Garcia M., Juhos S., Larsson M., Olason P.I., Martin M., Einfeldt J., DiLorenzo S., Sandgren J., Diaz De Ståhl T., Ewels P., et al. // *F1000Research*. 2020. V. 9. P. 63.
18. McKenna A., Hanna M., Banks E., Sivachenko A., Cibulskis K., Kernytzky A., Garimella K., Altshuler D., Gabriel S., Daly M., et al. // *Genome Res*. 2010. V. 20. № 9. P. 1297–1303.
19. McLaren W., Gil L., Hunt S.E., Singh Riat H., Ritchie G.R.S., Thormann A., Flicek P., Cunningham F. // *Genome Biol*. 2016. V. 17. № 122. P. 1–14.
20. Chen X., Schulz-Trieglaff O., Shaw R., Barnes B., Schlesinger F., Källberg M., Cox A.J., Kruglyak S., Saunders C.T. // *Bioinformatics*. 2016. V. 32. № 8. P. 1220–1222.
21. Buniello A., MacArthur J.A.L., Cerezo M., Harris L.W., Hayhurst J., Malangone C., McMahon A., Morales J., Mountjoy E., Sollis E., et al. // *Nucl. Acids Res*. 2019. V. 47. № D1. P. 1005–1012.
22. Girdhar K., Hoffman G.E., Bendl J., Rahman S., Dong P., Liao W., Hauberg M.E., Sloofman L., Brown L, Devillers O., et al. // *Nat. Neurosci*. 2022. V. 25. № 4. P. 474–483.
23. Adzhubei I.A., Schmidt S., Peshkin L., Ramensky V.E., Gerasimova A., Bork P., Kondrashov A.S., Sunyaev S.R. // *Nat. Methods*. 2010. V. 7. № 4. P. 248–249.
24. Dunn A.J., Snijders R., Hurd R.W., Kramarcy N.R. // *Ann. N. Y. Acad. Sci*. 1982. V. 400. № 1. P. 345–353.
25. Snuders R., Kramarcy N.R., Hurd R.W., Nemeroff C.B., Dunn A.J. // *Neuropharmacology*. 1982. V. 21. № 5. P. 465–468.
26. Bhattacharya S.K., Rao P.J.R.M., Brumleve S.J., Parmar S.S. // *Pharm. Res*. 1986. V. 3. № 3. P. 162–166.
27. Dixon A.K. // *Br. J. Med. Psychol*. 1998. V. 71. № 4. P. 417–445.

УДК 575.162

# Генетические варианты, ассоциированные с бронхиальной астмой, специфичные для населения РФ

Ю. Н. Ахмерова<sup>1#</sup>, Т. А. Шпакова<sup>1#</sup>, К. С. Грамматикати<sup>1#</sup>, С. И. Митрофанов<sup>1#</sup>, П. Г. Казакова<sup>1</sup>, А. А. Мкртчян<sup>1</sup>, П. Ю. Земский<sup>1</sup>, М. Н. Пилипенко<sup>1</sup>, Н. В. Фелиз<sup>1</sup>, Л. В. Фролова<sup>1</sup>, А. А. Фроловская<sup>1</sup>, В. С. Юдин<sup>1</sup>, А. А. Кескинов<sup>1</sup>, С. А. Краевой<sup>1</sup>, С. М. Юдин<sup>1</sup>, В. И. Скворцова<sup>2</sup>

<sup>1</sup>Федеральное государственное бюджетное учреждение «Центр стратегического планирования и управления медико-биологическими рисками здоровью» Федерального медико-биологического агентства (ФГБУ «ЦСП» ФМБА России), Москва, 119121 Россия

<sup>2</sup>Федеральное медико-биологическое агентство (ФМБА России), Москва, 123182 Россия

# Вклад этих авторов в работу равнозначный.

\*E-mail: YUAhmerova@cspfmbaru

Поступила в редакцию 07.11.2022

Принята к печати 09.01.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11853

**РЕФЕРАТ** Бронхиальная астма (БА) – хроническое заболевание, до сих пор не имеющее исчерпывающего протокола лечения. В связи с этим особое внимание привлекает поиск генетических предпосылок возникновения данного заболевания. Широкое распространение получило изучение ассоциаций генетических полиморфизмов ряда генов с бронхиальной астмой. В результате анализа литературы нами отобраны 167 генов, ассоциированных с развитием бронхиальной астмы. С целью биоинформатической проверки ассоциаций известных полиморфизмов генов с развитием бронхиальной астмы и поиска новых была сформирована группа из 7303 человек, добровольно предоставивших свой биоматериал (венозную кровь) для исследований. Эту группу разбили на две когорты, состоящие из лиц с бронхиальной астмой в анамнезе и условно здоровых доноров. Каждую когорту разделили в свою очередь в соответствии с их гендерной принадлежностью. В каждой когорте проанализировали полиморфные варианты отобранных генов и выявили те, встречаемость которых в разных когортах различалась статистически значимо (уровень значимости менее 0.0001). В ходе исследования обнаружено 11 полиморфизмов, влияющих на развитие БА: четыре генетических варианта (rs869106717, rs1461555098, rs189649077, rs1199362453), которые чаще встречаются у мужчин, болеющих бронхиальной астмой, чем у условно здоровых мужчин; пять генетических вариантов (rs1923038536, rs181066119, rs143247175, rs140597386, rs762042586), которые чаще встречаются у женщин с бронхиальной астмой в анамнезе, чем у условно здоровых женщин; два генетических варианта (rs1219244986, rs2291651), редко встречающихся у женщин с бронхиальной астмой в анамнезе.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** бронхиальная астма, полиморфизм, фенотип-генотипические ассоциации, генетические варианты.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** БА – бронхиальная астма; ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; ГДП – гиперактивность дыхательных путей; ГК – глюкокортикостероиды; ИГК – ингаляционные глюкокортикостероиды; ОФВ – объем форсированного выдоха; SNP – однонуклеотидный полиморфизм (single-nucleotide polymorphism); PAF – фактор активации тромбоцитов (platelet-activating factor).

## ВВЕДЕНИЕ

Бронхиальная астма (БА) – хроническое рецидивирующее заболевание, патогенез которого связан с измененной реактивностью бронхов, обусловленной как специфическими иммунологическими, так и неспецифическими механизмами. Основной (обязательный) клинический признак БА – прису-

пы удушья, возникающие вследствие бронхоспазма, гиперсекреции слизи и отека слизистой оболочки бронхов [1].

ВОЗ считает бронхиальную астму одним из самых серьезных неинфекционных заболеваний с хроническим течением. Большинство летальных исходов, вызванных БА, наблюдается в странах



с низким и средним уровнем доходов населения, где выявление и лечение этого заболевания, как и здравоохранение в целом, находятся на недостаточно высоком уровне [2]. В настоящее время до 350 млн человек в мире страдают БА [1], к 2025 году этот показатель может увеличиться до 450 млн [3].

В Российской Федерации, по официальным данным, зарегистрировано 1.3 млн больных БА. Это означает, что распространенность данного заболевания в РФ составляет менее 1%, а доля болеющих БА не достигает 0.4% от всех астматиков в мире. При этом, по данным Европейского общества пульмонологов, распространенность БА в ряде европейских стран составляет 5% среди взрослого населения и более 7% среди детей. Во многих странах отмечена тенденция к росту инвалидизации и смертности в результате БА. Так, в Великобритании смертность от БА за последние 20 лет увеличилась в 7 раз, в Северной Америке – в 2–3 раза. В США от БА ежегодно умирает более 5000 человек.

Возникновение БА обусловлено рядом факторов, в том числе интенсивностью экспозиции аллергенов, разрушением среды обитания, иммунной реактивностью и генетическими особенностями [3]. Показано, что у ребенка, один из родителей которого болен бронхиальной астмой, вероятность развития этого заболевания составляет 25%. Если больны оба родителя, то риск развития БА у ребенка возрастает до 50% [4]. Также доказана связь увеличения частоты БА с повышением загрязнения почвы, воздуха и воды [5].

В 2018 году прямые затраты российского здравоохранения на лечение БА составили около 8.5 млрд рублей, две трети из которых пришлось на оплату стационарного лечения. Кроме того, значительные средства требуются на выплаты по листкам нетрудоспособности и пособиям по инвалидности [6]. Ранняя диагностика и предупреждение развития БА помогут не только снизить эти затраты, но и уменьшить распространенность бронхиальной астмы в России.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Формирование когорт

Манифестация и характер течения БА у женщин и мужчин существенно различаются, что в значительной мере обусловлено разной вовлеченностью половых гормонов в патогенез БА [7]. В связи с этим участники данного исследования были разделены на когорты, выделенные как по наличию БА в анамнезе, так и по половому признаку.

Из 7303 участников группы были сформированы четыре когорты:

1А – женщины с подтвержденным диагнозом БА (средний возраст  $52 \pm 10$  лет), 218 человек;

2А – мужчины с подтвержденным диагнозом БА (средний возраст  $41 \pm 12$  лет), 70 человек;

3Н – условно здоровые женщины, в анамнезе которых отсутствует БА, а также иные диагнозы со сходной клинической картиной (средний возраст  $52 \pm 8$  лет), 4015 человек;

4Н – условно здоровые мужчины, в анамнезе которых отсутствует БА, а также иные диагнозы со смежной клинической картиной (средний возраст  $44 \pm 6$  лет), 3000 человек.

Критерием включения в группы 1А и 2А служил диагноз бронхиальная астма в анамнезе. В группы 3Н и 4Н вошли условно здоровые женщины и мужчины, критериями не включения в эти когорты служили записи в анамнезе о заболеваниях, симптомы которых сходны с такими проявлениями БА, как острый бронхит, эмфизема легких, аллергический ринит, гастроэзофагеальный рефлюкс, пищеводно-трахеальный свищ, врожденный порок сердца, трахео- и бронхомаляция, муковисцидоз, первичная цилиарная дискинезия, бронхоэктазы другой этиологии, туберкулез, злокачественные новообразования легкого, сосудистое кольцо, саркоидоз, увеличение внутригрудных лимфоузлов, бронхолегочная дисплазия, аллергический бронхолегочный аспергиллез, системная анафилаксия, первичный иммунодефицит, дисфункция голосовых связок, психогенный кашель, аффективно-респираторные приступы [8].

### Сбор биоматериала и данные участников исследования

В данном исследовании использовали образцы из ранее собранных коллекций ФГБУ «ЦСП» ФМБА России. Во всех случаях соблюдены заданные методикой условия: наличие и корректность данных каждого донора, а именно: пол, возраст, регион проживания, национальность, анамнез; подписанное донором добровольное информированное согласие на забор, обработку, транспортировку и хранение биоматериала, а также использование его личных данных; обеспечение правильного забора, обработки, транспортировки и хранения биоматериала (венозная кровь) в соответствии с ГОСТ Р53079.4-2008.

Все образцы, попавшие в финальную выборку исследования, прошли проверку на уникальность идентификационного кода донора и зашифрованной в этом коде информации, а также проверку на отсутствие признаков гемолиза и хилеза в биоматериале. Транспортировка образцов осуществлена при постоянном контроле температурного режима.

### Формирование перечня генов-кандидатов

В настоящее время описано более 150 генов, ассоциированных с развитием БА. Среди них особый интерес представляют три условные группы генов:

гены атопии. К ним относятся *IL4*, *IL5*, *IL13*, *IL4RA*, *CHI3L1*, *RAD50* и др., определяющие уровень общего и специфических IgE в крови, а также наличие аллергических реакций;

гены бронхиальной гиперактивности, в том числе *ADRB2*, *TNF*, *IL5*, *IL9*, *NOS1*, *NPSR1*, *TAC1*, *TACR2*, *TACR1*, *TACR3*, *ADAM33*, *ACE* и др., определяющие повышенную реактивность бронхов, которая тесно связана с уровнем IgE в крови и воспалительными процессами;

гены воспаления, такие, как *TNF*, *IL4*, *IL5*, *IL13*, *ORMDL3*, *SCGB3A2*, *CCL11*, *IRAK3*, *CSF2*, *ALOX5*, *CYSLTR1*, *CYSLTR2*, *LTC4S*, *STAT3*, *STAT6* и др., определяющие количество медиаторов воспаления за счет регуляции иммунного ответа и поведения клеток воспаления в биологических жидкостях [8].

На основании 107 источников сформирован перечень из 167 генов-кандидатов для поиска фенотип-генотипических ассоциаций. Перечень этих генов с кратким указанием функций кодируемых ими белков представлен в разделе «Обсуждение».

### Выделение ДНК, подготовка геномных библиотек и секвенирование

ДНК из образцов цельной крови выделяли с помощью набора MagAttract HMW DNA Kit (Qiagen, Германия). Протокол выделения ДНК автоматизирован на Tecan Freedom EVO (Tecan, Швейцария). Концентрацию и чистоту выделенной ДНК измеряли с помощью микропланшетного ридера Tecan Infinite® F Nano Plus (Tecan, Швейцария).

Геномные библиотеки для секвенирования подготовлены с использованием набора Nextera DNA Flex (Illumina, США) в соответствии с рекомендациями производителя. При этом каждый образец в проточной кювете метили с помощью индексов из набора IDT-ILMN Nextera DNA UD (Illumina, США).

Концентрации геномных библиотек измеряли на спектрофотометре Tecan Infinite® F Nano Plus. Размер геномных библиотек определяли с помощью системы Agilent TapeStation 4200 с использованием набора Agilent DNA 1000 (Agilent, США). Библиотечные пулы, состоящие из 24 образцов, объединяли с использованием автоматизированной станции Tecan Freedom EVO.

Полногеномное секвенирование проведено с использованием секвенатора NovaSeq 6000 и комплекта реагентов S4 (300 циклов) (Illumina, США) для парноконцевых прочтений  $2 \times 150$  п.н.

### Биоинформатическая обработка данных полногеномного секвенирования

На первом этапе обработки первичных данных секвенирования осуществляли демультипликацию, при которой исходная выдача секвенатора NovaSeq 6000 конвертирована из формата BCL в формат FASTQ с использованием программного обеспечения bcl2fastq v2.20 [9]. Качество секвенирования всей ячейки в целом контролировали с помощью программы Illumina Sequencing Analysis Viewer v2.4.7 [10]. Качество отдельных прочтений контролировали с использованием биоинформатического инструмента FastQC v0.11.9 [11].

В финальную выборку попали образцы крови, прошедшие контроль качества по показателю равномерности распределения нуклеотидов в рядах и по GC-составу.

На втором этапе биоинформатической обработки с помощью DRAGEN [12] проведено выравнивание на референсный геном. В качестве референсного генома использовали последовательность GRCh38.d1.vd1. Образцы крови, среднее покрытие которых по геному составляло менее  $\times 30$ , из исследования исключали.

Наличие дубликатов в выборке проверяли с помощью программы CrossCheck [13]. Все дубликаты образцов из исследования исключали.

### Поиск малых генетических вариантов

Для обработки VCF-файлов и поиска малых вариантов (SNP, индели до 50 п.н.) использовали программное обеспечение Strelka [14].

В 167 генах-кандидатах (7303 образца) обнаружено 380 564 малых генетических варианта, из которых 253 628 встретились более одного раза.

Для выявления полиморфизмов, ассоциированных с развитием БА, использовали методику поиска генетических вариантов, встречаемость которых статистически значимо различается в разных когортах. Для определения степени значимости различий использовали точный тест Фишера.

За нулевую гипотезу принят случай, при котором встречаемость «нулевого» варианта во всех четырех когортах одна и та же. Уровень значимости, при котором отвергалась нулевая гипотеза, принят равным  $10^{-4}$ . Расчеты проведены на языке R.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Сравнение мужских когорт

В результате проведенного нами анализа в интронах генов *TACR3*, *ZNF257*, *FOXP1* и *EGFR* выявлены четыре генетических варианта, встречаемость которых статистически значимо различается (величина

*p* не превышает уровень значимости  $10^{-4}$ ) в когорте мужчин с подтвержденным диагнозом БА и в когорте условно здоровых мужчин. Эти генетические варианты в когорте 2А встречаются значимо чаще (более чем в 5 раз) (табл. 1), чем в когорте 4Н.

В гене *TACR3*, кодирующем рецепторы тахикинов и косвенно влияющем на тонус бронхов [15, 16], обнаружена делеция rs1461555098 (chr4:g.103629850\_103629861del). По нашим расчетам, относительный риск развития БА при наличии этой делеции равен 6.9, тогда как в норме этот показатель составляет 1.0. Как оказалось, делеция rs1461555098 (chr4:g.103629850\_103629861del) встречается в когорте 2А 6.2 раза чаще, чем в 4Н.

В гене *ZNF257*, кодирующем фактор транскрипции (белок с мотивом цинковых пальцев) [17], выявлен генетический вариант rs1199362453 (chr19:g.22076863T>C), который в когорте 2А встречается 3 раза и отсутствует в когорте 4Н.

В гене *FOXP1*, кодирующем фактор транскрипции и экспрессирующемся в проксимальном эпителии дыхательных путей [18], выявлен генетический вариант rs869106717 (chr3:g.71465326del), который в когорте 2А встречается в 33.6 раза чаще, чем в когорте 4Н. Относительный риск развития БА у носителей данной мутации равен 36.0.

В гене *EGFR*, кодирующем трансмембранный рецептор, связывающий внеклеточные лиганды из группы эпидермальных факторов роста [19], генетический вариант rs189649077 (chr7:g.55168296G>T)

в когорте 2А встречается в 143 раза чаще, чем в когорте 4Н. Относительный риск развития БА при данной мутации составляет 34.3.

### Сравнение женских когорт

Показано, что в когорте женщин с подтвержденным диагнозом БА пять генетических вариантов встречаются более чем в 6 раз чаще, чем в когорте условно здоровых женщин (величина *p* не превышает уровень значимости  $10^{-4}$ ). Эти генетические варианты расположены в генах *CYSLTR1*, *IL5RA*, *NRG1*, *HDC* и *DPP10* (табл. 2).

В гене *CYSLTR1*, кодирующем белок, влияющий на выработку медиаторов воспаления – лейкотриенов [16, 20], выявлен вариант rs1923038536 (chrX:g.78306516G>A), который в когорте 1А встречается в 45.8 раза чаще, чем в когорте 3Н. При этом относительный риск развития БА при наличии данной мутации равен 14.2.

В гене *IL5RA*, кодирующем субъединицу гетеродимерного рецептора интерлейкина 5 – цитокина, играющего важную роль в дифференцировке эозинофилов [21], найден генетический вариант rs181066119 (chr3:g.3102851A>G), который в когорте 1А встречается в 36.6 раза чаще, чем в когорте 3Н. При этом относительный риск развития астмы при данной мутации составляет 13.2.

В гене *NRG1*, кодирующем белок, индуцирующий продукцию муцинов клетками бокаловидного эпителия дыхательных путей [22], выявлен генети-

Таблица 1. Полиморфизмы, связанные с развитием бронхиальной астмы у мужчин

Хромосома	Идентификатор полиморфизма	Ген	Встречаемость		<i>p</i>
			когорта 2А, %	когорта 4Н, %	
chr3	rs869106717 (del)	<i>FOXP1</i>	5.71	0.17	$1.1 \times 10^{-5}$
chr4	rs1461555098 (del)	<i>TACR3</i>	12.86	2.07	$2.9 \times 10^{-5}$
chr7	rs189649077 (G>T)	<i>EGFR</i>	4.29	0.03	$2.4 \times 10^{-5}$
chr19	rs1199362453 (T>C)	<i>ZNF257</i>	4.29	0.00	$4.5 \times 10^{-5}$

Таблица 2. Полиморфизмы, связанные с развитием бронхиальной астмы у женщин

Хромосома	Идентификатор полиморфизма	Ген	Встречаемость		<i>p</i>
			когорта 1А, %	когорта 3Н, %	
chrX	rs1923038536(G>A)	<i>CYSLTR1</i>	2.29	0.05	$6.7 \times 10^{-6}$
chr1	rs1219244986(T>C)	<i>MUC1</i>	1.83	9.46	$1.5 \times 10^{-5}$
chr3	rs2291651(G>C)	<i>MUC4</i>	83.03	91.88	$5.0 \times 10^{-5}$
chr3	rs181066119(A>G)	<i>IL5RA</i>	1.83	0.05	$9.5 \times 10^{-5}$
chr8	rs143247175(T>A)	<i>NRG1</i>	1.83	0.05	$9.5 \times 10^{-5}$
chr15	rs140597386(dup)	<i>HDC</i>	4.13	0.67	$6.0 \times 10^{-5}$
chr2	rs762042586(del)	<i>DPP10</i>	1.83	0.05	$9.5 \times 10^{-5}$

ческий вариант rs143247175 (chr8:g.32692193T>A), который, как и предыдущий вариант, встречается в когорте 1А в 36.6 раза чаще, чем в когорте 3Н. Относительный риск развития БА при этой мутации также равен 13.2.

Ген *HDC* кодирует фермент, катализирующий синтез гистамина из L-гистидина [23]. В этом гене выявлен генетический вариант rs140597386 (chr15:g.50261726dup), который в когорте 1А встречается в 6.2 раза чаще, чем в когорте 3Н. Относительный риск развития БА у носителей данной мутации равен 5.0.

В гене *DPP10*, кодирующем мембранный белок семейства сериновых протеаз [16], выявлен генетический вариант rs762042586 (chr2:g.115490670del), который в когорте 1А встречается в 36.6 раза чаще, чем в когорте 3Н. Относительный риск развития БА при наличии данной мутации равен 13.2.

Генетические варианты rs2291651 (chr3:g.195751141G>C) и rs1219244986 (chr1:g.155189991T>C) в генах *MUC1* и *MUC4* у женщин-астматиков встречаются существенно реже, чем у условно здоровых женщин. Это значит, что выявленные варианты можно рассматривать как протективные при БА [24]. Гены *MUC1* и *MUC4* кодируют муцины. При этом ген *MUC1* оказывает противовоспалительное действие при бронхолегочных заболеваниях. *MUC4* опосредованно влияет на пролиферацию клеток эпителия дыхательных путей [25]. Генетический вариант rs2291651 (chr3:g.195751141G>C) в гене *MUC4* в когорте 1А встречается несколько реже, чем в когорте 3Н. При этом относительный риск развития БА при наличии данной мутации равен 0.5, тогда как в норме этот показатель равен 1.0. Это свидетельствует о снижении риска развития бронхиальной астмы у женщин, имеющих генетический вариант rs2291651, в 2 раза. Относительный риск развития БА у женщин с генетическим вариантом rs1219244986 (chr1:g.155189991T>C) равен 0.2, т.е. ниже единицы, что соответствует снижению вероятности развития заболевания в 5 раз.

Однако необходимо принять во внимание тот факт, что обнаруженные варианты в генах *MUC1* и *MUC4* находятся в GC-богатых регионах. Такое расположение негативно влияет на качество секвенирования и, соответственно, определения генетических вариантов.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Нами проведен анализ генов, которые рассматриваются как ассоциированные с БА. Выявлены 11 полиморфизмов, встречаемость которых существенно различается у лиц с диагнозом БА и без такого диа-

гноза. При этом девять выявленных генетических вариантов увеличивают риск развития БА, тогда как два варианта снижают его. Эти девять вариантов увеличивают риск БА в 5 раз и более. Данные варианты свойственны населению Российской Федерации.

Согласно [26], до 45% женщин, болеющих бронхиальной астмой, испытывают ухудшение состояния в предменструальный период. В 2020 году полиморфизм rs2291651 в гене *MUC4* был описан как один из сопутствующих признаков эндометриоза у женщин в Южной Корее [27]. В этой работе анализировали взаимосвязь между однонуклеотидными полиморфизмами в генах *MUC1* и *MUC4* и риском развития эндометриоза. Проведение скрининга выявило восемь генетических вариантов *MUC4*, в том числе rs2291651, присутствие которых коррелировало с развитием эндометриоза. Более легкие приступы БА отмечены у женщин репродуктивного возраста, которые использовали некоторые оральные контрацептивы [28]. В ряде исследований [29, 30] также показано, что колебания уровней эстрадиола и прогестерона в ходе менструального цикла влияют на выраженность симптомов бронхиальной астмы. Это означает, что при изучении генетической предрасположенности к тяжелому течению БА у женщин особое внимание следует уделять генам, связанным с женскими половыми гормонами.

В ходе исследования нами рассмотрено 167 генов-кандидатов, ассоциированных с бронхиальной астмой. В число этих генов входят *HNMT*, *MS4A2*, *HRH1*, *HRH2*, *HRH3*, *HRH4*, *AOC1*, *HDC*, кодирующие гистаминовые рецепторы, которые участвуют в процессе регуляции высвобождения гистамина [16, 23, 31–33].

Ген *HDC* кодирует фермент гистидиндекарбоксилазу, который катализирует образование гистамина из L-гистидина, а уровень мРНК *HDC* повышен у больных астмой [23];

*IL3*, *IL4*, *IL4R*, *IL5*, *IL9*, *IL13*, *IL17*, *IL21R*, *IL18*, *IL18R1*, *IL2RB*, *IL1RL1*, *IL5RA*, *IL33*, *SCGB3A2*, *TNF*, *CCL11*, *IRAK3*, *CSF2*, *TSLP* кодируют цитокины, которые участвуют в воспалительных процессах. Например, *IL5* стимулирует высвобождение эозинофилов в кровотоки, а *IL5RA* регулирует их активность. Воздействие аллергенов на дыхательные пути увеличивает локальную концентрацию *IL5*, что коррелирует со степенью эозинофилии дыхательных путей, а *IL4RA* кодирует альфа-цепь рецептора *IL4*, который может связывать *IL4* и *IL13* для регуляции выработки IgE [4, 16, 21, 23, 34–40];

*IL17F* кодирует провоспалительный цитокин, который участвует в патофизиологических проявлениях астмы. Исследования *in vivo* и *in vitro* по-

казали, что IL17F участвует в патогенезе аллергического воспаления дыхательных путей [41];

*ADRB2* кодирует бета-2-адренорецепторы, играющие важную роль в контрактильности дыхательных путей. Бета-2-адренорецепторы являются мишенью для  $\beta_2$ -агонистов, обладающих выраженной бронходилатирующей и бронхопротективной активностью, что имеет значение для оценки эффективности терапии БА [16];

*PLA2G7* кодирует ацетилгидролазу фактора активации тромбоцитов. Этот фермент катализирует расщепление PAF путем гидролиза ацетильной группы до биологически неактивных продуктов [31];

*ALOX5*, *CYSLTR1*, *CYSLTR2*, *LTC4S* кодируют белки, влияющие на выработку медиаторов воспаления – лейкотриенов, способствующих развитию различных аллергических реакций и реакций гиперчувствительности. Показано, что изменение экспрессии некоторых из них может вызывать бронхоконстрикцию дыхательных путей и гиперреактивность к бронхоконстрикторным агентам, таким, как гистамин, повышенная проницаемость сосудов, отек, повышение уровня эозинофилов и нейтрофилов, пролиферация гладкой мускулатуры, отложение коллагена и фиброз в различных тканевых участках, секреция муцина клетками бокаловидного эпителия, метаплазия бокаловидных клеток и гипертрофия эпителиальных клеток органов дыхательной системы [16, 20, 42];

*PTGER2*, *PTGDR* кодируют рецепторы простагландинов и участвуют в патогенезе БА [16, 43];

*TBX21*, *TBX5* кодируют белки – факторы активации транскрипции, экспрессия этих факторов снижена в Т-клетках дыхательных путей больных астмой [16, 44];

*STAT6* кодирует фактор активации транскрипции семейства STAT; экспрессия этого гена значительно повышена у больных тяжелой формой БА [16];

ген *STAT3* кодирует фактор активации транскрипции семейства STAT, который опосредует клеточные ответы на интерлейкины и действует как регулятор воспалительного ответа [45, 46];

*STAT4* кодирует фактор активации транскрипции семейства STAT, экспрессия этого гена снижена у больных БА [47];

*NPSR1* кодирует рецептор нейропептида S, повышение экспрессии этого гена в эпителии дыхательных путей вызывает активацию матриксных металлопротеиназ, которые участвуют в патогенезе БА [16, 48];

*TAC1*, *TACR2*, *TACR1*, *TACR3* кодируют рецепторы тахикининов, которые содержатся в чувствительных нервных окончаниях, активируются под влиянием медиаторов воспаления (гистамина, фактора актива-

ции тромбоцитов, лейкотриенов) и включают в патогенез астмы механизм аксон-рефлекс, тем самым увеличивая и распространяя первоначальное воспаление. Тахикинины влияют на тонус бронхов и проницаемость кровеносных сосудов [16];

*CHI3L1* кодирует гликопротеин семейства гликозилгидролаз, играет роль в развитии воспалительной реакции по  $T_H2$ -типу [16, 49];

*DENND1B* кодирует белок, взаимодействующий с фактором некроза опухоли и играющий важную роль в подавлении Т-клеточных рецепторов на  $T_H2$ -клетках [50, 51];

*ADAM33* кодирует металлопротеазу. *ADAM33* экспрессируется в различных типах клеток дыхательных путей. Экспрессия гена *ADAM33* повышена у пациентов с БА, а нарушение функций этой металлопротеазы может быть связано с гиперреактивностью бронхов и ремоделированием стенки дыхательных путей, что способствует ранней манифестации бронхиальной астмы [52];

*ORMDL1*, *ORMDL2*, *ORMDL3* кодируют ORM-подобные белки – ключевые регуляторы серинпальмитойлтрансферазы, которая катализирует начальный этап биосинтеза сфинголипидов. Сфинголипиды играют важную роль в передаче сигналов в ответ на стресс, а также влияют на механические свойства клеточных мембран. Нарушение регуляции биосинтеза сфинголипидов связано с некоторыми заболеваниями, включая аллергические и воспалительные реакции, а также астму [53, 54];

*VIP* кодирует вазоактивный пептид, расслабляющий гладкую мускулатуру [55];

гены семейства *NOS* кодируют синтетазы оксида азота. Мутации в гене *NOS1* приводят к снижению концентрации оксида азота при неэозинофильном фенотипе, что является маркером бронхиальной астмы, и к бронхиальной гиперактивности [56–58];

*ACE* кодирует ангиотензин, который превращает ангиотензин I в вазоактивный ангиотензин II, участвует в патогенезе БА, вызывая пролиферацию и повышенную сократимость гладких мышц, вызывая обструкцию легких [59];

белок *RAD50*, кодируемый геном *RAD50*, участвует в репарации двухцепочечных разрывов ДНК. На трансгенных мышцах показано, что фрагмент 3'-концевой области этого гена является LCR (locus control region)  $T_H2$ , регулирующим экспрессию генов цитокинов [60];

*PTAFR* кодирует рецептор фактора активации тромбоцитов – хемотаксического фосфолипидного медиатора, который обладает сильной воспалительной, сократительной и гипотензивной активностью в отношении гладких мышц. Рецептор PAF участвует в различных патологических процессах, таких,

как аллергия, астма, септический шок, артериальный тромбоз и воспалительные процессы [16];

*OPN3* кодирует рецептор, связанный с G-белком. Повышенная экспрессия *OPN3* выявлена в эпителии бронхов, а также в иммунных клетках. Мутации в гене *OPN3* повышают риск развития бронхиальной астмы [20, 61];

*GSDMB* кодирует белок, сверхэкспрессия которого в клетках бронхиального эпителия увеличивает экспрессию генов, важных как для ремоделирования дыхательных путей, так и для их гиперреактивности [16, 62];

*PKN2* кодирует серин/треониновую протеинкиназу, регулирует формирование апикального соединения в бронхиальном эпителии человека [63];

*PTK2* кодирует тирозиновую протеинкиназу, играет важную роль в гиперреактивности и ремоделировании дыхательных путей [63];

*ALPP* кодирует плацентарную щелочную фосфатазу, катализирующую гидролиз моноэфиров фосфорной кислоты, уровень экспрессии этого гена ассоциирован с детской БА [63];

*PTEN* кодирует фосфатидилинозитол-3,4,5-трифосфат-3-фосфатазу [20]. Низкая экспрессия гена *PTEN* рассматривается как один из независимых факторов развития БА [64];

*PRMT1* кодирует важный эпигенетический регулятор – белок-аргинин-метилтрансферазу-1, которая способствует воспалению и ремоделированию дыхательных путей при БА [65];

*HSPD1* кодирует белок теплового шока, который может модулировать иммунные и воспалительные реакции, участвовать в патогенезе и/или быть маркером риска и прогноза развития некоторых заболеваний, включая БА [66];

*TLR2* и *TLR4* кодируют белки, входящие в семейство Toll-подобных рецепторов, необходимые для распознавания патогенов и активации врожденного иммунитета. Некоторые полиморфизмы в этих генах связаны с риском развития БА [67];

*ZNF208*, *ZNF257*, *ZNF676*, *ZNF729*, *ZNF98*, *ZNF492*, *ZNF99*, *ZNF723*, *ZNF728*, *ZNF730*, *ZNF91* кодируют белки с мотивами «цинковых пальцев», локализованные в области кластера факторов транскрипции, связанных с патогенезом БА [17];

*B4GALT1* кодирует бета-1,4-галактозилтрансферазу, связан с атопическими фенотипами и воспалительными состояниями [68];

*IGFBP3* кодирует белок, связывающий инсулиноподобный фактор роста, блокирующий специфические физиологические последствия астмы IGF-независимым образом [69];

гены семейства *MUC* кодируют муцины. *MUC7* кодирует муцин слюны, частота аллеля *MUC7* с пя-

тью tandemными повторами значительно снижена при астме [20, 70]. На поздних стадиях бактериальной инфекции *MUC1* играет противовоспалительную роль в дыхательных путях, которая инициируется и опосредуется подавлением передачи сигналов Toll-подобного рецептора [24]. Муцин *MUC4* идентифицирован как лиганд, активирующий рецепторную тирозинкиназу, которая модулирует пролиферацию эпителиальных клеток дыхательных путей при астме [25], *MUC19* экспрессируется в основном в клетках подслизистых желез трахеи и слюнных желез, при аллергическом рините и хроническом среднем отите этот ген экспрессируется в эпителии. *MUC5AC* экспрессируется в бокаловидных клетках трахеального и бронхиального эпителия. *MUC5B* также экспрессируется в эпителии и протоках подслизистой железы и, в меньшей степени, в бокаловидных клетках как трахеального, так и бронхиального эпителия. У многих индивидов с подтвержденным диагнозом бронхиальная астма повышен уровень мРНК *MUC5AC*, но понижен уровень мРНК *MUC5B* [71];

*NRG1* кодирует белок, который индуцирует выработку муцинов *MUC5AC* и *MUC5B* бокаловидными клетками эпителия дыхательных путей человека, поэтому его ингибирование можно рассматривать как новый терапевтический подход к снижению гиперсекреции слизи при респираторных заболеваниях [22];

*DACT1*, *DACT2* и *DACT3* кодируют белки, участвующие в патогенезе БА. В тканях больных астмой значительно повышены уровни мРНК *DACT1*, *DACT2* и *DACT3* [72];

группа генов *CYP* кодирует белки цитохромов, которые вовлечены в метаболизм многих лекарственных средств, включая нестероидные противовоспалительные средства, пероральные антикоагулянты и антагонисты рецепторов ангиотензина, в синтез холестерина, стероидов и других липидов [20, 70, 73–77];

*CHML* кодирует Rab геранилгеранилтрансферазу, регулирующую внутриклеточный транспорт мембранных структур. Полиморфизмы в этом гене ассоциированы с развитием БА [61];

*GSTT2* и *GSTP1* кодируют глутатион-S-трансферазу тета-2 и глутатион-S-трансферазу P, полиморфизмы в этих генах могут быть факторами риска развития БА [78];

*NAT2* кодирует N-ацетилтрансферазу 2, полиморфизмы в этом гене ассоциированы с развитием атопической астмы [79];

*PYHIN1* кодирует интерферон-индуцируемый белок HIN-200, который принимает участие в выработке провоспалительных цитокинов в эпителиальных клетках дыхательных путей [80];

промотор гена *SMAD3* значительно гиперметилирован у пациентов, страдающих БА [81];

*PGAP3* кодирует гликозилфосфатидилинозитол-специфическую фосфолипазу, которая преимущественно локализуется в аппарате Гольджи. Белки *PGAP3* и *ORMDL3* могут способствовать развитию БА [82];

*ERBB2* кодирует рецепторную тирозинкиназу эпидермального фактора роста. Экспрессия *ERBB2* ниже в свежeweыделенных астматических клетках эпителия дыхательных путей, чем в клетках здоровых людей [83];

*COL15A1* кодирует альфа-цепь коллагена типа XV, входящего в семейство коллагенов FACIT [16], вовлечен в метаболизм лекарственных средств, применяемых при заболеваниях легких [84];

*FOXP1* кодирует фактор транскрипции семейства FOXO, экспрессирующийся в проксимальном эпителии дыхательных путей в легких, снижение экспрессии *FOXP1* ингибирует раннюю дифференцировку секреторных клеток [18];

*ACOT7* кодирует белок из семейства ацилкоэнзимов, эпигеномное ассоциативное исследование продемонстрировало связь степени метилирования с развитием бронхиальной астмы [85];

*MTHFR* кодирует фермент метилентетрагидрофолатредуктазу. Полиморфизмы гена *MTHFR* ассоциированы с предрасположенностью к бронхиальной астме и эффективностью глюкокортикостероидов у людей [86];

*DICER1* кодирует РНК-хеликазу, участвующую в продукции цитокинов и передаче сигналов при БА [87];

*SERPINC1* кодирует антитромбин III, выступающий ингибитором факторов свертывания крови, изменение уровня которого может приводить к тромбообразованию, легочной эмболии [88];

*SYNM* кодирует промежуточный филамент, существует предположение об участии уровня метилирования этого гена в развитии БА [89];

*GATA3* кодирует транскрипционный фактор семейства GATA. Экспрессия *GATA3* значительно возрастает в дыхательных путях при астме. Увеличение экспрессии *GATA3* коррелирует с изменением экспрессии *IL5* и появлением гиперактивности бронхов [90];

*FOXP3* кодирует фактор активации транскрипции, экспрессия этого гена снижена у больных астмой [91];

*CCDC80*, *DAPK3*, *LOXL1*, *PROC*, *FUCA2*, *SP100*, *ITCH* кодируют белки, связанные с презентацией антигена Т-лимфоцитам. Выявлено повышение уровня метилирования этих генов при астме [76];

ген *VDR* кодирует рецептор витамина D3. У детей с БА часто встречаются генетические вариан-

ты в гене *VDR*, которые отрицательно коррелируют с тяжестью течения астмы [92];

*DPP10* кодирует мембранный белок семейства сериновых протеаз. Мутации в этом гене повышают риск развития БА [16, 93];

генетические варианты в генах *PHF11*, *SPP1*, *PLAUR* ассоциированы с повышением уровня IgE [94];

*SLC22A5* кодирует переносчик органических катионов, уровень экспрессии этого гена снижен в бронхиальном эпителии больных астмой [95];

*EPHX1* кодирует микросомальную эпоксидгидролазу. Высокий уровень экспрессии *EPHX1* связан с повышенным риском развития БА в течение жизни [96];

*CTLA4* кодирует один из белков суперсемейства иммуноглобулинов. Результаты проведенного мета-анализа показывают, что некоторые полиморфизмы в этом гене выступают в роли факторов риска развития БА [16, 97];

*MMP9* кодирует матриксную металлопротеазу, участвующую в локальном протеолизе внеклеточного матрикса, миграции лейкоцитов и ремоделировании дыхательных путей [98];

*SOCS5* кодирует белок, принадлежащий семейству супрессоров цитокиновой сигнализации. Однонуклеотидные полиморфизмы, идентифицированные в этом гене, ассоциированы с развитием БА [99];

полиморфизмы в гене *FCER2*, кодирующем CD23, ассоциированы с атопией, повышенным риском обострений у пациентов с астмой и высокими уровнями IgE в сыворотке [100];

*VEGFA* кодирует гепаринсвязывающий белок, один из факторов роста PDGF/VEGF. При БА наблюдается повышение экспрессии этого гена [101];

*ASB3* кодирует белок, который участвует в пролиферации клеток гладкой мускулатуры и в развитии мышечных клеток. Полногеномное ассоциативное исследование выявило связь между полиморфизмами в этом гене и развитием БА [102];

*CRISPLD2* кодирует секреторный белок LCCL, который увеличивает чувствительность к глюкокортикостероидам и регулирует иммунный ответ [103];

по данным полногеномного ассоциативного исследования полиморфизмы в генах *APOBEC3B*, *APOBEC3C*, *EDDM3B* ассоциированы с обострениями БА [104];

полногеномное ассоциативное исследование выявило связь между полиморфизмами в гене *BBS9* с эффективностью терапии астмы у детей [105];

*PRKG1* кодирует циклоGMP-зависимую протеинкиназу – ключевого медиатора сигнального пути

оксида азота (NO)/сGMP – и играет роль в расслаблении тонуса гладкой мускулатуры [16];

*DNAH5* кодирует белок динеин. Экспрессия *DNAH5* снижена в бронхиальном эпителии больных астмой по сравнению с группой контроля [106];

*JAK1* и *JAK2* кодируют тирозинкиназы, участвующие в сигнальных путях воспалительных цитокинов, связанные с увеличенной частотой обострений бронхиальной астмы и повышенной восприимчивостью к аллергической сенсibilизации и антигенам окружающей среды [107, 108];

*CHRNA1* и *CHRNA3* кодируют никотиновые ацетилхолиновые рецепторы. Полиморфизмы в этих генах относятся к генетическим факторам риска бронхиальной обструкции [109];

*TGF-β* кодирует секретлируемый лиганд надсемейства белков TGF-β. Изоформы TGF-β играют роль в регуляции воспаления дыхательных путей и процесса их ремоделирования [110];

варианты в гене *HHIP* ассоциированы с хронической обструктивной болезнью легких [111];

*SOD3* кодирует супероксид-дисмутаза. Экспрессия *SOD3* повышена у больных БА, а некоторые генетические варианты этого гена влияют на распределение внеклеточной супероксид-дисмутаза в легких и снижают вероятность проявления симптомов БА [112];

*EGFR* кодирует трансмембранный рецептор, связывающий внеклеточные лиганды из группы эпидермальных факторов роста. В биоптатах больных астмой часто выявляют участки повреждения эпителия, которые иммуноокрашиваются EGFR, по-

вышенная экспрессия *EGFR* наблюдается также в морфологически интактном «астматическом» эпителии [19];

*SLC11A1* кодирует белок-переносчик двухвалентного железа и марганца. В ряде исследований установлена связь полиморфизмов в этом гене с развитием заболеваний легких [113];

*ZPBP2* кодирует белок, который экспрессируется в железистом эпителии бронхов. Уровни метилирования этого гена различаются у здоровых и больных БА [114].

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Обнаруженные в ходе исследования генетические варианты ряда генов, повышающие и снижающие относительный риск развития БА, могут помочь в ранней диагностике бронхиальной астмы, а также способствовать правильной постановке диагноза в спорных случаях. В перспективе анализ образцов, полученных от жителей разных регионов, поможет оценить географическое распространение генетических вариантов риска и картировать не только заболеваемость БА, но и адекватно распределить по регионам потоки финансовых и материальных средств, а также квалифицированные медицинские кадры. Заблаговременное, в том числе пренатальное, выявление лиц, склонных к БА, а также корректная постановка диагноза повысят качество медицинской помощи, снизят инвалидизацию и смертность от бронхолегочных событий, уменьшат прямые и косвенные финансовые затраты на борьбу с бронхиальной астмой. ●

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Межрегиональная общественная организация Российское респираторное общество, Всероссийская общественная организация аллергологов и клинических иммунологов, Общероссийская общественная организация Союз педиатров России, Научный совет Министерства здравоохранения Российской Федерации. Клинические рекомендации. Бронхиальная астма. М., 2021. С. 7.
- Vos T., Lim S.S., Abbafati, C., Abbas K.M., Abbasi M., Abbasifard M., Abbasi-Kangevari M., Abbastabar, H., Abd-Allah F., Abdelalim A., et al. // *Lancet*. 2020. V. 396. № 10258. P. 1204–1222.
- Заикина М.В. Бронхиальная астма у молодых мужчин: ранние изменения функционального состояния кардиореспираторной системы: Дис. ... канд. мед. наук. Пермь: Пермский гос. мед. ун-т, 2017. 153 с.
- Асанов А.Ю., Намазова Л.С., Пинелис В.Г., Журкова Н.В., Вознесенская Н.И. // *Педиатр. фармакол.* 2008. Т. 5. № 4. С. 31–37.
- The European Community Respiratory Health Survey II // *Eur. Resp. J. Eur. Resp. Soc.* 2002. V. 20. № 5. P. 1071–1079.
- Белевский А.С., Зайцев А.А. // *Мед. совет.* 2018. № 15. С. 60–68.
- Yung J.A., Fuseini H., Newcomb D.C. // *Ann. Allergy Asthma Immunol.* 2018. V. 120. № 5. P. 488–494.
- Чучалин А.Г., Абелевич М.М., Архипов В.В., Астафьева Н.Г., Ашерова И.К., Балаболкин И.И., Балева Л.С., Баскакова А.Е., Блохин Б.М., Богорад А.Е. и др. Национальная программа «Бронхиальная астма у детей. Стратегия лечения и профилактика». 4-е изд. М., 2012. С. 11.
- Holtgrewe M., Messerschmidt C., Nieminen M., Beule D. // *Bioinformatics*. 2020. V. 36. № 6. P. 1983–1985.
- Wright M.N., Gola D., Ziegler A. // *Statistical Human Genetics*. 2017. V. 1666. P. 629–647.
- de Sena Brandine G., Smith A.D. // *F1000Res*. 2021. V. 8. P. 1874.
- Miller N.A., Farrow E.G., Gibson M., Willig L.K., Twist G., Yoo B., Marrs T., Corder S., Krivohlavek L., Walter A., et al. // *Genome Medicine*. 2015. V. 7. № 1. P. 100.
- Najafov J., Najafov A. // *Nature*. 2017. V. 7. P. 5855.
- Saunders C.T., Wong W.S.W., Swamy S., Becq J., Murray L.J., Cheetham R.K. // *Bioinformatics*. 2012. V. 28. № 14. P. 1811–1817.
- Ramalho R., Soares R., Couto N., Moreira A. // *BMC Pulm Med*. 2011. V. 11. P. 41–48.
- Stelzer G., Rosen N., Plaschkes I., Zimmerman S., Twik M.,



- Fishilevich S., Stein T.I., Nudel R., Lieder I., Mazor Y., et al. // *Curr. Protoc. Bioinformatics*. 2016. V. 54. P. 1.30.1–1.30.33.
17. Карунас А.С., Юнусбаев Б.Б., Федорова Ю.Ю., Гималова Г.Ф., Рамазанова Н.Н., Гурьева Л.Л., Мухтарова Л.А., Загидуллин Ш.З., Эткина Э.И., Хуснутдинова Э.К. // *Молекуляр. биология*. 2011. Т. 11. № 6. С. 992–1003.
18. Li S., Wang Y., Zhang Y., Lu M.M., DeMayo F.J., Dekker J.D., Tucker P.W., Morrisey E.E. // *Development*. 2012. V. 139. № 14. P. 2500–2509.
19. Puddicombe S.M., Polosa R., Richter A., Krishna M.T., Howarth P.H., Holgate S.T., Davies D.E. // *FASEB J*. 2000. V. 14. № 10. P. 1362–1374.
20. UniProt Consortium. // *Nucl. Acids Res*. 2021. V. 49. P. D480–D489.
21. Cheong H.S., Kim L.H., Park B.L., Choi Y.H., Park H.S., Hong S.J., Choi B.W., Park C.S., Shin H.D. // *J. Hum. Genet*. 2005. V. 50. № 12. P. 628–634.
22. Zuiker R.G., Tribouley C., Diamant Z., Boot J.D., Cohen A.F., van Dyck K., De Lepeleire I., Rivas V.M., Malkov V.A., Burggraaf J., et al. // *Eur. Clin. Respir. J*. 2016. V. 3. P. 31324.
23. Yamauchi K. // *Nihon Rinsho*. 1996. V. 54. № 2. P. 377–388.
24. Kato K., Lillehoj E.P., Lu W., Kim K.C. // *J. Clin. Med*. 2017. V. 6. № 12. P. 110.
25. Damera G., Xia B., Sachdev G.P. // *Respiratory Res*. 2006. V. 7. № 1. P. 39.
26. Arathimos R., Granell R., Haycock P., Richmond R.C., Yarmolinsky J., Relton C.L., Tilling K. // *Thorax*. 2019. V. 74. № 7. P. 633–642.
27. Yen C.-F., Kim M.-R., Lee C.-L. // *Gynecol. Minim. Invasive Ther*. 2019. V. 8. № 1. P. 4–11.
28. Nwaru B.I., Tibble H., Shah S.A., Pillinger R., McLean S., Ryan D.P., Critchley H., Price D.B., Hawrylowicz C.M., Simpson C.R., et al. // *Thorax*. 2021. V. 76. № 2. P. 109–115.
29. Chowdhury N.U., Guntur V.P., Newcomb D.C., Wechsler M.E. // *Eur. Respir. Rev*. 2021. V. 30. № 162. P. 210067.
30. Yung J.A., Fuseini H., Newcomb D.C. // *Ann. Allergy Asthma Immunol*. 2018. V. 120. № 5. P. 488–494.
31. Amberger J.S., Bocchini C.A., Schiettecatte F., Scott A.F., Hamosh A. // *Nucl. Acids Res*. 2015. V. 43. № 7. P. 89–98.
32. Yoshikawa T., Nakamura T., Yanai K. // *Int. J. Mol. Sci*. 2019. V. 20. № 3. P. 737.
33. Szczepankiewicz A., Bręborowicz A., Sobkowiak P., Popiel A. // *Clin. Mol. Allergy*. 2010. V. 8. P. 14.
34. Freihart L.A., Wheeler J.I., Wong A., Turek I., Manallack D.T., Irving H.R. // *Sci. Rep. Nature*. 2019. V. 9. № 1. P. 15468.
35. Matucci A., Bormioli S., Nencini F., Maggi E., Vultaggio A. // *Expert. Rev. Clin. Immunol*. 2021. V. 17. № 1. P. 63–71.
36. Borish L., Steinke J.W. // *Curr. Allergy Asthma Rep*. 2011. V. 11. № 1. P. 7–11.
37. Matera M.G., Rogliani P., Calzetta L., Cazzola M. // *Drugs*. 2020. V. 80. № 5. P. 449–458.
38. Gordon E.D., Palandra J., Wesolowska-Andersen A., Ringel L., Rios C.L., Lachowicz-Scroggins M.E., Sharp L.Z., Everman J.L., MacLeod H.J., et al. // *JCI Insight*. 2016. V. 1. № 14. P. 87871.
39. Zhang Y., Moffatt M.F., Cookson W.O.C. // *Curr. Opin. Pulmonary Med*. 2012. V. 18. № 1. P. 6–13.
40. Elena-Pérez S., Heredero-Jung D.H., García-Sánchez A., Estravís M., Martín M.J., Ramos-González J., Triviño J.C., Isidoro-García M., Sanz C., Dávila I. // *Front. Med. (Lausanne)*. 2021. V. 7. P. 624576.
41. Ota K., Kawaguchi M., Matsukura S., Kurokawa M., Kokubu F., Fujita J., Morishima Y., Huang S.K., Ishii Y., Satoh H., et al. // *J. Immunol. Res*. 2014. V. 2014. P. 602846.
42. Theron A.J., Steel H.C., Tintinger G.R., Gravett C.M., Anderson R., Feldman C. // *J. Immunol. Res*. 2014. V. 2014. P. 608930.
43. García-Solaesa V., Sanz-Lozano C., Padrón-Morales J., Hernández-Hernández L., García-Sánchez A., Rivera-Reigada M.L., Dávila-González I., Lorente-Toledano F., Isidoro-García M. // *Allergol. Immunopathol (Madrid)*. 2014. V. 42. № 1. P. 64–68.
44. Edris A., de Roos E.W., McGeachie M.J., Verhamme K.M.C., Brusselle G.G., Tantisira K.G., Iribarren C., Lu M., Wu A.C., Stricker B.H., Lahousse L. // *Clin. Exp. Allergy*. 2022. V. 52. № 1. P. 33–45.
45. Nikolskii A.A., Shilovskiy I.P., Barvinskaia E.D., Korneev A.V., Sundukova M.S., Khaitov M.R. // *Biochemistry (Moscow)*. 2021. V. 86. № 11. P. 1489–1501.
46. Saik O.V., Demenkov P.S., Ivanisenko T.V., Bragina E.Y., Freidin M.B., Dosenko V.E., Zolotareva O.I., Choynzonov E.L., Hofstaedt R., Ivanisenko V.A. // *J. Integr. Bioinform*. 2018. V. 15. № 4. P. 20180054.
47. Трофимов В.И., Минеев В.Н., Сорокина Л.Н., Нема М.А., Лим В.В., Еремеева А.В. // *Мед. акад. журн*. 2013. Т. 13. № 1. С. 67–72.
48. Pietras C.O., Vendelin J., Anedda F., Bruce S., Adner M., Sundman L., Pulkkinen V., Alenius H., D'Amato M., Söderhäll C., et al. // *BMC Pulm. Med*. 2011. V. 11. P. 39.
49. Komi D.E.A., Kazemi T., Bussink A.P. // *Curr. Allergy Asthma Rep*. 2016. V. 16. № 8. P. 57.
50. Sleiman P.M., Flory J., Imielinski M., Bradfield J.P., Annaiah K., Willis-Owen S.A., Wang K., Rafaels N.M., Michel S., Bonnelykke K., et al. // *N. Engl. J. Med*. 2010. V. 362. № 1. P. 36–44.
51. Fiuzza B.S.D., de Silva M.J., Alcântara-Neves N.M., Barreto M.L., Costa R.D.S., Figueiredo C.A. // *Mol. Immunol*. 2017. V. 90. P. 33–41.
52. Sharma N., Tripathi P., Awasthi S. // *Allergy Rhinol. (Providence)*. 2011. V. 2. № 2. P. 63–70.
53. Paulenda T., Draber P. // *Allergy*. 2016. V. 71. № 7. P. 918–930.
54. Luthers C.R., Dunn T.M., Snow A.L. // *Front. Immunol*. 2020. V. 11. P. 597945.
55. Pavón-Romero G.F., Serrano-Pérez N.H., García-Sánchez L., Ramírez-Jiménez F., Terán L.M. // *Front. Cell. Dev. Biol*. 2021. V. 9. P. 663535.
56. Ferraro V., Carraro S., Bozzetto S., Zanconato S., Baraldi E. // *Asthma Res. Pract*. 2018. V. 4. P. 9.
57. Багожаргалова Б.Ц., Дьякова С.Э., Петрова Н.В., Мизерницкий Ю.Л., Зинченко Р.А. // *Рос. вест. перинатол. педиатр*. 2019. Т. 64. № 5. С. 55–68.
58. Bouzigon E., Monier F., Boussaha M., Le Moual N., Huyvaert H., Matran R., Letort S., Bousquet J., Pin I., Lathrop M., et al. // *PLoS One*. 2012. V. 7. № 5. P. 36672.
59. Сардарян И.С., Желенина Л.А., Галустян А.Н., Коростовцев Д.С., Иващенко Т.Э. // *Рос. вест. перинатол. педиатр*. 2008. Т. 53. № 1. С. 44–48.
60. Li X., Howard T.D., Zheng S.L., Haselkorn T., Peters S.P., Meyers D.A., Bleecker E.R. // *J. Allergy Clin. Immunol*. 2010. V. 125. № 2. P. 328–335.
61. White J.H., Chiano M., Wigglesworth M., Geske R., Riley J., White N., Hall S., Zhu G., Maurio F., Savage T., et al. // *Hum. Mol. Genet*. 2008. V. 17. № 13. P. 1890–1903.
62. Das S., Miller M., Beppu A.K., Mueller J., McGeough M.D., Vuong C., Karta M.R., Rosenthal P., Chouiali F., Doherty T.A., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2016. V. 113. № 46. P. 13132–13137.
63. Krautenbacher N., Flach N., Böck A., Laubhahn K., Laimighofer M., Theis F.J., Ankerst D.P., Fuchs C., Schaub B.

- // Allergy. 2019. V. 74. № 7. P. 1364–1373.
64. Wen X., Yan J., Han X.-R., Zheng G.-H., Tang R., Liu L.-F., Wu D.-M., Lu J., Zheng Y.-L. // *J. Thorac. Dis.* 2018. V. 10. № 1. P. 202–211.
65. Zhai W., Sun H., Li Z., Li L., Jin A., Li Y., Chen J., Yang X., Sun Q., Lu S., et al. // *J. Immunol.* 2021. V. 206. № 1. P. 11–22.
66. Wancheng T., Weici L. // *Respiriology.* 2001. V. 5. P. 227–230.
67. Yang M., Wu T., Cheng L., Wang F., Wei Q., Tanguay R.M. // *Respirat. Res.* 2005. V. 6. № 1. P. 18.
68. Hansel N.N., Diette G.B. // *Proc. Am. Thorac. Soc.* 2007. V. 4. № 1. P. 32–36.
69. Lee Y.-C., Jogie-Brahim S., Lee D.-Y., Han J., Harada A., Murphy L.J., Oh Y. // *J. Biol. Chem.* 2011. V. 286. № 20. P. 17898–17909.
70. McGuckin M., Thornton D., Whitsett J. *Mucosal Immunol.* Cambridge: Acad. Press Books, 2015. V. 1. P. 231–250.
71. Bonser L.R., Erle D.J. // *J. Clin. Med.* 2017. V. 6. № 12. P. 112.
72. Zhang C., Yang P., Chen Y., Liu J., Yuan X. // *Exp. Ther. Med.* 2018. V. 15. № 3. P. 2674–2680.
73. Yildirim Yaroğlu H., Calikoğlu M., Tamer Gümüş L. // *Med. Princ. Pract.* 2011. V. 20. № 1. P. 39–42.
74. Niewiński P., Patkowski J., Orzechowska-Juzwenko K., Hurkacz M., Wolańczyk-Medrala A., Nittner-Marszalska M. // *Adv. Clin. Exp. Med.* 2005. V. 14. P. 1175–1180.
75. Yim E.-Y., Kang H.-R., Jung J.-W., Sohn S.-W., Cho S.-H. // *Asia PacAllergy.* 2013. V. 3. № 4. P. 231–240.
76. Ntontsi P., Photiades A., Zervas E., Xanthou G., Samitas K. // *Internat. J. Mol. Sci.* 2021. V. 22. № 5. P. 2412.
77. Laitinen T. // *Meth. Mol. Biol.* 2007. V. 376. P. 213–234.
78. Liang S., Wei X., Gong C., Wei J., Chen Z., Chen X., Wang Z., Deng J. // *Respirology.* 2013. V. 18. № 5. P. 774–783.
79. Pawlik A., Juzyszyn Z., Gawronska-Szkwarz B. // *Arch. Med. Res.* 2009. V. 40. № 4. P. 264–267.
80. Massa D., Baran M., Bengoechea J.A., Bowie A.G. // *J. Biol. Chem.* 2020. V. 295. № 14. P. 4438–4450.
81. DeVries A., Wlasiuk G., Miller S.J., Bosco A., Stern D.A., Lohman I.C., Rothers J., Jones A.C., Nicodemus-Johnson J., Vasquez M.M., et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2017. V. 140. № 2. P. 534–542.
82. Stein M.M., Thompson E.E., Schoettler N., Helling B.A., Magnaye K.M., Stanhope C., Igartua C., Morin A., Washington C., Nicolae D., et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2018. V. 142. № 3. P. 749–764.
83. Inoue H., Hattori T., Zhou X., Etling E.B., Modena B.D., Trudeau J.B., Holguin F., Wenzel S.E. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2019. V. 143. № 6. P. 2075–2085.
84. Maghsoudloo M., Azimzadeh Jamalkandi S., Najafi A., Masoudi-Nejad A. // *Mol. Med.* 2020. V. 26. № 1. P. 9.
85. Cardenas A., Sordillo J.E., Rifas-Shiman S.L., Chung W., Liang L., Coull B.A., Hivert M.-F., Lai P.S., Forno E., Celedón J.C., et al. // *Nat. Commun.* 2019. V. 10. № 1. P. 3095.
86. Li M., Tang Y., Zhao E.-Y., Chen C.-H., Dong L.-L. // *Zhongguo Dang Dai Er Ke Za Zhi.* 2021. V. 23. № 8. P. 802–808.
87. Hudon Thibeault A.-A., Laprise C. // *Genes (Basel).* 2019. V. 10. № 11. P. 932.
88. Bai J., Zhong J.-Y., Liao W., Hu R., Chen L., Wu X.-J., Liu S.-P. // *Mol. Med. Rep.* 2020. V. 22. № 5. P. 3607–3620.
89. Gunawardhana L.P., Gibson P.G., Simpson J.L., Benton M.C., Lea R.A., Baines K.J. // *Epigenetics.* 2014. V. 9. № 9. P. 1302–1316.
90. Ray A., Cohn L. // *J. Clin. Invest.* 1999. V. 104. № 8. P. 985–993.
91. Vale-Pereira S., Todo-Bom A., Geraldles L., Schmidt-Weber C., Akdis C.A., Mota-Pinto A. // *Clin. Exp. Allergy.* 2011. V. 41. № 4. P. 490–496.
92. Hou C., Zhu X., Chang X. // *Exp. Ther. Med.* 2018. V. 15. № 3. P. 2773–2776.
93. Allen M., Heinzmann A., Noguchi E., Abecasis G., Broxholme J., Ponting C.P., Bhattacharyya S., Tinsley J., Zhang Y., Holt R., et al. // *Nat. Genet.* 2003. V. 35. № 3. P. 258–263.
94. Holloway J.W., Beghe B., Holgate S.T. // *Clin. Exp. Allergy.* 1999. V. 29. P. 1023–1032.
95. Mukherjee M., Brown A., Pritchard D.I., Bosquillon C. // *Physiological Soc.* 2013. V. 30. P. 11.
96. Salam M.T., Lin P.-C., Avol E.L., Gauderman W.J., Gilliland F.D. // *Thorax.* 2007. V. 62. № 12. P. 1050–1057.
97. Zheng Y., Wang H., Luo L., Liao L., You L., Wang J., Li Q. // *Medicine (Baltimore).* 2018. V. 97. № 28. P. 11380.
98. Ohbayashi H., Shimokata K. // *Curr. Drug Targets Inflamm. Allergy.* 2005. V. 4. № 2. P. 177–181.
99. Аверьянов А.Б., Черкашина И.И., Никулина С.Ю., Максимов В.Н., Шестовицкий В.А. // *Терапевтический архив.* 2019. T. 3. С. 27–30.
100. Chan M.A., Gigliotti N.M., Aubin B.G., Rosenwasser L.J. // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2014. V. 50. № 2. P. 263–269.
101. Ding Q., Sun S., Zhang Y., Tang P., Lv C., Ma H., Yu Y., Xu S., Deng Z. // *COPD.* 2020. V. 15. P. 357–365.
102. Israel E., Lasky-Su J., Markezich A., Damask A., Szefer S.J., Schuemann B., Klanderma B., Sylvia J., Kazani S., Wu R., et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2015. V. 191. № 5. P. 530.
103. Kachroo P., Hecker J., Chawes B.L., Ahluwalia T.S., Cho M.H., Qiao D., Kelly R.S., Chu S.H., Virkud Y.V., Huang M., et al. // *Nat. Heart, Lung, Blood Inst. Trans-Omics for Precision Med. Consortium.* 2019. V. 156. № 6. P. 1068–1079.
104. Hernandez-Pacheco N., Farzan N., Francis B., Karimi L., Repnik K., Vijverberg S.J., Soares P., Schieck M., Gorenjak M., Forno E., et al. // *Clin. Exp. Allergy.* 2019. V. 49. № 6. P. 789–798.
105. Perez-Garcia J., Espuela-Ortiz A., Lorenzo-Diaz F., Pino-Yanes M. // *Pharmgenomics Pers. Med.* 2020. V. 13. P. 89–103.
106. Lee J.H., McDonald M.-L.N., Cho M.H., Wan E.S., Castaldi P.J., Hunninghake G.M., Marchetti N., Lynch D.A., Crapo J.D., Lomas D.A., et al. // *Respir. Res.* 2014. V. 15. № 1. P. 97.
107. Dengler H.S., Wu X., Peng I., Rinderknecht C.H., Kwon Y., Suto E., Kohli P.B., Liimatta M., Barrett K., Lloyd J., et al. // *Sci. Transl. Med.* 2018. V. 10. № 468. P. 2151.
108. Tabèze L., Marchand-Adam S., Borie R., Justet A., Dupin C., Dombret M.-C., Crestani B., Taillé C. // *Eur. Respir. J.* 2019. V. 53. № 6. P. 1802248.
109. Finsterer J. // *Orphanet. J. Rare Dis.* 2019. V. 14. P. 57.
110. Al-Alawi M., Hassan T., Chotirmall S.H. // *Respir. Med.* 2014. V. 108. № 10. P. 1409–1423.
111. Li X., Howard T.D., Moore W.C., Ampleford E.J., Li H., Busse W.W., Calhoun W.J., Castro M., Chung K.F., Erzurum S.C., et al. // *J. Allergy Clin. Immunol.* 2011. V. 127. № 6. P. 1457–1465.
112. Gaurav R., Varasteh J.T., Weaver M.R., Jacobson S.R., Hernandez-Lagunas L., Liu Q., Nozik-Grayck E., Chu H.W., Alam R., Nordestgaard B.G., et al. // *JCI Insight.* 2017. V. 2. № 17. P. 95072.
113. Smit J.J., Folkerts G., Nijkamp F.P. // *Trends Immunol.* 2004. V. 25. № 7. P. 342–347.
114. Moussette S., Al Tuwaijri A., Kohan-Ghadr H.-R., Elzein S., Farias R., Bérubé J., Ho B., Laprise C., Goodyer C.G., Rousseau S., et al. // *PLoS One.* 2017. V. 12. № 2. P. 0172707.

УДК 615.212

# Анализ участия NMDA-рецепторов в анальгезии и гипотермии, вызванной активацией ионных каналов TRPV1

Е. А. Иванова\*, А. И. Матюшкин, Т. А. Воронина

Научно-исследовательский институт фармакологии имени В.В. Закусова, Москва, 125315  
Россия

\*E-mail: iwanowaea@yandex.ru

Поступила в редакцию 09.10.2022

Принята к печати 09.01.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11829

**РЕФЕРАТ** Глутаматные рецепторы NMDA-подтипа играют важную роль в ноцицепции в норме и при патологии. На периферии они могут взаимодействовать с ионными каналами TRPV1, блокада которых приводит к снижению вызванной NMDA гипералгезии, а антагонисты NMDA-рецепторов подавляют болевую реакцию при введении капсаицина, агониста TRPV1. Ионные каналы TRPV1 и NMDA-рецепторы способны функционально взаимодействовать на периферии, поэтому интерес представляет изучение возможности их взаимодействия на уровне ЦНС, чему и посвящена данная работа. Установлено, что в тесте отдергивания хвоста у мышей, воспроизводящем спинальный флексорный рефлекс, капсаицин при однократном его подкожном введении в дозе 1 мг/кг повышает порог болевой чувствительности к тепловому раздражителю, что объясняется его способностью вызывать длительную десенситизацию ноцицепторов. Превентивно введенные неконкурентные антагонисты NMDA-рецепторов (высокоаффинный МК-801, 20 мкг/кг и 0.5 мг/кг подкожно; низкоаффинный гимантан, 40 мг/кг внутривенно), как и селективный антагонист TRPV1 ВСТС (20 мг/кг внутривенно), препятствуют вызываемому капсаицином повышению порога болевой чувствительности. Введение капсаицина (однократно подкожно в дозе 1 мг/кг) приводит к кратковременной гипотермии у мышей, механизм которой объясняется запускаемыми гипоталамусом вегетативными реакциями. Этот эффект предупреждает введение ВСТС, но не неконкурентных антагонистов NMDA-рецепторов.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** NMDA-рецепторы, ионные каналы TRPV1, капсаицин, мыши, ноцицепция, терморегуляция.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** МК-801 – (5S,10R)-(+)-5-метил-10,11-дигидро-5H-дibenzo[a,d]циклогептен-5,10-имингидромалеат; ВСТС – 4-(3-хлор-2-пиридинил)-N-4-(1,1-диметилэтил)фенил-1-пиперазин-карбоксамид.

## ВВЕДЕНИЕ

Взаимодействие глутамата с глутаматными рецепторами имеет ключевое значение для передачи возбуждения в центральной нервной системе (ЦНС) и играет важную роль в ноцицепции в норме и при патологии. В частности, при длительной активации ноцицепторов при повреждении тканей, нервов и воспалении происходит непрерывное выделение глутамата, который совместно с высвобождаемыми нейропептидами может вызвать долговременную деполяризацию мембраны, ликвидировать потенциалзависимую блокаду ионного канала глутаматных рецепторов NMDA-подтипа магнием и обеспечить их активацию [1]. Глутаматные рецепторы NMDA-подтипа представлены на первичных афферентах [2–5], и их стимуляция приводит к активации или сенсibilизации ноцицепторов [2, 6–9].

На периферии глутаматные рецепторы NMDA-подтипа способны взаимодействовать с ионными каналами TRPV1 в каскадах кальций/кальмодулин-зависимой протеинкиназы типа II (CaMKII) и протеинкиназы C (PKC); а введение AMG9810, антагониста ионных каналов TRPV1, подавляет вызванную NMDA (N-метил-D-аспарагиновой кислотой) механическую гипералгезию у крыс [10]. Введение антагонистов ионотропных NMDA, AMPA и метаботропных mGluR1 глутаматных рецепторов в плантарную область крыс снижает вызванную капсаицином, агонистом ионных каналов TRPV1, термическую гипералгезию и предотвращает повышение уровня глутамата в подкожном перфузате, наблюдаемое после инъекции капсаицина

в область плюсны животных [11]. Неконкурентные антагонисты NMDA-рецепторов – высокоаффинный (5S,10R)-(+)-5-метил-10,11-дигидро-5Н-добензо[а,d]-циклогептен-5,10-имингидромалеат (МК-801) и низкоаффинный N-(2-адамантил)-гексаметиленмина гидрохлорид (гимантан) – снижают длительность болевой реакции мышей на подкожную инъекцию раствора капсаицина в область плюсны при накожной аппликации, системном (внутрибрюшинном для гимантана и подкожном для МК-801) и подкожном интраплантарном введении [12].

Ионные каналы TRPV1 – неселективные катионные потенциалзависимые каналы, которые экспрессируются первичными афферентными нейронами, активируются «ванилоидными» соединениями, низким рН (рН<6.5), изменениями осмолярности, метаболитами арахидоновой кислоты, эндоканнабиноидами, температурой выше 42°C [13–17] и рассматриваются в качестве «интегратора сигналов» при патологических состояниях, о чем, в частности, свидетельствует возможность их функционального взаимодействия с глутаматными рецепторами NMDA-подтипа в афферентных нейронах тройничного нерва при механической гипералгезии [10]. Как и глутаматные рецепторы NMDA-подтипа, ионные каналы TRPV1 широко представлены в ЦНС [17]. Учитывая способность ионных каналов TRPV1 и глутаматных рецепторов NMDA-подтипа функционально взаимодействовать на периферии, изучение их взаимодействия в ЦНС представляет значительный интерес.

Цель данной работы состояла в оценке способности неконкурентных антагонистов NMDA-рецепторов – высокоаффинного МК-801 и низкоаффинного гимантана – влиять на эффекты капсаицина – агониста ионных каналов TRPV1, которые реализуются на уровне ЦНС: изменение порога болевой реакции в тесте отдергивания хвоста и ректальной температуры у мышей. Влияние антагонистов NMDA-рецепторов изучали в сравнении с проникающим через гематоэнцефалический барьер (ГЭБ) [18] селективным антагонистом ионных каналов TRPV1 4-(3-хлор-2-пиридинил)-N-4-(1,1-диметилэтил)фенил-1-пиперазинкарбоксамидом (ВСТС).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Животные

В работе использовали половозрелых мышей-самцов ICR массой 23–26 г, полученных из питомника лабораторных животных филиала «Столбовая» ФГБУН «Научный центр биомедицинских технологий ФМБА» (Московская область). Работы проводи-

ли в соответствии с ГОСТ 33216-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила содержания и ухода за лабораторными грызунами и кроликами», ГОСТ 33215-2014 «Руководство по содержанию и уходу за лабораторными животными. Правила оборудования помещений и организации процедур» и Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза от 22.09.2010 по охране животных, используемых в научных целях. Проведение экспериментов одобрено Комиссией по биомедицинской этике ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова» (протокол № 01 от 28.01.2022).

### Объекты исследования, дозы, способы введения

Антагонисты NMDA-рецепторов – неконкурентный высокоаффинный антагонист (5S, 10R)-(+)-5-метил-10,11-дигидро-5Н-добензо[а,d]циклогептен-5,10-имингидромалеат (МК-801; Sigma Aldrich, США), неконкурентный низкоаффинный антагонист N-(2-адамантил)-гексаметиленмина гидрохлорид (гимантан; синтезирован и предоставлен химико-технологической лабораторией ФГБНУ «НИИ фармакологии имени В.В. Закусова»). Антагонист ионных каналов TRPV1 – 4-(3-хлор-2-пиридинил)-N-4-(1,1-диметилэтил)фенил-1-пиперазинкарбоксамид (ВСТС; Sigma Aldrich, США). Соединения вводили за 30 мин до введения раствора капсаицина: МК-801 – подкожно в дозах 20 мкг/кг и 0.5 мг/кг; гимантан – внутрибрюшинно в дозе 40 мг/кг, ВСТС – внутрибрюшинно в дозе 20 мг/кг.

Агонист ионных каналов TRPV1 капсаицин (Sigma Aldrich, США), разведенный в смеси физиологического раствора и этанола (9:1, v/v), вводили подкожно в дозе 1 мг/кг, в которой он вызывает кратковременную гипотермию у мышей [14].

### Тест отдергивания хвоста от воздействия теплового излучения (tail-flick)

Тест отдергивания хвоста основан на спинальном флексорном рефлексе в ответ на прогрессивно увеличивающееся воздействие теплового излучения на кожную поверхность и широко используется при оценке анальгетического эффекта различных веществ [19, 20]. В этом тесте последовательно активируются терморепцепторы, С-волокна полимодальных ноцицепторов, Ad-волокна полимодальных ноцицепторов, высокопороговые механорецепторы. Болевое раздражение наносили на хвост локально, воздействуя тепловым излучением с помощью анальгезиметра TSE-system (Германия). Интенсивность воздействия составляла 27%, что соответствовало постепенному увеличению темпе-

ратуры от 51 до 61°C в течение 15 с. Латентный период (ЛП) отдергивания хвоста, равный 15 с, рассматривали в качестве максимально допустимого времени нанесения раздражителя. Рассчитывали величину максимально возможного эффекта (МВЭ) по формуле:

$$МВЭ (\%) = \frac{(ЛП_{оп} - ЛП_{контр}) \times 100}{(МАХ_{время} - ЛП_{контр})}, \text{ где}$$

*ЛП<sub>оп</sub>* – латентный период реакции мышей через 30 мин после введения раствора капсаицина или антагонистов NMDA-рецепторов и ионных каналов TRPV1.

*ЛП<sub>контр</sub>* – латентный период контрольной группы мышей, которым вводили растворитель,

*МАХ<sub>время</sub>* – максимально допустимое время нанесения раздражителя (15 с).

Экспериментальную работу по изучению влияния неконкурентных антагонистов NMDA-рецепторов на вызванное капсаицином (агонист ионных каналов TRPV1) изменение порога болевой реакции в тесте отдергивания хвоста проводили в два этапа. На первом этапе оценивали влияние ВСТС, антагониста ионных каналов TRPV1, и антагонистов NMDA-рецепторов на чувствительность мышей к наносимому на хвост термическому раздражению через 30 мин после их введения. На втором этапе оценивали их влияние на повышенный при введении капсаицина порог болевой реакции животных через 30 мин после введения агониста ионных каналов TRPV1. В качестве контрольных групп использовали мышей, которым подкожно вводили растворители в эквивалентном объеме (10 мл/кг). В первом эксперименте растворителем служил физиологический раствор. Во втором эксперименте в качестве растворителя для ВСТС, гимантана и МК-801 использовали физиологический раствор, для капсаицина – смесь физиологического раствора и этанола (9:1, v/v), т.е. контрольные животные получали вместо ВСТС, гимантана и МК-801 физиологический раствор, вместо капсаицина – смесь физиологического раствора и этанола (9:1, v/v).

**Ректальную температуру** у мышей регистрировали с помощью ректального цифрового термометра производства Kent Scientific Corp. (США). В эксперимент включены группы животных, которым вводили растворители – физиологический раствор и смесь физиологического раствора и этанола (9:1, v/v); физиологический раствор и капсаицин; и группы животных, которым спустя 30 мин после введения изучаемых антагонистов NMDA-рецепторов и ионных каналов TRPV1 вводили капсаицин. Кроме

того, сравнивали влияние антагонистов NMDA-рецепторов и ионных каналов TRPV1 на ректальную температуру с группой мышей, которым вводили только физиологический раствор. Ректальную температуру регистрировали до введения растворителя, капсаицина, антагонистов NMDA-рецепторов и ВСТС и через каждые 30 мин после введения растворителя, антагонистов NMDA-рецепторов, ВСТС, капсаицина (2 ч) или через каждые 30 мин после введения капсаицина при его введении с антагонистами NMDA-рецепторов и ВСТС (2 ч).

**Статистическую обработку** результатов экспериментов осуществляли с помощью программы Statistica 10.0. Нормальность распределения данных проверяли с помощью критерия Шапиро–Уилка с последующей оценкой межгруппового равенства дисперсий критерием Левена. При нормальном распределении в группах и соблюдении межгруппового равенства дисперсий дальнейшую статистическую обработку проводили с помощью однофакторного дисперсионного анализа с последующим сравнением групп с помощью критерия Ньюмана–Кейлса. При отсутствии нормального распределения использовали критерий Краскела–Уоллиса, который является непараметрической альтернативой однофакторного дисперсионного анализа. При обнаружении статистически значимых различий между группами с помощью критерия Краскела–Уоллиса проводили парное сравнение выборок, используя критерий Манна–Уитни. Различия между группами считали статистически значимыми при  $p < 0.05$ . Рисунки выполнены с помощью программы GraphPad Prism V. 8.4.3.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Экспрессия ионных каналов TRPV1 максимальна в задних корешках спинного мозга крыс [21]; их кратковременная стимуляция вызывает длительное повышение пресинаптического уровня ионов кальция ( $Ca^{2+}$ ) и сопутствующее усиление выделения глутамата в синаптическую щель [22]. В свою очередь, активация глутаматных рецепторов NMDA-подтипа задних рогов спинного мозга необходима для инициации центральной сенситизации [23–26].

Спинальный флексорный рефлекс выбран в качестве ноцицептивной реакции, реализующейся на уровне спинного мозга, в механизме которой задействованы ионные каналы TRPV1 и глутаматные рецепторы NMDA-подтипа. Воспроизводящий его тест отдергивания хвоста [20, 27] позволяет оценивать способность антагонистов NMDA-рецепторов влиять на обусловленное активацией TRPV1 изменение чувствительности животных к тепловому

раздражителю. Известно, что у мышей VR<sup>-/-</sup> (у которых отсутствуют ионные каналы TRPV1) нарушена реакция на болевое термическое воздействие. С-волокна мышей VR<sup>-/-</sup> характеризуются сниженным порогом ответа на тепловое воздействие, а латентный период отдергивания хвоста в тесте тепловой иммерсии хвоста при погружении в горячую воду (tail immersion) температурой 50 и 52°C (но не 46 и 48°C) и реакции животных в тесте «Горячая пластина» температурой 52.5, 55 и 58°C (но не 50°C), наоборот, значительно повышен [14]. Поэтому в проведенном нами эксперименте – тесте отдергивания хвоста – термическое раздражение осуществляли, воздействуя на хвост животных тепловым излучением с постепенным увеличением температуры от 51 до 61°C (в течение 15 с).

Установлено, что однократное внутрибрюшинное введение ВСТС (антагониста ионных каналов TRPV1) в дозе 20 мг/кг значительно повышало ЛП отдергивания хвоста мышей на 36.4% по сравнению с контрольной группой; величина максимально возможного эффекта (МВЭ) соответствовала 15.09% (табл. 1). Известно, что антагонисты ионных каналов TRPV1 обладают анальгетическим действием [28]. В частности, полученные результаты согласуются с данными об эффективности однократного внутрибрюшинного введения ВСТС в дозах 3, 10 и 30 мг/кг на модели тепловой гипералгезии у крыс [29].

Низкоаффинный антагонист NMDA-рецепторов гимантан в дозе 40 мг/кг (внутрибрюшинно) повышал ЛП отдергивания хвоста мышей на 63.6% по сравнению с контрольной группой; МВЭ соответствовал 26.42%. Значимой разницы между группами животных, которым вводили ВСТС в дозе 20 мг/кг и гимантан в дозе 40 мг/кг, выявлено не было (табл. 1). Гимантан при однократном внутрибрюшинном введении в дозах 20 и 40 мг/кг дозозависимо уменьшал длительность болевой реакции мышей на подкожную инъекцию раствора капсаицина в область плюсны, поэтому в проведенном исследовании препарат использовали в дозе 40 мг/кг [12].

Высокоаффинный антагонист NMDA-рецепторов МК-801 при однократном подкожном введении мышам в дозе 20 мкг/кг, в которой он снижал длительность капсаицин-индуцированного болевого поведения мышей [12], и в большей дозе (0.5 мг/кг) не оказывал значимого влияния на порог чувствительности мышей к болевому тепловому воздействию в тесте отдергивания хвоста (табл. 1). Примечательно, что однократное введение МК-801, высокоаффинного антагониста NMDA-рецепторов, вызывало как проноцицептивный [30], так и антиноцицептивный эффект у крыс [31].

**Таблица 1.** Влияние антагонистов NMDA-рецепторов (гимантана и МК-801) и антагониста ионных каналов TRPV1 ВСТС на порог болевой чувствительности в тесте отдергивания хвоста от теплового излучения у мышей ICR. Медиана (Q1; Q3)

Группа	Число мышей в группе	ЛП отдергивания хвоста, с	МВЭ, %
Контроль	10	4.40 (3.90; 5.10)	0.00 (-4.72; 6.60)
ВСТС, 20 мг/кг	8	6.00 (5.20; 7.35)*	15.09 (7.55; 27.83)*
Гимантан, 40 мг/кг	8	7.20 (6.30; 10.05)*	26.42 (17.92; 53.30)*
МК-801, 20 мкг/кг	9	4.60 (4.10; 5.20)	1.89 (-2.83; 7.55)
МК-801, 0.5 мг/кг	9	4.00 (3.80; 4.40)	-3.77 (-5.66; 0.00)

Примечания: контроль – физиологический раствор; МВЭ – максимально возможный эффект.  
\**p* < 0.05 по сравнению с группой «Контроль», критерий Манна–Уитни.

Капсаицин при однократном подкожном введении в дозе 1 мг/кг выраженно повышал порог чувствительности мышей к болевому тепловому воздействию. ЛП отдергивания хвоста при введении капсаицина был на 67.4% выше, чем у мышей контрольной группы, которым вводили растворители – физиологический раствор + смесь физиологического раствора и этанола (9:1, v/v) (табл. 2). Зарегистрированный эффект капсаицина в тесте отдергивания хвоста у мышей объясняется его способностью вызывать длительную десенситизацию ноцицепторов [32].

Капсаицин не повышал порог чувствительности мышей, которым превентивно вводили ВСТС – селективный антагонист ионных каналов TRPV1, или антагонисты NMDA-рецепторов гимантан и МК-801, к болевому тепловому воздействию. Эффективность ВСТС, введенного мышам за 30 мин до подкожной инъекции капсаицина, была практически такой же, как в группе, получавшей только ВСТС. Так, ЛП отдергивания хвоста в группе «ВСТС, 20 мг/кг + капсаицин, 1 мг/кг» был значительно выше (на 38.04%), чем в контроле (группа «Физ. р-р + физ. р-р/этанол»); МВЭ соответствовал 16.83%. Гимантан в дозе 40 мг/кг, введенный за 30 мин до инъекции капсаицина, повышал ЛП отдергивания хвоста у мышей на 21.7% по сравнению с контрольной группой, МВЭ соответствовал 9.62% (табл. 2). Хотя значение ЛП отдергивания хвоста у животных,

**Таблица 2.** Влияние антагонистов NMDA-рецепторов (гимантана и МК-801) и антагониста ионных каналов TRPV1 (ВСТС) на повышение порога болевой чувствительности у мышей ICR, вызванное введением капсаицина. Медиана (Q1; Q3)

Группа	Число мышей в группе	ЛП отдергивания хвоста, с	МВЭ, %
Физ. р-р + физ. р-р/этанол	11	4.60 (4.50; 4.80)	0.00 (-0.96; 1.92)
Физ. р-р + капсаицин, 1 мг/кг	13	7.70 (6.80; 15.00)*	29.81 (21.15; 100.00)*
ВСТС 20 мг/кг + капсаицин, 1 мг/кг	8	6.35 (5.90; 7.45)*#	16.83 (12.50; 27.40)*#
Гимантан 40 мг/кг + капсаицин, 1 мг/кг	11	5.60 (4.90; 9.20)*#	9.62 (2.88; 44.23)*#
МК-801 20 мкг/кг + капсаицин, 1 мг/кг	14	4.60 (3.90; 4.90)#	0.00 (-6.73; 2.88)#
МК-801 0.5 мг/кг + капсаицин, 1 мг/кг	13	3.80 (3.40; 4.60)*#	-7.69 (-11.54; 0.00)*#

\* $p < 0.05$  по сравнению с группой «Физ. р-р + физ. р-р/этанол», критерий Манна–Уитни.

# $p < 0.05$  по сравнению с группой «Физ. р-р + капсаицин, 1 мг/кг», критерий Манна–Уитни.

которым гимантан вводили до инъекции капсаицина, было ниже, чем у животных, которым вводили только гимантан, значимых различий между показателями МВЭ в этих группах не выявлено (табл. 1, 2). Введение МК-801 в обеих дозах за 30 мин до инъекции капсаицина не повышало порог болевой чувствительности мышей к тепловому раздражителю в тесте отдергивания хвоста (табл. 2).

В группах мышей, которым антагонисты NMDA-рецепторов (гимантан и МК-801) и ВСТС вводили до инъекции капсаицина, ЛП отдергивания хвоста был значимо ниже, чем в группе мышей, которым вводили капсаицин и физиологический раствор (табл. 2).

Таким образом, в группах животных, которым превентивно (до инъекции капсаицина) вводили селективный антагонист TRPV1 ионных каналов ВСТС или антагонисты NMDA-рецепторов гимантан и МК-801, порог болевой чувствительности к тепловому раздражителю был значимо ниже, чем в группе мышей, которым вводили капсаицин и физиологический раствор. Это свидетельствует о сходном влиянии антагонистов NMDA-рецепторов и ВСТС – антагониста ионных каналов TRPV1. Эти соединения препятствовали действию капсаицина на ионные каналы TRPV1, приводящему к их де-

сенситизации и, соответственно, к выраженному повышению порога болевой чувствительности к тепловому раздражителю.

Одна из функций TRPV1 – участие в терморегуляции, в реализацию которого вовлечены центральные и периферические механизмы [33–35]. Системное введение капсаицина приводит к быстрому кратковременному снижению температуры тела, которое объясняют запускаемыми гипоталамусом вегетативными реакциями, такими, как вазодилатация и гиперсаливация [14, 36].

Глутаматные рецепторы бледного ядра шва (raphe pallidus nucleus, RPa) опосредуют терморегуляцию бурой жировой ткани, вызванной активацией нейронов дорсомедиального гипоталамуса: микроинъекции NMDA или каиновой кислоты в RPa вызывают повышение температуры бурой жировой ткани у крыс [37]. Превентивное введение селективного антагониста NMDA-рецепторов LY 235959 ослабляет вызванную агонистом ионных каналов TRPM8 и TRPA1 ицилином (Icilin, AG-3-5) гипертермию у крыс [38].

В нашем эксперименте однократное подкожное введение мышам капсаицина в дозе 1 мг/кг вызвало кратковременную гипотермию, которую регистрировали через 30 мин после введения: ректальная температура снижалась на 2°C по сравнению как с фоновым значением (до введения капсаицина), так и со значением в контрольной группе мышей, которым вводили растворители – физиологический раствор + смесь физиологического раствора и этанола (9:1, v/v). Через 60 мин после введения капсаицина регистрировали нормализацию ректальной температуры (рис. 1).

Проникающий через ГЭБ селективный антагонист ионных каналов TRPV1 ВСТС [18] при его однократном внутрибрюшинном превентивном введении в дозе 20 мг/кг препятствовал появлению гипотермического эффекта капсаицина. У мышей, которым последовательно вводили ВСТС, а затем подкожно капсаицин, ректальная температура через 30 и 60 мин после введения была значимо выше, чем в группе животных, которые получали капсаицин и физиологический раствор – на 2.5 и 0.8°C соответственно (рис. 1А). ВСТС, как и другие антагонисты ионных каналов TRPV1, вызывает гипертермию, механизм формирования которой пока не ясен [32]. Так, в проведенном нами эксперименте значимое повышение ректальной температуры (по сравнению с контрольной группой животных) у мышей, которым однократно внутрибрюшинно вводили ВСТС в дозе 20 мг/кг, было зарегистрировано через 30, 90 и 120 мин после введения на 1, 0.6 и 0.5°C соответственно (рис. 2А).

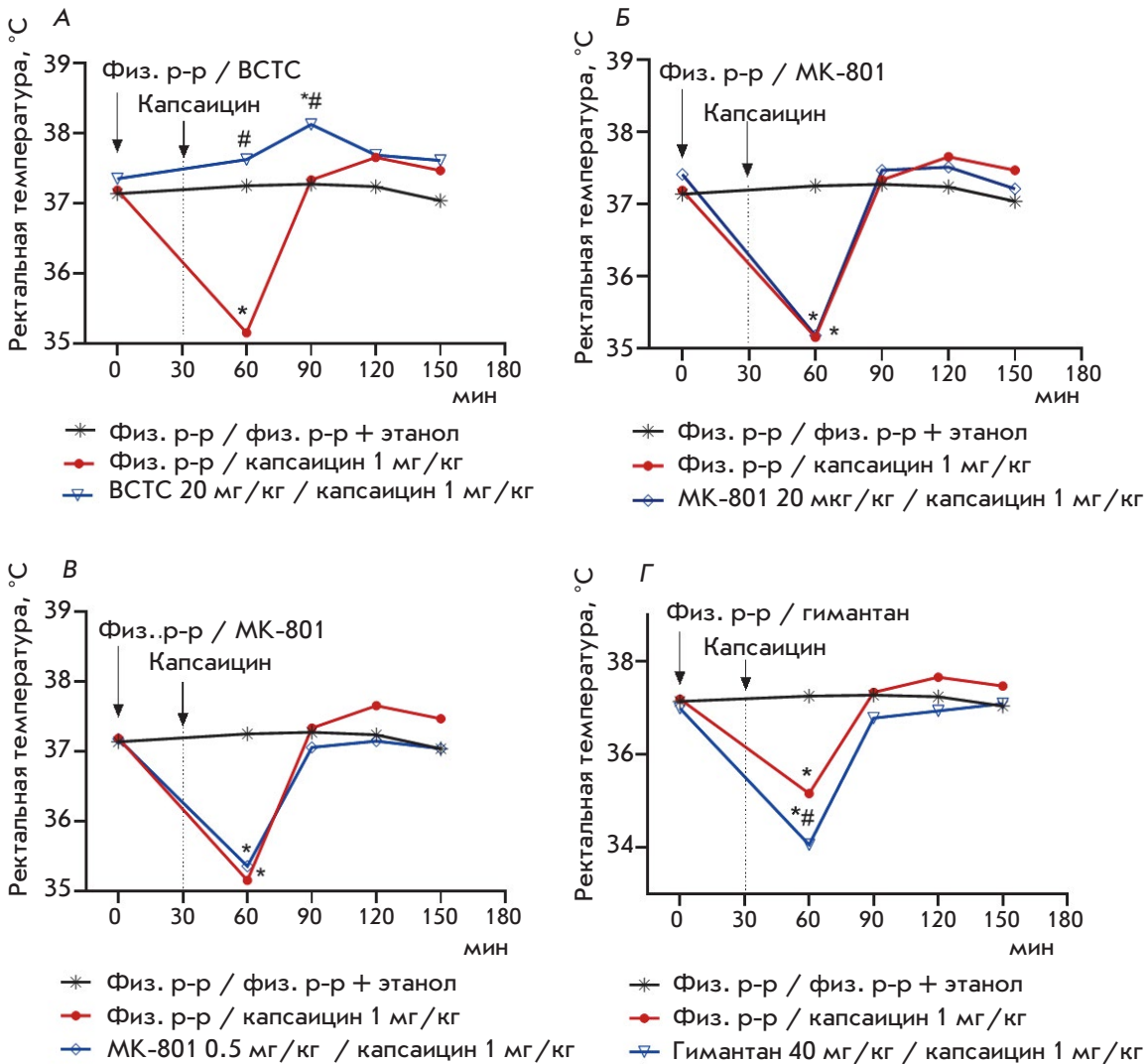


Рис. 1. Влияние антагониста ионных каналов TRPV1 ВСТС (А) и антагонистов NMDA-рецепторов гимантана (Г) и МК-801 (Б, В) на вызванное введением капсаицина снижение ректальной температуры у мышей. \* $p < 0.05$  по сравнению с группой «Физ. р-р / физ. р-р + этанол», критерий Ньюмена–Кейлса. # $p < 0.05$  по сравнению с группой «Физ. р-р / капсаицин 1 мг/кг», критерий Ньюмена–Кейлса

Неконкурентные антагонисты NMDA-рецепторов – высокоаффинный МК-801 и низкоаффинный гимантан – при однократном превентивном введении не предупреждали гипотермический эффект капсаицина, зарегистрированный на 30 мин после его инъекции. Ректальная температура мышей, которым вводили высокоаффинный антагонист NMDA-рецепторов МК-801 в дозах 20 мкг/кг и 0.5 мг/кг до инъекции капсаицина, через 30 мин после инъекции была равна соответственно 35.18 и 35.36°С; у животных группы «Капсаицин» ректальная температура была равна 35.16°С (рис. 1Б,В). При этом МК-801, как и ВСТС, в обеих дозах вызы-

вал гипертермию у мышей (рис. 2А,Б). Ректальная температура у животных, которым вводили высокоаффинный антагонист NMDA-рецепторов в дозе 0.5 мг/кг, была значимо выше, чем в контрольной группе мышей с 30 по 120 мин регистрации; в дозе 20 мкг/кг – через 30, 90 и 120 мин после введения МК-801 (рис. 2Б). Известно, что МК-801 способен вызывать у крыс как гипертермию в дозах до 1.2 мг/кг [39, 40], так и гипотермию – при повышении дозы до 3 мг/кг [40]. Зарегистрированное в проведенном нами эксперименте повышение ректальной температуры мышей при введении высокоаффинного антагониста NMDA-рецепторов



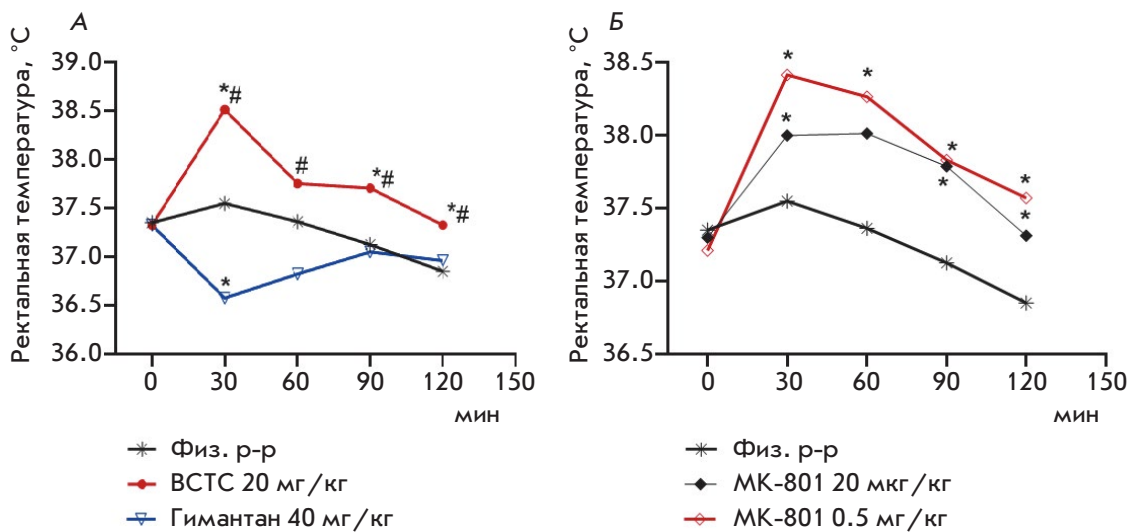


Рис. 2. Влияние антагониста ионных каналов TRPV1 ВСТС и антагонистов NMDA-рецепторов гимантана (А) и МК-801 (Б) на ректальную температуру мышей. \* $p < 0.05$  по сравнению с группой «Физ. р-р», критерий Ньюмена–Кейлса. # $p < 0.05$  по сравнению с группой «Гимантан 40 мг/кг», критерий Ньюмена–Кейлса

МК-801 может быть обусловлено его дофамин-позитивным действием. На синапсах стриатума крыс показано, что как неконкурентный антагонист NMDA-рецепторов МК-801, так и конкурентный антагонист NMDA-рецепторов (+/-)-СРР (3-(2-карбоксихиперазин-4-ил)-пропил-1-фосфоновая кислота) ингибируют обратный захват дофамина [41]. Дофаминергическая система играет важную роль в регуляции температуры тела, агонисты D1- и D2-дофаминергических рецепторов вызывают гипертермию у крыс [42].

Гимантан при его однократном превентивном внутрибрюшинном введении в дозе 40 мг/кг за 30 мин до инъекции капсаицина значительно усиливал вызванную капсаицином гипотермию: гимантан на 1.1°C значительно снижал ректальную температуру мышей по сравнению с группой «Капсаицин» через 30 мин после введения агониста TRPV1 (рис. 1Г). При этом гимантан при однократном внутрибрюшинном введении в дозе 40 мг/кг интактным животным вызывал значимое снижение ректальной температуры на 1°C через 30 мин после введения; спустя 60 мин после введения гимантана ректальная температура мышей повышалась до значения, не отличавшегося значимо от ректальной температуры в контрольной группе (рис. 2А). Следовательно, капсаицин при введении через 30 мин после гимантана увеличивает длительность гипотермического действия гимантана до 60 мин. Через 60 мин после введения капсаицина значимой разницы ректальной температуры

у животных, которым вводили гимантан, не зафиксировано ни по сравнению с контрольной группой, ни по сравнению с группой «Капсаицин» (рис. 1Г).

Ранее было установлено, что однократное внутрибрюшинное введение гимантана в дозе 20 мг/кг приводит к снижению уровня серотонина и его метаболита 5-гидроксииндолуксусной кислоты в стриатуме мышей С57В1/6 [43]. Поэтому зарегистрированный гипотермический эффект гимантана, по-видимому, можно объяснить его влиянием на серотонинергическую систему, так как серотонинергические нейроны гипоталамуса контролируют температурный гомеостаз, а введение серотонина в термочувствительную зону переднего гипоталамуса вызывает гипертермию [44].

В качестве механизма TRPV1-индуцированной гипотермии рассматривают возбуждение чувствительных к капсаицину периферических нервов (соматосенсорных афферентов в коже и афферентных волокон блуждающего нерва в брюшной полости), передающих сигналы по полисинаптическим путям в отвечающую за терморегуляцию преоптическую (preoptic/anterior) область гипоталамуса [35]. Кроме того, проникающий через ГЭБ капсаицин [45] способен активировать ионные каналы TRPV1 нервных клеток гипоталамуса и за счет этого влиять на термочувствительность [35]. Так, введение капсаицина в преоптическую область гипоталамуса крыс вызывает быстрое снижение температуры тела, выраженность которого уменьшается при повторных инъекциях этого агониста TRPV1 [46].

Предварительное применение антагонистов NMDA-рецепторов предупреждало повышение порога болевой чувствительности, обусловленное введением капсаицина, в воспроизводящем спинальный флексорный рефлекс тесте отдергивания хвоста у мышей и снижало длительность их реакции (облизывание лапы) на инъекцию раствора капсаицина в область плюсны в исследовании, проведенном нами ранее [12]. Внутрикожная инъекция капсаицина в лапу крыс вызывала катализируемое протеинкиназой А (PKA) и PKC фосфорилирование субъединицы NR1 NMDA-рецепторов в нейронах дорсальных рогов спинного мозга и спинального тракта, зарегистрированное через 30 мин после инъекции капсаицина [47, 48]. Исходя из представленных фактов функционального взаимодействия NMDA-рецепторов и ионных каналов TRPV1, мы предполагали, что предварительное введение антагонистов NMDA-рецепторов МК-801 и гимантана снизит выраженность вызванной капсаицином гипотермии за счет ослабления передачи нервных импульсов с периферии (в частности, в спинном мозге) в преоптическую (preoptic/anterior) область гипоталамуса. Однако этого не произошло: не зарегистрировано предупреждение вызванной капсаицином кратковременной гипотермии при превентивном введении животным антагонистов NMDA-рецепторов. Следовательно, в механизме формирования вызванной капсаицином кратковременной гипотермии у мышей не обнаружено функционального взаимодействия ионных каналов TRPV1 и NMDA-рецепторов, подобного взаимодействию, выявленному в экспериментах по оценке болевой реакции мышей в тесте отдергивания хвоста или длительности реакции мышей при введении изучаемого агониста TRPV1 в область плюсны [12]. Поэтому полученные нами данные свидетельствуют в пользу способности

капсаицина – селективного агониста ионных каналов TRPV1 – проникать при системном введении через ГЭБ и действовать на нейроны в преоптической (preoptic/anterior) области гипоталамуса, влияя таким образом на термочувствительность.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Установлено, что в тесте отдергивания хвоста у мышей, воспроизводящем спинальный флексорный рефлекс, превентивно введенные неконкурентные антагонисты NMDA-рецепторов (высокоаффинный МК-801 и низкоаффинный гимантан), как и ВСТС – селективный антагонист ионных каналов TRPV1, препятствуют вызываемому агонистом TRPV1 капсаицином повышению порога чувствительности к болевому тепловому раздражителю. Учитывая взаимодействие NMDA-рецепторов и ионных каналов TRPV1 на периферии, эффект, зарегистрированный в тесте отдергивания хвоста у мышей, можно объяснить влиянием изучаемых соединений на афферентную иннервацию. Оценка этого взаимодействия на уровне ЦНС требует проведения дальнейших исследований.

Однократное подкожное введение капсаицина приводит к кратковременной гипотермии у мышей, и предварительное введение ВСТС – селективного антагониста ионных каналов TRPV1, но не неконкурентных антагонистов NMDA-рецепторов МК-801 и гимантана, отменяет этот эффект. Полученные данные подтверждают возможность функционального взаимодействия NMDA-рецепторов и ионных каналов TRPV1 при вызванной капсаицином антиноцицептивной реакции, но не подтверждают эту возможность при вызванной капсаицином кратковременной гипотермии, механизм которой объясняют вегетативными реакциями, запускаемыми гипоталамусом. ●

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Chrish B.A. // *Amino Acids*. 2002. V. 23. № 1–3. P. 169–176.
2. Carlton S.M., Hargett G.L., Coggeshall R.E. // *Neurosci. Lett*. 1995. V. 197. № 1. P. 25–28.
3. Coggeshall R.E., Carlton S.M. // *J. Comp. Neurol*. 1998. V. 391. № 1. P. 78–86.
4. Kinkelin I., Bröcker E.B., Koltzenburg M., Carlton S.M. // *Neurosci. Lett*. 2000. V. 283. № 2. P. 149–152.
5. Ma Q.P., Hargreaves R.J. // *Neuroscience*. 2000. V. 101. № 3. P. 699–707.
6. Du J., Koltzenburg M., Carlton S.M. // *Pain*. 2001. V. 89. № 2–3. P. 187–198.
7. Lawand N.B., Willis W.D., Westlund K.N. // *Eur. J. Pharmacol*. 1997. V. 324. № 2–3. P. 169–177.
8. Zhou S., Bonasera L., Carlton S.M. // *Neuroreport*. 1996. V. 7. № 4. P. 895–900.
9. Christoph T., Reissmüller E., Schiene K., Englberger W., Chizh B.A. // *Brain Res*. 2005. V. 1048. № 1–2. P. 218–227.
10. Lee J., Saloman J.L., Weiland G., Auh Q.S., Chung M.K., Ro J.Y. // *Pain*. 2012. V. 153. № 7. P. 1514–1524.
11. Jin Y.H., Yamaki F., Takemura M., Koike Y., Furuyama A., Yonehara N. // *J. Pharmacol. Sci*. 2009. V. 109. № 2. P. 233–241.
12. Иванова Е.А., Матюшкин А.И., Воронина Т.А. // *Хим.-фарм. журн*. 2021. Т. 55. № 9. С. 3–6.
13. Tominaga M., Caterina M.J., Malmberg A.B., Rosen T.A., Gilbert H., Skinner K., Raumann B.E., Basbaum A.I., Julius D. // *Neuron*. 1998. V. 21. № 3. P. 531–543.
14. Caterina M.J., Leffler A., Malmberg A.B., Martin W.J., Trafton J., Petersen-Zeit K.R., Koltzenburg M., Basbaum A.I., Julius D. // *Science*. 2000. V. 288. № 5464. P. 306–313.
15. Chung M.K., Guler A.D., Caterina M.J. // *Nat. Neurosci*. 2008. V. 11. № 5. P. 555–564.
16. Chavez A.E., Chiu C.Q., Castillo P.E. // *Nat. Neurosci*. 2010.

- V. 13. № 12. P. 1511–1518.
17. Sanchez J.F., Krause J.E., Cortright D.N. // *Neuroscience*. 2001. V. 107. № 3. P. 373–381.
18. Valenzano K.J., Grant E.R., Wu G., Hachicha M., Schmid L., Tafesse L., Sun Q., Rotshteyn Y., Francis J., Limberis J., et al. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 2003. V. 306. № 1. P. 377–386.
19. Руководство по проведению доклинических исследований лекарственных средств / Под ред. Миронова А.Н. М.: Гриф и К, 2012. 944 с.
20. Bannon A.W., Malmberg A.B. // *Curr. Protoc. Neurosci.* 2007. Chapter 8:Unit 8.9.
21. Sanchez J.F., Krause J.E., Cortright D.N. // *Neuroscience*. 2001. V. 107. № 3. P. 373–381.
22. Medvedeva Y.V., Kim M.S., Usachev Y.M. // *J. Neurosci.* 2008. V. 28. № 20. P. 5295–5311.
23. Bleakman D., Alt A., Nisenbaum E.S. // *Semin. Cell. Dev. Biol.* 2006. V. 17. № 5. P. 592–604.
24. Chizh B.A., Headley P.M. // *Curr. Pharm. Des.* 2005. V. 11. № 23. P. 2977–2994.
25. Salter M.W. // *Curr. Top. Med. Chem.* 2005. V. 5. № 6. P. 557–567.
26. Woolf C.J. // *Anesthesiology*. 2007. V. 106. № 4. P. 864–867.
27. Dewey W.L., Harris L.S., Howes J.F., Nuite J.A. // *J. Pharmacol. Exp. Ther.* 1970. V. 175. № 2. P. 435–442.
28. Trevisani M., Gatti R. // *Open Pain J.* 2013. № 6 (Suppl 1: M11). P. 108–118.
29. Tekus V., Bölcskei K., Kis-Varga A., Deezsi L., Szentirmay E., Visegrady A., Horvath C., Szolcsanyi J., Petho G. // *Eur. J. Pharmacol.* 2010. V. 641. № 2–3. P. 135–141.
30. Al-Amin H., Saade N., Khani M., Atweh S., Jaber M. // *Brain Res.* 2003. V. 981. № 1–2. P. 99–107.
31. Forman L.J. // *Life Sci.* 1999. V. 64. № 21. P. 1877–1887.
32. Iftinca M., Defaye M., Altier C. // *Drugs*. 2021. V. 81. № 1. P. 7–27.
33. Kauer J.A., Gibson H.E. // *Trends Neurosci.* 2009. V. 32. № 4. P. 215–224.
34. Sharif-Naeini R., Ciura S., Bourque C.W. // *Neuron*. 2008. V. 58. № 3. P. 179–185.
35. Caterina M.J. // *Am. J. Physiol. Regul. Integr. Comp. Physiol.* 2007. V. 292. № 1. P. R64–R76.
36. Jancso-Gabor A., Szolcsanyi J., Jancso N. // *J. Physiol.* 1970. V. 206. № 3. P. 495–507.
37. Cao W.H., Morrison S.F. // *Neuropharmacology*. 2006. V. 51. № 3. P. 426–437.
38. Ding Z., Gomez T., Werkheiser J.L., Cowan A., Rawls S.M. // *Eur. J. Pharmacol.* 2008. V. 578. № 2–3. P. 201–208.
39. Pechnick R.N., Hiramatsu M. // *Eur. J. Pharmacol.* 1994. V. 252. № 1. P. 35–42.
40. Hetzler B.E., Burkard H.K. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1999. V. 62. № 3. P. 559–573.
41. Ковалев Г.И., Абаимов Д.А., Воронин М.В., Фирстова Ю.Ю., Долотов О.В. // *Нейрохимия*. 2007. Т. 24. № 2. С. 143–149.
42. Nagashima M., Yamada K., Kimura H., Matsumoto S., Furukawa T. // *Pharmacol. Biochem. Behav.* 1992. V. 43. № 4. P. 993–997.
43. Абаимов Д.А., Зимин И.А., Кудрин В.С., Ковалев Г.И. // *Эксп. клин. фармакол.* 2009. Т. 72. № 1. С. 64–67.
44. Myers R.D. // *J. Physiol. (Paris)*. 1981. V. 77. № 2–3. P. 505–513.
45. Saria A., Skofitsch G., Lembeck F. // *J. Pharm. Pharmacol.* 1982. V. 34. № 4. P. 273–275.
46. Jancso-Gabor A., Szmrecsanyi J., Jancso N. // *J. Physiol.* 1970. V. 208. № 2. P. 449–459.
47. Zou X., Lin Q., Willis W.D. // *Neuroscience*. 2002. V. 115. № 3. P. 775–786.
48. Zou X., Lin Q., Willis W.D. // *Brain. Res.* 2004. V. 1020. P. 95–105.

УДК 577.21

# RNAcontacts, вычислительный конвейер для предсказания РНК-РНК-контактов по данным конформационного секвенирования РНК *in situ*

С. Д. Маргасюк<sup>1</sup>, М. А. Власенок<sup>1</sup>, Г. Ли<sup>2</sup>, Ч. Као<sup>3</sup>, Д. Д. Первушин<sup>1\*</sup><sup>1</sup>Сколковский институт науки и технологий, Москва, 121205 Россия<sup>2</sup>Колледж наук о жизни, Чжэцзянский университет, Ханчжоу, Чжэцзян, ZJ310058 КНР<sup>3</sup>Ключевая лаборатория биологии РНК, Институт биофизики Китайской академии наук, Пекин, 100101 КНР

\*E-mail: d.pervouchine@skoltech.ru

Поступила в редакцию 22.12.2022

Принята к печати 20.02.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11893

**РЕФЕРАТ** Конформационное секвенирование (КС) РНК – группа молекулярных методов высокопроизводительного анализа пространственной сближенности РНК в живых клетках. Эти методы основаны на шивке, фрагментации и последующем лигировании пространственно сближенных молекул. Чтения, получаемые в результате высокопроизводительного секвенирования, содержат два разных типа разрывов, один из которых образуется в результате сплайсинга, а второй – в результате лигирования. Нами разработан RNAcontacts – универсальный вычислительный конвейер для обнаружения контактов РНК-РНК в данных КС РНК. RNAcontacts решает задачу картирования последовательностей с двумя различными типами разрывов с помощью двухпроходного выравнивания. На первом проходе из контрольного эксперимента секвенирования РНК определяют экзон-экзонные соединения, которые затем передают картировщику на втором проходе как уже известные интроны. Этот подход позволяет с большей чувствительностью обнаруживать контакты РНК и обладает более высокой специфичностью в отношении интронов, присутствующих в биологическом образце, по сравнению с уже существующими методами. RNAcontacts в автоматическом режиме извлекает контакты, кластеризует точки лигирования, вычисляет поддержку чтением и визуализирует результаты. Он реализован в воспроизводимой и масштабируемой системе управления рабочими процессами Snakemake, которая позволяет быстро и единообразно обрабатывать сразу несколько наборов данных. Разработанный вычислительный конвейер применим к любым данным КС, если одним из взаимодействующих партнеров является РНК. RNAcontacts доступен через репозиторий github по адресу <https://github.com/smargasyuk/RNAcontacts/>

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** РНК, лигирование, сплайсинг, конформационное секвенирование.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** КС – конформационное секвенирование; RNA-seq – секвенирование РНК (RNA sequencing); ЛПБМ – лигирование пространственно близких молекул.

## ВВЕДЕНИЕ

Быстрое развитие технологий высокопроизводительного секвенирования позволило выявлять пространственные контакты между нуклеиновыми кислотами, включая контакты ДНК в трехмерной структуре хроматина [1–3], функциональные взаимодействия энхансеров с промоторами [4, 5], а также хроматин-ассоциированные контакты РНК с ДНК [6, 7]. Эти методы основаны на принципе лигирова-

ния пространственно сближенных молекул (ЛПБМ, proximity ligation assays) – разрезании и последующем стохастическом лигировании нуклеиновых кислот, входящих в состав макромолекулярных комплексов, которое преимущественно происходит между пространственно близкими участками. Глубокое секвенирование полученных химерных фрагментов дает сотни миллионов чтений, содержащих последовательности взаимодействующих локусов.

В некоторых недавно разработанных методах для изучения взаимодействий РНК-РНК *in vivo* и *in vitro* применяется ЛПБМ [8, 9]. В некоторых из этих методов, таких, как PARIS [10], LIGR-seq [11], SPLASH [12] и COMRADES [13], используются производные псоралена для того, чтобы вызвать обратимое сшивание между дуплексами РНК для определения комплементарных взаимодействий. В протоколе конформационного секвенирования РНК *in situ* (RIC-seq) цепи РНК сшиваются через РНК-связывающие белки (РСБ) [14], что позволяет не только устанавливать вторичные и третичные структуры РНК, но и помогает воссоздать трехмерные карты взаимодействий РНК с РСБ. Во всех этих случаях взаимодействия закодированы в химерных последовательностях РНК, полученных путем разрезания и последующего лигирования.

В отличие от взаимодействий ДНК с ДНК, проявляющихся в данных КС в виде чтений с разрывами, которые картируются только на два пространственно близких геномных локуса, взаимодействия РНК с РНК дают чтения, которые могут картироваться более сложным образом, поскольку пре-мРНК подвергаются сплайсингу. В частности, химерные фрагменты могут содержать как экзон-экзонные соединения (ЭЭС), так и продукты сшивки пространственно близких РНК, в результате чего образуются как чтения с каноническими интронными GT/AG-разрывами, возникающими при сплайсинге, так и чтения с другими разрывами, возникающими при лигировании (рис. 1А). Точное картирование та-

ких чтений представляет сложную задачу, поскольку большинство картировщиков может работать только с одним типом разрывов. Так, картировщик, имеющий только одну модель разрывов, был бы вынужден либо увеличивать штраф для разрывов без GT/AG-мотива для более точной идентификации координат канонических интронов, либо ослаблять требования к наличию GT/AG-мотива с целью более точного нахождения координат РНК-контактов. Поэтому разработка вычислительного метода, позволяющего картировать короткие чтения с двумя различными типами разрывов, является актуальной задачей биоинформатики. В данной работе представлен вычислительный конвейер, который позволяет достичь этой цели без разработки специализированного картировщика.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Геномы и их аннотации

Сборка генома человека hg19 (февраль 2009) и аннотация транскриптома GENCODE v34lift37 были загружены с веб-сайта Genome Reference Consortium [15] и веб-сайта GENCODE [16] соответственно. Координаты интронов получены из выходных данных программы STAR (см. ниже).

### Данные высокопроизводительного секвенирования

Две реплики данных RIC-seq с деплецией рРНК (GSM3629915 и GSM3629916) в клеточ-

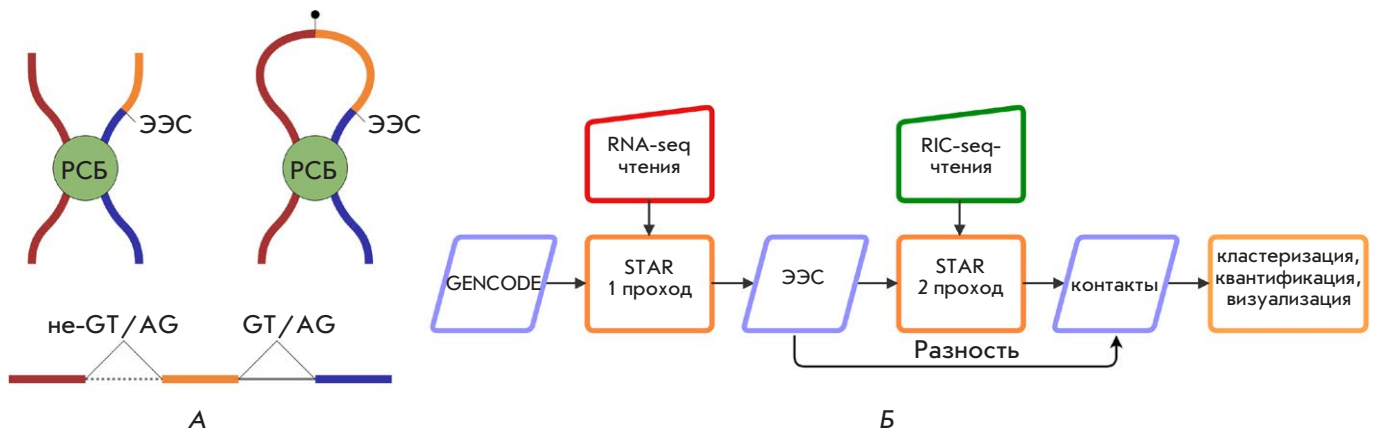


Рис. 1. А – в протоколе RIC-seq [14] несплайсированный участок РНК может быть лигирован через РНК-связывающий белок (РСБ) с другим участком, содержащим экзон-экзонные соединения (ЭЭС). Последовательность, образованная в результате лигирования, выравнивается на геном с двумя разрывами: не-GT/AG-разрывом, соответствующим точке лигирования, и каноническим GT/AG-разрывом, соответствующим сплайсингу. Б – схема RNAcontacts. На первом проходе чтения из контрольного эксперимента RNA-seq выравниваются на референсный геном для выявления экспрессируемых ЭЭС. Эти ЭЭС используются на втором проходе как известные интроны при выравнивании данных КС для обнаружения разрывов, которые кодируют контакты РНК-РНК

ной линии HeLa [14] были загружены из Gene Expression Omnibus в формате FASTQ (GSE127188). Соответствующий набор контрольных данных секвенирования РНК (RNA-seq) в клеточной линии HeLa был загружен из консорциума ENCODE (ENCLB555ASI и ENCLB555ASJ). На первом проходе данные RNA-seq картировали на геном человека с помощью программы-картировщика STAR версии 2.7.3a в парноконцевом режиме со следующими дополнительными параметрами:

```
--runMode alignReads --outSAMtype BAM SortedByCoordinate --chimOutType Junctions.
```

На втором проходе данные RIC-seq картировали на геном человека с помощью той же версии STAR со следующими дополнительными параметрами:

```
--chimSegmentMin 15 --chimJunctionOverhangMin 15 --chimScoreJunctionNonGTAG -1 --scoreGapNoncan -1 --scoreGapATAC -1 --scoreGapGCAG -1 --chimSegmentReadGapMax 3 --outFilterMatchNminOverLread 0.5 --outFilterScoreMinOverLread 0.5
```

Параметр `--chimSegmentReadGapMax 3` введен для пропуска при картировании дополнительного биотинилированного остатка цитозина в RIC-seq [14]. При втором проходе штраф снижается до `-1` для всех типов неканонических разрывов.

### Реализация метода

RIC-contacts реализован в популярной системе управления задачами Snakemake [17] и находится в свободном доступе на GitHub [18]. Пути к входным файлам указываются в конфигурационном файле в формате `yaml`, который также содержит настройки STAR и дополнительные параметры, контролирующие минимальное расстояние между двумя точками лигирования в кластере и порог разброса, для визуализации коллинеарных разрывов через UCSC Genome Browser [19]. Коллинеарные чтения извлечены из BAM-файлов с помощью отдельных программ (`neo.pl` в репозитории RNAcontacts) и пакета `samtools v1.14` [20]. Пакет `bedops v2.4.41` использовался для кластеризации точек разрыва [21]. Количество поддерживающих чтений подсчитано с помощью пакета `bedtools v2.29.0` [22].

### Визуализация результатов

Для визуализации карт контактов списки контактов были конвертированы в формат `'cool'` с помощью пакета `'cooler'` v0.8.11 с разрешением 100 п.н. Полученные карты визуализировали с помощью

пакета `pygenometracks v3.7`. Визуализация чтений с разрывами выполнена с помощью `IGV v2.11.2` и `UCSC Genome Browser` [19]. По умолчанию в UCSC Genome Browser визуализируются только коллинеарные контакты с разбросом не более 50000 нуклеотидов (см. также руководство [18]).

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Метод RNAcontacts

Для анализа данных КС РНК нами разработан вычислительный конвейер RNAcontacts, который обходит проблему нескольких различных типов разрывов путем выравнивания коротких чтений в двухпроходном режиме (рис. 1Б). Метод основан на использовании картировщика STAR [23], который на первом этапе выравнивает набор данных секвенирования РНК (RNA-seq) в парноконцевом режиме, чтобы определить интроны, которые экспрессируются в данном биологическом образце, используя строгий штраф для не-GT/AG-разрывов. Здесь RNA-seq представляет собой контрольный эксперимент, не содержащий химерных фрагментов, полученных в результате ЛПБМ. На втором проходе чтения сгенерированные в эксперименте КС РНК выравниваются с использованием ослабленного штрафа за не-GT/AG-разрывы, при этом на вход подается список разрывов, идентифицированных на первом проходе как интроны, так что картировщик будет преимущественно делать разрывы в чтениях по координатам из предоставленного списка. Поскольку данные КС РНК могут содержать химерные чтения на произвольном геномном расстоянии или *in trans*, выравнивание на втором проходе выполняется в одноконцевом режиме. Все выравнивания с разрывами, полученные на втором проходе, анализируются для извлечения контактов РНК-РНК и исключения интронов, полученных на первом проходе.

Программы выравнивания чтений с разрывами обычно генерируют два отдельных выходных файла, соответствующих коллинеарным и неколлинеарным разрывам. В частности, программа-картировщик STAR сообщает о коллинеарных разрывах (одна и та же хромосома, одна и та же цепь, согласованный порядок картирования фрагментов) в стандартном выходном файле SAM/BAM, в то время как неколлинеарные разрывы помещаются в отдельный выходной файл с химерными разрывами, так как BAM-формат не позволяет представить их с помощью одной CIGAR-строки [23]. RNAcontacts извлекает координаты неоразрывов, т.е. коллинеарных разрывов, найденных на втором проходе, из результатов SAM/BAM и объединя-

ет их с химерными разрывами. Следует отметить, что не только *trans*-, но и *cis*-контакты могут быть закодированы как в нео-, так и в химерных разрывах. Объединенный результат второго прохода состоит из нео- и химерных разрывов в чтениях, которые соответствуют точкам лигирования РНК.

В ходе эксперимента RIC-seq в клеточной линии HeLa [14] были картированы 94.3% из ~224 млн чтений из двух реплик, где 72.0% картированных чтений картированы уникально (табл. S1). При этом 18.5% уникально картированных чтений содержали по крайней мере один разрыв, в то время как значения для LIGR-seq, PARIS и SPLASH, как сообщалось ранее, составили 3.5, 2 и 0.5% соответственно [24]. Отметим, что результаты работы программ картирования коротких чтений, учитывающих сплайсинг, могут различаться. При использовании протокола RIC-seq небольшие различия в координатах разрывов могут возникать даже при сопоставлении чтений, которые перекрывают одну и ту же точку лигирования, поскольку картирование одной и той же последовательности на одну или другую цепь может приводить к смещению координат из-за отсутствия консенсусных последовательностей у точек лигирования (рис. S1). Кроме того, различные копии одной и той же РНК разрезаются и повторно лигируются стохастически, что приводит к еще большей вариабельности. Учитывая эту техническую и биологическую вариативность, мы ожидаем выявление кластеров точек лигирования, а не четко определенных сайтов, как это имеет место в случае сайтов сплайсинга в GT/AG-интронах.

Распределение расстояний между двумя последовательными точками разрыва быстро убывает, причем приблизительно 50% расстояний составляет меньше 9 нуклеотидов и 90% расстояний – меньше 21 нуклеотида (рис. S2). Поэтому точки разрыва были кластеризованы с использованием односвязной (single-linkage) кластеризации с порогом по расстоянию ( $\delta$ ) 10 и 20 нуклеотидов (рис. S3). Контакты определены как пары кластеров, соединяемые хотя бы одним разрывом, а число чтений, поддерживающих контакт, определяли как суммарное число чтений, поддерживающих все разрывы из кластера.

Для каждого значения  $\delta$  мы разделили контакты на три группы: внутригенные (оба конца контакта принадлежат аннотированному гену), контакты *in cis* (на одной хромосоме, но не в одном гене) и контакты *in trans* (на разных хромосомах). Число контактов ( $n$ ), длина кластера ( $s$ ), расстояние между контактирующими кластерами ( $d$ , которое определяется только для внутригенных и *cis*-контактов) и число поддерживающих чтений ( $r$ )

Таблица 1. Характеристика кластеров контактов РНК-РНК

$\delta$	Метрика	Внутригенные кластеры контактов	<i>in cis</i>	<i>in trans</i>
10	n	1369158	1061470	4881920
	s	10.1±2.2	10.1±2.1	10.2±2.2
	log <sub>2</sub> d	10.8±3.3	17.6±4.4	нет
	log <sub>2</sub> r	0.8±0.8	0.5±0.7	0.5±0.7
20	n	1313727	1035656	4851697
	s	20.2±2.4	20.2±2.3	20.3±2.4
	log <sub>2</sub> d	11.0±3.3	17.6±4.4	нет
	log <sub>2</sub> r	0.8±0.8	0.5±0.7	0.5±0.7

Примечание. Расстояние между кластерами,  $\delta$ . Количество контактов,  $n$ . Длина кластера,  $s$ . Расстояние между контактирующими кластерами,  $d$ . Количество чтений, поддерживающих контакт,  $r$ . Показано среднее значение ± стандартное отклонение.

незначительно различались для двух значений  $\delta$  (табл. 1). В среднем мы обнаружили на 30% больше внутригенных контактов, чем контактов *in cis*, и более чем двукратное обогащение контактов *in trans* по отношению к двум другим группам. При  $\delta = 10$  большинство кластеров имели длину 10 нуклеотидов (рис. S4), что указывает на то, что они состоят только из одной индивидуальной точки лигирования, окруженной с обеих сторон участками из 5 нуклеотидов.

Расстояния между контактирующими кластерами по-разному распределены в нео- и химерных разрывах в чтениях как по количеству собственно контактов, так и при взвешивании по количеству поддерживающих чтений (рис. S5). Примечательно, что распределения имеют две моды, причем первая мода  $d=1000$  соответствует внутригенным контактам, задаваемым как нео-, так и химерными разрывами. Химерные разрывы могут задавать внутригенные контакты, если лигирование произошло в обратной ориентации, как например, в кольцевых РНК [25]. Вторая мода для неоразрывов обусловлена условием  $d \leq 250000$ , которое накладывает картировщик STAR на коллинеарные разрывы, однако более длинные контакты *in cis* захвачены химерным распределением. При этом большинство контактов *in cis* и *in trans* поддерживается только одним чтением.

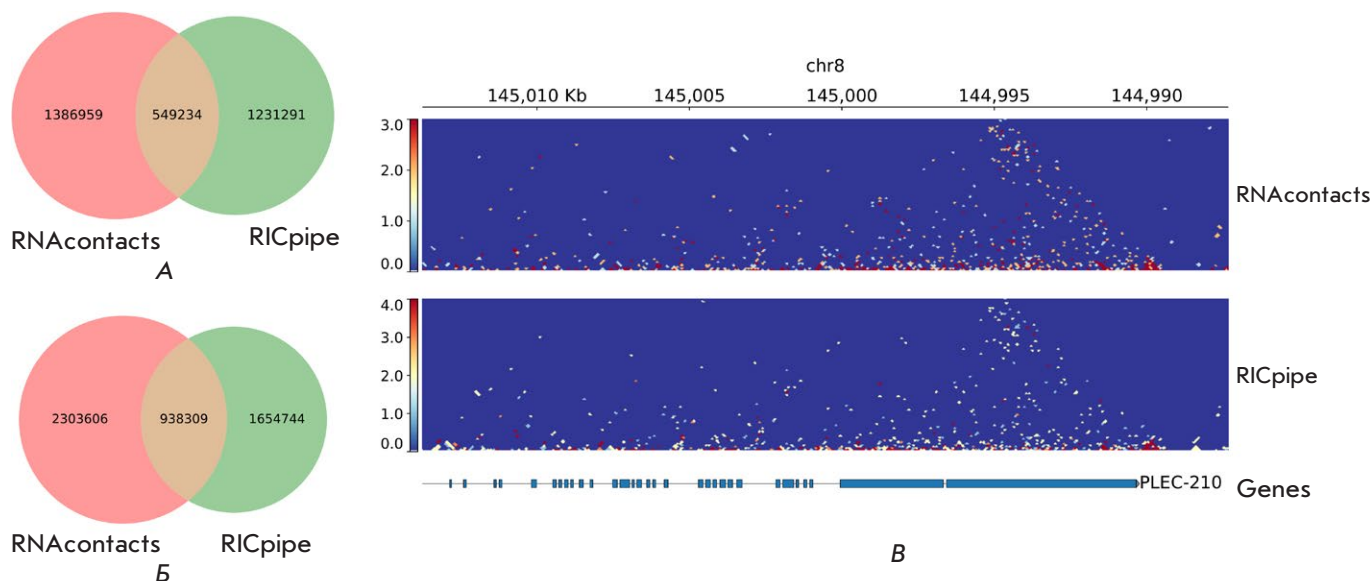


Рис. 2. Сравнение RNAcontacts и RICpipe. А – диаграмма Венна для координат разрывов, полученных по RNAcontacts и RICpipe. Б – то же, но координаты разрывов взвешены по их поддержке чтениями. В – карты контактов в гене PLEC-210, полученные из RNAcontacts (вверху) и RICpipe (внизу)

ем, в то время как большинство внутригенных контактов поддерживается двумя чтениями (рис. S6). Таким образом, поддержка чтениями в отдельных экспериментах RIC-seq довольно скудна даже после объединения контактов в кластеры.

### Чувствительность RNAcontacts

Чтобы сравнить производительность RNAcontacts с производительностью RICpipe (метод, изначально разработанный для анализа данных RIC-seq), мы проанализировали внутрихромосомные разрывы в чтениях с разбросом 50 нуклеотидов или более. Мы исключили разрывы в чтениях, картируемых на рРНК, из результатов RNAcontacts, поскольку RICpipe также удаляет чтения рРНК [14]. Только 40% (соответственно, 45%) разрывов, идентифицированных с помощью RNAcontacts (соответственно, RICpipe), имели точно такие же координаты, как и разрывы, идентифицированные другим методом, что указывает на различия в процедурах картирования (рис. 2А). Однако RNAcontacts удалось выровнять больше чтений, поддерживающих идентифицированные разрывы, по сравнению с RICpipe, что указывает на увеличение чувствительности примерно на 40% (рис. 2Б). При проведении сравнения с использованием окон размером 100 нуклеотидов, т.е. без точного совпадения координат, мы заметили, что результаты двух методов в значительной степени согласованы, о чем также свидетельствуют визуально похожие

карты контактов с немного большим количеством контактов, полученных RNAcontacts, по сравнению с RICpipe (рис. 2В).

Затем мы проверили производительность RNAcontacts на данных RIC-seq в клеточной линии HeLa с первым проходом картирования и без него. Для этого мы отдельно выполнили второй проход RNAcontacts, предоставляя только аннотированные интроны из GENCODE [16], не добавляя специфичные для клеточной линии HeLa интроны, найденные на первом проходе. В результате получен примерно 1% ложных соединений лигирования, которые соответствуют неаннотированным интронам в HeLa. Мы также обнаружили, что 16809 из ~3.5 млн разрывов в чтениях, идентифицированных с помощью RICpipe, соответствуют экзон-экзонным соединениям. Хотя количество таких разрывов невелико, они поддерживаются значительной долей (>30%) чтений. Таким образом, двухпроходный метод обеспечивает более высокую специфичность (меньший процент ложноположительных результатов) при обнаружении контактов РНК, особенно в условиях, когда экспрессируемый транскриптом значительно отличается от аннотированного.

### ОБСУЖДЕНИЕ И ВЫВОДЫ

В данной работе представлено концептуальное решение проблемы картирования чтений с двумя типами разрывов, характерными для экспериментов КС РНК. Несмотря на то, что представленное реше-



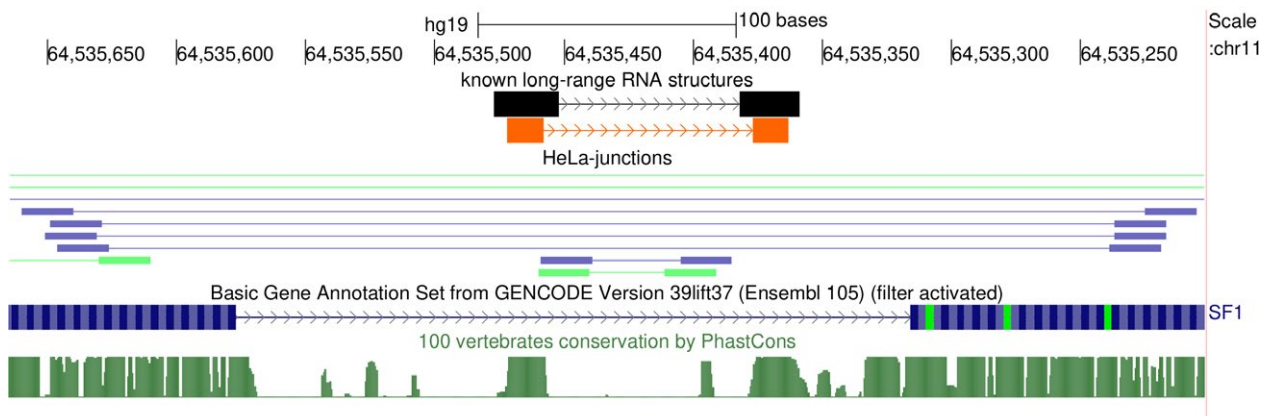


Рис. 3. Разрывные чтения, поддерживающие структуру РНК в гене *SF1* человека [28]. Комплементарные цепи показаны оранжевым цветом. Ниже показаны разрывные чтения (чтения из двух реплик показаны синим и зеленым цветом)

ние задействует картировщик STAR, предложенный подход не ограничивается использованием только этой программы, и вместо нее может быть использована любая другая программа для выравнивания чтений с разрывами [26]. Мы продемонстрировали, что экзон-экзонные соединения составляют большую часть чтений с разрывами в данных RIC-seq, и RNAcontacts позволяет обнаруживать разрывы, соответствующие точкам лигирования в экспериментах RIC-seq, с большей чувствительностью, чем RICpipe. Реализация RNAcontacts в воспроизводимой и масштабируемой системе управления рабочим процессом Snakemake позволяет быстро и единообразно обрабатывать множество наборов однотипных данных КС.

Данные экспериментов конформационного секвенирования РНК похожи по характеру на данные Hi-C, но имеют важные отличия, связанные с разрешением. Если для Hi-C обычной практикой является усреднение контактов хроматина на уровне тысяч или миллионов пар нуклеотидов, то обнаружение контактов РНК с помощью КС по своей сути нацелено на масштаб отдельных нуклеотидов. При этом поддержка известных контактов чтениями RIC-seq, например, в известной вторичной структуре в гене *SF1*, очень слаба (рис. 3). Большинство контактов RIC-seq *in cis* и *in trans* поддерживаются только одним чтением, в связи с чем возникает проблема оценки статистической значимости наблюдаемых контактов. Эта проблема, возможно, будет решена в исследованиях, анализирующих большие наборы экспериментов RIC-seq. Мы ожидаем, что в скором времени появится гораздо больше наборов данных

экспериментов КС РНК, аналогичных RIC-seq, которые могут быть проанализированы представленным методом.

Таким образом, RNAcontacts реализует вычислительный конвейер анализа контактов РНК-РНК, учитывающий два типа разрывов, специфичных для метода КС РНК. Несмотря на то, что программное обеспечение разработано для протокола RIC-seq, область его применения распространяется на любой аналогичный метод КС, в котором одним из взаимодействующих партнеров является РНК. ●

*Авторы выражают благодарность Т.М. Иванову за дополнительное тестирование программы. Работа поддержана грантами Министерства науки и образования Российской Федерации (075-10-2021-116) и исследовательского гранта Национальной ключевой программы исследований и разработок Китая (2021YFE0114900).*

*Авторы заявляют, что у них нет конкурирующих интересов.*

*Д.Д.П. разработал план и руководил исследованием; Г.Л. и Ч.К. предоставили данные и участвовали в их обработке; С.Д.М. провел анализ данных и разработал программное обеспечение. Все авторы участвовали в написании текста статьи, прочитали и одобрили его.*

### ДОПОЛНИТЕЛЬНЫЕ МАТЕРИАЛЫ

Дополнительные данные и материалы доступны в репозитории Zenodo (<https://zenodo.org/record/7027475>) [27].

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Jerkovic I, Cavalli G. // *Nat. Rev. Mol. Cell. Biol.* 2021. V. 22. № 8. P. 511–528.
2. McCord R.P., Kaplan N., Giorgetti L. // *Mol. Cell.* 2020. V. 77. № 4. P. 688–708.
3. Han J., Zhang Z., Wang K. // *Mol. Cytogenet.* 2018. V. 11. P. 21.
4. Lu L., Liu X., Huang W.K., Giusti-Rodríguez P., Cui J., Zhang S., Xu W., Wen Z., Ma S., Rosen J.D., et al. // *Mol. Cell.* 2020. V. 79. № 3. P. 521–534.
5. Li G., Cai L., Chang H., Hong P., Zhou Q., Kulakova E.V., Kolchanov N.A., Ruan Y. // *BMC Genomics.* 2014. V. 15 Suppl. 12. P. S11.
6. Bell J.C., Jukam D., Teran N.A., Risca V.I., Smith O.K., Johnson W.L., Skotheim J.M., Greenleaf W.J., Straight A.F. // *Elife.* 2018. V. 7. P. e27024.
7. Limouse C., Jukam D., Smith O.K., Fryer K.A., Straight A.F. // *Meth. Mol. Biol.* 2020. V. 2161. P. 115–142.
8. Kudla G., Wan Y., Helwak A. // *Annu. Rev. Genomics Hum. Genet.* 2020. V. 21. P. 81–100.
9. Xu B., Zhu Y., Cao C., Chen H., Jin Q., Li G., Ma J., Yang S.L., Zhao J., Zhu J., et al. // *Sci. China Life Sci.* 2022. V. 65. № 7. P. 1285–1324.
10. Lu Z., Zhang Q.C., Lee B., Flynn R.A., Smith M.A., Robinson J.T., Davidovich C., Gooding A.R., Goodrich K.J., Mattick J.S., et al. // *Cell.* 2016. V. 165. № 5. P. 1267–1279.
11. Sharma E., Sterne-Weiler T., O’Hanlon D., Blencowe B.J. // *Mol. Cell.* 2016. V. 62. № 4. P. 618–626.
12. Aw J.G., Shen Y., Wilm A., Sun M., Lim X.N., Boon K.L., Tapsin S., Chan Y.S., Tan C.P., Sim A.Y., et al. // *Mol. Cell.* 2016. V. 62. № 4. P. 603–617.
13. Ziv O., Gabryelska M.M., Lun A.T.L., Gebert L.F.R., Sheu-Gruttadauria J., Meredith L.W., Liu Z.Y., Kwok C.K., Qin C.F., MacRae I.J., et al. // *Nat. Methods.* 2018. V. 15. № 10. P. 785–788.
14. Cai Z., Cao C., Ji L., Ye R., Wang D., Xia C., Wang S., Du Z., Hu N., Yu X., et al. // *Nature.* 2020. V. 582. № 7812. P. 432–437.
15. Church D.M., Schneider V.A., Graves T., Auger K., Cunningham F., Bouk N., Chen H.C., Agarwala R., McLaren W.M., Ritchie G.R., et al. // *PLoS Biol.* 2011. V. 9. № 7. P. e1001091.
16. Harrow J., Frankish A., Gonzalez J.M., Tapanari E., Diekhans M., Kokocinski F., Aken B.L., Barrell D., Zadissa A., Searle S., et al. // *Genome Res.* 2012. V. 22. № 9. P. 1760–1774.
17. Mölder F., Jablonski K.P., Letcher B., Hall M.B., Tomkins-Tinch C.H., Sochat V., Forster J., Lee S., Twardziok S.O., Kanitz A., et al. // *F1000Res.* 2021. V. 10. P. 33.
18. Margasyuk S., Pervouchine D. RNAcontacts pipeline. <https://doi.org/10.5281/zenodo.6512482>. 2022.
19. Raney B.J., Dreszer T.R., Barber G.P., Clawson H., Fujita P.A., Wang T., Nguyen N., Paten B., Zweig A.S., Karolchik D., Kent W.J. // *Bioinformatics.* 2014. V. 30. № 7. P. 1003–1005.
20. Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R. // *Bioinformatics.* 2009. V. 25. № 16. P. 2078–2079.
21. Neph S., Kuehn M.S., Reynolds A.P., Haugen E., Thurman R.E., Johnson A.K., Rynes E., Maurano M.T., Vierstra J., Thomas S., et al. // *Bioinformatics.* 2012. V. 28. № 14. P. 1919–1920.
22. Quinlan A.R., Hall I.M. // *Bioinformatics.* 2010. V. 26. № 6. P. 841–842.
23. Dobin A., Davis C.A., Schlesinger F., Drenkow J., Zaleski C., Jha S., Batut P., Chaisson M., Gingeras T.R. // *Bioinformatics.* 2013. V. 29. № 1. P. 15–21.
24. Schönberger B., Schaal C., Schäfer R., Voß B. // *F1000Res.* 2018. V. 7. P. 1824
25. Eger N., Schoppe L., Schuster S., Laufs U., Boeckel J.N. // *Adv. Exp. Med. Biol.* 2018. V. 1087. P. 41–52.
26. Engström P.G., Steijger T., Sipoš B., Grant G.R., Kahles A., Rättsch G., Goldman N., Hubbard T.J., Harrow J., Guigó R., et al. // *Nat. Methods.* 2013. V. 10. № 12. P. 1185–1191.
27. Margasyuk S., Vlasenok M., Li G., Cao C., Pervouchine D. RIC-seq contacts in HeLa. 2022. URL: <https://doi.org/10.5281/zenodo.7027475>.
28. Pervouchine D.D., Khrameeva E.E., Pichugina M.Y., Nikolaienko O.V., Gelfand M.S., Rubtsov P.M., Mironov A.A. // *RNA.* 2012. V. 18. № 1. P. 1–15.

УДК 548.5; 538.9; 544.77.023.55

# Связь концентрации кластеров-прекурсоров в насыщенном кристаллизационном растворе с дальним порядком при переходе к твердой фазе

М. А. Марченкова<sup>1\*</sup>, А. С. Бойкова<sup>1</sup>, К. Б. Ильина<sup>1</sup>, П. В. Конарев<sup>1</sup>, Ю. В. Писаревский<sup>1</sup>, Ю. А. Дьякова<sup>2</sup>, М. В. Ковальчук<sup>1,2</sup>

<sup>1</sup>ФНИЦ «Кристаллография и фотоника» РАН, Москва, 119333 Россия

<sup>2</sup>НИЦ «Курчатовский институт», Москва, 123182 Россия

\*E-mail: marchenkova@crys.ras.ru

Поступила в редакцию 02.10.2022

Принята к печати 11.01.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11815

**РЕФЕРАТ** Предложена модель перехода от разупорядоченного жидкого состояния к твердой фазе, основанная на установлении корреляции между концентрацией кластеров-прекурсоров в насыщенном растворе и особенностями образования твердой фазы. Справедливость модели проверена экспериментально путем параллельного исследования олигомерной структуры растворов белка лизоцима и особенностей образования твердой фазы из этих растворов. Показано, что в отсутствие в растворе кластеров-прекурсоров (октамеров) твердая фаза не образуется; при небольшой концентрации октамеров образуются совершенные монокристаллы; при увеличении степени пересыщения (и концентрации октамеров) наблюдается массовая кристаллизация; еще большее увеличение концентрации октамеров приводит к образованию аморфной фазы.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** олигомеры, кластеры-прекурсоры, кристаллизация, пересыщение, рост кристаллов.

## ВВЕДЕНИЕ

Переход от жидкого разупорядоченного состояния к твердому является важной областью физики конденсированного состояния, составляющей предмет исследований в течение многих десятилетий [1, 2]. Проведено огромное количество экспериментальных исследований перехода к твердой фазе разнообразных веществ: синтетических, металлических, диэлектрических, полупроводниковых, органических, высокомолекулярных (в том числе белков) и пр. Для растворов известных соединений переход к твердой фазе наблюдается при достижении пересыщения раствора. Также установлено, что степень пересыщения влияет на структуру образующейся твердой фазы. При небольших значениях пересыщения образуются монокристаллы. Дальнейшее увеличение степени пересыщения приводит к массовой кристаллизации, а затем к образованию аморфной фазы. Тем не менее, до настоящего времени не существует общепринятой модели этого перехода.

Классический путь кристаллизации, который когда-то считался применимым ко всем системам, постепенно уступает место неклассическому пути,

который в настоящее время считается доминирующим механизмом кристаллизации из раствора и других систем [2–9]. В соответствии с классической теорией роста кристаллов, рост любого кристалла происходит за счет присоединения к его поверхности новых строительных единиц (атомов, ионов, молекул или их комплексов) из среды – раствора, расплава, пара или твердого тела. В неклассических моделях кристаллизации постулируется возможность роста кристаллов за счет присоединения к растущей поверхности не единичных атомов, ионов или молекул, как в классической теории, а целых блоков твердой фазы. Стоит отметить, что в этих работах описаны образующиеся прекурсоры, частицы, плотные жидкие капли, имеющие аморфную структуру, а также существенные особенности ряда случаев перехода от жидкого к твердому, проявляющиеся в процессах, происходящих в масштабе десятков нанометров и больше. В этих работах отмечается необходимость исследования процессов, происходящих в насыщенных (кристаллизационных) растворах, в масштабе единиц и десятков нанометров.

В последние несколько лет структуры кристаллизационных растворов в масштабах единиц и десятков нанометров изучали с использованием методов малоуглового рассеяния рентгеновских лучей (МУРР) и нейтронов (МУРН), а также методов молекулярной динамики. Такие работы проведены прежде всего для насыщенных кристаллизационных растворов ряда белков [10–15] и дигидрофосфата калия [9]. В этих работах из кристаллической структуры исследуемых соединений выделяли 3D-фрагменты, из которых мог строиться монокристалл. И эти упорядоченные образования обнаружены в насыщенных растворах лизоцима (октамеры [10–15]), термолизина (гексамеры [16]), протеиназы (димеры [17]), аминотрансферазы (двенадцатимеры [18]), а также в растворах дигидрофосфата калия (октамеры [19]), что экспериментально подтвердило гипотезу о существовании и структуре кластера-прекурсора в кристаллизационном растворе. Методом молекулярной динамики установлено, что именно этот кластер стабилен в кристаллизационном растворе [20]. В частности, для лизоцима установлено, что в кристаллизационном растворе существуют только димеры и октамеры белка, а другие олигомеры (тетрамеры, гексамеры, десятимеры и т.п.) нестабильны [21].

Подробно исследована зависимость концентрации димеров и октамеров лизоцима от температуры, концентрации осадителя, растворителя методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей либо нейтронов. В большой области изменения параметров кристаллизационного раствора подтверждено, что структура раствора лизоцима включает мономеры, димеры и октамеры этого белка, соотношение между которыми зависит от степени пересыщения раствора [10–15].

В настоящей работе на примере лизоцима исследована связь между концентрацией кластера-прекурсора и особенностями образования твердой фазы. Для этого были проведены две серии работ. Методом малоуглового рассеяния рентгеновских лучей была измерена олигомерная структура лизоцима (соотношение между концентрацией мономеров, димеров и октамеров) в ~60 растворах лизоцима с различным составом осадителя. В этих же растворах изучен переход к твердой фазе (кристаллизацию проводили методом диффузии в парах в варианте сидячей капли).

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Приготовление кристаллизационных растворов белка лизоцима

Для приготовления образцов использовали лизоцим куриного яйца производства Sigma-Aldrich (CAS#

12650-88-3, США). В качестве осадителей использовали растворы из наборов для кристаллизации *NeXtal-Tubes-Classics-Suite 1*, *NeXtal-Tubes-Classics-Suite 2* (QIAGEN®) и хлорид натрия (CAS 7647-14-5) производства Helicon (Россия). Для приготовления натрий-ацетатного буфера использовали ацетат натрия (CAS 6131-90-4) производства Sigma-Aldrich и уксусную кислоту (CAS 64-19-7) производства PanReac AppliChem. (Далее растворы осадителей из наборов для кристаллизации будут обозначаться как CS1 № и CS2 № соответственно, где вместо № приведен номер конкретного раствора из набора.) Лизоцим и NaCl растворяли в 0.2 М натрий-ацетатном буфере с pH 4.5, приготовленном с использованием ультрачистой воды Millipore (сопротивление воды 18 Мом × см). Раствор белка перед смешением с осадителем центрифугировали в течение 10 мин с частотой 10 000 об/мин. Начальная концентрация маточного раствора белка – 80 мг/мл, затем этот раствор разбавляли буфером до достижения необходимой концентрации.

Перед проведением измерений МУРР лизоцим и маточные растворы осадителя смешивали в равных объемах.

### Измерение структуры кристаллизационных растворов лизоцима методом МУРР

*Измерения растворов лизоцима методом МУРР на станции P12 EMBL BioSAXS источника синхротронного излучения PETRA III (DESY, г. Гамбург, Германия).* Образцы с различным составом осадителей из наборов CS1 и CS2 были измерены на станции P12 EMBL BioSAXS источника синхротронного излучения PETRA III (DESY, г. Гамбург, Германия) [22]. Энергия рентгеновского излучения составляла 10 кэВ ( $\lambda = 0.124$  нм). Сбор данных проводили с использованием пиксельного двухкоординатного детектора PILATUS 6M (Dectris, Швейцария) при расстоянии образец–детектор 3.0 м, охватывающем диапазон вектора рассеяния  $0.02 < s < 7.0$  нм<sup>-1</sup> ( $s = 4\pi\sin\theta/\lambda$ , где  $2\theta$  – угол рассеяния), что соответствует разрешению 300–0.9 нм в реальном пространстве. Измерения проводили с использованием специализированной ячейки для образцов МУРР, состоящей из горизонтального термостатируемого (в диапазоне температур от 278 до 323 К) кварцевого капилляра с толщиной стенок 50 мкм и диаметром 1.7 мм, размещенного в специализированном корпусе из нержавеющей стали для вакуумных измерений. Исследуемый раствор равномерно продвигался по капилляру, при этом пучок попадал в одну и ту же точку на капилляре, но все время в новую часть образца. Для каждого измерения образца сделано 20 съемок. Время экспо-

зиции составляло 50 мс. Объем образца в каждом измерении составлял 40 мкл. Все измерения проводили при температуре 20°C и концентрации лизоцима 20 мг/мл.

*Измерения растворов лизоцима методом МУРР на станции BM29 BioSAXS источника синхротронного излучения ESRF (г. Гренобль, Франция).* Образцы с различными концентрациями осадителя NaCl (в диапазоне от 5 до 30 мг/мл) были измерены на станции BM29 BioSAXS источника синхротронного излучения ESRF (г. Гренобль, Франция). Энергия рентгеновского излучения составляла 12.4 кэВ, в качестве детектора сигнала использовали пиксельный двухкоординатный детектор Pilatus 1M (Dectris). Расстояние образец–детектор составляло 2.9 м. Исследуемые образцы помещали в специальную термостатируемую роботизированную систему [23] в кюветы из полистирола объемом 200 мкл, нагрев которых осуществляли одновременно. Образцы нагревали до 20°C и далее поддерживали эту температуру на постоянной основе. Далее раствор из кюветы автоматически поступал в проточный кварцевый капилляр диаметром 1.8 мм, который использовали при измерениях. Исследуемый раствор равномерно продвигался по капилляру, при этом пучок попадал в одну и ту же точку на капилляре, но все время в новую часть образца. За время движения образца по капилляру сделано 10 съемок. Время экспозиции каждого измерения составляло 1 с, сечение пучка на образце – 700 мкм<sup>2</sup>.

### Методика обработки экспериментальных данных МУРР

Усреднение сигнала от буферного раствора, вычитание усредненного сигнала от буфера из экспериментальных данных рассеяния раствором белков и нормировку на концентрацию белка выполняли с помощью программы PRIMUS, входящей в пакет программ ATSAS [24, 25]. В результате были получены экспериментальные кривые интенсивности рассеяния  $I(s)$  растворов белка в различных условиях. Сравнение последовательных кривых рассеяния не выявило радиационного повреждения на исследуемых образцах. Добавление осадителя к раствору лизоцима в определенных условиях приводит к изменению олигомерного состава раствора, когда наряду с мономерными частицами начинают образовываться мультимеры (олигомеры более высокого порядка: димеры, тетрамеры, гексамеры, октамеры). Вследствие этого анализ данных проводили с учетом присутствия нескольких компонентов в системе. После первичной обработки экспериментальные кривые малоуглового рассеяния обрабатывали с помощью

программы OLIGOMER [25] для определения объемных долей мономеров и олигомеров разного порядка. Расчет теоретических кривых олигомерных компонентов проводили с помощью программы CRY SOL [26]. В качестве мономерного компонента была взята кристаллографическая структура мономера лизоцима (PDB ID: 4WLD), а модели димера, тетрамера, гексамера и октамера получены по методике, описанной в [10]. Качество приближения оценивали с помощью минимизации невязки  $\chi^2$  между экспериментальными данными и теоретическими модельными приближениями по формуле, приведенной в [14].

### Кристаллизация лизоцима

Маточные растворы, приготовленные для измерений методом МУРР на станции P12 EMBL BioSAXS (DESY, Гамбург, Германия), использовали также для кристаллизации лизоцима. Кристаллизацию осуществляли методом диффузии в парах в варианте сидячей капли с помощью кристаллизационного робота Mosquito-LCP (EMBL, Гамбург, Германия), объем каждой из трех капель составлял 200 нл (100 нл маточного раствора белка + 100 нл маточного раствора осадителя). Кристаллы выращивали в автоматизированной системе визуализации ROCK IMAGER при температуре 19°C. Система позволяет наблюдать рост кристаллов белков и фотографировать капли в течение длительного времени (в «нулевой» день (сразу после загрузки кристаллизационного планшета) и далее в 1, 3, 7, 14, 28, 54 и 84 день). В качестве осадителей использовали те же растворы из наборов *NeXtal-Tubes-Classics-Suite 1* и *NeXtal-Tubes-Classics-Suite 2*, как и при исследовании растворов с помощью МУРР. Кристаллизацию лизоцима осуществляли при двух концентрациях белка: 20 и 40 мг/мл. Обратим внимание, что исследование растворов методом МУРР было проведено при одной концентрации (20 мг/мл).

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Как упомянуто в ввводной части, кристаллизацию можно описать как фазовый процесс перехода вещества из жидкой фазы в твердую. Таким образом, кристаллизация представляет собой трехстадийный процесс (двухступенчатая кристаллизация), при котором раствор первоначально пребывает в жидком состоянии, затем образуется промежуточная фаза, а на завершающей стадии образуется твердая фаза.

### Влияние концентрации осадителя на степень пересыщения и его связь с концентрацией октамеров

На степень пересыщения белкового раствора влияют несколько факторов, в число которых входят

**Таблица 1.** Олигомерный состав кристаллизационного раствора лизоцима (объемные доли мономеров, димеров и октамеров) с использованием NaCl в качестве осадителя, полученный методом МУРР

Концентрация NaCl, мг/мл	$R_g$ , А	Мономер, %	Димер, %	Октамер, %	$\chi^2$
30	21.0	85.6	10.3	4.1	1.46
25	20.7	87.3	8.9	3.8	1.41
20	20.3	88.8	7.7	3.5	1.30
15	19.5	92.0	5.1	2.9	1.43
5	15.5	95.2	4.5	0.3	1.78

Примечание. Измерения проводили при температуре 20°С.  $R_g$  – радиус инерции.  $\chi^2$  – качество приближения.

как физические параметры (например, температура), так и химические (концентрация осадителя и белка в растворе, химический состав раствора, в том числе природа осадителя). В рамках данной работы изучено влияние концентрации и типа осадителя на состав промежуточной фазы (содержание мономеров, димеров и октамеров, которые ее образуют). Результаты представлены в *табл. 1*.

Согласно уравнению (2) из [27], растворимость лизоцима ( $C_s$ ) и концентрация NaCl ( $C_{NaCl}$ ) в натрий-ацетатном буфере (рН 4.6) при температуре 293 К связаны следующим соотношением:

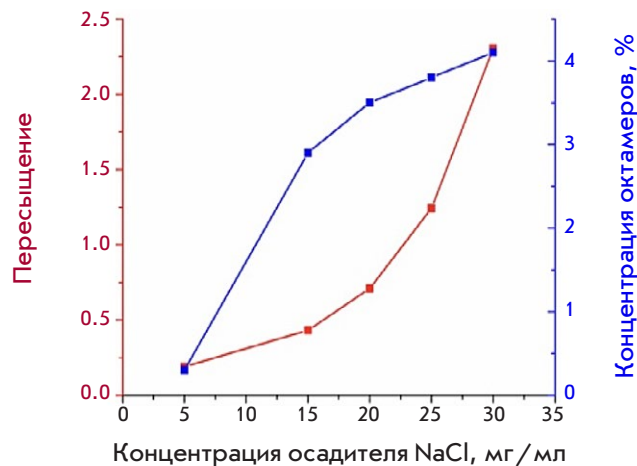
$$C_s = -0.0016C_{NaCl}^3 + 0.2146C_{NaCl}^2 - 9.6437C_{NaCl} + 148.06$$

Пересыщение ( $\sigma$ ) связано с растворимостью ( $C_s$ ) и концентрацией лизоцима в растворе ( $C$ ) соотношением:  $\sigma = C / C_s$  [24].

Расчитанный график зависимости пересыщения раствора лизоцима с зависимостью концентрации октамеров от концентрации NaCl в растворе представлен на *рис. 1*.

С увеличением концентрации NaCl увеличивается как пересыщение, так и объемная доля октамеров, причем пересыщение увеличивается не постепенно, а начиная с какого-то момента, почти экспоненциально. Точка наименьшего пересыщения и наибольшей растворимости при концентрации NaCl 5 мг/мл соответствует наименьшей объемной доли октамеров (0.3%), что делает кристаллизацию маловероятной.

С увеличением концентрации NaCl (от 15 до 30 мг/мл) объемная доля октамеров в растворе увеличивается с 2.9 до 4.1%. В то же время с увеличением концентрации осадителя быстро увеличивается степень пересыщения, что указывает на ее неста-



**Рис. 1.** Пересыщение лизоцима (красная кривая) и объемная доля октамеров (синяя кривая) в растворе лизоцима при разных концентрациях NaCl

бильность, где даже небольшое изменение внешних условий способно сильно повлиять на степень пересыщения раствора. Иными словами, в области, где объемная доля октамеров превышает 4%, вероятность появления монокристаллов должна уменьшаться, а вероятность агрегации или появления аморфного осадка, наоборот, увеличиться.

### Сопоставление результатов перехода в твердую фазу с концентрацией октамеров

Обработка полученных данных МУРР (олигомерный состав растворов, радиус инерции ( $R_g$ ) и значение невязки  $\chi^2$ ) от кристаллизационных растворов с наборами осадителей CS1 и CS2 приведена в *табл. 2–4*. В каждом случае указан химический состав осадителей и результат кристаллизации, который в нашем случае мог быть представлен одним из четырех вариантов:

- пустые капли (нет кристалла, результат «нет»);
- кристалл вырос при исследованной концентрации 20 мг/мл хотя бы в одной капле (результат «кристалл»);
- произошла агрегация (массовая кристаллизация, результат «агрегация»);
- произошла денатурация (образовался аморфный осадок, результат «денатурация»).

Из всех 67 исследованных растворов таких случаев 55.

При использовании остальных 12 осадителей (CS1 13, CS1 55, CS2 16, CS2 14, CS2 15, CS1 36, CS1 26, CS1 54, CS1 38, CS1 40, CS1 12, CS1 52) кристалл не вырос в растворе с концентрацией белка 20 мг/мл, но вырос при концентрации 40 мг/мл в растворе с этим же осадителем. В подавляющем

Таблица 2. Результаты исследования олигомерного состава кристаллизационных растворов лизоцима с осадителями из наборов для кристаллизации CS1 и CS2, полученные методом МУРР

№	Осадитель	$R_g$ , Å	Димер, %	Октамер, %	$\chi^2$	Результат кристаллизации	Состав раствора осадителя
1	CS1 1	14.3	0	0	3.26	Нет	0.01 М хлорид кобальта 0.1 М ацетат натрия pH 4.6 1.0 М 1,6-гександиол
2	CS1 10	15.5	9.3	0	1.37	Нет	0.2 М хлорид магния 0.1 М HEPES натриевая соль pH 7.5 30% (v/v) изопропанол
3	CS1 11	15.0	5.4	0	1.25	Нет	0.2 М ацетат аммония 0.1 М Трис-HCl pH 8.5 30% (v/v) изопропанол
4	CS1 14	14.3	0	0	6.97	Нет	25% (v/v) этиленгликоль
5	CS1 15	14.3	0	0	2.24	Нет	0.02 М хлорид кальция 0.1 М ацетат натрия pH 4.6 30% (v/v) MPD (2-метил-2,4-пентандиол)
6	CS1 16	14.5	1.7	0	1.18	Нет	0.2 М хлорид натрия 0.1 М ацетат натрия pH 4.6 30% (v/v) MPD
7	CS1 17	16.3	18.4	0	1.2	Нет	0.2 М ацетат аммония 0.1 М тринатрий цитрат pH 5.6 30% (v/v) MPD
8	CS1 2	16.3	18.4	0	1.69	Нет	0.1 М тринатрий цитрат pH 5.6 2.5 М 1,6-гександиол
9	CS1 21	15.6	10.9	0	1.43	Нет	0.2 М фосфат аммония 0.1 М Трис pH 8.5 50% (v/v) MPD
10	CS1 23	14.3	0	0	2.17	Нет	0.1 М Трис pH 8.5 25% (v/v) Трет-бутанол
11	CS1 25	16	14.9	0	1.71	Нет	0.4 М фосфат аммония
12	CS1 3	14.3	0	0	1.08	Нет	0.2 М хлорид магния 0.1 М Трис pH 8.5 3.4 М 1,6-гександиол
13	CS1 51	14.3	0	0	7.41	Нет	35% (v/v) диоксан
14	CS1 61	14.5	1.2	0	1.15	Нет	0.2 М формиат магния
15	CS1 18	14.3	0	0	1.17	Нет	0.2 М ацетат магния 0.1 М какодилат натрия pH 6.5 30% (v/v) MPD
16	CS1 20	17.1	25.9	0.1	1.73	Нет	0.5 М сульфат аммония 0.1 М HEPES pH 7.5 30% (v/v) MPD
17	CS1 24	17.6	33.5	0.1	3.06	Нет	0.1 М тринатрий цитрат pH 5.6 35% (v/v) Трет-бутанол
18	CS1 9	18	39.3	0.1	3.76	Нет	0.2 М тринатрий цитрат 0.1 М какодилат натрия pH 6.5 30% (v/v) изопропанол
19	CS2 13	14.3	0	0.1	1.35	Нет	0.3 М формиат магния 0.1 М Bis-Трис pH 5.5
20	CS1 56	17.5	20.8	0.6	1.14	Нет	0.1 М HEPES pH 7.5 20% (v/v) Джеффамин М-600
21	CS1 35	17.1	14.2	0.6	1.18	Нет	1.0 М имидазол pH 7
22	CS1 6	16	3.9	0.6	1.08	Нет	0.2 М хлорид кальция 0.1 М ацетат натрия pH 4.6 20% (v/v) изопропанол
23	CS1 8	18.1	29.6	0.7	1.76	Нет	0.2 М тринатрий цитрат 0.1 М HEPES натриевая соль pH 7.5 20% (v/v) изопропанол

Примечание. Образцы расположены в порядке увеличения объемной доли октамеров (от 0 до 0.7%).

Таблица 3. Результаты изучения олигомерного состава кристаллизационных растворов лизоцима с осадителями из наборов для кристаллизации CS1 и CS2, полученные методом МУРР

№	Осадитель	$R_g, \text{ \AA}$	Димер, %	Октамер, %	$\chi^2$	Результат кристаллизации	Состав раствора осадителя
24	CS1 39	17.4	14.8	0.9	1.32	Кристалл	0.05 М сульфат кадмия 0.1 М HEPES pH 7.5 1.0 М ацетат натрия
25	CS2 17	18.5	28.9	1	1.08	Агрегация	1.26 М фосфат натрия 0.14 М фосфат калия
26	CS1 62	18.3	25.1	1	1.25	Кристалл	0.1 М MES pH 6.5 1.6 М сульфат магния
27	CS1 46	18.3	24.5	1.1	1.17	Кристалл	0.1 М HEPES натриевая соль pH 7.5 0.8 М фосфат натрия 0.8 М фосфат калия
28	CS1 50	18.3	20.5	1.2	1.28	Агрегация	1.6 М сульфат аммония 0.1 М MES pH 6.5 10% (v/v) диоксан
29	CS1 27	19.2	29.1	1.6	1.26	Кристалл	0.1 М Трис-HCl pH 8.5 2.0 М фосфат аммония
30	CS1 37	19.1	24.5	1.7	1.28	Кристалл	0.1 М HEPES натриевая соль pH 7.5 0.8 М К/Na тартрат
31	CS1 58	19.5	28	1.9	1.28	Нет	0.01 М хлорид никеля 0.1 М Трис pH 8.5 1.0 М сульфат лития
32	CS1 28	19.2	19.2	2	1.2	Кристалл	0.1 М HEPES pH 7.5 2.0 М формиат аммония
33	CS1 59	19.6	27.7	2.1	1.34	Агрегация	0.1 М HEPES натриевая соль pH 7.5 1.5 М сульфат лития
34	CS1 32	19.7	23.6	2.3	1.25	Агрегация	0.1 М хлорид натрия 0.1 М HEPES pH 7.5 1.6 М сульфат аммония
35	CS1 22	21.1	66.8	2.5	12.72	Кристалл	0.1 М HEPES pH 7.5 70% (v/v) MPD
36	CS2 22	19.9	22.8	2.5	1.18	Кристалл	0.8 М янтарная кислота pH 7.0
37	CS1 33	20.1	23.9	2.7	1.26	Агрегация	0.01 М хлорид кобальта 0.1 М MES pH 6.5 1.8 М сульфат аммония
38	CS2 18	20.5	32.6	2.9	1.14	Агрегация	0.49 М фосфат натрия 0.91 М фосфат калия
39	CS1 4	20.7	25.1	3.3	1.22	Агрегация	2.0 М сульфат аммония 5% (v/v) изопропанол
40	CS1 57	20.8	27.6	3.4	1.27	Агрегация	0.5 М сульфат аммония 0.1 М цитрат натрия pH 5.6 1.0 М сульфат лития
41	CS1 30	21.1	24.6	3.8	1.23	Агрегация	0.1 М Трис-HCl pH 8.5 2.0 М сульфат аммония
42	CS2 19	21.4	29.8	4	1.06	Агрегация	0.056 М фосфат натрия 0.91 М фосфат калия
43	CS1 29	21.3	23.7	4	1.09	Агрегация	0.1 М ацетат натрия pH 4.6 2.0 М сульфат аммония
44	CS1 60	21.4	23	4.2	1.18	Нет	0.1 М BICINE pH 9.0 2.0 М хлорид магния
45	CS1 31	21.5	24.6	4.3	1.2	Агрегация	2.0 М сульфат аммония
46	CS1 47	21.6	22.4	4.4	1.13	Кристалл	0.1 М ацетат натрия pH 4.6 2.0 М формиат натрия

Примечание. Образцы расположены в порядке увеличения объемной доли октамеров (от 0.9 до 4.4%).



Таблица 4. Результаты изучения олигомерного состава кристаллизационных растворов лизоцима с осадителями из наборов для кристаллизации CS1 и CS2, полученные методом МУРР

№	Осадитель	$R_g, \text{ \AA}$	Димер, %	Октамер, %	$\chi^2$	Результат кристаллизации	Состав раствора осадителя
47	CS1 43	18	0	4.9	23.69	Денатурация	0.1 М HEPES pH 7.5 4.3 М хлорид натрия
48	CS2 21	22.3	35.9	5.1	1.27	Денатурация	1.8 М цитрат аммония pH 7.0
49	CS1 42	22.2	24.4	5.2	1.15	Агрегация	0.1 М фосфат натрия 0.1 М фосфат калия 0.1 М MES pH 6.5 2.0 М хлорид натрия
50	CS1 41	22.8	21.3	6.2	1.12	Агрегация	0.1 М ацетат натрия pH 4.62 М хлорид натрия
51	CS2 24	23.4	23.9	7.1	1.13	Денатурация	2.8 М ацетат натрия pH 7.0
52	CS1 34	23.5	25.1	7.4	1.17	Денатурация	0.2 М K/Na тартрат 0.1 М тринатрий цитрат pH 5.6
53	CS1 44	26.2	15.1	13.5	1.17	Денатурация	0.1 М HEPES натриевая соль pH 7.5 1.4 М тринатрий цитрат
54	CS1 45	26.8	20.5	16	1.42	Денатурация	1.6 М тринатрий цитрат pH 6.5
55	CS1 48	28.2	0	21.1	18.85	Денатурация	4.0 М формиат натрия

Примечание. Образцы расположены в порядке увеличения объемной доли октамеров (от 4.9 до 21.1%).

большинстве случаев кристалл зафиксирован через очень длительный промежуток времени (по истечении 28–56 дней) либо был зафиксирован всего лишь в одной капле из трех.

Крайне важно отметить, что во всех случаях, когда в растворе отсутствовали октамеры (присутствовали только мономеры и димеры), кристаллы не были обнаружены; также не зафиксированы ни агрегация, ни денатурация (все три капли оставались визуально чистыми в течение всего времени съемки). Наряду с ранее проведенными исследованиями методом малоуглового рассеяния нейтронов [13] и найденной высотой ступеней роста грани (110) кристаллов сингонии тетрагональной сингонии – 6 нм [28, 29], можно утверждать, что именно **образование октамеров является ключевым этапом в процессе кристаллизации лизоцима** [10], а димеры не могут быть ключевым элементом белкового кристалла.

В целом суммарно мы можем выделить три случая, отражающих различный олигомерный состав кристаллизационного раствора и соответствующих разным участкам фазовой диаграммы:

- 1) в растворе присутствуют только мономеры (нижняя точка ненасыщенной области);
- 2) в растворе присутствуют мономеры и димеры (ненасыщенная область – приближение к насыщению);

3) в растворе присутствуют мономеры, димеры и октамеры, причем концентрация октамеров изменяется приблизительно следующим образом в зависимости от степени пересыщения (всего четыре интервала):

1. от 0 до 1% – в растворе отсутствуют кристаллы и другие твердые образования;
2. от 1 до 5% – наблюдается рост монокристаллов и агрегация;
3. от 5 до 7% – наблюдается агрегация или денатурация (аморфное образование);
4. более 7% – наблюдается только денатурация.

На рис. 2 показаны пять экспериментальных кривых МУРР для раствора лизоцима с осадителями CS1 18 (№ 15 в табл. 2), CS1 17 (№ 7 в табл. 2), CS1 28 (№ 32 в табл. 3), CS1 31 (№ 45 в табл. 3) и CS1 45 (№ 54 в табл. 4). Эти кривые представляют разные случаи олигомерного состава раствора лизоцима и результат кристаллизации. В случае CS1 18, где в растворе наблюдались только мономеры, были пустые капли (не образуются кристаллы или другая твердая фаза). В случае CS1 17 (присутствуют мономеры и димеры, тогда как октамеры в растворе не обнаружены) также была пустая капля (результат «нет»). В случае CS1 28 (мономеры, димеры и октамеры обнаружены в растворе), при кристаллизации рос кристалл (результат «кристалл»). В CS1 31 и CS1 45, в кристаллизационных раство-

рах которых наблюдались мономеры, димеры и октамеры, произошли агрегация и денатурация (CS1 31 и CS1 45 соответственно).

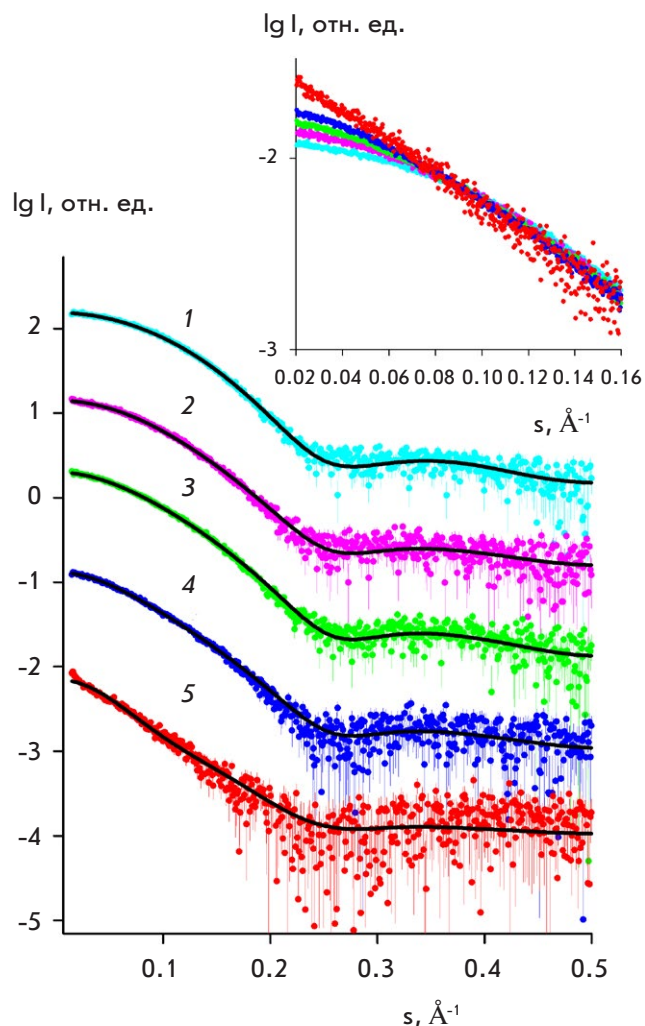
**Зависимость вероятности роста кристаллов от концентрации кластеров-прекурсоров в кристаллизационном растворе**

После приготовления кристаллизационного раствора белка существует несколько путей «эволюции» состояния этого раствора в зависимости от степени пересыщения:

- 1) в белковом растворе после добавления осадителя не образуются кластеры – прекурсоры, т.е. не происходит формирования промежуточной фазы и, следовательно, формирования какой-либо твердой фазы, в том числе и монокристаллов (наряду с мономерами в растворе могут присутствовать димеры (ненасыщенная область – приближение к насыщению));
- 2) в растворе образуются кластеры-прекурсоры, формируется промежуточная фаза, которая затем переходит в рост кристалла;
- 3) степень пересыщения раствора становится настолько высокой и концентрация кластеров-прекурсоров настолько повышается, что в растворе происходит агрегация (состояние, которое может перейти и в кристалл);
- 4) степень пересыщения превышает предельное значение, и белок в растворе переходит в аморфное состояние, в котором может происходить даже частичная денатурация.

Сравнение результатов измерения концентрации октамеров и особенностей перехода лизоцима из раствора в твердую фазу показывает их взаимосвязь. При отсутствии в растворе октамеров (когда в растворе зафиксированы только мономеры и димеры) и при концентрации октамеров ниже 1% не наблюдалось образование ни монокристаллов лизоцима, ни какой-либо другой твердой или аморфной фазы. В интервале концентраций октамеров 1–5% наблюдается кристаллизация и агрегация, причем образование монокристаллов происходит преимущественно в диапазоне концентрации октамеров от 2 до 3%. При концентрации октамеров от 5 до 7% наблюдается агрегация или денатурация (аморфное образование), выше 7% – только денатурация белка (образование аморфных осадков).

Поэтому преобразуем данные к другому виду. Рассмотрим вероятность успешного роста кристаллов при различных долях октамеров в растворе, округлив доли октамеров до целого числа (с помощью стандартной встроенной функции Excel). Рассмотрим следующие случаи, для которых будем рассчитывать вероятность: первый случай – рост



**Рис. 2.** Экспериментальные кривые МУРП (цветные линии) для кристаллизационных растворов лизоцима и (черные линии) теоретические приближения смесью олигомеров, рассчитанные с использованием программы OLIGOMER для следующих растворов: 1 – лизоцим с осадителем CS1 18 (только мономеры, нет кристалла), 2 – лизоцим с осадителем CS1 17 (димеры и мономеры, без кристалла), 3 – лизоцим с осадителем CS1 28 (мономеры, димеры и октамеры, кристалл), 4 – лизоцим с осадителем CS1 31 (мономеры, димеры и октамеры, агрегация), 5 – лизоцим с осадителем CS1 45 (мономеры, димеры и октамеры, денатурация). Кривые смещены по вертикальной оси для лучшей визуализации

кристалла при 20 мг/мл, второй – появление видимой агрегации (массовая кристаллизация) и третий – выпадение аморфного осадка (денатурация). Тогда вероятность будет рассчитываться как отношение числа успехов (когда в капле наблюдался какой-то из трех случаев, перечисленных выше) к числу всех случаев с данной долей октамеров (табл. 5).

Таблица 5. Вероятности, рассчитанные для роста кристалла при 20 мг/мл, появления видимой агрегации (массовая кристаллизация) и денатурации

Доля октамеров (округленная до целого числа), %	Всего случаев	Кристалл		Агрегация		Денатурация	
		Успех	Вероятность	Успех	Вероятность	Успех	Вероятность
0	24	0	0	0	0	0	0
1	12	3	0.25	2	0.16667	0	0
2	7	3	0.42857	2	0.28571	0	0
3	8	2	0.25	4	0.5	0	0
4	6	1	0.16667	4	0.66667	0	0
5	3	0	0	1	0.33333	2	0.66667
6	2	0	0	1	0.5	0	0
7	2	0	0	0	0	2	1
14	1	0	0	0	0	1	1
16	1	0	0	0	0	1	1
21	1	0	0	0	0	1	1

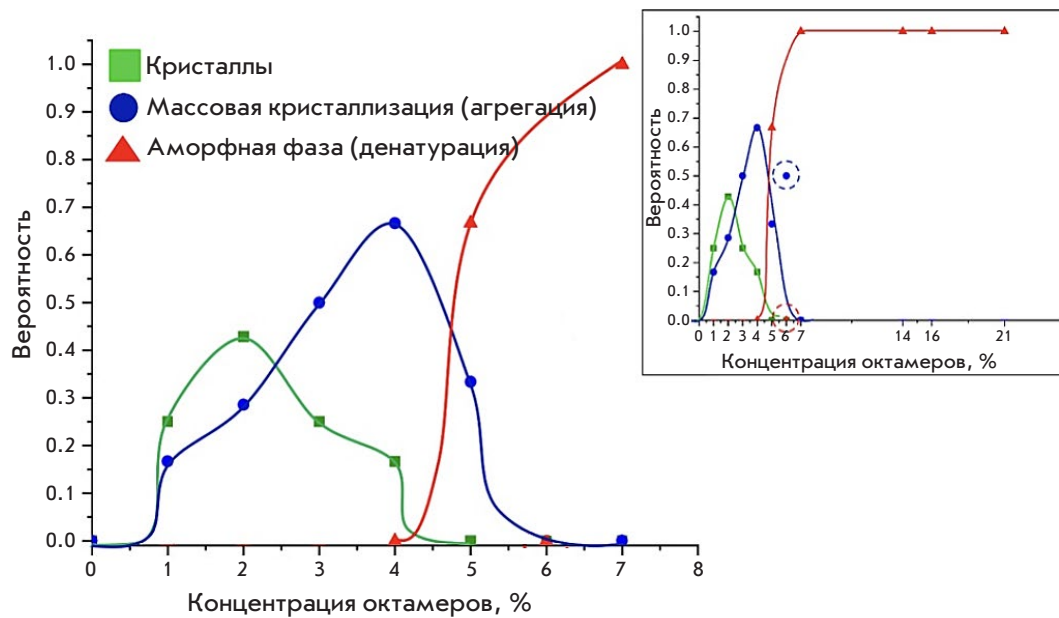


Рис. 3. Общие закономерности, отражающие поведение изменений вероятности роста кристалла, агрегации и денатурации лизоцима, в зависимости от целочисленной доли октамеров (на вставке интервал доли октамеров увеличен до 21%), в разных случаях образования конденсированной фазы: кристаллы (зеленая линия), массовая кристаллизация (синяя линия) и аморфный осадок/денатурация (красная линия)

Максимальная вероятность появления кристалла лизоцима приходится на интервал концентраций октамеров 2–3% (рис. 3). После 7% не наблюдается ни образования кристаллов, ни агрегации, вероятность денатурации в этих случаях равна 1. В целом, общая закономерность между образованием определенной конденсированной фазы в результате кристаллизации и концентрацией октамеров в растворе выглядит следующим образом: при объемной доле октамеров в растворе от 0 до 1% вероятность образования какой-либо твердой фазы равняется 0. При повышении объемной доли октамеров увеличивается вероятность образования кристаллов и агрегации, причем максимальная вероятность появления

кристалла наблюдается при концентрации октамеров 2%, а максимальная вероятность агрегации сдвигается в сторону больших концентраций октамеров и соответствует 4%. Вероятность появления аморфного состояния достигает своего максимума при концентрации октамеров больше 7%.

Отметим, что на данных, представленных на рис. 3, две точки, соответствующие округленной доле октамеров 6%, мы не включили в общие кривые вероятности для агрегации и денатурации. Причина, почему эти точки не вписались в кривые, может быть в маленькой статистике (всего два случая).

В разделе «Влияние концентрации осадителя на степень пересыщения и его связь с концентра-

цией октамеров», где проведено сравнение концентрации октамеров в зависимости от концентрации NaCl со степенью пересыщения и растворимостью, говорилось, что с увеличением концентрации NaCl (от 15 до 30 мг/мл) доля октамеров в растворе увеличивается от 2.9 до 4.1%. Исходя из изменения степени пересыщения с увеличением концентрации NaCl, было показано, что в области, где концентрация октамеров превышает 4%, вероятность появления монокристаллов должна снизиться, а вероятность агрегации или появления аморфного осадка, наоборот, увеличиться. Именно такое поведение вероятности мы и наблюдаем на рис. 3, где при концентрации октамеров больше 4% вероятность роста кристаллов снизилось до 0, а вероятности агрегации и денатурации начали увеличиваться.

Исходя из сопоставления полученных графиков с областями на фазовой диаграмме мы можем сказать, что концентрация октамеров 0% (в растворе присутствуют только мономеры или димеры и мономеры) соответствует ненасыщенной области на фазовой диаграмме. С увеличением объемной доли октамеров увеличивается степень пересыщения, и область концентрации октамеров 1–5% приходится на зону нуклеации. Концентрация октамеров более 5% приходится на зону осаждения.

### ВЫВОДЫ

Параллельное измерение концентрации олигомеров и образования твердой фазы в 67 растворах белка лизоцима показывает:

- при малых концентрациях октамеров (меньше 0.8%) кристаллы не образуются;
- при концентрации октамеров в диапазоне от 0.7 до 4% образуются или отдельные кристаллы или происходит массовая кристаллизация (агрегация), причем вероятность агрегации растет с ростом концентрации кластеров-прекурсоров (степени пересыщения раствора);
- начиная с 6% октамеров, резко возрастает вероятность получения аморфной (денатурированной) фазы.

На основании предыдущих результатов о взаимосвязи концентрации октамеров в растворе лизоцима на начальной стадии кристаллизации и результатов кристаллизации, которые могли быть монокристаллами, агрегатами или аморфными образованиями, можно сказать, что концентрация наноразмерных кластеров-прекурсоров (в данном случае октамеров лизоцима) в растворе на начальной стадии кристаллизации связана с тем, в какую форму твердой фазы белковый раствор трансформируется окончательно (рис. 4). Полученные данные позволяют сопоставить процессы, происходящие

в области 3–20 нм, когда образуется промежуточная фаза кластеров-прекурсоров из 3D-кластеров с результатами перехода к твердой фазе (для размеров 1–10 мкм).

Как отмечено выше, концентрация кластеров-прекурсоров определяет вид твердой фазы. За рамками настоящей работы остался собственно переход от кластеров к кристаллам или к аморфной фазе. К настоящему времени это наименее исследованная область. Со времен Фарадея известно, что переохлажденная жидкость может существовать неопределенное время, не переходя в твердое состояние. Обычно этот переход инициируется градиентами температур и концентраций, внесением посторонних объектов, способных играть роль затравки и т.п. В настоящей работе кристаллизация проводилась в условиях градиента концентраций, но при этом образование твердой фазы происходило спустя почти 3 месяца после приготовления раствора.

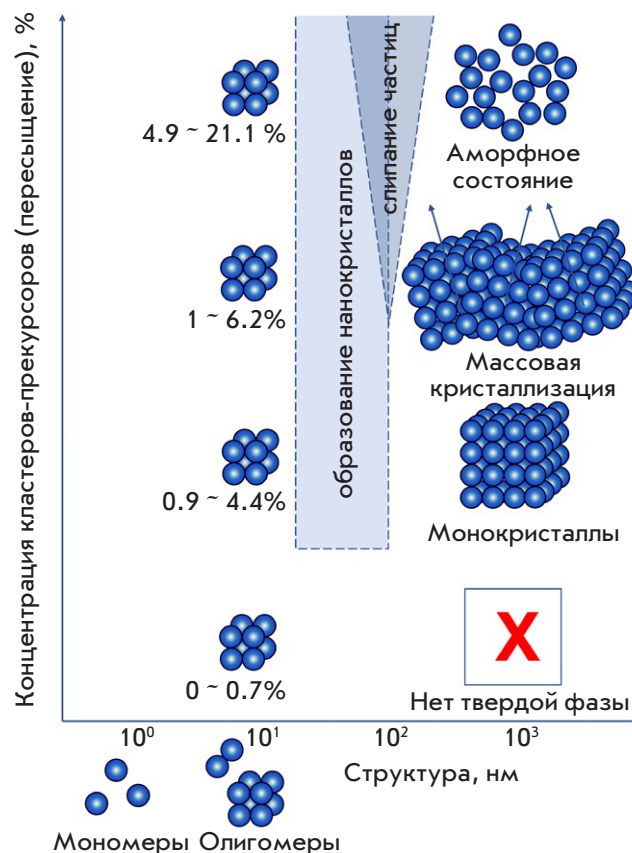


Рис. 4. Полиморфизм структур, формирующихся в процессе кристаллизации, в зависимости от концентрации кластеров-прекурсоров на примере белка лизоцима в условиях кристаллизации тетрагональной сингонии

Тем не менее результат настоящей работы позволяет предсказывать вид твердой фазы на ранней стадии приготовления раствора (расплава) по изменению (или вычислению) концентрации кластеров-прекурсоров.

Также за рамками работы остается процесс зародышеобразования [30], однако полученные результаты могут быть полезными и в понимании этого процесса. ●

*Работа выполнена при поддержке Министерства науки и высшего образования в рамках выполнения работ по Государственному заданию ФНИЦ «Кристаллография и фотоника»*

*РАН в части исследования начальной стадии кристаллизации лизоцима во внешних условиях (различные условия по составу и концентрации осадителей) на линии ВМ29 в Европейском центре синхротронного излучения и обработки экспериментальных данных МУРР, в рамках выполнения работ по гранту № 075-15-2021-1362 в части обработки экспериментальных данных МУРР и анализа результатов кристаллизации и Консорциума iNEXT [6938] в части «обеспечения финансовой поддержки сбора данных МУРР на линии Р12, управляемой EMBL Hamburg на кольце PETRA III».*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Gebauer D., Kellermeier M., Gale J.D., Bergström L., Cölfen H. // *Chem. Soc. Rev.* 2014. V. 43. P. 2348–2371.
- Асхабов А.М. // *Записки российского минералогического общества.* 2019. Т. 148. № 6. С. 1–13.
- Karthika S., Redhakrishnan T.K., Kalaichelvi P. // *Cryst. Growth Des.* 2016. V. 16. № 11. P. 6663–6681.
- Ivanov V.K., Fedorov P.P., Baranchikov A.Ye., Osiko V.V. // *Rus. Chem. Rev.* 2014. V. 83. № 12. P. 1204–1222.
- De Yoreo J.J., Gilbert P.U.P.A., Sommerdijk N.A.J.M., Penn R.L., Whitelam S., Joester D., Zhang H., Rimer J.D., Navrotsky A., Banfield J.F., et al. // *Science.* 2015. V. 349. № 6247. P. aaa6760-1-aaa6760-9.
- Berman H.M., Westbrook J., Feng Z., Gilliland G., Bhat T.N., Weissig H., Shindyalov I.N., Bourne P.E. // *Nucl. Acids Res.* 2000. V. 28. № 1. P. 235–242.
- Krauss I.R., Merlino A., Vergara A., Sica F. // *Int. J. Mol. Sci.* 2013. V. 14. № 6. P. 11643–11691.
- McPherson A. // *Methods.* 2004. V. 34. № 3. P. 254–265.
- Vekilov P.G., Vorontsova M.A. // *Acta Cryst. F.* 2014. V. F270. P. 271–282.
- Kovalchuk M.V., Blagov A.E., Dyakova Yu.A., Gruzinov A.Yu., Marchenkova M.A., Peters G.S., Pisarevsky Yu.V., Timofeev V.I., Volkov V.V. // *Cryst. Growth Des.* 2016. V. 16. № 4. P. 1792–1797.
- Marchenkova M.A., Volkov V.V., Blagov A.E., Dyakova Yu.A., Ilina K.B., Tereschenko E.Yu., Timofeev V.I., Pisarevsky Yu.V., Kovalchuk M.V. // *Cryst. Rep.* 2016. V. 61. № 1. P. 5–10.
- Boikova A.S., D'yakova Yu.A., Il'ina K.B., Konarev P.V., Kryukova A.E., Marchenkova M.A., Blagov A.E., Pisarevskii Yu.V., Koval'chuk M.V. // *Cryst. Rep.* 2017. V. 62. № 6. P. 837–842.
- Boikova A.S., Dyakova Yu.A., Ilina K.B., Konarev P.V., Kryukova A.E., Kuklin A.I., Marchenkova M.A., Nabatov B.V., Blagov A.E., Pisarevsky Yu.V., et al. // *Acta Cryst. D.* 2017. V. 73. № 7. P. 591–599.
- Dyakova Yu.A., Boikova A.S., Ilina K.B., Konarev P.V., Marchenkova M.A., Pisarevsky Yu.V., Timofeev V.I., Kovalchuk M.V. // *Cryst. Rep.* 2019. V. 64. № 1. P. 11–15.
- Marchenkova M.A., Konarev P.V., Boikova A.S., Ilina K.B., Pisarevsky Yu.V., Kovalchuk M.V. // *Cryst. Rep.* 2021. V. 66. № 5. P. 751–757.
- Kovalchuk M.V., Boikova A.S., Dyakova Yu.A., Ilina K.B., Konarev P.V., Kryukova A.E., Marchenkova M.A., Pisarevsky Yu.V., Timofeev V.I. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2019. V. 37. № 12. P. 3058–3064.
- Boikova A.S., D'yakova Yu.A., Il'ina K.B., Konarev P.V., Kryukova A.E., Marchenkova M.A., Pisarevskii Yu.V., Koval'chuk M.V. // *Cryst. Rep.* 2018. V. 63. № 6. P. 865–870.
- Marchenkova M.A., Konarev P.V., Rakitina T.V., Timofeev V.I., Boikova A.S., Dyakova Yu.A., Ilina K.B., Korzhenevskiy D.A., Nikolaeva A.Yu., Pisarevsky Yu.V., et al. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2020. V. 38. № 10. P. 2939–2944.
- Kovalchuk M.V., Alekseeva O.A., Blagov A.E., Ilyushin G.D., Il'ina K.B., Konarev P.V., Lomonov V.A., Pisarevsky Y.V., Peters G.S. // *Cryst. Rep.* 2019. V. 64. № 1. P. 6–10.
- Kordonskaya Yu.V., Timofeev V.I., Dyakova Yu.A., Marchenkova M.A., Pisarevsky Yu.V., Podshivalov D.D., Kovalchuk M.V. // *Cryst. Rep.* 2018. V. 63. № 6. P. 947–950.
- Kordonskaya Yu.V., Marchenkova M.A., Timofeev V.I., Dyakova Yu.A., Pisarevsky Y.V., Kovalchuk M.V. // *J. Biomol. Struct. Dyn.* 2021. V. 39. № 18. P. 7223–7230.
- Blanchet C.E., Spilotros A., Schwemmer F., Graewert M.A., Kikhney A., Jeffries C.M., Franke D., Mark D., Zengerle R., Cipriani F. // *J. Appl. Crystallogr.* 2015. V. 48. P. 431–443.
- Round A., Felisaz F., Fodinger L., Gobbo A., Huet J., Villard C., Blanchet C.E., Pernot P., McSweeney S., Roessle M., et al. // *Acta Cryst. D.* 2015. V. D71. P. 67–75.
- Franke D., Petoukhov M.V., Konarev P.V., Panjkovich A., Tuukkanen A., Mertens H.D.T., Kikhney A.G., Hajizadeh N.R., Franklin J.M., Jeffries C.M. // *J. Appl. Crystallogr.* 2017. V. 50. P. 1212–1225.
- Konarev P.V., Volkov V.V., Sokolova A.V., Koch M.H.J., Svergun D.I. // *J. Appl. Crystallogr.* 2003. V. 36. P. 1277–1282.
- Svergun D., Barberato C., Koch M.H.J. // *J. Appl. Crystallogr.* 1995. V. 28. P. 768–773.
- Chen R.-Q., Lu Q.-Q., Cheng Q.-D., Ao L.-B., Zhang C.-Y., Hou H., Liu Y.-M., Li D.-W., Yin D.-C. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. № 1. P. 1–6.
- Wiechmann M., Enders O., Zeilinger C., Kolb H.-A. // *Ultramicroscopy.* 2001. V. 86. № 1–2. P. 159–166.
- Yaminsky I.V., Gvozdev N.V., Sil'nikova M.I., Rashkovich L.N. // *Cryst. Rep.* 2002. V. 47. № S1. P. S149–158.
- Zhou R., Cao H., Zhang C., Yin D. // *CrystEngComm.* 2017. V. 19. P. 1143–1155.

УДК 577.151.35: 577.151.45

# Специфичность пенициллинацилаз в реакции снятия защитной группы в N-бензилоксикарбонильных производных аминокислот

И. А. Морозова<sup>1</sup>, Д. Ф. Гуранда<sup>1</sup>, Н. В. Панин<sup>1,2</sup>, В. К. Швядас<sup>1,2,3\*</sup><sup>1</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии им. А.Н. Белозерского, Москва, 119991 Россия<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Научно-исследовательский вычислительный центр, Москва, 119991 Россия<sup>3</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, 119991 Россия

\*E-mail: vyfas@belozersky.msu.ru

Поступила в редакцию 02.02.2023

Принята в печать 20.02.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.13703

**РЕФЕРАТ** Изменение структуры N-ацильной группы в производных аминокислот существенным образом влияет как на узнавание, так и на активность пенициллинацилаз в этом ряду субстратов. Тем не менее, как пенициллинацилаза из *Alcaligenes faecalis*, так и пенициллинацилаза из *Escherichia coli* способны снимать N-бензилоксикарбонильную защитную группу с производных аминокислот в мягких условиях без использования токсичных реагентов и могут быть использованы в органическом синтезе.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** специфичность пенициллинацилаз, ферментативное снятие защитных групп, N-бензилоксикарбонильные производные аминокислот.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** ПА – пенициллинацилаза; ВЭЖХ – высокоэффективная жидкостная хроматография; PMSF – фенилметилсульфонилфторид; NIPAB – 6-нитро-3-фенилацетамидобензойная кислота; о-ФА – о-фталевый альдегид; НАС – N-ацетил-L-цистеин; Z – N-бензилоксикарбонильная группа.

## ВВЕДЕНИЕ

Маскировка функциональных групп является важной частью органического синтеза [1, 2]. Использование ферментов для введения и снятия защитных групп существенно расширяет возможности в этой области, вплоть до применения новых реагентов и изменения условий проведения этих стадий. Так, в химическом пептидном синтезе, проводимом преимущественно в органических растворителях, используется один набор реагентов, а при использовании ферментов, например, для маскировки аминогрупп, возможно применение фенилацетильных [3], фталильных [4], ацетильных [5] защитных групп. Использование биокатализа в органическом синтезе, особенно при получении лекарственных препаратов, направлено также на поиск ферментов, способных катализировать традиционные химические реакции и сделать их более привлекательными с экологической и экономической точки зрения. В качестве примера можно привести отщепление бензилоксикарбонильной за-

щитной группы в аминокислотах, традиционно проводимое каталитическим гидрированием, восстановлением натрием в жидком аммиаке, а также ацидолизом с помощью бромоводорода в уксусной кислоте [1, 2]. Среди ограничений и недостатков этих методов можно выделить следующие: активно используемый метод гидрирования на палладиевом катализаторе нельзя применить, если в структуре соединения есть органические сульфиды, в том числе остатки цистеина или метионина [6]. Можно проводить деблокирование в присутствии циклогексилламина или эфира трехфтористого бора [7], однако метод не селективен при наличии восстанавливаемых функциональных групп, таких, как C=C, C=O, CN, NO<sub>2</sub>, формильной, карбамоильной и др. [8]. Следует также принимать во внимание токсичность палладия и отсутствие методов надежного удаления его следов из конечного продукта, что чрезвычайно важно при синтезе лекарственных препаратов [9]. При восстановительном расщеплении натрием в жидком аммиаке [10] одновременно с бензилок-

сикарбонильным остатком отщепляются другие защитные группы, сложные эфиры, хотя бы частично, превращаются в амиды, разрушаются остатки треонина, частично деметилируются остатки метионина, происходит расщепление некоторых пептидных связей. При ацидолитическом расщеплении идут побочные реакции переэтерификации, ацетилирования остатков треонина и серина, разрушаются остатки триптофана, нитроаргинина, бензиловые эфиры и амидные группы [11]. Наряду с оптимизацией условий проведения этих реакций с целью снижения вклада побочных процессов интерес представляет разработка биокаталитических методов снятия N-бензилоксикарбонильной защиты аминокислот. При развитии этого направления были обнаружены новые ферменты: уретангидролазы [12, 13], снимающие бензилоксикарбонильную защиту ферменты в *Sphingomonas paucimobilis*, *Burkholderia phenazinium* и *Arthrobacter sp.* [14–16], показана способность пенициллинацилазы из *Escherichia coli* расщеплять N-бензилоксикарбонильные производные аминокислот [17]. Целью данной работы было изучить как меняется специфичность пенициллинацилаз из *Alcaligenes faecalis* и *E. coli* при изменении структуры N-ацильной группы (замене фенолацетильного остатка на бензилоксикарбонильный) в структуре субстрата и сравнить способности двух ферментов снимать защитную группу.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Реагенты

В работе использовали фенолацетилхлорид (Sigma, США); фенолметилсульфонилфторид (Merck, ФРГ); ацетонитрил («Криохром», Россия); N-фенолацетильные производные  $\alpha$ -аминокислот синтезировали как описано ранее [18]. Препарат пенициллинацилазы из *E. coli* выделяли как описано ранее [19], препарат пенициллинацилазы из *A. faecalis* предоставлен компанией ООО «Инновации и высокие технологии МГУ», концентрацию активных центров пенициллинацилаз определяли титрованием фенолметилсульфонилфторидом (PMSF) как описано ранее [20, 21].

### Определение $k_{\text{кат}}$ и $K_M$ гидролиза N-ацильных производных аминокислот под действием пенициллинацилаз

Кинетические эксперименты проводили в термостатируемой ячейке спектрофотометра Shimadzu UV-1601 при 400 нм и 25°C в 0.01 М фосфатном буфере pH 7.5 в присутствии 0.1 М KCl. Значения константы Михаэлиса ( $K_M$ ) для гидролиза N-фенолацетильных и N-бензил-

оксикарбонильных производных аминокислот определяли как константы конкурентного ингибирования гидролиза цветного субстрата NIPAB этими соединениями при анализе зависимости наблюдаемой константы Михаэлиса гидролиза NIPAB от концентрации N-фенолацетильного или N-бензилоксикарбонильного производного аминокислоты. Определение каталитических констант ферментативного гидролиза N-фенолацетильных и N-бензилоксикарбонильных производных аминокислот проводили при насыщающей концентрации субстрата (численно равной 10 и 20  $K_M$ ) для определения максимальной скорости ферментативной реакции. За протеканием реакции следили при помощи отбора проб и спектрофотометрической регистрации образующихся аминокислот после модификации о-фталевым альдегидом. В типичном эксперименте раствор N-ацильного производного аминокислоты в 0.01 М фосфатном буфере pH 7.5, содержащем 0.1 М KCl, помещали в термостатируемую ячейку при 25°C и при перемешивании добавляли необходимое количество фермента. Через определенное время отбирали пробы (15–30 мкл) реакционной смеси, смешивали их с 50 мкл 10 мМ раствора PMSF в изопропанол для остановки реакции, разбавляли до нужной концентрации и анализировали при помощи ВЭЖХ. Для определения начальных скоростей ферментативного гидролиза обычно отбирали 8–10 проб, степень превращения субстрата при этом не превышала 10%.

### ВЭЖХ-анализ с предколоночной модификацией аминокислот о-фталевым альдегидом

Модификацию первичных аминокислот проводили следующим образом: к 900 мкл 0.5 мМ раствора аминокислоты в 0.4 М боратном буфере pH 9.6 при 25°C добавляли 50 мкл метанольного раствора, содержащего NAC (40 мМ) и о-ФА (20 мМ). Смесь перемешивали, через 15 мин разбавляли элюентом для хроматографии, центрифугировали в течение 3 мин при 12000 об/мин и анализировали. Хроматографическая система состояла из модуля подачи элюента Waters M6000, инжектора типа Reodyne 7 125 с петлей объемом 50 мкл, колонки для обращенно-фазовой хроматографии Nucleosil C1-8 Chrompack Varian (250×4 мм, 5 мкм) и детектора Waters M481 LC. Хроматограммы регистрировали на программно-аппаратном комплексе для сбора и обработки хроматографических данных Мультихром («Амперсенд», Россия). Скорость потока 1 мл/мин. Образующиеся изоиндолы анализировали при 340 нм с использованием в качестве подвижной фазы 6 мМ фосфатного буфера pH 6.8, содержащего ацетонитрил (10–40% по объему).

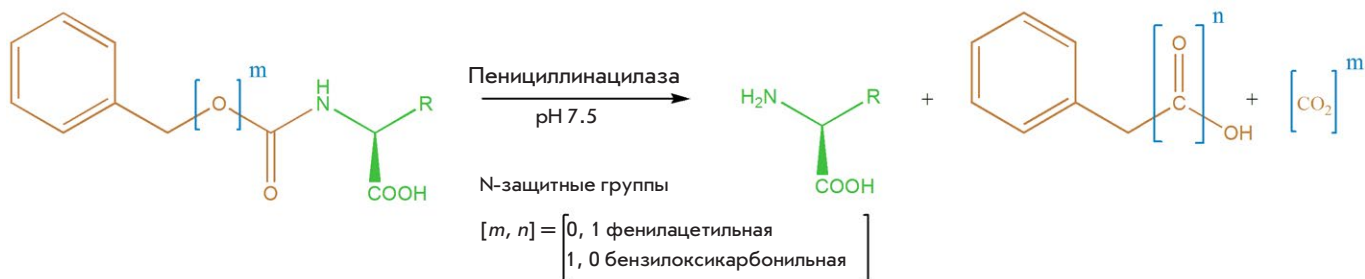


Рис. 1. Реакции снятия фенилацетильной и бензилоксикарбонильной защитных групп, катализируемые пенициллинацилазами

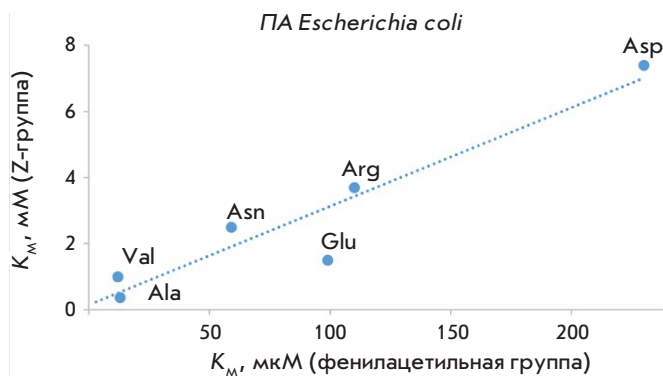


Рис. 2. Корреляция между значениями констант Михаэлиса ( $K_M$ ) в реакциях гидролиза N-фенилацетильных (ось абсцисс) и N-бензилоксикарбонильных (ось ординат) производных аминокислот, катализируемых пенициллинацилазой из *E. coli*

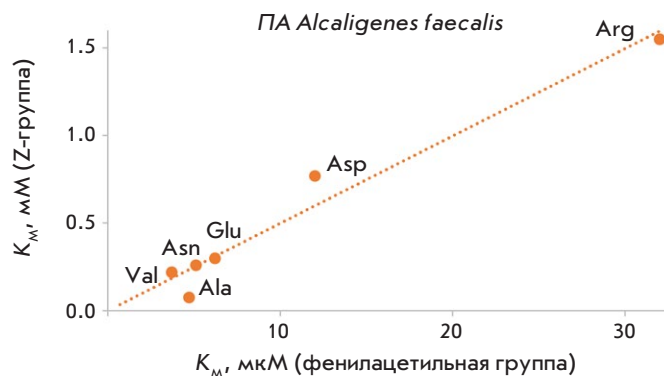


Рис. 3. Корреляция между значениями констант Михаэлиса ( $K_M$ ) в реакциях гидролиза N-фенилацетильных (ось абсцисс) и N-бензилоксикарбонильных (ось ординат) производных аминокислот, катализируемых пенициллинацилазой из *A. faecalis*

### Прямой ВЭЖХ-анализ компонентов реакционной смеси

ВЭЖХ-анализ компонентов реакционной смеси без предколоночной модификации образующихся аминогрупп проводили при помощи хроматографической системы Waters, колонки Kromasil Eternity-5-C18 column (Eka Chemicals, Швеция) с использованием 6 mM фосфатного буфера pH 3.0, содержащего ацетонитрил (30% по объему) и 0.1 г/л додецилсульфата натрия, при 210 нм и скорости потока 1 мл/мин.

### РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Схема ферментативного гидролиза N-фенилацетильных и N-бензилоксикарбонильных производных аминокислот представлена на рис. 1. Необходимо отметить отличие продуктов в этих двух реакциях: при снятии N-фенилацетильной защиты и выделении аминокислоты со свободной аминогруппой образуется фенилуксусная кислота, в то время как при снятии N-бензилоксикарбонильной защиты наряду с аминокислотой накапливается бензиловый спирт и выделяется  $\text{CO}_2$ .

Отличие ацильных групп на один атом кислорода приводит к существенному изменению в эффек-

тивности связывания субстратов в активном центре пенициллинацилаз, это характерно как для пенициллинацилазы из *A. faecalis*, так и для пенициллинацилазы из *E. coli*. Изменение в структуре N-ацильной группы не меняет специфичность ферментов к боковому радикалу аминокислоты, о чем свидетельствуют корреляции между значениями константы Михаэлиса в реакциях снятия N-фенилацетильной и N-бензилоксикарбонильной защиты, катализируемых обеими пенициллинацилазами. В то же время оба фермента отличаются по своей специфичности к этому структурному фрагменту: если наименее эффективно связывающимися субстратами пенициллинацилазы из *E. coli* являются производные аспарагиновой кислоты (рис. 2), то для пенициллинацилазы из *A. faecalis* это производные аргинина (рис. 3).

При замене фенилацетильного остатка на бензилоксикарбонильный сродство обоих ферментов к субстрату снижается более чем на порядок, при этом пенициллинацилаза из *A. faecalis* проявляет более высокое сродство к новым субстратам (значения  $K_M$  в интервале 0.08–1.6 mM).

В то время как сродство обоих ферментов к субстратам зависит от природы боковой цепи аминокис-



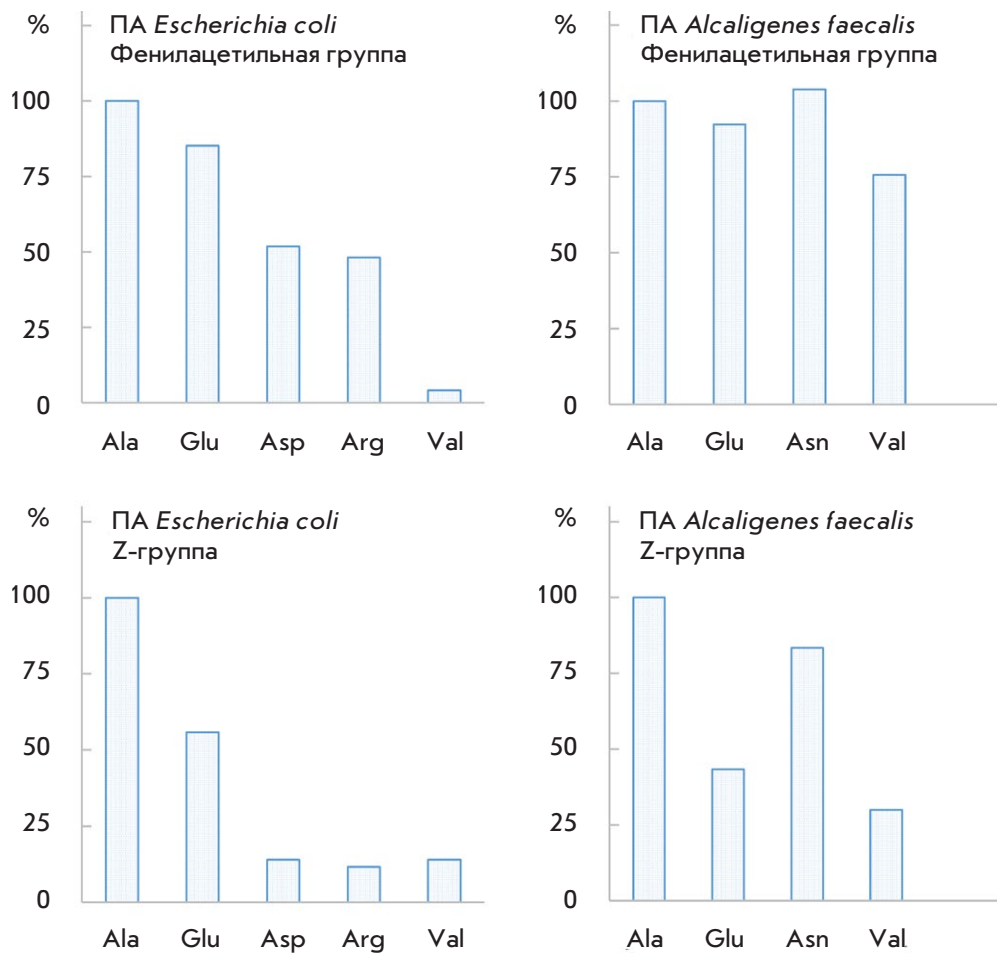


Рис. 4. Каталитическая активность пенициллинацилаз из *E. coli* (левые рисунки) и *A. faecalis* (правые рисунки) в реакциях гидролиза N-фенилацетильных и N-бензилоксикарбонильных производных аминокислот, выраженная как значение каталитических констант по отношению к производным аланина (в процентах): верхние рисунки показывают активность ферментов по отношению к N-фенилацетильным производным аминокислот, нижние – к N-бензилоксикарбонильным производным аминокислот

кислоты, этот структурный фрагмент по-разному влияет на реакцию способность пенициллинацилаз (рис. 4). Природа боковой цепи аминокислоты в ряду N-фенилацетильных производных аминокислот слабо влияет на каталитическую активность пенициллинацилазы из *A. faecalis* (верхний правый рисунок), в то время как реакция способность пенициллинацилазы из *E. coli* сильно зависит от этого структурного фрагмента и падает в ряду N-Phac-Ala, Glu, Asp, Arg, Val более чем в 20 раз (верхний левый рисунок). При замене фенилацетильного остатка на бензилоксикарбонильный снижается реакция способность ферментов. Так, активность пенициллинацилазы из *E. coli* падает в 10–49 раз в зависимости от структуры бокового радикала аминокислотного остатка, а пенициллинацилаза из *A. faecalis* еще более чувствительна к такому структурному изменению: активность фермента уменьшается на два порядка. Тем не менее, обе пенициллинацилазы способны снимать защитные N-бензилоксикарбонильные группы в производных аминокислот (рис. 5), а введением мутаций в структуру ферментов можно увеличить каталитическую

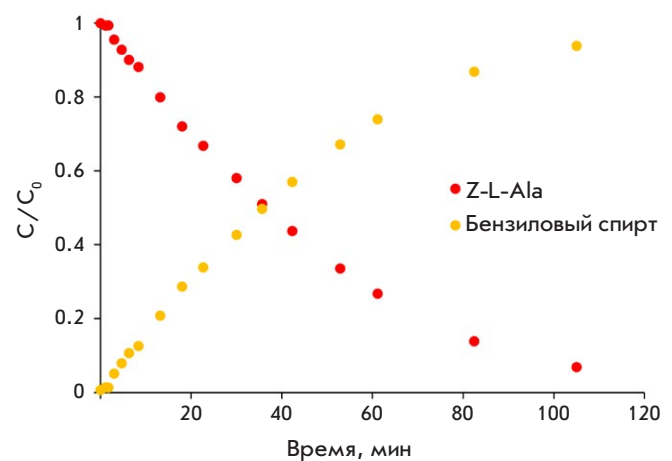


Рис. 5. Снятие N-бензилоксикарбонильной защитной группы, катализируемое пенициллинацилазой из *A. faecalis*. Красными точками представлено изменение концентрации субстрата (N-бензилоксикарбонил-L-Ala), желтыми – накопление продукта превращения (бензилового спирта). Условия реакции: pH 7.5, 25°C, концентрация субстрата 1 мМ, концентрация фермента 6 мкМ

активность к неспецифическим субстратам. Опыт изучения пенициллинацилазы из *E. coli* показывает, что методами белковой инженерии удастся повысить как каталитическую активность, так и сродство фермента к субстратам [22].

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Проведенное исследование показало, что изменение структуры N-ацильной группы в производных аминокислот существенным образом влияет как на узнавание, так и на активность пенициллинацилаз в этом ряду субстратов. Тем не менее, как пенициллинацилаза из *A. faecalis*, так и пе-

нициллинацилаза из *E. coli* способны снимать N-бензилоксикарбонильную защитную группу в производных аминокислот в мягких условиях без использования токсичных реагентов и могут быть использованы в органическом синтезе. Эффективность такого биокаталитического снятия защитной группы может быть улучшена при использовании современных методов рационального дизайна ферментов. ●

*Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда (грант № 21-71-30003).*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Kadereit D., Waldmann H. // Chem. Rev. 2001. V. 101. № 11. P. 3367–3396.
- Sartori G., Maggi R. // Chem. Rev. 2010. V. 113. P. 1–54.
- Didziapetris R.J., Drabnig B., Schellenberger V., Jakubke H.-D., Svedas V.K. // FEBS Lett. 1991. V. 287. P. 31–33.
- Costello C.A., Kreuzman A.J., Zmijewski M.J. // Tetrahedron Lett. 1996. V. 37. № 42. P. 7469–7472.
- Simons C., van Leeuwen J.G.E., Stemmer R., Arends I.W.C.E., Maschmeyer T., Sheldon R.A., Hanefeld U. // J. Mol. Catal. B Enzym. 2008. V. 54. № 3–4. P. 67–71.
- Sewald N., Jakubke H.-D. Peptides: Chemistry and Biology. 2<sup>nd</sup> ed. Weinheim: Wiley, 2009. 594 p.
- Yajima H. // Chem. Pharm. Bull. Japan. 1968. V. 16. P. 1342.
- Medzihradzky K., Medzihradzky-Schweiger H. // Acta Chem. Acad. Sci. Hung. 1965. V. 44. P. 15–18.
- Ojha N.K., Zyryanov G.V., Majee A., Charushin V.N., Chupakhin O.N., Santra S. // Coordination Chem. Rev. 2017. V. 353. P. 1–57.
- Sifferd R.H., Vigneaud V. // J. Biol. Chem. 1935. V. 108. P. 753.
- Wunsch E., Drees F. // Chem. Ber. 1966. V. 99. P. 110.
- Matsumura E., Shin T., Muraio S., Sakaguchi M., Kawano T. // Agric. Biol. Chem. 1985. V. 49. № 12. P. 3643–3645.
- Matsumura E., Yamamoto E., Kawano T., Shin T.H., Muraio S. // Agric. Biol. Chem. 1986. V. 50. № 6. P. 1563–1571.
- Patel R.N., Nanduri V., Brzozowski D., McNamee C., Banerjee A. // Adv. Synth. Catal. 2003. V. 345. P. 830–834.
- Chu L.N., Nanduri V.B., Patel R.N., Goswami A. // J. Mol. Catal. B Enzym. 2013. V. 85–86. P. 56–60.
- Maurs M., Acher F., Azerad R. // J. Mol. Catal. B Enzym. 2012. V. 84. P. 22–26.
- Alvaro G., Feliu J.A., Caminal G., Lopez-Santin J., Clapes P. // Biocatal. Biotransformation. 2000. V. 18. № 3. P. 253–258.
- Guranda D.T., van Langen L.M., van Rantwijk F., Sheldon R.A., Svedas V.K. // Tetrahedron: Asymmetry. 2001. V. 12. P. 1645–1650.
- Ясная А.С., Ямскова О.В., Гуранда Д.Ф., Щербакова Т.А., Тишков В.И., Швядас В.К. // Вестник МГУ. Серия 2. Химия. 2008. Т. 49. С. 127–133.
- Швядас В.К., Марголин А.Л., Шерстюк С.Ф., Клесов А.А., Березин И.В. // Биоорганическая химия. 1977. Т. 3. С. 546–554.
- Švedas V., Guranda D., van Langen L., van Rantwijk F., Sheldon R. // FEBS Lett. 1997. V. 417. P. 414–418.
- Shapovalova I.V., Alkema W.B.L., Jamskova O.V., de Vries E., Guranda D.T., Janssen D.B., Švedas V.K. // Acta Naturae. 2009. V. 1. P. 94–98.

УДК 577.181, 579.61

# Генетическое программирование дрожжей для создания рекомбинантных агентов биоконтроля

С. О. Пипия<sup>1\*</sup>, Н. З. Мирзоева<sup>1</sup>, М. Н. Баранова<sup>1</sup>, И. Е. Елисеев<sup>1</sup>, Ю. А. Мокрушина<sup>1,2</sup>,  
О. В. Шамова<sup>3</sup>, А. Г. Габибов<sup>1,2</sup>, И. В. Смирнов<sup>1,4</sup>, С. С. Терехов<sup>1,2</sup>

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

<sup>2</sup>Московский государственный университет им. М.В. Ломоносова, Москва, 119234 Россия

<sup>3</sup>Институт экспериментальной медицины, Санкт-Петербург, 197022 Россия

<sup>4</sup>Национальный медицинский исследовательский центр эндокринологии Министерства здравоохранения Российской Федерации, Москва, 115478 Россия

\*E-mail: pipiyasofiya@ibch.ru

Поступила в редакцию 14.12.2022

Принята к печати 21.02.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11878

**РЕФЕРАТ** Бактериальные инфекции, возбудители которых обладают множественной лекарственной устойчивостью, представляют серьезную проблему современной медицины, поэтому поиск и создание новых антибиотиков считаются одной из важнейших задач здравоохранения. Особый интерес вызывают антибиотики на основе антимикробных пептидов (АМП) ввиду своей генетически-кодированной природы. Отдельным преимуществом большинства АМП является прямой механизм их действия, обусловленный мембранолитическими свойствами. Низкая скорость формирования антибиотикорезистентности, связанная с механизмом действия АМП, делает перспективными разработки в данной области. Рекомбинантные технологии позволяют получать генетически программируемые продуценты АМП для масштабной наработки рекомбинантных АМП (рАМП), а также направленного создания агентов биоконтроля. В данной работе метилотрофные дрожжи *Pichia pastoris* были генетически модифицированы для секретирования продукции рАМП. Показано, что конститутивная экспрессия нуклеотидной последовательности, кодирующей зрелый АМП протегрин-1, позволяет получить штамм дрожжей, эффективно ингибирующий рост грамположительных и грамотрицательных бактерий-мишеней. Антимикробный эффект наблюдался также на уровне микрокультуры при коинкапсуляции дрожжевого продуцента и репортерной бактерии в каплях микрофлюидной двойной эмульсии. Полученные результаты показывают перспективность использования разработанной системы гетерологической продукции АМП для создания эффективных агентов биоконтроля, а также скрининга антимикробной активности с применением ультравысокопроизводительных технологий.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** антимикробные пептиды (АМП), дрожжи *Pichia pastoris*, гетерологическая экспрессия, протегрин-1 (PG-1), микрофлюидная компартиментализация, эмульсионное микрокультивирование.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** АМП – антимикробные пептиды; рАМП – рекомбинантные антимикробные пептиды; АР – антибиотикорезистентность; ESKAPE – группа патогенов, в которую входят *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и виды рода *Enterobacter*; МИК – минимальная ингибирующая концентрация; PG-1 – протегрин-1; rPG-1 – рекомбинантный протегрин-1; GAP – глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназа; sfGFP – зеленый флуоресцентный белок суперфолдер; МЛУ – множественная лекарственная устойчивость; АОХ1 – алкогольоксидаза-1.

## ВВЕДЕНИЕ

Антибиотикорезистентность (АР) является серьезным вызовом для мирового здравоохранения. По некоторым оценкам в 2019 году инфекции, вызванные резистентными штаммами бактерий, унесли жизни 4.95 миллиона человек [1]. Растет

и число штаммов, приобретающих резистентность к антибиотикам, в том числе последней линии защиты. Однако количество одобренных к применению в клинике новых антибиотиков с каждым годом уменьшается, что не соответствует скорости распространения АР [2], и делает необходимым по-

иск альтернативных подходов к борьбе с инфекционными заболеваниями.

Мировым сообществом выделены и объединены в акроним ESKAPE наиболее приоритетные патогены, новые подходы к борьбе с которыми необходимо разрабатывать в первую очередь [3]. К ним относятся *Enterococcus faecium*, *Staphylococcus aureus*, *Klebsiella pneumoniae*, *Acinetobacter baumannii*, *Pseudomonas aeruginosa* и виды рода *Enterobacter*. Антимикробные пептиды (АМП) способны особенно эффективно бороться с бактериальными инфекциями, вызванными антибиотикорезистентными представителями данной группы бактерий [4]. АМП вырабатываются широким спектром организмов и обладают антибактериальной, антифунгальной и иммуномодулирующей активностями [5]. Механизмы действия и молекулярные мишени АМП отличаются от мишеней низкомолекулярных антибиотиков. АМП зачастую нацелены на мембрану, они формируют поры в липидном бислое или влияют на процессы формирования клеточной стенки, так или иначе нарушая целостность бактериальных клеток, что приводит к гибели патогена [6]. Этот механизм действия определяет более низкий уровень возникновения резистентности к АМП [7, 8].

В настоящее время количество АМП, доступных для терапевтического применения, ограничено, однако, количество АМП, проходящих стадии доклинических и клинических испытаний, растет, что подтверждает перспективность развития данного направления [9, 10]. Стоимость производства АМП с помощью твердофазного синтеза может составлять 50–400 \$ за грамм продукта, что является экономически выгодным в основном для коротких пептидов [11]. Также технологии химического синтеза не позволяют проводить широкомасштабный скрининг антимикробной активности с использованием принципов комбинаторной химии и биологии [12]. Альтернативным подходом является использование гетерологических систем рекомбинантной продукции АМП. Гетерологические системы продукции на основе митотрофных дрожжей *Pichia pastoris* позволяют легко масштабировать производство рекомбинантных биопрепаратов, минимизируя издержки на их производство [13, 14].

Агенты биоконтроля – это живые организмы (природные или модифицированные), которые способны ингибировать распространение патогенов и вредоносных организмов [15]. Чаще всего этот термин используется в контексте создания биологических пестицидов. Поскольку дрожжевые клетки не являются мишенями большинства АМП, их можно использовать для создания агентов биоконтроля, секретирующих во внеклеточную среду

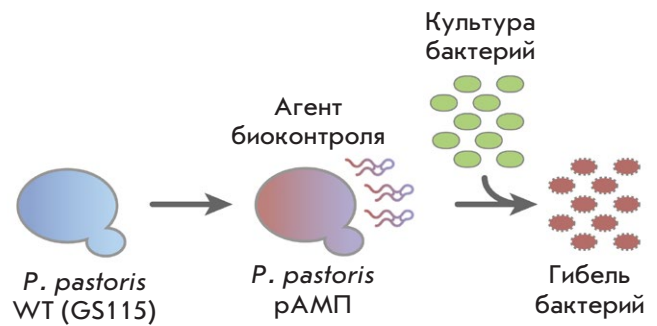


Рис. 1. Схематическое представление генетического программирования штаммов дрожжей *P. pastoris* и создания рекомбинантного агента биоконтроля. Клетки дрожжей дикого типа (*P. pastoris* WT GS115) трансфицируют генетической конструкцией для продукции секретируемой АМП; кокультивирование полученного агента биоконтроля (*P. pastoris* pAMP) с бактерией-мишенью приводит к гибели этой бактерии

активные АМП для подавления роста патогенных бактерий (рис. 1) [16] или фитопатогенных грибов [17]. Применение подобного подхода в борьбе с патогенами, в том числе из группы ESKAPE, может стать перспективным для ограничения распространения антибиотикорезистентности.

Данная работа посвящена генетическому программированию митотрофных дрожжей *P. pastoris* с целью получения рекомбинантных агентов биоконтроля, в качестве активных компонентов в которых выступает антимикробный пептид. Получена генетическая конструкция, обеспечивающая конститутивную продукцию зрелого АМП, секретируемого в культуральную среду. Дрожжи *P. pastoris*, трансфицированные данной конструкцией, проявляли антимикробную активность в отношении и грамотрицательных, и грамположительных бактерий-мишеней. Выраженный антимикробный эффект наблюдали также в эмульсионной микрокультуре, имитирующей природные микрокомпарменты. Коинкапсуляция клеток бактерии-мишени и дрожжей-продуцентов АМП в каплях микрофлюидной двойной эмульсии приводила к эффективному подавлению роста бактерий, опосредованному гетерологической продукцией pAMP – протегрина-1 (rPG-1). Разработанный подход к созданию рекомбинантных агентов биоконтроля представляет перспективную основу для дальнейшего развития альтернативных стратегий борьбы с антибиотикорезистентностью.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Бактериальные и дрожжевые штаммы

В качестве гетерологического продуцента АМП использовали штамм *P. pastoris* GS115 (Invitrogen,

США). Антимикробную активность проверяли на штаммах бактерий *Escherichia coli*  $\Delta$ lptD (любезно предоставлены И.А. Остерманом) и *Bacillus megaterium* В-512 (любезно предоставлены С.А. Дубилей). Для получения репортерного штамма *E. coli*  $\Delta$ lptD sfGFP клетки *E. coli*  $\Delta$ lptD трансформировали плазмидой, конститутивно экспрессирующей зеленый флуоресцентный белок sfGFP [18].

### Конструирование плазмиды и трансфекция клеток дрожжей

Оптимизацию кодонов последовательности, кодирующей зрелый протегрин-1 (rPG-1), проводили с использованием программного обеспечения GeneArt GeneOptimizer (Thermo Fisher Scientific Inc., США). Оптимизированную последовательность гена rPG-1 клонировали в экспрессионный вектор pGAPZalpha A (Thermo Fisher Scientific Inc.) с помощью гомологичной рекомбинации. Полученную плазмиду pGAP-PG-1 линейаризовали по сайту рестрикции AvrII и трансфицировали в клетки дрожжей с помощью электропорации [19]. Трансфицированные клоны отбирали на селективной агаризованной среде YPDS (2% пептона, 1% дрожжевого экстракта, 2% глюкозы, 1 М сорбитол, 2% агар-агара) с добавлением антибиотика зеоцина до конечной концентрации 100 мкг/мл.

### Определение зон ингибирования роста бактериимишени

Для определения размера зон ингибирования роста клоны *P. pastoris* выращивали на чашках с YPD-агаром (1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 2% глюкозы, 100 мМ фосфат калия рН 6.0, 1.8% агара) в течение 2 дней при 30°C. Мягкий агар (8 г/л триптона, 2.5 г/л NaCl, 5 г/л дрожжевого экстракта, 0.5% агара) расплавляли, охлаждали до 42°C и инокулировали клетки *E. coli*  $\Delta$ lptD или *B. megaterium* В-512 до конечной концентрации примерно 10<sup>6</sup> КОЕ/мл. Затем колонии *P. pastoris* покрывали инокулированным мягким агаром и инкубировали при 37° в течение ночи. Наличие антимикробной активности анализировали по размеру зон ингибирования роста репортерной бактерии.

### Оценка содержания рекомбинантного протегрина-1 в среде культивирования

Дрожжевой штамм-продуцент rPG-1 культивировали в среде YPD (1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 2% глюкозы, 100 мМ фосфат калия рН 6.0) в колбах-качалках при 37°C и 250 об/мин в течение 3 суток. Среду культивирования использовали для анализа антимикробной активности против бактерии-мишени *E. coli*  $\Delta$ lptD методом двукратных серийных разведений. В качестве стандарта

для определения концентрации пептида использовали синтетический аналог протегрина-1, полученный с помощью твердофазного синтеза.

### Инкапсуляция штаммов дрожжей и бактериимишени в капли микрофлюидной двойной эмульсии и проточная цитофлуориметрия

Репортерный штамм *E. coli*  $\Delta$ lptD sfGFP, продуцирующий sfGFP под контролем промотора pJ23119, культивировали в среде YPD (1% дрожжевого экстракта, 2% пептона, 2% глюкозы, 100 мМ фосфат калия рН 6.0) в колбах-качалках при 37°C и 250 об/мин до начала фазы логарифмического роста. *P. pastoris* GS115 и rPG-1 культивировали в среде YPD в колбах-качалках при 30°C и 180 об/мин в течение 16 ч. Затем клеточные культуры фильтровали с использованием 40 мкм клеточных фильтров (Greiner Bio-One, Германия) и разбавляли до достижения оптической плотности  $OD_{600} = 0.45$  (заселенность ( $\lambda$ ) ~ 5 клеток на каплю) для *E. coli*  $\Delta$ lptD и  $OD_{600} = 1.5$  (заселенность ( $\lambda$ ) ~ 1 клетка на каплю) для штаммов дрожжей. Затем клетки инкапсулировали в капли микрофлюидной двойной эмульсии (МДЭ) с использованием 20 мкм микрофлюидных чипов, полученных методом мягкой литографии, как описано ранее [20]. Заполненные капли МДЭ культивировали при 30°C в инкубаторе, насыщенном водяным паром. После инкубации в течение 24 ч сигнал флуоресценции от капель МДЭ анализировали с помощью проточного цитофлуориметра Novocyte Flow Cytometer (ACEA Biosciences Inc., США). Капли визуализировали с помощью инвертированного флуоресцентного микроскопа Eclipse Ti (Nikon, Япония) со стандартным фильтром FITC. Эксперимент по кокультивированию дрожжей и бактерий в 96-луночном планшете проводили в среде YPD со стартовой оптической плотностью  $OD_{600} = 0.25$  для дрожжей и  $OD_{600} = 0.005$  для *E. coli*  $\Delta$ lptD sfGFP. Планшет инкубировали при 30°C и постоянном перемешивании. Рост целевой бактерии оценивали путем подсчета колоний после посева на агаризованную среду серийных десятикратных разведений кокультуры. Измерения проводили в трех повторностях.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

### Антимикробные пептиды как эффективные антимикробные агенты

Антимикробные пептиды могут сочетать в себе высокую антимикробную эффективность с широким спектром антимикробной активности. В табл. 1 приведены результаты анализа опубликованных данных об антимикробной активности ряда высокоактивных АМП.

Таблица 1. Антибиотическая активность панели репрезентативных высокоэффективных АМП

Чувствительные бактерии	МИК, мкг/мл				
	протегрин-1	ареницин-1	темпорин L	плевроцидин	мелиттин
<i>Klebsiella pneumoniae</i>	0.5–4	нд	16	4–8	4–64
<i>Acinetobacter baumannii</i>	0.25	4	4	1–2	0.25–0.5
<i>Pseudomonas aeruginosa</i>	4	2–4	16	16–32	2–8
<i>Staphylococcus aureus</i>	4	2–4	2–4	4–16	1–4
<i>Candida albicans</i>	2	24	8	нд	25

\*нд – нет данных; данные МИК протегрин-1 адаптированы из [21], ареницина-1 – из [22, 23], темпорина L – [24], плевроцидина – [25], мелиттина – [26–29].

Высокоэффективные АМП можно найти среди представителей различных структурных классов. Протегрин-1 и ареницин-1 относятся к бета-шпилечным АМП, тогда как темпорин L, плевроцидин и мелиттин обладают альфа-спиральной структурой. Несмотря на отличия во вторичной структуре, они проявляют широкий спектр антимикробной активности, эффективно воздействуя в том числе и на патогены, относящиеся к группе ESKAPE, а также на оппортунистические патогенные грибы, такие, как *Candida albicans*.

Среди представленных пептидов протегрин-1 (PG-1) характеризуется низкой минимальной ингибирующей концентрацией (МИК), а также обладает широким спектром активности, в том числе и в отношении патогенов группы ESKAPE. Таким образом, принимая во внимание высокую антимикробную активность PG-1, было решено использовать его аминокислотную последовательность для создания агента биоконтроля на основе метилотрофных дрожжей *P. pastoris*.

### Генетическое программирование дрожжей

Протегрин-1 состоит из 18 аминокислотных остатков и содержит две внутримолекулярные дисульфидные связи, поддерживающие бета-шпилечную структуру (рис. 2А). В отличие от рекомбинантного протегринина, природный пептид содержит амидированный С-концевой остаток аргинина. Отсутствие модификации на С-конце может влиять на стабильность и активность АМП, однако эффективная продукция рекомбинантного протегринина-1 (rPG-1) *in situ* в гетерологической системе способна минимизировать подобные эффекты.

Нуклеотидная последовательность гена протегринина-1 *P. pastoris* GS115 была оптимизирована в соответствии с частотой использования кодонов и клонирована в челночный экспрессионный вектор rGAPZalpha A. Полученная генетическая конструкция rGAP-PG-1 обеспечивала конститутивную продукцию протегринина-1 за счет сильного

конститутивного промотора гена глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAP), а секрецию во внеклеточную среду обеспечивала сигнальная последовательность альфа-фактора дрожжей (рис. 2Б). Созданный штамм дрожжей rPG-1, трансфицированный плазмидой rGAP-PG-1, секретировал зрелый пептид во внеклеточную среду и формировал четкие зоны ингибирования роста репортерных штаммов грамположительных (*B. megaterium*) и грамотрицательных (*E. coli ΔlptD*) бактерий (рис. 2В).

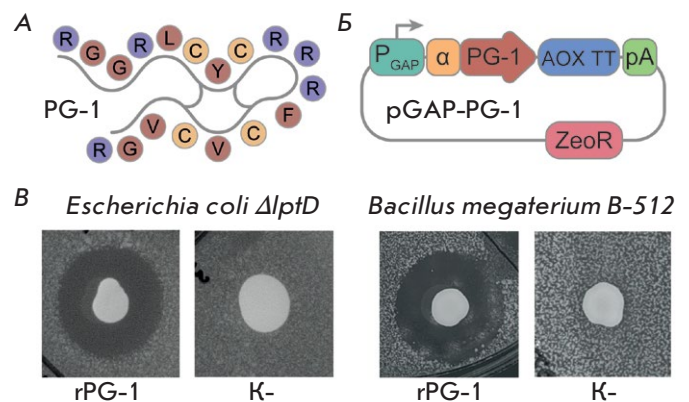


Рис. 2. Генетическое программирование дрожжей *P. pastoris*. А – схема строения протегринина-1 (фиолетовым обозначены положительно заряженные аминокислотные остатки, красным – незаряженные, желтым – остатки цистеина; Б – схема генетической конструкции для продукции протегринина-1 в дрожжах: P<sub>GAP</sub> – промотор гена глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAP), α – сигнальная последовательность альфа-фактора, PG-1 – кодированная последовательность протегринина-1, AOX TT – AOX1-терминатор транскрипции, pA – сигнал полиаденилирования, ZeoR – устойчивость к зеоцину; В – тест антимикробной активности штамма продуцента протегринина (rPG-1) и контрольных дрожжей, продуцирующих флуоресцентный белок mCherry (К-). Диаметр зон ингибирования роста – 12 и 14 мм для репортерных бактерий *E. coli ΔlptD* и *B. megaterium* соответственно

Уровень продукции rPG-1 клетками дрожжей оценивали по значениям антимикробной активности среды культивирования против репортерной бактерии *E. coli ΔlptD*. В качестве стандарта использовали химически синтезированный аналог rPG-1. Концентрация rPG-1 в среде культивирования равна 540 нг/мл.

Таким образом, показана возможность реконструкции искусственной антимикробной активности в клетках *P. pastoris*, продуцирующих rPG-1.

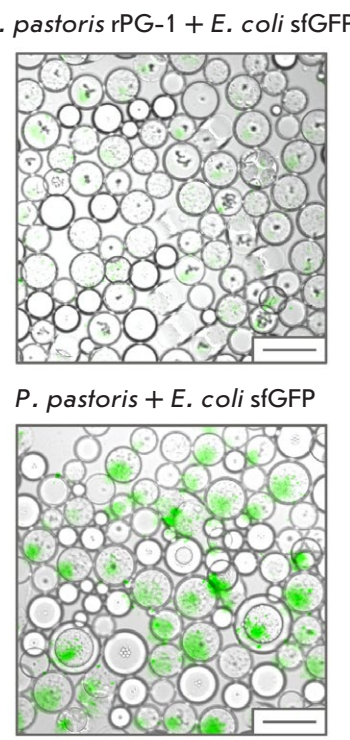
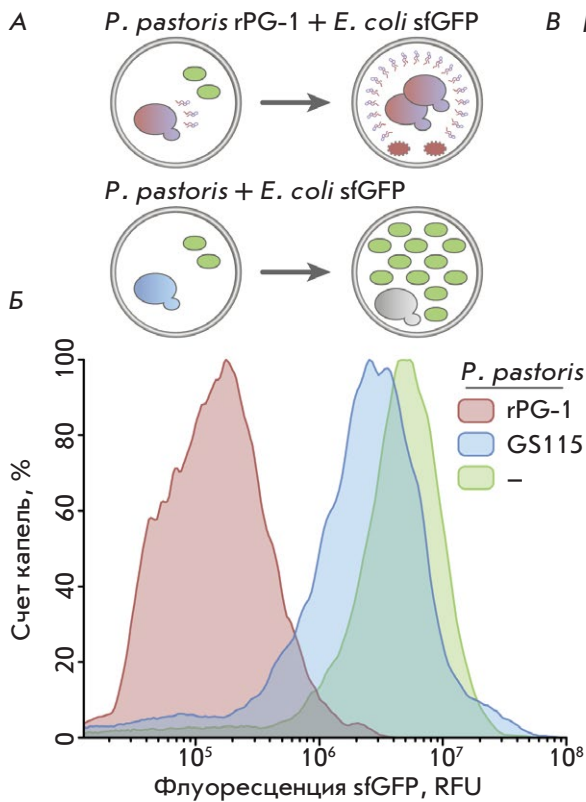
**Кокультивирование в каплях микрофлюидной двойной эмульсии**

Эффективные агенты биоконтроля способны ограничивать распространение патогенных микроорганизмов, против которых они направлены. Зачастую конкуренция микроорганизмов происходит в рамках определенных микрокомпарментов среды обитания, будь то почвенные сообщества или микробиота кишечника [30]. Таким образом, при создании агентов биоконтроля и пробиотических организмов необходимо оценить их способность ингибировать рост целевых бактерий в микрокомпартаментах и при численном преимуществе последних. Капли двойной эмульсии, сгенерированные с помощью микрофлюидных технологий, позволяют заключить клетки эффекторных дрожжей с репортерным штаммом бактерии и оценить их антибиотические

свойства. Подобная модель в дальнейшем может быть модифицирована для проведения широкомасштабных скринингов антимикробной активности.

В рамках данной работы рекомбинантный штамм дрожжей, продуцирующий протегрин (rPG-1), был коинкапсулирован в капли микрофлюидной двойной эмульсии с репортерными клетками *E. coli ΔlptD sfGFP*, конститутивно продуцирующими зеленый флуоресцентный белок sfGFP (рис. 3А). В качестве контроля использовали коинкапсуляцию *E. coli ΔlptD sfGFP* с дрожжами дикого типа (GS115) и инкапсуляцию *E. coli ΔlptD sfGFP* без дрожжей. Антимикробную активность рекомбинантных штаммов дрожжей *P. pastoris* детектировали по гибели или пролиферации репортерной бактерии-мишени и сопутствующей флуоресценции sfGFP в каплях микрофлюидной двойной эмульсии.

После инкубации в течение 24 ч капли анализировали с помощью проточного цитофлуориметра. Коинкапсуляция бактерии-мишени со штаммом дрожжей rPG-1 приводила к снижению сигнала флуоресценции репортера по сравнению с каплями, в которых *E. coli ΔlptD sfGFP* были инкапсулированы отдельно или вместе с контрольным штаммом GS115 (рис. 3Б). Снижение уровня флуоресценции в каплях свидетельствовало о подавлении роста клеток *E. coli ΔlptD sfGFP* в присутствии дрожжей rPG-1. В то же время дрожжи GS115 не оказыва-



**Рис. 3.** Анализ антимикробных свойств рекомбинантного агента биоконтроля. А — схема кокультивирования эффекторных дрожжей с бактерией-мишенью в каплях двойной эмульсии. Б — результаты проточной цитофлуориметрии капель после кокультивирования: цветом отмечено распределение сигнала флуоресценции *E. coli ΔlptD sfGFP* инкапсулированных со штаммом rPG-1 (красный), с контрольными дрожжами *P. pastoris* GS115 (синий), без дрожжей (зеленый). В — микроскопия капель микрофлюидной двойной эмульсии при инкапсуляции бактерии-мишени *E. coli sfGFP* с эффекторными дрожжами *P. pastoris* rPG-1 и с контрольными клетками *P. pastoris* GS115. Шкала делений — 50 мкм

ли значительного влияния на пролиферацию *E. coli*  $\Delta$ lptD sfGFP, что приводило к увеличению сигнала флуоресценции в соответствующих каплях.

Микроскопия образцов после инкубации показала высокоэффективное подавление роста репортерного штамма *E. coli*  $\Delta$ lptD sfGFP, сопровождающееся пролиферацией *P. pastoris* rPG-1 (рис. 3B). В то же время коинкапсуляция репортерной бактерии с контрольным штаммом GS115 приводила к преобладанию капель, заполненных размножившимися клетками бактерии-репортера (рис. 3B). Подобный эффект сохранялся и при совместном культивировании эффекторных дрожжей с целевой бактерией в 96-луночной планшете. В суспензии *P. pastoris* rPG-1 подавлялся рост *E. coli*  $\Delta$ lptD sfGFP, в отличие от контрольных дрожжей *P. pastoris* GS115.

Таким образом, созданные дрожжи-продуценты rPG-1 способны ингибировать рост целевой бактерии в совместной культуре уже на первые сутки инкубации. Полученные результаты могут быть имплементированы для разработки пробиотических организмов на основе дрожжей-продуцентов рАМП и создания программируемых рекомбинантных агентов биоконтроля.

## ОБСУЖДЕНИЕ

Стремительное распространение антибиотикорезистентности серьезно осложняет борьбу с инфекционными заболеваниями. Появление бактериальных штаммов с множественной лекарственной устойчивостью (МЛУ) еще сильнее уменьшает число доступных схем терапии. Таким образом, остро стоит вопрос о поиске альтернативных антимикробных соединений. Антимикробные пептиды способны стать источником новых антимикробных препаратов, поскольку обладают активностью против широкого спектра патогенов, в том числе ассоциированных с множественной лекарственной устойчивостью [31].

АМП включают представителей различных структурных классов. Среди них выделяют бета-шпильки, альфа-спирали, линейные, комбинированные, а также циклические пептиды [32]. Широкая структурная вариабельность АМП позволяет реализовывать разные механизмы воздействия на бактериальные клетки, влияя на спектр антимикробной активности. Технологии рационального дизайна позволяют провести тонкую настройку физико-химических свойств АМП и получить пептид с улучшенными показателями активности и токсичности [33]. Таким образом, АМП создают пластичную основу для получения эффективных антимикробных препаратов.

Протегрин-1, относящийся к бета-шпильчатым АМП, состоит из 18 аминокислотных остатков и содержит две внутримолекулярные дисульфидные

связи. Он проявляет широкую антимикробную активность за счет взаимодействия с бактериальной мембраной и формирования в ней пор [34, 35]. Принимая во внимание высокие показатели антимикробной активности и широкий спектр чувствительных к нему патогенов, протегрин-1 был выбран в качестве активного компонента для создания рекомбинантного агента биоконтроля.

Гетерологическая продукция АМП представляет важную биотехнологическую задачу, а также служит основой для создания систем широкомасштабного скрининга антимикробных соединений. Метилотрофные дрожжи *P. pastoris* широко используются в биотехнологии, поскольку позволяют за короткое время получать рекомбинантные белки с высоким выходом [13, 14]. Наиболее широко используется получение рекомбинантных белков под контролем промотора алкогольоксидазы-1 (АОХ1), индуцируемого метанолом [36]. Однако метанол легко воспламеняется и относится к токсичным веществам, к тому же индуцированная экспрессия не позволяет оценить конкурентные характеристики рекомбинантных дрожжей *in vivo*. В нашей работе синтез антимикробного пептида в клетках *P. pastoris* осуществлялся под контролем сильного конститутивного промотора глицеральдегид-3-фосфат-дегидрогеназы (GAP). Это позволило получить рекомбинантный штамм дрожжей, способный эффективно ингибировать рост грамположительных (*B. megaterium*) и грамотрицательных (*E. coli*  $\Delta$ lptD) бактериальных мишеней.

Агенты биоконтроля способны ингибировать рост патогенных организмов, против которых они направлены [15]. Для эффективной защиты от патогенов агенты биоконтроля должны обладать способностью конкурировать с этими патогенами в рамках ограниченного количества ресурсов и пространства. В данной работе такие условия моделировали посредством микрокомпартиментализации бактериальной мишени и дрожжевого эффектора в каплях микрофлюидной двойной эмульсии, и при инкапсуляции создавалось численное преимущество бактериальных клеток над дрожжевыми. Установлено, что штамм дрожжей, секретирующий рекомбинантный протегрин-1 (rPG-1) в культуральную среду, уже в первые сутки после инкапсуляции способен эффективно подавлять рост бактерии-мишени. За счет конститутивной продукции rPG-1 рекомбинантные дрожжи обладают постоянной антимикробной активностью, они способны контролировать рост микроорганизмов без необходимости в добавлении индуктора. Таким образом, в результате генетического программирования дрожжей *P. pastoris* создан рекомбинантный агент биоконтроля, способный ин-



гибировать рост бактерии-мишени в условиях конкуренции за пространство и питательные вещества.

## ЗАКЛЮЧЕНИЕ

В ходе данного исследования на основе метило-трофных дрожжей *P. pastoris* создан рекомбинантный агент биоконтроля, активным компонентом которого выступает рАМП протегрин-1. Полученный штамм дрожжей ингибировал рост репортерной мишени как на агаризованной среде, так и в условиях кокультивирования в каплях микрофлюидной

двойной эмульсии. Разработанная стратегия получения рекомбинантных агентов биоконтроля является важным этапом создания альтернативных способов борьбы с патогенами. Кроме того, рассмотренные подходы могут применяться для поиска новых антимикробных соединений с использованием технологий глубокого функционального профилирования [37]. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке гранта РНФ (проект № 21-14-00357).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Murray C.J.L., Ikuta K.S., Sharara F., Swetschinski L., Robles Aguilar G., Gray A., Han C., Bisignano C., Rao P., Wool E., et al. // *Lancet*. 2022. V. 399. № 10325. P. 629–655.
- Chahine E.B., Dougherty J.A., Thornby K.-A., Guirguis E.H. // *Ann. Pharmacother*. 2022. V. 56. № 4. P. 441–462.
- Oliveira D.M.P.D., Forde B.M., Kidd T.J., Harris P.N.A., Schembri M.A., Beatson S.A., Paterson D.L., Walker M.J. // *Clin. Microbiol. Rev*. 2020. V. 33. № 3. P. e00181–00119.
- Lin Q., Deslouches B., Montelaro R.C., Di Y.P. // *Int. J. Antimicrob. Agents*. 2018. V. 52. № 5. P. 667–672.
- Mookherjee N., Anderson M.A., Haagsman H.P., Davidson D.J. // *Nat. Rev. Drug Discov*. 2020. V. 19. № 5. P. 311–332.
- Mahlapu M., Håkansson J., Ringstad L., Björn C. // *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2016. V. 6. № 194. P. 1–20.
- Spohn R., Daruka L., Lázár V., Martins A., Vidovics F., Grézal G., Méhi O., Kintses B., Számel M., Jangir P.K., et al. // *Nat. Commun*. 2019. V. 10. № 1. P. 4538.
- Assoni L., Milani B., Carvalho M.R., Nepomuceno L.N., Waz N.T., Guerra M.E.S., Converso T.R., Darrieux M. // *Front. Microbiol*. 2020. V. 11. № 593215. P. 1–20.
- Zhu Y., Hao W., Wang X., Ouyang J., Deng X., Yu H., Wang Y. // *Med. Res. Rev*. 2022. V. 42. № 4. P. 1377–1422.
- Moretta A., Scieuzo C., Petrone A.M., Salvia R., Manniello M.D., Franco A., Lucchetti D., Vassallo A., Vogel H., Sgambato A., et al. // *Front. Cell. Infect. Microbiol*. 2021. V. 11. № 668632. P. 1–26.
- Tucker A.T., Leonard S.P., DuBois C.D., Knauf G.A., Cunningham A.L., Wilke C.O., Trent M.S., Davies B.W. // *Cell*. 2018. V. 172. № 3. P. 618–628.e613.
- Popa C., Shi X., Ruiz T., Ferrer P., Coca M. // *Front. Microbiol*. 2019. V. 10. № 1472. P. 1–13.
- Chen X., Li J., Sun H., Li S., Chen T., Liu G., Dyson P. // *Sci. Rep*. 2017. V. 7. № 1. P. 14543.
- Stenberg J.A., Sundh I., Becher P.G., Björkman C., Dubey M., Egan P.A., Friberg H., Gil J.F., Jensen D.F., Jonsson M., et al. // *J. Pest Sci*. 2021. V. 94. № 3. P. 665–676.
- Pipiya S.O., Mokrushina Y.A., Gabibov A.G., Smirnov I.V., Terekhov S.S. // *Antibiotics*. 2020. V. 9. № 9. P. 527.
- Huang Y., Gao L., Lin M., Yu T. // *Postharvest. Biol. Technol*. 2021. V. 171. № 11. P. 1298.
- Baranova M.N., Babikova P.A., Kudzhaev A.M., Mokrushina Y.A., Belozerova O.A., Yunin M.A., Kovalchuk S., Gabibov A.G., Smirnov I.V., Terekhov S.S. // *Antibiotics*. 2021. V. 10. № 10. P. 1161.
- Wu S., Letchworth G.J. // *BioTechniques*. 2004. V. 36. № 1. P. 152–154.
- Terekhov S.S., Smirnov I.V., Stepanova A.V., Bobik T.V., Mokrushina Y.A., Ponomarenko N.A., Belogurov A.A., Rubtsova M.P., Kartseva O.V., Gomzikova M.O., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2017. V. 114. № 10. P. 2550–2555.
- Edwards I.A., Elliott A.G., Kavanagh A.M., Zuegg J., Blaskovich M.A.T., Cooper M.A. // *ACS Infect. Dis*. 2016. V. 2. № 6. P. 442–450.
- Orlov D.S., Shamova O.V., Eliseev I.E., Zharkova M.S., Chakchir O.B., Antcheva N., Zachariev S., Pantelev P.V., Kokryakov V.N., Ovchinnikova T.V., et al. // *Mar. Drugs*. 2019. V. 17. № 6. P. 376.
- Park C., Cho J., Lee J., Lee D.G. // *Biotechnol. Lett*. 2011. V. 33. № 1. P. 185–189.
- Manzo G., Ferguson P.M., Hind C.K., Clifford M., Gustilo V.B., Ali H., Bansal S.S., Bui T.T., Drake A.F., Atkinson R.A., et al. // *Sci. Rep*. 2019. V. 9. № 1. P. 10934.
- Manzo G., Hind C.K., Ferguson P.M., Amison R.T., Hodgson-Casson A.C., Ciazynska K.A., Weller B.J., Clarke M., Lam C., Man R.C.H., et al. // *Commun. Biol*. 2020. V. 3. № 1. P. 697.
- Dosler S., Karaaslan E., Alev Gerceker A. // *J. Chemother*. 2016. V. 28. № 2. P. 95–103.
- Akbari R., Hakemi-Vala M., Pashaie F., Bevalian P., Hashemi A., Pooshang Bagheri K. // *Microb. Drug Resist*. 2018. V. 25. № 2. P. 193–202.
- Jang W.S., Kim C.H., Kim K.N., Park S.Y., Lee J.H., Son S.M., Lee I.H. // *Antimicrob. Agents Chemother*. 2003. V. 47. № 8. P. 2481–2486.
- Sung W.S., Park S.H., Lee D.G. // *FEBS Lett*. 2008. V. 582. № 16. P. 2463–2466.
- Donaldson G.P., Lee S.M., Mazmanian S.K. // *Nat. Rev. Microbiol*. 2016. V. 14. № 1. P. 20–32.
- Park S.C., Park Y., Hahm K.S. // *Int. J. Mol. Sci*. 2011. V. 12. № 9. P. 5971–5992.
- Huan Y., Kong Q., Mou H., Yi H. // *Front. Microbiol*. 2020. V. 11. № 582779. P. 1–21.
- Elliott A.G., Huang J.X., Neve S., Zuegg J., Edwards I.A., Cain A.K., Boinett C.J., Barquist L., Lundberg C.V., Steen J., et al. // *Nat. Commun*. 2020. V. 11. № 1. P. 3184.
- Bolinteanu D., Hazrati E., Davis H.T., Lehrer R.I., Kaznessis Y.N. // *Peptides*. 2010. V. 31. № 1. P. 1–8.
- Fahrner R.L., Dieckmann T., Harwig S.S., Lehrer R.I., Eisenberg D., Feigon J. // *Chem. Biol*. 1996. V. 3. № 7. P. 543–550.
- Karbalaei M., Rezaee S.A., Farsiani H. // *J. Cell. Physiol*. 2020. V. 235. № 9. P. 5867–5881.
- Terekhov S.S., Smirnov I.V., Malakhova M.V., Samoilov A.E., Manolov A.I., Nazarov A.S., Danilov D.V., Dubiley S.A., Osterman I.A., Rubtsova M.P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2018. V. 115. № 38. P. 9551–9556.

УДК 57.023

# Характеристика человеческого моноклонального антитела С6D7-RBD, специфичного к рецепторсвязывающему домену S белка вируса SARS-CoV-2

Я. О. Романенко\*, М. В. Силкина, А. С. Карцева, М. А. Марьин, М. А. Шкуратова, М. А. Макарова, А. К. Рябко, Д. А. Конышкова, Н. А. Зенинская, А. Е. Хлынцева, И. Г. Шемякин, В. В. Фирстова

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

\*E-mail: muntian.jana@yandex.ru

Поступила в редакцию 01.11.2022

Принята к печати 20.02.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11849

**РЕФЕРАТ** Новая коронавирусная инфекция COVID-19 — это острое вирусное заболевание, поражающее преимущественно верхние дыхательные пути. Этиологическим агентом COVID-19 является РНК-содержащий вирус SARS-CoV-2 (сем. Coronaviridae, род *Betacoronavirus*, подрод. *Sarbecovirus*). Нами получено высокоаффинное человеческое моноклональное антитело с авторским названием С6D7-RBD, специфичное к рецепторсвязывающему домену (RBD) S белка вируса SARS-CoV-2 вариант Wuhan-Hu-1, обладающее вируснейтрализующей активностью в тесте с рекомбинантными антигенами: ангиотензинпревращающим ферментом 2 (ACE2) и RBD.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** COVID-19, SARS-CoV-2, рецепторсвязывающий домен, человеческое моноклональное антитело, вируснейтрализующая активность.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** COVID-19 – (COronaVirus Disease 2019); SARS-CoV-2 – коронавирус 2 тяжелого острого респираторного синдрома (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2); ВОЗ – Всемирная организация здравоохранения; FDA – Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов (U.S. Food and Drug Administration); чМКА – человеческое моноклональное антитело; МКА – моноклональное антитело; ACE-2 – ангиотензинпревращающий фермент 2; TMPRSS2 – трансмембранная сериновая протеаза 2; RBD – рецепторсвязывающий домен; ФСБ – фосфатно-солевой буфер; ФБС – фетальная сыворотка крупного рогатого скота; ИФА – иммуноферментный анализ; ТМВ – 3,3',5,5'-тетраметилбензидин; ФСБ-Тв – фосфатно-солевой буфер с добавлением Tween-20; ПААГ – полиакриламидный гель.

## ВВЕДЕНИЕ

Новая коронавирусная инфекция COVID-19 (COronaVirus Disease 2019), вызываемая вирусом SARS-CoV-2 (Severe acute respiratory syndrome-related coronavirus 2), впервые была зарегистрирована в конце 2019 года в городе Ухань – столице китайской провинции Хубэй. Несмотря на все попытки сдержать заболевание в Китае, вирус распространился по всему миру и вскоре Всемирная организация здравоохранения (ВОЗ) объявила COVID-19 пандемией [1]. На сегодняшний день продолжающаяся пандемия этой инфекции не перестает уносить жизни людей. За небольшой промежуток времени в мире создано немало эффективных вакцин. Однако есть необходимость в создании средств пассивной иммунотерапии

людей в умеренно тяжелых и тяжелых случаях заболевания, к которым относятся препараты на основе человеческих моноклональных антител (чМКА).

Геном вируса SARS-CoV-2 кодирует четыре структурных белка: поверхностный шиповидный гликопротеин S, мембранный M, белок нуклеокапсида N и оболочечный белок E. Белок S обуславливает возможность прикрепления, слияния и проникновения вируса в клетку хозяина. Под действием трансмембранной сериновой протеазы 2 (TMPRSS2) белок S расщепляется на две субъединицы – S1 и S2 [2, 3]. Непосредственно рецепторное взаимодействие вируса с клеткой хозяина осуществляется через RBD, который расположен в субъединице S1, а затем с помощью субъединицы S2 происходит соединение

мембраны вируса и клетки хозяина [4]. Поэтому RBD является основной мишенью для получения чМКА, потенциально способных нейтрализовать вирус [5].

Исследователи всего мира в условиях быстро нарастающей заболеваемости и высокой смертности в ускоренные сроки разрабатывают инновационные лекарственные препараты, которые, в свою очередь, должны обладать большой клинической эффективностью и безопасностью.

В октябре 2020 года Министерство здравоохранения РФ утвердило применение плазмы от доноров-реконвалесцентов (лиц с подтвержденным случаем COVID-19 в стадии выздоровления) для лечения пациентов с тяжелым течением новой коронавирусной инфекции в связи с отсутствием препаратов для специфического лечения. В методических рекомендациях говорится, что возрастной диапазон донора должен быть от 18 до 55 лет, иметь массу тела более 55 кг, а забор плазмы крови должен проводиться не ранее чем через 14 дней после исчезновения клинических симптомов и двукратном отрицательном результате на РНК SARS-CoV-2 в орофарингеальном мазке, взятом с интервалом не менее 24 ч. Плазма крови должна обладать вируснейтрализующей активностью в разведении 1 : 160, концентрация общего белка в крови не менее 65 г/л [6].

На территории РФ нет опыта использования препаратов на основе моноклональных антител у тяжело больных пациентов, но есть одно запатентованное чМКА, обладающее нейтрализующей активностью, селективно взаимодействующее с RBD-фрагментом в составе S-белка вируса SARS-CoV-2 [7].

Получение чМКА, специфичных к RBD-домену белка S SARS-CoV-2, является перспективным направлением. В данном исследовании охарактеризовано полученное нами чМКА, которое может быть использовано для лечения COVID-19.

### ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Для выполнения данной работы нами был выбран донор крови, переболевший новой коронавирусной инфекцией COVID-19 и через 6 месяцев после выздоровления иммунизированный вакциной «Спутник Лайт» (пр-во ГУ НИИЭМ им. Н.Ф. Гамалеи РАМН, Россия). От донора получено письменное информированное согласие на участие в работе. На 7 сутки после вакцинации был проведен забор периферической крови с последующим выделением из нее фракции В-лимфоцитов с помощью коммерческого набора RossetteSep™ Human B Cell Enrichment Cocktail (Stemcell technologies, Канада) в соответствии с инструкцией производителя. Выделенные В-лимфоциты подвергали электрослиянию с миеломной клеточной линией K6H6/B5 (ATCC® CRL1823™)

на приборе ECM 2001 (ВТХ Harvard Apparatus, США) согласно ранее опубликованной методике [8].

Культивирование полученных гибридом проводили при температуре 37°C во влажной атмосфере с 5% CO<sub>2</sub>. Замену культуральной среды проводили 1 раз в трое суток. По достижении монослоя гибридной культуры проводили иммуоферментный анализ (ИФА) с целью выявления гибридом, синтезирующих специфические МКА к RBD-домену S-белка SARS-CoV-2.

### Имуоферментный анализ

Культуральную жидкость из лунок, в которых наблюдался рост гибридных клеток, тестировали с помощью ИФА в отношении специфического взаимодействия с рекомбинантным RBD вируса SARS-CoV-2 вариант Wuhan-Hu-1 (his-sars2-rbd, Invivogen). Для этого в лунки 96-луночного полистиролового планшета вносили по 100 мкл раствора рекомбинантного белка RBD (his-sars2-rbd, Invivogen) в концентрации 1 мкг/мл на лунку в ФСБ и инкубировали при температуре 37°C в течение 2 ч на планшетном орбитальном шейкере (Elmi, Латвия) при скорости вращения платформы 370 об/мин. Затем каждую лунку планшета трехкратно отмывали, внося по 200 мкл ФСБ с добавлением 0.05% Tween-20 (ФСБ-Тв). Затем свободные валентности пластика блокировали молоком с массовой долей жира не более 0.5%, внося по 200 мкл в лунку, и инкубировали при температуре 37°C в течение 1 ч при тех же условиях. После инкубации лунки планшета трехкратно отмывали ФСБ-Тв. Далее в планшет вносили по 100 мкл культуральной жидкости, инкубацию и отмывку планшета проводили при тех же условиях. В качестве отрицательного контроля использовали лунки с чистым ФСБ, в качестве положительного контроля – ранее проверенную сыворотку крови донора с высоким титром антител к RBD-белку в разведении 1 : 25. После инкубации лунки планшета трижды отмывали ФСБ-Тв. Далее в лунки добавляли антитела кролика против цельной молекулы IgG человека, конъюгированные с пероксидазой хрена (Sigma, США), в разведении 1 : 20000. Планшет инкубировали при тех же условиях в течение 40 мин. По окончании инкубации планшет отмывали 6 раз, затем в лунки планшета вносили по 100 мкл провячного раствора на основе 3,3',5,5'-тетраметилбензидина (ТМБ). Реакцию оценивали по появлению синего окрашивания. Интенсивность окрашивания измеряли на планшетном спектрофотометре (Bio-Rad xMark) при длине волны 655 нм.

Колонии гибридных клеток, показавшие высокую (трехкратно превышающую значение отрицательного контроля) оптическую плотность в ИФА,

клонировали и масштабировали в культуральных флаконах Corning® T-25 и T-75. Далее для работы чМКА гибридную культуру культивировали в колбах 1.6 л Optimum Growth™ Flasks (Thomson Instrument Company, США).

### Аффинная хроматография

Для получения чМКА C6D7-RBD культуральную жидкость, в которой культивировались одноименные гибридомы, очищали методом аффинной хроматографии на колонке с Protein G-сефарозой (HiTrap™ Protein G, Швеция) с использованием системы ÄKTA Start (GE Healthcare, США). Выделенные IgG переводили в ФСБ и доочищали методом гель-фильтрации на сорбенте Superdex 200 10/300 GL (GE Healthcare, США). Чистоту полученной иммуноглобулиновой фракции проверяли методом SDS-электрофореза по Лэммли в 10% полиакриламидном геле (ПААГ) в редуцирующих и не редуцирующих условиях. Гель окрашивали Кумасси бриллиантовым синим R-250.

### Иммуноблот-анализ

Оценку иммунологической специфичности очищенного чМКА C6D7-RBD проводили методом иммуноблоттинга. Для этого рекомбинантный RBD (1 мкг на дорожку) разделяли с помощью ПААГ-электрофореза в редуцирующих условиях, после чего проводили горизонтальный перенос белка из геля на нитроцеллюлозную мембрану Hybond-C Extra (GE Healthcare) стандартным методом. По окончании переноса мембрану погружали в обезжиренное (не более 0.5% жирности) молоко для блокировки свободных валентностей нитроцеллюлозы и инкубировали в течение 1 ч при покачивании и температуре 37°C. По окончании инкубации мембрану трижды отмывали ФСБ-Тв и погружали в раствор с чМКА C6D7-RBD с концентрацией 10 мкг/мл в ФСБ. Инкубацию и отмывку мембраны проводили при тех же условиях. чМКА детектировали на мембране козьими антителами против IgG человека, конъюгированными с пероксидазой хрена (Sigma), в разведении 1 : 10 000 в ФСБ. Мембрану инкубировали в течение 40 мин при тех же условиях. После инкубации мембрану отмывали 6 раз ФСБ-Тв и проявляли 1% раствором диаминобензидина в ФСБ с добавлением хлоридов никеля и кобальта, а также 33% пероксида водорода в количестве 1 мкл на 1 мл проявочного раствора.

### Определение классовой принадлежности чМКА C6D7-RBD

Для определения подкласса и изотипа очищенного чМКА C6D7-RBD использовали иммунохроматогра-

фический экспресс-тест (Iso-Gold™ Rapid Human Antibody Isotyping Kit, Канада). Перед проведением экспресс-теста все реагенты доводили до комнатной температуры. Опытный образец чМКА C6D7-RBD разводили в 200 мкл буфера для разведения образца (Part Number SDB-004) в соотношении 1 : 100. Затем в пробирку с опытным образцом погружали тест-полоску. Результат анализировали через 5–10 мин.

### Определение параметров равновесной константы диссоциации чМКА C6D7-RBD с белком-мишенью RBD

Параметры равновесной константы диссоциации чМКА C6D7-RBD с белком-мишенью RBD определяли с помощью метода поверхностного плазмонного резонанса (SPR) на приборе BIAcore X-100 (Biacore, Швеция). Эксперимент проводили на сенсорном чипе CM5 в буфере HBS-EP (10 mM HEPES, 150 mM NaCl, 3 mM EDTA и 0.005% поверхностно-активного вещества P20, pH 7.4). Антитела к гистидину конъюгировали с сенсорным чипом с использованием наборов His Capture Kit type 2 и Amine Coupling Kit (Cytiva, Швеция) в соответствии с инструкцией производителя. Рекомбинантный RBD (10 мкг/мл) наносили на подготовленный чип со скоростью 30 мкл/мин в течение 3 мин. После 10-минутной стабилизации антитело (концентрация от 6.25 до 100 нМ) вводили в течение 3 мин при постоянной скорости потока 40 мкл/мин. Диссоциацию контролировали в течение 90 мин, после чего чип регенерировали 10 mM глицином pH 1.7 в течение 30 с при скорости потока 50 мкл/мин. Сенсорограммы нормализовали путем вычитания базовых значений RU из эталонной проточной кюветы (без захвата чМКА) и анализировали путем подгонки данных к модели связывания Ленгмюра 1 : 1 с помощью программного обеспечения Biacore T200 Evaluation Software.

### Определение способности чМКА C6D7-RBD ингибировать взаимодействие белка ACE-2 с RBD

Определение вируснейтрализующей активности чМКА C6D7-RBD проверяли в конкурентном ИФА. С этой целью в лунки 96-луночного полистиролового планшета иммобилизовали рекомбинантный вариант белка RBD в концентрации 1 мкг/мл по описанной выше методике. Затем в лунки вносили чМКА C6D7-RBD в концентрации от 10 до 0.078125 мкг/мл с двукратным серийным шагом разведения. Планшет инкубировали при температуре 37°C в течение 1 ч. После инкубации лунки планшета трижды отмывали ФСБ-Тв. Следующим этапом в лунки планшета вносили рекомбинантный белок человеческого ACE-2 (fc-hace2, Invivogen), конъюгированный с пероксидазой хрена, с использованием набора LYNX Rapid

HRP Antibody Conjugation Kit (Bio-Rad). Инкубацию и отмывку планшета проводили при тех же условиях. Затем в лунки планшета вносили по 100 мкл промывочного раствора ТМВ. Реакцию оценивали по появлению синего окрашивания раствора. Интенсивность окрашивания измеряли на планшетном спектрофотометре (Bio-Rad xMark) при длине волны 655 нм. За 100% нейтрализующую активность принимали среднее значение оптической плотности фона (контрольные лунки без иммобилизации RBD, что равносильно случаю, когда он полностью заблокирован антителами), а за отсутствие нейтрализующей активности (0%) принимали среднее значение оптической плотности контрольных лунок, где ACE-2-HRP взаимодействует с RBD без внесения антитела. По контрольным значениям получали линейную функцию, с помощью которой значения оптической плотности в опытных лунках с различным количеством антитела переводили в процентное значение нейтрализующей активности.

## РЕЗУЛЬТАТЫ

В результате электрослияния плазмобластов с клетками-партнерами К6Н6/В5 получено 5 гибридом, из которых по итогам скрининга на специфичность синтезируемых ими антител к RBD была выбрана одна гибридома, названная С6D7-RBD. Последующее масштабирование объема культивирования гибридом позволило получить большой объем супернатанта, в котором содержались антитела. Для получения чистой фракции иммуноглобулинов использовали методы хроматографической очистки.

### Результаты хроматографической очистки чМКА С6D7-RBD

Чистоту иммуноглобулиновой фракции, полученной методом аффинной хроматографии с последующей доочисткой методом гель-фильтрации, проверяли с помощью SDS-электрофореза по Лэммли в 10% ПААГ в редуцирующих и не редуцирующих условиях (рис. 1). Положение очищенного чМКА С6D7-RBD на электрофореграмме соответствует его молекулярной массе. Степень чистоты очищенного чМКА С6D7-RBD составила, по данным денситометрии (GE Turphoon FLA 9500, Швеция), не менее 95%.

### Иммунологическая специфичность чМКА С6D7-RBD к рецепторсвязывающему домену S-белка вируса SARS-CoV-2

Специфичность чМКА С6D7-RBD в отношении рекомбинантного белка RBD доказали методом иммуноблоттинга. Показано, что чМКА С6D7-RBD характеризуется специфической активностью в отношении рекомбинантного белка RBD (рис. 2).

### Результаты иммунохроматографического теста

Согласно данным иммунохроматографического теста исследуемое чМКА С6D7-RBD относится к изотипу G1 иммуноглобулинов класса G и содержит  $\kappa$ -цепь (рис. 3).

### Определение равновесной константы диссоциации чМКА С6D7-RBD с белком-мишенью RBD (Ухань)

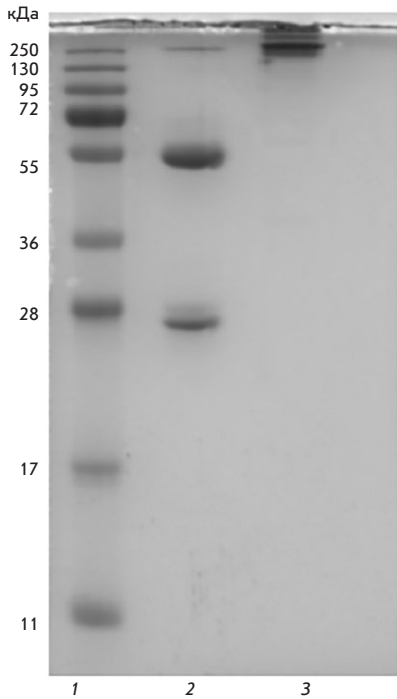
Параметры аффинного взаимодействия чМКА С6D7-RBD с рекомбинантным белком RBD определяли методом поверхностного плазмонного резонанса (SPR). Величина равновесной константы диссоциации ( $K_D$ ) для чМКА С6D7-RBD составила:  $K_D = 5.525 \times 10^{-9}$  М (рис. 4).

### Определение RBD-ACE2-нейтрализующей активности чМКА С6D7-RBD

Из представленных на рис. 5 данных видно дозозависимое повышение нейтрализующей активности чМКА С6D7-RBD. При максимальной концентрации 10 мкг/мл чМКА С6D7-RBD наблюдалось практически полное (97%) ингибирование взаимодействия ACE-2 и RBD (Ухань). Добавление чМКА С6D7-RBD в концентрации 0.625 мкг/мл ингибировало ACE-2 – RBD (Ухань) взаимодействие на 36%, а при минимальной концентрации чМКА С6D7-RBD (0.078125 мкг/мл) нейтрализующая активность практически отсутствовала (2%).

## ОБСУЖДЕНИЕ

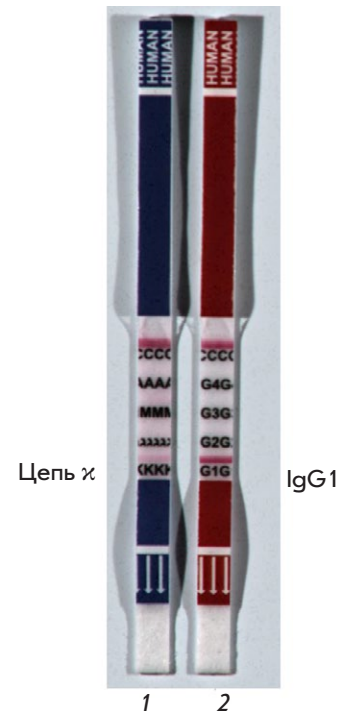
Получение чМКА с физиологически спаренными тяжелой и легкой цепями, специфичного в отношении выбранной мишени и к тому же обладающего вируснейтрализующей активностью – довольно сложная задача. Нами использованы современные методы цитометрического сортирования с целью получения пула плазмобластов. Мы выбрали стратегию сортирования всей популяции плазмобластов (независимо от их специфичности), но забор крови проводили на 7-е сутки после вакцинации донора вакциной «Спутник Лайт». В ряде работ показано, что количество специфических плазмобластов увеличивается в крови на 7–8 сутки после вакцинации или заболевания [9–11]. Далее для увеличения количества получаемых нами гибридом мы применили метод электрослияния, эффективность которого на порядок выше, чем слияние с ПЭГ [8]. Использование клеточной линии К6Н6/В5 в качестве клеток-партнеров позволило снизить вероятность последующей сегрегации хромосом человека из гибридомы [12]. В результате проведенной нами работы получено 12 гибридом, но только пять оказались специфичными в отношении RBD и только одна гибридома (С6D7-RBD) сохранила способность стабильно синтезировать антитело.



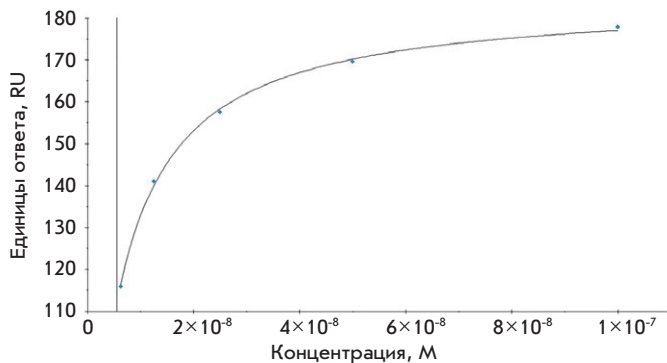
**Рис. 1.** Электрофореграмма чМКА C6D7-RBD. 1 – маркеры молекулярных масс PageRuler™ SM1811 (Fermentas, США). 2 – образец чМКА C6D7-RBD в редуцирующих условиях. 3 – образец чМКА C6D7-RBD в не редуцирующих условиях



**Рис. 2.** Определение специфичности чМКА C6D7-RBD в отношении рекомбинантного белка RBD. 1 – маркеры молекулярных масс PageRuler™ SM1811 (Fermentas, США). 2 – рекомбинантный RBD, детектированный чМКА C6D7-RBD



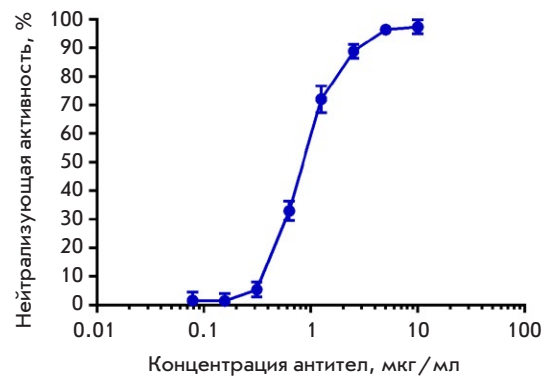
**Рис. 3.** Классовая принадлежность чМКА C6D7-RBD. 1 – тест-полоска для определения типа легкой цепи и классовой принадлежности иммуноглобулина. 2 – тест-полоска для определения подкласса иммуноглобулина G



**Рис. 4.** Результаты определения  $K_D$  чМКА C6D7-RBD в отношении белка-мишени RBD

Дальнейший анализ показал, что C6D7-RBD относится к подклассу IgG1 и содержит легкую цепь типа  $\kappa$ . чМКА C6D7-RBD специфично к RBD SARS-CoV-2 с  $K_D = 5.525 \times 10^{-9}$  М.

Традиционные методы выявления способности МКА нейтрализовать вирус SARS-CoV-2 основаны на оценке способности антител ингибировать бляшкообразование или цитопатогенное действие вируса на чувствительной культуре клеток. Работа с виру-



**Рис. 5.** Определение RBD-ACE2-нейтрализующей активности чМКА C6D7-RBD

сом дикого типа SARS-CoV-2 подразумевает необходимость биоизоляции и проведения исследований в лабораториях, отвечающих требованиям безопасности работ с патогенными биологическими объектами II группы патогенности. Для облегчения скрининга нейтрализующей активности моноклональных антител или сывороток переболевших/вакцинированных доноров можно использовать «суррогатные» методы. К таким методам относится конкурентный ИФА,

с использованием которого анализируется влияние антител на способность взаимодействия рекомбинантных белков RBD и ACE-2 друг с другом. Этот метод отражает способность антител подавлять проникновение вируса внутрь клетки. В ряде работ показано, что большая часть вируснейтрализующих антител имеет специфичность к RBD поверхностного гликопротеина S SARS-CoV-2, и механизм их действия обусловлен ингибированием способности вируса связываться с вирусным рецептором ACE-2 на поверхности клетки-мишени. С использованием этого метода показано, что чМКА С6D7-RBD в концентрации 10 мкг/мл способно практически полностью блокировать взаимодействие RBD-ACE-2.

В мировой практике уже есть опыт использования препаратов, основой которых являются чМКА. В настоящее время FDA утвердило только три таких препарата для экстренного лечения COVID-19. В 2021 году британская фармацевтическая компания GSK (GlaxoSmithKline) и ее американский партнер Vir Biotechnology выпустили препарат Sotrovimab (VIR-7831) [13]. Препарат состоит из одного чМКА, специфичного к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 [14]. В том же 2021 году компанией AbCellera совместно с Исследовательским центром вакцин США в Национальном институте аллергии и инфекционных заболеваний (NIAID) разработан препарат LY-CoV555/бамлаживимаб и LY-CoV016/этесевимаб [15]. Этот препарат состоит из коктейля чМКА, специфичных к RBD S-белка, а также специфичных к ACE-2 [16]. Третий утвержденный

препарат Казирививимаб и Имдевимаб (REGN10933 и REGN10987), разработанный американской биотехнологической компанией Regeneron Pharmaceuticals, состоит из двух чМКА, специфичных к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2 [17, 18]. Клинические испытания показывают, что для большей эффективности нейтрализации вируса SARS-CoV-2 необходимо использовать коктейль моноклональных антител, специфичных к RBD S-белка вируса SARS-CoV-2.

Таким образом, полученное нами чМКА С6D7-RBD перспективно для дальнейшего изучения эффективности его применения в качестве отдельного чМКА или в составе коктейля МКА для нейтрализации вируса SARS-CoV-2.

### ЗАКЛЮЧЕНИЕ

С использованием методов цитометрического сортирования и гибридной технологии нами получена гибридома, синтезирующая чМКА С6D7-RBD. чМКА С6D7-RBD относится к подклассу 1 IgG, легкая цепь представлена изотипом  $\kappa$ . чМКА С6D7-RBD специфично к RBD SARS-CoV-2 с  $K_D = 5.525 \times 10^{-9}$  М и проявляет способность ингибировать взаимодействие между ACE-2 и RBD-белками, что позволяет рассматривать возможную способность данного чМКА нейтрализовать проникновение вируса SARS-CoV-2 в клетку. ●

*Работа выполнена в рамках государственного задания НИОКР 3.1.3.*

*Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.*

### СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Yan Y., Chang L., Wang L. // Rev. Med. Virol. 2020. V. 30. № 3. P. e2106.
2. Huang Y., Yang C., Xu X.F., Xu W., Liu S.W. // Acta Pharmacologica Sinica. 2020. V. 41. № 9. P. 1141–1149.
3. Kumar S., Chandele A., Sharma A. // PLoS Pathogens. 2022. V. 17. № 9. P. e1009885.
4. Raybould M.I., Kovaltsuk A., Marks C., Deane C.M. // Bioinformatics. 2021. V. 37. № 5. P. 734–735.
5. Xia S., Yan L., Xu W., Agrawal A.S., Algaissi A., Tseng C.T.K., Wang Q., Du L., Tan W., Wilson I.A., et al. // Sci. Adv. 2019. V. 5. № 4. P. eaav4580.
6. Камкин Е.Г. Профилактика, диагностика и лечение новой коронавирусной инфекции (COVID-19). Временные методические рекомендации. М.: Министерство здравоохранения РФ, 2020.
7. Шахпаронов М.И., Павлюков М.С., Антипова Н.В. Моноклональное антитело к RBD-фрагменту в составе S-белка вируса SARS-CoV-2. Патент РФ на изобретение № 2744274. 2021.
8. Силкина М.В., Карцева А.С., Рябко А.К., Марьин М.А., Романенко Я.О., Калмантаева О.В., Хлынцева А.Е., Шемякин И.Г., Дятлов И.А., Фирстова В.В. // Биотехнология. 2021. Т. 37. № 2. С. 77–87.
9. Scholzen A., Nahrendorf W., Langhorne J., Sauerwein R.W. // PLoS One. 2014. V. 9. № 7. P. e102885.
10. Traggiai E., Becker S., Subbarao K., Kolesnikova L., Uematsu Y., Gismondo M.R., Murphy B.R., Rappuoli R., Lanzavecchia A. // Nat. Medicine. 2004. V. 10. № 8. P. 871–875.
11. Ušaj M., Trontelj K., Miklavčič D., Kandušer M. // J. Membrane Biol. 2010. V. 236. № 1. P. 107–116.
12. Yu X., McGraw P.A., House F.S., Crowe J.E., Jr. // J. Immunol. Meth. 2008. V. 336. № 2. P. 142–151.
13. Tuccori M., Ferraro S., Convertino I., Cappello E., Valdiserra G., Blandizzi C., Maggi F., Focosi D. // MAbs. 2020. V. 12. № 1. P. 1854149.
14. Cathcart A.L., Havenar-Daughton C., Lempp F.A., Ma D., Schmid M.A., Agostini M.L., Guarino B., Di Julio J., Rosen L.E., Tucker H., et al. // bioRxiv. 2021. P. 2021.03.09.434607.
15. Jones B.E., Brown-Augsburger P.L., Corbett K.S., Westendorf K., Davies J., Cujec T.P., Wiethoff C.M., Blackbourne J.L., Heinz B.A., Foster D., et al. // Sci. Translat. Med. 2021. V. 13. № 593. P. eabf1906.
16. Chen P., Nirula A., Heller B., Gottlieb R.L., Boscia J., Morris J., Huhn G., Cardona J., Mocherla B., Stosor V., et al. // New Engl. J. Med. 2021. V. 384. № 3. P. 229–237.
17. Hansen J., Baum A., Pascal K.E., Russo V., Giordano S., Wloga E., Fulton B.O., Yan Y., Koon K., Patel K., et al. // Science. 2020. V. 369. № 6506. P. 1010–1014.
18. VanBlargan L.A., Errico J.M., Halfmann P., Zost S.J., Crowe J.E., Purcell L.A., Kawaoka Y., Corti D., Fremont D.H., Diamond M.S. // Nat. Medicine. 2022. V. 28. № 3. P. 490–495.

УДК 575+56

# Искажение популяционной статистики как результат различных методических подходов к приготовлению геномных библиотек древней ДНК

Ф. С. Шарко<sup>1</sup>, К. В. Жур<sup>1</sup>, В. А. Трифонов<sup>1,2</sup>, Е. Б. Прохорчук<sup>1</sup><sup>1</sup>Федеральный исследовательский центр «Фундаментальные основы биотехнологии» РАН, Москва, 119071 Россия<sup>2</sup>Институт истории материальной культуры РАН, Санкт-Петербург, 191186 Россия

E-mail: fedosic@gmail.com

Поступила в редакцию 26.12.2022

Принята к печати 02.03.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11898

**РЕФЕРАТ** На сегодняшний день существует несколько различных методов подготовки ДНК-библиотек для палеогенетических исследований. Однако химические реакции, лежащие в основе каждого из них, способны повлиять на нуклеотидную последовательность библиотек древней ДНК (дДНК) и внести изменения в результаты статистического анализа. Нами проведено сравнение результатов секвенирования библиотек дДНК образца эпохи бронзы из погребений кавказского могильника Клады. Библиотеки были приготовлены с применением трех различных подходов: метода дробовика (shotgun sequencing), отбора целевых районов генома и отбора целевых районов генома с предварительной обработкой ДНК смесью урацил-ДНК-гликозилазы (UDG) и эндонуклеазы VIII. Проанализировано влияние этих подходов на результаты вторичного статистического анализа данных, а именно F4-статистики, ADMIXTURE и метода главных компонент (PCA). Показано, что при приготовлении геномных библиотек без использования урацил-ДНК-гликозилазы возможно искажение результатов статистической обработки, связанное с посмертными химическими модификациями дДНК. Эти искажения можно нивелировать путем анализа только однонуклеотидных полиморфизмов генома, вызванных трансверсиями.

**КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА** древняя ДНК, ADMIXTURE, урацил-ДНК-гликозилаза, UDG.

**СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ** UDG – урацил-ДНК-гликозилаза; дДНК – древняя ДНК; ОНП – однонуклеотидный полиморфизм; PCA – метод главных компонент.

## ВВЕДЕНИЕ

Российская Федерация является богатым источником археологического материала для проведения палеогенетических исследований. Материалы из нашей страны так или иначе использовались практически во всех громких открытиях, сделанных на основе дДНК, таких, как открытие Денисовского человека [1], популяции Ancient North Eurasians (ANE) [2], восточных охотников-собирателей (EHG) [3], популяции ямников [4]. Тем не менее сами палеогенетические исследования в России имеют весьма скромные достижения, по большей части ограничиваясь донорством костного материала [5]. Однако в последнее время создано несколько междисциплинарных коллективов, которые ставят своей целью комплексные исследования: от экспедиционных находок через синтез археологических и палеогенетических данных к генерации новых исторических гипотез. В данной

работе суммированы методические подходы, опробованные в ФИЦ Биотехнологии, и выработаны наиболее эффективные алгоритмы создания геномных библиотек, которые могут быть использованы другими лабораториями, работающими в данной области.

Анализ последовательности древней ДНК (дДНК) стал мощным инструментом для изучения древних популяций человека [6–8]. Однако существует ряд сложностей, обусловленных посмертной деградацией генетического материала под действием эндогенных нуклеаз, а также случайного гидролиза и окисления. Наиболее частым повреждением дДНК является дезаминирование остатков цитозина, т.е. отщепление аминогруппы от азотистого основания с образованием остатков урацила, которые, в свою очередь, превращаются в остатки тимина в процессе проведения полимеразной цепной реакции при приготовлении библиотек фрагментов ДНК [9]. Как ре-



зультат, при секвенировании библиотек фрагментов ДНК исследователь наблюдает замены C > T на 5'-конце молекулы ДНК или G > A на 3'-конце в зависимости от особенностей выбранного протокола пробоподготовки. Наличие таких замен (ложных нуклеотидов) снижает точность картирования прочтений на референсную последовательность, при которой прочтения, содержащие неререференсные аллели, будут картированы с меньшей вероятностью, чем содержащие эталонные аллели [6].

Общее количество ложных нуклеотидов, присутствующих в реконструированном геноме, зависит от количества полученных данных секвенирования, количества накопленных посмертных повреждений ДНК и от того, проводилась ли предварительная обработка ДНК смесью ферментов урацил-ДНК-гликозилазы (UDG) и эндонуклеазы VIII (смесь позволяет вырезать урацил с образованием однонуклеотидного разрыва) при приготовлении геномных библиотек [10]. Реконструированные древние геномы обычно содержат последовательности как с полными, так и с искусственными вариантами, что может влиять на частотный анализ аллелей и определение структуры популяции [6].

Анализ базы данных древних геномов (Allen Ancient DNA Resource <https://reich.hms.harvard.edu/allen-ancient-dna-resource-aadr-downloadable-genotypes-present-day-and-ancient-dna-data>) показывает, что большинство секвенированных геномов получены путем создания библиотек методом дробовика (shotgun, SG) с обработкой или без обработки UDG, либо отбором целевых районов с помощью систем обогащения. Среди последних чаще всего используют наборы производства компаний Twist, Agilent и Arbor. Системы обогащения были недавно детально охарактеризованы группой Дэвида Райха [11], что позволило выделить наборы Twist как наиболее эффективные. Однако в этой работе затронуты такие важные вопросы, как влияние методов пробоподготовки на результаты вторичного статистического анализа. К ним мы относим F-статистики, анализ предковых компонент ADMIXTURE и многомерные проекции PCA (Principal Component Analysis).

Важную роль в эволюционной генетике человека играет изучение структуры популяций, что позволяет охарактеризовать генетическую изменчивость [12], т.е. наличие различных уровней генетического родства между некоторыми подгруппами в данной популяции. Это необходимо, когда, например, требуется сделать вывод о времени расхождения между популяциями, происходящими из разных географических мест [13, 14]. Для математического решения этой задачи делается формальное предположение

о существовании так называемых «предковых популяций», из которых произошли анализируемые группы. Эти «предковые популяции» являются математической абстракцией, они характеризуются определенными частотами аллелей, и по их вкладу в анализируемые реальные образцы можно создавать компактные визуальные сводки, иллюстрирующие структуру популяции в выборке.

Алгоритмы генетической кластеризации, реализованные в таких программах, как STRUCTURE [15] и ADMIXTURE [16], широко используются для характеристики отдельных образцов и популяций на основе генетических данных. Программа ADMIXTURE эффективно оценивает индивидуальное происхождение, вычисляя оценки максимального правдоподобия в параметрической модели. Данная модель утверждает, что генотип  $n_{ij}$  для индивида  $i$  в однонуклеотидном полиморфизме (ОНП)  $j$  представляет собой количество наблюдаемых аллелей типа «1». Учитывая  $K$  предковых популяций, вероятность успеха в

$$p_{ij} = \sum_{k=1}^K q_{ik} f_{kj}$$

биномиальном распределении  $n_{ij} \sim \text{Bin}(2, p_{ij})$  зависит от доли  $q_{ik}$  происхождения  $i$ , относящейся к популяции  $k$ , и от частоты  $f_{kj}$  аллеля 1 в популяции  $k$ . ADMIXTURE максимизирует логарифмическую вероятность модели с использованием блочной релаксации:

$$L(Q, F) = \sum_{ij} \{n_{ij} \times \ln p_{ij} + (2 - n_{ij}) \times \ln(1 - p_{ij})\},$$

где  $q_{ik}$  и  $f_{kj}$  составляют матрицы  $Q$  и  $F$  соответственно [17].

Используемая в данной работе F4-статистика определяет вероятность независимости двух ветвей графа, где в каждой ветви находится по две популяции. В пространстве частот статистика выглядит как математическое ожидание произведения разности частот двух популяций в каждой из двух ветвей графа по всем позициям ОНП:

$$F4(A, B; C, D) = \{(a-b)(c-d)\},$$

где  $A, B, C, D$  – популяции,  $a, b, c, d$  – соответствующие частоты.

Статистика считается значимой, если значение  $z$  score распределения элементов выборки F4-статистики будет по модулю больше 3. Часто в палеогенетике невозможно получить частоты популяции в силу недоступности значимого количества образцов. В этом случае аналогом F4-статистики выступает АВВА-ВАВА-тест по геноти-

пам единичных геномов. Для оценки вероятности отличия АВВА-ВАВА-теста от нуля используется также то, что величина *z score* должна быть по модулю больше 3, а в качестве элементов выборки берутся значения АВВА-ВАВА-теста для равномерных окон генома [18]. Если одна из тестируемых популяций в F4 (или в случае генотипов в АВВА-ВАВА-тесте) в историческом, морфологическом или генетическом аспекте очень удалена от исследуемых групп (*outgroup*), то тогда интуитивное объяснение ненулевой F4-статистики сводится к тому, насколько велик вклад популяции, находящейся в одной ветви с *outgroup*, в одну из двух популяций, находящихся в другой ветви графа.

Если абстрагироваться до представления генома образца в виде вектора, координатами которого являются значения генотипов, состоящие из трех цифр 1, 0, -1, как аналога гомозигот AA и BB и гетерозиготы, то генотипированные образцы можно представить как набор многомерных (по суммарному количеству определяемых ОНП) векторов, которые можно проецировать на пространства меньшей размерности. Один из методов проецирования – PCA, позволяет визуализировать взаимное расположение образцов. В частности, при проведении этногеографических исследований попарные расстояния между образцами современных геномов в PCA-анализе коррелируют с попарными географическими расстояниями между точками проживания доноров этого генетического материала. Нанесение древних геномов на PCA-карты, построенные в векторном пространстве современных геномов, является удобным инструментом оценки генетической связи между древними и современными людьми.

В данной работе мы сравниваем результаты популяционного ADMIXTURE и PCA-анализа, а также значения F4-статистики для образца эпохи бронзы из кавказских погребений могильника Клады (станция Царская) [19], полученные с использованием трех подходов. В качестве метода создания геномных библиотек были использованы: 1) стратегия *shotgun*-секвенирования; 2) отбор целевых районов генома набором компании Arbor; 3) отбор целевых районов генома набором компании Arbor с предварительной обработкой ДНК UDG; 4) отбор целевых районов генома набором компании Agilent с предварительной обработкой ДНК UDG.

## ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

### Выделение ДНК и приготовление геномных библиотек

Все работы с дДНК проводили в «чистой комнате», расположенной на базе ФИЦ Биотехнологии

Российской академии наук (Институт биоинженерии им. Скрябина). Использовали ДНК, полученную из антропологического образца, представляющего собой останки (фрагменты челюстей с зубами) взрослого индивида из мегалитических гробниц майкопской культуры эпохи бронзы (Северо-Западный Кавказ). ДНК выделяли из 100 мг костной пудры с использованием буфера Дабни (5 М гидрохлорид гуанидина, 40% (об./об.) 2-пропанола, 0.12 М ацетата натрия и 0.05% (об./об.) Tween 20) и магнитных шариков, покрытых силикагелем [20]. Полученную ДНК использовали для приготовления библиотек одноцепочечных фрагментов ДНК высокой сложности с помощью набора реагентов ACCEL-NGS 1S Plus DNA Library Kit (Swift Biosciences, США) в соответствии с оригинальным протоколом с некоторыми модификациями: в случае этапов ПЦП с индексацией использовали полимеразу, которая была разработана так, чтобы остатки урацила (KAPA HiFi HS Uracil+RM, США) не останавливали синтез цепи.

Из одного и того же экстракта были приготовлены три разных типа библиотек фрагментов ДНК для последующего секвенирования нового поколения. Первый (I) тип библиотеки (KLD\_SG) получен с применением стратегии *shotgun*-секвенирования всего генома (подход, основанный на методе дробовика). Для второго (II) типа библиотеки (KLD\_CAP) использовали тот же протокол подготовки с последующим обогащением по интересующим областям генома (стратегия целевого обогащения). Третий (III) тип библиотеки (KLD\_UDG) отличается от типа II тем, что ДНК предварительно обрабатывали смесью урацил-ДНК-гликозилазы (UDG) и эндонуклеазы VIII, которая удаляет остатки урацила из цепей ДНК и превращает полученные абазические сайты в однонуклеотидные разрывы [21]. Обработка смесью UDG и эндонуклеазы VIII успешно удаляет остатки урацила из молекул древней ДНК, сохраняя их значительную часть на концах фрагментов, так называемые «усы древности», свидетельствующие о том, что ДНК действительно древняя. Данные по четвертому типу (IV) библиотеки, синтезированной из тех же костных останков по принципу отбора целевых районов набором компании Agilent с предварительной обработкой исходной дДНК UDG, получены от профессора Пинхасси (Университет Вены, Австрия) и обозначаются индексом I6268 из ранее опубликованной работе [22].

### Целевое обогащение

Для захвата 1.6 млн ОНП из образцов древней ДНК человека мы использовали набор MyBaits Expert Human Affinities Prime Plus Kit [MyBaits Manual v.1.0 – Population Genomics Hybridization

Capture for Target NGS, 2021. [https://arborbiosci.com/wp-content/uploads/2021/03/myBaits\\_Expert\\_HumanAffinities\\_v1.0\\_Manual.pdf](https://arborbiosci.com/wp-content/uploads/2021/03/myBaits_Expert_HumanAffinities_v1.0_Manual.pdf)]. Реагенты для обогащения по отобранным регионам генома состоят из биотинилированных одноцепочечных ДНК-зондов, которые представляют собой смесь трех наборов зондов: панель prime 1240K [23], Y Chr 46K (сайты Y-хромосомы, идентифицированные Международным обществом генетической генеалогии ISOGG) и MitoTrio (набор зондов на три различных митохондриальных генома, включая пересмотренную эталонную последовательность Кембриджа (rCRS), реконструированную эталонную последовательность Sapiens (RSRS) и последовательность неандертальца Vindija [24]). Протокол для набора MyBaits Expert Human Affinities Prime Plus предусматривает два последовательных раунда обогащения.

### Секвенирование

Все три геномные библиотеки (как shotgun, так и библиотеки, обогащенные по интересующим регионам генома) были секвенированы на платформе Illumina HiSeq 4000 (1 × 75 + 8 + 8 циклы) с одинокими ДНК-прочтениями.

### Биоинформатическая обработка

Для фильтрации контаминирующих ДНК-прочтений из данных секвенирования мы применяли программное обеспечение BBDuk [25], входящее в пакет BBMap ([www.sourceforge.net/projects/bbmap/](http://www.sourceforge.net/projects/bbmap/)), с использованием баз данных бактерий, грибов, растений, вирусов и «других» (<http://jgi.doe.gov/data-and-tools/bbtools/bb-tools-user-guide/>). Выходные данные инструмента BBDuk были обработаны с помощью конвейера PALEOMIX (версия 1.2.14) [26], в котором были обрезаны адаптеры секвенирования с помощью программы cutadapt v3.4 [27], а также выполнено сопоставление с эталонной последовательностью генома человека (hg19/GRCh37) с использованием BWA (версия 0.7.17) [28]. Выровненные прочтения отфильтровали для обеспечения минимального качества отображения 20 с помощью samtools view v1.9 [29]. Индексацию, сортировку и удаление дубликатов (rmdup) выполняли с помощью samtools v1.9 [29].

PileupCaller (<https://github.com/stschiff/sequenceTools>) использовали для вызова генотипов из выровненных прочтений с помощью опции «--random-Haploid», который вызывает гаплоидные генотипы путем случайного выбора одной базы высокого качества (показатель качества базы phred  $\geq$  30) из панели ОНП 1240K (<https://reich.hms.harvard.edu/>).

Паттерны посмертных повреждений ДНК анализировали с помощью инструмента MapDamage2 [30], который предлагает несколько инструментов

для визуализации и моделирования закономерностей посмертных повреждений, наблюдаемых в древних образцах. MapDamage2.0 также позволяет пересчитывать базовые показатели качества, чтобы смягчить влияние посмертного повреждения на последующие анализы.

Мы использовали программу ADMIXTURE v1.3.0 [16] для определения генетической кластеризации образца эпохи бронзы из погребений могильника Клады (Кавказ) с помощью каждого из трех способов приготовления геномных библиотек, а также остальных образцов из панели Allen Ancient DNA Resource (AADR). ОНП были обрезаны для сайтов с неравновесным сцеплением с использованием PLINK v1.9 [31] с размером скользящего окна в 50 вариантов, размером шага – 5 вариантов и порогом  $r^2$  в 0.2 (–indep-pairwise 50 5 0.2). Мы сделали 10 повторов со случайными начальными значениями для числа кластеров (K) от 4 до 13 и выбрали прогон с минимальной ошибкой перекрестной проверки для построения графика примесей популяций.

## РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

### Характеристика геномных библиотек

Вклад посмертных модификаций ДНК в искажения результатов статистического анализа мы проверяли с использованием трех геномных библиотек, приготовленных из археологического образца костей Царской: (I) shotgun-библиотека KLD\_SG; (II) обогащенная целевыми районами библиотека KLD\_CAP и (III) обогащенная целевыми районами и обработанная смесью урацил-ДНК-гликозилазы (UDG) и эндонуклеазы VIII, которые удаляют остатки урацила из цепей ДНК и превращают полученные абазические сайты в однонуклеотидные пробелы, библиотека KLD\_UDG. Таким образом, мы ожидали, что в библиотеке I и II могут быть найдены замены С-Т, которые потенциально искажают результаты генетического анализа, а в библиотеке III они искусственно удалены, но эта библиотека ожидаемо несет более короткие фрагменты, что связано с внесением одноцепочечных разрывов в исходные молекулы ДНК за счет обработки UDG.

Общее количество ДНК-прочтений, сгенерированных для этих трех ДНК-библиотек, варьировало от 58364547 до 1473546011 на ДНК-библиотеку, а количество эндогенной ДНК (т.е. прочтения, которые картировались на геном человека hg19/GRCh37) составило от 3.18 до 7.53% (табл. 1).

Следует отметить, что оценка количества ОНП, пригодных для анализа, проведено только по списку 1240K панели, используемой для работы с дДНК

Таблица 1. Статистика секвенирования

Библиотека	Количество входных прочтений	Количество прочтений после фильтрации	Средняя длина прочтений для анализа	Откартировалось прочтений	После удаления PCR-дубликатов	Покрытие	Эндогенная ДНК, %	ОНП (для анализа)
KLD_SG (I)	1473546011	1469259287	78.02	65025843	46813163	1.17	3.18	321229
KLD_CAP (II)	100874292	100870259	79.06	85406013	3865852	0.09	3.83	615991
KLD_UDG (III)	58364547	58329170	63.95	52565836	4392304	0.08	7.53	690148
I6268	*	*	*	*	1091304	0.81	4.02	372480

Примечание. В статье Wang et al. [22] не приведены метрики, обозначенные \*.

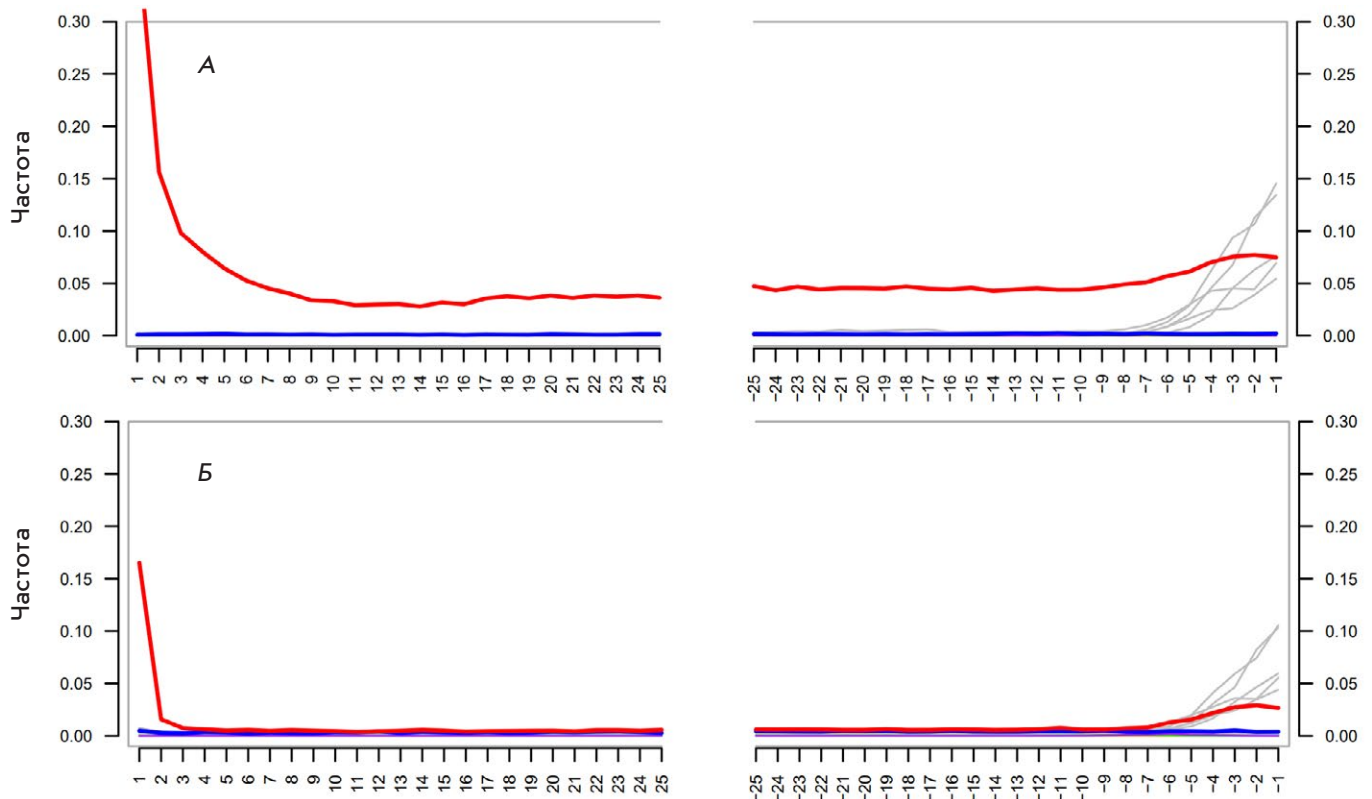


Рис. 1. Паттерны посмертных повреждений ДНК-библиотек, сгенерированные MapDamage2.0. А – в библиотеке, не обработанной UDG (KLD\_SG), ложные переходы из С в Т показаны красной линией (синей линией – комплементарные G в А) на 5'- (положительные координаты) и 3'-концах (отрицательные координаты) последних 25 нуклеотидов. Наличие замен С в Т на втором прочтении (правая половина графика) комплементарной цепи обусловлено особенностями приготовления одноцепочечной библиотеки. Падение уровня дезаминирования в нуклеотидах -5, -1 связано с А-тэйлингом и также отражает особенности экспериментального протокола. Б – характер повреждений библиотеки (KLD\_UDG), частично обработанной UDG, полученной из того же экстракта

[32]. В библиотеке I, несмотря на почти десятикратное превышение количества прочтений над библиотеками II и III, определено приблизительно в 2 раза меньше ОНП.

Подлинность древней ДНК оценивали с помощью программы MapDamage2.0, которая использует пат-

терны посмертных повреждений (рис. 1). Учитывая, что библиотеки, обработанные UDG, по-прежнему сохраняют определенное количество замен С > Т на последних 2 п.н. картированных фрагментов, следует удалить по 2 п.н. с обоих концов прочтений с помощью модуля trimBam bamUtil [33].

### ADMIXTURE-анализ

Результаты ADMIXTURE-анализа для  $K = 7$  трех приготовленных в данной работе библиотек с ранее секвенированным тем же образцом новосвободненской культуры I6268 [22], к которой и принадлежат захоронения могильника Клады станицы Царской, выявили дополнительные компоненты в образцах, не обработанных UDG (KLD\_CAP и KLD\_SG), в виде «зеленой» и «фиолетовой» составляющей (рис. 2А). В силу идентичности костного образца выдвинута гипотеза о ложном влиянии посмертных модификаций дДНК на результаты ADMIXTURE при приготовлении библиотек без использования UDG.

Нами предложен биоинформатический подход к уменьшению влияния посмертных модификаций, который заключается в маскировании всех ОНП, относящихся к транзициям (С → Т и комплементарные G → А). После удаления всех транзиций результаты ADMIXTURE-анализа библиотек, не обработанных UDG, соотносятся с результатами анализа библиотек, обработанных UDG (рис. 2Б).

Обращает на себя внимание тот факт, что на фоне исчезновения ложных «зеленого» и «фиолетового» компонентов при переходе к анализу трансверсий изменяется пропорциональный состав предковых популяций: увеличивается «синий» компонент, но уменьшаются «красный» и «розовый». Объяснение данного наблюдения заключается в существенном уменьшении количества ОНП, подаваемых на вход в программу ADMIXTURE. Действительно, количество трансверсий приблизительно в 5 раз меньше,

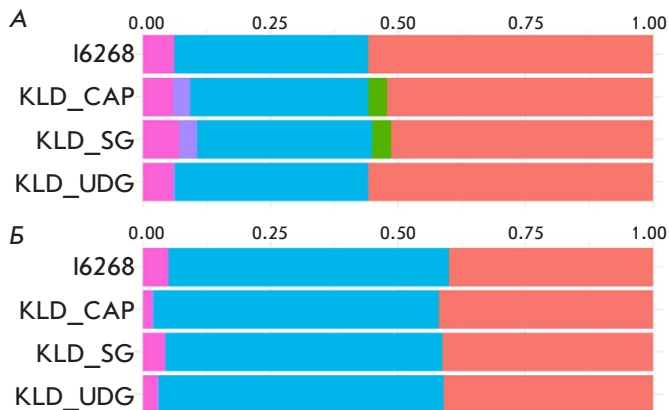


Рис. 2. ADMIXTURE-анализ ( $K = 7$ ) генома, секвенированного с использованием различных методических подходов. А – стандартный анализ примесей, основанный на панели Дэвида Райха SNP 1240K. Можно наблюдать дополнительные базовые «зеленые» и «фиолетовые» популяции в виде дополнительных составляющих, вызванных посмертными изменениями. Б – анализ примесей, выполненный только на трансверсиях

чем общее количество ОНП. Детальные численные параметры ОНП для трех библиотек KLD\_CAP, KLD\_SG и I6268 приведены на рис. 3.

Таким образом, использование трансверсий в ADMIXTURE-анализе убирает ложноположительные сигналы в виде предковых популяций, возникающих только вследствие постмортальных модификаций ДНК, а не реальных исторических популяционных перипетий. Однако необходимо с осторожностью использовать такого рода генетический редукционизм, поскольку падение общего количества входных данных за счет отсека транзиций может повлиять на достоверность результатов анализа. Наш эмпирический опыт показывает, что порог достоверности наступает при использовании менее 30 000 ОНП.

Проанализировав все образцы из панели Allen Ancient DNA Resource (AADR) V44.3 (январь 2021), мы выявили значительную отрицательную корреляцию (-0.5844) между дополнительным компонентом ADMIXTURE и наличием обработки UDG в 3284 европейских образцах из базы данных Allen Ancient DNA Resource (AADR) (рис. 4). Следует также отметить, что использование процедуры обогащения целевыми районами приводит к экономии ресурсов при секвенировании. Действительно, генерация 58 млн прочтений в библиотеке KLD\_UDG приводит к выводам о структуре предковых популяций, сравнимым с выводами, сделанными с использованием библиотеки KLD\_SG (около 1500 млн прочтений).

### F4-статистика

Для исследования роли пробоподготовки в интерпретации результатов популяционного анализа нами была рассчитана F4-статистика в конфигурации F4(Wang\_3, Y;X, Yoruba). Популяция Wang\_3 состоит из трех образцов (I6267, I6266 и I6272) новосвободненской культуры, к которой и принадлежит также образец I6268. Популяция X взята из списка, предложенного археологами (приведен на рис. 5 слева от оси ординат), в контексте их исторических гипотез. Популяцию Yoruba использовали в качестве outgroup. В качестве популяций Y выступали четыре набора ОНП, определенных в KLD\_SG, KLD\_CAP, KLD\_UDG и I6268. Как сказано выше, интуитивный смысл ненулевой достоверной статистики укажет на ту популяцию из списка X, которая вносит больший вклад в популяцию Wang\_3 в случае положительной статистики и больший вклад в экспериментальный образец Y в случае отрицательной статистики. Интерпретация археологического и исторического смысла разницы между популяцией Wang\_3 и образцом, использованным для приготовления четырех тестовых библиотек,

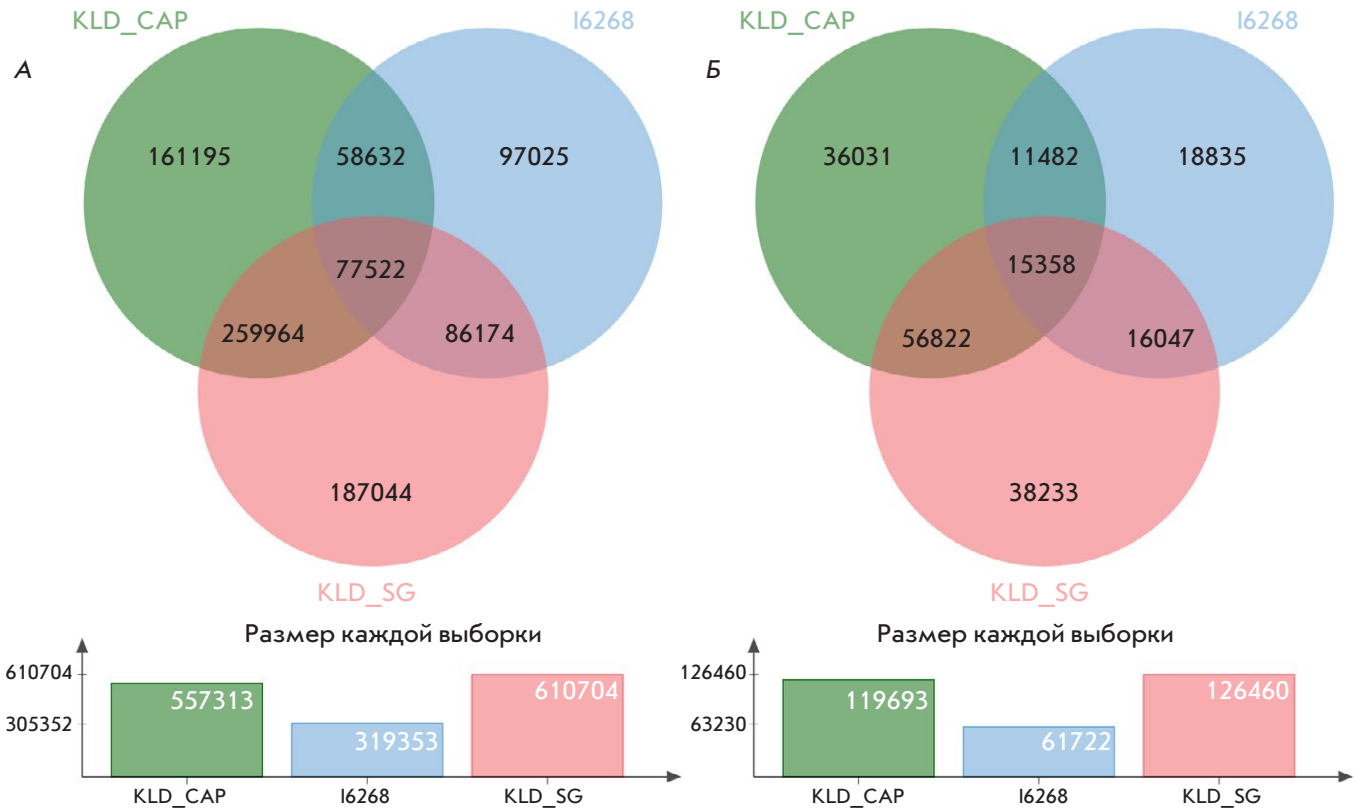


Рис. 3. Диаграммы Венна для ОНП трех библиотек KLD\_CAP, KLD\_SG и I6268. Общее количество ОНП для каждой библиотеки приведено под диаграммами. А – трансверсии и транзиции; Б – трансверсии

выходит за рамки данной статьи. Расчеты приведены лишь для примера, чтобы указать на возможности различной интерпретации достоверной ненулевой F4-статистики в зависимости от метода пробоподготовки.

На рис. 5А приведены данные F4-статистики для всех ОНП. При использовании в качестве Y KLD\_SG все популяции справа отсортированы по убыванию значения статистики. При использовании в качестве Y трех других библиотек порядок сортировки существенно меняется. Более того, достоверные статистики с модулем z score больше 3 изменяются: 12, 9, 8 и 2 для KLD\_SG, KLD\_CAP, KLD\_UDG и I6268 популяций соответственно. Всего лишь одна популяция из списка X – Russia\_HG\_Tuumen – является достоверной для всех четырех библиотек списка Y. Однако при переходе к анализу трансверсий порядок сортировки всех четырех библиотек меняется по сравнению с исходной сортировкой F4 (Wang\_3; KLD\_SG; X; Yoruba). Количество достоверных популяций из списка X составляет 7, 9, 4 и 1 для KLD\_SG, KLD\_CAP, KLD\_UDG и I6268 соответственно. Но при этом нет ни одной популяции X, которая бы достоверно определялась через F4-статистику во всех четырех библиотеках при ис-

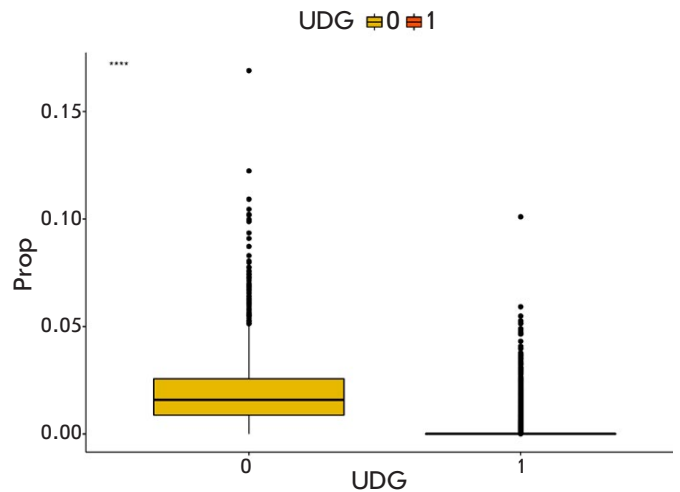


Рис. 4. Распределение относительного содержания дополнительных составляющих в ADMIXTURE-анализе в образцах из панели Allen Ancient DNA Resource V44.3, обработанных UDG (1) – 2376 образцов и без обработки (0) – 908 образцов. Prop – пропорция дополнительных примесей

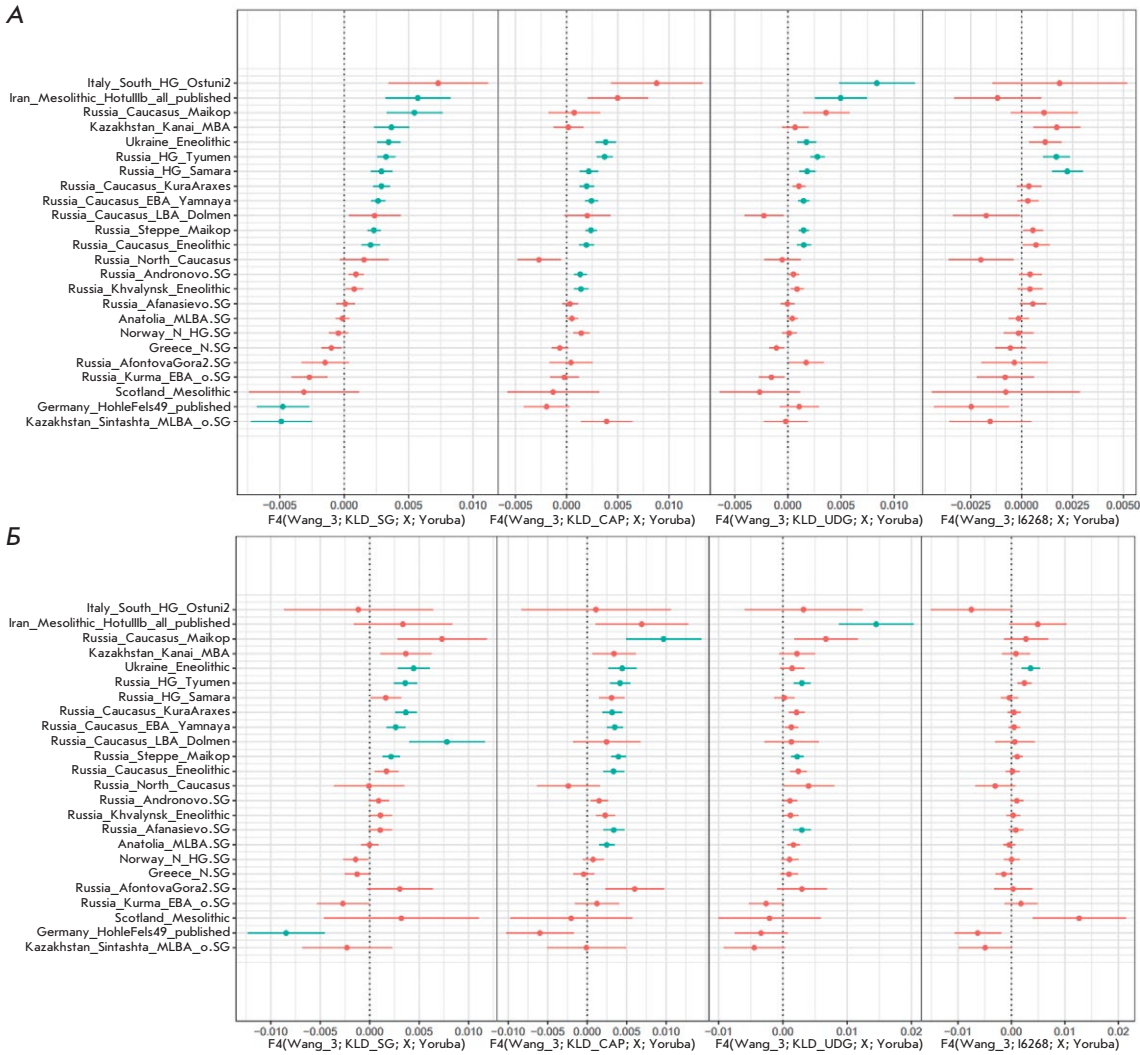


Рис. 5. F4-статистика в конфигурации F(Wang\_3, Y; X, Yoruba). Синим обозначены достоверные метрики при  $|z| > 3$ . А – F4, рассчитанная на всех ОНП из панели 1240К. Б – F4 только на трансверсиях

пользовании трансверсий. Как видно из рис. 5Б, даже Russia\_HG\_Tyumen, будучи общей достоверной популяцией X при анализе всех ОНП, является достоверной лишь в трех библиотеках – KLD\_SG, KLD\_CAP, KLD\_UDG, но не в I6268.

Вывод из этой части работы заключается в том, что F4-статистика по аналогии с ADMIXTURE чрезвычайно чувствительна к количеству поданных на вход ОНП, также критически важно использовать в F4-статистике наборы ОНП, полученные из единообразно приготовленных геномных библиотек. В ином случае есть вероятность неправильной интерпретации достоверных и положительных по модулю значений F4.

### РСА-генетические карты

Оценено также влияние пробоподготовки на РСА-проекцию на плоскость PC1-PC2. В РСА, исходно построенном для векторов представителей различных современных популяций Евразии, использованы 253

древних образца [34]. С целью упрощения восприятия все древние образцы на рис. 6 были окрашены в светло-серый цвет за исключением четырех исследуемых библиотек. Образцы I6268 и KLD\_UDG имеют минимальную разницу в координатах PC1-PC2, в то время как KLD\_SG несколько отдалается от них в направлении «северо-восток». Чтобы получить детальное представление о том, как группируются четыре тестовые библиотеки при анализе всех ОНП и только трансверсий, проведен РСА-анализ с использованием только 17 образцов исторического контекста новосвободненской культуры (рис. 7). Следует пояснить, что новый РСА с 17 образцами предусматривает генерацию новых векторов PC1-PC2, отличных от полученных на рис. 6. Видно, что ни в случае использования всех ОНП (рис. 7А), ни в случае использования только трансверсий (рис. 7Б) не удастся свести хотя бы две любые библиотеки в одну точку на плоскости PC1-PC2. Надо признать, что Fst для группы KLD\_SG, KLD\_CAP,

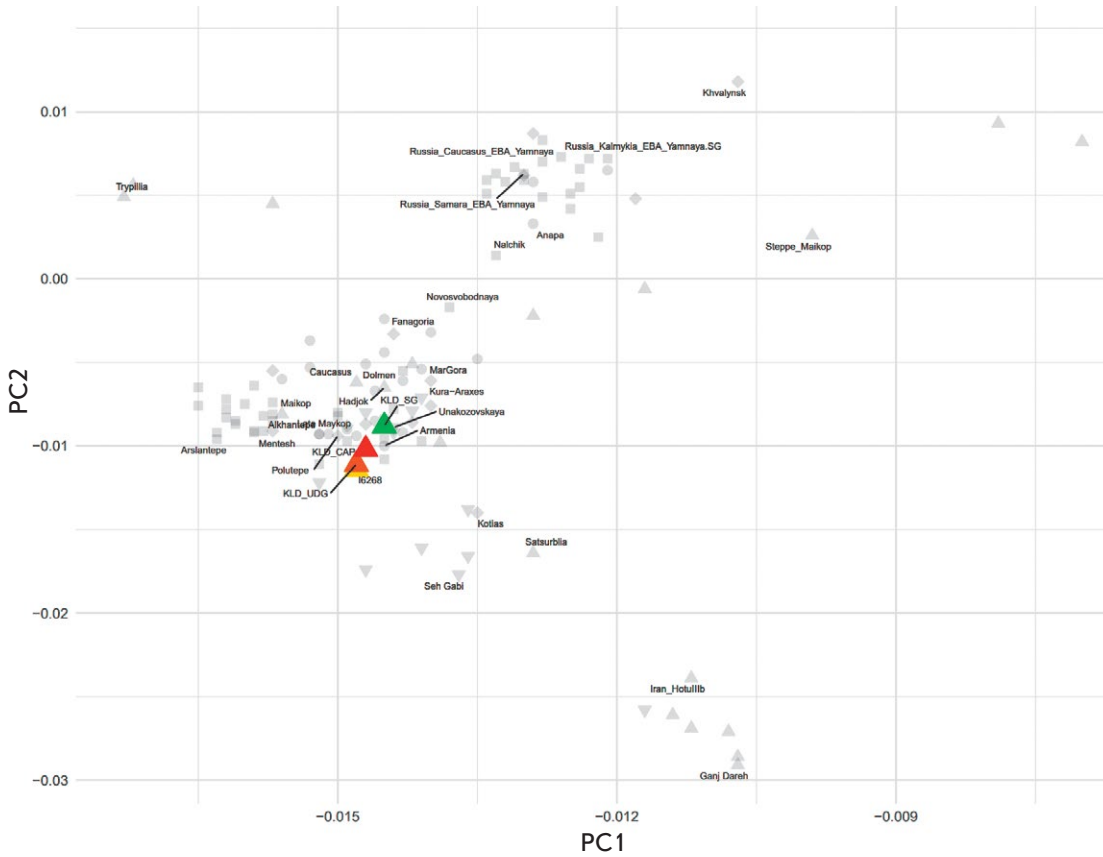


Рис. 6. Метод главных компонент (PCA) с помощью проецирования «древних» образцов на вектора современных образцов, которые использовались только для построения PCA и не представлены на данном рисунке. Сначала рассчитываются главные компоненты в векторах современных образцов, после чего на них проецируются вектора «древних» образцов. На рисунке представлены только «древние» образцы в координатах PC1 и PC2 (первые две главные компоненты)

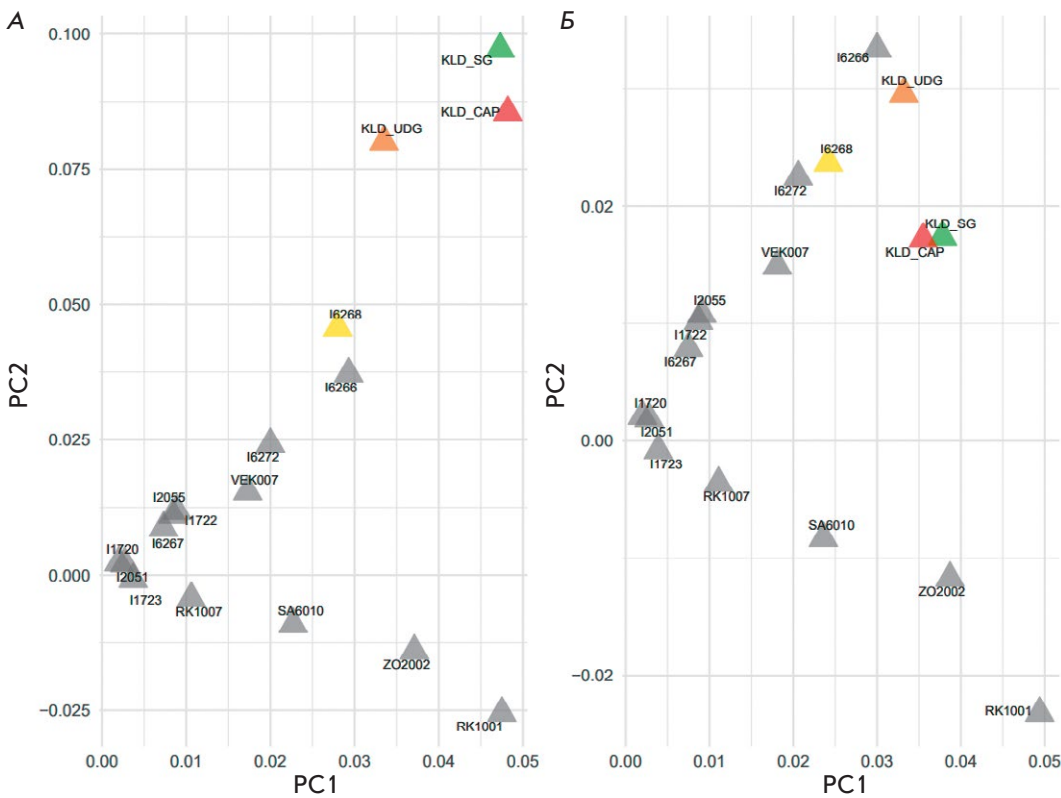


Рис. 7. Метод главных компонент (PCA) для KLD\_SG, KLD\_CAP, KLD\_UDG, I6268 (выделены цветом) и других кавказских образцов (серые), рассчитанные на всех ОНП из панели 1240К (А) и только на трансверсиях (Б)



KLD\_UDG и I6268 составляет 11% при использовании всех ОНП и 19% в случае только трансверсий, говоря о повышении конкордантности образцов при использовании трансверсий, что нашло отражение в несколько большей кучности четырех тестовых библиотек на РСА-картах.

## ВЫВОДЫ

В работе показано, что современные статистические методы, особенно F4-статистика, весьма чувствительны к используемому методу пробоподготовки геномных библиотек дДНК. Оптимальным подходом к созданию геномных библиотек мы посчитали отбор целевых районов с предварительной обработкой

UDG исходной дДНК. Даже при таком подходе использование наборов для обогащения целевыми районами от различных производителей может генерировать ложноположительные результаты при статистическом анализе. Для уменьшения влияния методических подходов рекомендуется увеличивать экспедиционные выборки костных останков представителей одной культуры/популяции, а также унифицировать по возможности пробоподготовку в рамках одного исследования. ●

*Работа выполнена при финансовой поддержке проекта Минобрнауки России, системный номер № 075-10-2020-116 (номер гранта 13.1902.21.0023).*

## СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Krause J., Fu Q., Good J.M., Viola B., Shunkov M.V., Derevianko A.P., Pääbo S. // Nature. 2010. V. 464. № 7290. P. 894–897.
- Long J. // Hum. Biol. 2017. V. 89. № 4. P. 303–304.
- Haak W., Lazaridis I., Patterson N., Rohland N., Mallick S., Llamas B., Brandt G., Nordenfelt S., Harney E., Stewardson K., et al. // Nature. 2015. V. 522. № 7555. P. 207–211.
- Morgunova N. // Radiocarbon. 2013. V. 55. № 3–4. P. 1286–1296.
- Grigorenko A.P., Borinskaya S.A., Yankovsky N.K., Rogaev E.I. // Acta Naturae. 2009. V. 1. № 3. P. 58–69.
- Orlando L., Allaby R., Skoglund P., Der Sarkissian C., Stockhammer P.W., Ávila-Arcos M.C., Fu Q., Krause J., Willerslev E., Stone A.C., et al. // Nat. Rev. Methods Primers. 2021. V. 1. № 1. P. 14.
- Sokolov A.S., Nedoluzhko A.V., Boulygina E.S., Tsygankova S.V., Sharko F.S., Gruzdeva N.M., Shishlov A.V., Kolpakova A.V., Rezepkin A.D., Skryabin K.G., et al. // J. Archaeol. Sci. 2016. V. 73. P. 138–144.
- Erlikh V.R., Gak E.I., Kleshchenko A.A., Sharko F.S., Boulygina E.S., Tsygankova S.V., Slobodova N.V., Rastorguev S.M., Nedoluzhko A., Godizov G.L., et al. // J. Archaeol. Sci. Repts. 2021. V. 39. P. 103198.
- Axelsson E., Willerslev E., Gilbert M.T.P., Nielsen R. // Mol. Biol. Evol. 2008. V. 25. № 10. P. 2181–2187.
- Llamas B., Valverde G., Fehren-Schmitz L., Weyrich L.S., Cooper A., Haak W. // STAR: Sci. Technol. Archaeol. Res. 2017. V. 3. № 1. P. 1–14.
- Rohland N., Mallick S., Mah M., Maier R., Patterson N., Reich D. // Genome Res. 2022. V. 32. № 11–12. P. 2068–2078.
- Hellenthal G., Busby G.B.J., Band G., Wilson J.F., Capelli C., Falush D., Myers S. // Science. 2014. V. 343. № 6172. P. 747–751.
- Gopalan S., Smith S.P., Korunes K., Hamid I., Ramachandran S., Goldberg A. // Philos. Trans. R. Soc. Lond. B Biol. Sci. 2022. V. 377. № 1852. P. 20200410.
- Sjödin P., McKenna J., Jakobsson M. // Genetics. 2021. V. 217. № 4. iyab008.
- Hubisz M.J., Falush D., Stephens M., Pritchard J.K. // Mol. Ecol. Resour. 2009. V. 9. № 5. P. 1322–1332.
- Alexander D.H., Novembre J., Lange K. // Genome Res. 2009. V. 19. № 9. P. 1655–1664.
- Zhou H., Alexander D., Lange K. // Stat. Comput. 2011. V. 21. № 2. P. 261–273.
- Sinharay S. International encyclopedia of education. Amsterdam: Elsevier, 2010. P. 229–231.
- Шишлина Н.И., Трифонов В.А., Хоммель П. // Краткие сообщения Института археологии (КСИА). 2019. № 257. С. 35–47.
- Rohland N., Glocke I., Aximu-Petri A., Meyer M. // Nat. Protoc. 2018. V. 13. № 11. P. 2447–2461.
- Gansauge M.-T., Meyer M. // Nat. Protoc. 2013. V. 8. № 4. P. 737–748.
- Wang C.-C., Reinhold S., Kalmykov A., Wissgott A., Brandt G., Jeong C., Cheronet O., Ferry M., Harney E., Keating D., et al. // Nat. Commun. 2019. V. 10. № 1. P. 590.
- Mathieson I., Lazaridis I., Rohland N., Mallick S., Patterson N., Roodenberg S.A., Harney E., Stewardson K., Fernandes D., Novak M., et al. // Nature. 2015. V. 528. № 7583. P. 499–503.
- Green R.E., Malaspinas A.-S., Krause J., Briggs A.W., Johnson P.L.F., Uhler C., Meyer M., Good J.M., Maricic T., Stenzel U., et al. // Cell. 2008. V. 134. № 3. P. 416–426.
- Bushnell B., Rood J., Singer E. // PLoS One. 2017. V. 12. № 10. P. e0185056.
- Schubert M., Ermini L., Der Sarkissian C., Jónsson H., Ginolhac A., Schaefer R., Martin M.D., Fernández R., Kircher M., McCue M., et al. // Nat. Protoc. 2014. V. 9. № 5. P. 1056–1082.
- Martin M. // EMBnet J. 2011. V. 17. № 1. P. 10.
- Li H., Durbin R. // Bioinformatics. 2009. V. 25. № 14. P. 1754–1760.
- Li H., Handsaker B., Wysoker A., Fennell T., Ruan J., Homer N., Marth G., Abecasis G., Durbin R., 1000 Genome Project Data Processing Subgroup. // Bioinformatics. 2009. V. 25. № 16. P. 2078–2079.
- Jónsson H., Ginolhac A., Schubert M., Johnson P.L.F., Orlando L. // Bioinformatics. 2013. V. 29. № 13. P. 1682–1684.
- Purcell S., Neale B., Todd-Brown K., Thomas L., Ferreira M.A.R., Bender D., Maller J., Sklar P., de Bakker P.I.W., Daly M.J., et al. // Am. J. Hum. Genet. 2007. V. 81. № 3. P. 559–575.
- Allentoft M.E., Sikora M., Sjögren K.-G., Rasmussen S., Rasmussen M., Stenderup J., Damgaard P.B., Schroeder H., Ahlström T., Vinner L., et al. // Nature. 2015. V. 522. № 7555. P. 167–172.
- Jun G., Wing M.K., Abecasis G.R., Kang H.M. // Genome Res. 2015. V. 25. № 6. P. 918–925.
- Triska P., Chekanov N., Stepanov V., Khusnutdinova E.K., Kumar G.P.A., Akhmetova V., Babalyan K., Boulygina E., Kharkov V., Gubina M., et al. // BMC Genet. 2017. V. 18. № Suppl. 1. P. 110.

## ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

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

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

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

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

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

Рукопись и все необходимые файлы следует загрузить на сайт [www.actanaturae.ru](http://www.actanaturae.ru):

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

## ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

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

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

## РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

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

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

## ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

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

## РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

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

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

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

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

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

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

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

## ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

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

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

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

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

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

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

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

Шкурников М.Ю. Влияние нагрузок различной интенсивности на концентрацию белка теплового шока с молекулярной массой 70 кДа. 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.**