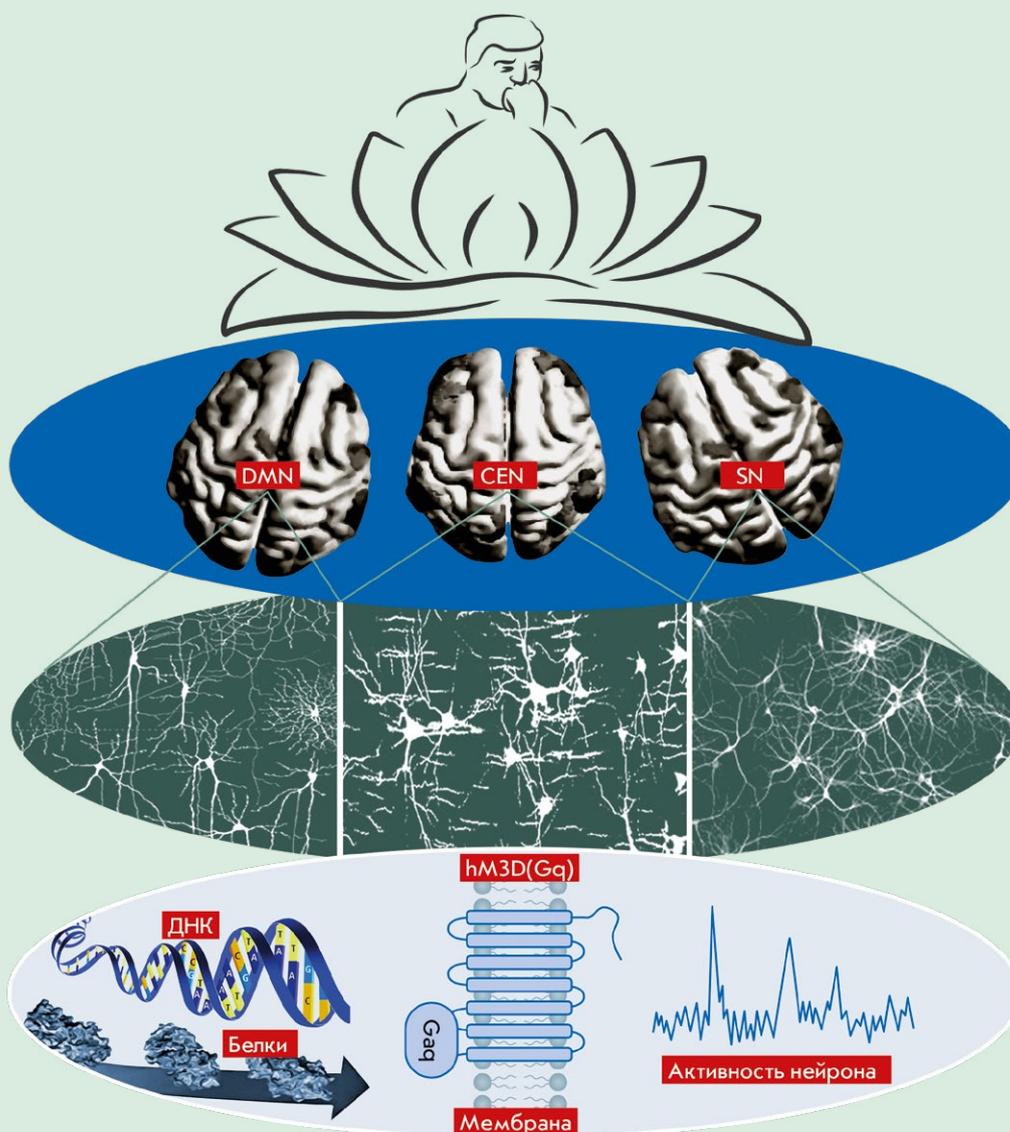


Acta Naturae

Коннективность головного мозга
в свете хемогенетического управления
активностью нейронов



ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ
МУКОВИСЦИДОЗА:
ДОСТИЖЕНИЯ И ПЕРСПЕКТИВЫ
СТР. 20

РЕДАКТИРОВАНИЕ ЖИЗНЕННО ВАЖНЫХ
ГЕНОВ С ПОМОЩЬЮ СИСТЕМЫ
CRISPR/Cas9 НА МОДЕЛИ ДРОЗОФИЛЫ
СТР. 70

Уникальный геном вируса и альтернативные стратегии его реализации

О. П. Жирнов

В геноме ряда РНК-содержащих вирусов обнаружены амбиполярные гены, локализованные в вирусном геноме по принципу «стекинга» (один над другим) и кодирующие белки в противоположных направлениях. Присутствие амбиполярных генов открывает новый путь формирования вирусного разнообразия, когда вирионы, имеющие идентичный геном, могут отличаться схемой реализации (стратегией) генома и иметь различные типы дочерних вирионов, отличающихся по полярности геномной РНК и составу белков, экспрессированных положительно- или негативно-полярными генами, так называемые амбиполярные вирионы. Пока такой путь реализации вирусного генома остается гипотетическим и скрытым от нас подобно «темной стороне луны» и заслуживает пристального изучения.

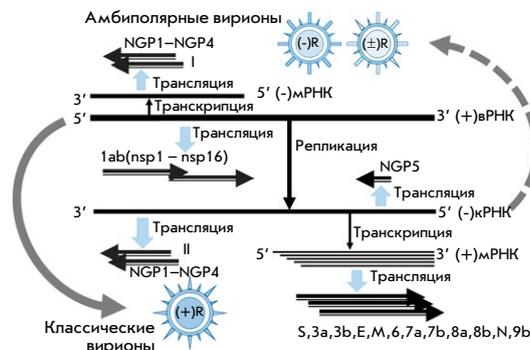
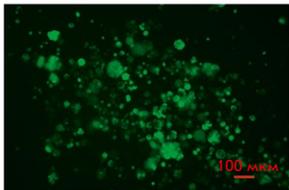


Схема кодирования генов в РНК-геноме коронавируса на модели SARS-CoV2



Контроль



Цетуксимаб

Влияние цетуксимаба на структуру сфероидов MCF7-EGFR

Подавление EGFR ингибирует сферообразование клеток культуры MCF7 со сверхэкспрессией EGFR

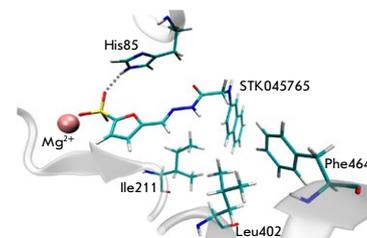
Д. Д. Новак, О. С. Троицкая, А. А. Нуштаева, М. В. Жильникова, В. А. Рихтер, М. И. Мещанинова, О. А. Коваль

Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) – онкогенная тирозинкиназа, которая участвует в возникновении и прогрессировании опухоли. Экспрессия трансгена *EGFR* в линии клеток MCF7 (MCF7-EGFR) аденокарциномы молочной железы человека стимулирует рост клеток в виде 3D-сфероидов. В работе изучено, влияет ли ингибирование EGFR на сборку сфероидов или приводит к разрушению уже сформированных сфероидов. Обнаружено, что подавление мРНК EGFR с помощью siРНК уменьшало образование сфер, тогда как обработка уже сформированных сфероидов не вызывала такого эффекта. Показано участие N-кадгерина в EGFR-зависимом образовании сфероидов MCF7-EGFR. Сфероиды MCF7-EGFR являются релевантной моделью для изучения агрессивных гормон-положительных опухолей молочной железы.

Поиск ингибиторов транскетолазы из *Mycobacterium tuberculosis* в ряду сульфозамещенных соединений

И. В. Гущина, Д. К. Нилов, Т. А. Щербаква, С. М. Балдин, В. К. Швядас

В результате компьютерного скрининга библиотеки сульфозамещенных соединений выявлены молекулы, способные связываться в активном центре транскетолазы из *Mycobacterium tuberculosis*. Осуществлена экспериментальная проверка ингибиторной активности наиболее перспективного соединения STK045765 в отношении высокоочищенного препарата рекомбинантного фермента. Показано, что молекула STK045765 конкурирует за участок связывания пиррофосфатной группы кофактора тиаминдифосфата и в микромолярной концентрации способна подавлять активность микобактериальной транскетолазы. Обнаруженный фурансульфонатный скаффолд может служить основой для создания противотуберкулезных препаратов.



Модель фермент-ингибиторного комплекса тБК и STK045765

Acta Naturae

ТОМ 15, № 2 (57), АПРЕЛЬ—ИЮНЬ 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

Корректурa: Р.С. Шаймарданова

Дизайн-проект: Х. Шнайдер

WEB-редактор: О.Б. Семина

Адрес редакции: 101000, Москва, ул. Мясницкая, 13, стр. 4

Телефон/факс: +7 (495) 727 38 60

E-mail: actanaturae@gmail.com

При перепечатке материалов ссылка на журнал
Acta Naturae обязательна. Любое воспроизведение опубликованных
материалов без письменного согласия редакции не допускается.
Редакция не несет ответственность за достоверность информации,
опубликованной в рекламных материалах.

© ACTA NATURAE, 2023

Номер подписан в печать 29 июня 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: 2.0 (WOS); 3.5 (Scopus)

СОДЕРЖАНИЕ

ОБЗОРЫ

Н. Н. Дыгало

Коннективность головного мозга
в свете хомогенетического управления
активностью нейронов 4

О. П. Жирнов

Уникальный геном вируса и альтернативные
стратегии его реализации. 14

М. А. Ломунова, П. М. Гершович

Генная терапия муковисцидоза:
достижения и перспективы 20

М. М. Цыганов, М. К. Ибрагимова

Длинная некодирующая РНК MALAT1
и ее роль в канцерогенезе молочной железы . . . 32

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНЫЕ СТАТЬИ

- Г. А. Жулай, М. И. Шибяев
Связь экспрессии изоформ аденозинкиназы и эктонуклеотидаз CD39/CD73 в крови больных колоректальным раком 42
- Е. И. Лебедева, А. С. Бабенко, А. Т. Щастный
Уровень мРНК ММР-9 и прогрессирование мостовидного фиброза при токсическом поражении печени 50
- Д. Д. Новак, О. С. Троицкая, А. А. Нуштаева, М. В. Жильникова, В. А. Рихтер, М. И. Мещанинова, О. А. Коваль
Подавление EGFR ингибирует сферообразование клеток культуры MCF7 со сверхэкспрессией EGFR 59
- И. С. Осадчий, С. О. Камалян, К. Ю. Тумашова, П. Г. Георгиев, О. Г. Максименко
Редактирование жизненно важных генов с помощью системы CRISPR/Cas9 на модели дрозофилы 70
- И. Б. Соколова, О. П. Горшкова
Клеточная терапия — новая технология восстановления церебральной циркуляции после ишемии/реперфузии 75

КРАТКИЕ СООБЩЕНИЯ

- И. В. Гущина, Д. К. Ниров, Т. А. Щербакова, С. М. Балдин, В. К. Швядас
Поиск ингибиторов транскетолазы из *Mycobacterium tuberculosis* в ряду сульфозамещенных соединений. 81
- Правила для авторов 84

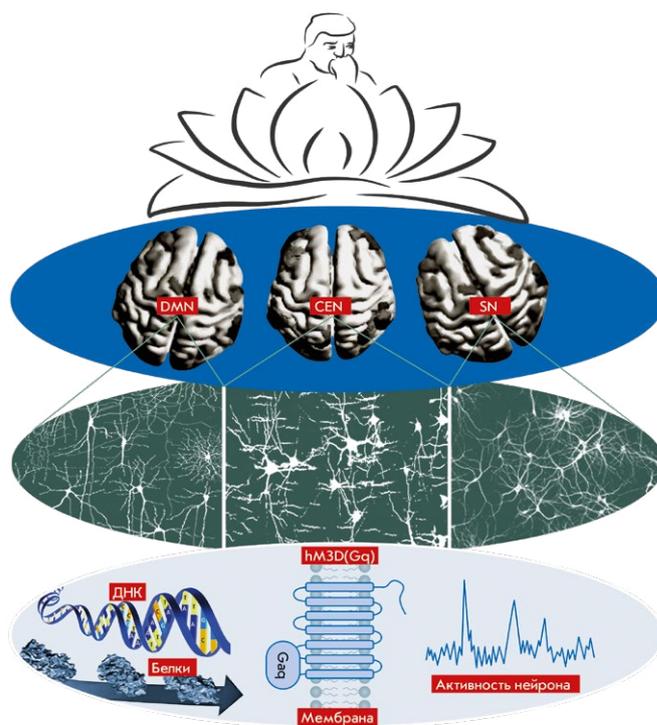


РИСУНОК НА ОБЛОЖКЕ
(см. статью Дыгало и др.)

Коннективность головного мозга в свете хемогенетического управления активностью нейронов

Н. Н. Дыгало

Федеральный исследовательский центр Институт цитологии и генетики Сибирского отделения Российской академии наук (ИЦиГ СО РАН), Новосибирск, 630090 Россия

E-mail: dygalo@bionet.nsc.ru

Поступила в редакцию 24.12.2022

Принята к печати 10.05.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11895

РЕФЕРАТ Коннективность – согласованная активность нейронных сетей, осуществляющая функции мозга, выявляется сигналами функциональной магнитно-резонансной томографии, зависящими от содержания кислорода в крови (blood oxygen level-dependent – BOLD), снабжающей мозг. Сигнал BOLD лишь косвенно связан с лежащей в его основе активностью нейронов, поэтому открытым остается вопрос, являются ли коннективность и ее изменения только проявлениями нормальных или патологических состояний мозга, или же в какой-то мере их причинами. Создание хемогенетических рецепторов, активируемых синтетическими препаратами (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs – DREADD), которые в зависимости от типа рецептора облегчают или, наоборот, тормозят ответ нейрона на поступающие к нему физиологические стимулы, позволяет оценить коннективность мозга в свете управляемой активности нейронов. Имеющиеся данные свидетельствуют, что коннективность базируется на активности нейронов и представляет собой проявление связей областей мозга, интегрирующих сенсорные, когнитивные и моторные функции. Хемогенетическая модуляция активности разнообразных групп и типов нейронов изменяет коннективность мозга и его сложноорганизованные функции. Хемогенетика может оказаться полезной для перестройки патологических механизмов нервных и психических заболеваний. Начинаясь интеграция на основе коннектома всего пути от молекулярно-клеточных, нейрональных и синаптических процессов до высшей нервной деятельности и поведения существенно повысит фундаментальную и прикладную ценность сведений этого раздела нейронаук.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА коннективность мозга, функциональная магнитно-резонансная томография, хемогенетика, активность нейронов, поведение.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ BOLD – сигналы fMRI, зависящие от содержания кислорода в крови (blood oxygen level-dependent); CaMKII – промотор, активный в пирамидных глутаматергических нейронах; CEN – центральная исполнительная сеть (Central Executive Network); CNO – клозапин-N-оксид (Clozapine N-oxide); DREADD – химерные рецепторы, активируемые исключительно синтетическими агонистами (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs); DMN – сеть пассивного режима работы головного мозга (Default Mode Network); GABA – гамма-аминомасляная кислота (Gamma-amino butyric acid); Gq – активирующий гуанинсвязывающий белок; fMRI – функциональная магнитно-резонансная томография; rs-fMRI – функциональная магнитно-резонансная томография в состоянии покоя; hM3D(Gq) – активирующий хемогенетический рецептор; hM4D(Gi) – ингибирующий хемогенетический рецептор; hSyn – промотор гена синапсина человека; KORD – ингибирующий хемогенетический рецептор; LC – синее пятно (locus coeruleus); mCherry – маркерный красный флуоресцирующий белок; NE – норадреналин (norepinephrine); PFC – префронтальная кора; rAVV – рекомбинантный аденоассоциированный вирус; SN – сеть ситуативной значимости (Salience Network).

ВВЕДЕНИЕ

Одной из ключевых задач нейробиологии является выяснение связи активности нейронов мозга с высшей нервной деятельностью, включающей нормальные и патологические когнитивные

и психоэмоциональные проявления. Современные экспериментальные и клинические данные отмечают существенный вклад в механизмы функционирования мозга не только нейротрансмиссивных, нейроэндокринных, нейротрофических, иммуноло-

гических и молекулярно-генетических регуляторов [1–8], но также и взаимодействий структур мозга коннективности [9–15] – согласованной активности нейронных сетей, вовлеченных в осуществление той или иной функции мозга. Об этом свидетельствуют, например, наблюдаемые связи между активностями нейронных сетей и концентрацией внимания [16, 15], памятью [11, 17], а также многими другими поведенческими и психологическими проявлениями [18–20]. Прямое или косвенное влияние, которое одна группа нейронов оказывает на другую их группу, обозначается как эффективная коннективность.

Возросший интерес к коннективности мозга обусловлен возможностью прижизненной неинвазивной регистрации ее проявлений методом функциональной магнитно-резонансной томографии (Functional magnetic resonance imaging – fMRI). Этот метод позволяет получать сигналы, зависящие от содержания кислорода в крови (blood oxygen level-dependent – BOLD), снабжающей мозг. Считается, что локальная оксигенация крови и, следовательно, величина BOLD-сигнала в целом соответствует активности нейронов структуры. Корреляция между низкочастотными флуктуациями в BOLD-сигналах удаленных структур мозга в покое, а также при активации мозга сенсорной стимуляцией или фармакологической нагрузкой рассматривается в качестве показателя коннективности этих структур [12].

При большом числе исследований в этой области нейронаук до сих пор остается неясным, являются ли коннективность и ее нарушение одним из проявлений нормальных или патологических состояний мозга, или же в какой-то мере их причиной. Для прояснения этого вопроса необходимо отличить причинно-следственные связи между этими состояниями и коннективностью от случайных. Экспериментальные воздействия, вызывающие то или иное проявление функций мозга (поведенческие, вегетативные или иные ответы), а также сопровождающие их изменения коннективности, не достаточны для установления между ними причинности связи. Как индуцированные ответы, так и изменения коннективности могут быть независимыми проявлениями состояния, возникающего в результате воздействия. Необходимы специфические физиологические вмешательства, целенаправленно изменяющие активность нейронов и, как предполагается, коннективность, базирующуюся на этой активности. Большинство таких воздействий к людям не применимы. Поэтому для решения этой задачи резонно использовать эксперименты на животных [21].

Хемотретические методы, созданные относительно недавно [22], существенно усовершенствовали

подходы к исследованию функций мозга. Эти методы позволяют контролировать активность нужных нейронов с помощью искусственно сконструированных рецепторов, например, сопряженных с гуанин-связывающими белками или являющихся ионными каналами, управляемыми лигандами. К перспективным среди этих рецепторов относятся активируемые исключительно синтетическими препаратами дизайнерские рецепторы семейства DREADD (Designer Receptors Exclusively Activated by Designer Drugs). Воздействия на такие рецепторы, в зависимости от их типа, облегчают или, наоборот, затормаживают ответ нейрона на приходящие к нему естественные физиологические стимулы, а не навязывают ему активность воздействия, внешнего для мозга и нейрона. Поэтому они дают возможность наиболее объективно взглянуть на нейронно-сетевую организацию функций головного мозга в свете управления активностью нейронов. Описание и систематизация имеющихся в настоящее время сведений по этому вопросу и стали целью данного обзора.

ДИЗАЙНЕРСКИЕ РЕЦЕПТОРЫ, АКТИВИРУЕМЫЕ ИСКЛЮЧИТЕЛЬНО ДИЗАЙНЕРСКИМИ ПРЕПАРАТАМИ

Наиболее популярным хемотретическим подходом, используемым в исследовании регуляции разнообразных аспектов деятельности мозга экспериментальных животных нейронными сетями, является метод DREADD [22–28]. Наряду с решением задач фундаментальной науки, хемотретика потенциально может оказаться полезной для перестройки патологических механизмов нервных и психических заболеваний и их регуляции с помощью дизайнерских препаратов [29]. DREADD взаимодействуют с экзогенными синтетическими лигандами, инертными для природных рецепторов организма. Активность нейронов, экспрессирующих эти сконструированные рецепторы, может быть усилена или, напротив, ослаблена, в зависимости от использованного типа рецептора. Ниже описаны варианты DREADD и особенности их экспрессии в составе вирусных векторов или трансгенов, использованных в экспериментах, оценивающих влияние хемотретических воздействий на коннективность мозга.

Два варианта DREADD, сконструированные методами генной инженерии на основе рецептора ацетилхолина мускаринового типа человека (hM3D(Gq) и hM4D(Gi)) находят широкое применение. Для создания DREADD-hM3D(Gq), которые при взаимодействии с синтетическим лигандом клозапин-N-оксидом (CNO) повышают ответ нейрона на приходящие к нему физиологические стимулы, был использован метаботропный рецептор ацетилхо-

лина третьего типа, сопряженный с активирующим гуанинсвязывающим белком Gq. Функциональный эффект этих рецепторов связывают с повышением чувствительности нейрона к стимуляции за счет деполяризации его мембраны. DREADD-hM4D(Gi), тормозящие при взаимодействии с CNO активацию клетки, имеющей такие рецепторы, создан с использованием модифицированного метаботропного рецептора ацетилхолина четвертого типа, сопряженного с ингибирующим гуанинсвязывающим белком Gi. Считается, что hM4D(Gi) снижает возбуждение нейронов за счет гиперполяризации клетки. Наряду с ацетилхолиновыми рецепторами, для создания DREADD использовали каппа-опиоидный рецептор, сопряженный с ингибирующим гуанинсвязывающим белком Gi (KORD), снижающий активность клетки при взаимодействии со своим фармакологически инертным лигандом сальвинорин В [30]. Хомогенетическое торможение/инактивацию в экспериментальной нейроповеденческой неврологии часто называют и интерпретируют как хомогенетическое молчание (silencing).

DREADD поступают в мозг либо в составе трансгена, экспрессия которого в желаемой структуре и типе клеток достигается путем скрещивания специально созданных линий мышей [31], либо в составе вектора, как правило, на основе аденоассоциированного вируса [24–28]. Стереотаксическое введение вирусного вектора обеспечивает его локализацию в нужной структуре мозга, а промотор, управляющий экспрессией, обеспечивает присутствие DREADD в желаемом типе или типах клеток.

DREADD хорошо экспрессируются в клетках центральной нервной системы в составе вирусных векторов или в качестве трансгенов и подходят для обратимой активации или ингибирования клеток-мишеней при введении лигандов этих рецепторов системно или непосредственно в мозг. Высокий уровень экспрессии в мозге обеспечивают входящие в состав вектора неизбирательные по типу нейронов промоторы, такие, как промотор цитомегаловируса [32] или синапсина человека (hSyn) [31–36]. Использование промоторов, активных лишь в нейронах определенного типа, например, промотора CaMKII, активного в пирамидных глутаматергических нейронах [31, 37], промоторов, специфичных для ГАВАергических интернейронов, синтезирующих парвальбумин и экспрессирующих продинорфин или проэнкефалин [31], а также специфичных для серотонинергических [38], норадренергических нейронов или нейронов, отвечающих на дофамин [39–41], позволяет исследовать влияние изменения активности каждого отдельного типа или даже подтипа нейронов на коннективность в мозге.

КОННЕКТИВНОСТЬ

Функциональную коннективность определяют по уровню корреляции между значениями сигналов, зависящих от содержания кислорода в крови – BOLD, выявляемых в разных областях мозга функциональной магнитно-резонансной томографией – fMRI. Регистрируемый сигнал при отсутствии внешних стимулов относят к состоянию покоя – resting-state-fMRI. Сигналы BOLD, сопровождающие решение «задачи», составляют так называемые «ответы», например, тактильная fMRT – на стимуляцию конечностей [42]. На основе этих сигналов строятся пространственные карты [43], отражающие внутреннюю функционально-сетевую организацию мозга.

Каждая сеть состоит из групп нейронов, локализованных в разных структурах мозга, но координированно изменяющих свою активность. Например, сеть пассивного режима работы головного мозга (Default Mode Network – DMN) обеспечивает в здоровом мозге независимое от внешних стимулов мышление и саморефлексию. Подавление ее активности улучшает выполнение задач, требующих концентрации внимания [9]. Ядро DMN составляют задняя медиальная и теменная кора головного мозга, а также отдельные височные и лобные модули [44]. Сеть определения значимости (Salience Network – SN) концентрирует внимание на важных событиях, воспринимает и реагирует на сигналы, связанные с сохранением гомеостаза [45]. Основные структуры SN – передняя часть островка (anterior insula), передняя поясная кора (anterior cingulate cortex) и вентральное полосатое тело (ventral striatum). Центральная исполнительная сеть (Central Executive Network – CEN) оперирует информацией рабочей памяти и отвечает за принятие решений в ходе целенаправленного поведения. Ее центрами являются дорсолатеральная префронтальная кора и латеральная задняя теменная кора. Эти и другие крупномасштабные сети, выявленные впервые у людей [46], обнаруживают заметную гомологию с подобными сетями обезьян и грызунов [47, 48].

Активности сетей функциональной коннективности, определенные с помощью rs-fMRI, хорошо согласуются с когнитивными способностями и поведением [49], а также с изменениями уровня возбуждения мозга [10, 50]. Практически важно, что сигналы rs-fMRI пациентов с психическими [13, 20, 51, 52] или нейродегенеративными [53] заболеваниями четко отличаются от функциональной коннективности в мозге здоровых людей. И хотя это позволяет использовать rs-fMRI при диагностике патологий [54], результаты, касающиеся таких различий, часто

сложно интерпретировать, поскольку сигнал BOLD лишь слабо и косвенно связан с лежащей в его основе активностью нейронов.

В связи с этим разрабатываются подходы к выявлению возможной связи между региональной функциональной связностью и прямыми индикаторами активации нейронов, высвобождением нейротрансмиттеров или метаболизма в клетках мозга. Для этого необходимо индуцировать изменения активности нейронов и при этом регистрировать сигналы rs-fMRI или позитронно-эмиссионной томографии. Последний метод используется существенно реже, чем rs-fMRI, поскольку сопряжен с использованием позитрон-излучающих радиоизотопов, например, ^{18}F -фтордезоксиглюкозы [55]. Применимый для человека метод транскраниальной магнитной стимуляции действительно влияет на связность DMN [56]. Однако изменения активности нейронов, выходящие за пределы ее нормальных паттернов, нарушают структуру и функционирование сети. Поэтому для оценки влияния активности нейронов на связность в мозге подходит лишь ее модуляция в пределах естественного диапазона [57]. Этому условию среди разнообразных способов изменения активности нейронов (фармакологических, электрофизиологических, с помощью воздействий магнитным полем, а также оптогенетических) в наибольшей мере удовлетворяет хемогенетический подход. Этот метод главным образом облегчает или, наоборот, затормаживает ответ нейрона на приходящие к нему естественные физиологические стимулы. Некоторым вариантам таких методов авторы дали специальные названия. Например, метод, включающий технологию DREADD и визуализацию ^{18}F -фтордезоксиглюкозы с помощью позитронно-эмиссионной томографии, назван (DREAMM) (DREADD-Assisted Metabolic Mapping – метаболическое картирование с помощью DREADD) [55]. Объединение технологии DREADD с rs-fMRI для изучения изменений спонтанной активности нейронов названо chemo-fMRI – хемо-fMRT [38].

Следует отметить, что активация узловых нейронов сети распространяется даже по ее удаленным участкам. Так, например, хемогенетическая стимуляция нейронов, экспрессирующих рецептор D1 дофамина, в дорсальном полосатом теле лишь одного полушария, активирует электрофизиологические ответы медиального таламуса, прилежащего ядра и коры обоих полушарий мыши [41]. Подавление нейронной активности в узловых участках сети также может иметь волновой характер распространения, выходящий за рамки связей с узлом, и захватывать другие нейронные сети мозга [35].

Большинство накопленных к настоящему времени экспериментальных данных, которые будут рассмотрены ниже, свидетельствуют об изменении связности при хемогенетической модуляции активности разнообразных групп и типов нейронов головного мозга.

ВОЗДЕЙСТВИЯ, НЕИЗБИРАТЕЛЬНЫЕ ПО ТИПУ НЕЙРОНОВ

К настоящему времени ряд лабораторий использует неизбирательную по типу нейронов хемогенетическую модуляцию их активности совместно с fMRI [34–39, 58] для исследования ответов связности нейронных сетей мозга лабораторных животных.

Мозг млекопитающих является сложной системой, и изменение активности нейронов даже одной области может иметь широкомасштабные последствия для многих функций. Например, у макаков хемогенетическая инактивация нейронов всех типов, экспрессирующих под промотором hSyn DREADD – hM4D, угнетающего активность нейронов в миндале, подкорковой области с широкими связями в коре, нарушила амигдало-корковую fMRI связность и распределение кортико-кортикальных взаимосвязей между функциональными сетями мозга [33]. Большое количество DREADD-трансфицированных клеток в миндале ассоциировалось с более существенным нарушением функциональной связности между этой структурой и моносинаптически связанными, а также и не связанными с нею прямыми областями мозга. Коммуникационные контакты через моносинаптические и полисинаптические пути в совокупности объясняли значительную часть корреляционной структуры эндогенной активности мозга и многие ее изменения, возникающие в результате снижения активности миндалины. Такие результаты указывают на структурную основу нейронной активности и вероятную связь невропатологии с удаленными от презумптивного очага ее возникновения нейрофизиологическими изменениями [33].

Сеть пассивного режима работы головного мозга DMN является основной сетью мозга млекопитающих. Однако функциональная роль узлов этой сети и то, как ее организация связана с поведением, которое она контролирует, все еще неясны. Для получения информации по этим вопросам применяли хемогенетическую инактивацию ключевого узла DMN – дорсальной передней поясной коры (dorsal Anterior Cingulate Cortex) в сочетании с функциональной магнитно-резонансной томографией в состоянии покоя (rs-fMRI) и поведенче-

ским тестированием бодрствующих крыс [34]. Этот метод авторы назвали «chemo-rsfMRI-behavior approach» – химио-fMRT-покоя – поведенческий подход. Подавление активности дорсальной передней поясной коры с использованием DREADD-hM4Di, экспрессированного под промотором hSyn, значительно снизило активность нейронов пре-лимбической и дорсальной коры средней поясной извилины и индуцировало разнонаправленные изменения коннективности между узлами DMN. Изменения коннективности коррелировали с поведением животных – проявлениями беспокойства и двигательной активности в домашней клетке. Результаты свидетельствуют, что активность DMN у грызунов, как и у людей, скоординирована с поведенческими проявлениями [34].

Хемогенетическая активация мезолимбических или мезокортикальных путей – проекций от вентральной области покрышки (Ventral Tegmental Area) к прилежащему ядру (Nucleus Accumbens) или медиальной префронтальной коре (medial Prefrontal Cortex), соответственно, индуцировала ответы, регистрируемые по уровню оксигенации крови BOLD, не только в областях, экспрессирующих DREADD, но также и в нейронных сетях, отдаленных от мест введения хемогенетических векторов, в которых DREADD не экспрессировались [36]. Нейрохимическая природа этих путей, очевидно, гетерогенна, поскольку для экспрессии DREADD-hM3D(Gq) был использован неизбирательный по типу нейронов промотор-hSyn, а проекции из вентральной области покрышки в прилежащее ядро, например, высвобождают дофамин, глутамат, GABA, мозговой нейротрофический фактор и другие сигнальные молекулы [59]. Время активации мозга соответствовало проявлению поведенческого ответа – двигательной гиперактивности животных с хемогенетически активированным мезолимбическим путем. Такая активация специфически увеличивала активность нейронов, тогда как функциональная коннективность, оцениваемая с помощью fMRI в состоянии покоя, оставалась стабильной. Положительные и отрицательные ответы BOLD четко отражали одновременную активацию вентрального паллидума и деактивацию сетчатой части черной субстанции, соответственно, демонстрируя скоординированные противоположно направленные изменения активности разных участков нейронной сети после стимуляции специфических проекционных нейронов среднего мозга [36]. Следует отметить, что, в отличие от Roelofs с коллегами [36], отметивших стабильность функциональной коннективности при хемогенетической активации подкорковых путей, авторы всех остальных

рассмотренных в данном обзоре статей наблюдали изменения функциональной коннективности после хемогенетической модуляции активности нейронов разных типов, локализованных во многих структурах головного мозга.

Острое хемогенетическое ингибирование нейронов PFC с помощью DREADD-hM4D(Gi) под не-селективным к типу нейронов промотором hSyn увеличивало fMRI-коннективность между этой областью и ее прямыми таламо-кортикальными мишенями. Торможение PFC усиливало мощность низкочастотных осцилляций путем снижения разрядной активности нейронов, не связанной по фазе с медленными ритмами, что приводило к увеличению когерентности медленных и δ -диапазонов ритмов электроэнцефалограммы между областями, демонстрирующими сверхконнективность fMRI. Очевидно, что инактивация коры может увеличивать коннективность fMRI через усиление медленных колебательных процессов [31].

Одновременная хемогенетическая реактивация набора многих ансамблей нейронов, вовлеченных в формирование памятного следа (энграммы) об угрожающих условиях и маркированных в этих условиях повышенной экспрессией гена раннего ответа *c-fos*, функционально связанных, в частности, с нейронами гиппокампа или миндалина, более эффективно реализовала на уровне поведения энграмму, чем реактивация лишь одного ансамбля, и воспроизводила более полно страх, вызываемый угрожающей обстановкой. Эти результаты показывают, что коннективность удаленных структур является естественным компонентом реализации сложноорганизованных функций мозга [60].

Хемогенетическое блокирование коннективности орбитофронтальной коры и ростромедиальной части хвостатого ядра (rostromedial caudate nucleus) макак-резусов путем контралатеральной экспрессии в этих структурах мозга тормозного DREADD hM4Di нарушало адекватное определение ценности пищевого вознаграждения [32]. В этих экспериментах экспрессию DREADD обеспечивал цитомегаловирусный промотор, и нарушение коннективности нельзя отнести на счет снижения активности нейронов какого-либо определенного типа или клеток глии [61]. Тем не менее, ясно, что коннективность орбитофронтальной коры и ростромедиальной части хвостатого ядра, вероятно, имеет решающее значение для формирования мотивированного поведения на базе интеграции внешних стимулов с внутренним побуждением обезьян [32].

Не только неизбирательная по типу нейронов модуляция их активности, но и изменения активности нейронов какого-либо определенного типа

также влияли на коннективность и, по-видимому, на зависящие от нее проявления высшей нервной деятельности.

МОДУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ МОНОАМИНЕРГИЧЕСКОЙ НЕЙРОТРАНСМИССИИ

Хемотретическая тоническая активация норадренергических NE-нейронов синего пятна LC в области моста головного мозга мышей снижала его кровоснабжение и поглощение глюкозы этими нейронами, а также увеличивала синхронную низкочастотную активность fMRI в сети пассивного режима работы DMN в лобной коре, существенно удаленной от LC. Активация LC-NE индуцировала высвобождение NE, усиливала кальциевые сигналы нейронов и снижала кровоснабжение в передней поясной коре. Стимуляция LC-NE также усиливала функциональную коннективность в лобном отделе DMN и, очевидно, способствовала проявлению поведения, связанного с этой сетью мозга [40]. Активация LC у людей ассоциируется со сдвигом коннективности в сетях мозга в пользу обработки наиболее значимой информации [62]. Возможную причинно-следственную связь в рамках этой ассоциации анализировали на мышах путем совмещения хемотретической активации LC с fMRT в состоянии покоя [39]. Такой подход назван «хемо-коннектомика» («chemo-connectomics»). Обнаружено, что активация LC быстро прерывает текущее поведение и значительно увеличивает коннективность в масштабах всего мозга, с наиболее глубокими эффектами в сети ситуативной значимости SN, а также и в сети миндалины. Изменения функциональной коннективности коррелировали с уровнями транскриптов альфа-1- и бета-1-адренергических рецепторов в головном мозге, а коннективность функциональной сети коррелировала с обменом норадреналина в структурах мозга. Вероятно, эти изменения коннективности в крупномасштабных сетях мозга могут оказывать влияние на оптимизацию нейрональной обработки информации, значимой для повышения бдительности и обнаружения угроз [39].

Хемотретическая активация нейронов, экспрессирующих рецепторы D1 дофамина в левом дорсальном отделе полосатого тела мыши, увеличивала фракционную амплитуду низкочастотных колебаний (fractional Amplitude of Low Frequency Fluctuations – fALFF) в медиальном таламусе, прилежащем ядре и коре обоих полушарий. Кроме того, локальные полевые потенциалы в гамма-диапазоне были увеличены как в стимулированном стриатуме, так и в коре обоих полушарий [41].

Нейроны, продуцирующие серотонин, обильно иннервируют области мозга через протяженные

проекции [63]. Использование chemo-fMRI для выявления возможного влияния серотонинергической нейротрансмиссии на региональную и глобальную функциональную активность позволило обнаружить, что эндогенная стимуляция нейронов, продуцирующих серотонин, не влияла на глобальную активность мозга, но приводила к региональной активации ряда первичных областей-мишеней, охватывающих кортико-гиппокампальные и вентральные области стриатума. В то же время фармакологическое повышение уровня серотонина приводило к широко распространяемой в мозге fMRT-деактивации, вероятно, отражая смешанный вклад центральных и периваскулярных констрикторных эффектов. Эти результаты идентифицируют основные функциональные мишени эндогенной серотонинергической стимуляции и свидетельствуют о возможной причинно-следственной связи между активацией серотонинергических нейронов и регионарными сигналами fMRT [38].

МОДУЛЯЦИЯ АКТИВНОСТИ ПИРАМИДНЫХ НЕЙРОНОВ И ИНТЕРНЕЙРОНОВ

Хемотретическая стимуляция нейронов ядра ложа конечной полоски (Bed Nucleus of the Stria Terminalis), экспрессирующих везикулярный транспортер гамма-аминомасляной кислоты (vesicular γ -aminobutyric acid (GABA) transporter), с помощью DREADD-hM3Dq способствовала проявлению тревожно-подобного поведения, а также вызывала длительную депрессию глутаматергической нейротрансмиссии, указывающую на изменения в синаптической пластичности. Метаболическое картирование активности всего мозга после этого воздействия выявило повышенную активность структур вентрального среднего мозга, включая вентральную область покрышки, а также структур заднего мозга, таких, как синее пятно LC и парабрахияльное ядро (parabrachial nucleus). Активность этих ядер мозга ассоциирована с тревожно-подобным поведением. Использование микрофлюидного профилирования рецепторной системы отдельных нейронов ядра ложа конечной полоски, экспрессирующих везикулярный транспортер гамма-аминомасляной кислоты, выявило, что стимуляция сопряженного с Gq-белком серотонинового рецептора типа 2c ответственна за тревожно-подобное поведение [64].

Метод, включающий технологию DREADD и визуализацию ^{18}F -фтордезоксиглюкозы (FDG) с помощью микропозитронно-эмиссионной томографии, названный DREAMM (DREADD-assisted metabolic mapping), позволил создать метаболические карты целого мозга в условиях свободного поведения

животных [65]. Этим методом обнаружена ассоциация различных кортиколимбических сетей со специфическими поведенческими проявлениями при торможении активности экспрессирующих продинорфин или проэнкефалин ГАВАергических тормозных средних шипиковых нейронов (medium spiny neurons) оболочки прилежащего ядра (Nucleus Accumbens Shell) [65], вовлекаемых в нейropsychиатрические расстройства.

Снижение у мышей активности глутаматергических нейронов правой передней поясной области коры (Anterior Cingulate Cortex) с помощью ингибирующего каппа-опиоидного рецептора DREADD (KORD), экспрессированного под промотором CaMKII, вызывало в этом отделе мозга ослабление зависящего от уровня оксигенации крови BOLD-сигнала fMRI и его усиление в связанных с передней поясной областью коры регионах мозга обоих полушарий. Изменения активности нейронов наблюдались в функциональных сетях, включая связи с сенсорной корой, таламусом, базолатеральной миндалиной и вентральным паллидумом (globus pallidus s. pallidum) – областями, участвующими в процессах внимания, рабочей памяти, страха и вознаграждения соответственно. Эти модуляции активности нейронов сопровождалась снижением внутри- и межполушарной функциональной связности [58].

Хемогенетическое возбуждение главных глутаматергических пирамидных нейронов, экспрессирующих активирующей DREADD-hM3D(Gq) под CaMKII-промотором, или ингибирование ГАВАергических интернейронов, синтезирующих парвальбумин, в префронтальной коре ослабляли ее связи с кортикальными проекциями DMN. Оба воздействия повышали локальную скорость возбуждения и сдвигали мощности локального полевого потенциала (Local Field Potential – LFP) в сторону более высоких частот, эффективно обращая электрофизиологические эффекты, вызываемые ингибирующим DREADD-hM4D(Gi), экспрессированным в коре под неселективным к типу нейронов промотором hSyn. Стимуляция пирамидных нейронов подавляла активность медленного и дельта-диапазона LFP более эффективно, чем воздействие на интернейроны. Предполагается, что наблюдаемая в таких опытах функциональная сверхсвязность может быть обусловлена как повышенным соотношением возбуждения и торможения в префронтальной коре, так и неспецифическим функциональным снижением активности ГАВАергических нейронов [31].

Хемогенетическая активация глутаматергических нейронов паравентрикулярного ядра (Paraventricular Hypothalamic Nucleus) гипоталамуса, экспрессирующих вектор rAVV-CaMKII α -

hM3Dq-mCherry, увеличивала выявляемые методом хемо-fMRT сигналы BOLD и функциональную связность между паравентрикулярным и обонятельным ядрами, поясной корой, паравентрикулярным ядром таламуса, периакведуктальным серым веществом (Periaqueductal Gray Nucleus) и гиппокампом после введения крысам CNO [66].

АКТИВНОСТИ НЕЙРОНОВ МОДУЛИРУЮТ ПОВЕДЕНИЕ ЧЕРЕЗ КОННЕКТИВНОСТЬ

Результаты недавних экспериментов, подобных описанным выше, позволяют рассматривать специфические изменения связности, вызываемые хемогенетическими воздействиями, не только как сопутствующие признаки нарушения тех или иных проявлений высшей нервной деятельности, но и в качестве вероятной причины этих нарушений. Так, обнаружена ассоциация различных кортиколимбических сетей со специфическими поведенческими проявлениями при угнетении активности ГАВАергических тормозных средних шипиковых нейронов. Если эти нейроны экспрессировали продинорфин, то усиливалось левовращательное поведение, а если проэнкефалин, то правовращательное поведение. Угнетение активности этих нейронов в состоянии бодрствования или под наркозом приводило к изменению активности разных нейронных сетей [65]. Хемогенетическая инактивация взаимодействия между орбитофронтальной и обонятельной корой с помощью hM4Di-DREADD снижала способность обезьян различать в поведенческом тесте ожидаемые размеры вознаграждения [67]. Хемогенетические нарушения связности орбитофронтальной коры и ростромедиальной части хвостатого ядра изменяли формирование мотивированного поведения на базе интеграции внешних стимулов с внутренним побуждением обезьян [32]. Подавление активности дорсальной передней поясной коры с использованием DREADD-hM4D(Gi), экспрессированного под промотором hSyn, значительно снижало активность нейронов прелимбической и дорсальной коры средней поясной извилины и индуцировало разнонаправленные изменения связности между узлами DMN. Эти изменения коррелировали с поведением животных – проявлениями беспокойства и двигательной активности в домашней клетке. Очевидно, активность DMN у грызунов, как и у людей, скоординирована с поведенческими проявлениями [34]. Хемогенетическая активация LC-NE индуцировала высвобождение NE, усиливала кальциевые сигналы нейронов и снижала кровоснабжение в передней поясной коре. Активация LC-NE также усиливала функциональную связность в лобном отделе DMN и, соот-

ветственно, способствовала проявлению поведения, связанного с этой сетью мозга [40].

Контралатеральная, как и билатеральная, но не ипсилатеральная хомогенетическая инактивация преимущественно глутаматергических нейронов двух структур (дорсального гиппокампа и PFC), нарушала обучение крыс в W-образном лабиринте. Эти результаты свидетельствуют, что коннективность дорсального гиппокампа и PFC играет ключевую роль в пространственном обучении и памяти [68]. Совместное применение хомогенетического подавления активности первичной соматосенсорной коры с тактильной fMRT выявило взаимосвязи активности нейронов, коннективности и поведения макака. Фокальное хомогенетическое ингибирование функционально идентифицированной области руки соматосенсорной коры нарушило хватательное поведение. Это же ингибирование ослабляло также сигнал fMRT, вызванный стимуляцией рук, как в локальном месте ингибирования, так и в анатомически и/или функционально связанной нижестоящей сети, лежащей в основе индуцированного нарушения хватательного поведения. Более того, ингибирование области рук неожиданно растормаживало репрезентацию ног с сопутствующей поведенческой гиперсенсibilизацией [42].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Коннективность – проявление естественных связей областей мозга, которые избирательно интегрируют сенсорные, когнитивные и моторные активации. Эти связи имеют корни в эволюции мозга [69], а их индивидуальные особенности закладываются в онтогенезе [70]. В формирование индивидуальных особенностей коннектома существенный вклад вносит генетический компонент. Большинство из 19 различных нейропсихиатрических и идиопатических психических состояний, исследованных у более чем 30000 человек, имели характерные для состояния коннектомные профили, коррелирующие с геномными и транскриптомными особенностями этих состояний [71]. Гены играют важную роль в формировании функционально значимых, метаболически затратных взаимодействий между узловыми участками коннектомов. Эти участки имеют похожие паттерны транскрипционной активности, связанные с их сходными метаболическими и цитоархитектоническими особенностями. Гены, участвующие в формировании и поддержании синапсов и аксонов, важны для установления связей между областями мозга, а особенности транскриптомов узловых центров нейронных сетей обусловлены метаболическими потребностями этих центров [72, 73]. Следует отметить, что при активации DREADD изменяется

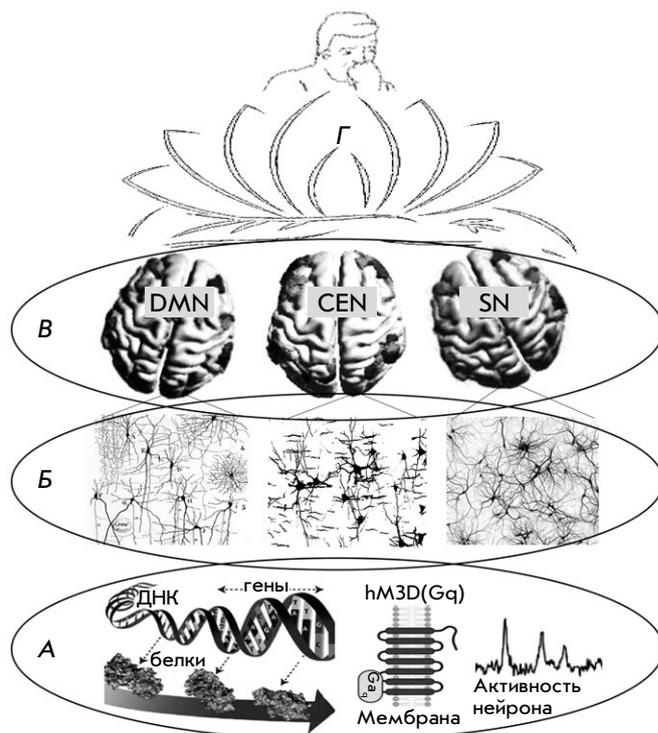


Рис. 1. Схема многоуровневой организации функций головного мозга млекопитающих. А – молекулярно-клеточные процессы, включающие гены, белки, мембрану клетки со встроенными в нее белками (в качестве одного из мембранных белков представлена схема хомогенетического рецептора активирующего типа hM3D(Gq)), а также электрофизиологическая активность нейрона. Б – нейронно-сетевые процессы, являющиеся основой структурно-функциональной организации мозга, осуществляют ансамбли взаимосвязанных контактами нейронов. В – процессы в крупномасштабных сетях головного мозга, каждая из которых формировалась в ходе эволюции на основе нейронных ансамблей, схемы которых представлены в части (Б), для преимущественного выполнения каждой из них определенных адаптивных функций. На схемах апикальной поверхности мозга человека представлены три крупномасштабные сети: сеть пассивного режима работы головного мозга (Default Mode Network, DMN), центральная исполнительная сеть (Central Executive Network, CEN) и сеть ситуативной значимости (Salience Network, SN). Наиболее важные участки каждой из сетей затемнены. По-видимому, взаимодействия DMN, CEN, SN, а также ряда других крупномасштабных сетей головного мозга обеспечивают когнитивные и поведенческие проявления у человека (Г)

экспрессия генов. Так, хомогенетическая активация глутаматергических нейронов верхних бугорков четверохолмия значительно изменяла транскриптом этой структуры в сторону преобладания нейротрофических процессов [74]. Тринадцать дефек-

тов развития нервной системы, неврологических и психических расстройств, предикторами которых являются молекулярно-генетические и биохимические нарушения, ассоциировались со структурно-анатомическими паттернами корковых аномалий, затрагивающих основную сетевую архитектуру мозга, что указывает на вероятное взаимное усиление негативных вкладов локальных молекулярных и глобальных коннектомных механизмов в патологию [75].

Во многих исследованиях и обзорах обсуждалась вариабельность паттернов экспрессии генов в мозге в одних и тех же психоэмоциональных состояниях, вплоть до практически полного несовпадения у разных линий мышей [76]. Поэтому одним из путей прояснения структуры и функции механизмов таких состояний может быть опора на более близкие к психоэмоциональной регуляции параметры мозга, такие, как коннективность, основанная, в том

числе, и на экспрессии генов [8]. Имеющиеся в настоящее время результаты, включая и рассмотренные в данном обзоре, дают для этого достаточные основания.

Вместе с тем, выявление биологического смысла, заключенного в коннектоме, требует не только данных его регистрации, но и результатов смежных наук, таких, как, анатомия, физиология, молекулярная генетика, анализ поведения. Необходимы сведения о внутриклеточных процессах и свойствах клеток, пластичности синапсов, об эффектах нейромодуляторов на клетки и синапсы. Такие данные позволяют интегрировать на основе коннектома весь путь от молекулярно-клеточных, нейрональных и синаптических процессов до высшей нервной деятельности и поведения (*рис. 1*). ●

Работа выполнена при поддержке РФФИ (проект № 20-015-00129) и FWNR-2022-0023.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- McEwen B.S. // *Physiol. Rev.* 2007. V. 87. № 3. P. 873–904.
- McEwen B.S., Bowles N.P., Gray J.D., Hill M.N., Hunter R.G., Karatsoreos I.N., Nasca C. // *Nat. Neurosci.* 2015. V. 18. № 10. P. 1353–1363.
- Dygalo N.N., Shishkina G.T., Kalinina T.S., Yudina A.M., Ovchinnikova E.S. // *Pharmacol Biochem. Behav.* 2006. № 85. № 1. P. 220–227.
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Sournina N.Y., Dygalo N.N. // *J. Neurosci.* 2001. V. 21. № 2. P. 726–731.
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Dygalo N.N. // *Neuroscience.* 2004. V. 129. № 3. P. 521–528.
- Shishkina G.T., Kalinina T.S., Berezova I.V., Bulygina V.V., Dygalo N.N. // *Behav. Brain. Res.* 2010. V. 213. № 2. P. 218–224.
- Shishkina G.T., Dygalo N.N. // *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. im. I.P. Pavlova.* 2010. V. 60. № 2. P. 138–152.
- Dygalo N.N., Kalinina T.S., Shishkina G.T. // *Stress.* 2020. V. 23. № 6. P. 700–707.
- Whitfield-Gabrieli S., Ford J.M. // *Annu. Rev. Clin. Psychol.* 2012. V. 8. P. 49–76.
- Allen E.A., Damaraju E., Plis S.M., Erhardt E.B., Eichele T., Calhoun V.D. // *Cereb. Cortex.* 2014. V. 24. № 3. P. 663–676.
- Avery E.W., Yoo K., Rosenberg M.D., Greene A.S., Gao S., Na D.L., Scheinost D., Constable T.R., Chun M.M. // *J. Cogn. Neurosci.* 2020. V. 32. № 2. P. 241–255.
- Friston K.J. // *Brain Connect.* 2011. V. 1. № 1. P. 13–36.
- Duman R.S., Sanacora G., Krystal J.H. // *Neuron.* 2019. V. 102. № 1. P. 75–90.
- Dygalo N.N., Shishkina G.T. // *Zh. Vyssh. Nerv. Deiat. im. I.P. Pavlova.* 2020. V. 70. № 1. P. 3–11.
- Rosenberg M.D., Scheinost D., Greene A.S., Avery E.W., Kwon Y.H., Finn E.S., Ramani R., Qiu M., Constable R.T., Chun M.M. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2020. V. 117. № 7. P. 3797–3807.
- Kucyi A., Daitch A., Raccach O., Zhao B., Zhang C., Esterman M., Zeineh M., Halpern C.H., Zhang K., Zhang J., Parvizi J. // *Nat. Commun.* 2020. V. № 11. P. 325.
- Yamashita M., Yoshihara Y., Hashimoto R., Yahata N., Ichikawa N., Sakai Y., Yamada T., Matsukawa N., Okada G., Tanaka S.C., et al. // *Elife.* 2018. V. 10. № 7. P. e38844.
- Woodward N.D., Cascio C.J. // *JAMA Psychiatry.* 2015. V. 72. № 8. P. 743–744.
- Yan C.G., Chen X., Li L., Castellanos F.X., Bai T.J., Bo Q.J., Cao J., Chen G.M., Chen N.X., Chen W., Cheng C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2019. V. 116. № 18. P. 9078–9083.
- Li S., Hu N., Zhang W., Tao B., Dai J., Gong Y., Tan Y., Cai D., Lui S. // *Front. Psychiatry.* 2019. № 10. P. 482.
- Pais-Roldán P., Mateo C., Pan W.J., Acland B., Kleinfeld D., Snyder L.H., Yu X., Keilholz S. // *Neuroimage.* 2021. № 245. P. 118630.
- Armbruster B.N., Li X., Pausch M.H., Herlitze S., Roth B.L. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2007. V. 104. № 12. P. 5163–5168.
- Atasoy D., Sternson S.M. // *Physiol. Rev.* 2018. V. 98. № 1. P. 391–418.
- Roth B.L. // *Neuron.* 2016. V. 89. № 4. P. 683–694.
- Dygalo N.N. // *Neurosci. Behav. Physiol.* 2020. V. 50. № 8. P. 1051–1056.
- Dygalo N.N., Lanshakov D.A., Komysheva N.P., Drozd U.S., Shaburova E.V., Sukhareva E.V., Shishkina G.T. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2020. V. 490. № 1. P. 16–18.
- Kolesov D.V., Sokolinskaya E.L., Lukyanov K.A., Bogdanov A.M. // *Acta Naturae.* 2021. V. 13. № 4. P. 17–32.
- Swanson J.L., Chin P.S., Romero J.M., Srivastava S., Ortiz-Guzman J., Hunt P.J., Arenkiel B.R. // *Front. Neural Circuits.* 2022. V. 16. P. 886302.
- Ozawa A., Arakawa H. // *Behav. Brain Res.* 2021. V. 406. P. 113234.
- Vardy E., Robinson J.E., Li C., Olsen R.H.J., DiBerto J.F., Giguere P.M., Sassano F.M., Huang X.P., Zhu H., Urban D.J., et al. // *Neuron.* 2015. V. 86. № 1. P. 936–946.
- Rocchi F., Canella C., Noei S., Gutierrez-Barragan D., Colletta L., Galbusera A., Stuefer A., Vassanelli S., Pasqualetti M., Iurilli G., et al. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 1056.
- Oyama K., Hori Y., Mimura K., Nagai Y., Eldridge M.A.G., Saunders R.C., Miyakawa N., Hirabayashi T., Hori Y., Inoue K.I., et al. // *J. Neurosci.* 2022. V. 42. № 32. P. 6267–6275.
- Grayson D.S., Bliss-Moreau E., Machado C.J., Bennett J.,

- Shen K., Grant K.A., Fair D.A., Amaral D.G. // *Neuron*. 2016. V. 91. № 2. P. 453–466.
34. Tu W., Ma Z., Ma Y., Dopfel D., Zhang N. // *Cereb. Cortex*. 2021. V. 31. № 1. P. 312–323.
35. Tu W., Ma Z., Zhang N. // *Neuroimage*. 2021. V. 237. P. 118219.
36. Roelofs T.J.M., Verharen J.P.H., van Tilborg G.A.F., Boekhoudt L., van der Toorn A., de Jong J.W., Luijendijk M.C.M., Otte W.M., Adan R.A.H., Dijkhuizen R.M. // *Neuroimage*. 2017. V. 156. P. 109–118.
37. Peeters L.M., van den Berg M., Hinz R., Majumdar G., Pintelon I., Keliris G.A. // *Science*. 2020. V. 9. P. 101455.
38. Giorgi A., Migliarini S., Galbusera A., Maddaloni G., Mereu M., Margiani G., Gritti M., Landi S., Trovato F., Bertozzi S.M., Armirotti A., et al. // *Cell Rep*. 2017. V. 21. № 4. P. 910–918.
39. Zerbi V., Floriou-Servou A., Markicevic M., Vermeiren Y., Sturman O., Privitera M., von Ziegler L., Ferrari K.D., Weber B., De Deyn P.P., et al. // *Neuron*. 2019. V. 103. № 4. P. 702–718.
40. Oyarzabal E.A., Hsu L.M., Das M., Chao T.H., Zhou J., Song S., Zhang W., Smith K.G., Sciolino N.R., Evsyukova I.Y., et al. // *Sci. Adv*. 2022. V. 8. № 17. P. eabm9898.
41. Nakamura Y., Nakamura Y., Pelosi A., Djemai B., Debacker C., Hervé D., Girault J.A., Tsurugizawa T. // *Neuroimage*. 2020. V. 220. P. 117079.
42. Hirabayashi T., Nagai Y., Hori Y., Inoue K.I., Aoki I., Takada M., Sahara T., Higuchi M., Minamimoto T. // *Neuron*. 2021. V. 109. № 20. P. 3312–3322.
43. Biswal B., Zerrin Yetkin F., Haughton V.M., Hyde J.S. // *Magn. Reson. Med*. 1995. V. 34. P. 537–541.
44. Raichle M.E. // *Annu. Rev. Neurosci*. 2015. V. 8. № 38. P. 433–447.
45. Seeley W.W.J. // *Neurosci*. 2019. V. 39. № 50. P. 878–882.
46. Power J.D., Cohen A.L., Nelson S.M., Wig G.S., Barnes K.A., Church J.A., Vogel A.C., Laumann T.O., Miezin F.M., Schlaggar B.L., et al. // *Neuron*. 2011. V. 72. № 4. P. 665–678.
47. Grandjean J., Canella C., Anckaerts C., Ayranci G., Bougacha S., Bienert T., Buehlmann D., Coletta L., Gallino D., Gass N., et al. // *Neuroimage*. 2020. V. 205. P. 116278.
48. Xu N., LaGrow T.J., Anumba N., Lee A., Zhang X., Yousefi B., Bassil Y., Clavijo G.P., Khalilzad Sharghi V., et al. // *Front. Neurosci*. 2022. V. 16. P. 816331.
49. Smith S.M., Nichols T.E., Vidaurre D., Winkler A.M., Behrens T.E., Glasser M.F., Ugurbil K., Barch D.M., van Essen D.C., Miller K.L. // *Nat. Neurosci*. 2015. V. 18. № 11. P. 1565–1567.
50. Tagliazucchi E., Laufs H. // *Neuron*. 2014. V. 82. № 3. P. 695–708.
51. Zhang L., Wu H., Xu J., Shang J. // *Front. Neurosci*. 2018. V. 12. P. 692.
52. Yang H., Zhang H., Meng C., Wohlschläger A., Brandl F., Di X., Wang S., Tian L., Biswal B. // *Hum. Brain Map*. 2022. V. 43. № 12. P. 3792–3808.
53. Sorg C., Riedel V., Mühlau M., Calhoun V.D., Eichele T., Läer L., Drzezga, Förstl H., Kurz A., Zimmer C., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA*. 2007. V. 104. № 47. P. 18760–18765.
54. Lee M.H., Smyser C.D., Shimony J.S. // *AJNR Am. J. Neuroradiol*. 2013. V. 34. № 10. P. 1866–1872.
55. Michaelides M., Hurd Y.L. // *Neuropsychopharmacology*. 2015. V. 40. № 1. P. 239–240.
56. Liston C., Chen A.C., Zebley B.D., Drysdale A.T., Gordon R., Leuchter B., Voss H.U., Casey B.J., Etkin A., Dubin M.J. // *Biol. Psychiatry*. 2014. V. 76. № 7. P. 517–526.
57. Jazayeri M., Afraz A. // *Neuron*. 2017. V. 93. № 5. P. 1003–1014.
58. Peeters L.M., Hinz R., Detrez J.R., Missault S., De Vos W.H., Verhoye M., van der Linden A., Keliris G.A. // *Neuroimage*. 2020. V. 220. P. 117088.
59. Morales M., Margolis E.B. // *Nat. Rev. Neurosci*. 2017. V. 18. P. 73–85.
60. Roy D.S., Park Y.G., Kim M.E., Zhang Y., Ogawa S.K., DiNapoli N., Gu X., Cho J.H., Choi H., Kametsky L., et al. // *Nat. Commun*. 2022. V. 13. P. 1799.
61. Betley J.N., Sternson S.M. // *Hum. Gene. Ther*. 2011. V. 22. № 6. P. 669–677.
62. Hermans E.J., Henckens M.J., Joëls M., Fernández G. // *Trends Neurosci*. 2014. V. 37. № 6. P. 304–314.
63. Awasthi J.R., Tamada K., Overton E.T.N., Takumi T. // *J. Comp. Neurol*. 2021. V. 529. № 7. P. 1391–1429.
64. Mazzone C.M., Pati D., Michaelides M., DiBerto J., Fox J.H., Tipton G., Anderson C., Duffy K., McKlveen J.M., Hardaway J.A., et al. // *Mol. Psychiatry*. 2018. V. 23. № 1. P. 143–153.
65. Michaelides M., Anderson S.A., Ananth M., Smirnov D., Thanos P.K., Neumaier J.F., Wang G.J., Volkow N.D., Hurd Y.L. // *J. Clin. Invest*. 2013. V. 123. № 12. P. 5342–5350.
66. Liu Y., Rao B., Li S., Zheng N., Wang J., Bi L., Xu H. // *Front. Pharmacol*. 2022. V. 13. P. 814623.
67. Eldridge M.A., Lerchner W., Saunders R.C., Kaneko H., Krausz K.W., Gonzalez F.J., Ji B., Higuchi M., Minamimoto T., Richmond B.J. // *Nat. Neurosci*. 2016. V. 19. № 1. P. 37–39.
68. Maharjan D.M., Dai Y.Y., Glantz E.H., Jadhav S.P. // *Neurobiol. Learn. Mem*. 2018. V. 155. P. 351–360.
69. Thiebaut de Schotten M., Forkel S.J. // *Science*. 2022. V. 378. № 6619. P. 505–510.
70. Bragg-Gonzalo L., De León Reyes N.S., Nieto M. // *Semin. Cell. Dev. Biol*. 2021. V. 118. P. 24–34.
71. Moreau C.A., Kumar K., Harvey A., Huguet G., Urchs S., Schultz L.M., Sharmarke H., Jizi K., Martin C.O., Younis N., et al. // *Brain*. 2022. awac315.
72. Arnatkevičiūtė A., Fulcher B.D., Fornito A. // *Front. Neural Circuits*. 2019. V. 13. P. 47.
73. Arnatkevičiūtė A., Fulcher B.D., Oldham S., Tiego J., Paquola C., Gerring Z., Aquino K., Hawi Z., Johnson B., Ball G., et al. // *Nat. Commun*. 2021. V. 12. P. 4237.
74. Claes M., Geeraerts E., Plaisance S., Mentens S., Van den Haute C., De Groef L., Arckens L., Moons L. // *Cells*. 2022. V. 11. № 11. P. 1784.
75. Hansen J.Y., Shafei G., Vogel J.W., Smart K., Bearden C.E., Hoogman M., Franke B., van Rooij D., Buitelaar J., McDonald C.R., et al. // *Nat. Commun*. 2022. V. 13. № 1. P. 4682.
76. Mozhui K., Karlsson R.M., Kash T.L., Ihne J., Norcross M., Patel S., Farrell M.R., Hill E.E., Graybeal C., Martin K.P., et al. // *J. Neurosci*. 2010. V. 30. № 15. P. 5357–5367.

УДК 578.832.1;579.22

Уникальный геном вируса и альтернативные стратегии его реализации

О. П. Жирнов^{1,2}¹Научно-исследовательский центр эпидемиологии и микробиологии имени почетного академика Н.Ф. Гамалеи Минздрава России, Институт вирусологии им. Д.И. Ивановского, Москва, 123098 Россия²Русско-немецкая академия медико-социальных и биотехнологических наук, Инновационный центр Сколково, Москва, 121205 Россия

E-mail: zhirnov@inbox.ru

Поступила в редакцию 31.12.2022

Принята к печати 11.05.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11904

*Посвящается 130-летию открытия русским ученым
Д.И. Ивановским новой формы биологической жизни – царства вирусов.*

РЕФЕРАТ В геноме ряда РНК-содержащих вирусов обнаружены амбиполярные гены, локализованные в вирусном геноме по принципу «стекинга» (один над другим) и кодирующие белки в противоположных направлениях. Присутствие амбиполярных генов открывает новый путь формирования вирусного разнообразия, когда вирионы, имеющие идентичный геном, могут отличаться схемой реализации (стратегией) генома и иметь различные типы дочерних вирионов, отличающихся по полярности геномной РНК и составу белков, экспрессированных положительно- или негативно-полярными генами, так называемые амбиполярные вирионы. Пока такой путь реализации вирусного генома остается гипотетическим и скрытым от нас подобно «темной стороне луны» и заслуживает пристального изучения.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА разнообразие вирусов, стратегия генома, амбисенс-гены, классификация вирусов.

130 лет назад выдающийся русский ученый Д.И. Ивановский описал новую форму биологической жизни, так называемых фильтрующихся контагиозных корпускулярных микроорганизмов («*contagium vivum fixum*») [1, 2], которая впоследствии была выделена в отдельное царство вирусов [3, 4]. По современной классификации Международного комитета по таксономии вирусов (ICTV – International Committee on Taxonomy of Viruses; Current ICTV Taxonomy Release: <https://ictv.global/taxonomy>) в домене вирусов выделяют шесть надцарств, 65 отрядов, 233 семейства и 2606 родов и более 10 тысяч вариантов (штаммов) вирусов [5].

Согласно общепризнанной классификации D. Baltimore [6], основанной на характеристике геномной нуклеиновой кислоты (НК) и стратегии ее реализации в инфицированной клетке, вирусы были разделены на семь генетических классов: I. Двухцепочечные ДНК-вирусы; II. Вирусы с одноцепочечной (+) смысловой ДНК; III. Двухцепочечные РНК-вирусы; IV. Вирусы с одноцепочечной (+)

смысловой РНК; V. Вирусы с одноцепочечной (-) смысловой РНК; VI. Одноцепочечные (+) смысловые РНК-вирусы с промежуточной ДНК в жизненном цикле; VII. Двухцепочечные ДНК-вирусы с промежуточной РНК. Центральное место в классификации занимает понятие о положительной полярности вирусных мРНК, т.е. молекул РНК, способных транслироваться клеточными рибосомами с образованием вирусных белков [7, 8]. Напротив, НК негативной полярности способны кодировать и транслировать белки через промежуточный синтез комплементарной (положительно полярной) цепочки мРНК. Для геномных вирусных ДНК принято считать положительной цепочку, идентичную последовательности транслируемой молекулы плюс-мРНК, и, наоборот, цепочку, комплементарную мРНК, обозначают как отрицательно полярную.

Различия в структуре вирусного генома и вариации схем его реализации в инфицированной клетке (т.е. стратегий реализации вирусного генома) порождают разнообразие вирусов, пантропную адаптацию вирусов к различным организмам, будь то бактерии,

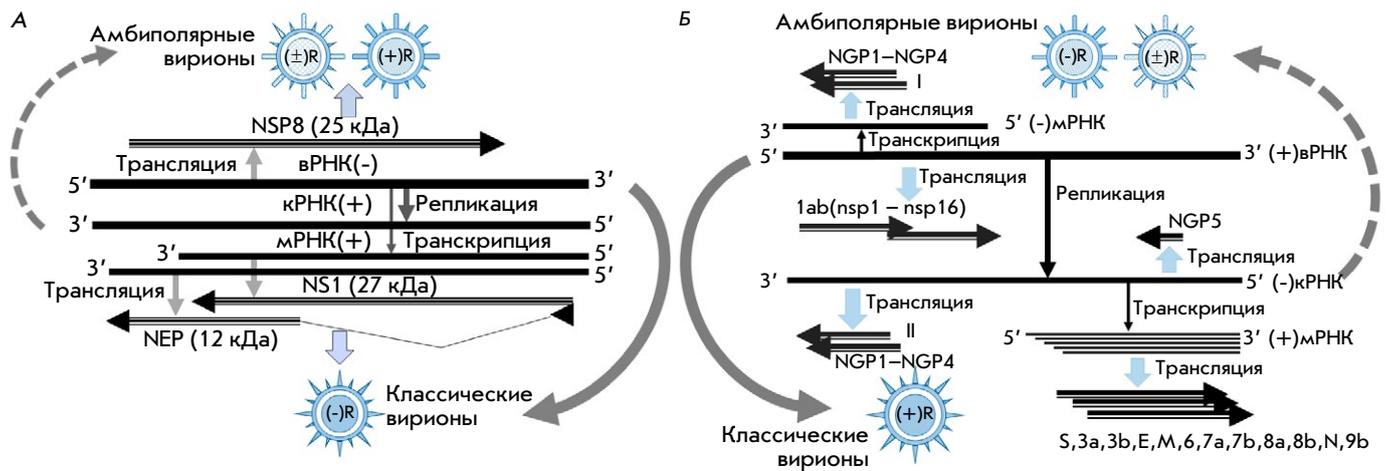


Рис. 1. Локализация амбиполярных генов в РНК-геноме вируса гриппа А и коронавируса, формирование амбиполярных вирионов. А – схема кодирования генов в сегменте NS генома вируса гриппа на модели A/Aichi/2/68 (H3N2). Вирус гриппа имеет геном негативной полярности, который кодирует три белка: негативно-полярные NS1 и NEP и позитивно-полярный стекинг-белок NSP8. Показан канонический путь стратегии сегмента № 8 (NS). Данный путь осуществляется посредством синтеза белков NS1 и NEP с образованием классических оболочечных вирионов, содержащих белки PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M1, M2, а также возможный альтернативный путь с образованием неканонического (амбиполярного) белка NSP8 и аналогичных амбиполярных белков позитивно-полярных генов, обнаруженных в сегментах PB1, PB2, PA, NP, M, NS (белки NSP1–NSP8 соответственно нумерации РНК сегментов вирусного генома). Неканонические амбиполярные вирионы, структурированные белками NSP1–NSP8, пока не обнаружены и имеют гипотетический характер (показано пунктирной стрелкой). Б – схема кодирования генов в РНК-геноме коронавируса на модели SARS-CoV2. Коронавирус имеет геном позитивной полярности, кодирующий пять основных структурных (S1/S2, N, E, M) и 16 (nsp 1–16) вспомогательных неструктурных полипептидов. Классический путь позитивно-полярной стратегии ведет к образованию классических оболочечных вирионов, содержащих белки S1/S2, N, E, M (показан сплошной стрелкой). В негативном направлении генома (3'→5') обнаружены протяженные рамки трансляции со всеми необходимыми элементами, такими, как инициаторный AUG, элемент Козак, структура IRES, стоп-кодны. Эти трансляционные рамки (гены) обозначены как NGP (Negative Gene Protein) и наиболее протяженные из них, NGP1–NGP5, имели мол. массу в диапазоне 7–20 кДа [17]. Альтернативный путь стратегии генома с образованием неканонических (амбиполярных) вирионов показан прерывистой стрелкой. Белки и направление их кодирования в геноме показаны двойной стрелкой. Синтез амбиполярных полипептидов NGP1–NGP5 возможен посредством образования субгеномной (-) мРНК и ее трансляции (путь I), а также возможен через трансляцию полноразмерной комплементарной геномной (-) кРНК (путь II)

грибы, растения, рыбы, животные, включая человека, и обеспечивают глобальное распространение вирусов на земле, а, возможно, и в космосе, и на других планетах [6].

Генетическое разнообразие вирусов, положенное в основу классификации D. Baltimore, рассматривалось с позиции: один уникальный вирусный геном – одна стратегия генома, т.е. один геном имеет одну схему репликации и направляет образование одного структурно-функционального класса вирионов (т.е. один тип репродукции вируса). При этом подразумевается однотипный и унифицированный процесс синтеза вирусных частиц (вирионов) в рамках одного рода (или семейства) вирусов [7, 8]. Однако обнаружение нами у РНК вирусов уникальных генов, локализованных в геномной РНК по принципу стопки (так называемый «genes stacking») и кодирующих белки в противоположных (амбиполярных)

направлениях, приводит к идее о возможном существовании нескольких альтернативных стратегий реализации генома у одного вируса, ведущих к образованию различных структурных классов вирусных частиц.

В 2007 году при анализе негативно-полярного генома вирусов гриппа А (семейство ортомиксовирусов) мы обнаружили протяженные рамки трансляции (open reading frame – ORF), которые, в отличие от канонических генов вирусов гриппа (PB1, PB2, PA, HA, NP, NA, M, NS) с негативной полярностью кодирования в геномной РНК в направлении 3'→5', имели позитивную полярность кодирования (в направлении 5' → 3' геномной молекулы) (рис. 1А). Особенность обнаруженных амбиполярных генов состояла в том, что они локализовались в геноме в участках, перекрывающих соответствующие классические негативно-полярные гены,

так называемое стопчатое расположение [9–14]. Позднее, в 2019 году в позитивно-полярном РНК-геноме коронавируса нами были идентифицированы протяженные открытые рамки трансляции с негативно-полярным направлением кодирования (3'→5') [15–18] (рис. 1Б). Обнаруженные в геномах ортомиксо- и коронавируса амбиполярные гены характеризовались наличием всех функциональных элементов, необходимых для экспрессии данных генетических рамок как трансляционных генов [19, 20]: стартовых кодонов ATG (или альтернативного CUG-кодона), трансляционных стоп-кодонов [21], канонических инициаторных последовательностей Козак в зоне инициаторного кодона (Kozak element [22]), присутствием в стартовой области амбиполярного гена типичных по вторичной структуре сайтов посадки рибосом (IRES – internal ribosome entry site [23]). Компьютерный анализ алгоритмов первичной структуры вирусных геномов выявил различные структурные и функциональные домены в пока еще гипотетических белковых продуктах амбиполярных генов, в частности, трансмембранных элементов белков ионных каналов, структурных доменов убиквитин-дегидрогеназы, ряда доменов, характерных для белков, способных участвовать в регуляции иммунитета и воспаления [9, 14, 18].

В настоящее время признана точка зрения, согласно которой геном одного вида (рода) вируса имеет одну стратегию, обуславливающую образование вирусных частиц определенного (канонического) строения и характерного круга хозяев. Обнаружение амбиполярных стекинг-генов в геномах РНК-содержащих вирусов наводит на мысль о наличии альтернативных стратегий в геноме одного вида (рода) вируса, реализация которых может (1) направлять синтез нескольких структурно-функциональных классов вирионов, отличающихся как белковым составом, так и структурной формой (полярностью) геномной РНК, и/или (2) формировать несколько различных стратегий репликации вируса и его патогенеза в инфицированном макроорганизме. Наличие нескольких стратегий у одного вирусного генома создает резерв адаптивных свойств вируса, который можно рассматривать как способ (или разновидность) генетического хеджирования (т.е. генетического спасения вирусов).

Идея многовариантной стратегии генома у одного вида (рода) вирусов и схемы реализации классической и альтернативной стратегий отображены на рис. 2 на модели вируса гриппа и коронавируса. Для вируса гриппа, имеющего геномную (-) РНК, характерно наличие как классического пути реализации генома (путь I; центральная стрелка на рис. 2А), так и возможность альтернативных

стратегий, показанных на рис. 2 цифрами II–V. В результате реализации альтернативных стратегий генома могут формироваться амбиполярные вирионы, которые помимо классических белков (PB1, PA, PB2, HA, NA, NP, M1, M2) могут содер-

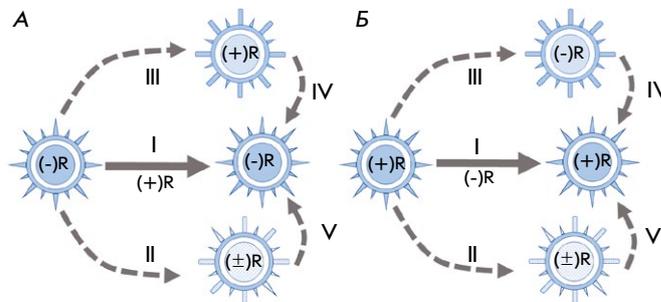


Рис. 2. Альтернативные стратегии генома вируса гриппа, имеющего негативно-полярный геномом, и формирование амбиполярных вирионов. Схема иллюстрирует альтернативные стратегии вирусного генома на модели генома вирусов гриппа (А) и коронавируса (Б) и применима для других вирусов – пневмо-, парамиксо-, рабдо-, филовирусов и т.д., имеющих негативно-полярный РНК-геном (-R). Стратегия генома представлена как путь репликации вирусного генома, приводящий к формированию канонических вирусных частиц определенного строения и состава как в части полярности вирусного генома, так и белкового состава вирусной оболочки. Показано три альтернативных стратегии, возможных для одного уникального вирусного генома. В настоящее время каноническим считается путь I, когда как четыре другие стратегии пока являются гипотетическими. При этом вполне вероятно, что в определенном биохимическом контексте инфицированных клеток могут реализоваться стратегии II–V, когда полноразмерные цепочки геномной РНК ((+)R и (±)R) будут упаковываться белками различного состава (показано различными значками (■, ▲, △)), включая белки амбиполярных генов. При этом различные типы вирионов могут иметь различную оболочечную структуру, содержащую либо не содержащую клеточные липиды, так называемые оболочечные и не оболочечные вирионы. Генетическая реализация репликации вирусного генома осуществляется РНК-зависимой полимеразой, которая может включаться в состав вириона и обеспечивать начало репликации вируса в клетке-мишени. (+)R, (-)R, (±)R – три возможных варианта геномной РНК дочерних вирионов: одноцепочечной позитивной и негативной полярности и двухцепочечной структуры соответственно. Возможные пути смены стратегии экспрессии генома у вируса одного вида показаны пунктирными стрелками и знаками (II–V); классический путь негативно-полярной стратегии вируса гриппа показан главной стрелкой (I) соответственно. Для раскрытия стратегий II–V необходимы целенаправленные исследования поиска вирионов, указанных неканонических структурных классов II–V

жать и белки – продукты амбиополярных генов *NSP1–NSP8*, соответствующих сегментов геномной РНК (*NSP* – Negative Strand Protein) (см. *рис. 2А*). При реализации классической для коронавируса стратегии также формируются вирионы, содержащие канонический (+) РНК-геном и классические структурные белки: N (нуклеокапсидный белок), S (поверхностный гликопротеин), E (мембранный белок), M (белок внутреннего матрикса), и образуется ряд вспомогательных неструктурных регуляторных белков, поддерживающих репликацию вируса в клетках-мишенях и подавление иммунного ответа хозяина. При этом от внимания ускользают продукты основных амбиополярных генов, обозначенных нами *NGP1–NGP5* (Negative Gene Proteins, так называемые белки негативно-полярных генов [17]), которые могут формировать новый структурный класс вирионов (так называемых амбиополярных вирионов; показано на *рис. 2Б* пунктирной стрелкой). Пока такие белки, кодируемые открытыми амбиополярными генами, в инфицированных клетках не обнаружены. Возможная причина кроется либо в минимальном уровне их синтеза, либо строго селективной экспрессии только в специализированных клетках организма, содержащих уникальные факторы, необходимые для экспрессии данных вирусных генов «стекинг»-типа при определенных условиях внутриклеточной и/или окружающей внеклеточной среды. Вместе с тем, имеются косвенные признаки экспрессии амбиополярных генов в инфицированном макроорганизме. У животных, инфицированных вирусом гриппа А, удавалось обнаружить клоны цитотоксических лимфоцитов, распознающих специфические пептидные домены амбиополярных белков вируса гриппа, в частности белка *NSP8*, кодируемого амбиополярным геном *NSP8* сегмента *NS* вируса гриппа А [24–26].

Можно предположить, что такие неканонические белки будут способны декорировать вирусный геном, формируя новый класс вирусных частиц, а также выполнять уникальные регуляторные функции и изменять поведение вируса в пораженном организме, например, переключая продуктивный тип инфекции на скрытую персистентную (низко репродуктивную) вирусную инфекцию. Более того, не исключена альтернативная возможность использования в качестве геномной молекулы цепочки РНК, комплементарной (амбиополярной реплики) каноническому геному: минус-цепочки РНК коронавирусов или плюс-РНК у вирусов гриппа (*рис. 2*). Таким образом амбиополярные вирусные частицы могут содержать как амбиополярные белки, так и амбиополярные реплики геномной РНК, обеспечивая альтернативный путь стратегии вирусного генома.

В результате, на одном уникальном вирусном геноме может реализоваться несколько альтернативных стратегий: с участием и без участия амбиополярных генов, а сами вирусы могут иметь несколько возможных жизненных путей в зависимости от контекста окружающих клеточных процессов. Эта идея отражена на *рис. 2*. Такой мультивариантный механизм стратегии уникального вирусного генома можно рассматривать как способ хеджирования (от английского *bet-hedging* – спасение) вирусов, способствующий формированию альтернативных путей размножения вирусов и созданию резервных адаптивных потенциалов у вирусов различных семейств. В этом аспекте РНК-вирусы могут иметь сходство с ДНК-вирусами и РНК-содержащими ретровирусными (вирус-подобными) транспозонами, имеющими двойной образ жизни – в форме ДНК-провируса и зрелого вируса, соответственно, который определяет вертикальный (в форме интегрированной в клеточный геном ДНК-копии вирусного генома) и горизонтальный (в форме зрелых вирионов) пути их существования в хозяине в зависимости от условий среды размножения и круга хозяев [27–29].

Амбиополярные гены вирусов обладают высокой популяционной стабильностью. В частности, в природной популяции высоковариабельных вирусов гриппа данные гены сохраняются в геноме со всеми необходимыми регуляторными элементами на протяжении более 100 лет, несмотря на заметную популяционную вариабельность как канонических, так и выявленных амбиополярных генов с характерным высоким коэффициентом *dN/dS*, показывающим выраженное иммунологическое давление со стороны макроорганизма-хозяина [14]. Эволюционная стабильность сохранения амбиополярных генов в природной популяции вирусов подчеркивает их необходимость для вируса и, как следствие, устойчивость к естественному селективному отбору. Присутствие амбиополярных генов в геноме РНК-содержащих вирусов открывает новый путь формирования вирусного разнообразия, когда вирионы, имеющие идентичный геном, могут отличаться схемой реализации (стратегией) генома и иметь различные типы, отличающиеся как по составу белков, экспрессированных «положительными» или «негативными» генами (так называемые амбиополярные вирионы), так и по полярности генома [17]. Наличие альтернативных стратегий генома и смена профиля синтезируемых белков и вирусной оболочки дают вирусу дополнительные возможности адаптации к новому хозяину и расширению круга хозяев. При этом вирус может не только использовать разные стратегии экспрессии своего генома, но и способен менять эти стратегии в за-

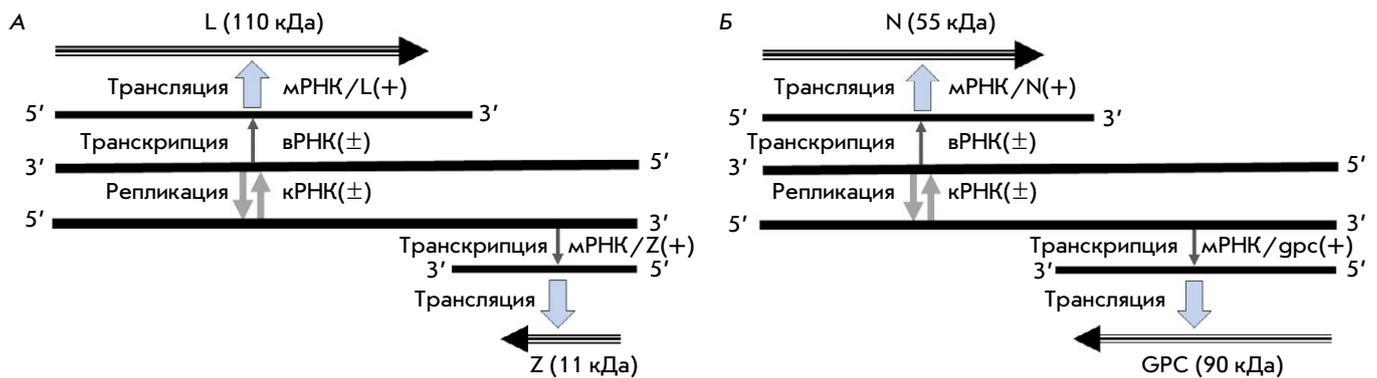


Рис. 3. Схема биполярной (амбисенс) стратегии генома аренавируса (семейство *Arenaviridae*; род *Mammarenavirus*). Представлен геном аренавируса (вирус лимфоцитарного хориоменингита (LCMV); ас.п. AY847350; AY847351). Семейство объединяет возбудителей особо опасных для человека геморрагических лихорадок Ласса, Луйо, Мачупо, Хунин, Чапаре, Гуанарито, Сабиа и др. Геном аренавирусов содержат четыре гена, которые кодируют: А – белок полимеразы (L, 110 кДа) и неструктурный белок (Z, 11 кДа); Б – нуклеокапсидный белок (N, 55 кДа) и поверхностный гликопротеид (GPC; 90 кДа) [31]. Как показано на схеме, кодирование генов L и N имеет негативную, а генов GPC и Z противоположную (позитивную) полярности соответственно. Все четыре гена разобщены в геноме аренавируса и не имеют перекрытий, а для экспрессии каждого из генов в инфицированных клетках необходим синтез индивидуальных кепированных на 5'-конце мРНК

висимости от хозяина, что отражено на *рис. 2* (показано пунктирными стрелками). Пока такой путь множественной реализации вирусного генома остается гипотетическим и скрытым от нас, подобно «темной стороне луны». Экспериментальная проверка данного предположения позволит оценить возможность существования амбиполярных классов вирионов-невидимок, скрытых пока от пытливого ока исследователей. На сегодняшний момент пока не выявлено образование в инфицированном организме зрелых белковых продуктов, кодируемых обнаруженными амбиполярными вирусными генами. Но это не означает, что процесс экспрессии вирусных генов данного «стекинг»-класса не реализуется в природе. Для идентификации экспрессии генов данного типа потребуется целенаправленный поиск с применением оригинальных подходов и высокочувствительных методов идентификации белков в различных органах и специфических клетках инфицированного макроорганизма-хозяина. Не исключено, что раскрытие альтернативных стратегий вирусных геномов может иметь важное значение для понимания эволюции вирусов и патогенеза вирусных инфекций, как, например, при ковиде-2019, когда отдаленные и тяжелые осложнения вирусной инфекции могут быть обусловлены формированием амбиполярных вирионов, скрытых пока от внимания ученых и практикующих медиков.

Очевидно, что обнаруженный у РНК-содержащих вирусов амбиполярный стекинг генов дает вирусу, во-первых, увеличение информационной емкости генома. Во-вторых, определяет сцепленную (реци-

прокную) эволюцию вирусных генов, когда мутации в одном гене будут порождать изменение в стекинг-гене и, таким образом, представлять собой разновидность генетической синтении. В-третьих, белковые продукты стопчатых генов могут быть сцеплены функционально и иметь предопределенное структурное соответствие друг другу, что пока остается гипотетическим предположением и требует экспериментального подтверждения [14, 17]. Признак стекинга генов отличает указанные вирусы от уже известных в настоящее время четырех родов амбиполярных вирусов (тоспо-, флебо-, арена- и буньявирусов), у которых амбиполярные гены локализованы в геноме отдельно, не перекрывая другие гены, и функционируют как основные гены, направляющие синтез главных структурных и регуляторных вирусных белков [30]. Данная стратегия вирусного генома с разделенными амбисенс-генами, т.е. лишенными стекинг-локализации, показана на *рис. 3* на модели аренавирусов (семейство *Arenaviridae*, род *Mammarenavirus*). В этой связи различие по признаку стекинга позволяет рассматривать две группы амбиполярных вирусов. На текущий момент представляется логичным следующее разделение: у первой группы вирусов (вирусы гриппа, коронавирусы), имеющих стекинг генов в вирусном геноме, реализация амбиполярных стратегий генома может иметь альтернативный (необязательный) характер, тогда как для вирусов, лишенных стекинга генов (тоспо-, флебо-, арена- и буньявирусов), реализацию амбисенс-стратегии генома следует рассматривать как облигатный

(обязательный) характер для репликации вируса. Дальнейший целенаправленный поиск реализации альтернативных стратегий генома у одного вирусного вида и идентификация пока гипотетического класса амбиоплярных вирионов позволят ответить на вопрос о существовании данной разновидности многообразия вирусной жизни и ее роли в эволюции

вирусов различных родов и применить эти знания в разработке новых типов вакцин и противовирусных лекарств, а также для понимания молекулярных основ патогенеза вирусных болезней. ●

Автор выражает благодарность А.И. Чернышовой за помощь в подготовке настоящей статьи.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Ивановский Д.И. // Сельское хозяйство и лесоводство. 1892. № 2. С. 108–121.
2. Ivanowsky D. Concerning the mosaic disease of the tobacco plant. 1892. (English Translation. J. Johnson. in: *Phytopathological Classics*. 1942. № 7. P. 27–30. American Phytopathological Society, St. Paul, MN).
3. Жирнов О.П., Георгиев Г.П. // Вестник РАМН. 2017. Т. 72. № 1. С. 84–86.
4. Lvov D.K., Alkhovsky S.V., Zhirnov O.P. // *Probl. Virol.* 2022. V. 67. № 5. P. 357–384. doi: 10.36233/0507-4088-140
5. Walker P.J., Siddell S.G., Lefkowitz E.J., Mushegian A.R., Adriaenssens E.M., Alfenas-Zerbini P., Dempsey D.M., Dutilh B.E., García M.L., Curtis Hendrickson R., et al. // *Arch. Virol.* 2022. V. 167. № 11. P. 2429–2440. doi: 10.1007/s00705-022-05516-5.
6. Baltimore D. // *Bacteriol. Rev.* 1971. V. 35. № 3. P. 235–241. doi: 10.1128/br.35.3.235-241.1971.
7. Koonin E.V., Krupovic M., Agol V.I. // *Microbiol. Mol. Biol. Rev.* 2021. V. 85. № 3. P. e0005321. doi: 10.1128/MMBR.00053-21.
8. Agol V.I. // *Biosystems.* 1974. V. 6. № 2. P. 113–132. doi: 10.1016/0303-2647(74)90003-3.
9. Zhirnov O.P., Poyarkov S.V., Vorob'eva I.V., Safonova O.A., Malyshev N.A., Klenk H.D. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2007. V. 414. P. 127–133.
10. Gong Y.N., Chen G.W., Chen C.J., Kuo R.L., Shih S.R. // *PLoS One.* 2014. V. 9. № 12. P. e115016. <https://doi.org/10.1371/journal.pone.0115016>.
11. Clifford M., Twigg J., Upton C. // *Viol. J.* 2009. V. 6. P. 198. doi: 10.1186/1743-422X-6-198.
12. Yang C.W., Chen M.F. // *PLoS One.* 2016. V. 11. № 1. P. e0146936. doi: 10.1371/journal.pone.0146936.
13. Sabath N., Morris J.S., Graur D. // *J. Mol. Evol.* 2011. V. 73. № 5-6. P. 305–315. doi: 10.1007/s00239-011-9477-9.
14. Zhirnov O.P. // *Biochemistry (Moscow)*. 2020. V. 85. № 3. P. 387–392. <https://doi.org/10.1134/S000629792003014132564743>
15. Zhirnov O.P., Poyarkov S.V. Unknown negative genes in the positive RNA genomes of coronaviruses. *Authorea* 2020. doi:10.22541/au.160614900.06870227/v2.
16. Zhirnov O.P., Poyarkov S.V. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2021. V. 496. № 1. P. 27–31. doi: 10.1134/S1607672921010130.
17. Zhirnov O. // *World J. Virol.* 2021. V. 10. № 5. P. 256–263. doi: 10.5501/wjv.v10.i5.256.
18. Bartas M., Volná A., Beaudoin C.A., Poulsen E.T., Červeň J., Brázda V., Špunda V., Blundell T.L., Pečinka P. // *Brief Bioinform.* 2022. V. 23. № 3. P. bbac045. doi: 10.1093/bib/bbac045.
19. Zhirnov O.P., Klenk H.D. // *Vopr. Virusol. (Rus.)* 2010. V. 55. № 2. P. 4–8.
20. Zhirnov O.P., Akulich K.A., Lipatova A.V., Usachev E.V. // *Dokl. Biochem. Biophys.* 2017. V. 473. № 1. P. 122–127. <https://doi.org/10.1134/S160767291702009028510127>
21. Kears M.G., Wilusz J.E. // *Genes Dev.* 2017. V. 31. P. 1717–1731. doi:10.1101/gad.305250.117.
22. Acevedo J.M., Hoermann B., Schlimbach T., Teleman A.A. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 4018. doi:10.1038/s41598-018-22330-9.
23. Kolekar P., Pataskar A., Kulkarni-Kale U., Pal J., Kulkarni A. // *Sci. Rep.* 2016. № 6. P. 27436. doi:10.1038/srep27436.
24. Zhong W., Reche P.A., Lai C.C., Reinhold B., Reinherz E.L. // *J. Biol. Chem.* 2003. V. 278. P. 45135–45144. doi:10.1074/jbc.M307417200.
25. Hickman H.D., Mays J.W., Gibbs J., Kosik I., Magadán J.G., Takeda K., Das S., Reynoso G.V., Ngudiankama B.F., Wei J. // *J. Immunol.* 2018. V. 201. P. 2187. doi:10.4049/jimmunol.1801100.
26. Zhirnov O.P., Konakova T.E., Anhlan D., Ludwig S., Isaeva E.I. // *MIR J.* 2019. № 6. P. 28–36. doi:10.18527/2500-2236-2019-6-1-28-36.
27. Krupovic M., Blomberg J., Coffin J.M., Dasgupta I., Fan H., Geering A.D., Gifford R., Harrach B., Hull R., Johnson W., et al. // *J. Virol.* 2018. № 92. P. e00515-18. doi:10.1128/JVI.00515-18.
28. Avlund M., Dodd I.B., Semsey S., Sneppen K., Krishna S. // *J. Virol.* 2009. V. 83. № 22. P. 11416–11420. doi: 10.1128/JVI.01057-09. Erratum in: *J. Virol.* 2012. V. 86. № 5. P. 2898.
29. Maslov S., Sneppen K. // *Sci. Rep.* 2015. V. 5. P. 10523. doi: 10.1038/srep10523.
30. Nguyen M., Haenni A.L. // *Virus Res.* 2003. V. 93. P. 141–150. doi:10.1016/s0168-1702(03)00094-7.
31. Grande-Pérez A., Martin V., Moreno H., de la Torre J.C. // *Curr. Top. Microbiol. Immunol.* 2016. V. 392. P. 231–276. https://doi.org/10.1007/82_2015_468.

УДК 616.24-003.4 (056.7) : 577.21

Генная терапия муковисцидоза: достижения и перспективы

М. А. Ломунова*, П. М. Гершович

АО «БИОКАД», Санкт-Петербург, 198515 Россия

*E-mail: lomunova@biocad.ru

Поступила в редакцию 22.03.2023

Принята к печати 22.05.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11708

РЕФЕРАТ Одним из современных подходов к терапии наследственных заболеваний, вызванных дефицитом того или иного гена в организме, является заместительная генная терапия, которая заключается в том, что функциональную копию гена вводят в клетки и ткани с помощью различных систем доставки. С этой целью могут использоваться как вирусные частицы, несущие в себе целевой транскрипт, так и различные невирусные методы доставки генетического материала с помощью липосом, наночастиц и др. В представленном обзоре рассмотрены молекулярно-генетические механизмы и типы генетических мутаций, приводящие к возникновению муковисцидоза, а также описаны современные подходы к генной терапии муковисцидоза, которые потенциально могут применяться для коррекции этих мутаций и восстановления нормального функционирования белка-переносчика ионов натрия и хлора в клетках эпителия дыхательной системы. Восстановление экспрессии этого белка приведет к нормализации трансмембранного транспорта этих ионов и воды, а следовательно, и к снижению вязкости поверхностной жидкости дыхательных путей – одного из патологических проявлений этого заболевания. Также обсуждаются результаты доклинических и клинических исследований различных генотерапевтических препаратов, что позволяет сделать выводы о возможных перспективах применения генной терапии при муковисцидозе.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА генная терапия, муковисцидоз, CFTR, вирусный вектор, наночастицы.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ МВТР (CFTR) – трансмембранный регулятор муковисцидоза; НСД – нуклеотид-связывающий домен; ТМ – трансмембранный; МСС – мукоцилиарный клиренс; КИ – клинические исследования; Ad – аденовирус (Adenovirus); AAV – аденоассоциированный вирус (Adeno-Associated Virus); LV – лентивирус (Lentivirus); LNP – липосомные наночастицы (Liposomal NanoParticles); FDA – Food and Drug Administration.

ВВЕДЕНИЕ

Муковисцидоз, или кистозный фиброз (CF, cystic fibrosis), – одно из наиболее распространенных моногенных заболеваний. Кистозный фиброз – системное врожденное заболевание, которое вызывается мутациями в гене, кодирующем белок-регулятор трансмембранной проводимости (МВТР) [1]. В основе молекулярного механизма патогенеза заболевания лежит дисфункция или полное отсутствие кодируемого геном CFTR (cystic fibrosis transmembrane conductance regulator) белка-переносчика ионов натрия и хлора. Этот ионный канал обеспечивает нормальное функционирование клеток эпителия в легких, кишечнике, поджелудочной железе и некоторых других органах. МВТР регулирует перенос ионов натрия и хлора через мембрану, а также водный обмен в клетках секреторного эпителия в различных системах организма: дыхательной, желудочно-кишечной, гепатобилиарной и репродуктивной

[2, 3]. Нарушение функций этого белка приводит к развитию тяжелой прогрессирующей патологии, которая клинически проявляется поражением легких (дыхательная недостаточность), поджелудочной железы и печени (в тяжелых случаях возможно развитие цирроза), а также повышением концентрации электролитов в потовом секрете.

Различают несколько форм муковисцидоза: в 75–80% случаев встречается смешанная (легочно-кишечная), в 15–20% случаев диагностируют легочную форму и в 5% случаев – кишечную. Наиболее тяжелой считается смешанная форма муковисцидоза, поскольку она включает в себя клинические проявления как легочной, так и кишечной форм. Помимо этого, относительно редко также могут наблюдаться мекониальная кишечная непроходимость (15–20% случаев), отечно-анемическая, цирротическая и другие формы. Тем не менее, необходимо учитывать, что о таком делении на раз-

личные формы муковисцидоза можно говорить только условно, поскольку при выраженном поражении респираторного тракта обычно имеются также и нарушения органов пищеварения. То же самое происходит и при кишечной форме муковисцидоза – наряду с поражением кишечника развивается и поражение бронхолегочной системы. Основные осложнения, к которым может приводить муковисцидоз: легочные и желудочные кровотечения, кишечная непроходимость, гиперактивность бронхов, отеки, абсцессы, пневмо- и пиопневмоторакс, «легочное сердце», гайморит, цирроз печени, выпадение прямой кишки, задержки в развитии, бесплодие, сахарный диабет и др. [2].

По статистике в России ежегодно рождается примерно 650 человек с диагнозом муковисцидоз [4], при этом в мире соотношение составляет один новорожденный с муковисцидозом на 2000–5000 здоровых детей. В США и Европе на данный момент насчитывается около 70000 больных муковисцидозом [5]. У мужчин и женщин заболевание встречается с одинаковой частотой. Диагноз муковисцидоз обычно ставится в первые годы жизни ребенка, поскольку поражение всех органов (особенно легких и кишечника) становится очевидным уже на ранних этапах развития. У больных наблюдаются множественные нарушения почти всех систем организма: дыхательной, пищеварительной, опорно-двигательной, нервной, сердечно-сосудистой и др. У 85–90% пациентов наблюдается экзокринная недостаточность поджелудочной железы (дисфункция протоков). Средняя продолжительность жизни больных может составлять 30–40 лет, при этом качество жизни напрямую зависит от объема специализированной помощи и симптоматического лечения. Несмотря на это, до 90% больных муковисцидозом умирают от легочных инфекций и связанных с ними осложнений [3].

Поскольку причиной муковисцидоза является мутация в гене *CFTR*, полностью вылечить эту болезнь имеющимися в арсенале современной медицины методами невозможно. До последнего времени лечение муковисцидоза было исключительно симптоматическим: разжижение слизи (муколитики), расширение бронхов, противовоспалительная терапия, антибактериальная терапия, а также заместительная терапия с помощью ферментов (при кишечной форме заболевания). Все эти меры не позволяли увеличить продолжительность жизни и лишь на какое-то время улучшали качество жизни пациентов [6]. Появление препаратов-модуляторов МВТР (Vertex Pharmaceuticals) для патогенетической терапии существенно увеличило продолжительность жизни больных муковисцидозом, однако этот подход также

не устраняет причину заболевания, обрекая пациентов на дорогостоящую пожизненную терапию.

В свою очередь, использование методов генной терапии, направленной на восстановление функционирования гена *CFTR* в эпителиальных клетках, открывает новые перспективы в лечении муковисцидоза наряду с другими тяжелыми наследственными заболеваниями, где генная терапия уже показала свою эффективность и безопасность. Быстрое развитие технологий геномного редактирования дает возможность надеяться на развитие этиотропной терапии, позволяющей скорректировать мутацию *CFTR*, которая является причиной заболевания, и тем самым улучшить качество и продолжительность жизни больных муковисцидозом.

МОЛЕКУЛЯРНО-ГЕНЕТИЧЕСКИЕ МЕХАНИЗМЫ РАЗВИТИЯ МУКОВИСЦИДОЗА

МВТР – трансмембранный белок, локализованный на апикальной поверхности эпителиальных клеток. Связывание этого белка с АТФ приводит к изменению его конформации внутри белка канала, позволяющего ионам Cl^- выходить из клетки наружу. Окончание гидролиза АТФ приводит, в свою очередь, к закрытию канала (рис. 1).

Известно, что для поддержания нормального осмотического давления и циркуляции жидкости в межклеточном пространстве вблизи внешней мембраны клеток должны находиться ионы натрия и хлора. При этом одним из условий, необходимых для функционирования клеток эпителия легких, кишечника, потовых желез и других органов, является постоянный контролируемый ток ионов хлора через мембрану. Нарушение переноса ионов хлора через мембрану клеток приводит к изменению ее проницаемости для молекул воды и, таким образом, к дегидратации, что вызывает повышение вязкости выделяемого секрета. Поэтому при муковисцидозе в первую очередь поражаются именно эти органы: на поверхности эпителия образуется густой вязкий секрет, который забивает бронхолегочные пути и протоки желез, нарушая таким образом нормальное функционирование органов [2].

Секреция и абсорбция – два противоположных процесса транспорта электролитов, которые регулируют вязкоупругие свойства жидкой составляющей секретов экзокринных органов. Согласно накопленным данным, нарушение транспорта электролитов при муковисцидозе происходит на обоих уровнях: как на уровне абсорбции соли, так и на уровне абсорбции жидкости и ее секреции, опосредованной анионами [8]. При понижении концентрации ионов хлора в межклеточном пространстве происходит активация эпителиального натриевого канала ENaC

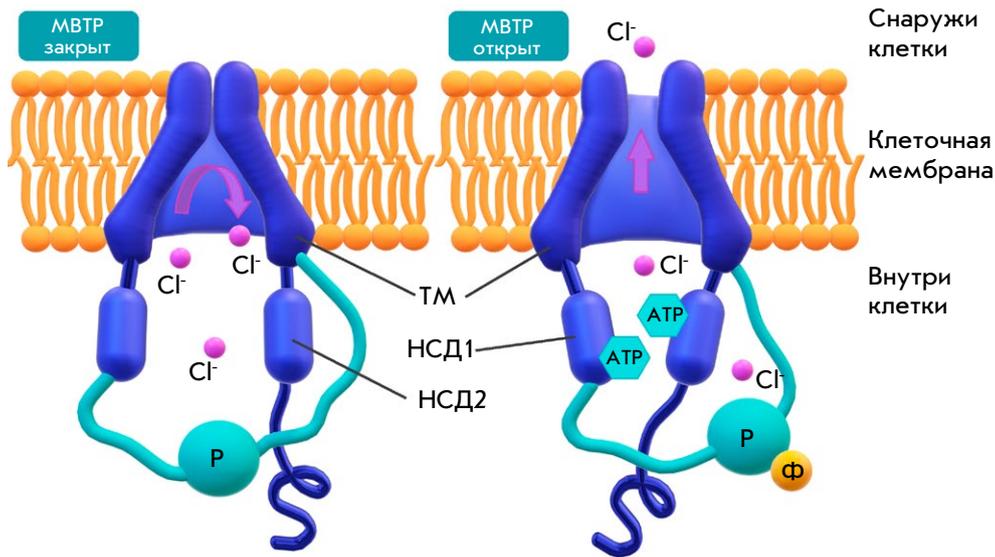


Рис. 1. Схематическое представление структуры белка МВТР в закрытом и открытом положениях. ТМ – трансмембранные домены, формирующие канал для транспорта ионов Cl^- . НСД1 и НСД2 – нуклеотид-связывающие внутриклеточные домены 1 и 2. Р – регуляторный домен с сайтами фосфорилирования (Ф). Для активации канала необходим остаток фосфорной кислоты на регуляторном домене. Открытие канала происходит посредством взаимодействия с трансмембранными доменами при связывании и гидролизе АТФ внутриклеточными доменами НСД1 и НСД2 [7]

(epithelial sodium channel), что приводит к увеличению концентрации Na в клетке (рис. 2). Это, в свою очередь, приводит к усилению абсорбции ионов Cl^- и воды и нарушению трансэпителиальной электрической разности потенциалов. В результате уменьшается объем жидкости на поверхности дыхательных путей, существенно увеличивается ее вязкость и резко снижается уровень клиренса на поверхности реснитчатого эпителия (рис. 2). В легких такие процессы приводят к обезвоживанию дыхательных путей и, соответственно, к снижению очищающей активности ресничек и слизистой оболочки в целом. Помимо этого, застой слизи также способствует быстрому развитию инфекции [9].

Выделяемый секрет представляет собой полимерную сетку, состоящую из О-гликозилированных гликопротеинов (муцинов), секретируемых в виде нитей и формирующих пористую структуру [11, 12]. Вязкоупругие свойства секрета и его структура в нормальном физиологическом состоянии адаптированы таким образом, чтобы улавливать и удалять вдыхаемые частицы и бактерии. При муковисцидозе повышенная вязкость секрета приводит к формированию бляшек муцина и уменьшению размера пор. В норме диаметр пор в секрете составляет 0.2–1 мкм, а при патологии не превышает 0.1 мкм. Это приводит к тому, что нейтрофилы, обеспечивающие первую линию защиты иммунной системы бактерий, не могут мигрировать сквозь слой слизи. При этом на уплотненной слизи бактерии формируют макроколонии, которые особенно устойчивы к действию иммунной системы и антибиотиков, что еще больше осложняет терапию [13].

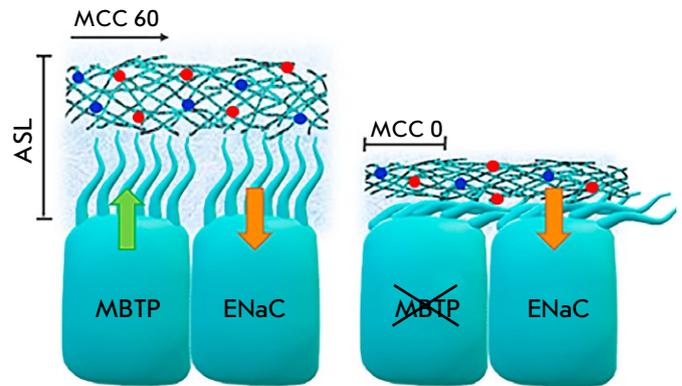
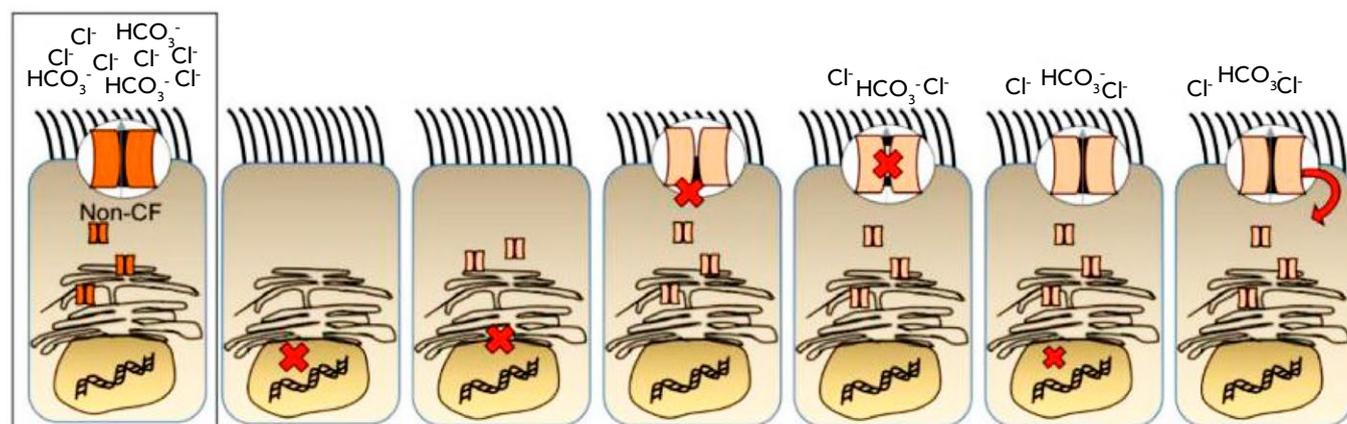


Рис. 2. Толщина слизистого слоя (ASL, airway surface liquid) в дыхательных путях в физиологическом состоянии (слева) зависит от нормального функционирования каналов МВТР и ENaC. МСС – мукоцилиарный клиренс или, другими словами, скорость очистки дыхательных путей посредством движения слизи по поверхности эпителия (в мкм/с). В случае нарушения работы МВТР при муковисцидозе (справа) из-за дефектного МВТР снижение количества ионов хлора приводит к избыточному транспорту ионов натрия, что приводит к осушению поверхности эпителия дыхательных путей, увеличению вязкости секрета и слипанию ресничек. При этом неподвижность секрета также вызывает воспалительную реакцию, вызванную размножением в нем патогенных микроорганизмов [9, 10]

Хронические инфекции, вызванные беспрепятственным размножением бактерий на поверхности дыхательных путей, считаются основной причиной смертности при муковисцидозе [14].



Класс мутации	I	II	III	IV	V	VI
Дефект белка	Нарушен синтез белка	Нарушен транспорт белка на мембрану	Нарушено открытие канала	Снижена проводимость канала	Снижено количество белка	Белок не стабилен
Наиболее частая мутация	G542X	F508del	G551D	R117H	3489+10kb C>T	4326delTC
% больных с хотя бы одной мутацией	22	88	6	6	5	5
Терапия	–	VX-809, VX-661	VX-770	–	–	–

Рис. 3. Типы мутаций МВТР и терапевтические препараты, одобренные FDA, для коррекции состояний, обусловленных этими мутациями. Больные муковисцидозом могут иметь более одной мутации. Адаптировано из [23]

МУТАЦИИ ГЕНА *CFTR*

Муковисцидоз – это ауточномное рецессивное заболевание, вызванное мутациями в гене *CFTR*, идентифицированном в 1989 году группой исследователей под руководством Lap-Chee Tsui [15, 16]. Ген *CFTR* расположен на хромосоме 7, он состоит из 27 экзонов и кодирует белок из 1480 аминокислотных остатков. На данный момент описано более 2000 мутаций в гене *CFTR*, и список мутаций постоянно пополняется, но только 250–300 из них приводят к развитию патологии, причем только 20 из этих мутаций встречаются достаточно часто (более чем у 0.1% больных) [17]. Выделяют пять классов мутаций (некоторые ученые выделяют семь) в соответствии с типом дефекта, который они вызывают (рис. 3). Мутации I–III классов (так называемые тяжелые) ассоциированы с более глубоким нарушением функций МВТР, IV–V классы (мягкие) ассоции-

рованы с сохранением остаточной функции белка МВТР [18]. Разные мутации гена *CFTR* могут приводить к нарушению синтеза, процессинга, стабильности и функционирования белка МВТР, а также его внутриклеточного транспорта из эндоплазматического ретикулума до комплекса Гольджи и деградации, что приводит к разнообразным фенотипическим проявлениям [19].

Мутации класса I

Мутации класса I (G542X, W1282X, R553X, 2143delT, 1677delTA) обнаруживают примерно у 10% пациентов с муковисцидозом. Если ген содержит мутацию этого класса, то белок МВТР не синтезируется или синтезируется его укороченный вариант, который подвергается деградации. К мутациям этого класса относятся нонсенс-мутации, мутации сдвига рамки считывания и мутации участка сплайсинга,

приводящие к образованию стоп-кодона, преждевременной терминации синтеза белка и образованию фрагмента, который не может выполнять функции изначально синтезируемого белка [19].

Мутации класса II

Миссенс-мутации класса II считаются наиболее распространенными у пациентов с муковисцидозом (del F508, del I 507, N1303 K, S541 I, S549 R). Среди мутаций II класса самой частой является F508del – делеция остатка фенилаланина в положении 508. Примерно 70% пациентов содержат мутацию в обеих копиях гена *CFTR* (гомозиготы), у 90% пациентов присутствует хотя бы один мутантный аллель [20]. Наиболее тяжелое течение заболевания наблюдается у гомозиготных пациентов, при этом у гетерозигот *CFTR*-F508del с одной нормальной копией гена отсутствуют признаки заболевания.

Мутация F508del вызывает неправильное сворачивание (фолдинг) белка и последующий его процессинг, в результате чего большинство мутантных молекул не достигает клеточной мембраны и уничтожается. Необходимо отметить, что около 1% таких молекул все же способны достигать клеточной поверхности, но, поскольку мутация нарушает подвижность доменов, необходимых для открывания и закрывания канала, эффективность функционирования белка остается очень низкой [21]. Кроме того, в течение нескольких минут белок удаляется с поверхности и уничтожается [22].

Мутации класса III

Примерно у 4–5% пациентов с муковисцидозом встречаются также миссенс-мутации III класса (G551 D, G1224 E, S1255 P), которые приводят к нарушению регуляции открытия ионного канала. Белок с такой мутацией достигает апикальной мембраны, но проводимость и проницаемость канала нарушаются. Среди мутаций этого класса наиболее распространена замена остатка глицина в положении 551 домена NBD1 на аспарагиновую кислоту (G551D). Эта мутация приводит к тому, что канал остается преимущественно закрытым [19, 21].

Мутации IV класса

Мутации класса IV встречаются наиболее редко (около 1.7%). Эти мутации (R117H, R334W, R347P) снижают транспорт ионов хлора через открытый канал МВТР [9]. Эти мутации приводят к замене положительно заряженных остатков аргинина в канале МВТР на незаряженные остатки (предполагается, что для транспорта через канал ионов Cl⁻ необходимо наличие в нем положительных зарядов). У пациентов с мутациями этого класса наблюдает-

ся, как правило, легкое течение болезни, чаще всего без легочных и панкреатических проявлений.

Мутации класса V–VI

В некоторых случаях клиницисты также выделяют мутации классов V–VI, при которых функциональный белок МВТР продуцируется, однако наблюдается замедление синтеза этого белка и его быстрое удаление с поверхности клеток, в результате чего клетки содержат недостаточное количество белка. Мутации этого класса приводят к сравнительно легкому течению заболевания [17].

ПАТОГЕНЕТИЧЕСКАЯ ТЕРАПИЯ МУКОВИСЦИДОЗА

На сегодняшний день FDA (*Food and Drug Administration*) одобрена схема терапии муковисцидоза с использованием малых молекул, которые способствуют поддержанию нормального функционирования хлорных каналов (модуляторы МВТР). Препараты под торговыми марками Kalydeco (VX-770), Orkambi (VX-809), Symdeco (VX-661) разработаны американской компанией Vertex Pharmaceuticals (рис. 3). Препарат Калидеко /Kalydeco (ивакафтор / ivacaftor) одобрен в США, Канаде и ЕС для лечения муковисцидоза у пациентов старше 6–12 месяцев, содержащих одну из 10 мутаций в гене *CFTR* (G551D, S1255P, G178R, S549N, G1244E, S1251N, G1349D, S549R, G551S или R117H). Препарат Оркамби/ Orkambi (лумакафтор + ивакафтор / lumacaftor + ivacaftor) применяется для лечения пациентов старше 12 лет с двумя копиями мутации F508del в гене *CFTR*. Симдеко/ Symdeco (тезакафтор + ивакафтор / tezacaftor + ivacaftor) предназначен для лечения пациентов старше 6 лет. В ходе скрининга на клетках эпителия бронхов пациентов, гомозиготных по мутации *CFTR*-F508del, установлено, что Симдеко в сочетании с ивакафтором повышает транспорт хлорида до уровня 15.7% от нормы. Это очень дорогие препараты (от 1 млн рублей за 1 упаковку), которые не обеспечивают полного излечения, т.е. оказывают только поддерживающий эффект. Тем не менее, благодаря этой терапии за последнее время достигнут значительный прогресс: средняя продолжительность жизни больных с муковисцидозом возросла более чем в 2 раза.

ГЕННАЯ ТЕРАПИЯ МУКОВИСЦИДОЗА

Открытие модуляторов МВТР, корректирующих работу дефектного белка, улучшило качество и продолжительность жизни, а также дало надежду большому количеству больных муковисцидозом. Однако примерно 10% пациентов к модуляторам МВТР невосприимчивы, поскольку у них МВТР

Таблица 1. Некоторые КИ генной терапии муковисцидоза*

Способ доставки гена <i>CFTR</i>	Метод	Клинические исследования	Ссылка
Аденовирус (Ad)	Назальное введение, эндобронхиальное введение	NCT00004779 NCT00004287	[26–29]
Аденоассоциированный вирус (AAV)	Введение в гайморовы пазухи, назальное введение, эндобронхиальное введение	NCT00073463 NCT00004533	[30–32]
Лентивирус (LV)	Интраназальное введение (перфузия)	Подготовка КИ	[33]
Наночастицы (липосомы), синтетические полимеры	Аэрозольное посредством небулайзера, интраназальное	NCT01621867 NCT00789867 NCT00004471 NCT00004806	[34–38]
Одноцепочечный антисмысловый РНК-олигонуклеотид (QR-010)	Интраназально	NCT02564354 NCT02532764	[39]

*Все КИ завершены.

либо вовсе не синтезируется, либо синтезируется на слишком низком уровне. Кроме того, по данным клинических исследований (КИ), 10–20% больных муковисцидозом обладают индивидуальной непереносимостью препаратов-модуляторов [24].

Поэтому в настоящее время разрабатываются новые подходы к лечению муковисцидоза, в частности, основанные на методах генной терапии, с помощью которых нуклеиновые кислоты доставляют в клетки больного с целью воздействия на первичную (генетическую) причину патологии и, таким образом, на течение болезни. Несмотря на то что муковисцидоз поражает многие органы, основным объектом генной терапии этого заболевания являются легкие, поскольку летальный исход в 90–95% случаев связан именно с тяжелым поражением легких. Основная стратегия генной терапии муковисцидоза предполагает доставку гена *CFTR* в эпителиальные клетки дыхательных путей больных. При этом при выборе способа доставки гена в клетки необходимо учитывать, что присутствие густого секрета в бронхиолах значительно снижает эффективность введения гена с помощью аэрозоля. Этот секрет накладывает дополнительные ограничения на проведение генной терапии, поскольку используемый вектор должен не только приводить к эффективной экспрессии функционального белка *CFTR*, но и обладать способностью проникать в клетки подслизистых желез и в поверхностный эпителий слизистой оболочки, покрытой плотным слоем секрета [2].

Начиная с 1993 года, проводятся КИ генотерапевтических препаратов, в которых целевые гены доставляют в эпителий носовых и бронхиальных дыхательных путей больных муковисцидозом с использованием как вирусных, так и невирусных систем. На сегодняшний день всего проведено более 27 КИ генной терапии муковисцидоза, в которые

были вовлечены более 600 пациентов, однако все они по той или иной причине пока не имели значительных успехов (табл. 1).

Необходимо отметить, что постоянное обновление эпителия дыхательных путей делает необходимой повторную доставку целевого трансгена в клетки. Это ограничивает использование систем на основе вирусных векторов, так как их повторное введение часто вызывает иммунный ответ и элиминацию векторов. Кроме того, недостаток подходящих *in vivo* моделей для тестирования эффективности новых векторов также сдерживает развитие исследований в данном направлении. Поэтому, несмотря на первоначальный энтузиазм, до сих пор нет ни одного одобренного FDA метода генной терапии муковисцидоза [25]. Тем не менее, усовершенствование технологий создания новых векторов, понимание особенностей разных серотипов векторов и создание новых *in vivo* моделей муковисцидоза дают надежду на разработку более эффективных способов генной терапии муковисцидоза [5].

Доставка трансгена с помощью векторов на основе аденовируса (Ad)

Первые КИ генной терапии муковисцидоза были направлены на использование Ad для доставки нормальной копии гена в клетки эпителия дыхательных путей (табл. 1). С использованием первого поколения Ad проведено два КИ [26–28, 40, 41], однако, несмотря на эффективность данного подхода на клеточных моделях и *in vivo*, результаты КИ поставили под вопрос безопасность применения этих векторов у человека. Врожденный и клеточный иммунитет препятствовали достижению долгосрочного эффекта при использовании векторов на основе аденовируса: наблюдалось увеличение альвеолярного воспаления наряду с повышением содержания

серотип-специфических нейтрализующих антител, что делало неэффективным повторное введение вирусных частиц [23].

Впоследствии для доставки трансгена использовали улучшенную Ad-платформу – хелперзависимый аденовирус (HD-Ad) с удаленными вирусными генами, что позволило устранить Т-клеточный ответ на вирусный белок, который наблюдался у Ad-векторов первого поколения. Тем не менее, оставалось присутствие адаптивного иммунного ответа CD8⁺ Т-клеток через презентацию HD-Ad-эпитопов дендритными клетками [42].

В легких HD-Ad использовали с применением лизофосфатидилхолина (LPC) для разрушения толстого слоя секрета и улучшения доступа к базолатеральной поверхности клеток, необходимой для инфекции. Посредством этой стратегии достигнута более длительная экспрессия трансгена *in vivo* по сравнению с первым поколением Ad, а также продемонстрирован эффективный перенос гена в дыхательные пути мышей, свиней и хорьков [43, 44].

Один из вариантов модификации Ad-платформы – использование транспозонов piggyBac, которые обеспечивают перенос гена посредством механизма «cut and paste» («вырезание и вставка»). Опосредованная транспозазой piggyBac-вставка в рекомбинантный Ad привела к созданию гибридного вектора piggyBac/Ad, использование которого позволило эффективно экспрессировать трансген в легких свиней [45].

Еще один подход к терапии муковисцидоза, который еще только предстоит подробно исследовать, – использование таких инструментов геномного редактирования, как TALEN (Transcription Activator-Like Effector Nucleases) и CRISPR (Clustered Regulatory Interspaced Short Palindromic Repeats)/Cas9. Эти появившиеся относительно недавно молекулярные методы редактирования генома уже показали свою эффективность и надежность [46]. Относительная безопасность и значительная емкость капсида векторов HD-Ad (36 т.п.н.) позволяют доставлять одновременно несколько конструкций, что дает возможность использования сайт-специфических нуклеаз для прицельного встраивания доставляемого гена строго в необходимый локус. Такая специфическая вставка нормальной копии гена в конкретный локус вместо коррекции мутированного белка дает преимущество с точки зрения возможности терапии муковисцидоза независимо от типа мутации гена *CFTR*. Один из примеров использования этого подхода приведен в работе Emily Xia и соавт. [47], в которой экспрессионную кассету с геном *CFTR* встроили в локус *AAVS1 in vitro* с помощью вектора HD-Ad, несущего также нуклеазу TALEN.

В клетках, трансдуцированных вектором с этой кассетой, детектировали экспрессию мРНК белка МВТР и восстановление функций этого белка [47]. Похожий подход применен *in vitro* и *in vivo* с использованием HD-Ad-вектора для точной доставки CRISPR/Cas9 и копии ДНК в локус GGTA1 генома эпителиальных клеток дыхательных путей свиньи. Показано, что трансдуцированные клетки экспрессировали функциональный МВТР на уровне мРНК и на уровне белка как *in vitro*, так и в моделях *in vivo*. Также для оценки экспрессии белка МВТР после трансдукции с помощью CRISPR/Cas9 создана генно-инженерная клеточная линия *CFTR*^{-/-} эпителия свиней. Измерение активности канала МВТР в трансдуцированных *CFTR*^{-/-} клетках показало восстановление функции анионного транспорта [48, 49]. Эти данные предполагают появление нового подхода к генной терапии муковисцидоза с использованием нуклеаз уже в ближайшем будущем.

Доставка с помощью аденоассоциированных (AAV) векторов

Замена мутированного варианта гена белка МВТР его функциональной копией оказалась довольно сложной задачей, поэтому после неудачи с Ad-векторами первого поколения начался поиск альтернативных вариантов системы доставки трансгена в целевые клетки. Отчеты о проведенных КИ с использованием вектора AAV2 (табл. 1) показывают, что введение вектора в легкие больных муковисцидозом не вызывало значимых побочных эффектов, однако эффективность вызывала разочарование: ни одно из КИ не показало значимой экспрессии МВТР или коррекции патологических проявлений муковисцидоза. Причинами отсутствия положительного результата могли стать недостаточная эффективность встройки трансгена (что может быть связано с невозможностью проникновения вирусных частиц через плотный слой секрета в дыхательных путях), недостаточная сила промотора в составе экспрессионной кассеты или иммунный ответ хозяина на введение вирусного вектора [50]. Поэтому в последние годы велись работы, направленные на улучшение тропизма AAV-векторов, поиска новых серотипов, новых промоторов, путей усиления экспрессии целевого белка и персистенции в легких, также подходов к снижению иммуногенности. Одновременно с этим шло развитие релевантных *in vivo* моделей, включающих свиней [51], овец [52], хорьков [53] и мышей [54], которые, наряду с традиционными *in vitro* тестами на эпителиальных клетках человека, позволили бы проводить более эффективные доклинические исследования генной терапии муковисцидоза.

Например, с помощью *in vivo* селекции был отобран AAV-вирус с высоким тропизмом к эпителию дыхательных путей свиней [51]. Усовершенствованный капсид AAV2H22 на основе AAV2 с пятью точечными мутациями приводил к 240-кратному увеличению эффективности специфического инфицирования эпителия дыхательных путей свиней. Одним из основных параметров оценки фенотипической эффективности терапии является транспорт Cl⁻. Введение AAV2H22-MBTP в дыхательные пути CFTR-null свиней, у которых отсутствовал функциональный ген *CFTR*, обеспечивало экспрессию MBTP в клетках эпителия, восстановление анионного транспорта, нормализацию pH секрета на поверхности дыхательных путей и его бактерицидных свойств [51].

Эффективность экспрессии трансгена повышали также с использованием AAV-вектора, содержащего ген укороченного белка CFTRDR под коротким цитомегаловирусным промотором CMV173. Трансдукция клеточных органоидов препаратом AAV-CFTRDR приводила к восстановлению функции MBTP. При этом также регистрировались изменения разности потенциалов на мембране клеток эпителия носовых дыхательных путей, что свидетельствовало о восстановлении нормального фенотипа у мышей, несущих самую распространенную при муковисцидозе мутацию ΔF508 [54]. Другой вариант решения проблемы ограниченного размера генетической конструкции, которая может быть упакована в AAV2, – создание короткого синтетического промотора [55] или получение гена *CFTR* с частичной делецией регуляторного домена [56].

Помимо этого, протестирован новый химерный вектор AAV2/HBoV1, полученный путем псевдотипирования: переноса генома AAV2 в капсид HBoV1 – респираторного бокавируса человека, который инфицирует дыхательные пути человека и обладает высоким тропизмом к апикальной поверхности клеток эпителия дыхательных путей человека [57]. Также это привело к увеличению емкости капсида, что позволило использовать более сильный промотор и полноценный ген *CFTR* [58]. Способность rAAV2/HBoV1 трансдуцировать клетки легочного эпителия хорьков (*Mustela putorius furo*) позволила создать *in vivo* модели для проведения доклинических исследований [53].

Тестирование девяти охарактеризованных серотипов AAV-векторов на эпителиальных клетках и на легких мышей привело к идентификации вектора AAV6 с наибольшим тропизмом к клеткам легочного эпителия мыши и человека [59, 60]. Показано, что эффективность трансдукции эпителиальных клеток дыхательных путей мыши AAV6

достигала 80%, при этом данный серотип обладал меньшей иммуногенностью по сравнению с AAV2-векторами, что делает AAV6 одним из наиболее предпочтительных векторов для генной терапии муковисцидоза и других легочных заболеваний [61]. Кроме того, с целью дальнейшего повышения эффективности трансдукции эпителиальных клеток вектором AAV6 ввели точечную мутацию в гене, кодирующем один из атипичных аминокислотных остатков F129, который обычно присутствует в составе белка капсида. Результирующий вектор AAV6.2 показал более высокую эффективность трансдукции как в клетках дыхательных путей мыши, так и в культурах клеток НАЭС (human airway epithelial cells). Выявлена стабильная экспрессия интраназально введенного макакам трансгена (2×10^{11} вирусных частиц) в течение 72 дней [59]. Преимущество проникновения AAV6-вектора через слизь, полученную от пациентов с муковисцидозом, показано также в новой мышинной модели, которая наиболее точно мимикрирует легочную патофизиологию при обструктивных легочных заболеваниях. Точечная мутация белка капсида предполагает потенциальный механизм, посредством которого AAV6 избегает адгезии к полимерной сетке, которую представляет из себя слизь при муковисцидозе и которая приводит к агрегации AAV-векторов других серотипов [62].

Нужно отметить, что на данный момент разработкой генной терапии муковисцидоза на основе AAV занимаются несколько фармацевтических компаний. По данным компании Abeona Therapeutics [63], доклинические исследования продукта ABO401, представляющего собой разработанный в компании капсид нового поколения AAV204, несущий функциональную копию mini-MBTP гена человека, позволяет эффективно восстанавливать основной фенотипический признак муковисцидоза – работу хлорных каналов – в *in vitro* и *in vivo* моделях. При этом AAV204 более специфично направлен на клетки легких, он трансдуцирует также бронхиальные и клетки назального эпителия больных муковисцидозом (уровень экспрессии MBTP в 3–5 раз выше в сравнении с AAV6-вектором).

Кроме того, в 2020 году препарат Spiro-2101 компании Spirovant Sciences, предназначенный для терапии муковисцидоза, получил от FDA статус «Орфанного лекарственного препарата», что позволит компании ускорить проведение клинических исследований и вывести препарат на рынок. В препарате Spiro-2101 также используется новый AAV-капсид с улучшенным тропизмом к клеткам эпителия дыхательных путей для доставки функциональной копии гена *CFTR*.

Доставка с помощью лентивирусных векторов

В генной терапии также широко применяются векторы на основе лентивирусов. Привлекательным аспектом их применения является тот факт, что они обладают низкой иммуногенностью, инфицируют различные типы клеток и способны стабильно интегрироваться в геном, что обеспечивает долговременную экспрессию и сохранение трансгена при делении клетки. Тем не менее, стоит учитывать, что стабильная интеграция в геном может приводить к инсерционному мутагенезу и, соответственно, к риску опухолевой трансформации (онкогенезу) [64]. На данный момент все разрабатываемые подходы к терапии муковисцидоза с использованием лентивирусных векторов (LV) находятся на стадии доклинических исследований, однако недавние успехи применения усовершенствованных лентивирусных векторов в различных КИ показали возможность и безопасность их использования и в терапии муковисцидоза [65].

Исследования на первичных культурах эпителия больных муковисцидозом и животных моделях показали длительную коррекцию фенотипа и низкую иммуногенность лентивирусных векторов. В частности, в экспериментах *in vivo* установлено восстановление функций МВТР-каналов в дыхательных путях свиней после трансдукции вирусом иммунодефицита кошек (FIV, feline immunodeficiency virus), псевдотипированным белком GP64, который обеспечивает апикулярный тропизм к клеткам НАЕ-ALI (human airway epithelium cultured at an air-liquid interface). Спустя 2 недели после введения FIV-МВТР в виде аэрозоля в нос и легкие наблюдалось значительное увеличение трансэпителиального транспорта Cl^- , а также восстановление рН трахеальной поверхностной жидкости и ее бактерицидных свойств [66].

В другом формате эксперимента использовали вирус иммунодефицита обезьян (SIV, simian immunodeficiency virus), псевдотипированный белком слияния вируса Сендай (Sendai virus fusion protein – F), геммагглютинином и нейраминидазой (HN). В доклинических исследованиях показано, что перенос гена МВТР в легкие с использованием этого вектора обеспечивал более эффективную трансдукцию клеток эпителия бронхов человека и эпителия легких мышей *in vivo*, чем невирусная доставка, и не вызывал какого-либо иммунного ответа [33].

В 2017 году Alton и соавт. проанализировали результаты нескольких доклинических исследований с целью выбора наиболее перспективного типа вектора для инициации и планирования первого КИ с использованием лентивирусной доставки трансгена МВТР. Лучшим кандидатом был признан

rSIV.F/HN, обеспечивающий экспрессию функционального МВТР, с эффективностью 90–100% при использовании клинически релевантных устройств для введения. Эти данные позволяют предположить возможность использования этого вектора в первом КИ у больных муковисцидозом [33]. Тем не менее, КИ так и не было начато, что наводит на мысль о том, что данный вектор нуждается в дополнительных доклинических исследованиях и в доказательствах его эффективности для генной терапии муковисцидоза.

Невирусная доставка с помощью липосом и полимерных наночастиц

Преимуществом липосом является простота масштабирования конечной формуляции препарата и емкость, подходящая для больших молекул ДНК. В 2015 году в одном из самых больших КИ, в котором липосомы рGM169/GL67A использовали для доставки МВТР, была показана безопасность применения этого препарата при муковисцидозе [67]. Безопасность многократного введения препарата подтверждена в следующем КИ с использованием липосом рGM169/GL67A. Впервые показали, что генная терапия смогла замедлить снижение функций легких больных муковисцидозом, однако эффект оставался недостаточным для признания терапии эффективной [34].

В последние несколько лет исследования были направлены на улучшение эффективности доставки с помощью липосом (рис. 4). В частности, установ-

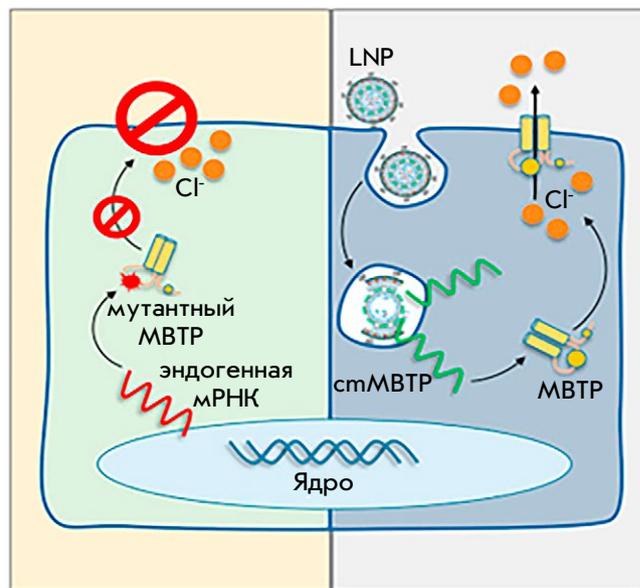


Рис. 4. Доставка LNP-cmМВТР. Адаптировано на основе [68]

лено, что использование клинически релевантных липосомных наночастиц (LNP) для упаковки и доставки химически модифицированной мРНК МВТР (смМВТР) в бронхиальные эпителиальные клетки от пациентов с муковисцидозом приводило к увеличению количества локализованного на мембране МВТР и восстановлению функционирования хлорных каналов [68].

Кроме того, интраназальное введение LNP-смМВТР приводило к восстановлению транспорта Cl^- в эпителии дыхательных путей у мышей МВТР-КО, которое продолжалось в течение 14 дней. Функциональная активность МВТР достигала пика на 3-й день после трансфекции, что проявлялось в восстановлении потока Cl^- до 55% от уровня у здоровых мышей. По эффективности эти результаты сравнимы с результатами использования ивакафтора (модулятор МВТР) и подтверждают возможность использования LNP-смМВТР для коррекции муковисцидоза и других моногенных заболеваний [68].

Известны также различные варианты использования полимеров, в частности, покрытие частиц плотным слоем полиэтиленгликоля (PEG), который обеспечивал проникновение частиц через толстый слой слизи *in vitro* и таким образом увеличивал эффективность трансфекции в легких мышей *in vivo* [69]. Интерес представляет также использование биodeградируемых триплексоформирующих пептидно-нуклеиновых кислот (PNA, Peptide nucleic acid), которые связываются с геномной ДНК и формируют триплексы PNA/ДНК/PNA, стимулирующие восстановление эндогенной ДНК. Доставка таких комплексов вместе с корректирующим геном приводит к сайт-специфическому исправлению гена [70]. В этом случае введение донорской ДНК *in vivo* в носовые пазухи и легкие гомозиготных мышей $\Delta F508del$ приводило к существенной коррекции мутации в эпителии дыхательных путей и облегчало течение заболевания [71].

Кроме того, описана первая попытка системного введения усовершенствованных полимерных наночастиц PNA LNP, несущих ДНК-редактирующие агенты и обладающие более высокой способностью попадать в клетки и более эффективно исправлять мутации. Внутривенное введение таких частиц приводило к их «правильному» биораспределению: частицы накапливались в дыхательных и желудочно-кишечных путях мышей, а функции МВТР в эпителиальных клетках полностью восстанавливались. Это первый случай успешного системного введения наночастиц для генной терапии муковисцидоза [72].

Антисмысловые олигонуклеотиды

Известно, что олигонуклеотиды и их комплексы применялись в качестве терапевтических молекул для восстановления ДНК-модификаций (ДНК-репарации) [73]. Эти олигомеры, содержащие РНК- и/или ДНК-нуклеотиды, используются для осуществления сайт-специфической репарации дефектной ДНК.

Недавно компания ProQR Therapeutics завершила два КИ возможности коррекции гена *CFTR*, опосредованной РНК. В этих КИ использовали интраназальное введение одноцепочечной антисмысловой РНК (eluforsen, QR-010), разработанной для специфического связывания с областью F508del в мРНК и восстановления функции МВТР в эпителии дыхательных путей. В предварительных исследованиях *in vitro* и *in vivo* на мышах было показано, что QR-010 способен быстро диффундировать через муковисцидоз-подобный секрет, что, по-видимому, обусловлено его небольшим размером и отрицательным зарядом. При этом QR-010 оставался стабильным в условиях одновременного применения стандартных терапевтических препаратов для муковисцидоза и в условиях бактериального инфицирования, а также наблюдались положительные изменения в транспорте хлоридов [74–77]. По результатам КИ показано, что QR-010 восстанавливает функцию МВТР у пациентов, гомозиготных по мутации *CFTR*-F508del: отмечено клинически значимое улучшение функционирования МВТР после трех интраназальных введений в течение 4 недель, которое проявлялось стабилизацией параметров транспорта Cl^- и Na^+ [78].

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

К настоящему времени, как показано с использованием доклинических моделей и в КИ муковисцидоза, уже достигнуты некоторые успехи в применении генно-терапевтических методов доставки функциональной копии гена *CFTR*. Тем не менее до сих пор существует проблема неэффективной доставки гена *CFTR* в эпителиальные клетки бронхолегочных путей. До сих пор не найден оптимальный подход, обеспечивающий экспрессию белка в эпителиальных клетках в количестве, необходимом для выраженного терапевтического эффекта. При этом необходимо учитывать, что вирусная доставка генетического материала при повторном использовании может закономерно вызывать иммунный ответ организма на вирусный капсид, что приведет к снижению эффективности терапии, а невирусные носители обладают недостаточно высокой проникающей способностью, чтобы преодолеть густой слой плотной слизи. Несмотря на то что в настоящее время отсутствует

одобренный FDA метод генной терапии муковисцидоза, основные критические условия, ограничивающие эффективность этой терапии, уже известны и ведется работа по их преодолению. Основываясь на уже имеющихся данных, необходимо разрабатывать более эффективные способы доставки, повышать эффективность проникновения препара-

рата через слой плотного секрета и минимизировать иммунный ответ организма на его введение. Стремительное развитие технологий генной инженерии в последние годы внушает уверенность в том, что этиотропная терапия муковисцидоза может стать реальностью уже в ближайшем будущем. ●

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Classification of cystic fibrosis and related disorders. Report of a Joint Working Group of WHO/ICF (M)/A/ECFS/ECFTN. World Health Organization. // *J. Cyst. Fibros.* 2002. V. 1. P. 5–8.
- Орлов А.В., Симонова О.И., Рославцева Е.А., Шадрин Д.И. Муковисцидоз (клиническая картина, диагностика, лечение, реабилитация, диспансеризация): Учебное пособие для врачей. СПб.: Северо-Западный государственный медицинский университет им. И.И. Мечникова, 2014. 160 с.
- Баранов А.А., Намазова-Баранова Л.С., Симонова О.И., Каширская Н.Ю., Рославцева Е.А., Горинова Ю.В., Красовский С.А., Селимзянова Л.Р. // *Педиатрическая фармакология.* 2015. Т. 12. № 5. С. 589–604.
- Клинические рекомендации. Кистозный фиброз (муковисцидоз): микробиологическая диагностика хронической респираторной инфекции. Минздрав РФ, 2020.
- Yan Z., McCray P.B., Engelhardt J.F. // *Hum. Mol. Genet.* 2019. V. 28. № R1. P. R88–R94.
- Смирнихина С.А., Лавров А.В. // *Гены & клетки.* 2018. Т. 13. № 3. С. 23–31.
- Bradley S.Q., Steven M.R. // *BMJ.* 2016. V. 352. i859.
- Гембицкая Т.Е., Черменский А.Г. // *Пульмонология и аллергология.* 2011. Т. 4. С. 35–39.
- Clunes M.T., Boucher R.C. // *Drug Discov. Today Dis. Mech.* 2007. V. 4. P. 63–72.
- Красовский С.А., Самойленко В.А., Амелина Е.Л. // *Практическая пульмонология.* 2013. Т. 1. С. 42–46.
- Rubin B.K. // *Paediatric Respir. Rev.* 2007. V. 8. № 1. P. 4–7.
- Ostedgaard L.S., Moninger T.O., McMenimen J.D., Sawin N.M., Parker C.P., Thornell I.M., Powers L.S., Gansmer N.D., Bouzek D.C., Cook D.P., et al. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2017. V. 114. № 26. P. 6842–6847.
- Boucher R.C. // *Trends Mol. Med.* 2007. V. 13. P. 231–240.
- Matsui H., Verghese M.W., Kesimer M., Schwab U.E., Randell S.H., Sheehan J.K., Grubb B.R., Boucher R.C. // *J. Immunol.* 2005. V. 175. № 2. P. 1090–1099.
- Kerem B., Rommens J.M., Buchanan J.A., Markiewicz D., Cox T.K., Chakravarti A., Buchwald M., Tsui L.C. // *Science.* 1989. V. 245. № 4922. P. 1073–1080.
- Rommens J.M., Iannuzzi M.C., Kerem B., Drumm M.L., Melmer G., Dean M., Rozmahel R., Cole J.L., Kennedy D., Hidaka N., et al. // *Science.* 1989. V. 245. № 4922. P. 1059–1065.
- Fajac I., Wainwright C.E. // *Presse Med.* 2017. V. 46. № 6. Pt 2. P. e165–e175.
- Welsh M.J., Smith A.E. // *Cell.* 1993. V. 73. № 7. P. 1251–1254.
- Maiuri L., Raia V., Kroemer G. // *Cell Death Differ.* 2017. V. 24. № 11. P. 1825–1844.
- Ameen N., Silvis M., Bradbury N.A. // *J. Cyst. Fibros.* 2007. V. 6. № 1. P. 1–14.
- Meng X., Clews J., Martin E.R., Ciuta A.D., Ford R.C. // *Biochem. Soc. Trans.* 2018. V. 46. № 5. P. 1093–1098.
- Meng X., Clews J., Kargas V., Wang X., Ford R.C. // *Cell Mol. Life Sci.* 2017. V. 74. № 1. P. 23–38.
- Cooney A.L., McCray P.B., Sinn P.L. // *Genes (Basel).* 2018. V. 9. № 11. P. 538.
- Burgener E.B., Moss R.B. // *Curr. Opin. Pediatr.* 2018. V. 30. № 3. P. 372–377.
- Burney T.J., Davies J.C. // *Appl. Clin. Genet.* 2012. V. 5. P. 29–36.
- Zabner J., Couture L.A., Gregory R.J., Graham S.M., Smith A.E., Welsh M.J. // *Cell.* 1993. V. 75. P. 207–216.
- Crystal R.G., McElvaney N.G., Rosenfeld M.A., Chu C.S., Mastrangeli A., Hay J.G., Brody S.L., Jaffe H.A., Eissa N.T., Danel C. // *Nat. Genet.* 1994. V. 8. P. 42–51.
- Boucher R.C., Knowles M.R., Johnson L.G., Olsen J.C., Pickles R., Wilson J.M., Engelhardt J., Yang Y., Grossman M. // *Hum. Gene Ther.* 1994. V. 5. P. 615–639.
- Zuckerman J.B., Robinson C.B., McCoy K.S., Shell R., Sferra T.J., Chirmule N., Magosin S.A., Probert K.J., Brown-Parr E.C., Hughes J.V., et al. // *Hum. Gene Ther.* 1999. V. 10. № 18. P. 2973–2985.
- Wagner J.A., Nepomuceno I.B., Messner A.H., Moran M.L., Batson E.P., Dimiceli S., Brown B.W., Desch J.K., Norbash A.M., Conrad C.K., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2002. V. 13. № 11. P. 1349–1359.
- Moss R.B., Milla C., Colombo J., Accurso F., Zeitlin P.L., Clancy J.P., Spencer L.T., Pilewski J., Waltz D.A., Dorkin H.L., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2007. V. 18. № 8. P. 726–732.
- Flotte T.R., Zeitlin P.L., Reynolds T.C., Heald A.E., Pedersen P., Beck S., Conrad C.K., Brass-Ernst L., Humphries M., Sullivan K., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2003. V. 14. № 11. P. 1079–1088.
- Alton E.W., Beekman J.M., Boyd A.C., Brand J., Carlon M.S., Connolly M.M., Chan M., Conlon S., Davidson H.E., Davies J.C., et al. // *Thorax.* 2017. V. 72. № 2. P. 137–147.
- Alton E.W., Armstrong D.K., Ashby D., Bayfield K.J., Bilton D., Bloomfield E.V., Boyd A.C., Brand J., Buchan R., Calcedo R., et al. // *Lancet Respir. Med.* 2015. V. 3. № 9. P. 684–691.
- Alton E.W., Stern M., Farley R., Jaffe A., Chadwick S.L., Phillips J., Davies J., Smith S.N., Browning J., Davies M.G., et al. // *Lancet.* 1999. V. 353. № 9157. P. 947–954.
- Caplen N.J., Alton E.W., Middleton P.G., Dorin J.R., Stevenson B.J., Gao X., Durham S.R., Jeffery P.K., Hodson M.E., Coutelle C., et al. // *Nat. Med.* 1995. V. 1. № 1. P. 39–46.
- Yoshimura K., Rosenfeld M.A., Nakamura H., Scherer E.M., Pavirani A., Lecocq J.P., Crystal R.G. // *Nucl. Acids Res.* 1992. V. 20. P. 3233–3240.
- Ruiz F.E., Clancy J.P., Perricone M.A., Bebok Z., Hong J.S., Cheng S.H., Meeker D.P., Young K.R., Schoumacher R.A., Weatherly M.R., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2001. V. 12. № 7. P. 751–761.
- Sermet-Gaudelus I., Clancy J.P., Nichols D.P., Nick J.A., De Boeck K., Solomon G.M., Mall M.A., Bolognese J., Bouisset F., den Hollander W., et al. // *J. Cyst. Fibros.* 2019. V. 18. № 4. P. 536–542.

40. Knowles M.R., Hohneker K.W., Zhou Z., Olsen J.C., Noah T.L., Hu P.C., Leigh M.W., Engelhardt J.F., Edwards L.J., Jones K.R., et al. // *N. Engl. J. Med.* 1995. V. 333. P. 823–831.
41. Crystal R.G., Jaffe A., Brody S., Mastrangeli A., McElvaney N.G., Rosenfeld M., Chu C.S., Danel C., Hay J., Eissa T. // *Hum. Gene Ther.* 1995. V. 6. P. 643–666.
42. Kushwah R., Cao H., Hu J. // *J. Immunol.* 2008. V. 180. № 6. P. 4098–4108.
43. Yan Z., Stewart Z.A., Sinn P.L., Olsen J.C., Hu J., McCray P.B., Engelhardt J.F. // *Hum. Gene Ther. Clin. Dev.* 2015. V. 26. P. 38–49.
44. Cao H., Ouyang H., Grasemann H., Bartlett C., Du K., Duan R., Shi F., Estrada M., Seigel K.E., Coates A.L., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2018. V. 29. P. 643–652.
45. Cooney A.L., Singh B.K., Loza L.M., Thornell I.M., Hippee C.E., Powers L.S., Ostedgaard L.S., Meyerholz D.K., Wohlford-Lenane C., Stoltz D.A., et al. // *Nucl. Acids Res.* 2018. V. 46. P. 9591–9600.
46. Немудрый А.А., Валетдинова К.Р., Медведев С.П., Закиян С.М. // *Acta Naturae.* 2014. Т. 6. № 3. С. 20–42.
47. Xia E., Zhang Y., Cao H., Li J., Duan R., Hu J. // *Genes (Basel).* 2019. V. 10. № 1. P. 39.
48. Zhou Z.P., Yang L.L., Cao H., Chen Z.R., Zhang Y., Wen X.-Y., Hu J. // *Hum. Gene Ther.* 2019. V. 30. № 9. P. 1101–1116.
49. Zhou Z.P., Yang L.L., Cao H., Wen X.-Y., Hu J. // *ASGCT meeting 2019. Mol. Therapy. V. 27. № 4S1.*
50. Guggino W.B., Cebotaru L. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2017. V. 17. № 10. P. 1265–1273.
51. Steines B., Dickey D.D., Bergen J., Excoffon K.J., Weinstein J.R., Li X., Yan Z., Abou Alaiwa M.H., Shah V.S., Bouzek D.C., et al. // *JCI Insight.* 2016. V. 1. № 14. P. e88728.
52. McClain L.E., Davey M.G., Zoltick P.W., Limberis M.P., Flake A.W., Peranteau W.H. // *J. Pediatr. Surg.* 2016. V. 51. P. 879–884.
53. Yan Z., Feng Z., Sun X., Zhang Y., Zou W., Wang Z., Jensen-Cody C., Liang B., Park S.Y., Qiu J., et al. // *Hum. Gene Ther.* 2017. V. 28. P. 612–625.
54. Vidovic D., Carlon M.S., da Cunha M.F., Dekkers J.F., Hollenhorst M.I., Bijvelds M.J., Ramalho A.S., van den Haute C., Ferrante M., Baekelandt V., et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2016. V. 193. P. 288–298.
55. Yan Z., Sun X., Feng Z., Li G., Fisher J.T., Stewart Z.A., Engelhardt J.F. // *Hum. Gene Ther.* 2015. V. 26. P. 334–346.
56. Ostedgaard L.S., Rokhlina T., Karp P.H., Lashmit P., Afione S., Schmidt M., Zabner J., Stinski M.F., Chiorini J.A., Welsh M.J. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2005. V. 102. P. 2952–2957.
57. Yan Z., Keiser N.W., Song Y., Deng X., Cheng F., Qiu J., Engelhardt J.F. // *Mol. Ther.* 2013. V. 21. P. 2181–2194.
58. Yan Z., Zou W., Feng Z., Shen W., Park S.Y., Deng X., Qiu J., Engelhardt J.F. // *Hum. Gene Ther.* 2019. V. 30. P. 556–570.
59. Limberis M.P., Vandenberghe L.H., Zhang L., Pickles R.J., Wilson J.M. // *Mol. Ther.* 2007. V. 15. № 1. P. S160. doi: 10.1016/S1525-0016(16)44621-6
60. Kurosaki F., Uchibori R., Mato N., Sehara Y., Saga Y., Urabe M., Mizukami H., Sugiyama Y., Kume A. // *Gene Ther.* 2017. V. 24. P. 290–297.
61. Halbert C.L., Allen J.M., Miller A.D. // *J. Virol.* 2001. V. 75. № 14. P. 6615–6624.
62. Duncan G.A., Kim N., Colon-Cortes Y., Rodriguez J., Mazur M., Birket S.E., Rowe S.M., West N.E., Livraghi-Butrico A., Boucher R.C., et al. // *Mol. Ther. Meth. Clin. Dev.* 2018. V. 9. P. 296–304.
63. Wille P.T., Rosenjack J., Cotton C., Kelley T., Padegimas L., Miller T.J. // *J. Cyst. Fibros.* 2019. V. 18. P. S39. doi: 10.1016/S1569-1993(19)30241-3
64. Черенкова Е.Е., Исламов Р.Р., Ризванов А.А. // *Международный журн. прикладных и фундаментальных исследований.* 2013. Т. 11. № 2. С. 57–58.
65. Marquez Loza L.I., Yuen E.C., McCray P.B. Jr. // *Genes (Basel).* 2019. V. 10. № 3. P. 218.
66. Cooney A.L., Abou Alaiwa M.H., Shah V.S., Bouzek D.C., Stroik M.R., Powers L.S., Gansemer N.D., Meyerholz D.K., Welsh M.J., Stoltz D.A., et al. // *JCI Insight.* 2016. V. 1. № 14. P. e88730.
67. Alton E.W., Boyd A.C., Porteous D.J., Davies G., Davies J.C., Griesenbach U., Higgins T.E., Gill D.R., Hyde S.C., Innes J.A., et al. // *Am. J. Respir. Crit. Care Med.* 2015. V. 192. P. 1389–1392.
68. Robinson E., MacDonald K.D., Slaughter K., McKinney M., Patel S., Sun C., Sahay G. // *Mol. Ther.* 2018. V. 26. № 8. P. 2034–2046.
69. Mastorakos P., da Silva A.L., Chisholm J., Song E., Choi W.K., Boyle M.P., Morales M.M., Hanes J., Suk J.S. // *Proc. Natl. Acad. Sci. USA.* 2015. V. 112. P. 8720–8725.
70. Quijano E., Bahal R., Ricciardi A., Saltzman W.M., Glazer P.M. // *J. Biol. Med.* 2017. V. 90. № 4. P. 583–598.
71. McNeer N.A., Anandalingam K., Fields R.J., Caputo C., Kopic S., Gupta A., Quijano E., Polikoff L., Kong Y., Bahal R., et al. // *Nat. Commun.* 2015. V. 6. P. 6952.
72. Piotrowski-Daspit A.S., Barone C., Kauffman A.C., Lin C.Y., Nguyen R., Gupta A., Glazer P.M., Saltzman W.M., Egan M.E. // *J. Cyst. Fibros.* 2021. V. 20. P. S277. doi: 10.1016/S1569-1993(21)02005-1
73. Papaioannou I., Simons J.P., Owen J.S. // *Expert Opin. Biol. Ther.* 2012. V. 12. № 3. P. 329–342.
74. Beumer W., Swildens J., Henig N., Anthonijsz H., Biasutto P., Teresinha L., Ritsema T. // *J. Cyst. Fibros.* 2015. V. 14. P. S1. doi: 10.1016/S1569-1993(15)30002-3
75. Brinks V., Lipinska K., Koppelaar M., Matthee B., Button B.M., Livraghi-Butrico A., Henig N. // *J. Cyst. Fibros.* 2016. V. 15. № 1. P. S31. doi: 10.1016/S1569-1993(16)30168-0
76. Beumer W., Swildens J., Leal T., Noel S., Anthonijsz H., van der Horst G., Kuiperij-Boersma H., Potman M., van Putten C., Biasutto P., et al. // *PLoS One.* 2019. V. 14. № 6. P. e0219182.
77. Brinks V., Lipinska K., Jager M., Beumer W., Button B., Livraghi A., Henig N., Matthee B. // *J. Aerosol Med. Pulmonary Drug Delivery.* 2019. V. 32. № 5. P. 303–316.
78. Sermet-Gaudelus I., Clancy J.P., Nichols D.P., Nick J.A., De Boeck K., Solomon G.M., Mall M.A., Bolognese J., Bouisset F., den Hollander W., et al. // *J. Cyst. Fibros.* 2019. V. 18. № 4. P. 536–542.

УДК 577.214

Длинная некодирующая РНК MALAT1 и ее роль в канцерогенезе молочной железы

М. М. Цыганов^{1,2*}, М. К. Ибрагимова^{1,2,3}¹Научно-исследовательский институт онкологии, Томский национальный исследовательский медицинский центр РАН, Томск, 634050 Россия²Сибирский государственный медицинский университет Министерства здравоохранения Российской Федерации, Томск, 634050 Россия³Национальный исследовательский Томский государственный университет, Томск, 634050 Россия

*E-mail: TsyganovMM@yandex.ru

Поступила в редакцию 26.12.2022

Принята к печати 02.03.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11905

РЕФЕРАТ Длинная некодирующая РНК MALAT1 (NEAT2) участвует в регуляции множества клеточных процессов, а также в патогенезе различных злокачественных новообразований, в том числе рака молочной железы. В обзоре рассмотрены результаты экспериментального и клинического исследования роли MALAT1 в канцерогенезе и прогрессии рака молочной железы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА MALAT1, NEAT2, рак молочной железы, длинные некодирующие РНК, канцерогенез.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ мяРНК – малые ядерные РНК; РМЖ – рак молочной железы; ТНРМЖ – трижды негативный рак молочной железы; ЭМП – эпителиально-мезенхимальный переход; Δ sv-MALAT1 – small variant MALAT1, малый транскрипт MALAT1; ER1 – эстрогеновый рецептор 1; MALAT1 – metastasis associated lung adenocarcinoma transcript 1, транскрипт 1, ассоциированный с метастазированием аденокарциномы легкого; mascРНК – MALAT1-associated small cytoplasmic RNA, мцРНК – малая цитоплазматическая РНК, ассоциированная с MALAT1; MMTV-ПуМТ – Mouse mammary tumor virus-Polyomavirus middle T-antigen, вирус опухоли молочной железы мышей и малый Т-антиген полиомавируса; нкРНК – некодирующая РНК; sh-MALAT1 – short hairpin RNA, короткие шпилечные РНК MALAT1; siMALAT1 – малые интерферирующие РНК к MALAT1.

ВВЕДЕНИЕ

Одним из самых распространенных злокачественных новообразований у женщин по-прежнему является рак молочной железы (РМЖ) [1]. РМЖ характеризуется высокой гетерогенностью, которая приводит к различиям в чувствительности к терапии, прогнозе, метастазированию и рецидивированию, что затрудняет проведение успешной терапии. Поэтому на первый план при РМЖ выходит назначение персонализированного предоперационного лечения [2]. В настоящее время хорошо изучены такие молекулярные маркеры РМЖ, как мембранные рецепторы опухолевых клеток, белок p53, антиген Ki-67, гены *BRCA1* и *BRCA2*, различные микроРНК и некоторые другие, что позволяет классифицировать опухоли и прогнозировать исход лечения [3]. На данный момент выделяют пять молекулярно-биологических подтипов РМЖ: люминальный А ER⁺: не содержит HER2, низкое содержание Ki-67

($\leq 20\%$), высокое содержание рецепторов прогестерона (PR) ($\geq 20\%$); люминальный В HER2: ER⁺, HER2⁺; присутствует один из следующих факторов: Ki-67 высокий ($\geq 30\%$), PR низкие ($< 20\%$); люминальный В HER2 положительный: ER положительный, HER2 положительный, Ki-67 любой, PR любые; HER2⁺: HER2⁺, ER⁻ и PR⁻, Ki-67 любой; трижды негативный (ТНРМЖ): ER⁻, PR⁻, HER2⁻ [4]. Однако мишени, воздействие на которые эффективно при трижды негативном РМЖ, практически отсутствуют.

Совершенствование технологий секвенирования генома позволило обнаружить, что помимо белоккодирующих РНК, геном человека кодирует не-транслируемые (некодирующие) РНК (нкРНК), которые составляют большую часть генома – около 98% [5]. Некодирующие РНК вовлечены в процессы генетической и эпигенетической регуляции, поэтому в настоящий момент времени идет активное изучение их функций и участия в процессах

опухолевой прогрессии [6]. нкРНК подразделяются на малые (микро) и длинные некодирующие РНК (миРНК и днРНК соответственно). Особый интерес представляют длинные некодирующие РНК, которые выполняют множество различных функций в клетке и участвуют в различных процессах [6, 7]. На данный момент установлены функции 2% днРНК. Можно выделить три категории функций днРНК. днРНК действуют как сигнальные молекулы, регулируют транскрипцию, участвуя в сборке РНК-полимераз в области энхансера, инициируют расщепление РНК, а также связаны с плюрипотентностью и репрограммированием клеток. днРНК действуют в качестве «ловушек» для миРНК, они также служат «проводниками», которые связываются с белками и доставляют их в места, где белки участвуют в *транс*- и *цис*-регуляции экспрессии генов за счет связывания с гетеродуплексами ДНК: РНК, триплексами РНК:ДНК:ДНК; взаимодействуют с белками группы поликомб и триторакс, не давая им модифицировать гистоны, тем самым осуществлять эпигенетическую регуляцию и ремоделирование хроматина. днРНК инициируют сборку РНК-комплексов, которые служат местами сборки белков и контролируют работу белков в стрессовых условиях [6, 8–12]. Одной из интересных днРНК является РНК MALAT1, ассоциированная с метастазированием аденокарциномы легких [13].

ДЛИННАЯ НЕКОДИРУЮЩАЯ РНК MALAT1

Впервые РНК MALAT1 обнаружили при изучении экспрессии генов в метастатических опухолях немелкоклеточного рака легкого (НМРЛ) [13]. MALAT1, известная так же как NEAT2 (nuclear enriched abundant transcript 2), располагается в нуклеоплазме в ядерных спеклях – структурах, выполняющих разнообразные функции, главная из которых – регуляция сплайсинга пре-мРНК и транскрипции [14]. Безинтронный ген *MALAT1*, локализованный в локусе 11q13.1, кодирует транскрипт, состоящий примерно из 8700 нуклеотидов [15, 16]. Ген *MALAT1* расположен в области с высокой плотностью генов с очень высокой синтетической эволюционной консервативностью [17]. Так, исключительной особенностью *MALAT1* является консервативность ее нуклеотидной последовательности (у позвоночных общая консервативность превышает 50% и 80% – в 3'-концевой области) [18]. Транскрипт MALAT1 обычно имеет длительный период полужизни – в В-клетках человека он остается стабильным в течение 16 ч и 9–12 ч в опухолевых клетках [19]. Время полужизни MALAT1 больше, чем у других днРНК, вероятно, из-за наличия структуры тройной спирали на ее 3'-конце [20].

MALAT1 транскрибируется РНК-полимеразой II с длинного плеча хромосомы 11 (11q13) человека (рис. 1). Образование этой днРНК зависит от процессинга тРНК, который позволяет получить две некодирующие РНК с одного локуса, которые локализируются в разных субклеточных компартментах и выполняют разные функции [21]. Эндонуклеаза РНКазы Р распознает эту тРНК-подобную структуру и расщепляет ее, чтобы одновременно образовался зрелый 3'-конец длинного транскрипта MALAT1 и 5'-конец тРНК-подобной малой РНК. Дополнительные ферменты, участвующие в биогенезе тРНК, включая РНКазу Z и фермент, добавляющий ССА, затем обрабатывают малую РНК с образованием зрелого транскрипта из 61 нуклеотида, известного как масРНК (малая цитоплазматическая РНК, ассоциированная с MALAT1). Как только первичный транскрипт MALAT1 обработан, масРНК экспортируется в цитоплазму, а длинный транскрипт остается в ядре в виде ядерных спеклей [22].

Длинная некодирующая РНК MALAT1 накапливается в ядре, где играет решающую роль в прогрессировании рака и формировании ядерных параспеклей соответственно.

MALAT1 выполняет множество различных функций (рис. 2): 1) действует как ядерный каркас на периферии спеклей для трансдействующих белковых факторов, таких, как белки SR, что приводит к модуляции пре-сплайсинга и альтернативного сплайсинга; 2) участвует в посттранскрипционной регуляции генов, ассоциированных с подвижностью клеток [23]; 3) участвует в регуляции многих процессов совместно с микроРНК [24–27], а также в эпигенетической регуляции – например, у больных РМЖ MALAT1 связывается с промотором гена *EEF1A1*, кодирующего фактор элонгации трансляции $\alpha 1$ (Eukaryotic Translation Elongation Factor 1 Alpha 1), что приводит к метилированию гистона H3 [28].

MALAT1 не только играет регуляторную роль, но и участвует во множестве сигнальных путей, например, в каскадах TGF- β /Smad и p53 [11, 29]. Интересно, что MALAT1 может связываться с другими нкРНК и пре-мРНК в основном только через медиаторные белки, а с хроматином – только в области активно сплайсируемых генов [14].

Стоит отметить и альтернативный сплайсинг, изменения в котором все чаще признаются возможным патогенным механизмом канцерогенеза. Альтернативный сплайсинг – это посттранскрипционный механизм, который увеличивает сложность транскриптома за счет экспрессии множества различных мРНК отдельных генов, таким образом потенциально генерируя различные изоформы бел-

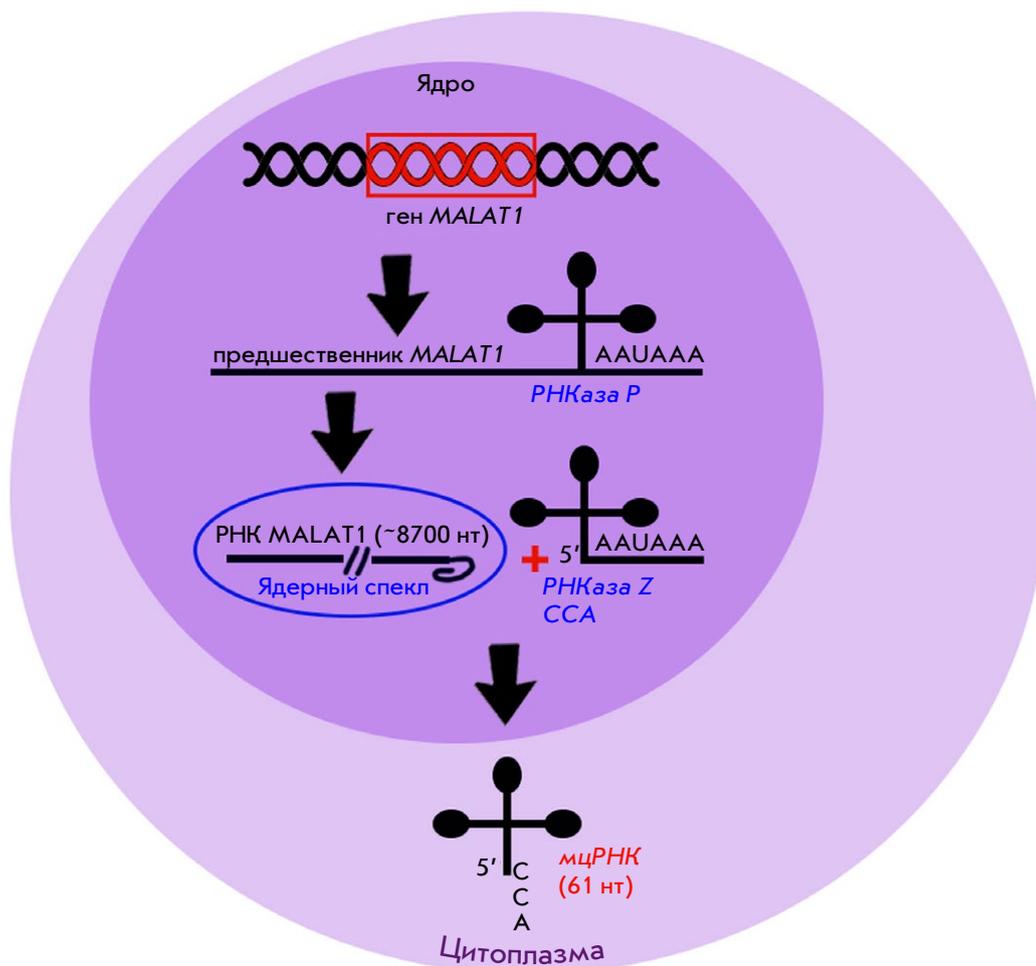


Рис. 1. Схема синтеза длинной некодирующей РНК MALAT1 в клетке

ков [30]. Проведенный Meseure D. скрининг базы данных dbEST (database Expressed Sequence Tags) привел к обнаружению Δ sv-MALAT1 (малого транскрипта MALAT1), основного продукта альтернативного сплайсинга MALAT1. В опухолях молочной железы Δ sv-MALAT1 экспрессируется преимущественно на низком уровне [31].

УЧАСТИЕ MALAT1 В КАНЦЕРОГЕНЕЗЕ МОЛОЧНОЙ ЖЕЛЕЗЫ

Изучение роли MALAT1 в процессах канцерогенеза представляет большой интерес, поскольку эта РНК участвует в регуляции множества клеточных процессов. Так, экспрессия транскрипта MALAT1 нарушена при различных онкологических заболеваниях и в опухолях разной локализации [32]. Впервые участие MALAT1 в процессах канцерогенеза обнаружено у больных немелкоклеточным раком легкого и было показано, что MALAT1 связана с повышенным риском развития метастазов

и неблагоприятным исходом при плоскоклеточном раке и аденокарциноме легкого [13]. Weber и соавт. предположили, что уровень MALAT1 в сыворотке крови больных раком легкого может быть потенциальным биомаркером этого заболевания [33]. Более того, сверхэкспрессия MALAT1 наблюдается в клетках гепатоцеллюлярной карциномы человека, РМЖ, рака поджелудочной железы, рака толстой кишки [32] и вовлечена в регуляцию экспрессии некоторых генов, ассоциированных со способностью к метастазированию [10, 34] и опухолевой прогрессии РМЖ [27]. Согласно Liu С. и соавт., экспрессия MALAT1 положительно коррелирует с метастазированием рака легкого и отрицательно коррелирует с прогнозом заболевания; это важный прогностический маркер для пациентов с НМРЛ [35]. Данные об участии MALAT1 в опухолевых процессах вызвали большой интерес к изучению онкогенной роли MALAT1 и ее участия в метастазировании опухолей молочной железы. Так, MALAT1 играет критически значи-

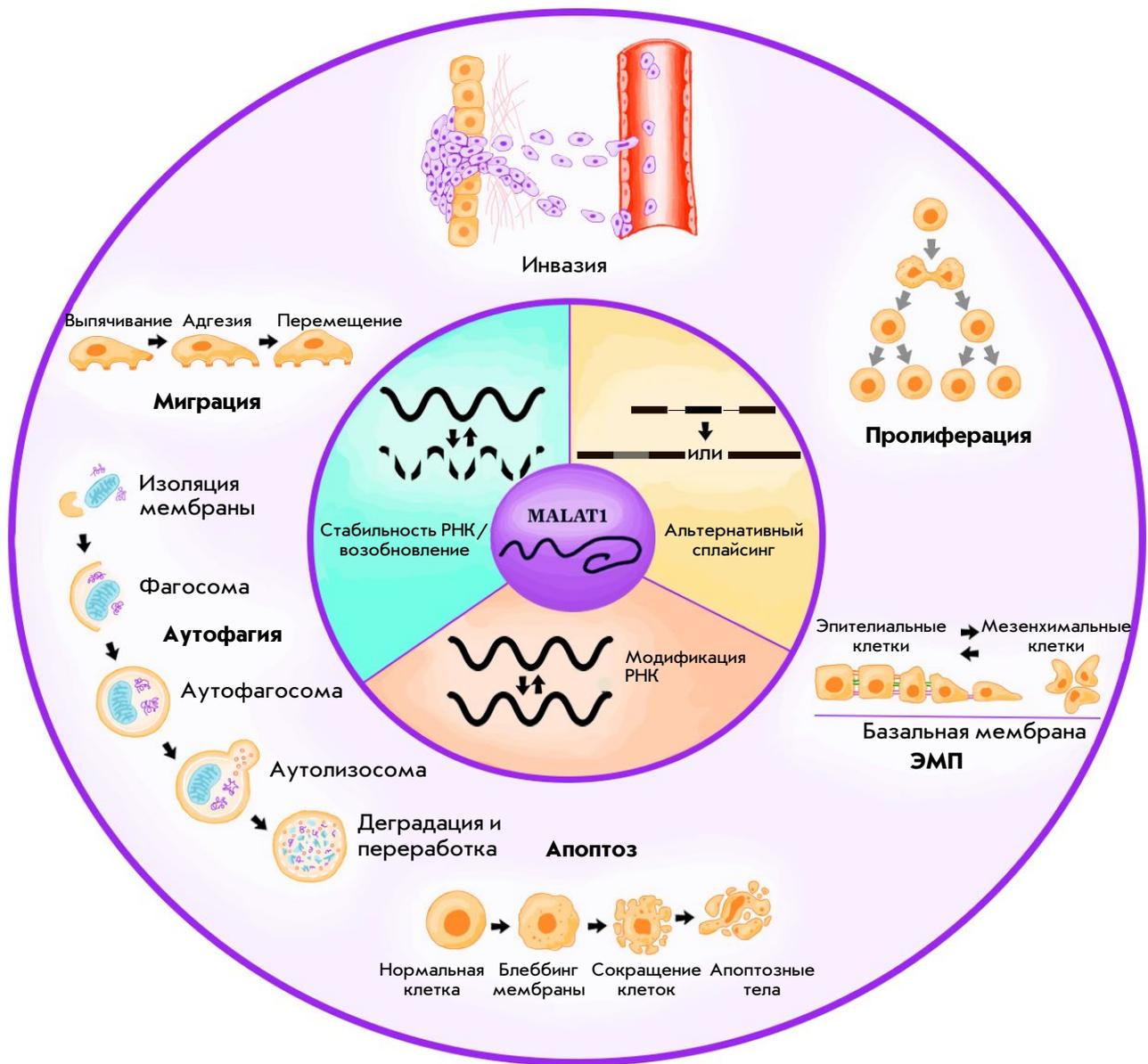


Рис. 2. Основные функции длинной некодирующей РНК MALAT1 в клетке

мую роль в регуляции транскрипции и клеточного цикла, в эпигенетической регуляции, процессах воспаления и метастазирования опухоли (рис. 2) [36]. MALAT1 влияет на возникновение и развитие опухолей различных локализаций, включая рак гортани, гортаноглотки, щитовидной железы, пищевода, легких, печени и яичников [37–40]. Таким образом, MALAT1 является одним из важных факторов, играющих роль в регуляции молекулярных путей, приводящих к фенотипическим проявлениям рака [16]. Далее роль MALAT1 при РМЖ будет рассмотрена более детально.

Исследования *in vitro*

Механизмы, вызывающие миграцию и инвазию клеток, и изучение метастатического каскада при РМЖ представляют большой интерес. Участие MALAT1 в регуляции способности клеток к миграции и инвазии подтверждено во многих работах. Ранее сообщалось, что MALAT1 регулирует пролиферацию клеток рака шейки матки и желудка, а также их устойчивость к цисплатину посредством пути PI3K/Akt [41, 42]. Одним из первых этапов метастазирования является эпителиально-мезенхимальный переход (ЭМП) опухолевых клеток [43].

В работе Xu S. и соавт. изучена роль MALAT1 в процессе ЭМП при раке молочной железы: обнаружено, что MALAT1 способствует миграции и инвазии клеток рака молочной железы (MDA-MB-231, MDA-MB-453, MCF10A, SK-BR-3, BT549) *in vitro*, а более низкий уровень экспрессии MALAT1 связан с метастазированием рака молочной железы, то есть MALAT1 действует как индуктор ЭМП, активируя путь PI3K-Akt [23]. Аналогичные результаты получены также Wu Y. и соавт., которые показали, что путь PI3K/Akt, опосредующий связывание FOXO1 с промотором *MALAT1*, может быть механизмом, при котором *MALAT1* индуцирует ЭМП и снижает чувствительность клеток HER2⁺ рака молочной железы к трастузумабу [44]. Отличительной чертой этого исследования является то, что экспрессия MALAT1 была оценена в семи клеточных линиях РМЖ, которые включали клеточные линии подтипов ER⁺/HER2⁻, ER⁺/HER2⁺, ER⁻/HER2⁺ и ТНРМЖ. Среди этих клеточных линий самый высокий уровень MALAT1 выявлен в клетках метастатического трижды негативного рака молочной железы и в устойчивых к трастузумабу клетках HER2⁺ [44]. Клетки культур трижды негативного РМЖ (MDA-MB-231, клетки первичных опухолей ТНРМЖ, Hs578T, HCC1806) характеризовались более низким уровнем MALAT1, чем ER⁺-клетки (MCF-7, клетки первичных ER⁺ опухолей, T-47D) [27, 45, 46]. Обнаружено, что сверхэкспрессия MALAT1, ассоциированная с метастазированием, может негативно коррелировать с экспрессией продукта Nisch – белка-супрессора опухолевого роста, экспрессия которого снижена у больных РМЖ [47]. В культурах клеток 231-GFP-Nisch (MDA-MB-231 со сверхэкспрессией Nisch) уровни экспрессии Nisch ассоциированы с уровнями MALAT1 – нокаут транскрипта гена *Nisch* в таких клетках приводит к усилению способности клеток к пролиферации и миграции [47].

Zhang P. и соавт. показано, что опухолевые клетки секретируют MALAT1 в клетках-реципиентах для регуляции пролиферации рецепторных клеток в микроокружении опухоли. MALAT1 экспрессируется на значительном уровне в клетках рака молочной железы: экзосомы MDA-MB-231 значительно увеличивают пролиферацию клеток MDA-MB-231 и ZR-75-1; однако экзосомы из клеток MDA-MB-231, обработанных MALAT1-siPHK (small interfering RNA, малые интерферирующие РНК, MALAT1-направленная siPHK), вызывали снижение пролиферации клеток при раке молочной железы [48]. Ранее в своем исследовании Jin C. и соавт. показали, что нокаут *MALAT1* в клетках ТНРМЖ приводит к подавлению способности клеток к пролиферации, инвазии и запускает апоптоз, что достигается пу-

тем обратной регуляции транскриптома РНК miR-1 и ее белка-мишени – эпителиально-мезенхимального перехода – Slug [45]. Механизм функционирования данного процесса более подробно описан на культурах MDA-MB-231 и MCF-7 с применением метода трансфекции плазмидных векторов. Сверхэкспрессия MALAT1 увеличивает способность клеток к миграции и инвазии за счет связывания с miR-1 и снижению уровня Cdc42 – белка, задействованного в процессе ЭМП [26]. Более того, с использованием ингибирования MALAT1 при помощи siMALAT1 и, наоборот, путем встраивания вектора, сверхэкспрессирующего MALAT1 в линии клеток РМЖ, выявили, что экспрессия MALAT1 напрямую влияет на экспрессию miR-124 – микроРНК, связанной с подавлением прогрессии РМЖ, сверхэкспрессия MALAT1 подавляет ингибиторный эффект miR-124 на рост опухоли молочной железы, приводя к увеличению ее размеров [25].

На культуре клеток 4T14T1 – высокометастатической клеточной линии рака молочной железы, полученной из спонтанной опухоли молочной железы мышей BALB/c, Li Z. и соавт. обнаружили новый механизм, с помощью которого MALAT1 может участвовать в регуляции ЭМП в опухолях молочной железы. Было показано, что транскрипт обладает провоспалительной активностью и способностью регулировать воспаление и ЭМП клеток, индуцированные липополисахаридом [49]. Обнаружен также антисмысловой транскрипт гена *MALAT1*, транскрибируемый с противоположной цепи и названный TALAM1 [50]. Проведя собственное исследование на основании данного открытия, Gomes C. и соавт. показали, что для линий клеток РМЖ характерна сверхэкспрессия данных транскриптов, а также положительная корреляция между уровнями их экспрессии в исследуемых клеточных линиях. MALAT1 и TALAM1 работают «совместно»: TALAM1 опосредует активность MALAT1 в присутствии цитокина TGF-β [51], известного активатора ЭМП. Тем не менее, достаточно сложно оценить влияние MALAT1 на способность клеток к метастазированию, так как разные авторы по-разному описывают данный механизм. Основные причины противоречий в данных об активности MALAT1 не установлены. По-видимому, различия в результатах, полученных на культурах опухолевых клеток, могут быть связаны с особенностями экспрессии белков в клетках разного типа, а также с тем, что транскрипт MALAT1 формирует комплексы с разными белками, вызывая противоположные эффекты [47]. К возможным причинам можно отнести и использование клеточных линий с разным генетическим фоном или различия в условиях культивирования.

Интересно отметить, что влияние MALAT1 на функционирование клеток показано в исследованиях на клеточных линиях рака легкого A549. Клетки A549 трансфицировали MALAT1 siРНК1 и MALAT1 siРНК2; контрольные клетки трансфицировали control siРНК1 и siРНК2 соответственно. Показано, что нокдаун MALAT1 с помощью siРНК вызвал снижение уровня MALAT1 на 70–80%, что в значительной степени повлияло на подвижность клеток, снизив ее по сравнению с клетками, трансфицированными контрольной siРНК. Кроме того, нокдаун MALAT1 приводил к снижению скорости миграции. Однако влияния на пролиферацию клеток не наблюдалось [52].

Исследования на модельных объектах *in vivo*

Функции MALAT1 *in vivo* изучают преимущественно с использованием ксенотрансплантации опухолей человека или культур клеток в организм бестимусных мышей. Исследования *in vitro* на культурах клеток и с использованием опухолевых ксенотрансплантатов выявили противоречивые эффекты MALAT1 на рост и инвазию опухолевых клеток. Показано, что целенаправленная инактивация гена MALAT1 в модели рака молочной железы у трансгенных мышей без изменения экспрессии соседних генов способствует метастазированию в легкие, и этот фенотип может быть обращен генетическим добавлением MALAT1. Точно так же нокаут MALAT1 в клетках рака молочной железы человека индуцирует их способность к метастазированию, которая устраняется повторной экспрессией MALAT1 [53]. Кроме того, MALAT1 стимулирует рост опухоли молочной железы: трансфекция siMALAT1 в культуры клеток MDA-MB-231 и ZR-75-1 приводила к подавлению способности клеток к пролиферации, при этом подкожное введение трансфицированных опухолевых клеток мышам также снижало рост опухоли и ее размер [48]. На основании результатов, полученных на культурах клеток (нокдаун MALAT1 приводил к ингибированию пролиферативной и инвазивной способности и запуску апоптоза в культурах клеток ТНPMЖ), Jin C. и соавт. подкожно вводили мышам ксенотрансплантаты опухолей с нокаутом MALAT1 и получили сходные результаты: рост опухоли ингибировался, опухоль уменьшилась в размерах, гипокспрессия MALAT1 приводила к апоптозу опухолевых клеток, снижению скорости их пролиферации и числа Ki-67⁺ клеток в опухоли [45]. На модели ксенографтов с siMALAT1, ингибитор miR-124 и ингибитор miR-124⁺ показано, что сверхэкспрессия MALAT1 связана с экспрессией CDK4 и с пролиферацией клеток через сигнальный путь CDK4/E2F1 в PMЖ [25]. Интересно также

отметить, что Yang C. и соавт. создана модель ксенотрансплантата опухоли мыши для обнаружения функции MALAT1 при HER2⁺ раке молочной железы: экспрессия MALAT1 значительно повышалась при HER2⁺ раке молочной железы как в клетках, так и в тканях. Сайленсинг MALAT1 ингибировал пролиферацию HER2⁺ клеток рака молочной железы. Полученные результаты позволили сделать вывод, что MALAT1 может быть потенциальным биомаркером и терапевтической мишенью при HER2⁺ раке молочной железы [54].

Существует несколько исследований, направленных на изучение возможности воздействия на MALAT1 с целью улучшения эффекта терапии злокачественных новообразований. Исследования в области РНК-терапии позволяют в настоящее время создавать препараты на основе РНК, а именно антисмысловые олигонуклеотиды (ASO), небольшие последовательности, комплементарные мРНК, несущей информацию об исследуемом белке, которые могут блокировать его синтез [55]. Изучение роли MALAT1 в развитии рака молочной железы на модели MMTV (вирус опухоли молочной железы мыши)-РyMT показало, что нокдаун MALAT1 с помощью подкожно доставленного ASO приводит к уменьшению частоты метастазирования. У мышшей, которым вводили MALAT1-специфичные ASO1 или ASO2, был достигнут нокдаун MALAT1 (от 20 до 80%) в сравнении с контрольными мышшами, которым вводили контрольные скремблированные ASO (ScASO). У мышшей экспериментальной группы наблюдалось также снижение скорости роста опухоли на 50% по сравнению с мышшами контрольной группы, которым вводили ScASO [56].

Исследования *in vivo* больных PMЖ

Согласно опубликованным данным, MALAT1 использует разные механизмы в разных молекулярных подтипах рака молочной железы [2]. При ТНPMЖ экспрессия MALAT1 повышается, и у пациентов с повышенным уровнем MALAT1 наблюдается плохая общая выживаемость. Так, Samir A. и соавт. исследовали не только днРНК MALAT1, но и X-неактивный специфический транскрипт (XIST). Им удалось показать, что, хотя miR-182-5p проявляла онкогенный эффект, XIST оказывал доминирующее влияние на регуляцию сигнального пути PD-L1 посредством ингибирования онкогенной функции MALAT1 [57]. Это может объяснить результаты, полученные Xiping Z. и соавт., согласно которым подавление MALAT1 снижает экспрессию PD-L1. В этом исследовании показано, что генетическое редактирование MALAT1 позволяет эффективно подавлять пролиферацию и способность

к инвазии трижды отрицательных и HER2⁺ клеток рака молочной железы [2]. В образцах ТНPMЖ MALAT1 экспрессируется на гораздо более высоком уровне, чем в образцах HER2⁺ рака молочной железы. Lin R. и соавт. показано, что сниженная экспрессия MALAT1 или ее отсутствие характерны преимущественно для нормальной ткани, а сверхэкспрессия – для PMЖ, рака поджелудочной железы, печени, рака легких, толстого кишечника и простаты [32]. Показано также значительное повышение экспрессии мРНК MALAT1 в тканях PMЖ. Эти результаты согласуются с результатами предыдущих исследований, показывающих, что днРНК MALAT1 может способствовать пролиферации и инвазии клеток при ТНPMЖ и раке легкого [57]. Из этих результатов следует, что MALAT1 может быть использован в качестве многообещающего биомаркера в клинической диагностике и прогнозировании агрессивных опухолей PMЖ. То есть становится понятным, что активация MALAT1 играет важную роль в развитии PMЖ. Однако интересно заметить, что уровень MALAT1 в сыворотке также может быть потенциальным диагностическим онкомаркером PMЖ. В своем исследовании *in vitro* Miao Y. и соавт. показали, что подавление днРНК MALAT1 значительно ингибировало пролиферацию, миграцию и инвазию клеток PMЖ, индуцировало апоптоз и остановку клеточного цикла G1, что неоднократно показано и в других независимых исследованиях. Кроме того, уровень MALAT1 в сыворотке крови больных PMЖ был значительно выше, чем у больных доброкачественными заболеваниями молочной железы ($p < 0.001$) [58].

С другой стороны, при анализе данных РНК-секвенирования (The Cancer Genome Atlas) Kim J. и соавт. обнаружили, что наименьшие уровни экспрессии имели более агрессивные опухоли, и экспрессия MALAT1 в клетках PMЖ была ниже, чем в нормальной ткани. Это противоречит результатам других исследований – в большинстве случаев в клетках PMЖ наблюдали сверхэкспрессию транскрипта MALAT1 по сравнению с нормальной тканью [25, 28, 45, 46, 59–61]. Kim J. и соавт. для нокаута *MALAT1* использовали систему редактирования CRISPR-Cas9 и наблюдали увеличение метастазирования. Возможно, причиной подобных различий в результатах могут быть различия в подходах, использованных для получения мышей с нокаутом *MALAT1*. Так, согласно опубликованным данным, сверхэкспрессия MALAT1 наблюдается в опухолях ER⁺, PR⁺-подтипов, ТНPMЖ [27, 31, 46, 62]. Сравнение уровней экспрессии транскрипта в клетках ТНPMЖ и HER2-подтипа выявило сверхэкспрессию MALAT1 в клетках трижды нега-

тивного рака, что может свидетельствовать о связи экспрессии MALAT1 со способностью к метастазированию, а отличия связаны с опосредованным участием MALAT1 в разных клеточных процессах [2]. Сверхэкспрессию MALAT1 связывают с низкими показателями дифференцировки опухоли, резистентностью к гормонотерапии [59, 62], а низкую экспрессию – с относительно высокой 5-летней общей выживаемостью больных PMЖ [63].

КЛИНИЧЕСКАЯ ЗНАЧИМОСТЬ MALAT1

MALAT1 не только обычно сверхэкспрессируется при различных видах рака, но часто мутирует. Некоторые исследователи сообщают о высокой частоте мутаций локуса *MALAT1*; например, описана транслокация *MALAT1* в клетках карциномы почки и гастробластомы [17]. На данный момент существует мало исследований о связи мутаций *MALAT1* с развитием PMЖ и клинико-патологическими показателями опухоли, поэтому по-прежнему остается открытым вопрос, является ли данный ген драйверным при канцерогенезе PMЖ [64]. В исследовании Kandath S. и соавт. говорится о низкой частоте (1.1%) мутаций *MALAT1* при PMЖ в сравнении с другими типами злокачественных новообразований [31, 65]. Однако полногеномное исследование опухоли от больных PMЖ Nik-Zainal S. и соавт. выявило высокую частоту мутаций в *MALAT1* (замены нуклеотидов, инсерции и делеции), но являются ли данные мутации драйверными или возникли как следствие высокой мутационной нагрузки опухоли данной области генома, остается неясным [66].

Показано, что *MALAT1* входит в группу генов профиля люминального В PMЖ: мутации *MALAT1* связаны с такими клинико-патологическими показателями, как высокая степень злокачественности и высокий уровень экспрессии Ki-67. Также у больных PMЖ люминальных подтипов наблюдались делеции *MALAT1* [67], высокая частота инсерций и делеций, с большей вероятностью возникших в процессе транскрипции. В данном исследовании упоминается, что мутации *MALAT1* не связаны с изменением уровней экспрессии гена, они также, по-видимому, возникли в ходе транскрипции [64]. Вероятность активации онкогенного действия MALAT1 на клетки вряд ли связана с амплификацией гена. К такому выводу пришли Meseure D. и соавт., так как ген *MALAT1* расположен в локусе хромосомы, который редко амплифицируется [31]. Согласно нашим данным [68], частота делеций локуса, в котором находится *MALAT1*, в опухолях молочной железы люминального В-подтипа составляет 18%. Амплификация локуса 11q13.1 отмечена у 10% больных, в подавляющем большинстве слу-

чаев (72%) в опухолевых клетках сохраняется нормальная копия этого локуса [68].

Кроме того, показана связь полиморфизма rs619586 днРНК MALAT1 с ответом на химиотерапию препаратами на основе платины [69]. Обнаружено, что в доминантной генотипической модели наличие дикого генотипа (А/А) связано с высоким шансом ответа больных немелкоклеточным раком легкого на химиотерапию (OR 0.60; 95% CI 0.36–0.97, при $p = 0.04$), особенно в возрасте до 57 лет (OR 0.49; 95% CI 0.24–0.98, при $p = 0.04$), у мужчин (OR 0.53; 95% CI 0.31–0.92, при $p = 0.02$), курильщиков (OR 0.46; 95% CI 0.24–0.89, при $p = 0.02$) и у пациентов с плоскоклеточным раком легкого (OR 0.24; 95% CI 0.10–0.60, при $p < 0.001$) [69].

MALAT1 как прогностический фактор

Согласно ранее представленным данным, MALAT1 может быть использован в качестве многообещающего биомаркера в клинической диагностике и прогнозировании агрессивности РМЖ. Прогностическим фактором могут служить данные об уровне экспрессии MALAT1. Анализ данных 14 исследований выявил ассоциацию сверхэкспрессии MALAT1 с низкими показателями выживаемости пациентов (HR = 1.95; 95% CI 1.57–2.41, $p < 0.001$) [48, 70, 71]. Низкие показатели безрецидивной выживаемости, ассоциированные со сверхэкспрессией MALAT1, также характерны для пациентов с ER-профилем экспрессии опухоли (HR = 2.83; 95% CI 1.02–7.83, $p = 0.045$) и для группы с люминальными подтипами РМЖ (ER⁺), получавших лечение тамоксифеном (HR = 2.56; 95% CI 1.04–6.0, $p = 0.034$) [62]. Похожие результаты получены для больных ТНРМЖ и HER2⁺-подтипами РМЖ с отсутствием лимфогенного метастазирования, повышенный уровень MALAT1 коррелировал с худшим прогнозом [27]. Авторы [72] пришли к выводу, что не все пациенты с ТНРМЖ имеют плохой прогноз; пациенты, отрицательные по одному из генов – MALAT1 и BACH1 – или по обоим, имеют удовлетворительный прогноз, поэтому их можно лечить с помощью онкопластической хирургии молочной железы. Эти данные могут объяснить неоднозначность результатов независимых исследований. Далее Wang Y. и соавт. провели метаанализ с акцентом на метастазирование и показали, что сверхэкспрессия MALAT1 связана с плохим исходом заболевания. Безрецидивная выживаемость больных РМЖ при повышенной экспрессии данного гена в 95% случаев имела более низкие значения (HR = 1.97; 95% CI 1.25–3.09, $p = 0.003$), при этом не обнаружено связи между экспрессией MALAT1 и лимфогенным метастазированием (OR = 1.32; 95% CI

0.34–5.21) [73]. Однако интересно заметить, что в образцах ТНРМЖ и HER2⁺ РМЖ Xiping Z. и соавт. выявили положительную корреляцию между повышенным уровнем экспрессии транскрипта MALAT1 и количеством метастатических лимфатических узлов, а также обратную зависимость между уровнем экспрессии и безрецидивной выживаемостью больных с HER2⁺-подтипом РМЖ [2]. Другой эффект описан для безметастатической выживаемости больных РМЖ: снижение экспрессии MALAT1 у таких пациентов приводило к ухудшению показателей выживаемости (HR = 0.81; 95% CI 0.67 – 0.99, $p = 0.0420$; HR = 0.65; 95% CI, $p = 0.005$) [23]. Однако следует заметить, что в данном случае вывод был сделан на основе результатов эксперимента, показавшего, что MALAT1 действует как индуктор ЭМП при раке молочной железы, активируя путь PI3K-Akt. Следовательно, отсутствуют прямые доказательства корреляции между низкой экспрессией MALAT1 и худшим прогнозом.

Вдобавок, в недавнем метаанализе показано, что высокий уровень экспрессии MALAT1 связан с PR⁺-профилем опухоли (95% CI 1.18–1.82, $p = 0.0006$) и, более того, со снижением инфильтрации опухоли иммунными клетками, что может быть одной из причин неблагоприятного прогноза выживаемости у больных РМЖ со сверхэкспрессией MALAT1 [71]. И в завершении хотелось бы добавить, что Meseure D. и соавт. показали, что прогностическими факторами могут служить не только уровни экспрессии полного транскрипта MALAT1, но и экспрессия альтернативно сплайсированного транскрипта MALAT1 (Δ sv-MALAT1), имеющего две делеции: в 19% случаев наблюдалась гипоекспрессия Δ sv-MALAT1 в опухоли, причем это положительно коррелировало с большими размерами опухоли, ER- и PR-негативными, трижды негативными подтипами РМЖ и низкой безметастатической выживаемостью [31]. Таким образом, можно предположить, что изменение экспрессии гена влияет на направление развития опухоли.

Важно отметить, что MALAT1 является прогностическим маркером и при других локализациях опухолей человека. Так, согласно результатам исследования опухолевых клеток предстательной железы, устойчивых к энзалутамиду (антиандрогенный энзалутамид) – препарату, применяемому в терапии рака предстательной железы, ось MALAT1/AR-v7 (вариант 7 сплайсинга рецепторов андрогенов, AR) может быть перспективным терапевтическим маркером. Подчеркнута связь между экспрессией AR-v7, который играет роль в развитии устойчивости к энзалутамиду, и экспрессией MALAT1 [74]. Экспрессия обоих генов в клетках

EnzR-PCa (клеточная линия, устойчивая к энзалутамиду) была выше, чем в клетках, чувствительных к препарату. Введение MALAT1 siРНК и/или ASC-J9 (5-hydroxy-1,7-bis(3,4-dimethoxyphenyl)-1,4,6-heptatrien-3-one) приводило к подавлению прогрессирования опухолевых клеток EnzR-PCa. Показано, что AR связывается с элементами ответа на андрогены (ARE) на промоторе гена MALAT1. В присутствии энзалутамида данное взаимодействие подавлялось, что приводило к повышению активности промотора MALAT1. MALAT1-siРНК в свою очередь угнетала экспрессию AR-v7 [74].

Таким образом, уровень экспрессии MALAT1 может служить прогностическим фактором при РМЖ. Выявленные закономерности позволяют сделать вывод о том, что днРНК MALAT1 действительно может быть хорошим предиктивным маркером, используемым для подбора схемы терапии.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Важным представляется анализ роли днРНК в канцерогенезе различных типов опухолей, так как получение новых данных о принципах действия длинных некодирующих РНК позволит узнать роль некодирующей части генома в патогенезе опухолевых образований, а также дополнить знания о возможных прогностических маркерах онкозаболе-

ваний, в частности, РМЖ. Интерес представляет не так давно открытый ассоциированный с метастазированием аденокарциномы легкого транскрипт MALAT1, обнаруженный при изучении механизмов метастазирования при раке легкого. Данная РНК задействована во множестве клеточных процессов, таких, как транскрипция, сплайсинг, метастазирование, пролиферация клеток и многих других. На основании ряда исследований можно прийти к выводу, что высокий уровень данного транскрипта является маркером низкой выживаемости при РМЖ, а также может участвовать в регуляции механизмов ЭМП, инвазии и метастазировании. По этой причине сбор информации о данной нкРНК представляет важную задачу для поиска более эффективных методов диагностики и лечения злокачественных опухолей молочной железы. Дальнейшие исследования функций MALAT1 позволят понять основные механизмы образования и прогрессии опухолевых новообразований. ●

Конфликт интересов. Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Работа поддержана грантом РФФ № 22-15-00169 «Фенотип BRCA-подобных опухолей в процессе канцерогенеза и лечения».

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sung H., Ferlay J., Siegel R.L., Laversanne M., Soerjomataram I., Jemal A., Bray F. // *CA: Cancer J. Clinicians*. 2021. V. 71. № 3. P. 209–249.
- Xiping Z., Bo C., Shifeng Y., Feijiang Y., Hongjian Y., Qihui C., Binbin T. // *Oncotarget*. 2018. V. 9. № 2. P. 2255–2267.
- Wang D., Xu J., Shi G., Yin G. // *J. Cancer Res. Therapeutics*. 2015. V. 11. № 5. P. 11–15.
- Тюляндин С.А., Артамонова Е.В., Жукова Л.Г., Кислов Н.В., Королева И.А., Пароконная А.А. // *Злокачественные опухоли*. 2022. Т. 12. № (3s2-1). С. 155–197.
- Wang J., Ye C., Xiong H., Shen Y., Lu Y., Zhou J., Wang L. // *Oncotarget*. 2017. V. 8. № 3. P. 5508–5522.
- Alahari S., Eastlack S., Alahari S. // *Internat. Rev. Cell Mol. Biol.* 2016. V. 234. № 1. P. 229–254.
- Sanchez Calle A., Kawamura Y., Yamamoto Y., Takeshita F., Ochiya T. // *Cancer Sci*. 2018. V. 109. № 7. P. 2093–2100.
- Wright C.M. // *Epigenetic Cancer Therapy*. 2015. P. 91–114.
- Tsai M.-C., Manor O., Wan Y., Mosammamaparast N., Wang J.K., Lan F., Shi Y., Segal E., Chang H.Y. // *Science*. 2010. V. 329. № 5992. P. 689–693.
- Gutschner T., Hämmerle M., Eißmann M., Hsu J., Kim Y., Hung G., Revenko A., Arun G., Stentrup M., Groß M. // *Cancer Res*. 2013. V. 73. № 3. P. 1180–1189.
- Zhang J., Han C., Song K., Chen W., Ungerleider N., Yao L., Ma W., Wu T. // *PLoS One*. 2020. V. 15. № 1. P. e0228160.
- Schmitt A.M., Chang H.Y. // *Cancer Cell*. 2016. V. 29. № 4. P. 452–463.
- Ji P., Diederichs S., Wang W., Böing S., Metzger R., Schneider P.M., Tidow N., Brandt B., Buerger H., Bulk E. // *Oncogene*. 2003. V. 22. № 39. P. 8031–8041.
- Galganski L., Urbanek M.O., Krzyzosiak W.J. // *Nucl. Acids Res*. 2017. V. 45. № 18. P. 10350–10368.
- van Asseldonk M., Schepens M., de Bruijn D., Janssen B., Merckx G., van Kessel A.G. // *Genomics*. 2000. V. 66. № 1. P. 35–42.
- Goyal B., Yadav S.R.M., Awasthee N., Gupta S., Kunnumakkara A.B., Gupta S.C. // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Rev. Cancer*. 2021. V. 1875. № 2. P. 1–13.
- Arun G., Aggarwal D., Spector D.L. // *Noncoding RNA*. 2020. V. 6. № 2. P. 1–22.
- Johnsson P., Lipovich L., Grandér D., Morris K.V. // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gen. Subjects*. 2014. V. 1840. № 3. P. 1063–1071.
- Tani H., Nakamura Y., Ijiri K., Akimitsu N. // *Drug Discov. Therapeut*. 2010. V. 4. № 4. P. 235–239.
- Brown J.A., Bulkley D., Wang J., Valenstein M.L., Yario T.A., Steitz T.A., Steitz J.A. // *Nat. Struct. Mol. Biol*. 2014. V. 21. № 7. P. 633–640.
- Amodio N., Raimondi L., Juli G., Stamato M.A., Caracciolo D., Tagliaferri P., Tassone P. // *J. Hematol. Oncol*. 2018. V. 11. № 1. P. 1–19.
- Wilusz J.E. // *Biochim. Biophys. Acta (BBA) – Gene Regulatory Mechanisms*. 2016. V. 1859. № 1. P. 128–138.
- Xu S., Sui S., Zhang J., Bai N., Shi Q., Zhang G., Gao S., You Z., Zhan C., Liu F. // *Internat. J. Clin. Exp. Pathol*. 2015. V. 8. № 5. P. 4881–4891.
- Liu R., Li J., Lai Y., Liao Y., Liu R., Qiu W. // *Internat. J. Biol. Macromol*. 2015. V. 81. P. 491–497.
- Feng T., Shao F., Wu Q., Zhang X., Xu D., Qian K., Xie

- Y., Wang S., Xu N., Wang Y. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 13. P. 16205–16216.
26. Chou J., Wang B., Zheng T., Li X., Zheng L., Hu J., Zhang Y., Xing Y., Xi T. // *Biochem. Biophys. Res. Commun.* 2016. V. 472. № 1. P. 262–269.
27. Jadhaliha M., Zong X., Malakar P., Ray T., Singh D.K., Freier S.M., Jensen T., Prasanth S.G., Karni R., Ray P.S. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 26. P. 40418–40436.
28. Li X., Chen N., Zhou L., Wang C., Wen X., Jia L., Cui J., Hoffman A.R., Hu J.-F., Li W. // *Am. J. Cancer Res.* 2019. V. 9. № 4. P. 714–729.
29. Zhang T., Wang H., Li Q., Fu J., Huang J., Zhao Y. // *Cell. Physiol. Biochem.* 2018. V. 50. № 6. P. 2216–2228.
30. Black D.L. // *Annu. Rev. Biochem.* 2003. V. 72. № 1. P. 291–336.
31. Meseure D., Vacher S., Lallemand F., Alsibai K.D., Hatem R., Chemlali W., Nicolas A., De Koning L., Pasmant E., Callens C., et al. // *Br. J. Cancer*. 2016. V. 114. № 12. P. 1395–1404.
32. Lin R., Maeda S., Liu C.a., Karin M., Edgington T. // *Oncogene*. 2007. V. 26. № 6. P. 851–858.
33. Weber D.G., Johnen G., Casjens S., Bryk O., Pesch B., Jöckel K.-H., Kollmeier J., Brüning T. // *BMC Res. Notes*. 2013. V. 6. № 1. P. 1–9.
34. Ren D., Li H., Li R., Sun J., Guo P., Han H., Yang Y., Li J. // *Oncol. Lett.* 2016. V. 11. № 3. P. 1621–1630.
35. Liu C., Li H., Jia J., Ruan X., Liu Y., Zhang X. // *Med. Sci. Monitor: Internat. Med. J. Exp. Clin. Res.* 2019. V. 25. P. 5143–5149.
36. Qiao Y., Peng C., Li J., Wu D., Wang X. // *Curr. Neurovasc. Res.* 2018. V. 15. № 3. P. 211–219.
37. Kyurkchyan S.G., Popov T.M., Stancheva G., Rangachev J., Mitev V.I., Popova D.P., Kaneva R.P. // *J. BUON*. 2020. V. 25. № 1. P. 357–366.
38. Xu E., Liang X., Ji Z., Zhao S., Li L., Lang J. // *Eur. Arch. Oto-Rhino-Laryngol.* 2020. V. 277. № 2. P. 611–621.
39. Wang S., Wang T., Liu D., Kong H. // *Cancer Manag. Res.* 2020. V. 12. P. 10735–10747.
40. Zhao L., Lou G., Li A., Liu Y. // *Mol. Med. Rept.* 2020. V. 22. № 2. P. 1449–1457.
41. Wang N., Hou M., Zhan Y., Shen X., Xue H. // *Eur. Rev. Med. Pharmacol. Sci.* 2018. V. 22. № 22. P. 7653–7659.
42. Dai Q., Zhang T., Li C. // *Cancer Management and Research*. 2020. V. 12. № 1. P. 1929–1939.
43. Bill R., Christofori G. // *FEBS Lett.* 2015. V. 589. № 14. P. 1577–1587.
44. Wu Y., Sarkissyan M., Ogah O., Kim J., Vadgama J.V. // *Cancers*. 2020. V. 12. № 7. P. 1918.
45. Jin C., Lu Q., Lin Y., Ma L. // *Tumor Biol.* 2016. V. 37. № 6. P. 7383–7394.
46. Latorre E., Carelli S., Raimondi I., D'Agostino V., Castiglioni I., Zucal C., Moro G., Luciani A., Ghilardi G., Monti E. // *Cancer Res.* 2016. V. 76. № 9. P. 2626–2636.
47. Eastlack S.C., Dong S., Mo Y.Y., Alahari S.K. // *PLoS One*. 2018. V. 13. № 6. P. 1–13.
48. Zhang P., Zhou H., Lu K., Lu Y., Wang Y., Feng T. // *OncoTargets. Therapy*. 2018. V. 11. P. 291–299.
49. Li Z., Xu L., Liu Y., Fu S., Tu J., Hu Y., Xiong Q. // *Am. J. Translat. Res.* 2018. V. 10. № 10. P. 3186–3197.
50. Zong X., Nakagawa S., Freier S.M., Fei J., Ha T., Prasanth S.G., Prasanth K.V. // *Nucl. Acids Res.* 2016. V. 44. № 6. P. 2898–2908.
51. Gomes C.P., Nóbrega-Pereira S., Domingues-Silva B., Rebelo K., Alves-Vale C., Marinho S.P., Carvalho T., Dias S., de Jesus B.B. // *BMC Cancer*. 2019. V. 19. № 1. P. 1–11.
52. Takahashi D.T., Gabelle D., Agama K., Kiselev E., Zhang H., Yab E., Petrella S., Forterre P., Pommier Y., Mayer C. // *Nat. Commun.* 2022. V. 13. № 1. P. 1–11.
53. Kim J., Piao H.-L., Kim B.-J., Yao F., Han Z., Wang Y., Xiao Z., Siverly A.N., Lawhon S.E., Ton B.N. // *Nat. Genet.* 2018. V. 50. № 12. P. 1705–1715.
54. Yang C., Zhu H., Tan Y., Zhu R., Wu X., Li Y., Wang C. // *Curr. Cancer Drug Targets*. 2021. V. 21. № 10. P. 860–869.
55. Chen Q., Zhu C., Jin Y. // *Front Genet.* 2020. V. 11. № 93. P. 1–9.
56. Arun G., Diermeier S., Akerman M., Chang K.-C., Wilkinson J.E., Hearn S., Kim Y., MacLeod A.R., Krainer A.R., Norton L., et al. // *Genes Dev.* 2016. V. 30. № 1. P. 34–51.
57. Samir A., Tawab R.A., El Tayebi H.M. // *Oncol. Lett.* 2021. V. 22. № 2. P. 1–12.
58. Miao Y., Fan R., Chen L., Qian H. // *Ann. Clin. Lab. Sci.* 2016. V. 46. № 4. P. 418–424.
59. Guffanti A., Iacono M., Pelucchi P., Kim N., Soldà G., Croft L.J., Taft R.J., Rizzi E., Askarian-Amiri M., Bonnal R.J. // *BMC Genomics*. 2009. V. 10. № 1. P. 1–17.
60. Arshi A., Sharifi F.S., Ghahfarokhi M.K., Faghieh Z., Doosti A., Ostovari S., Maymand E.M., Seno M.M.G. // *Mol. Therapy–Nucle. Acids*. 2018. V. 12. P. 751–757.
61. Huang X.J., Xia Y., He G.F., Zheng L.L., Cai Y.P., Yin Y., Wu Q. // *Oncology Reports*. 2018. V. 5. P. 2683–2689.
62. Huang N.-S., Chi Y.-Y., Xue J.-Y., Liu M.-Y., Huang S., Mo M., Zhou S.-l., Wu J. // *Oncotarget*. 2016. V. 7. № 25. P. 37957–37965.
63. Sun Z., Liu J., Liu J. // *Cell. Mol. Biol.* 2020. V. 66. № 3. P. 72–78.
64. Rheinbay E., Nielsen M.M., Abascal F., Wala J.A., Shapira O., Tiao G., Hornshøj H., Hess J.M., Juul R.I., Lin Z. // *Nature*. 2020. V. 578. № 7793. P. 102–111.
65. Kandath C., McLellan M.D., Vandin F., Ye K., Niu B., Lu C., Xie M., Zhang Q., McMichael J.F., Wyczalkowski M.A. // *Nature*. 2013. V. 502. № 7471. P. 333–339.
66. Nik-Zainal S., Davies H., Staaf J., Ramakrishna M., Glodzik D., Zou X., Martincorena I., Alexandrov L.B., Martin S., Wedge D.C. // *Nature*. 2016. V. 534. № 7605. P. 47–54.
67. Ellis M.J., Ding L., Shen D., Luo J., Suman V.J., Wallis J.W., van Tine B.A., Hoog J., Goiffon R.J., Goldstein T.C. // *Nature*. 2012. V. 486. № 7403. P. 353–360.
68. Ибрагимова М.К., Цыганов М.М., Слонимская Е.М., Литвяков Н.В. // *Бюл. сиб. мед.* 2020. Т. 19. № 3. С. 22–28.
69. Gong W.-J., Yin J.-Y., Li X.-P., Fang C., Xiao D., Zhang W., Zhou H.-H., Li X., Liu Z.-Q. // *Tumor Biol.* 2016. V. 37. № 6. P. 8349–8358.
70. Tian X., Xu G. // *BMJ*. 2015. V. 5. № 9. P. 1–11.
71. Wang Y., Zhang Y., Hu K., Qiu J., Hu Y., Zhou M., Zhang S. // *Biosci. Rep.* 2020. V. 40. № 8. P. 1–11.
72. Elbasateeny S.S., Yassin M.A., Mokhtar M.M., Ismail A.M., Ebian H.F., Hussein S., Shazly S.A., Abdelwabab M.M. // *Internat. J. Breast Cancer*. 2022. V. 2022. № 1. P. 1–13.
73. Wang Y., Xue D., Li Y., Pan X., Zhang X., Kuang B., Zhou M., Li X., Xiong W., Li G. // *J. Cancer*. 2016. V. 7. № 8. P. 991–1001.
74. Wang R., Sun Y., Li L., Niu Y., Lin W., Lin C., Antonarakis E.S., Luo J., Yeh S., Chang C. // *Eur. Urol.* 2017. V. 72. № 5. P. 835–844.

УДК:577.27:616-006.66

Связь экспрессии изоформ аденозинкиназы и эктонуклеотидаз CD39/CD73 в крови больных колоректальным раком

Г. А. Жулай^{1*}, М. И. Шибеев²¹Институт биологии – обособленное подразделение Федерального государственного бюджетного учреждения науки Федерального исследовательского центра «Карельский научный центр Российской академии наук», Петрозаводск, 185910 Россия²Республиканская больница им. В.А. Баранова, Петрозаводск, 185910 Россия

*E-mail: zhgali-111@yandex.ru

Поступила в редакцию 07.12.2022

Принята к печати 03.04.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11871

РЕФЕРАТ Опухолевые клетки способны создавать богатую аденозином иммуносупрессорную среду, что может препятствовать успешной противоопухолевой иммунотерапии. В настоящее время разрабатываются подходы, нацеленные на подавление продукции аденозина или его сигналов, включая использование антител, ингибирующих CD39 или CD73, и антагонистов рецепторов аденозина. Однако избытие путей, управляющих балансом АТФ-аденозин, а также недостаточно изученные пути внутриклеточной регуляции аденозина не позволяют добиться ожидаемого успеха. Особый интерес представляет аденозинкиназа (АДК), фермент, который катализирует превращение аденозина в аденозинмонофосфат, регулируя тем самым его уровень. Изучен уровень экспрессии гена АДК, а также уровень мРНК его длинной (АДК-*L*) и короткой (АДК-*S*) изоформ в образцах периферической крови больных колоректальным раком (КРР) ($n = 31$) и в контрольных образцах крови здоровых доноров ($n = 17$). Проведен анализ взаимосвязи уровней экспрессии гена аденозинкиназы и генов CD39, CD73 и A2aR. Показано, что в группе больных КРР с III–IV стадиями уровень мРНК АДК-*L* снижен ($p < 0.001$) по сравнению с контролем. У больных КРР впервые выявлена средняя корреляционная связь между уровнем экспрессии CD39 и АДК-*S* ($r = -0.468$ при $p = 0.043$) и между CD73 и АДК-*L* ($r = 0.518$ при $p = 0.0232$). С помощью проточной цитофлуориметрии оценено содержание CD8⁺, CD4⁺ и регуляторных Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD39/CD73, и их связь с уровнем мРНК аденозинкиназы у больных КРР. Однако статистически значимых корреляционных связей не обнаружено.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА аденозинкиназа, АДК-*S*, АДК-*L*, CD39, CD73, CD8⁺ Т-клетки, CD4⁺ Т-клетки, Treg, колоректальный рак.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АДК – аденозинкиназа; АДК-*L* – длинная изоформа аденозинкиназы; АДК-*S* – короткая изоформа аденозинкиназы; CD39 – эктонуклеозидтрифосфат-дифосфогидролаза, ENTPD1; CD73 – экто-5'-нуклеотидаза, 5'NT; A2aR – рецептор аденозина A2A; КРР – колоректальный рак.

ВВЕДЕНИЕ

Роль внеклеточного аденозина в микроокружении опухоли хорошо изучена [1]. Аденозин может регулировать врожденные и адаптивные иммунные реакции [2], снижая действие эффекторного звена и стимулируя иммуносупрессорное звено. Поэтому внеклеточный аденозин представляет собой барьер для противоопухолевой иммунотерапии. Терапевтический потенциал блокады ферментов – эктонуклеотидаз CD39 (эктонуклеозидтрифосфат-дифосфогидролаза, ENTPD1) и CD73

(экто-5'-нуклеотидаза, 5'NT), расщепляющих АТФ до аденозина, а также ингибирование аденозиновых рецепторов (в основном A2a) показан в доклинических исследованиях и проходит проверку на I/II стадиях клинических испытаний для онкологических больных [3]. Однако пока не удалось добиться эффективности, ожидаемой по результатам доклинических исследований [4].

Многочисленные пути, управляющие балансом АТФ и аденозина, остаются недостаточно хорошо изученными. При разработке подходов к блокаде

аденозинового сигнального пути слабо учитывается внутриклеточная регуляция аденозина. В последнее время обсуждается не только «классический» путь образования внеклеточного аденозина из АТФ эктонуклеотидазами CD39-CD73, но и роль альтернативного пути, в котором участвует внеклеточный никотинамидадениндинуклеотид (NAD⁺), в прогрессии рака [5]. Поэтому актуальным представляется изучение и других компонентов метаболизма аденозина в условиях развития опухоли.

Концентрация аденозина регулируется аденозинконвертирующими ферментами: аденозинкиназой (ADK) и аденозиндезаминазой [6, 7]. ADK добавляет остаток фосфорной кислоты к аденозину и превращает его в АМР. Аденозиндезаминаза удаляет аминогруппу с молекулы аденозина с образованием инозина. Кроме того, уровень аденозина может регулироваться путем его доставки во внеклеточное пространство через двунаправленные переносчики нуклеотидов.

Особый интерес представляет аденозинкиназа, которая регулирует доступность аденозина и является важным звеном сложных гомеостатических и метаболических сетей [8]. Баланс аденозина и ADK строго поддерживается в здоровых клетках, а изменения экспрессии этого фермента приводят к разной степени активации аденозиновых рецепторов, что часто и определяет роль ADK в развитии патологий [9]. ADK участвует не только в метаболизме пуринов, но и в регуляции транsmетилирования. Показана связь экспрессии ADK с метилированием ДНК. Использование специфических ингибиторов ADK может дозозависимо снижать уровень глобального метилирования ДНК в клетках HeLa [10]. ADK человека представлена двумя изоформами, которые отличаются молекулярной массой и, предположительно, функциями. Короткая изоформа, ADK-S, находится в цитоплазме. Она обеспечивает рутинное метаболическое удаление аденозина в нормальных условиях путем его фосфорилирования с образованием АМР. Основная функция ADK-S состоит в регуляции уровня внеклеточного тканевого аденозина. Длинная изоформа ADK-L локализуется в ядре и биохимически напрямую связана с S-аденозилметионин-зависимым путем транsmетилирования, который управляет метилированием ДНК и гистонов. Высокий уровень и активность ADK-L связаны с повышенным глобальным метилированием ДНК [1].

Роль ADK в развитии рака изучена недостаточно. Результаты проведенных исследований [10–15] указывают на потенциальную роль ADK в канцерогенезе, в частности колоректального рака (КРР) [14], рака молочной железы [15] и печени [12]. На воз-

можность участия ADK в развитии опухоли указывает также связь ADK с клеточной пролиферацией в процессе онтогенеза и с ангиогенезом, а также изменения в экспрессии этого фермента в опухолевой ткани и его ассоциация с эпигенетической регуляцией [8].

КРР – одно из распространенных злокачественных заболеваний, входит в число основных причин смертности от рака. Значимую роль в патогенезе КРР отводят аденозинергическому пути [16], тесно связанному с супрессией адаптивного иммунитета. Однако связь ADK с иммунными механизмами при КРР не исследована.

В связи с этим целью исследования состояла в изучении уровня мРНК ADK, ADK-L, ADK-S и его связи с содержанием Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD39/CD73, в периферической крови больных КРР.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Материалом для исследования служила венозная кровь, собранная из локтевой вены натощак в пробирки с антикоагулянтом К3ЕDТА. В работе проанализирован 31 образец крови пациентов в возрасте 65 ± 12.4 лет с аденокарциномой толстой кишки в основном (91%) умеренной степени дифференцировки. Диагноз у всех пациентов установлен на основании клинико-инструментального обследования и подтвержден гистологически. Клиническая характеристика пациентов представлена в *табл. 1*. Критериями включения пациентов в исследование были возраст старше 18 лет и подтвержденный диагноз рака толстой киш-

Таблица 1. Характеристика участников исследования

Показатель		Больные КРР	Здоровые доноры
Количество		31	17
Пол	М	11 (35.5%)	6 (35.3%)
	Ж	20 (64.5%)	11 (64.7%)
Возраст, медиана (min–max)		65.0 лет (45–78 лет)	55.0 лет (28–79 лет)
Стадия КРР	1–2	16 (51.6%)	–
	3–4	15 (48.3%)	
Степень дифференцировки опухоли	G1	3 (9.7%)	–
	G2	23 (74.2%)	
	G3	5 (16.1%)	

Таблица 2. Нуклеотидные последовательности праймеров, использованных в работе

Ген	Праймер 5' → 3'	
	Прямой	Обратный
<i>ADK</i>	TTACTACGAGCAGAATGAGCAG	TGGCAGCAGCAAGATTAGC
<i>ADK-L</i>	TGTAGAGCCAAAGTGGGGTG	GCCTCCACCTTCAGCTTTTGTG
<i>ADK-S</i>	AAGCAGTTGCTGTGGTACCTG	AGCAGAGGATTTCCCATTCCA
<i>A2AR</i>	CTTGGGTTCTGAGGAAGCAG	CAGCAGCTCCTGAACCCTAG
<i>CD39</i>	AGCAGCTGAAATATGCTGGC	GAGACAGTATCTGCCGAAGTCC
<i>CD73</i>	ATTGCAAAGTGGTTCAAAGTCA	ACACTTGCCAGTAAAATAGGG
<i>GAPDH</i>	GGTGGTCTCCTCTGACTTCAACAG	GTTGCTGTAGCCAAATTCGTTGT

ки. Критериями исключения были неoadъювантная терапия, аутоиммунные и воспалительные заболевания в последние 3 месяца. В качестве контроля проанализированы 17 образцов крови здоровых лиц соответствующего возраста (56.10 ± 17.70 лет). Исследование проведено согласно требованиям Хельсинкской декларации 2013 г. и одобрено Комитетом по медицинской этике при Министерстве здравоохранения и социального развития Республики Карелия и Петрозаводском государственном университете (протокол № 25 от 12.02.2013 г.). Все обследованные лица подписали информированное согласие на участие в исследовании. Исследование выполнено с использованием приборной базы Центра коллективного пользования научным оборудованием ИБ КарНЦ РАН.

Анализ экспрессии генов

Суммарную РНК выделяли из крови с помощью реагента TRIzol LS (ThermoFisher Scientific, США) и очищали от примесей ДНК, обрабатывая образцы ДНКазой I (Lucigen, США). Количество и качество полученной РНК оценивали на спектрофотометре SmartSpec Plus (Bio-Rad, США). Синтез кДНК выполняли с использованием случайных гексапраймеров и обратной транскриптазы MMLV («Евроген», Россия). Амплификацию кДНК, а также анализ продуктов амплификации в режиме реального времени проводили с использованием реакционной смеси с интеркалирующим красителем SYBR Green I («Евроген») в соответствии с инструкцией производителя на приборе iCycler с оптической приставкой iQ5 (Bio-Rad, США) в двух повторах и с контролем без матрицы. Экспрессию интересующих генов нормировали по экспрессии референсного гена *GAPDH*. Праймеры, использованные для оценки экспрессии генов *ADK*, *ADK-L*, *ADK-S*, *A2AR*, *CD39* и *CD73* («Синтол», Россия), представлены в табл. 2. Оптимальную температу-

ру отжига подбирали постановкой температурного градиента. Для *ADK*, *ADK-L*, *ADK-S*: денатурация кДНК 5 мин, 95°C; 40 циклов: денатурация – 95°C, 30 с; отжиг – 61°C, 30 с; элонгация – 72°C, 30 с. Для *A2AR*, *CD39* и *CD73*: денатурация кДНК 5 мин, 95°C; 40 циклов: денатурация – 95°C, 30 с; отжиг – 64°C, 30 с; элонгация – 72°C, 30 с. Специфичность ПЦР контролировали с помощью анализа кривых плавления. Относительный уровень экспрессии генов рассчитывали методом $2^{-\Delta\Delta Ct}$, где Ct – пороговый цикл, а ΔCt – разница между значениями пороговых циклов для референсного и целевого генов. Итоговый уровень экспрессии генов рассчитывали относительно уровня в контроле (здоровые доноры), принимая величину экспрессии каждого исследуемого гена в контроле за единицу. Данные представлены в относительных единицах, рассчитывали среднее значение ± стандартная ошибка среднего ($M \pm SE$).

Проточная цитофлуориметрия

Образцы цельной крови окрашивали антителами и затем инкубировали в течение 20 мин при комнатной температуре в темноте в соответствии с протоколом производителя. Эритроциты лизировали реагентом BD FACS Lysing Solution (BD Biosciences, США). В работе использовали следующие моноклональные антитела: CD3-PC5 (клон UCST1), CD4-FITC (клон OKT4), CD4-PC7 (клон OKT4), CD8-PC7 (клон RPA-T8), CD25-PC5 (клон BC96), CD127-PC7 (клон EBIORDR5), CD73-PE (клон AD2), CD39-PE (клон EBIOA1), CD39-FITC (клон EBIOA1) (eBioscience, США), а также соответствующие им изотипические контроли. Все события получены на цитометре Cytomics FC500 (Beckman Coulter, США). В каждом образце анализировали не менее 30000 событий в лимфоцитарном гейте, основанном на прямом и боковом светорассеянии. Данные представлены в виде $M \pm SD$.

Статистический анализ

Статистическая обработка материала и расчет показателей проведены с использованием программы GraphPad Prism v.7. Значимость различий между количественными показателями вычисляли, используя непараметрический критерий Манна–Уитни. Различия считали значимыми при $p < 0.05$. Степень взаимосвязи параметров оценивали с помощью корреляционного анализа по Спирмену.

РЕЗУЛЬТАТЫ

Уровень экспрессии мРНК аденозинкиназы в периферической крови больных КРР

Опубликованы данные об экспрессии гена *ADK* в ткани КРР [14], однако не известно, как экспрессируется ген *ADK* и его изоформы в периферической крови больных КРР и как он связан с клиническими признаками заболевания. Нами оценено относительное содержание мРНК гена *ADK* и его изоформ в периферической крови пациентов с КРР. Сравнение группы больных КРР и здоровых доноров выявило пониженный уровень мРНК *ADK-L* ($p = 0.002$) при КРР. Содержание мРНК гена *ADK* и изоформы *ADK-S* не отличалось от содержания в контрольной группе. Показано, что в образцах крови больных с III–IV стадиями КРР уровень мРНК *ADK-L* снижен ($p < 0.001$) по сравнению со здоровыми донорами (рис. 1). При этом различия между уровнями мРНК *ADK-L* у больных на начальных стадиях заболевания (I–II стадии) и в контрольной группе не имели статистической значимости. Содержание мРНК гена *ADK* и изоформы *ADK-S* в образцах крови больных с начальными и поздними стадиями КРР также было приближено к уровню у здоровых лиц.

В работе рассмотрена также связь между уровнями мРНК исследуемого гена и клиническими признаками заболевания. Выявлена средняя отрицательная корреляция между содержанием мРНК *ADK-L* и размером опухоли (T2–T4), которая составила 0.508 при $p = 0.038$. Однако не обнаружено значимых корреляционных связей между уровнем мРНК *ADK-L* и стадией заболевания. Различия в уровне мРНК гена аденозинкиназы у больных КРР с наличием и отсутствием отдаленных метастазов (M0–M1) или метастазов в регионарные лимфатические узлы (N0–N2) не имели статистической значимости.

Уровень внеклеточного аденозина регулируется сетью ферментов, в том числе и эктонуклеотидазами CD39 и CD73, которые играют ключевую роль в канцерогенезе [17]. Ранее нами было показано, что в периферической крови больных КРР повышен

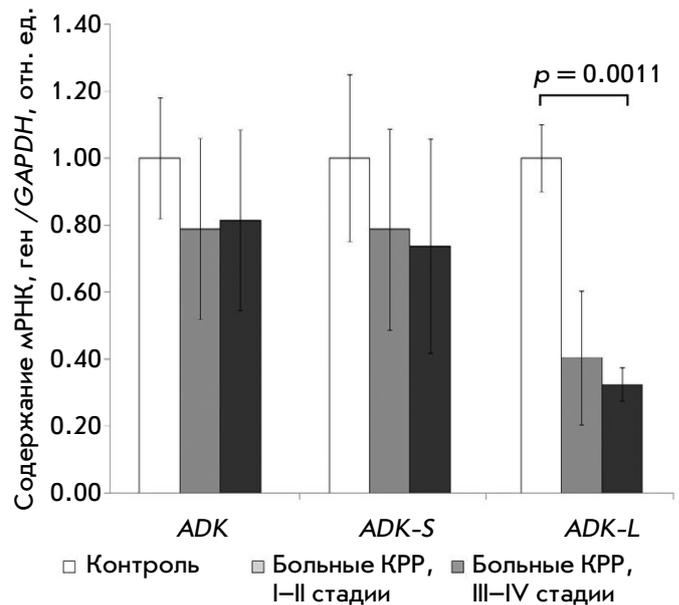


Рис. 1. Изменение относительного уровня мРНК гена *ADK* и изоформ *ADK-S*, *ADK-L* в крови пациентов с КРР по сравнению со здоровыми донорами. Относительный уровень мРНК в контроле принят за 1. Нормализация выполнена по мРНК гена *GAPDH*

Таблица 3. Значения коэффициентов корреляции между уровнем мРНК гена *ADK*, изоформ *ADK-S*, *ADK-L* и содержанием мРНК генов *CD39*, *CD73*, *A2AR* при колоректальном раке

Уровень мРНК	<i>ADK</i>		<i>ADK-S</i>		<i>ADK-L</i>	
	r_s	p	r_s	p	r_s	p
<i>A2AR</i>	-0.284	0.21	0.02	0.9346	0.406	0.0843
<i>CD39</i>	-0.038	0.097	-0.468	0.043	-0.329	0.168
<i>CD73</i>	-0.033	0.889	-0.16	0.511	0.518	0.0232

Примечание. Жирным шрифтом выделены статистически значимые показатели.

уровень мРНК гена *CD39*, тогда как уровень мРНК гена *CD73* был таким же, как у здоровых лиц [18]. Нами проанализирована связь между относительной экспрессией генов *CD39*, *CD73* и *A2AR* и экспрессий гена *ADK* и его изоформ в периферической крови больных КРР. Получены новые данные о существовании связи между экспрессией этих генов: выявлена отрицательная корреляция между относительным содержанием мРНК *ADK-S* и мРНК гена *CD39*. Показана положительная корреляционная связь уровней мРНК *ADK-L* и *CD73* (табл. 3).

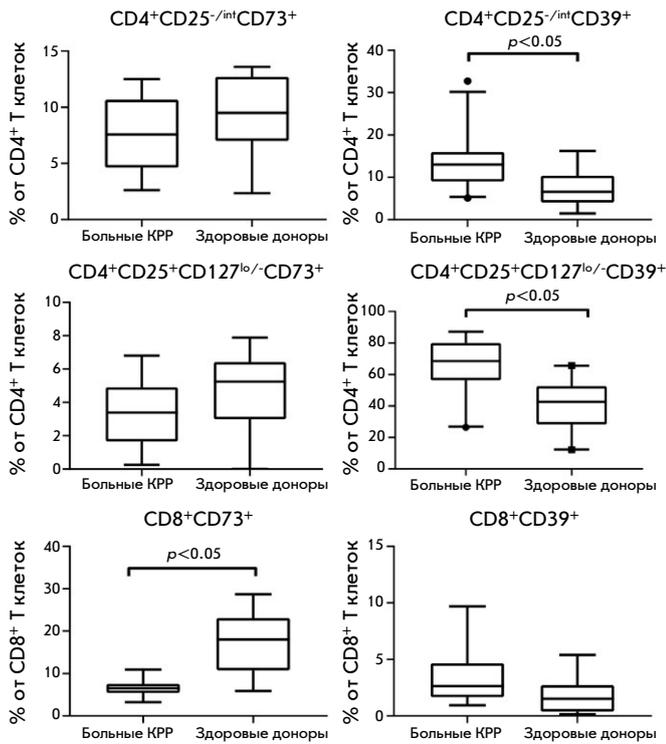


Рис. 2. Относительное содержание CD39⁺ и CD73⁺ Т-клеток в периферической крови больных КРР и здоровых доноров

Взаимосвязь между уровнем экспрессии гена ADK и содержанием CD39⁺/CD73⁺ Т-клеток

Установленная на уровне мРНК связь аденозинкиназы с эктонуклеотидазами CD39 и CD73 в периферической крови предполагает существование связи ADK с иммунными клетками, экспрессирующими CD39/CD73. Ключевое значение в противоопухолевом иммунном ответе имеет баланс эффектор-

ных CD8⁺, CD4⁺ Т-клеток и иммуносупрессорных регуляторных Т-клеток (Treg). Эти лимфоциты, как и многие другие клетки, чувствительны к действию аденозина, которое проявляется в основном через аденозиновый рецептор A2aR, а также способны участвовать в продукции аденозина, используя экспрессию на своей поверхности CD39 и/или CD73 [3]. Для выявления связи между уровнем экспрессии ADK и уровнем Т-клеток, участвующих в генерации аденозина, проанализировано относительное содержание CD39⁺/CD73⁺ эффекторных Т-лимфоцитов (CD4⁺ Т-хелперов и CD8⁺ цитотоксических клеток) и супрессорных Treg-клеток у больных КРР (n = 20) и здоровых лиц (n = 17) (рис. 2).

Как у здоровых, так и у больных лиц, CD39-положительные клетки преобладали в популяции Treg-клеток, тогда как экспрессия CD73 была более характерна для CD8⁺ Т-клеток (рис. 3). Это отмечают и другие авторы [19]. Поскольку популяция эффекторных CD4⁺ Т-клеток содержит 3–5% Treg-клеток, которые характеризуются повышенной экспрессией CD25, то для исключения вклада Treg-клеток в экспрессию CD39/CD73 Т-хелперными клетками рассматривали фенотип CD4⁺CD25^{-int}.

Показано, что около 64% всех Treg-клеток в крови больных КРР были CD39⁺, что значительно отличалось от содержания Treg-клеток в крови здоровых доноров (p = 0.0008), у которых CD39⁺ Treg-клетки составили 42%. Достоверные различия показаны и для CD4⁺CD39⁺ Т-хелперов (p = 0.037). В популяции CD8⁺ Т-клеток больных КРР содержание CD73-положительных клеток было снижено (p = 0.024). Содержание CD73⁺ Treg-клеток, CD73⁺CD4⁺ Т-клеток и CD39⁺CD8⁺ Т-клеток у больных КРР было таким же, как в контроле.

Для оценки взаимосвязи ADK с содержанием CD39⁺/CD73⁺ Т-лимфоцитов проведен анализ воз-

Таблица 4. Значения коэффициентов корреляции между уровнем мРНК гена ADK, изоформ ADK-S, ADK-L и относительным содержанием CD39⁺ и CD73⁺ Т-клеток в крови больных колоректальным раком

Субпопуляция Т-клеток	ADK		ADK-S		ADK-L	
	r _s	p	r _s	p	r _s	p
CD8 ⁺ CD73 ⁺	0.107	0.840	0.178	0.713	-0.036	0.951
CD8 ⁺ CD39 ⁺	0.033	0.948	-0.217	0.581	0.126	0.295
CD4 ⁺ CD25 ^{-int} CD73 ⁺	-0.217	0.581	-0.300	0.437	0.393	0.295
CD4 ⁺ CD25 ^{-int} CD39 ⁺	-0.021	0.929	0.255	0.278	0.002	0.995
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo/-} CD73 ⁺	-0.381	0.359	-0.381	0.360	0.256	0.549
CD4 ⁺ CD25 ⁺ CD127 ^{lo/-} CD39 ⁺	0.051	0.827	0.278	0.235	-0.151	0.522

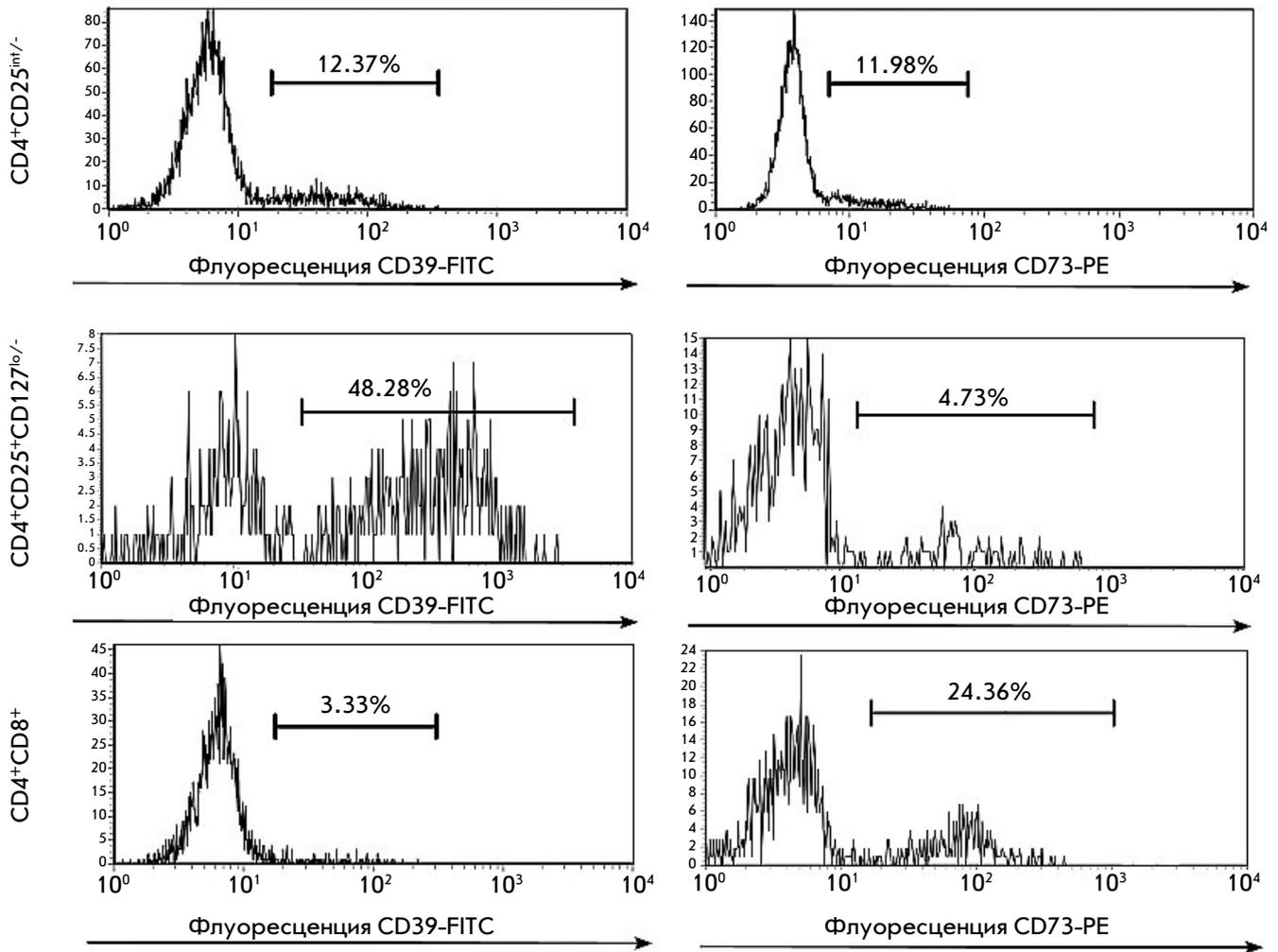


Рис. 3. Пример гистограмм распределения экспрессии CD39 и CD73 на поверхности CD8⁺ и CD4⁺ Т-клеток здорового донора. По оси X – интенсивность флуоресценции флуорохромов FITC и PE, конъюгированных с антителами к CD39 и CD73 соответственно. По оси Y показано количество событий в гейте лимфоцитов. Справа под горизонтальной линией отмечены клетки, экспрессирующие CD39/CD73, слева находятся клетки, негативные по экспрессии CD39/CD73

возможных связей между уровнем мРНК гена *ADK*, его изоформ *ADK-L*, *ADK-S* и содержанием CD39/CD73-экспрессирующих Т-клеток в периферической крови больных КРР. Однако статистически значимых корреляционных связей не выявлено (табл. 4).

ОБСУЖДЕНИЕ РЕЗУЛЬТАТОВ

В настоящее время установлено, что аденозинергический путь представляет интерес в качестве перспективной мишени для противоопухолевой терапии. Экспрессия и активность основных участников этого пути, CD39/CD73/A2aR, повышены в опухолевой ткани и часто ассоциируются с клиническими признаками заболевания и неблагоприятным про-

гнозом при некоторых типах рака [17]. В клинических испытаниях получены предварительный оптимальный профиль безопасности блокаторов A2aR и CD73 и повышенная общая частота ответа на них [4, 20]. Тем не менее, положительные результаты как монотерапии, так и комбинированной терапии были в основном ниже, чем ожидалось на основании доклинических исследований. Это указывает на необходимость более тонкого отбора пациентов или использования биомаркеров, которые могли бы прогнозировать и оптимизировать результаты терапии [4, 20].

Фермент ADK действует как регулятор уровня аденозина, превращая его в AMP. В настоящее

время нет четкого понимания роли ADK при развитии опухоли. Ранние работы показывают повышение уровня экспрессии гена *ADK* [14] и ферментативной активности ADK [21] в опухолевой ткани больных КРР по сравнению с нормальной тканью. У больных раком печени, напротив, уровень белка ADK был ниже, чем в здоровой ткани. Кроме того, в экспериментальной модели снижение уровня ADK в печени увеличивало чувствительность к острым токсическим эффектам канцерогена (диэтилнитрозамин) [12]. Ряд экспериментальных работ описывает ограничение пролиферации опухолевых клеток и индукцию апоптоза при обработке ингибиторами ADK, в том числе и в клеточной линии HT-29 колоректального рака [22]. Довольно мало известно о роли изоформ ADK при канцерогенезе. Так, Shamloo и соавт. [15] определили более значимую роль длинной изоформы ADK при раке молочной железы. Нокдаун гена этой изоформы приводит к событиям, предполагающим ее участие в митогенезе, канцерогенезе и инвазии опухолевых клеток. Практически не определен уровень ADK в периферической крови, а также связь ADK с активацией ключевых для противоопухолевого иммунного ответа популяций лимфоцитов ($CD8^+/CD4^+$ Т-клеток, Treg-клеток) у больных КРР.

Полученные нами результаты подтверждают изменение экспрессии ADK в патогенезе КРР. Согласно опубликованным данным, в опухолевой ткани идет локальное повышение активации ADK. Это может быть связано с накоплением аденозина в микроокружении опухоли и его активным метаболизмом. На периферии, в крови, напротив, мы наблюдали снижение уровня мРНК *ADK-L* в группе больных с III–IV стадиями КРР по сравнению с группой здоровых лиц, а также обратную связь между изменением уровня мРНК *ADK-L* у больных с распространенным процессом (T2–T4), тогда как уровень *ADK-S* не изменялся по сравнению с контролем.

Как известно, некоторые популяции лейкоцитов экспрессируют эктонуклеотидазы CD39/CD73 и могут участвовать в генерации аденозина [23], что может привести к иммунной супрессии и росту опухоли, в том числе и при КРР [3, 24]. В нашей работе обнаружены значимые корреляционные связи между уровнем мРНК гена *CD39* и мРНК *ADK-S* в периферической крови ($r = -0.468$ при $p = 0.043$), а также между уровнем мРНК гена *CD73* и мРНК *ADK-L* ($r = 0.518$ при $p = 0.0232$) у больных КРР.

Кроме того, не выявлена связь генной экспрессии ADK и изоформ с изменением экспрессии гена, кодирующего аденозиновый рецептор A2aA, активация которого на лимфоцитах способствует развитию иммунной супрессии.

В нашей работе впервые проанализирована связь между содержанием основных эффекторных и супрессорных популяций лимфоцитов, экспрессирующих на своей поверхности CD39/CD73, и изменениями экспрессии ADK у больных КРР. Определение содержания $CD4^+$, $CD8^+$ Т-клеток и Treg-клеток в периферической крови показало, что наиболее значимо при КРР изменяется содержание $CD39^+$ Т-клеток (табл. 3). Впервые проведен анализ связи между содержанием $CD39^+$ и $CD73^+$ Т-клеток и содержанием мРНК ADK и ее изоформ в периферической крови больных КРР. Достоверных корреляционных связей не обнаружено.

На сегодняшний день известно, что нести на своей поверхности эктонуклеотидазы CD39 и CD73 могут не только Т-лимфоциты, но и нейтрофилы, составляющие большинство в периферической крови, а также В-клетки, моноциты и эндотелиальные клетки [22, 25]. РНК для анализа экспрессии в нашей работе выделяли из цельной крови. Возможно, для определения взаимосвязи между исследуемыми показателями требуется проведение более глубокой оценки с использованием в качестве исходного материала для анализа экспрессии генов фракции мононуклеарных клеток (лимфоциты и моноциты), а также увеличение объема выборки.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Полученные нами, а также опубликованные данные свидетельствуют об изменении экспрессии ADK в патогенезе КРР. Обнаружена связь экспрессии длинной и короткой изоформ ADK с экспрессией *CD39* и *CD73* – эктонуклеотидаз, участвующих в генерации внеклеточного аденозина. Показана перспективная роль мРНК *ADK-L* в качестве биомаркера КРР. Однако взаимосвязь между уровнями экспрессии гена ADK, изоформ *ADK-L*, *ADK-S* и содержанием Т-лимфоцитов, экспрессирующих CD39/CD73, в периферической крови больных КРР в данном исследовании не обнаружена. ●

Исследование выполнено при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 21-75-00013).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Boison D., Yegutkin G.G. // *Cancer Cell*. 2019. V. 36. № 6. P. 582–596.
2. Sek K., Mølck C., Stewart G., Kats L., Darcy P., Beavis P. // *IJMS*. 2018. V. 19. № 12. P. 3837.
3. Churov A., Zhulai G. // *Human Immunol.* 2021. V. 82. № 4. P. 270–278.
4. Thompson E.A., Powell J.D. // *Annu. Rev. Med.* 2021. V. 72. № 1. P. 331–348.
5. Horenstein A.L., Chillemi A., Zaccarello G., Bruzzone S., Quarona V., Zito A., Serra S., Malavasi F. // *OncoImmunology*. 2013. V. 2. № 9. P. e26246.
6. Park J., Gupta R.S. // *Cell. Mol. Life Sci.* 2008. V. 65. № 18. P. 2875–2896.
7. Bagheri S., Saboury A.A., Haertlé T. // *Internat. J. Biol. Macromolecules*. 2019. V. 141. P. 1246–1257.
8. Zhulai G., Oleinik E., Shibaev M., Ignatev K. // *Biomolecules*. 2022. V. 12. № 3. P. 418.
9. Boison D. // *Pharmacol. Rev.* 2013. V. 65. № 3. P. 906–943.
10. Wahba A.E., Fedele D., Gebril H., AlHarfoush E., Toti K.S., Jacobson K.A., Boison D. // *ACS Pharmacol. Transl. Sci.* 2021. V. 4. № 2. P. 680–686.
11. Xu Y., Wang Y., Yan S., Zhou Y., Yang Q., Pan Y., Zeng X., An X., et al. // *EMBO Mol. Med.* 2017. V. 9. № 9. P. 1263–1278.
12. El-Kharrag R., Owen R., Boison D. // *J. Caffeine Adenosine Res.* 2019. V. 9. № 1. P. 4–11.
13. Huang J., He Y., Chen M., Du J., Li G., Li S., Liu W., Long X. // *Mol. Med. Repts.* 2015. V. 12. № 5. P. 6509–6516.
14. Giglioni S., Leoncini R., Aceto E., Chessa A., Civitelli S., Bernini A., Tanzini G., Carraro F., Pucci A., Vannoni D. // *Nucleosides. Nucleotides Nucl. Acids*. 2008. V. 27. № 6–7. P. 750–754.
15. Shamloo B., Kumar N., Owen R.H., Reemmer J., Ost J., Perkins R.S., Shen H. // *Oncotarget*. 2019. V. 10. № 68. P. 7238–7250.
16. Hajizadeh F., Masjedi A., Heydarzadeh Asl. S., Karoon Kiani F., Peydaveisi M., Ghalamfarsa G., Jadidi-Niaragh F., Sevbitov A. // *Internat. Immunopharmacol.* 2020. V. 87. P. 106853.
17. Baghbani E., Noorolyai S., Shanebandi D., Mokhtarzadeh A., Aghebati-Maleki L., Shahgoli V.K., Brunetti O., Rahmani S., Shadbad M., Baghbanzadeh M., et al. // *Life Sci.* 2021. V. 282. P. 119826.
18. Жулай Г.А., Олейник Е.К., Чуров А.В., Романов А.А., Кравченко П.Н., Олейник В.М. // *Мед. иммунол.* 2017. Вып. 19. № 1. С. 89–94.
19. Головкин А.С., Серебрякова М.К., Жидулева Е.В., Муртазалиева П.М., Титов В.А., Иртюга О.Б., Моисеева О.М., Кробинец И.И., Кудрявцев И.В. // *Трансляционная медицина*. 2017. Вып. 4. № 5. С. 46–60.
20. Willingham S.B., Hotson A.N., Miller R.A. // *Curr. Opin. Pharmacol.* 2020. V. 53. P. 126–133.
21. Vannoni D., Bernini A., Carlucci F., Civitelli S., Di Pietro M.C., Leoncini R., Rosi F., Tabucchi A., Tanzini G., Marinello E. // *Med. Oncol.* 2004. V. 21. № 2. P. 187–195.
22. Luo H.Y., Shen H.Y., Perkins R.S., Wang Y.X. // *Front. Pharmacol.* 2022. V. 13. P. 908882.
23. Antonioli L., Pacher P., Vizi E.S., Haskó G. // *Trends Mol. Med.* 2013. V. 19. № 6. P. 355–367.
24. Wu X.R., He X.S., Chen Y.F., Yuan R.X., Zeng Y., Lian L., Zou Y., Lan N., Wu X., Lan P. // *J. Surg. Oncol.* 2012. V. 106. № 2. P. 130–137.
25. Pulte E.D., Broekman M.J., Olson K.E., Drosopoulos J.H.F., Kizer J.R., Islam N., Marcus A.J. // *Thrombosis Res.* 2007. V. 121. № 3. P. 309–317.

УДК 576.38: 577.215.3: 616.36-004

Уровень мРНК ММР-9 и прогрессирование мостовидного фиброза при токсическом поражении печени

Е. И. Лебедева¹, А. С. Бабенко², А. Т. Щастный¹¹Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет, Витебск, 210009 Республика Беларусь²Белорусский государственный медицинский университет, Минск, 220116 Республика Беларусь

*E-mail: lebedeva.ya-elenale2013@yandex.ru

Поступила в редакцию 22.03.2023

Принята к печати 30.05.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.17856

РЕФЕРАТ Методы лечения заболеваний печени, при которых фиброз является ключевым патогенетическим звеном, до сих пор остаются актуальной проблемой гепатологии. Проведен анализ уровня мРНК ММР-9, количества FAP^{+} -, α -SMA⁺-, CD45⁺-клеток в девяти временных точках фиброза и цирроза. Установлено, что в случае фиброза печени выбор оптимального референсного гена зависит от стадии фиброгенеза. При детальном изучении конкретных стадий, а не всего процесса в длительном эксперименте следует использовать дополнительный выбор оптимального референсного гена. Уровень экспрессии мРНК ММР-9 стоит рассматривать как маркер инициации и развития фиброза печени, но не прогрессирования цирроза. В печени одновременно выявлены две морфологически неоднородные популяции миофибробластов, которые синтезировали различные типы иммуногистохимических маркеров. Показано, что FAP^{+} -клетки вносят основной вклад в развитие портального и начального этапа мостовидного фиброза. В выбранной экспериментальной модели инициация и развитие фиброза до начала перестройки паренхимы протекают с низким уровнем воспаления.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА крысы, печень, мРНК ММР-9, иммуногистохимия, FAP^{+} -, α -SMA⁺-, CD45⁺-клетки.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ HSC – стеллатные клетки; портальные PF – фибробласты; ТАА – тиацетамид; ПЦР-РВ – полимеразная цепная реакция в режиме реального времени.

ВВЕДЕНИЕ

Белок ММР-9, также известный как коллагеназа IV типа (желатиназа В), принадлежит к крупному семейству матриксных цинкзависимых протеиназ (ММР). Практически все члены этого семейства играют важную роль в регенерации печени, контроле количества белков внеклеточного матрикса, участвуют в фиброзе и циррозе, канцерогенезе и других процессах [1]. Благодаря многолетнему изучению молекулярных механизмов развития фиброза печени стало известно, что белки ММР-2 и ММР-9 вовлекаются в этот патологический процесс практически на всех стадиях и выполняют ключевую функцию в его прогрессировании [2, 3]. Наряду с этим, уровень ряда ММР в плазме крови является маркером фиброза, а некоторые терапевтические подходы направлены на ММР-9 как на специфическую мишень [4–7].

В ряде работ отмечено увеличение экспрессии белка ММР-9 и соответствующей мРНК на фоне

прогрессирования фиброза печени. При этом этиологические факторы, вызывающие фиброз, не имеют большого значения. Показано, что рост экспрессии ММР-9 наблюдается при токсических поражениях печени, равно как и на фоне вирусного гепатита [8, 9]. По мере развития фиброза происходит увеличение удельного объема соединительной ткани и в ряде случаев сообщают о корреляции этого процесса с ростом уровня мРНК ММР-9. Металлопротеиназа в норме отвечает за деградацию соединительной ткани, обновление коллагена и поддержание оптимального уровня белков внеклеточного матрикса [10, 11].

Однако связь между ростом уровня мРНК ММР-9 и прогрессированием фиброза печени до сих пор не изучена [1–3]. Кроме этого, на существующих экспериментальных моделях животных изучают конкретные, далеко отстоящие друг от друга, ключевые позиции, – норма, фиброз и цирроз, либо фиброгенез не на всем протяжении времени. Эти огра-

ничения могут скрывать важные детали динамики уровня MMP-9 [8–11].

Стеллатные клетки (HSC) принято считать основной клеточной популяцией, синтезирующей межклеточное вещество при патологиях печени. В научной литературе стеллатные клетки имеют разные названия: жиронакапливающие клетки, липоциты, перисинусоидные клетки, звездчатые клетки печени, клетки Ито и перициты [12–15]. В условиях физиологической нормы HSC локализируются в перисинусоидном пространстве, регулируют кровоток в синусоидах, функционируя как перициты, обладают низкой пролиферативной активностью и способностью к секреции коллагенов [13, 15]. Поражения печени преимущественно вирусной и токсической этиологии стимулируют активацию и трансдифференцировку HSC в миофибробластический фенотип с избыточной экспрессией α -SMA [12, 14–16]. Процессы активации, трансдифференцировки HSCs в настоящее время до конца не изучены и эффективная антифибротическая терапия не разработана. Источник покоящихся и активированных HSC не установлен. Предполагают, что их пул пополняется за счет клеток костного мозга, но нельзя исключать и то, что это самоподдерживающаяся популяция клеток [12, 16–18].

При холестатических заболеваниях печени источником миофибробластов считают резидентные портальные фибробласты (PF) [13]. Окончательная роль PF в развитии холестатического фиброза до сих пор остается дискуссионной. В исследованиях с использованием Col-GFP и Mdr2^{-/-}-мышей на начальных стадиях холестатического фиброгенеза источником миофибробластов выступали PF. Дальнейшее прогрессирование фиброза приводило к трансдифференцировке HSC в фиброгенный фенотип [16]. В других работах отмечено, что холестатический фиброз сопровождается одновременной активацией PF и HSC [16–18].

В настоящей работе мы предположили, что рост уровня мРНК MMP-9 может быть связан со скоростью образования соединительной ткани в ходе фиброгенеза. В соответствии с этим, целью настоящей работы было получение новых данных об уровне экспрессии мРНК MMP-9 и фиброгенной популяции клеток на разных стадиях токсического фиброза печени.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Дизайн эксперимента был одобрен на заседании Комиссии по биоэтике и гуманному обращению с лабораторными животными при учреждении образования «Витебский государственный ордена Дружбы народов медицинский университет» (протокол № 6 от 03.01.2019). В работе использовали половозре-

лых крыс-самцов Wistar весом от 190–210 г. Фиброз и цирроз печени моделировали путем хронической интоксикации тиаоацетамидом (ТАА; Acros Organics). Свежеприготовленный раствор ТАА вводили интрагастрально через зонд в дозе 200 мг/кг массы тела 2 раза в неделю в течение 17 нед. Крысы контрольной группы ($n = 12$) получали воду без ТАА в аналогичном объеме. Животных рандомизировали на 8 групп ($n = 12$ в каждой) в зависимости от длительности воздействия ТАА: 3 нед. (1-я группа), 5 нед. (2-я группа), 7 нед. (3-я группа), 9 нед. (4-я группа), 11 нед. (5-я группа), 13 нед. (6-я группа), 15 нед. (7-я группа), 17 нед. (8-я группа).

Гистологические и морфометрические методы исследования

После декапитации под кратковременным эфирным наркозом с применением гильотины из большой левой доли печени крыс забирали образцы диаметром 5–10 мм, которые помещали в 10% раствор нейтрального формалина («Биовитрум», Россия) на фосфатном буфере и фиксировали в течение 24 ч. Затем проводили обработку фиксированного материала с последующей заливкой в парафин с использованием автомата для гистологической обработки ткани STP-120 (Thermo Fisher Scientific, Германия) и станции для заливки ткани парафином EC350 (Thermo Fisher Scientific). От каждого животного получали по одному блоку для каждого метода окрашивания и с помощью ротационного микротомы HM340E (MICROM, Laborgerate GmbH, Германия) готовили в среднем по 3–4 среза толщиной 4 мкм и помещали их на предметные стекла. Для получения обзорных гистологических препаратов срезы печени окрашивали гематоксилином и эозином, а для выявления соединительной ткани – по Маллори с помощью автомата для окраски HMS70 (Thermo Fisher Scientific) [19].

Иммуногистохимическое исследование проводили на парафиновых срезах [20]. В качестве маркера активированных PF применяли поликлональные антитела кролика FAP (FAP-alpha, пролилэндопептидаза FAP, разведение 1 : 100), активированных HSC – моноклональные антитела мыши к α -SMA (alpha-SMA, ACTA2, разведение 1 : 1000), гемопоэтических стволовых клеток – поликлональные антитела кролика (CD45, разведение 1 : 200). Антитела производства Wuman Elabscience Biotechnology Incorporated Company, каталожный номер E-AB-32870 (FAP), E-AB-22155 (α -SMA), E-AB-16319 (CD45). В работе также использовали набор 2-step plus Poly-HRP Anti Rabbit/Mouse IgG Detection System/with DAB Solution; Retrieve-All Antigen (Unmasking System Basic), буфер для разведения антител (BioLegend),

Твин-20 (Glentham Life Sciences), PBS (Melford). Для лучшей ориентации в препарате и правильной идентификации клеток, содержащих искомым антиген, срезы докрашивали гематоксилином Майера в течение 1 мин. Для объективной интерпретации результатов каждой исследуемой серии (группы животных) использовали положительный и отрицательный контроли. Иммуногистохимическую окраску оценивали как положительную только при отсутствии окрашивания в отрицательном контроле и, наоборот, как отрицательную при окрашивании в положительном контроле.

Морфометрический анализ

Гистологические препараты исследовали с использованием компьютерных программ ImageScope Color и cellSens Standard. Площадь соединительной ткани определяли в процентах к общей площади среза [21]. Измерения осуществляли, используя микрфотосъемку случайных полей зрения (не менее 3 в каждом гистологическом срезе) препаратов печени цифровой камерой OLYMPUS XC30 (Япония) на базе микроскопа OLYMPUS BX51 (Япония) при увеличении объектива 20×. Количество FAP-позитивных клеток (FAP⁺-клетки), α-SMA-позитивных клеток (α-SMA⁺-клетки) и CD45-позитивных клеток (CD45⁺-клетки) подсчитывали в трех полях зрения каждого гистологического среза при увеличении объектива 40×. Степень фиброза оценивали с использованием полуколичественной шкалы Ishak K.G. (табл. 1) [22, 23].

Оценка относительного уровня мРНК гена MMP-9

Для исследования мРНК MMP-9 образцы печени помещали в криопробирки и далее в жидкий азот для хранения до начала процедуры выделения суммарной РНК. Общую фракцию РНК выделяли согласно инструкции производителя набора АртРНК MiniSpin («АртБиоТех», Беларусь). кДНК синтезировали с использованием олиго(dT)-праймеров и набора реагентов ArtMMLV Total («АртБиоТех») в соответствии с инструкцией производителя. В каждой реакции использовали 200 нг общей фракции РНК. Олигонуклеотидные праймеры и зонды для полимеразной цепной реакции в режиме реального времени (ПЦР-РВ) подбирали с помощью бесплатного онлайн-приложения Primer3 v. 0.4.0 (<http://bioinfo.ut.ee/primer3-0.4.0/>). В качестве кандидатов в референсные гены были выбраны *hes1*, *sdha* и *hprt*. Последовательности олигонуклеотидов представлены в табл. 2.

ПЦР-РВ проводили с использованием реагентов производства «Праймтех», Беларусь. Конечный объем реакционной смеси составлял

Таблица 1. Стадии фиброза печени по шкале K.G. Ishak

Стадии фиброза по шкале Ishak K.G.	Морфологическая характеристика степени выраженности фиброза
F0	Фиброз отсутствует
F1	Фиброзное расширение портальных зон с короткими фиброзными септами и без них
F2	Фиброзное расширение большинства портальных зон с короткими фиброзными септами и без них
F3	Фиброзное расширение большинства портальных зон с единичными мостовидными портопортальными септами
F4	Фиброзное расширение большинства портальных зон с выраженными мостовидными портопортальными и портоцентральными септами
F5	Многочисленные мостовидные септы с единичными узелками (неполный цирроз)
F6	Цирроз

25 мкл и содержал все необходимые компоненты в следующих концентрациях: 2 мМ хлорида магния, 0.1 мМ смеси дезоксирибонуклеотидтрифосфатов, 500 нМ олигонуклеотидов, включая зонд для ПЦР-РВ, 1.25 ед. термостабильной Taq-ДНК-полимеразы с соответствующим буферным раствором. Режим термоциклирования: 95°C – 2 мин, затем 40 циклов: 95°C – 5 с, 60°C – 45 с. Детекция по каналу FAM после каждого цикла. В работе использовали прибор CFX96touch (BioRad, США). Эффективность реакций определяли с помощью метода стандартной кривой и серий разведений концентрированных образцов кДНК. ПЦР-РВ каждого образца биологического материала проводили в трех повторях. В каждой экспериментальной и контрольной группах каждый из 12 образцов анализировали по отдельности для получения наибольшей достоверности и учета внутригрупповой вариации, фенотипической гетерогенности уровня экспрессии генов.

Статистический анализ

Полученные результаты обрабатывали в программе Statistica 10.0 (StatSoft, Inc.), Microsoft Office Excel (Microsoft Corp.). В каждой выборке определяли нормальность частотного распределения каждого признака. Поскольку выборки не были малыми ($n = 60 > 50$), проверку осуществляли по критерию Лиллиефорса. Данные представлены в виде средних арифметических (M) и соответствующих доверительных интервалов (95%ДИ), медианы и значения 15 и 85 перцентилей (Me (15%; 85%)). Об уровне статистической значимости различий изучаемых призна-

Таблица 2. Олигонуклеотидные праймеры и флуоресцентно меченные зонды, использованные в работе

Название олигонуклеотида	Нуклеотидная последовательность, 5' → 3'	Метка, 5'	Метка, 3'
<i>mmp-9F</i>	СТАСТСГАССССГАСГТСАС		
<i>mmp-9R</i>	АГАГТАСГТТГСССАГА		
<i>mmp-9P</i>	ГАТГТГСГТСТТССССТСГ	FAM	BHQ1
<i>hes1F</i>	ГАААГАТАСГТСССГГАТТ		
<i>hes1R</i>	СГАГАГТГТТСАСГТСАС		
<i>hes1P</i>	ССААГТГГАГААГГАСАСА	FAM	BHQ1
<i>hprtF</i>	ГГАСАГАСГТГАААГАСГТГТ		
<i>hprtR</i>	АСАГАГСССАСААТГТГАТ		
<i>hprtP</i>	САТГААГАГАТГГААГСС	FAM	BHQ1
<i>sdhaF</i>	СССАСАГАТТСАСГТГТ		
<i>sdhaR</i>	ТТГГТГТТГАТГАГААТГС		
<i>sdhaP</i>	САТСАСАГААГГАТГСССГТ	FAM	BHQ1

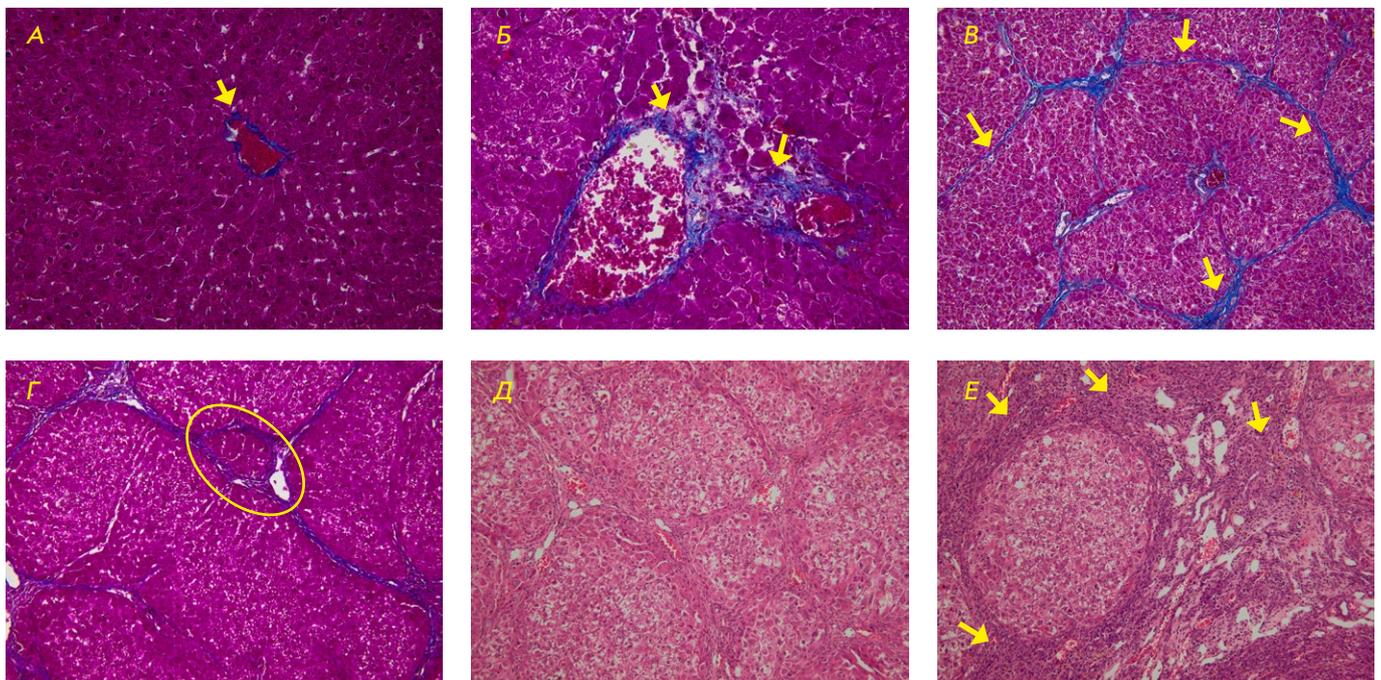


Рис. 1. Фрагменты печени крыс контрольной группы (А), через 3 нед. (Б), 7 нед. (В), 9 нед. (Г), 13 нед. (Д), 17 нед. (Е) после начала эксперимента. Окраска по методу Маллори. $\times 40$ (А, Б), $\times 20$ (В, Г). Окраска гематоксилином-эозином. $\times 20$ (Д, Е). А – незначительное количество соединительной ткани в области центральной вены (стрелка); Б – соединительная ткань в портальной зоне (стрелки); В – соединительнотканые септы между портальными зонами (стрелки); Г – сформированная ложная печеночная долька (выделена овальной рамкой); Д – сформированные ложные печеночные дольки разной формы и диаметра; Е – резко выраженная деструкция органа, клетки лимфоидно-гистиоцитарного инфильтрата (стрелки)

ков в группах с нормальным распределением данных судили по *t*-критерию Стьюдента; при отклонении выборок от нормального распределения использовали *U*-критерий Манна–Уитни. Для наглядности результаты статистической обработки данных представляли в виде графиков однофакторного и двухфакторного параметрического дисперсионного анализа. Так как во всех группах было одинаковое количество

исследуемых признаков, допустимо использовать параметрический дисперсионный анализ [24].

РЕЗУЛЬТАТЫ

Патоморфологический анализ печени крыс

У животных интактной группы выявили незначительное количество соединительной ткани вокруг меж-

дольковых сосудов и желчных протоков портальных зон, центральных и собирательных вен (F0, *рис. 1А*).

Важно отметить, что по мере прогрессирования фиброза печени скорость разрастания соединительной ткани была неодинаковой (*рис. 2*).

К 3 нед. эксперимента отмечали умеренное формирование фиброзной соединительной ткани в портальных зонах (F1, *рис. 1Б*). На 5 нед. процесс образования фиброзной ткани замедлился, но при этом она одновременно определялась как в портальных зонах, так и в паренхиме (мостовидный фиброз, F2/F3). К 7 нед. эксперимента интенсивность синтеза соединительной ткани сохранилась практически на том же уровне, как и на 5 нед. (F3/F4, *рис. 1В*). На этапе перехода от фиброза к циррозу снова наблюдали усиленное формирование соединительной ткани, аналогичное началу эксперимента (3 нед.). Через 9 нед. у портальных зон происходило образование ложных печеночных долек, что было морфологическим критерием начальной трансформации фиброза в цирроз (F4/F5, *рис. 1Г*). В период с 11 по 17 нед. разрастание соединительной ткани достигало максимально значения (F6, *рис. 1Д,Е*).

В печени интактных животных клетки лимфоидно-гистиоцитарного инфильтрата практически отсутствовали. Это указывает на чрезвычайно низкую выраженность воспаления или его полное отсутствие. Вопреки распространенному мнению о росте уровня воспаления при развитии фиброза, на 3 нед. и далее на 5 и 7 нед. не выявили морфологически значимых очагов воспаления, что свидетельствовало о том, что инициация и развитие фиброза до начала перестройки паренхимы протекали в данной токсической модели с низким уровнем воспаления. Начиная с 9 нед. эксперимента, на этапе активной трансформации фиброза в цирроз наблюдали диффузные очаги воспаления в соединительнотканых септах и портальных зонах. К 11 нед. (стадия неполного цирроза) уровень воспаления оценивали как умеренный. Количество клеток лимфоидно-гистиоцитарного ряда увеличилось. С 13 по 17 нед. на стадии развитого цирроза уровень воспаления стремительно нарастал и расценивался нами как высокий (*рис. 1Д,Е*).

Изменение количества клеток, экспрессирующих маркеры FAP, α -SMA и CD45

Клетки, синтезирующие маркер FAP⁺, в печени интактных животных отсутствовали (*рис. 3А*). В синусоидах α -SMA⁺-клетки не отмечены (*рис. 3Б*), но в отдельных случаях их выявляли в стенках междольковых артерий, междольковых и поддольковых вен. CD45⁺-клетки крайне редко локализовались в просветах сосудов и синусоидах, вместе с тем в паренхиме не визуализировались (*рис. 3В*).

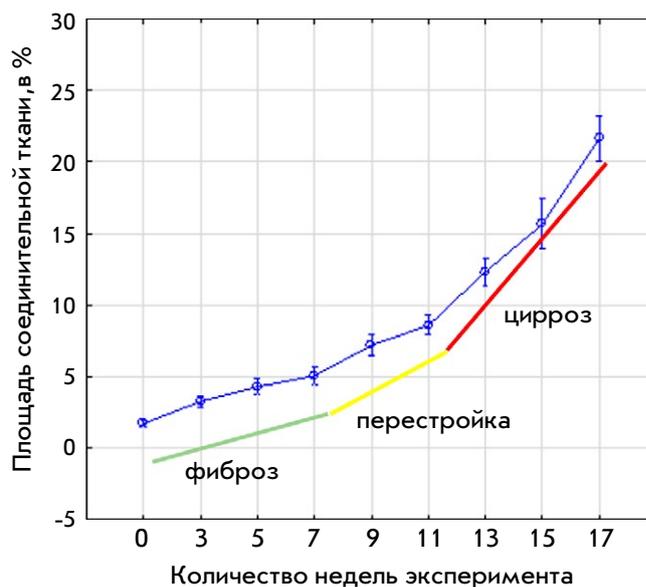


Рис. 2. Изменение площади соединительной ткани на разных этапах исследования

Начиная с 3 нед., наблюдали рост количества всех клеток, несущих указанные маркеры, однако число α -SMA⁺, CD45⁺-клеток превышало число FAP⁺-клеток (*рис. 4*).

На 5 нед. количество клеток, несущих целевые маркеры, увеличилось, при этом разрыв между FAP⁺-клетками и α -SMA⁺-клетками сократился. В то же время прирост CD45⁺-клеток был минимальным. Далее на 7 и 9 нед. ситуация с FAP⁺- и α -SMA⁺-клетками повторяется. На 7 нед. прирост числа α -SMA⁺-клеток более выражен (в % отношении), на 9 нед. разрыв между количеством FAP⁺- и α -SMA⁺-клеток снова сокращается. Наблюдали также рост CD45⁺-клеток, однако по мере прогрессирования фиброза его темпы замедляются, что переводит данный параметр в разряд второстепенных по критерию темпов роста. С 11 по 13 нед. эксперимента при переходе фиброза в цирроз снова наблюдали увеличение разрыва в темпах роста FAP⁺- и α -SMA⁺-клеток, на фоне которого зафиксировали некоторое снижение числа CD45⁺-клеток. Их доля на 15 и 17 нед. оставалась самой низкой на фоне FAP⁺- и α -SMA⁺-клеток при зафиксированном росте. В то же время количество α -SMA⁺-клеток быстро нарастало. На всех сроках выявлена статистически значимая сильная корреляция между площадью соединительной ткани и количеством FAP⁺-, α -SMA⁺-, CD45⁺-клеток.

На гистологических препаратах α -SMA⁺-клетки округлой формы наблюдали в синусоидах и очагах некроза до начала процесса трансформации фиброза в цирроз (9 нед.). С 11 по 17 нед. они находились как в синусоидах, так и в соединитель-

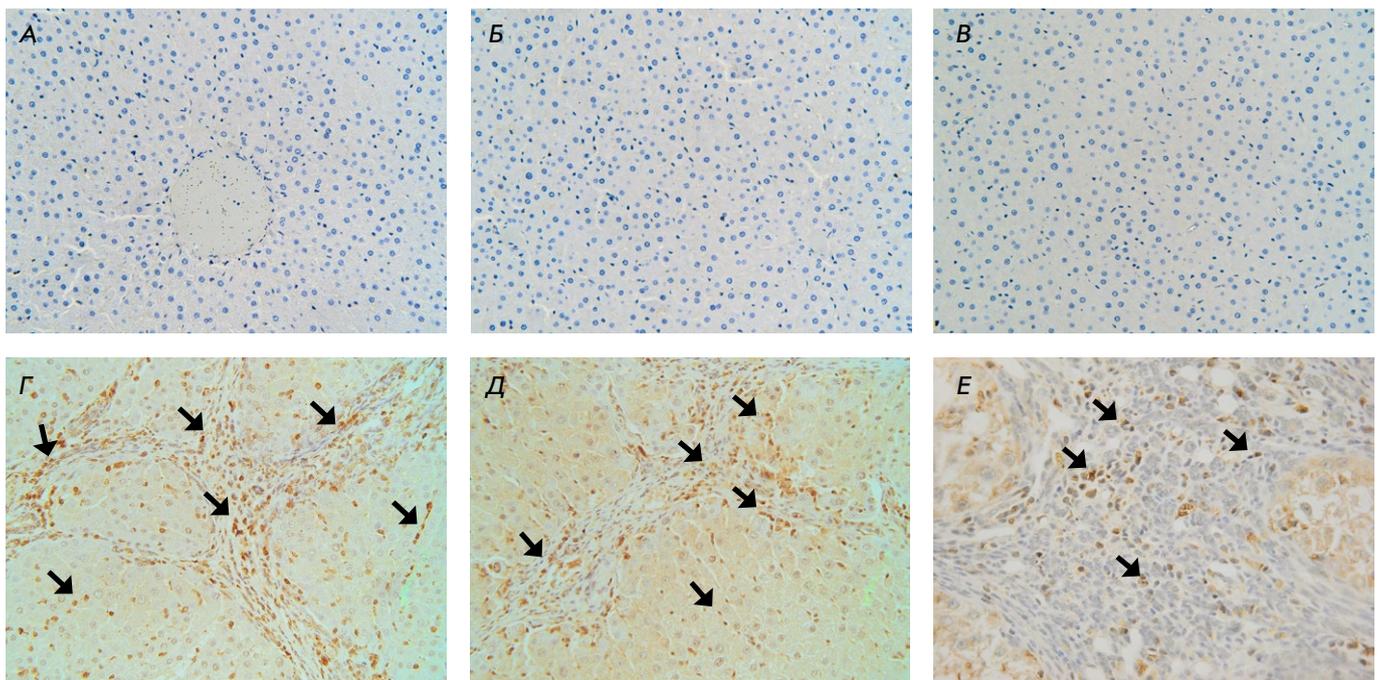


Рис. 3. Фрагменты печени крыс контрольной группы (А, Б, В), через 15 нед. (Г, Д), через 17 нед. (Е) после начала эксперимента. Иммуногистохимическое окрашивание: на FAP – (А, Д); на α -SMA – (Б, Г); на CD45 – (Б, Е). Докраска гематоксилином Майера. Увеличение $\times 40$. А – FAP⁺-клетки отсутствуют; Б – α -SMA⁺-клетки в синусоидах не выявлены; В – CD45⁺-клетки в паренхиме отсутствуют; Г – α -SMA⁺-клетки (стрелки); Д – FAP⁺-клетки (стрелки); Е – CD45⁺-клетки в соединительнотканной септе (стрелки)

нотканых септах (рис. 3Г). FAP⁺-клетки округлой формы на первом этапе эксперимента располагались вокруг междольковых сосудов и вблизи междольковых желчных протоков портальных зон, а с 7 нед. их выявляли в соединительнотканых септах и синусоидах (рис. 3Д). С помощью метода окраски по Маллори мы наблюдали направленное разрастание волокон фиброзной соединительной ткани с FAP⁺-клетками от двух портальных зон через паренхиму печени навстречу друг другу, предопределяя путь для патологической ткани и формирования соединительнотканых мостов – мостовидный фиброз. CD45⁺-клетки локализовались диффузно среди других клеток лимфоидно-гистиоцитарного инфильтрата соединительнотканых септ и портальных зон, а также в просвете сосудов (рис. 3Е). Реже они выявлялись в синусоидах ложных печеночных долек.

Уровень экспрессии мРНК MMP-9

В качестве референсного гена для нормализации данных ПЦР-РВ выбрали ген *hes1*, поскольку уровень его экспрессии был наиболее стабильным на протяжении всего эксперимента. Использование генов *hprt1* и *sdha* в качестве референсных признано нецелесообразным в силу высокой вариабельности уровня их мРНК. Эффективность ПЦР-РВ для мишени (MMP-9) и референсного гена (*hes1*)

отличалась менее чем на 1% [25], поэтому относительный уровень мРНК оценивали с использованием стандартного метода K.J. Livak, T.D. Schmittgen [26]. Данные о нормализованном уровне экспрессии мРНК гена *MMP-9* представлены на рис. 5.

В анализ включили все значения, полученные в рамках исследования, не исключая «выбросов». Невысокий уровень мРНК MMP-9 отмечен в контрольной точке (интактные крысы). Интересно отметить, что к 3 нед. эксперимента на фоне развивающегося фиброза относительный уровень MMP-9 не увеличился и даже несколько снизился по сравнению с контрольным значением. В то же время уровень MMP-9 повысился на сравнительно небольшом промежутке между 5 и 9 нед. эксперимента с последующим снижением до начального уровня. На фоне роста экспрессии мРНК MMP-9 происходил процесс трансформации фиброза в цирроз. Начиная с 11 нед., уровень мРНК MMP-9 снизился и, в итоге, уже с 13 по 17 нед. соответствовал начальному в контрольной точке.

Важно отметить, что рост уровня мРНК MMP-9 в рамках фиброгенеза отмечен во многих работах, выполненных на лабораторных животных [27, 28]. Однако исследователи часто не уделяют достаточного внимания как подробному анализу всех этапов фиброза, так и выбору подходящего референсного

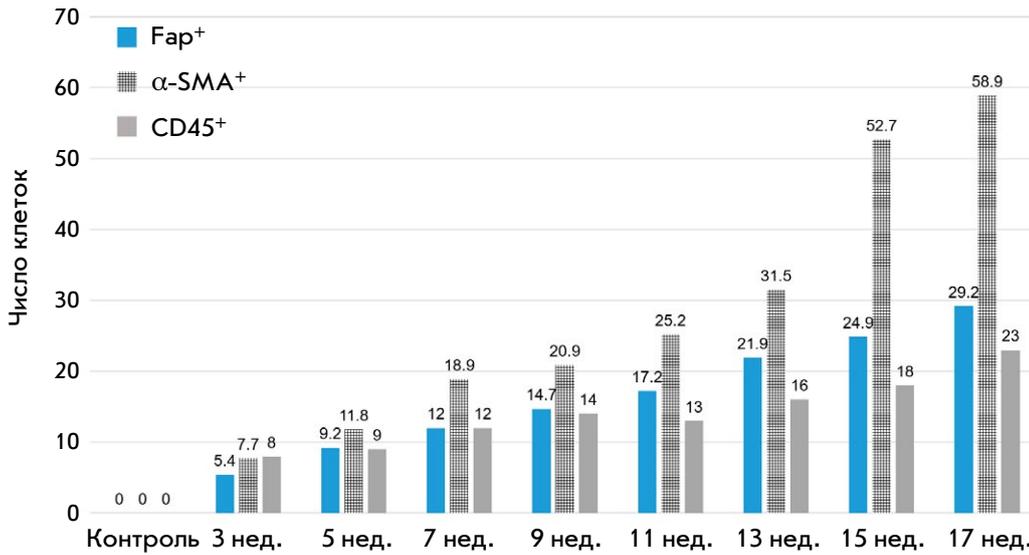


Рис. 4. Изменение количества FAP⁺-, α-SMA⁺-, CD45⁺-клеток на различных этапах исследования

гена для нормализации данных ПЦР-РВ. На рис. 6 представлены результаты нормализации полученных нами данных с использованием двух других референсных генов (*hprt1*, *sdha*). Диапазон значений Ct указанных генов в рамках эксперимента был выше, чем у гена мишени – *MMP-9*.

На рис. 6 приведен пример неадекватного использования референсных генов для нормализации данных ПЦР-РВ. Например, при использовании *hprt1* в среднем регистрируется повышение уровня мРНК *MMP-9* и также снижение на 3 нед. Однако относительные показатели варьируют в значительной степени. Мы считаем, что точность таких измерений может быть достаточной лишь при небольшом количестве контрольных точек эксперимента, но не рекомендуем использовать *hprt1* при подробном анализе стадий фиброза. В случае *sdha* становится невозможной регистрация падения уровня *MMP-9* на 3 нед. эксперимента, равно как и начало его падения на 11 нед. Стоит отметить, что выбор оптимального референсного гена зависит от стадии фиброза. При подробном изучении конкретных стадий, а не всего процесса в длительном эксперименте, следует дополнительно выбирать оптимальный референсный ген [19].

ОБСУЖДЕНИЕ

В рамках настоящей работы мы не оценивали уровень белка *MMP-9* и не можем сказать, какие клетки его синтезируют. Это будет предметом дальнейших исследований. Показано, что в печени *MMP-9* секретируется в основном клетками Купфера (резидентные макрофаги) [29, 30]. *MMP-9* активирует латентный TGFβ (трансформирующий фактор роста бета) и способствует таким образом трансдифференцировке HSC в миофибробластический фенотип

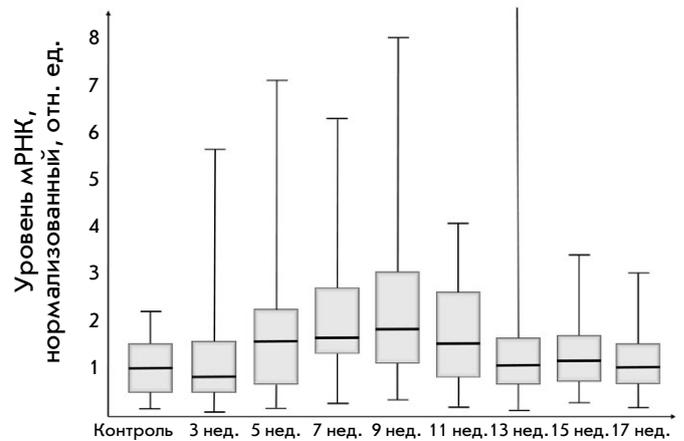


Рис. 5. Относительный уровень мРНК гена *MMP-9*

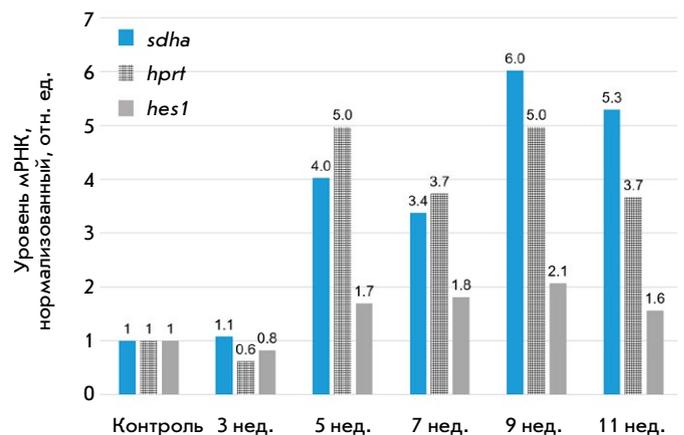


Рис. 6. Относительный уровень мРНК гена *MMP-9* при использовании различных генов для нормализации данных ПЦР-РВ

и прогрессированию фиброза печени в дальнейшем [31–33]. При этом Atta H. и соавт. отмечают, что MMP-9 может способствовать апоптозу трансформированных HSC при низком уровне TIMP1 (тканевый ингибитор матриксных металлопротеиназ), и в этом процессе важную роль выполняют клетки Купфера [29, 30, 34]. Противоречивость данных затрудняет понимание роли клеток Купфера в фиброгенезе печени, что указывает на необходимость фундаментальных исследований.

На начальных этапах инициации и развития фиброза печени наблюдалось увеличение площади соединительной ткани (3 нед. эксперимента). При этом уровень мРНК гена MMP-9 несколько снизился по сравнению со значениями в группе интактных животных. Вероятно, это снижение можно рассматривать как один из факторов относительно быстрого накопления белков внеклеточного матрикса. Снижение уровня мРНК MMP-9 может быть связано как с общим токсическим эффектом в ответ на воздействие ТАА, так и с более сложными процессами. Во-первых, развитие фиброза характеризуется дисбалансом между выработкой металлопротеиназ и соответствующих ингибиторов (белки семейства TIMP). Вероятно, TIMP индуцируется до того, как клетки начинают вырабатывать большее количество металлопротеиназ в ответ на токсические повреждения. Во-вторых, экспрессия гена MMP-9 контролируется эпигенетическими механизмами, и увеличение экспрессии может занимать какое-то время и/или ингибироваться на уровне транскрипции.

К 5 нед. эксперимента на фоне роста уровня мРНК MMP-9 ощутимо снижаются темпы образования соединительной ткани. Вероятно, повышается экспрессия соответствующего белка, что приводит к эффективному разрушению коллагена и других белков внеклеточного матрикса. Такую реакцию можно считать попыткой органа противодействовать прогрессированию фиброза за счет гиперактивации металлопротеиназ. Аналогичная ситуация наблюдается и на 7 нед. эксперимента. На фоне незначительного роста уровня мРНК MMP-9 (по сравнению с 5 нед.) скорость синтеза соединительной ткани продолжает снижаться. Так, прирост площади соединительной ткани к 3 нед. по сравнению с контрольной группой составил – 2.1 раза (201%, $p < 0.05$), к 5 нед. – 26.6% ($p < 0.05$) и к 7 нед. всего 5.2% ($p < 0.05$).

На этапе начала перестройки органа и перехода от фиброза к циррозу уровень мРНК MMP-9 достигает максимума – рост в 2.07 раза ($p < 0.05$) по сравнению с контрольной группой животных. Однако скорость разрастания соединительной ткани заметно возрастает к 9 нед. и примерно на 50% ($p < 0.05$)

превышает количество, зафиксированное к 7 нед. По-видимому, на этой стадии происходит смена ролей и уровень MMP-9 перестает быть важным фактором сдерживания развития фиброза. Возможно, на передний план выходят факторы, связанные с воспалением, поскольку его роль заметно возрастает, что выражается в росте числа диффузных очагов лимфоидно-гистиоцитарного инфильтрата.

К 11 нед. на стадии неполного цирроза уровень мРНК MMP-9 снижается и, вероятно, не играет важной роли в регуляции скорости увеличения площади соединительной ткани. Снижение ее образования происходит за счет каких-то альтернативных механизмов защиты/регенерации. Прирост мРНК MMP-9 составил всего 13% ($p < 0.05$) по сравнению с 9 нед. При этом более выраженными становятся признаки воспаления и в септах и портальных зонах значительно повышается количество клеток лимфоидно-гистиоцитарного инфильтрата.

На стадии развитого цирроза в период 13–17 нед. уровень мРНК MMP-9 достигает значений в контрольной группе животных. При этом уровень воспаления в органе достигает максимума.

Иммуногистохимическим методом в печени крыс одновременно выявлены две морфологически неоднородные популяции миофибробластов, которые экспрессировали различные типы маркеров. При этом α -SMA⁺-клетки на ранних стадиях фиброза не располагались вместе с FAP⁺-клетками. До начала процесса трансформации фиброза печени в цирроз α -SMA⁺-клетки отмечали в синусоидах печени и в очагах некроза, а затем они локализовались как в синусоидах, так и в соединительнотканых септах. FAP⁺-клетки на стадии портального фиброза располагались около междольковых сосудов и междольковых желчных протоков портальных зон, а с 7 нед. их выявляли в соединительнотканых септах и синусоидах.

Низкий уровень воспаления до стадии трансформации фиброза печени в цирроз дает основания предположить, что функция клеток, продуцирующих маркер CD45, заключается в их участии в регуляции функций полиморфных клеток патологических септ. Это требует более детальных исследований.

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Результаты нашей работы показывают, что при изучении фиброгенеза печени выбор оптимального референсного гена зависит от стадии фиброза. При подробном изучении конкретных стадий, а не всего процесса в длительном эксперименте, следует дополнительно проводить выбор оптимального референсного гена. Уровень экспрессии мРНК MMP-9 стоит рассматривать как маркер инициации и развития фиброза печени, но не прогрессирования цирроза.

Иммуногистохимическим методом в печени выявлены одновременно две морфологически неоднородные популяции миофибробластов, которые синтезировали различные типы маркеров. FAP⁺-клетки вносят основной вклад в развитие портального и начального этапа мостовидного фиброза. Их можно рассматривать как одну из популяций миофибробластов при индуцированном триацетамидом фиброгенезе печени. В выбранной экспериментальной модели инициация и развитие фиброза до начала перестройки паренхимы протекают с низким уровнем воспаления. ●

Конфликт интересов: Авторы заявляют об отсутствии конфликта интересов.

Работа выполнена в рамках государственной программы научных исследований «Фундаментальные и прикладные науки – медицине» Министерства здравоохранения Республики Беларусь, задание 2.89 «Изучить роль экспрессии генов NOTCH- и TWEAK-сигнальных путей, участвующих в процессах пролиферации и дифференцировки клеток печени в норме и при ее токсическом поражении» (регистрационный номер 20190107).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Tsomidis I, Notas G, Xidakis C, Voumvouraki A, Samonakis D.N., Koulentaki M., Kouroumalis E. // *Biomedicines*. 2022. V. 10. № 12. P. 3179. [https://doi: 10.3390/biomedicines10123179](https://doi.org/10.3390/biomedicines10123179).
- Rezaeian A.A., Yaghobi R., Geramizadeh B. // *Trop. Biomed.* 2018. V. 35. № 3. P. 839–848.
- Wanninger J., Walter R., Bauer S., Eisinger K., Schäffler A., Dorn C., Weiss T.S., Hellerbrand C., Buechler C. // *Mol. Pathol.* 2011. V. 91. № 2. P. 603–607. [https://doi: 10.1016/j.yexmp.2011.07.001](https://doi.org/10.1016/j.yexmp.2011.07.001).
- Lachowski D., Cortes E., Rice A., Pinato D., Rombouts K., Del Rio Hernandez A. // *Sci. Rep.* 2019. V. 9. № 1. P. 7299. [https://doi: 10.1038/s41598-019-43759-6](https://doi.org/10.1038/s41598-019-43759-6).
- Roeb E. // *Matrix. Biol.* 2018. V. 68–69. P. 463–473. [https://doi: 10.1016/j.matbio.2017.12.012](https://doi.org/10.1016/j.matbio.2017.12.012).
- Boeker K.H.W., Haberkorn C.I., Michels D., Flemming P., Manns M.P., Lichtinghagen R. // *Clin. Chim. Acta.* 2002. V. 316. № 1–2. P. 71–81. [https://doi: 10.1016/s0009-8981\(01\)00730-6](https://doi.org/10.1016/s0009-8981(01)00730-6).
- Craig V.J., Zhang L., Hagood J.S., Owen C.A. // *Am. J. Respir. Cell. Mol. Biol.* 2015. V. 53. № 5. P. 585–600. [https://doi: 10.1165/rcmb.2015-0020TR](https://doi.org/10.1165/rcmb.2015-0020TR).
- Lu L., Zhang Q., Wu K., Chen X., Zheng Y., Zhu C., Wu J. // *Cancer Lett.* 2015. V. 356(2 Pt B). P. 470–478. [https://doi: 10.1016/j.canlet.2014.09.027](https://doi.org/10.1016/j.canlet.2014.09.027).
- Crespo I., San-Miguel B., Fernández A., de Urbina J.O., González-Gallego J., Tuñón M.J. // *Transl. Res.* 2015. V. 165. № 2. P. 346–357. [https://doi: 10.1016/j.trsl.2014.10.003](https://doi.org/10.1016/j.trsl.2014.10.003).
- Su F., Zhang W., Chen Y., Ma L., Zhang H., Wang F. // *Exp. Ther. Med.* 2014. V. 8. № 6. P. 1677–1682. [https://doi: 10.3892/etm.2014.1989](https://doi.org/10.3892/etm.2014.1989).
- Gadd V.L., Melino M., Roy S., Horsfall L., O'Rourke P., Williams M.R., Irvine K.M., Sweet M.J., Jonsson J.R., Clouston A.D., Powell E.E. // *Liver Int.* 2013. V. 33. № 4. P. 569–579. [https://doi: 10.1111/liv.12050](https://doi.org/10.1111/liv.12050).
- Luo N., Li J., Wei Y., Lu J., Dong R. // *Physiol. Res.* 2021. V. 70. № 6. P. 821–829. [https://doi: 10.33549/physiolres.934755](https://doi.org/10.33549/physiolres.934755).
- Baglieri J., Brenner D.A., Kisseleva T. // *Int. J. Mol. Sci.* 2019. V. 20. № 7. P. 1723. [https://doi:10.3390/ijms20071723](https://doi.org/10.3390/ijms20071723).
- Lay A.J., Zhang H.E., McCaughan G.W., Gorrell M.D. // *Front. Biosci. (Landmark Ed)*. 2019. V. 24. № 1. P. 1–17. [https://doi: 10.2741/4706](https://doi.org/10.2741/4706).
- Dhar D., Baglieri J., Kisseleva T., Brenner D.A. // *Exp. Biol. Med.* (Maywood). 2020. V. 245. № 2. P. 96–108. [https://doi: 10.1177/1535370219898141](https://doi.org/10.1177/1535370219898141).
- Fuji H., Miller G., Nishio T., Koyama Y., Lam K., Zhang V., Looma R., Brenner D., Kisseleva T. // *Front. Mol. Biosci.* 2021. V. 8. P. 790032. [https://doi: 10.3389/fmolb.2021.790032](https://doi.org/10.3389/fmolb.2021.790032).
- Wells R.G. // *Curr. Pathobiol. Rep.* 2014. V. 2. № 4. P. 185–190. [https://doi: 10.1007/s40139-014-0054-y](https://doi.org/10.1007/s40139-014-0054-y).
- Sun Y., Liu B., Xie J., Jiang X., Xiao B., Hu X., Xiang J. // *Mol. Med. Rep.* 2022. V. 25. № 5. P. 181. [https://doi:10.3892/mmr.2022.12697](https://doi.org/10.3892/mmr.2022.12697).
- Лебедева Е.И., Щастный А.Т., Бабенко А.С. // *Молекулярная медицина*. 2022. Т. 20. № 2. С. 53–62. [https://doi: 10.29296/24999490-2022-02-08](https://doi.org/10.29296/24999490-2022-02-08).
- Теоретические основы и практическое применение методов иммуногистохимии: руководство / Под ред. Коржевского Д.Э. СПб.: СпецЛит, 2014. 119 с.
- Zheng C., Luo J., Yang Y., Dong R., Yu F.X., Zheng S. // 2021. V. 8. P. 618226. [https://doi: 10.3389/fped.2020.618226](https://doi.org/10.3389/fped.2020.618226).
- Everhart J.E., Wright E.C., Goodman Z.D., Dienstag J.L., Hoefs J.C., Kleiner D.E., Ghany M.G., Mills A.S., Nash S.R., Govindarajan S., et al. // *Hepatology*. 2010. V. 51. № 2. P. 585–594. <https://doi.org/10.1002/hep.23315>.
- Лебедева Е.И., Щастный А.Т., Красочко П.А., Бабенко А.С. // *Ветеринарный журнал Беларуси*. 2022. № 1(16). С. 105–110.
- Жижин К.С. *Медицинская статистика: Учебное пособие*. Ростов н/Д: Феникс, 2007. 160 с.
- A-Z of Quantitative PCR / Ed. Bustin S. La Jolla: International University Line, 2004. 882 p.
- Livak K.J., Schmittgen T.D. // *Methods*. 2001. V. 4. P. 402–408. [https://doi: 10.1006/meth.2001.1262](https://doi.org/10.1006/meth.2001.1262).
- Mirzavand S., Rafiei A., Teimoori A., Khorsandi L., Bahreini A., Motamedfar A., Beiromvand M. // *Parasitol. Res.* 2020. V. 119. P. 2177–2187. [https://doi: 10.1007/s00436-020-06700-9](https://doi.org/10.1007/s00436-020-06700-9).
- Ebrahim H.A., Kamar S.S., Haidara M.A., Abdel Latif N.S., Abd Ellatif M., ShamsEldeen A.M., Al-Ani B., Dawood A.F. // *Naunyn Schmiedebergs Arch. Pharmacol.* 2022. V. 395. № 9. P. 1087–1095. [https://doi: 10.1007/s00210-022-02264-w](https://doi.org/10.1007/s00210-022-02264-w).
- Tacke F., Trautwein C. // *J. Hepatol.* 2015. V. 63. № 4. P. 1038–1039. [https://doi: 10.1016/j.jhep.2015.03.039](https://doi.org/10.1016/j.jhep.2015.03.039).
- Murphy F.R., Issa R., Zhou X., Ratnarajah S., Nagase H., Arthur M.J.P., Benyon C., Iredale J.P. // *J. Biol. Chem.* 2002. V. 277. № 13. P. 11069–11076. [https://doi: 10.1074/jbc.M111490200](https://doi.org/10.1074/jbc.M111490200).
- Wang Q., Liu X., Zhang J., Lu L., Feng M., Wang J. // *Mol. Med. Rep.* 2019. V. 20. № 6. P. 5239–5248. [https://doi: 10.3892/mmr.2019.10740](https://doi.org/10.3892/mmr.2019.10740).
- Kobayashi T., Kim H., Liu X., Sugiura H., Kohyama T., Fang Q., Wen F., Abe S., Wang X. // *Am J. Physiol. Lung. Cell. Mol. Physiol.* 2014. V. 306. № 11. P. L1006–10015. [https://doi: 10.1152/ajplung.00015.2014](https://doi.org/10.1152/ajplung.00015.2014).
- Lo R.C., Kim H. // *Clin. Mol. Hepatol.* 2017. V. 23. № 4. P. 302–307. [https://doi: 10.3350/cmh.2017.0078](https://doi.org/10.3350/cmh.2017.0078).
- Atta H., El-Rehany M., Hammam O., Abdel-Ghany H., Ramzy S., Roderfeld M., Roeb E., Al-Hendy A., Abdel Raheim S., Allam H., Marey H. // *PLoS One*. 2014. V. 9. № 11. P. e112384. [https://doi: 10.1371/journal.pone.0112384](https://doi.org/10.1371/journal.pone.0112384).

УДК 577.29

Подавление EGFR ингибирует сферообразование клеток культуры MCF7 со сверхэкспрессией EGFR

Д. Д. Новак^{1#}, О. С. Троицкая^{1#*}, А. А. Нуштаева¹, М. В. Жильникова^{1,2}, В. А. Рихтер¹, М. И. Мещанинова¹, О. А. Коваль^{1,2}

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

²Новосибирский государственный университет, Новосибирск, 630090 Россия

#Равный вклад.

*E-mail: troitskaya_olga@bk.ru

Поступила в редакцию 23.03.2023

Принята к печати 18.04.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.17857

РЕФЕРАТ Рецептор эпидермального фактора роста (EGFR) – онкогенная тирозинкиназа, которая участвует в возникновении и прогрессировании опухоли, поэтому ингибиторы EGFR и моноклональные антитела к этому рецептору имеют большое значение в терапии опухолей. Экспрессия трансгена *EGFR* в линии клеток MCF7 (MCF7-EGFR) аденокарциномы молочной железы человека, как показано нами ранее, стимулирует рост клеток в виде 3D-сфероидов. В представленной работе изучено, влияет ли ингибирование EGFR на сборку сфероидов или приводит к разрушению уже сформированных сфероидов. Сравнили действие анти-EGFR siРНК, моноклонального антитела цетуксимаб против EGFR и ингибитора тирозинкиназы AG1478 на диссоциированные и целые сфероиды клеток MCF7-EGFR. Чувствительность клеток MCF7-EGFR к цитотоксическому действию цетуксимаба и AG1478 была в 2.5 раза выше, чем у клеток родительской линии MCF7. Обнаружено, что подавление мРНК EGFR с помощью siРНК уменьшало образование сфер, тогда как обработка уже сформированных сфероидов не вызывала такого эффекта. Обработка диссоциированных сфероидов цетуксимабом и AG1478 также тормозила образование сфер MCF7-EGFR. Мы предполагаем, что экспрессия EGFR важна по крайней мере на стадии формирования сфероидов. Обнаружено значительное увеличение уровня белка адгезии N-кадгерина при переходе от адгезивной клеточной культуры MCF7wt к сфероидам MCF7-EGFR. При воздействии siРНК и цетуксимаба на клетки MCF7-EGFR уровень N-кадгерина снижался. Таким образом, показано участие N-кадгерина в EGFR-зависимом образовании сфероидов MCF7-EGFR. Сфероиды MCF7-EGFR являются релевантной моделью для изучения агрессивных гормон-положительных опухолей молочной железы.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА 3D-культура клеток, сфероиды, MCF7, EGFR, siРНК, цетуксимаб, AG1478.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ EGFR – рецептор эпидермального фактора роста; siРНК – малая интерферирующая РНК; LF – Lipofectamine 3000; PI – йодид пропидия; wt – дикий тип; AG – ингибитор EGFR (AG1478); ДМСО – диметилсульфоксид; FDA – диацетат флуоресцеина; SD – стандартное отклонение; IC50 – концентрация препарата, при которой гибель клеток достигает 50%.

ВВЕДЕНИЕ

Взаимодействие различных факторов роста и их рецепторов регулирует автономный рост раковых клеток [1]; так эпидермальный фактор роста (EGF) и его рецептор (EGFR) играют важную роль в патогенезе и прогрессировании различных типов злокачественных опухолей [2]. EGFR (или HER1) входит в семейство рецепторных тирозинкиназ ErbB, которое также включает HER2, HER3 и HER4. EGFR содержит внеклеточный домен, гидрофобный транс-

мембранный домен, внутриклеточный каталитический тирозинкиназный домен и несколько внутриклеточных остатков тирозина [3].

В настоящее время в терапии опухолей используют два типа ингибиторов ErbB: моноклональные антитела против внеклеточного домена EGFR или HER2, такие, как цетуксимаб, матузумаб, панитумумаб, трастузумаб, пертузумаб, и ингибиторы тирозинкиназы, которые конкурируют за связывание в тирозинкиназном домене EGFR с молекулами

АТР, например, гефитиниб, эрлотиниб, лапатиниб, АЕЕ788 [4]. В 2004 году Управление по санитарному надзору за качеством пищевых продуктов и медикаментов США впервые одобрило применение цетуксимаба при метастатическом колоректальном раке, а в 2011 году – в терапии рака головы и шеи [5, 6]. Цетуксимаб – рекомбинантное химерное моноклональное антитело IgG1 человек/мышь, которое связывается с рецептором эпидермального фактора роста. Конкурентное специфическое связывание цетуксимаба с EGFR ингибирует фосфорилирование рецептора, сигнальный путь EGFR и, как итог, пролиферацию опухолевых клеток [7].

Нокдаун терапевтически значимых генов-мишеней также может быть эффективной стратегией терапии опухолей. Ингибирование процессинга мРНК с помощью малых интерферирующих РНК (siРНК) рассматривается как один из способов блокирования специфической мишени. РНК-интерференция является защитным механизмом от попадающих в клетку экзогенных нуклеиновых кислот, например, вирусной РНК [8]. В настоящее время проходят доклинические и клинические испытания несколько агентов на основе siРНК, предназначенных для лечения рака предстательной железы и головного мозга [9].

Ранее нами была получена линия клеток MCF7 аденокарциномы молочной железы человека с повышенной экспрессией EGFR и установлено, что избыток EGFR в клетках MCF7 приводит к спонтанному образованию сфер в стандартных условиях культивирования [10, 11]. Сфероиды MCF7-EGFR имеют округлую форму с четко выраженной внешней границей и медианным диаметром, равным 100 мкм; размер крупных сфероидов может превышать 400 мкм. Поскольку нами показано, что продукция EGFR влияет на адгезионные свойства клеток MCF7-EGFR, можно предположить, что ингибирование EGFR может вызывать разрушение сформированных сфероидов или подавлять сборку сфероидов из отдельных клеток. Чтобы подтвердить эту гипотезу, мы изучили влияние анти-EGFR siРНК, цетуксимаба и ингибитора тирозинкиназы AG1478 на структуру и формирование сфероидов MCF7-EGFR.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Клеточные линии

В работе использовали клеточные линии аденокарциномы молочной железы человека MCF7wt (#ACC 115, Германия) и MDA-MB-231 (#ACC 732, Германия). Клетки культивировали в виде монослойной культуры в среде IMDM или DMEM со-

ответственно, содержащей 10% FBS и 1% пенициллина-стрептомицина-амфотерицина (далее – полная среда), как описано ранее [12].

Клеточная линия аденокарциномы молочной железы человека MCF7-EGFR, формирующая сфероиды, описана ранее [10]. Сфероиды MCF7-EGFR культивировали в стандартных условиях в планшетах с неадгезивным покрытием (Nest Bio-technology Co., Китай).

Сферообразование и подсчет сфероидов

Для построения кинетических кривых сферообразования клетки диссоциировали с помощью реагента Stempro™ Accutase™ (Gibco, США), высевали в количестве 3×10^4 клеток/лунку в 48-луночный планшет с неадгезивным покрытием (Eppendorf, Германия) и культивировали в стандартных условиях как описано выше. Сфероиды подсчитывали в трех или шести независимых лунках планшета с использованием инвертированного микроскопа (Eclipse Ti, Nikon, Япония) при 40-кратном увеличении. В светлом поле подсчитывали все свободно плавающие сфероиды, размер которых превышал 30 мкм. Затем рассчитывали среднее количество сфероидов на лунку и стандартное отклонение (SD). Предварительный подсчет во всех экспериментах проводили с использованием программного обеспечения ImageJ (версия 1.52a, США) (данные не приведены). Точное количество сфероидов рассчитывали вручную.

Конструирование анти-EGFR siРНК

Для оценки ингибирования EGFR на сфероидах MCF7-EGFR были сконструированы siРНК на основе последовательностей, описанных в работе [13]. Синтез олигонуклеотидов проводили в лаборатории химии РНК ИХБФМ СО РАН. Использовали следующие siРНК: senScr 5'-CAA GUC UCG UAU GUA-GUG GUU-3', antiScr 5'-CCA CUA UAU ACG AGA-CUU GUU-3', senEGFR 5'-GUC CGC AAG UGU-AAG AAG UTT-3', antiEGFR 5'-ACU UCU UAC ACU-UGC GGA CTT-3'. Средняя концентрация рибоолигонуклеотидов в растворе составляла 0.203 мМ.

Гибридизация siРНК

Эквимольные количества sen- и anti-цепей siРНК смешивали с 5-кратным буфером для гибридизации siРНК (100 мМ $C_2H_3NaO_2$, 30 мМ HEPES-KOH, 2 мМ $Mg(CH_3COO)_2$, pH 7.4) в соотношении 2:2:1. Образцы нагревали на водяной бане в течение 2 мин при 90°C и охлаждали до комнатной температуры. К полученной смеси добавляли два объема $1 \times$ буфера для гибридизации siРНК. Конечная концентрация siРНК-дуплексов составила 27 мкМ.

Трансфекция клеток siРНК

Трансфекцию siРНК проводили с использованием реагента Lipofectamine 3000 (Invitrogen, США) в соответствии с протоколом производителя. Клетки высевали за 24 ч до эксперимента, обрабатывали 100 нМ siРНК и инкубировали в течение 4 ч при 37°C, после чего среду заменяли на полную среду, подходящую для данной культуры клеток, и продолжали культивирование.

Анализ выживаемости клеток

Жизнеспособность клеток определяли через 72 ч после обработки препаратом с помощью МТТ-теста как описано в [12]. Значения IC₅₀ рассчитывали с помощью программного обеспечения CompuSyn версии 1.0.

Исходный раствор (5 мг/мл) цетуксимаба Эрбитукс® (Merck Healthcare, Германия) хранили при +4°C. Для экспериментов на культуре клеток цетуксимаб разводили в полной среде IMDM. Исходный раствор (31.7 мМ) AG1478 (Sigma-Aldrich, США) в ДМСО:MeOH (1:1) хранили при -20°C. Для экспериментов на культуре клеток AG1478 разводили в полной среде IMDM так, чтобы концентрация ДМСО в лунках составляла 0.5%.

Окрашивание FDA

Исходный раствор (1 мг/мл) диацетата флуоресцеина – FDA (Sigma-Aldrich, США), разведенного в ДМСО, хранили при -20°C. Раствор добавляли в культуральную среду до конечной концентрации вещества – 10 мкг/мл. Сфероиды инкубировали в полной среде IMDM с растворенным FDA в течение 30 мин. После этого сфероиды собирали центрифугированием и промывали PBS. Жизнеспособность клеток и цитотоксичность анализировали с использованием флуоресцентного микроскопа (Eclipse Ti, Япония) и проточной цитометрии.

Проточная цитометрия

После обработки препаратом сфероиды диссоциировали с помощью реагента Stempro™ Accutase™, промывали в PBS и инкубировали с антителами к EGFR для определения уровня EGFR. Клетки для анализа жизнеспособности инкубировали с йодидом пропидия (PI) или FDA в соответствии с протоколом производителя. Использовали следующие антитела: моноклональные антитела IgG мыши к белку EGFR (Invitrogen, США), вторичные антитела, конъюгированные с флуоресцентной меткой Alexa Fluor 647 (Abcam, Великобритания). Все анализы выполняли с использованием проточного цитометра FACSCantoII (BD Biosciences, США), данные анализировали с помощью программного обеспече-

ния FACSDiva (BD Biosciences, США). Популяции клеток выделяли с использованием прямого и бокового светорассеяния, чтобы исключить мелкие частицы. В каждом эксперименте собирали не менее 10000 событий.

Вестерн-блот-анализ

Вестерн-блот-анализ проводили согласно протоколу, описанному в [14]. Клетки лизировали, измеряли концентрацию белка, после чего образцы (15 мкг) разделяли с помощью 10% SDS-PAGE и переносили на мембрану PVDF. Мембрану блокировали раствором 5% сухого молока, инкубировали последовательно с первичными и вторичными антителами, конъюгированными с пероксидазой хрена. Использовали следующие антитела: первичные антитела IgG к актину (Sigma-Aldrich, США), EGFR (Santa Cruz Biotechnology, США), SNAIL + SLUG (Abcam), N-кадгерину (Invitrogen, США), E-кадгерину (Abcam) и конъюгаты вторичных антител с пероксидазой хрена к антигенам кролика (Thermo Fisher, США) и мыши (Thermo Fisher). Хемилюминесцентный сигнал регистрировали с помощью набора реагентов Novex ECL HRP (Invitrogen) и прибора GE Amersham Imager 600 (GE, США). Денситометрический анализ вестерн-блотов проводили с использованием программного обеспечения для анализа изображений GelAnalyser версии 2010a.

Статистический анализ

Результаты представлены как среднее арифметическое \pm SD для выборки. Статистический анализ проводили с использованием *t*-критерия Стьюдента. Различия считали статистически значимыми при $p < 0.05$.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

Влияние анти-EGFR siРНК на сфероиды MCF7-EGFR

Влияние понижения экспрессии EGFR на образование сфероидов MCF7-EGFR мы оценили с использованием анти-EGFR siРНК. Используя международную базу данных NCBI Nucleotide установлено, что выбранная анти-EGFR siРНК комплементарна последовательности экзона 8 гена *EGFR* человека. Этот экзон кодирует фрагмент субдомена III EGFR, отвечающего за связывание рецептора с лигандом [15].

Сфероиды MCF7-EGFR диссоциировали на отдельные клетки, а затем высевали в планшеты с 100 нМ анти-EGFR siРНК. В качестве трансфицирующего агента использовали Lipofectamine 3000

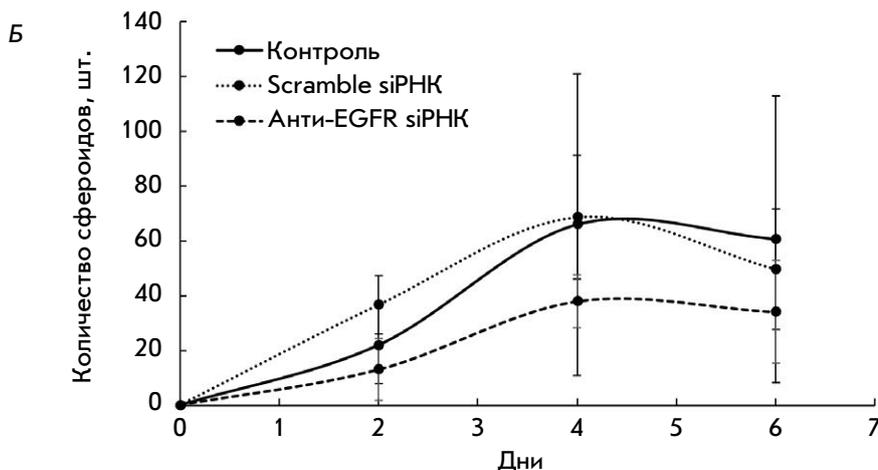
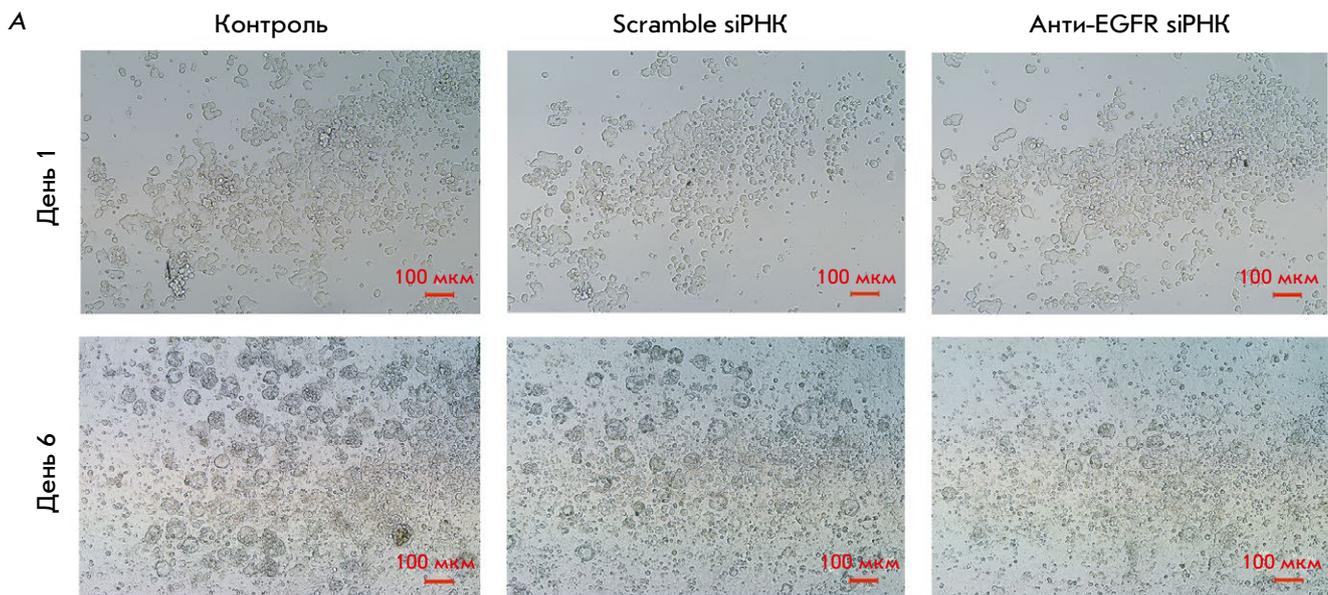


Рис. 1. Влияние анти-EGFR siRNA на образование сфероидов MCF7-EGFR. А – фотографии контрольных и обработанных siRNA сфероидов MCF7-EGFR. Б – динамика роста сфероидов MCF7-EGFR. Разрушенные сфероиды высевали в 48-луночные планшеты, обрабатывали siRNA (100 нМ) и подсчитывали в отдельных лунках с указанием числа сфероидов на лунку. Контрольные клетки обрабатывали LF

(LF). SiRNA, имеющую случайную последовательность (Scramble siRNA), использовали в качестве отрицательного контроля, а клетки, обработанные только LF, – в качестве контроля цитотоксической активности LF. Динамику роста и образования сфер после обработки siRNA и в контрольных образцах оценивали методом автоматического и прямого подсчета сфер. Обработка клеток анти-EGFR siRNA приводила к уменьшению числа сфероидов по сравнению с контрольными клетками и клетками, обработанными Scramble siRNA (рис. 1А,Б).

Уровень общего клеточного EGFR в клетках MCF7-EGFR был почти в 10 раз выше, чем в клетках MCF7wt (рис. 2В,Г). Нокдаун EGFR под действием анти-EGFR siRNA оценивали методом проточной цитометрии и вестерн-блотинга, используя антитела к поверхностному и внутреннему доменам белка соответственно. Показано, что снижение уровня поверхностного EGFR на вторые сутки после об-

работки siRNA сфероидов MCF7-EGFR составило примерно 20–25% (рис. 2). Данные вестерн-блотинга хорошо согласуются с результатами определения уровня поверхностного EGFR в клетках, обработанных siRNA.

Чтобы выявить влияние анти-EGFR siRNA на сформированные структуры, сфероиды EGFR-MCF7 помещали в неадгезивный планшет, а затем инкубировали с siRNA. Обнаружено, что анти-EGFR siRNA не влияла на структуру сфероидов (рис. 3). Обычно для эффективного ингибирования экспрессии белка-мишени используют siRNA в концентрации 20–200 нМ [16–18]. Однако siRNA могут хуже проникать в сфероиды, чем в клетки, растущие в монослое, поэтому в экспериментах со сфероидом часто используют более высокие концентрации siRNA или проводят трансфекцию в среде с сывороткой [19, 20]. В нашем исследовании увеличение концентрации анти-EGFR siRNA до 200 нМ

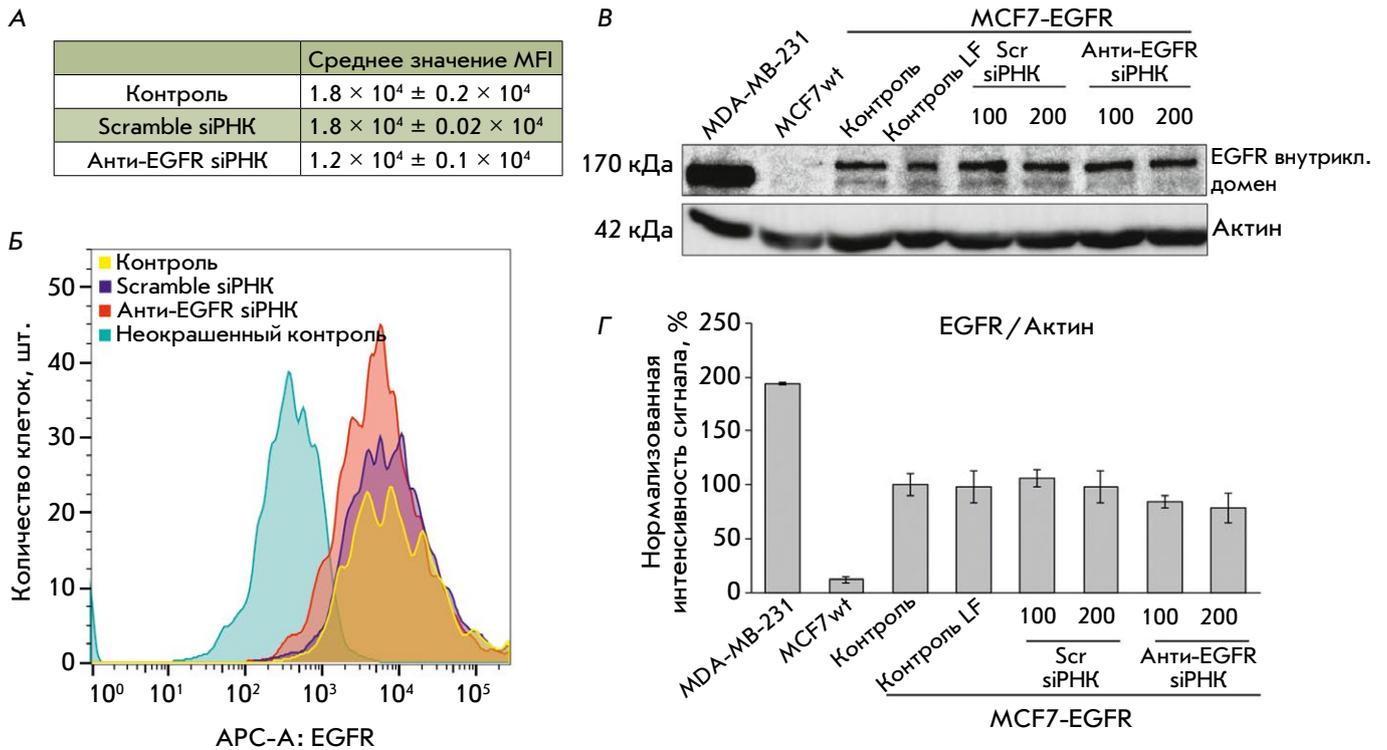


Рис. 2. Оценка снижения уровня EGFR в клетках MCF7-EGFR под действием анти-EGFR siPHK. **А** – количественная оценка клеточной популяции EGFR⁺. Данные представлены как средняя интенсивность флуоресценции (MFI) EGFR⁺-клеток по отношению к контрольным клеткам \pm SD по двум независимым экспериментам. **Б** – репрезентативное изображение цитометрического анализа. **В, Г** – изменения уровня EGFR после обработки анти-EGFR siPHK. В качестве контрольных клеточных линий использовали MDA-MB-231, MCF7 wt. Сфероиды MCF7-EGFR диссоциировали и обрабатывали Scramble siPHK, анти-EGFR siPHK (100–200 нМ) в течение 48 ч. **В** – репрезентативные изображения вестерн-блот-анализа. **Г** – Вестерн-блот-анализ EGFR/актин в клетках

не приводило к дополнительному снижению уровня EGFR. Проведение трансфекции в среде с сывороткой не повышало эффективность подавления EGFR в сфероиде MCF7-EGFR (данные не приведены). Дальнейшая оптимизация трансфекции сфероидов MCF7-EGFR с помощью siPHK представляется нам весьма актуальной.

На основании полученных данных можно сделать вывод, что подавление EGFR специфическими siPHK на стадии сборки сфероидов приводит к снижению темпа сферообразования в культуре MCF7-EGFR. В то же время подавление EGFR в зрелых сфероиде не приводит к их разрушению.

Влияние цетуксимаба на клетки MCF7wt и зрелые сфероиды MCF7-EGFR

Поскольку связывание цетуксимаба с мишенью вызывает гибель клеток, этот препарат применяют в иммунотерапии EGFR-положительных злокачественных новообразований [21]. Оценили цитотоксическую активность цетуксимаба в отношении сфероидов MCF7-EGFR: к сфероиде добавляли препарат (25–200 мкг/мл) и продолжали культу-

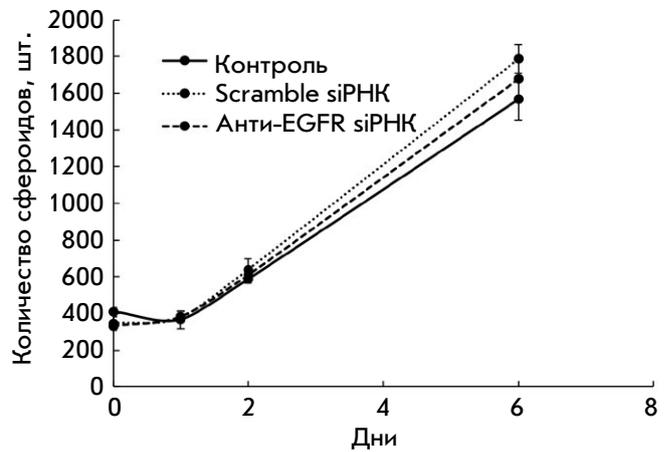


Рис. 3. Анализ воздействия анти-EGFR siPHK на структуру сфероидов MCF7-EGFR. Кинетика роста сфероидов MCF7-EGFR. Целые сфероиды высевали, обрабатывали siPHK (100 нМ) и подсчитывали в отдельных лунках 24-луночных планшетов с указанием числа сфероидов на лунку. Контрольные сфероиды обрабатывали LF. Данные представлены как среднее \pm SD трех независимых экспериментов

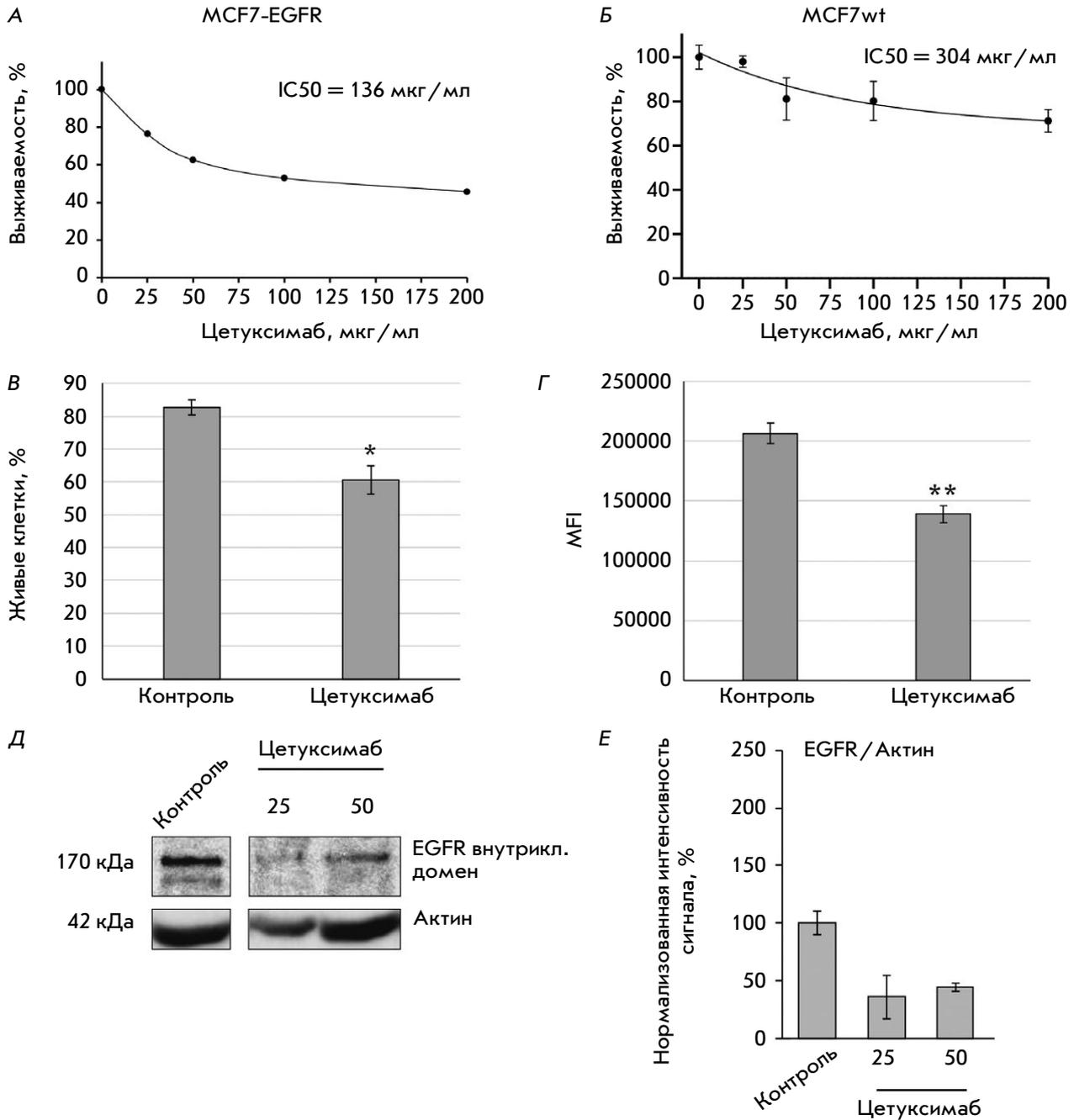


Рис. 4. Цитотоксическая активность цетуксимаба в отношении сфероидов MCF7-EGFR (А) и клеток MCF7 дикого типа (Б). Определение значений IC50 по данным МТТ-анализа. В, Г – оценка доли живых клеток сфероидов MCF7-EGFR после обработки цетуксимабом методом проточной цитометрии. Клетки MCF7-EGFR инкубировали с цетуксимабом (50 мкг/мл) в течение 72 ч и окрашивали FDA. В – средний % живых клеток ± SD двух независимых экспериментов. Г – MFI – средняя интенсивность флуоресценции живых клеток. Различия были значимыми при * $p < 0.05$, ** $p < 0.01$. Д, Е – изменения уровня EGFR после обработки цетуксимабом. Сфероиды MCF7-EGFR диссоциировали и обрабатывали цетуксимабом (25–50 мкг/мл) в течение 48 ч. Д – репрезентативные изображения вестерн-блот-анализа. Е – Вестерн-блот-анализ EGFR/актин в клетках

вировать в стандартных условиях в течение 72 ч. После этого клетки окрашивали йодистым пропидием (PI) и методом проточной цитометрии определяли процент PI-негативных клеток, что соответствует

популяции живых клеток (рис. 4А). Значение IC50 цетуксимаба составило 136 мкг/мл для сфероидов MCF7-EGFR и 304 мкг/мл для клеток родительской линии MCF7wt, что в 2.5 раза выше, чем в случае

клеток сфероидов MCF7-EGFR, и свидетельствует об устойчивости клеток к препарату (рис. 4Б). Сравнение экспериментальных значений IC50 с опубликованными данными для других EGFR-положительных опухолевых клеток, например рака легкого A549 (IC50 = 146 мкг/мл) [22], позволяет охарактеризовать клеточную линию MCF7-EGFR как чувствительную к цетуксимабу. Таким образом, клетки сфероидов MCF7-EGFR, культивируемые в стандартных условиях, доступны для воздействия цетуксимаба.

Поскольку в задачи исследования входила оценка эффекта цетуксимаба на сферы, отличного от цитотоксического, далее использовали концентрацию цетуксимаба, меньшую, чем значение IC25. Для визуализации живых клеток использовали диацетат флуоресцеина (FDA) – субстрат эстеразы, способный проникать в клетку. FDA можно использовать в качестве инструмента для анализа жизнеспособности, который измеряет как ферментативную активность, так и целостность клеточной мембраны [23]. Сфероиды MCF7-EGFR обрабатывали цетуксимабом (50 мкг/мл) в течение 72 ч и окрашивали FDA. С помощью проточной цитометрии клеток, обработанных цетуксимабом, выявлено снижение популяции живых клеток до 20% от значений в контроле (рис. 4В,Г). В образцах сфероидов, к которым не добавляли цитотоксический агент, также присутствовали погибшие клетки, наличие которых можно объяснить формированием некротического ядра сфероидов, вызванным недостатком транспорта кислорода и питательных веществ, как описано нами ранее [10]. Цетуксимаб сильнее снижал уровень EGFR, чем анти-EGFR siРНК: до 60% относительно необработанных клеток MCF7-EGFR (рис. 4Д,Е).

Добавление цетуксимаба на стадии диссоциированных сфероидов снижает образование сфер MCF7-EGFR

Чтобы подтвердить способность цетуксимаба ингибировать образование сфероидов MCF7-EGFR, мы оценили динамику сферообразования после обработки цетуксимабом. Сфероиды MCF7-EGFR диссоциировали и культивировали в стандартных условиях в присутствии цетуксимаба (50 мкг/мл). Обработка цетуксимабом вела к полному подавлению образования сфер на шестые сутки культивирования (рис. 5).

Также мы оценивали влияние цетуксимаба на сформированные сфероиды. Сфероиды MCF7-EGFR высевали на неадгезионный культуральный планшет в среде с добавлением цетуксимаба (50 мкг/мл) на 72 ч. Обработка цетуксимабом приводила к уменьшению количества сфероидов, что сви-

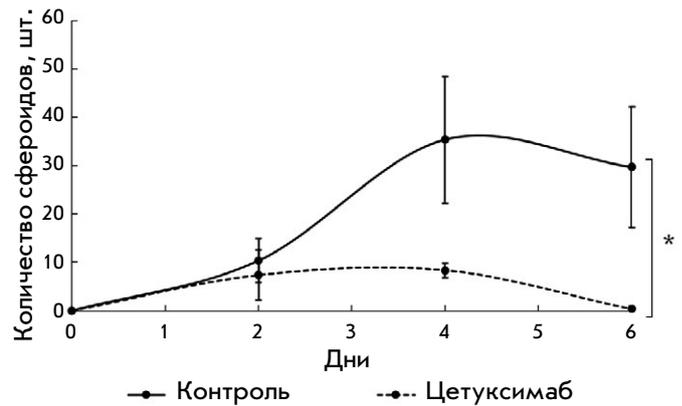


Рис. 5. Анализ влияния цетуксимаба на сферообразование MCF7-EGFR. Сфероиды диссоциировали, высевали в 48-луночный неадгезионный планшет, обрабатывали цетуксимабом (50 мкг/мл) и подсчитывали их количество в отдельных лунках. Данные представлены как среднее значение \pm SD трех независимых экспериментов; * $p < 0.05$

детельствует о стимуляции разрушения сфероидов MCF7-EGFR при ингибировании EGFR (рис. 6А,Б). Сфероиды, обработанные цетуксимабом и окрашенные FDA, анализировали с помощью флуоресцентной микроскопии. Показано, что в присутствии цетуксимаба появилось много отдельных клеток, а число крупных и структурированных сфероидов уменьшалось по сравнению с контролем (рис. 6В).

После воздействия ингибитора цетуксимаба количество сфер снижалось по сравнению с необработанными образцами, и этот эффект показан как для диссоциированных сфероидов, так и уже сформированных сфер. Мы считаем, что цетуксимаб оказывает преимущественно стойкое антипролиферативное действие как в новых, так и в уже существующих сфероидах. В отличие от siРНК, эффективность доставки цетуксимаба в клетки внутреннего слоя сфероида не вызывает сомнений, так как эффекты цетуксимаба подтверждены на организменном уровне [5].

Влияние AG1478 на образование сфер клетками MCF7-EGFR

Мы проанализировали действие на клетки MCF7-EGFR ингибитора EGFR – тирфостина (AG1478, или AG), который ингибирует связывание молекул АТФ с внутриклеточным доменом рецептора. Значение IC50 AG1478 для клеток MCF7 дикого типа было почти вдвое выше, чем для клеток MCF7-EGFR (рис. 7А,Б). Таким образом, показано изменение чувствительности клеток MCF7-EGFR к EGFR-ингибирующим агентам по сравнению с клетками MCF7wt.

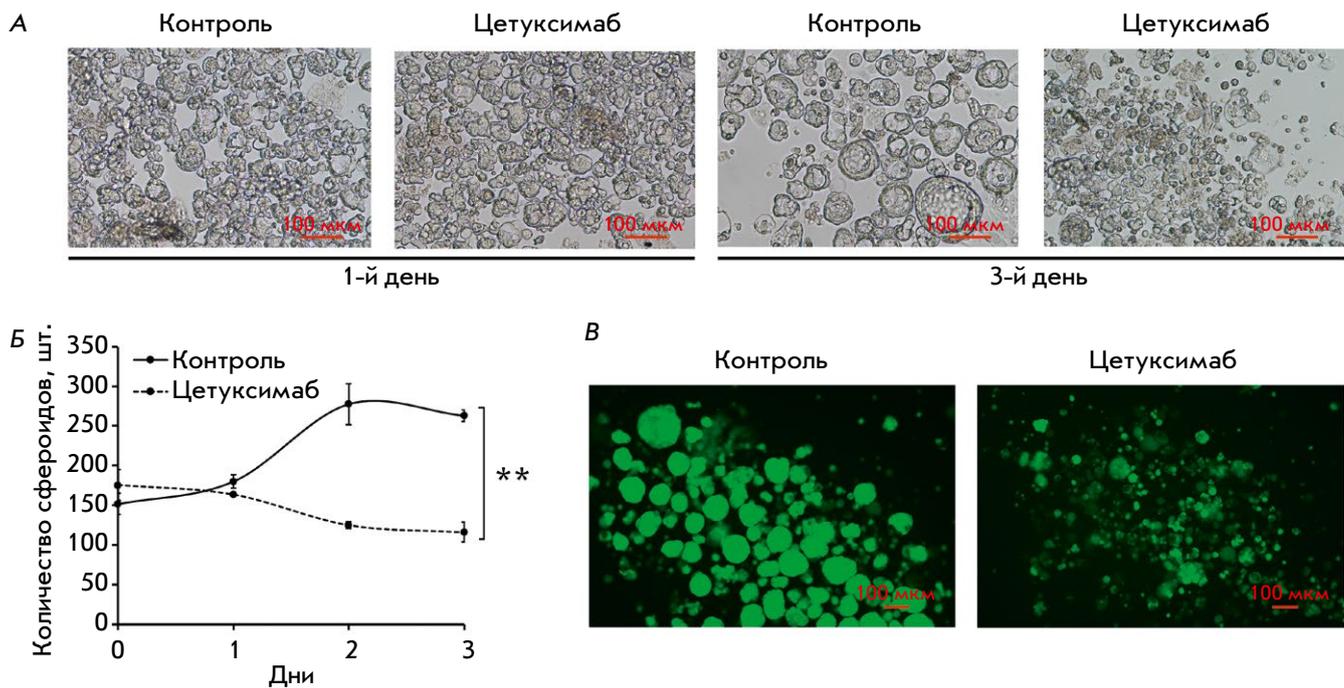


Рис. 6. Влияние цетуксимаба на структуру сфероидов MCF7-EGFR. А – фотографии контрольных и обработанных цетуксимабом сфероидов MCF7-EGFR. Б – кинетика роста сфероидов MCF7-EGFR, культивируемых в среде с цетуксимабом и без него. Целые сфероиды высевали, обрабатывали цетуксимабом (50 мкг/мл), подсчитывали в отдельных лунках 48-луночного планшета и указывали количество сфероидов на лунку. Данные представлены как среднее значение \pm SD трех независимых экспериментов; $**p < 0,01$. В – микроскопический анализ сфероидов MCF7-EGFR, обработанных цетуксимабом в течение 72 ч и окрашенных FDA

Для анализа влияния AG1478 на сферообразование сфероиды MCF7-EGFR диссоциировали, высевали в планшеты и через 24 ч культивирования добавляли к клеткам AG1478 (10 мкМ). Обработка AG1478 значительно снижала количество сфероидов по сравнению с контрольными клетками (рис. 7B).

Влияние siРНК и цетуксимаба на уровень белков адгезии и белков-регуляторов эпителиально-мезенхимального перехода

Рао и соавт. показали, что EGFR регулирует активацию интегрина и пространственную организацию фокальных спаек [24]. Поэтому представляет интерес изучение взаимосвязи между уровнем EGFR и образованием сфер, когда между клетками формируются не только горизонтальные, но и вертикальные взаимодействия и происходят существенные изменения адгезионных свойств. Важным компонентом, контролирующим взаимодействие между клетками и их окружением, является клеточная адгезия. Показано, что EGFR может дестабилизировать адгезию, опосредованную E-кадгеринами, усиливая эндоцитоз E-кадгерина, модифицируя его взаимодействие с цитоскелетом и снижая его экспрессию, тем самым способствуя онкогенезу [25].

Чтобы сравнить влияние анти-EGFR-агентов на уровень определенных белков в сфероидах MCF7-EGFR, обработанных siРНК или цетуксимабом, и в родительских клетках MCF7wt мы проанализировали уровень SNAIL/SLUG, N-кадгерина и E-кадгерина методом вестерн-блоттинга.

Транскрипционные факторы SNAIL и SLUG участвуют в регуляции эпителиально-мезенхимального перехода, важного фактора в трехмерных моделях [26]. Мы не обнаружили различий в базовом уровне белков SNAIL/SLUG между клеточными линиями MCF7wt и MCF7-EGFR. Инкубация с siРНК не влияла на уровень SNAIL/SLUG, но обработка цетуксимабом приводила к двукратному увеличению уровня SNAIL/SLUG в клетках MCF7-EGFR (рис. 8A,B).

Соотношение N-кадгерина и E-кадгерина в клетке считается важным фактором, определяющим межклеточную адгезию и образование сфероидов [27]. Нами обнаружено, что базовый уровень N-кадгерина в клеточной линии MCF7-EGFR был более чем в 5 раз выше, чем в исходной клеточной линии MCF7wt. Обработка анти-EGFR-агентами приводила к снижению уровня N-кадгерина в сфероидах MCF7-EGFR (рис. 9A,B). Базовый уровень E-кадгерина в клетках MCF7-EGFR не отличался статистически значимо от уровня в сферои-

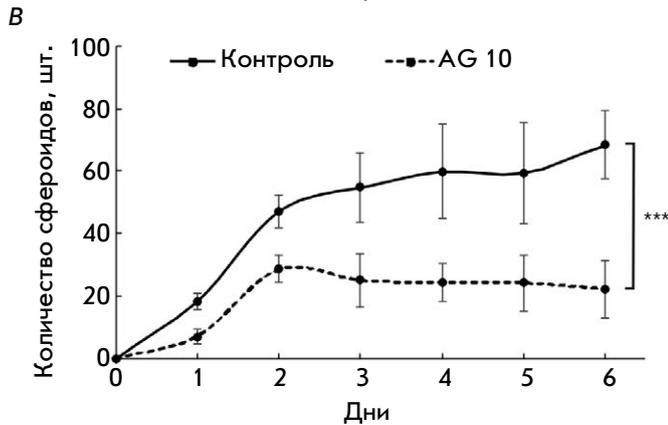
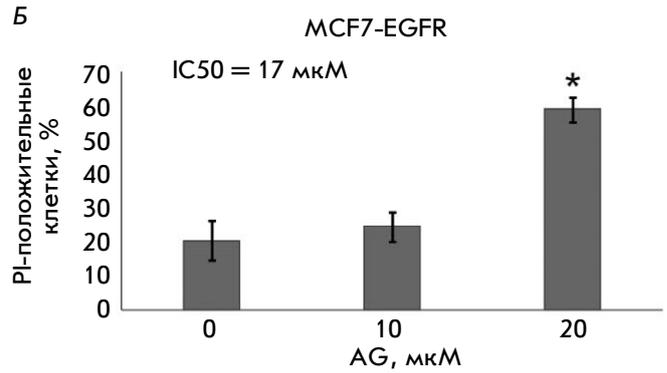
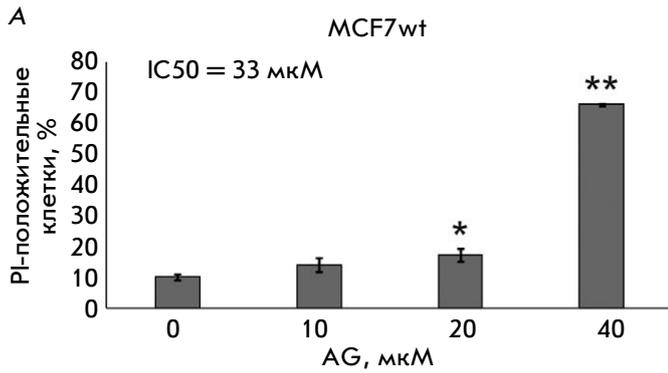


Рис. 7. Цитотоксическая активность AG 1478 (AG) в отношении клеток MCF7wt (А) и сфероидов MCF7-EGFR (Б). Клетки MCF7wt или сфероиды MCF7-EGFR инкубировали с AG (10–40 мкМ) в течение 5 дней. Контрольные клетки обрабатывали ДМСО. После обработки сфероиды диссоциировали, окрашивали PI и анализировали с помощью проточной цитометрии. Данные представлены как средний % PI-положительных клеток ± SD двух независимых экспериментов. В – кривые роста сфероидов MCF7-EGFR. Разрушенные сфероиды высеивали в 48-луночные планшеты и после 24 ч инкубации обрабатывали AG (10 мкМ). Подсчитывали количество сфероидов в отдельных лунках. Данные представлены как среднее значение ± SD шести независимых экспериментов. Статистические различия между контрольной и опытной группами обозначены * при $p < 0.05$, ** при $p < 0.01$, *** $p < 0.001$

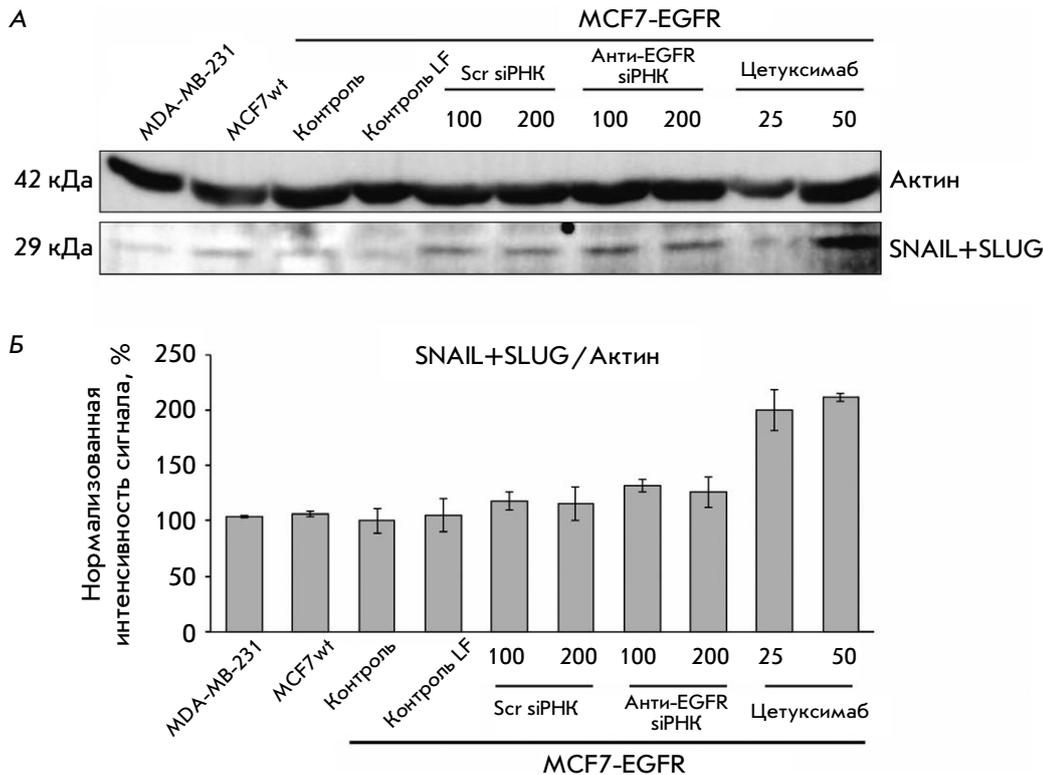


Рис. 8. Изменения клеточных белков после обработки анти-EGFR siPHK и цетуксимабом. В качестве контрольных клеточных линий использовали MDA-MB-231, MCF7wt. Сфероиды MCF7-EGFR диссоциировали и обрабатывали Scramble siPHK, анти-EGFR siPHK (100–200 нМ) или цетуксимабом (25–50 мкг/мл) в течение 48 ч. А – репрезентативные изображения вестерн-блотов. Б – Вестерн-блот-анализ SNAIL+SLUG / актина в клетках

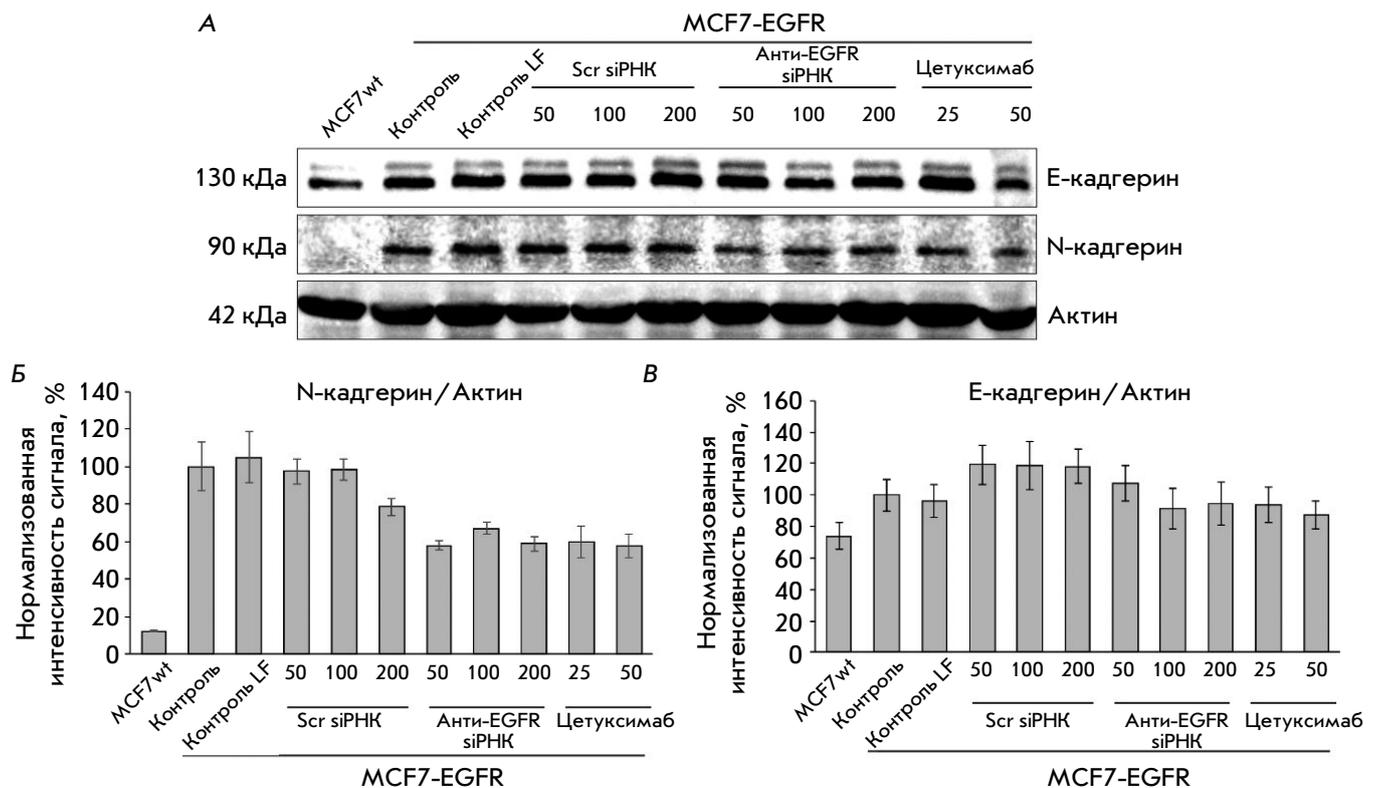


Рис. 9. Изменения клеточных белков после обработки анти-EGFR siРНК и цетуксимабом. В качестве контрольных клеточных линий использовали MDA-MB-231, MCF7 wt. Сфероиды MCF7-EGFR диссоциировали с помощью акустотазы и обрабатывали Scramble siРНК (scr siРНК), анти-EGFR siРНК (50–200 нМ) или цетуксимабом (25–50 мкг/мл) в течение 48 ч. Репрезентативные изображения результатов вестерн-блот-анализа (А). Вестерн-блот-анализ N-кадгерина/актина (Б) и E-кадгерина/актина (В)

дах MCF7-EGFR. Более того, уровень E-кадгерина в сфероиды MCF7-EGFR не зависел от добавления анти-EGFR siРНК или цетуксимаба (рис. 9А,В).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Нами обнаружено, что тирозинкиназный рецептор EGFR участвует в поддержании образования сфер клеток MCF7-EGFR. Значение EGFR для формирования сфероидов подтверждено в экспериментах с ингибиторами EGFR. Показано, что подавление EGFR на стадии отдельных клеток снижало сферообразование, тогда как обработка уже сформированных сфероидов такого эффекта не выявила. Мы предполагаем, что экспрессия EGFR важна, по крайней мере, на стадии формирования сфероиды. Чтобы получить значительный эффект нокдауна гена EGFR с применением siРНК на больших сфероиды, необходимо повысить эффективность системы трансфекции. Также показано, что переход клеток MCF7-EGFR в трехмерные структуры связан с значительным повышением экспрессии белка N-кадгерина. На основании полученных данных

мы предполагаем, что образование сфер клетками MCF7-EGFR частично связано с клеточными путями, регулируемыми эпителиально-мезенхимальный переход. Полученные результаты, по-видимому, частично обусловлены свойствами клеток MCF7, поскольку клетки MDA-MB-231 с высоким уровнем EGFR не образуют сфероидов без добавления факторов роста и матриксов. Тем не менее, разработка такой клеточной модели с аномальной активацией N-кадгерина важна для выявления потенциальных молекулярных мишеней опухолевой прогрессии. Более того, сфероиды MCF7-EGFR могут служить моделью для тестирования терапевтических эффектов комбинации ингибиторов EGFR и N-кадгерина. ●

Исследование поддержано грантом РФФ № 20-74-10039 (культивирование раковых клеток и сфероидов), грантом правительства Новосибирска № 7 (Гр-7) (эксперименты с siРНК) и проектом бюджетного финансирования № 121030200173-6 (эксперименты с цетуксимабом).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Sporn M.B., Roberts A.B. // *Nature*. 1985. V. 313. № 6005. P. 745–747.
2. Normanno N. // *Front. Biosci.* 2001. V. 6. № 1. P. d685.
3. Foley J., Nickerson N.K., Nam S., Allen K.T., Gilmore J.L., Nephew K.P., Riese D.J. // *Semin. Cell Dev. Biol.* 2010. V. 21. № 9. P. 951–960.
4. Hynes N.E., Lane H.A. // *Nat. Rev. Cancer*. 2005. V. 5. № 5. P. 341–354.
5. Chidharla A., Parsi M., Kasi A. *StatPearls. Treasure Island (FL): StatPearls Publ.*, 2022.
6. Kirkpatrick P., Graham J., Muhsin M. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2004. V. 3. № 7. P. 549–550.
7. Brand T.M., Iida M., Wheeler D.L. // *Cancer Biol. Therapy*. 2011. V. 11. № 9. P. 777–792.
8. Setten R.L., Rossi J.J., Han S. // *Nat. Rev. Drug Discov.* 2019. V. 18. № 6. P. 421–446.
9. Hu B., Zhong L., Weng Y., Peng L., Huang Y., Zhao Y., Liang X.-J. // *Sig. Transduct. Target Ther.* 2020. V. 5. № 1. P. 101.
10. Troitskaya O., Novak D., Nushtaeva A., Savinkova M., Varlamov M., Ermakov M., Richter V., Koval O. // *IJMS*. 2021. V. 22. № 23. P. 12937.
11. Патракова Е.А., Бирюков М.М., Троицкая О.С., Новак Д.Д., Милахина Е.В., Гугин П.П., Закревский Д.Э., Швейгерт И.В., Коваль О.А. // *Цитология*. 2023. Т. 65. № 1. С. 39–53.
12. Koval O., Kochneva G., Tkachenko A., Troitskaya O., Sivolobova G., Grazhdantseva A., Nushtaeva A., Kuligina E., Richter V. // *BioMed. Res. Internat.* 2017. V. 2017. P. 1–14.
13. Zhang C., Yuan W., Wu Y., Wan X., Gong Y. // *Life Sci.* 2021. V. 266. P. 118886.
14. Nushtaeva A., Ermakov M., Abdurakhmanova M., Troitskaya O., Belovezhets T., Varlamov M., Gayner T., Richter V., Koval O. // *IJMS*. 2023. V. 24. № 3. P. 2494.
15. Saxon M.L., Lee D.C. // *J. Biol. Chem.* 1999. V. 274. № 40. P. 28356–28362.
16. Zhao M., Yang H., Jiang X., Zhou W., Zhu B., Zeng Y., Yao K., Ren C. // *Mol. Biotechnol.* 2008. V. 40. № 1. P. 19–26.
17. Hou K.K., Pan H., Ratner L., Schlesinger P.H., Wickline S.A. // *ACS Nano*. 2013. V. 7. № 10. P. 8605–8615.
18. Kilroy G., Burk D.H., Floyd Z.E. // *PLoS One*. 2009. V. 4. № 9. P. e6940.
19. Al-Husaini K., Elkamel E., Han X., Chen P. // *Can. J. Chem. Eng.* 2020. V. 98. № 6. P. 1240–1254.
20. Morgan R.G., Chambers A.C., Legge D.N., Coles S.J., Greenhough A., Williams A.C. // *Sci. Rep.* 2018. V. 8. № 1. P. 7952.
21. Baselga J. // *Eur. J. Cancer*. 2001. V. 37. P. 16–22.
22. Wang M., Chang A.Y.-C. // *Oncotarget*. 2018. V. 9. № 23. P. 16533–16546.
23. Szabó P., Jordan G., Kocsis T., Posta K., Kardos L., Šajn R., Aljagić J. // *Environ. Monit. Assess.* 2022. V. 194. № 9. P. 632.
24. Rao T.C., Pui-Yan Ma V., Blanchard A., Urner T.M., Grandhi S., Salaita K., Mattheyses A.L. // *J. Cell Sci.* 2020. P. jcs.238840.
25. Ramírez Moreno M., Bulgakova N.A. // *Front. Cell Dev. Biol.* 2022. V. 9. P. 828673.
26. Mikami S., Katsube K.-I., Oya M., Ishida M., Kosaka T., Mizuno R., Mukai M., Okada Y. // *Lab. Invest.* 2011. V. 91. № 10. P. 1443–1458.
27. Wang M., Ren D., Guo W., Huang S., Wang Z., Li Q., Du H., Song L., Peng X. // *Internat. J. Oncol.* 2016. V. 48. № 2. P. 595–606.

УДК 577.218

Редактирование жизненно важных генов с помощью системы CRISPR/Cas9 на модели дрозофилы

И. С. Осадчий, С. О. Камалян, К. Ю. Тумашова, П. Г. Георгиев, О. Г. Максименко*

Федеральное государственное бюджетное учреждение науки Институт биологии гена Российской академии наук, Москва, 119334 Россия

*E-mail: maksog@mail.ru

Поступила в редакцию 08.12.2022

Принята к печати 04.04.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.11874

РЕФЕРАТ Система редактирования на основе CRISPR/Cas9 в последние годы стала основным инструментом манипуляций с геномами разных организмов. Однако при использовании данного метода исследователи часто сталкиваются с низкой эффективностью внесения изменений и с разрезами в нецелевых участках генома (off-target). Более того, редактирование жизненно важных генов часто заканчивается неудачей вследствие повышенной летальности при эффективном разрезании обоих аллелей гена интереса (ГИ). В статье предложена новая стратегия геномного редактирования с помощью CRISPR/Cas9-системы, основанная на том, что чем более важен ген для выживания организма, тем с меньшей эффективностью детектируются успешные случаи его редактирования и параллельно наблюдается все большее число разрезания нецелевых участков, что по сути является «ошибкой выжившего». В представленном методе в геном редактируемого организма предварительно вносят дополнительную копию ГИ, способную обеспечить уровень экспрессии гена, достаточный для выживания организма. Последующее применение CRISPR/Cas9-системы на фоне избыточной экспрессии ГИ позволило получить успешно отредактированные линии дрозофилы с делециями трех жизненно важных генов – *trf2*, *top1* и *top2*.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА CRISPR/Cas9, редактирование генома, редактирование жизненно важных генов, гены домашнего хозяйства.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ гРНК – гидовая РНК; Xp – хромосома; TRF2 – родственный ТВР фактор 2 (ТВР related factor 2); Top2 – топоизомераза 2 (Topoisomerase 2); MEP-1 – взаимодействующие с MOG и эктопические P-гранулы (MOG interacting and ectopic P-granules).

ВВЕДЕНИЕ

Развитие системы CRISPR/Cas9 в качестве программируемого инструмента для внесения двухцепочечных разрывов в ДНК существенно расширило возможности исследования функций генов и регуляторных элементов генома. Наиболее широко CRISPR/Cas9-система используется для получения нокаута гена интереса (ГИ) за счет внесения разрывов, приводящих к сдвигу рамки считывания. Стоит отметить, что ГИ может быть жизненно важным и попытки получить его нокаут при помощи CRISPR/Cas9-системы часто оказываются безуспешными либо из-за летальности успешно отредактированных эмбрионов, либо за счет биологической пластичности – появления альтернативного старт-кодона, пропуска дефектного экзона и т.д. [1]. В представленной работе CRISPR/Cas9-система редактирования применена на фоне избыточной экс-

прессии ГИ, что позволило достаточно эффективно получить нокауты трех жизненно важных генов у дрозофилы. Похожий подход был недавно протестирован на клеточной линии человека HEK293T [2]. В настоящей работе нами осуществлено внесение достаточно протяженных делеций в кодирующие участки ГИ с сопутствующим встраиванием посадочной платформы, содержащей в своем составе участок для сайт-специфической рекомбинации, позволяющий быстро и эффективно встраивать модифицированные производные ГИ.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Представленная стратегия дополняет методы, описанные в статьях [3–5], и подходит для повсеместно экспрессирующихся жизненно важных генов. Предложенный подход состоит из трех этапов (рис. 1):

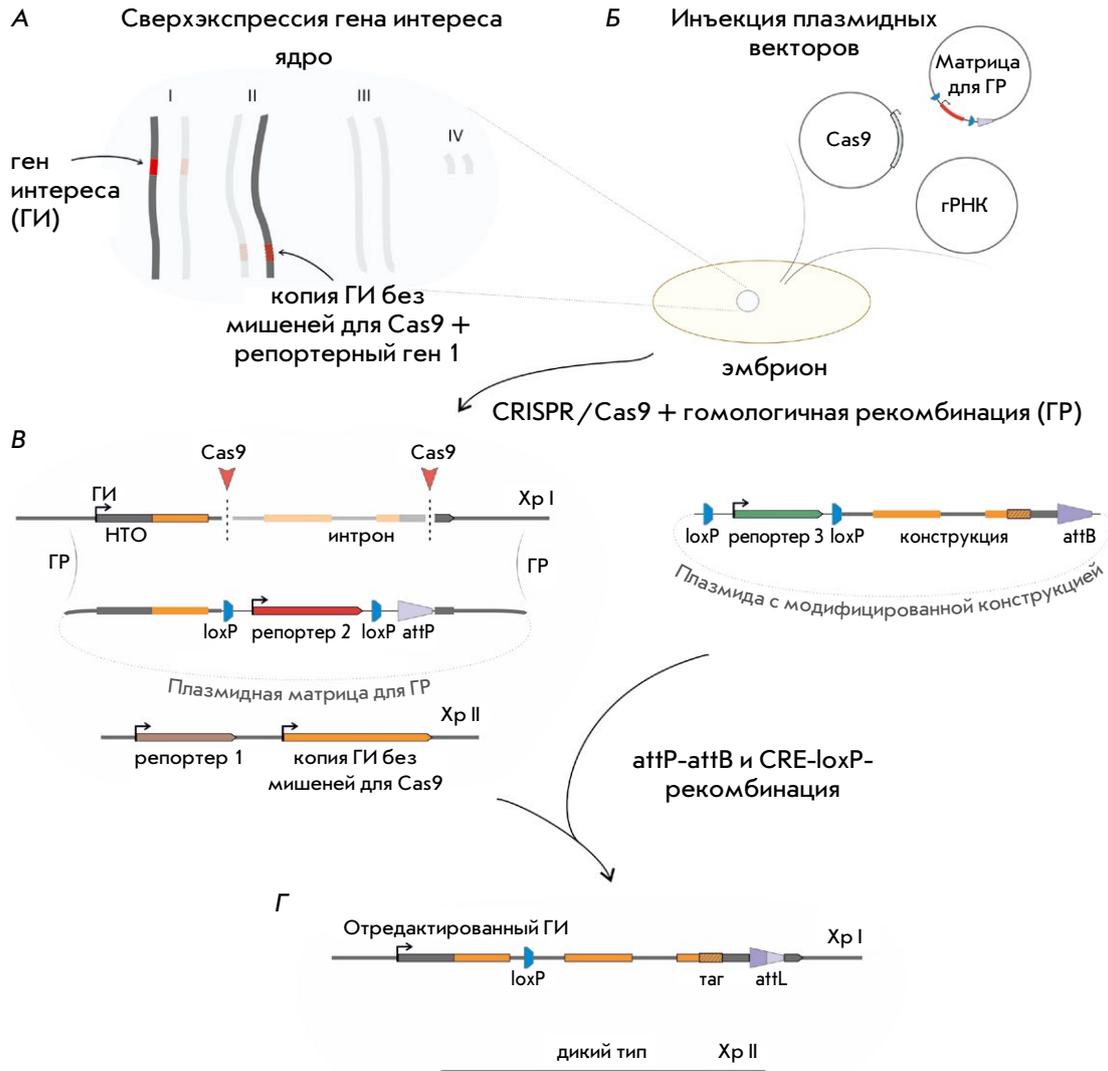


Рис. 1. Общая схема редактирования. А – вставка репортерного гена 1 (yellow) и копии гена интереса (ГИ), которая не содержит мишеней для CRISPR/Cas9-системы, в локус типа «тихая гавань» с помощью сайт-специфической рекомбинации. Б – микроинъекция эмбрионов матрицей для гомологичной рекомбинации (ГР) и плазмидами, экспрессирующими Cas9 и гРНК. В – внесение двухцепочечных разрывов в геномный участок интереса с помощью CRISPR/Cas9 и гомологичная рекомбинация с плазмидной матрицей, содержащей репортерный ген 2 (*mCherry*), окруженный *loxP*-сайтами, и *attP*-сайт. Г – интеграция модифицированной последовательности гена интереса с последующим CRE-опосредованным вырезанием репортерных генов 2 (*mCherry*) и 3 (*white*) и скрещивание для замены хромосомы с копией ГИ (Хр II) на хромосому дикого типа

1. Встраивание копии ГИ без узнаваемых системой CRISPR/Cas9 последовательностей вместе с репортерным геном 1 в локус без жизненно важных генов («тихая гавань») и находящийся на хромосоме, на которой не представлен нативный ГИ. На данном этапе получается спасающая линия с гетерологичной экспрессией копии ГИ. В настоящей работе для данного этапа созданы конструкции, содержащие последовательности, кодирующие белки TRF2, Top2 и MEP-1, под контролем промотора гена *Ubi-p63E* и гена *yellow* в качестве репортерного гена 1. Нокаут данных генов приводит к эмбриональ-

ной летальности. Конструкции встроены с помощью ФС31-опосредованной сайт-специфической рекомбинации в локусы 86Fb (TRF2, Top2) и 38D (MEP-1).

2. Замена протяженного участка кодирующей области нативного ГИ сайтом *attP* путем коинъекции трех плазмид, кодирующих белок Cas9 и гРНК, а также с матрицей для гомологичной рекомбинации, которая содержит сайт узнавания ФС31-интегразы *attP* и репортерный ген 2 (*mCherry*), окруженный сайтами *loxP*. На данном этапе получается линия с нокаутом ГИ на фоне экспрессии его копии. Для CRISPR/Cas9-опосредованного редакти-

рования ГИ использовали экспрессирующие Cas9 линии мух, полученные из депозитария Bloomington в Университете Индианы: BL54591 (Cas9 под контролем промотора *nanos*) и BL58492 (Cas9 под контролем промотора *Actin5C*). В альтернативном варианте в смесь для инъекции добавляли вектор, экспрессирующий Cas9 (Addgene #62209). CRISPR-мишени были выбраны с помощью инструмента fly CRISPR Optimal Target Finder (Университет Висконсина) [4] и клонированы в вектор на основе плазмиды pCFD4-U6:1_U6:3tandemgRNAs (Addgene #49411). Для делеции *trf2* использовали участки: гРНК1 (tctctgtagcactcttagc), гРНК2 (tgcttttcgcttcgggtgtcc) и гРНК3 (accaagtagctagagactta); пара гРНК1/гРНК2 приводит к делеции геномного фрагмента размером 6.7 т.п.н., гРНК1/гРНК3 – 1.1 т.п.н. Для *mer-1* использовали гРНК1м (acgaacagcagggcgcgcgcg), гРНК2м (cagcaagtgacgctggcttg) и гРНК3м (aggggatcttcggcctcgca), приводящие к делеции 5.6 т.п.н. (гРНК1м/гРНК2м) и 2 т.п.н. (гРНК1м/гРНК3м). Для делеции *top2* использовали гРНК1т (gttccscagtagtagacc) и гРНК2т (tctacggcgtgtcccgctt), приводящие к делеции 2 т.п.н.

Мух, полученных после инъекции (F0), индивидуально скрещивали с мухами линии y^1w^{1118} , и потенциальные события редактирования генома в потомстве (F1) выявляли с помощью флуоресценции mCherry. Правильность встраивания посадочной платформы (*attP*-mCherry) в геном проверяли с помощью ПЦР и секвенирования отредактированных участков генома.

3. Встройка в посадочную платформу модифицированных вариантов ГИ вместе с окруженным loxP-сайтами репортерным геном 3 (ген *white*). Встройка осуществляется за счет коинъекции содержащей *attB*-сайт конструкции и вспомогательной плазмиды с геном интегразы ϕ C31 (Addgene #26290). Репортерные гены 2 и 3 удаляли при помощи CRE-опосредованной сайт-специфической рекомбинации.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

TRF2 – это паралог базального фактора транскрипции TBP, инактивация которого ассоциирована с эмбриональной летальностью [6, 7].

Ранее, несмотря на использование разных источников Cas9 (экспрессия с инъекированного в эмбрион плазмидного вектора или использование линии мух с конститутивной экспрессией Cas9) и двух комбинаций гРНК, нам не удалось заменить ген *trf2* на посадочную платформу для последующей сайт-специфической встройки мутантных вариантов гена [8]. Последовательность всего гена *trf2* составляет около 25 т.п.н., в то время как его кодирующая часть укладывается в 7 т.п.н. Используемые комбинации

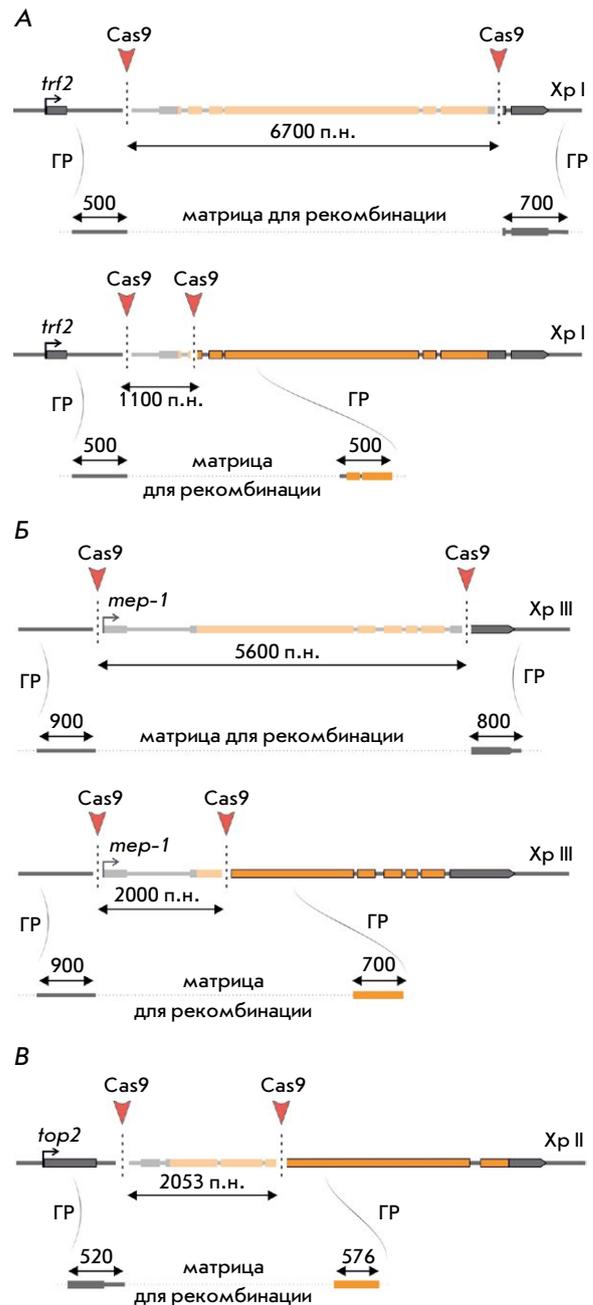


Рис. 2. Схемы замены ГИ – *trf2* (А), *mer-1* (Б), *top2* (В) – на посадочную платформу (*attP*-сайт и репортерный ген *mCherry*) при частичной или полноразмерной делеции

гРНК приводят к образованию двух двухцепочечных разрывов ДНК на расстоянии 6.7 или 1.1 т.п.н. для того, чтобы заменить всю кодирующую часть гена или участок, содержащий только старт-кодон, на платформу (рис. 2А).

Результаты, полученные при использовании разных схем замены гена *trf2* с помощью CRISPR/Cas9, показаны в табл. 1.

Таблица 1. Результаты микроинъекций смеси плазмид для замены гена на посадочную платформу для генов *trf2*, *mer-1* или *top2*

Линия мух	Источник Cas9	Делеция, п.н.	Инъецировано эмбрионов	Вылетело из куколок, F0	Линии F1 mCherry+	Нецелевые встройки	
TRF2	y ¹ w ¹¹¹⁸	Инъекция Cas9 вектора	6700	200	100	–	–
	54591	Cas9 под промотором <i>nanos</i>	6700	250	140	1	+
	58492	Cas9 под промотором <i>Actin5C</i>	6700	200	80	–	–
			1100	250	120	–	–
	y ¹ w ¹¹¹⁸ + сверхэкспрессия TRF2	Инъекция Cas9 вектора	6700	100	80	5	2
		1100	100	80	5	2	
MER-1	y ¹ w ¹¹¹⁸	Инъекция Cas9 вектора	2000	300	160	–	–
			5600	150	90	1	–
	y ¹ w ¹¹¹⁸ + сверхэкспрессия MER-1		5600	240	175	4	–
TOP2	y ¹ w ¹¹¹⁸	Инъекция Cas9 вектора	2053	150	100	–	–
			2053	150	80	3	–

Полученные после инъекции эмбрионы F0 без сверхэкспрессии *trf2* имели низкий уровень выживаемости. При этом экспрессия репортера *mCherry* в развивающихся особях варьировала по интенсивности от места инъекции по всему телу. Эмбрионы с наиболее ярким свечением *mCherry* погибали на последующих стадиях развития. В результате после скрещивания F0 с мухами дикого типа нами была получена только одна линия, которая имела вставку *attP*-сайта и репортерного гена *mCherry* по 5'-разрыву без удаления кодирующей части *trf2*.

Для того чтобы нивелировать эффект, связанный с высокой летальностью при делеции *trf2*, мы создали линию со сверхэкспрессией *trf2* посредством сайт-специфической встройки его короткой изоформы в линию мух, содержащую *attP*-сайт в локусе 86Fb.

Инъекция смеси плазмид для редактирования не приводила к снижению выживаемости эмбрионов со сверхэкспрессией *trf2*. В результате нами получено по пять линий со встройкой репортерного гена *mCherry* как для делеции размером 6.7 т.п.н., так и 1.1 т.п.н.

Дополнительно мы протестировали данный подход на двух других генах, *mer-1* и *top2*.

Белок MER-1 способствует привлечению комплекса ремоделирования хроматина и деацетилирования гистонов (dNuRD) к значительному числу промоторов [9, 10]. Белок MER-1 является важным регулятором раннего развития дрозофилы, и инак-

тивация гена *mer-1* приводит к эмбриональной летальности.

Как и в случае *trf2*, мы использовали две пары гРНК, производящих разрывы на расстоянии 5.6 и 2 т.п.н., для полноразмерной делеции и делеции только участка, содержащего старт-кодон, соответственно (рис. 2Б). Результаты, полученные при использовании разных схем замены гена *mer-1* с помощью CRISPR/Cas9, представлены в табл. 1.

При инъекции смеси плазмид для редактирования мухи без сверхэкспрессии *mer-1* имеют средний уровень летальности в течение развития. После индивидуальных скрещиваний мух F0 получена одна линия для полноразмерной делеции при использовании эмбрионов мух дикого типа и четыре линии на фоне сверхэкспрессии MER-1. Таким образом, делеция *mer-1* не является полностью летальной, однако, поскольку его сверхэкспрессия при делеции увеличивает выживаемость инъецированных эмбрионов, наблюдается увеличение эффективности редактирования.

Топоизомераза 2 (Top2) – фермент, снимающий топологическое напряжение с молекулы ДНК и способствующий поддержанию стабильности генома, участвует в ключевых клеточных процессах, таких, как репликация, транскрипция, рекомбинация [11].

Для замены участка гена *top2* на посадочную платформу были выбраны гРНК на расстоянии 2 т.п.н. в интроне 5'-нетранслируемой области и экзоне 3. Смесь векторов для замены гена на платформу инъецировали в эмбрионы линии y¹w¹¹¹⁸.

В потомстве от индивидуальных скрещиваний мух F0 с мухами дикого типа трансформантов не обнаружено. Однако при редактировании после встройки последовательности, кодирующей Top2, в локус 86Fb получены три линии (табл. 1).

Использование Cas9 для редактирования генома часто приводит к возникновению дополнительных мутаций в других генах. В этом случае экспрессия ГИ на другой хромосоме позволяет оценить наличие дополнительных нецелевых мутаций в линии, гомозиготной по делеции ГИ. С помощью такого скрининга можно отобрать линии дрозофилы, которые не содержат дополнительных нецелевых мутаций.

Полученные линии $\Delta trf2$, $\Delta mer-1$ или $\Delta top2$ летальны в гомозиготном состоянии без дополнитель-

ной введенной копии ГИ, что свидетельствует о необходимости продуктов этих генов для выживания и дает первичное подтверждение успешной замены гена на *attP*-платформу. Встройка восстанавливающих конструкций (кодирующих нативные варианты генов) в линии с соответствующими посадочными платформами с дальнейшим удалением репортерных генов приводила к восстановлению жизнеспособности мух в гомозиготном состоянии. Таким образом, получены платформы для трех генов дрозофилы, которые позволяют детально исследовать ключевые белки TRF2, Top2 и MEP-1. ●

Работа выполнена при поддержке Российского научного фонда, грант № 19-74-30026.

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Smits A.H., Ziebell F., Joberty G., Zinn N., Mueller W.F., Clauder-Münster S., Eberhard D., Fälth Savitski M., Grandi P., Jakob P., et al. // Nat. Methods. 2019. V. 16. № 11. P. 1087–1093.
2. Wang B., Wang Z., Wang D., Zhang B., Ong S.G., Li M., Yu W., Wang Y. // J. Biol. Eng. BioMed Central. 2019. V. 13. № 1. P. 35.
3. Gratz S.J., Ukken F.P., Rubinstein C.D., Thiede G., Donohue L.K., Cummings A.M., O'Connor-Giles K.M. // Genetics. 2014. V. 196. № 4. P. 961–971.
4. Zolotarev N., Georgiev P., Maksimenko O. // Biotechniques. Future Science. 2019. V. 66. № 4. P. 198–201.
5. Bischof J., Maeda R.K., Hediger M., Karch F., Basler K. // Proc. Natl. Acad. Sci. USA. 2007. V. 104. № 9. P. 3312–3317.
6. Kedmi A., Zehavi Y., Glick Y., Orenstein Y., Ideses D., Wachtel C., Doniger T., Waldman Ben-Asher H., Muster N., Thompson J., et al. // Genes Dev. 2014. V. 28. № 19. P. 2163–2174.
7. Duttke S.H.C. // Trends Biochem. Sci. 2015. V. 40. № 3. P. 127–129.
8. Osadchiy I.S., Georgiev P.G., Maksimenko O.G. // Dokl. Biochem. Biophys. 2019. V. 486. № 1. P. 224–228.
9. Reddy B.A., Bajpe P.K., Bassett A., Moshkin Y.M., Kozhevnikova E., Bezstarosti K., Demmers J.A., Travers A.A., Verrijzer C.P. // Mol. Cell. Biol. Am. Soc. Microbiol. 2010. V. 30. № 21. P. 5234–5244.
10. Kunert N., Wagner E., Murawska M., Klinker H., Kremmer E., Brehm A. // EMBO J. 2009. V. 28. № 5. P. 533–544.
11. Sutormin D.A., Galivondzhyan A.K., Polkhovskiy A.V., Kamalyan S.O., Severinov K.V., Dubiley S.A. // Acta Naturae. 2021. V. 13. № 1. P. 59–75.

УДК 576.3/.53/.7

Клеточная терапия – новая технология восстановления церебральной циркуляции после ишемии/реперфузии

И. Б. Соколова*, О. П. Горшкова

Институт физиологии им. И.П. Павлова РАН, Санкт-Петербург, 19034 Россия

*E-mail: SokolovaIB@infran.ru

Поступила в редакцию 07.02.2023

Принята к печати 07.04.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.14338

РЕФЕРАТ Клеточная терапия с использованием мезенхимных стволовых клеток (МСК) может быть перспективным методом восстановления мозгового кровотока после транзиторной ишемии. Клеточный материал для его практического применения необходимо культивировать в течение 7–9 сут. В работе изучена эффективность трансплантации мезенхимных стволовых клеток человека (МСКч), проведенной на 7 сут после ишемии/реперфузии головного мозга (И/Р), для восстановления церебральной циркуляции. С использованием метода прижизненной микрофотографии проведено сравнительное изучение плотности сосудистой сети в пиальной оболочке и реактивность пиальных артерий на воздействие ацетилхолина (ACh) у крыс, перенесших И/Р (пережатие обеих сонных артерий с одновременным снижением и строгим поддержанием среднего АД на уровне 45 ± 2 мм рт. ст. на 12 мин), после и в отсутствие трансплантации МСКч. С помощью метода лазерной доплерографии оценена перфузия (П) в сенсомоторной коре. Через 14 сут у крыс, перенесших И/Р, плотность всей сосудистой сети и ее артериального участка была меньше, чем у ложнооперированных животных (ЛО) – в 1.4 и 1.2 раза соответственно, а через 21 сут – в 1.2 и 1.3 раза. Число артерий, расширяющихся под воздействием ACh, уменьшилось через 14 сут после И/Р в 1.6–1.9 раза, через 21 сут – в 1.2–1.7 раза. Уровень П снижался только через 21 сут после И/Р – в среднем в 1.6 раза. Введение МСКч на 7 сут после И/Р позволило полностью восстановить плотность сосудистой сети к 14 сут после И/Р. ACh-опосредованная дилатация в течение 21 сут полностью восстановилась только у артерий диаметром менее 40 мкм. Уровень П через 21 сут после И/Р был ниже, чем в группе ЛО в 1.2 раза, но достоверно выше, чем у крыс после И/Р без введения МСКч. Отсроченное по времени от приступа транзиторной ишемии головного мозга введение МСК позволяет подготовить клеточный материал для трансплантации и имеет хороший терапевтический эффект, наблюдаемый в микроциркуляторном участке пиальной сосудистой сети.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА ишемия/реперфузия, головной мозг, внутривенная трансплантация, мезенхимные стволовые клетки, плотность микрососудистого русла, реактивность, перфузия.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ АД – артериальное давление; И/Р – ишемия/реперфузия; ЛО – ложнооперированные крысы; МСК и МСКч – мезенхимные стволовые клетки и МСК человека соответственно; П – показатель перфузии; ЭД – эндотелиальная дисфункция; ACh – ацетилхолин.

ВВЕДЕНИЕ

В настоящее время при изучении ишемических патологий головного мозга широко используется концепция нейроваскулярной единицы (НВЕ) [1]. НВЕ – структурно-функциональный комплекс, состоящий из нейронов, глиальных клеток, астроцитов, перицитов и сосудов, обеспечивающих газовый и метаболический обмен [2]. НВЕ участвует в регулировании кровотока посредством сократительной способности перицитов на уровне капиллярного русла [3] и гладкомышечных клеток (ГМК) в стенках артерий [4]. Определяющим фактором в восстановлении НВЕ

после транзиторной ишемии является реактивность входящих в нее артерий [5]. Клеточная терапия с использованием мезенхимных стволовых клеток (МСК) может быть одним из наиболее перспективных современных методов восстановления структуры и функции сосудистого русла головного мозга после транзиторной ишемии [6]. Но для практического применения клеточного материала требуется время для культивирования МСК. При условии, что МСК пациента были выделены заранее и находятся на хранении в криобанке, для наработки необходимого объема клеточного материала нужно 7–9 дней [7].

Цель исследования – выяснить, как влияет внутривенная трансплантация МСКч, проведенная через 7 сут после ишемии/реперфузии, на плотность сосудистой сети, реактивность пиальных артерий и тканевую перфузию в коре головного мозга через 14 и 21 сут после ишемического воздействия.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Работа проведена на животных из ЦКП «Биоколлекция ИФ РАН для исследования интегративных механизмов деятельности нервной и висцеральных систем» (Санкт-Петербург). Исследования проводили в соответствии с регламентом, установленным МЗСР РФ № 708н от 23.08.10 («Правила лабораторной практики»), Директивой 2010/63/EU Европейского парламента и Совета Европейского союза по охране животных, используемых в научных целях, и требованиями Комиссии по контролю над содержанием и использованием лабораторных животных при Институте физиологии им. И.П. Павлова РАН (протокол № 09/05 от 05.09.2022 г.).

Животные

Эксперименты проведены на крысах-самцах Wistar ($n = 68$). Животных содержали в стандартных условиях вивария при естественном освещении и свободном доступе к воде и пище.

Ишемия/реперфузия

У наркотизированных хлоралгидратом (внутрибрюшинно, 43 мг/100 г массы тела) крыс ишемию воспроизводили с использованием техники 12-минутной окклюзии обеих сонных артерий с одновременной управляемой гипотензией (снижение и строгое поддержание артериального давления (АД) на уровне 45 ± 2 мм рт. ст. путем забора/реинфузии крови в гепаринизированный шприц). Прямое измерение АД производили через катетер в бедренной артерии, соединенный с датчиком DTXPlus™ (Argon Critical Care Systems, Сингапур), подключенным к компьютеру, работающему с оригинальной программой визуализации значений АД, разработанной в нашей лаборатории. По окончании периода ишемии производили полную реинфузию забранной крови. После ушивания операционных ран и выхода из наркоза (на подогреваемых столиках) животных возвращали в клетки обычного содержания.

МСКч и их трансплантация

Для внутривенной трансплантации использовали МСКч, полученные от одного донора. Выделение МСК из костного мозга, их культивирование и фенотипирование проводили в ООО «Транс-

Технологии» по стандартным, общепринятым методикам с минимальными изменениями [8, 9]. В частности, для культивирования МСКч использовали питательную среду α -MEM (Hyclone, Новая Зеландия) с добавлением 20% сыворотки крови эмбрионов крупного рогатого скота (Gibco, США) и 100 мкг/мл пенициллина/стрептомицина (Gibco). Фенотипирование МСКч проводили методом проточной цитофлуориметрии на проточном цитофлуориметре FACSscan (Beckton Dickinson, США). МСКч окрашивали с помощью антител против позитивных маркеров CD90, CD105, CD44, CD73 и антител против негативных маркеров CD45, CD34, CD14, CD11b, HLA-DR и 7AAD (Beckton Dickinson, США). Для трансплантации использовали МСКч на 2–3 пассажах. Внутривенная трансплантация была проведена в отдельных группах крыс на 7 сут после И/Р головного мозга. Каждому животному было введено 5 млн МСКч в 30 мкл культуральной среды.

Все последующие хирургические и экспериментальные действия были проведены на наркотизированных (золетил, 20 мг/кг, внутривенно, Virbac, Франция) крысах; эвтаназия проведена путем введения увеличенной дозы зоветила.

Группы животных

1. Контрольная группа: ложнооперированные (ЛО) крысы Вистар, которые подвергались оперативному вмешательству, но без проведения И/Р. Исследования плотности сосудистой сети, реактивности пиальных артерий и перфузии в сенсомоторной коре у данной и всех последующих групп на отдельных подгруппах животных (острые опыты) были проведены через 14 и 21 сут после хирургического воздействия. Вес крыс и АД на 14 сут ($n = 10$) составили 303 ± 12.7 г и 133 ± 5 мм рт. ст. соответственно, на 21 сут ($n = 9$) – 330 ± 12.2 г и 135 ± 2 мм рт. ст. соответственно.

2. Крысы Вистар, которым была проведена И/Р головного мозга. Вес и АД на 14 сут ($n = 8$) – 256 ± 5.2 г и 133 ± 5 мм рт. ст. соответственно, на 21 сут ($n = 9$) – 318 ± 4.2 г и 124 ± 4 мм рт. ст. соответственно.

3. Крысы Вистар, которым проведена И/Р головного мозга и на 7 сут внутривенно введены МСКч. Вес и АД на 14 сут ($n = 10$) – 340 ± 4.5 г и 128 ± 4 мм рт. ст. соответственно и на 21 сут ($n = 10$) – 336.7 ± 8.4 г и 132 ± 3.1 мм рт. ст. соответственно.

Визуализация и мониторинг микрососудистой сети

Для проведения прижизненного исследования реакций пиальных артерий в теменной области чере-

па животного высверливали отверстие ($S \approx 1 \text{ см}^2$). Твердую мозговую оболочку в пределах отверстия удаляли, тем самым открывая поле для дальнейшего исследования. Поверхность мозга непрерывно орошали раствором Кребса (рН 7.4), температура которого составляла 37°C . На протяжении всего эксперимента контролировали среднее АД, показатели которого в течение всего эксперимента оставались примерно на одном уровне. Температуру тела животных в течение всего опыта поддерживали на уровне 38°C , с помощью многофункционального лазерного диагностического комплекса ЛАКК-М («ЛАЗМА», Россия) измеряли перфузию (П) в ткани коры головного мозга. Датчик прибора размещали в 3 точках над сенсомоторной корой с приближенными координатами $AP = 1, 2, 3 \text{ мм}$ от брегмы; $SD = 1.0 \text{ мм}$ латерально от сагиттального шва. Прилагаемое к комплексу ЛАКК-М программное обеспечение автоматически рассчитывало среднюю величину показателя микроциркуляции – П.

Визуализацию пиальных артерий проводили на тех же экспериментальных животных с помощью оригинальной установки, включающей стереоскопический микроскоп МС-2ZOOM («Микромед», Россия), цветную камеру – видеоокуляр для микроскопа DCM-510 (Scopetek, Китай) и персональный компьютер. На статических изображениях с помощью компьютерной программы для цитофотометрии «Photo M» (авторская разработка А. Черниговского, http://www.t_lambda.chat.ru) подсчитывали число артерий и общее число сосудов на определенной площади. По отношению числа сосудов к площади подсчета получали плотность сосудистой сети (ед./ мкм^2). Затем измеряли диаметры пиальных артериальных сосудов. В ходе эксперимента у каждого животного было исследовано от 40 до 120 пиальных артерий. Диаметр артерий фиксировали в стандартных условиях при непрерывном орошении поверхности мозга раствором Кребса и при орошении мозга раствором ацетилхолина (ACh) (10^{-7} М/л) (Sigma-Aldrich, США). Все исследованные пиальные артерии были разбиты на группы по диаметрам: 60–80, 40–60, 20–40 мкм , менее 20 мкм . О результатах воздействия ACh судили по количеству расширившихся артериальных сосудов и по степени их расширения. Изменение числа сосудов, расширившихся в ответ на воздействие, выражали в процентах относительно общего числа исследованных сосудов в группе. Степень дилатации ΔD оценивали как разность между значениями диаметра после (D_2) и до (D_1) воздействия ACh, отнесенную к диаметру сосуда D_1 перед воздействием, %:

$$\Delta D = (D_2 - D_1)/D_1 \times 100.$$

Считали, что реакция на воздействие отсутствует, если изменения диаметра не превышали $5.0 \pm 0.5\%$. Это значение, как мы предварительно установили, регистрируется в покое в отсутствие каких-либо воздействий. Данные по каждой группе сосудов, полученные на разных животных, усреднялись для отдельной экспериментальной группы крыс и использовались для статистических сравнений.

Статистическая оценка данных

Математическая обработка полученных данных проведена с использованием пакета статистических программ Microsoft Excel 2003 и программы InStat 3.02 (GraphPad Software Inc., США). Данные представлены в виде среднего арифметического значения и его ошибки. Проверка экспериментальных данных на нормальное распределение проведена с использованием критерия Колмогорова–Смирнова. Сравнение средних данных независимых выборок при нормальном характере распределения вариант в совокупности данных (выборке) рассчитывали при помощи дисперсионного анализа с последующим попарным сравнением групп согласно критерию Тьюки. При распределении вариант в выборке, отличном от нормального, при сравнении групп применяли критерий Краскела–Уоллиса с последующим попарным сравнением групп согласно U-критерию Манна–Уитни. Статистически значимым уровнем отличий считали вероятность не менее 95% ($p < 0.05$).

РЕЗУЛЬТАТЫ

Анализ культуры МСКч методом проточной цитофлуориметрии показал, что она состояла на 99.7% из $CD90^+$, $CD73^+$, $CD105^+$, $CD44^+$ -клеток (собственно МСК), на 0.3% $CD45^+$, $CD34^+$ -клеток (клетки гемопоэтического ряда) и на 0.5% из $CD14^+$, $CD11b^+$, $HLA-DR^+$, $7AAD^+$ -клеток (нежизнеспособных) было не более 0.9–1%.

Результаты исследования плотности микрососудистой сети пиальной оболочки сенсомоторной коры у ЛО и крыс, перенесших И/Р головного мозга, представлены на *рис. 1*. Через 14 сут после И/Р плотность всей микрососудистой сети и плотность артериальных сосудов были ниже, чем в ЛО-группе в 1.4 и 1.2 раза соответственно, а через 21 сут – в 1.2 и 1.3 раза. В группе животных, перенесших И/Р, которым была проведена внутривенная трансплантация МСКч, плотность микрососудистой сети пиальной оболочки была такой же, как и у ЛО крыс и на 14, и на 21 сут после И/Р.

В группе животных, перенесших И/Р головного мозга (без применения клеточной терапии), мы выявили значительное ухудшение реактивности пи-

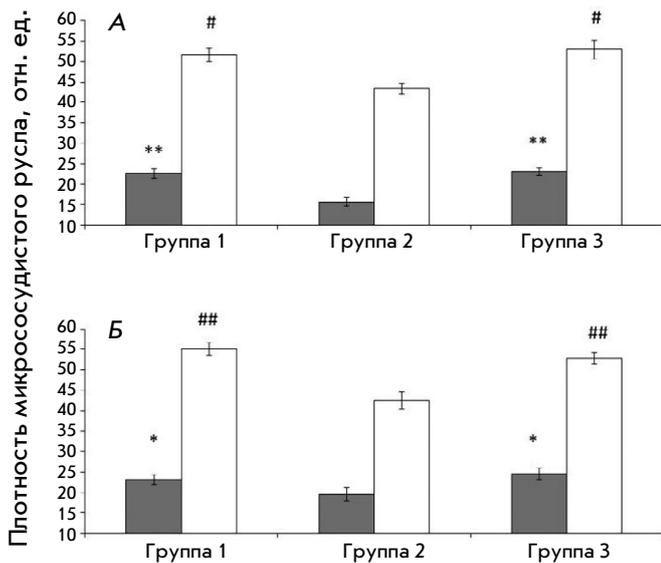


Рис. 1. Показатель плотности сосудистого русла пиальной оболочки сенсомоторной коры у экспериментальных животных. А – 14 сут после И/Р; Б – 21 сут после И/Р. Темная заливка – плотность артерий; светлая заливка – плотность всей сосудистой сети. По горизонтали – группы экспериментальных животных; по вертикали – показатель плотности микрососудистого русла (число сосудов/единицу площади). * – Отмечены изменения плотности артерий, значимые по сравнению с соответствующими изменениями у животных, перенесших И/Р. # – Отмечены изменения плотности всей сосудистой сети, значимые по сравнению с соответствующими значениями у животных, перенесших И/Р (*.# $p < 0.05$, **.## $p < 0.01$, критерий Тьюки)

альных артерий при аппликации на поверхность мозга ACh (рис. 2). У крыс из группы 2 число артериальных сосудов, ответивших расширением (увеличением диаметра) на воздействие ACh, через 14 сут было меньше по сравнению с ЛО-крысами в среднем в 1.8 раза; через 21 сут – в 1.3–2.1 раза.

В группе животных, которым МСКч были введены на 7 сут после И/Р, были получены следующие результаты. Через 14 сут после И/Р и соответственно через 7 сут после введения МСКч дилататорная реакция крупных пиальных артерий диаметром более 40 мкм была меньше, чем у ЛО-крыс в среднем в 1.3–2 раза, т.е. примерно такой же как у животных из 2-й группы. Число расширившихся при воздействии ACh артерий диаметром 20–40 мкм было меньше, чем у ЛО-крыс (в среднем в 1.3 раза), но больше, чем из группы 2 (в среднем в 1.4 раза). У самых мелких артерий диаметром менее 20 мкм выявлено полное восстановление дилататорной реакции на ACh до уровня ЛО крыс. Через 21 сут после И/Р (через 14 сут после введения МСКч) ре-

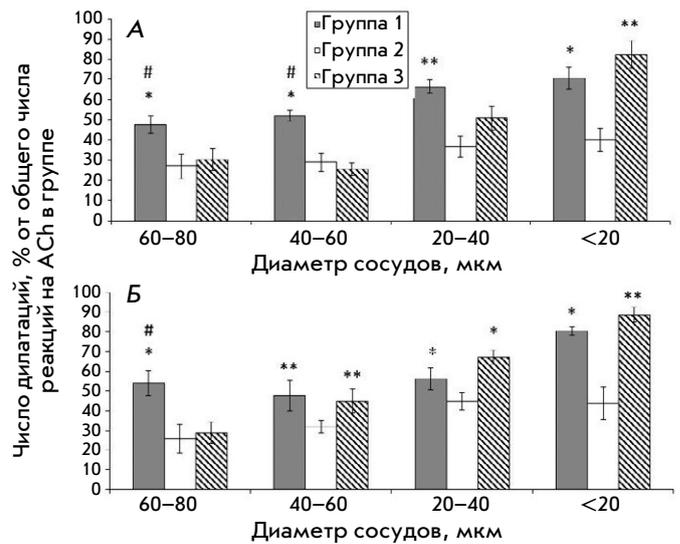


Рис. 2. Число пиальных артерий, ответивших дилатацией на воздействие ацетилхолина. А – 14 сут после И/Р, Б – 21 сут после И/Р. Темная заливка – ЛО-крысы, светлая заливка – крысы, перенесшие ишемию, косая штриховка – крысы, перенесшие ишемию, которым на 7 сут после И/Р проведена внутривенная трансплантация МСКч. По горизонтали – диаметр сосудов, по вертикали – число сосудов, расширившихся в ответ на воздействие ACh, % от общего числа реакций на ACh в группе. * – Изменения, значимые по сравнению с соответствующими значениями у животных, перенесших И/Р; # – значимые отличия от соответствующих значений у крыс после И/Р, которым внутривенная трансплантация МСКч проведена на 7 сут после И/Р (*.# $p < 0.05$, **.# $p < 0.01$, критерий Тьюки)

активность самых крупных артерий диаметром 60–80 мкм не восстановилась. Число дилатаций на воздействие ACh у артерий диаметром 20–60 мкм стало примерно таким же, как у ЛО-крыс; у сосудов диаметром менее 20 мкм этот показатель статистически значимо превышал число дилатаций у таких же артерий по сравнению с ЛО. По степени изменения диаметров (данные не показаны) не выявлено различий между группами животных.

Уровень П в ткани сенсомоторной коры через 14 сут у всех животных, перенесших И/Р головного мозга, оставался примерно таким же, как у ЛО-крыс (рис. 3). На 21 сут мы выявили значительное понижение П в среднем в 1.6 раза в группе № 2. У животных из групп клеточной терапии на 21 сут после ишемии также выявлено понижение П, но менее значимое – в среднем в 1.2 раза.

ОБСУЖДЕНИЕ

Внедрение клеточных технологий в практику требует разработки методов трансплантации МСК,

максимально удаленных от события транзиторной ишемии, ишемического инсульта, травмы головного мозга и т.д. Однако при лечении вышеназванных патологий головного мозга с помощью МСК нужно учитывать проницаемость гематоэнцефалического барьера для этих клеток. Опубликованы данные о повышении проницаемости гематоэнцефалического барьера в течение первых 7 сут после И/Р [10], что позволяет МСК после венозной трансплантации мигрировать в головной мозг. Экспериментально доказано, что МСК, введенные внутривенно через 24 ч после окклюзии средней мозговой артерии, мигрируют в поврежденную мозговую ткань и выявляются в стенках церебральных сосудов пенумбры [11]. В этой же тканевой зоне наблюдали повышение уровня фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1 α). МСК секретируют факторы, способствующие неоваскуляризации ткани: фактор роста фибробластов 2 (FGF-2), VEGF, трансформирующий ростовой фактор (TGF β), интерлейкины IL-6, IL-8, ангиогенин, фактор роста гепатоцитов (HGF), тромбоцитарный фактор роста (PDGF BB) [12]. Помимо активации ангиогенеза, МСК могут оказывать протекторное действие на клетки церебральных сосудов после ишемического инсульта [13, 14].

В данной работе нами показано, что плотность сосудистой сети пиальной оболочки у крыс, перенесших трансплантацию МСКч на 7 сут после И/Р, была примерно такой же, как у ЛО-животных (рис. 1) и на 14, и на 21 сут после ишемического воздействия. Известно, что после И/Р в ткани головного мозга формируются ишемизированные участки [6, 15, 16]. Тканевая ишемия стимулирует пролиферацию МСКч и усиливает их паракринную функцию [17]. При культивировании МСК в условиях пониженного содержания кислорода возрастает выработка этими клетками фактора роста эндотелия сосудов (VEGF) и фактора, индуцируемого гипоксией (HIF-1 α) [18]. Полагаем, что восстановление структуры сосудистой сети при трансплантации МСКч на 7 сут после И/Р в наших экспериментах произошло за счет активации ангиогенеза с помощью МСКч. Этот вывод подтверждается и реакцией пиальных артерий на воздействие ACh. Нами показано, что у крупных артерий диаметром более 60 мкм ACh-опосредованная дилатация не восстановилась ни на 14, ни на 21 сут (рис. 2). Дилататорная реакция у артерий диаметром 20–40 мкм на 14 сут была меньше, чем у контрольных животных. Вероятно, поврежденные эндотелиальные клетки в крупных сосудах не восстановились при введении МСКч через 7 сут после И/Р. Другое дело самые мелкие артерии диаметром менее 20 мкм: их реак-

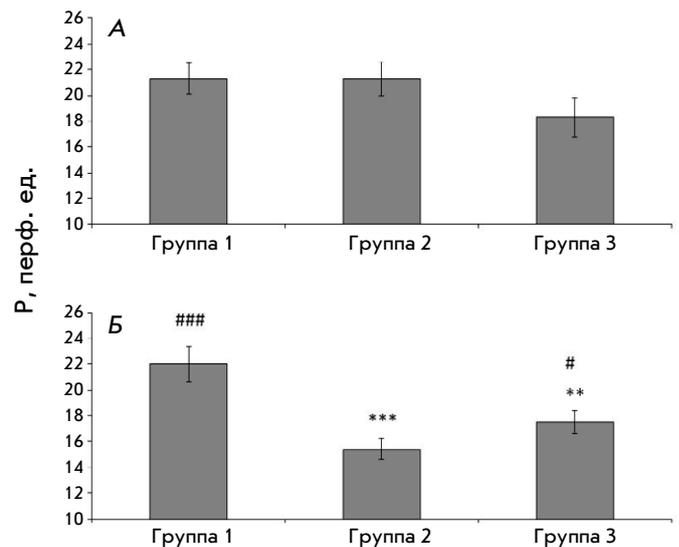


Рис. 3. Изменение показателя перфузии у ЛО и перенесших ишемию крыс. А – 14 сут после И/Р; Б – 21 сут после И/Р. По горизонтали – группы экспериментальных животных; по вертикали – показатель перфузии (перф. ед.). ** – Значимые отличия от соответствующих значений у ЛО-животных; # – значимые отличия от значений у крыс, перенесших ишемию (# $p < 0.05$, ** $p < 0.01$, *** $p < 0.001$, U-критерий Манна–Уитни)

тивность была такой же, как в контрольной группе уже на 14 сут (т.е. через 7 сут после введения МСКч). На 21 сут число дилатаций на воздействие ACh было статистически больше, чем в контрольной группе и группе клеточной терапии, проведенной в день И/Р. Это подтверждает активацию ангиогенеза в ишемизированной ткани головного мозга после трансплантации МСКч на 7 сут после И/Р. В этом случае имело место и паракринное терапевтическое воздействие на сосудистую стенку. Это видно на примере артерий диаметром 20–60 мкм, у которых реактивность к 14 сут после И/Р не восстановилась до уровня в контроле, а к 21 сут (через 14 сут после введения МСКч) была такой же, как в ЛО-группе (рис. 2). Вероятно, в этих сосудах функция эндотелиальных клеток была повреждена И/Р, но сами клетки не погибли и за счет того, что МСКч секретируют трофические факторы, смогли восстановиться [19, 20]. Например, повышенная выработка HIF-1 α может рассматриваться как терапевтическое воздействие после И/Р. HIF-1 α стимулирует в ишемизированной ткани повышение экспрессии генов, обеспечивающих адаптацию клеток к гипоксии, регулирующих сосудистый тонус, клеточную пролиферацию и апоптоз [21].

Восстановление структуры и функциональности сосудистой сети после И/Р очень важны для под-

держания скорости мозгового кровотока на физиологическом уровне. После кратковременной ишемической атаки, когда скорость кровотока в мозге резко понижена, реперфузия приводит к гиперемии. Через 7–14 сут скорость кровотока обычно снижается до исходного уровня, но не всегда. Для этого необходимо, чтобы нормализовались газовый состав крови (pO_2 и pCO_2), кислотно-щелочной баланс (pH), активировался вторичный ангиогенез, восстановилась сбалансированная выработка эндотелиальными клетками вазоконстрикторов и вазодилататоров [22]. Однако в реальной ситуации и к 21 сут после И/Р в головном мозге может наблюдаться понижение плотности микрососудистой сети, наличие эндотелиальной дисфункции (как в представленной работе), сдавливание просвета сосудов набухшими отростками астроцитов, внутрисосудистое скопление эритроцитов, тромбоцитов, лейкоцитов [23]. Эти факторы приводят к ухудшению церебрального кровообращения. Применение МСКч на 7 сут после И/Р позволило поддержать тканевую перфузию (интегральный показатель циркуляции крови) на более высоком уровне, чем у крыс, перенесших только И/Р (рис. 3).

ЗАКЛЮЧЕНИЕ

Итак, установлено, что внутривенная трансплантация МСКч на 7 сут после И/Р головного мозга приводит к хорошим терапевтическим результатам: у животных сохраняется/восстанавливается структура сосудистой сети в пиальной оболочке. Отсроченное на 7 сут от приступа транзиторной ишемии введение МСК позволяет провести необходимые процедуры по подготовке клеточного материала для трансплантации и полностью восстанавливает реактивность артерий в микроциркуляторном участке пиальной сосудистой сети. ●

Авторы выражают глубокую благодарность ООО «Транс-Технологии» и лично генеральному директору Д.Г. Полынцеву за предоставление клеточного материала для проведения исследования.

*Конфликт интересов отсутствует.
Работа выполнена при поддержке Госпрограммы 47 ГП «Научно-технологическое развитие Российской Федерации» (2019–2030), тема 0134-2019-0001.*

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

- Sato Y, Falcione-Juengert J, Tominaga T, Su H, Liu J. // Nat. Rev. Neurol. 2022. V. 11. № 18. P. 2823.
- Schaeffer S, Iadecola C. // Nat. Neurosci. 2021. V. 24. № 9. P. 1198–1209.
- Iadecola C. // Nat. Rev. Neurosci. 2004. V. 5. P. 347–360.
- Jaminon A, Reesink K, Kroon A, Schurgers L. // Int. J. Mol. Sci. 2019. V. 20. № 22. P. 5694.
- Tiedt S, Buchan A, Dichgans M, Lizasoain I, Moro M, Lo E. // Nat. Rev. Neurol. 2022. V. 18. № 10. P. 597–612.
- Sokolova I.B., Gorshkova O.P., Pavlichenko N.N. // Cell Tissue Biol. 2022. V. 16. № 1. P. 32–37.
- Lin Q, Tang X, Lin S, Chen B, Chen F. // Neural Regen. Res. 2020. V. 15. № 2. P. 324–331.
- Mushahary D, Spittler A, Kasper C, Weber V, Charwat V. // Cytometry A. 2018. V. 93. № 1. P. 19–31.
- Li X, Xie X, Yu Z, Chen Y, Qu G, Yu H, Luo B, Yifeng Lei Y, Li Y. // J. Cell. Physiol. 2019. V. 234. № 10. P. 18906–18916.
- Kangussu L.M., Almeida-Santos A.F., Fernandes L., Alenina N., Bader M., Santos R., Massensini A., Campagnole-Santos J. // Brain Res. Bull. 2023. № 192. P. 184–191.
- Sheikh A, Yano S, Mitaki S, Haque Md.A., Yamaguchi S, Nagai A. // Exp. Neurol. 2019. № 311. P. 182.
- Han Y, Yang J, Fang J, Zhou Y, Candi E, Wang J, Hua D, Shao C, Shi Y. // Signal Transduct. Target Ther. 2022. V. 7. № 1. P. 92.
- Afra S, Matin M. // Cell Tissue Res. 2020. V. 380. № 1. P. 1–13.
- Liu K, Guo L, Zhou Z, Pan M, Yan C. // Microvasc. Res. 2019. № 123. P. 74.
- Vrselja Z, Daniele S.G., Silbereis J, Talpo F, Morozov Y.M., Sousa A.M., Tanaka B.S., Skarica M., Pletikos M., Navjot Kaur N., et al. // Nature. 2019. V. 568. № 7752. P. 336–343.
- Cao L, Miao M, Qiao J, Bai M, Li R. // Saudi J. Biol. Sci. 2018. V. 25. № 6. P. 1170–1177.
- Yu H, Xu Z, Qu G, Wang H, Lin L, Li X, Xie X, Lei Y, He X, Chen Y, Li Y. // Cell Mol. Neurobiol. 2021. V. 41. № 3. P. 505–524.
- Xu W, Xu R, Li Z, Wang Y, Hu R. // J. Cell. Mol. Med. 2019. V. 23. № 3. P. 1899–1907.
- Gao Y, Chen H, Cang X, Chen H, Di Y, Qi J, Cai H, Luo K, Jin S. // Front. Cell Dev. Biol. 2022. № 10. P. 1016597.
- Liu Y, Zhao Y, Yu Min Y, Guo K, Chen Y, Huang Z, Long C. // Int. J. Stem. Cells. 2022. V. 15. № 2. P. 217–226.
- Han Y, Yang J, Fang J, Zhou Y, Candi E, Wang J, Hua D, Shao C, Yufang Shi Y. // Signal Transduct. Target Ther. 2022. V. 7. № 1. P. 92.
- Kang P, Ying C, Chen Y, Ford A.L., An H., Lee J. // Stroke. 2022. V. 53. № 5. P. 1570–1579.
- Bai J, Lyden P.D. // Int. J. Stroke. 2015. № 10. P. 143.

УДК 577.152.22, 547-305.2

Поиск ингибиторов транскетолазы из *Mycobacterium tuberculosis* в ряду сульфозамещенных соединений

И. В. Гуцина^{1*}, Д. К. Нилов^{2*}, Т. А. Щербакова², С. М. Балдин², В. К. Швядас^{1,2*}¹Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, факультет биоинженерии и биоинформатики, Москва, 119991 Россия²Московский государственный университет имени М.В. Ломоносова, НИИ физико-химической биологии имени А.Н. Белозерского, Москва, 119991 Россия

*Авторы, внесшие равный вклад в представленную работу.

*E-mail: vytas@belozersky.msu.ru

Поступило в редакцию 18.02.2023

Принято к печати 12.05.2023

DOI: 10.32607/actanaturae.15709

РЕФЕРАТ В результате компьютерного скрининга библиотеки сульфозамещенных соединений выявлены молекулы, способные связываться в активном центре транскетолазы из *Mycobacterium tuberculosis*. Осуществлена экспериментальная проверка ингибиторной активности наиболее перспективного соединения STK045765 в отношении высокоочищенного препарата рекомбинантного фермента. Показано, что молекула STK045765 конкурирует за участок связывания пирофосфатной группы кофактора тиаминдифосфата и в микромолярных концентрациях способна подавлять активность микобактериальной транскетолазы. Обнаруженный фурансульфонатный скаффолд может служить основой для создания противотуберкулезных препаратов.

КЛЮЧЕВЫЕ СЛОВА сульфонаты, сульфогруппа, ингибиторы, тиаминдифосфат, транскетолаза, микобактерии.

СПИСОК СОКРАЩЕНИЙ mbTK – транскетолаза микобактерий.

ВВЕДЕНИЕ

Лечение туберкулеза основано на продолжительной многокомпонентной химиотерапии и зачастую сопровождается развитием лекарственной устойчивости у *Mycobacterium tuberculosis*. В связи с этим чрезвычайно актуален поиск новых молекулярных мишеней и разработка препаратов, способных селективно подавлять развитие микобактерий. Анализ генома штамма H37Rv *M. tuberculosis* позволил установить метаболические пути, подавление которых может служить основой для разработки новых лекарственных средств. В частности, важное значение имеет пентозофосфатный путь и связанный с ним фермент транскетолаза (mbTK) [1, 2]. mbTK катализирует обратимый перенос двухуглеродного фрагмента субстрата-донора (кетосахар) на субстрат-акцептор (альдоза). Один из субстратов mbTK, рибозо-5-фосфат, используется для синтеза клеточной стенки микобактерий [3, 4]. В настоящей работе мы осуществили компьютерный скрининг способности сульфозамещенных соединений связываться в активном центре mbTK и эксперименталь-

ную проверку ингибиторных свойств отобранного наиболее перспективного кандидата.

ЭКСПЕРИМЕНТАЛЬНАЯ ЧАСТЬ

Молекулярная модель mbTK для докинга была получена на основе кристаллической структуры Zrim [4]. Атомы водорода добавляли с учетом ионизационных свойств аминокислотных остатков в программе AmberTools 1.2, затем их координаты оптимизировали в пакете Amber 12 [5] с использованием алгоритмов наискорейшего спуска и сопряженных градиентов. Библиотека сульфозамещенных соединений для скрининга была сконструирована на основе коммерческого набора низкомолекулярных соединений Vitas-M (<https://vitasmlab.biz>) с использованием структурного поиска по сульфогруппе в программе ACD/SpectrusDB (<https://www.acdlabs.com>). Соединения докировали в активный центр модели mbTK с помощью Lead Finder 1.1.16 [6]. Область поиска охватывала участок связывания кофактора тиаминдифосфата и субстрата [7]. При докировании отбирали соединения, способные

к образованию электростатического взаимодействия с ионом Mg^{2+} (для этого использовали Perl-скрипт структурной фильтрации), а также других благоприятных контактов.

Рекомбинантный белок mbTK получали с использованием плазмиды pET-19b с геном *Rv1449c* и штамма *Escherichia coli* BL21(DE3). Выделение и очистку белка проводили как описано ранее [8, 9]. Активность mbTK измеряли по сопряженной реакции восстановления NAD^+ , катализируемой глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназой из мышц кролика [10]. Система для измерения активности содержала: глицил-глицин (50 мМ), диэтиотреитол (3.2 мМ), арсенат натрия (10 мМ), хлорид магния (2.5 мМ), тиаминдифосфат (5 мкМ), ксилулозо-5-фосфат (140 мкМ), рибозо-5-фосфат (560 мкМ), NAD^+ (370 мкМ), глицеральдегид-3-фосфатдегидрогеназу (3 Е) и разные концентрации ингибитора STK045765 (0–1000 мкМ). Реакцию начинали добавлением раствора апоформы mbTK в реакционную смесь, инкубируемую в термостатируемой ячейке при pH 7.6 и 25°C. Скорость реакции регистрировали по увеличению оптической плотности раствора при 340 нм с помощью спектрофотометра Shimadzu UV-1800.

РЕЗУЛЬТАТЫ И ОБСУЖДЕНИЕ

В активном центре mbTK располагается кофактор тиаминдифосфат, а также ион Mg^{2+} [4]. Взаимодействие пирофосфатной группы с Mg^{2+} вносит существенный вклад в энергию связывания тиаминдифосфата и имеет важное значение для дизайна ингибиторов транскетолаз, которые для mbTK до проведения наших исследований не были известны.

В качестве возможного структурного миметика пирофосфатной группы, способного образовать электростатическое взаимодействие с ионами металлов, была выбрана сульфогруппа. Из библиотеки коммерчески доступных низкомолекулярных веществ извлечено 320 молекул с концевой (отрицательно заряженной) сульфогруппой и 563 молекулы с этерифицированной сульфогруппой. В результате докинга определены позиции связывающихся соединений этого класса в активном центре mbTK; полученные результаты были подвергнуты структурной фильтрации, учитывающей наличие прямого электростатического взаимодействия сульфогруппы с Mg^{2+} . При экспертном анализе позиций отобранных соединений идентифицированы пять соединений с концевой сульфогруппой (рис. 1), эффективно взаимодействующих с Mg^{2+} и окружающими остатками активного центра mbTK. Менее эффективные взаимодействия этерифицированных сульфонатов

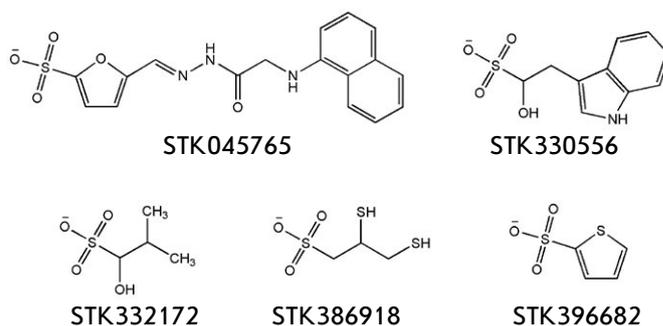


Рис. 1. Химические структуры потенциальных ингибиторов mbTK, отобранных в результате компьютерного скрининга

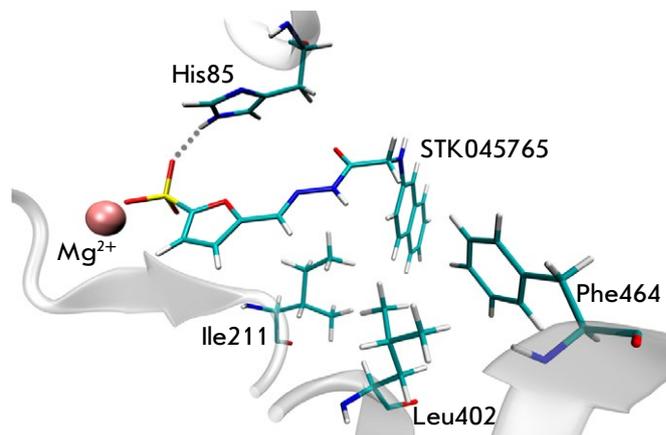


Рис. 2. Модель фермент-ингибиторного комплекса mbTK и STK045765. Сульфогруппа способна взаимодействовать с ионом Mg^{2+} и образовать водородную связь с остатком His85, гидрофобный бициклический структурный фрагмент комплементарен участку, сформированному остатками Ile211, Leu402 и Phe464. Рисунок подготовлен с использованием VMD 1.9.2 [11]

указывают на то, что для связывания ингибиторов в активном центре mbTK необходима отрицательно заряженная группа.

Для экспериментального тестирования ингибиторных свойств была отобрана молекула STK045765, образующая наиболее благоприятные связи и контакты при моделировании фермент-ингибиторных комплексов. В данной молекуле фурансульфонатный и нафталиновый фрагменты соединены гидразидным линкером. Отрицательно заряженная сульфогруппа STK045765 способна взаимодействовать с ионом Mg^{2+} и боковой цепью His85 (рис. 2) подобно пирофосфатной группе кофактора. Наряду с этим имеют место выгодные гидрофобные контакты бициклического структурного фрагмента STK045765 с боковыми цепями Ile211, Leu402 и Phe464. Экспериментальная проверка подтвердила

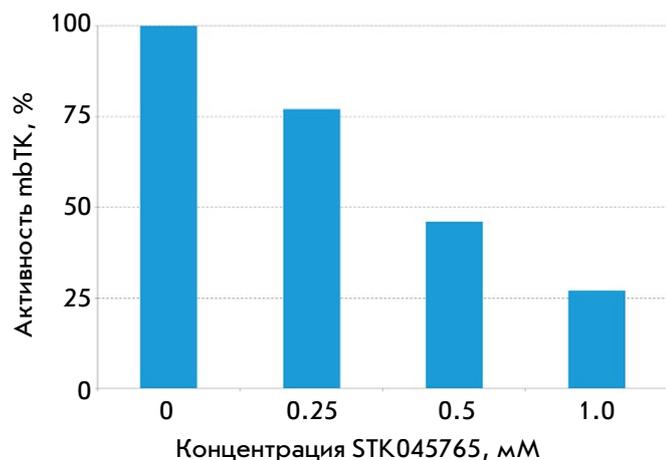


Рис. 3. Влияние ингибитора STK045765 на каталитическую активность mTAK

выводы молекулярного моделирования. При добавлении ингибитора в реакционную смесь обнаружено подавление активности mTAK: так в присутствии STK045765 в концентрации 1 мМ остаточная активность составила 27% (рис. 3).

ВЫВОДЫ

Компьютерный скрининг библиотеки сульфозамещенных соединений позволил идентифицировать потенциальные ингибиторы, способные связываться в активном центре mTAK и конкурировать с кофактором тиаминдифосфатом. Экспериментальная проверка одного из кандидатов (STK045765, содержащего фурансульфонатную группу) в отношении высокоочищенного препарата mTAK подтвердила, что соединения данного класса способны подавлять ферментативную активность. В результате проведенного исследования обнаружен первый (в своем классе) ингибитор mTAK, структура которого может стать основой для разработки более эффективных ингибиторов – прототипов противотуберкулезных препаратов. ●

Работа выполнена при финансовой поддержке Российского научного фонда (грант № 15-14-00069-П).

СПИСОК ЛИТЕРАТУРЫ

1. Cole S.T., Brosch R., Parkhill J., Garnier T., Churcher C., Harris D., Gordon S.V., Eiglmeier K., Gas S., Barry C.E., 3rd, et al. // Nature. 1998. V. 393. P. 537–544.
2. Kolly G.S., Sala C., Vocat A., Cole S.T. // FEMS Microbiol. Lett. 2014. V. 358. P. 30–35.
3. Wolucka B.A. // FEBS J. 2008. V. 275. P. 2691–2711.
4. Fullam E., Pojer F., Bergfors T., Jones T.A., Cole S.T. // Open Biol. 2012. V. 2. P. 110026.
5. Case D.A., Darden T.A., Cheatham T.E., 3rd, Simmerling C.L., Wang J., Duke R.E., Luo R., Walker R.C., Zhang W., Merz K.M., et al. AMBER 12. San Francisco: University of California, 2012.
6. Stroganov O.V., Novikov F.N., Stroylov V.S., Kulkov V., Chilov G.G. // J. Chem. Inf. Model. 2008. V. 48. P. 2371–2385.
7. Lüdtke S., Neumann P., Erixon K.M., Leeper F., Kluger R., Ficner R., Tittmann K. // Nat. Chem. 2013. V. 5. P. 762–767.
8. Щербакова Т.А., Балдин С.М., Шумков М.С., Гущина И.В., Нилов Д.К., Швядас В.К. // Acta Naturae. 2022. Т. 14. № 2. С. 93–97.
9. Мешалкина Л.Е., Соловьева О.Н., Ходак Ю.А., Друца В.Л., Кочетов Г.А. // Биохимия. 2010. Т. 75. С. 992–1000.
10. Kochetov G.A. // Methods Enzymol. 1982. V. 90. P. 209–223.
11. Humphrey W., Dalke A., Schulten K. // J. Mol. Graph. 1996. V. 14. P. 33–38.

ОБЩИЕ ПОЛОЖЕНИЯ

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

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

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

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

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

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

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

ОФОРМЛЕНИЕ РУКОПИСЕЙ

Рукопись должна быть построена следующим образом:

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

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

РЕКОМЕНДАЦИИ ПО НАБОРУ И ОФОРМЛЕНИЮ ТЕКСТА

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

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

ТРЕБОВАНИЯ К ИЛЛЮСТРАЦИЯМ

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

РЕЦЕНЗИРОВАНИЕ, ПОДГОТОВКА РУКОПИСИ К ПЕЧАТИ, ОЧЕРЕДНОСТЬ ПУБЛИКАЦИИ

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

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

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

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

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

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

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

ОФОРМЛЕНИЕ ССЫЛОК

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

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

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

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

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

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

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

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